Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko
Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko
Odbor rostlinolékařství ČAZV
Pícninářská komise ORV ČAZV
Agrární komora ČR

AKTUÁLNÍ POZNATKY V PĚSTOVÁNÍ, ŠLECHTĚNÍ, OCHRANĚ ROSTLIN A ZPRACOVÁNÍ PRODUKTŮ

Úroda 12/2024, vědecká příloha časopisu

Hlavní mediální partneři konference

Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko
Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko
Odbor rostlinolékařství ČAZV
Pícninářská komise Odboru rostlinné výroby ČAZV
Agrární komora ČR

Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů

Úroda 12/2024, vědecká příloha časopisu

Organizační výbor:

Ing. Barbora Badalíková – předseda
Ing. Pavel Kolařík
Ing. Jaroslav Lang, Ph.D.
Ing. Jakub Prudil
Ing. Karel Vejražka, Ph.D.
Mgr. Tomáš Vymyslický, Ph.D.

Vědecký výbor:

RNDr. Jan Nedělník, Ph.D. – předseda
Ing. Barbora Badalíková
doc. Ing. Bohumír Cagaš, CSc.
Ing. Jaroslav Čepl, CSc.
RNDr. Jan Hofbauer, CSc
Ing. Prokop Šmirous ml., Ph.D.
Ing. Pavel Kolařík
Ing. Petr Míša, Ph.D.
Ing. Jan Pelikán, CSc.
Ing. Karel Vejražka, Ph.D.
Mgr. Tomáš Vymyslický, Ph.D.

Příspěvky byly recenzovány členy vědeckého výboru

Doporučená citace příspěvků:
Autoři příspěvků: Název příspěvku. Úroda 12, roč. LXXII, 2024, vědecká příloha, s. od – do

ISSN 0139-6013

OBSAH

Úvodní slovo 7

ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN

Bartošová P., Klíma M., Rosokha H., Vítámvás P., Kosová K., Prášil I.T., Horal P.: Prašníkové kultury ve šlechtitelském procesu mrkve obecné seté (Daucus carota L. subsp. sativus) 9

Bilavčík A., Bobrová O., Zámečník J., Faltus M.: Porovnání mrazuvzdornosti generativních orgánů u vybraných ovocných dřevin v průběhu jejich jarního vývoje ... 17

Bjelková M., Mrázková M.: Nadějné genotypy olejného lnu 23

Bobrova O., Faltus M., Zámečník J., Bilavčík A.: Calorimetric study of apricot flower buds 31

Faltus M., Bilavčík A., Bobrova O., Zámečník J.: Využití termické analýzy pro kryokonzervaci genetických zdrojů rostlin 39

Frnková Ježková V., Macháč R.: Hodnocení odolnosti genových zdrojů lupiny bílé (Lupinus albus L.) vůči antraknóze 45

Golosna L., Bobrova O., Svoboda P., Faltus M.: In vitro kultivace chmele ve stresových podmínkách 51

Hauptvogel P., Hauptvogel, R., Panzarová, K., Matušíková, I., Varga, M.: Využitie moderných fenotypovacích techník pri skríningu pšenice v laboratórnych podmienkach 57

Jungová M. a Ovesná J.: Multiplexní sada primerů pro identifikaci rezistence proti Hyaloperonospora parasitica Pers. u Brassica oleracea L. pomocí SSR markerů 65

Klíma M., Bartošová P., Rosokha H., Vrbovský V., Baránek M.: Využití nanočástic v in vitro kulturách řepky olejky (Brassica napus L.) 73

Kosová K., Vítámvás P., Cit Z., Tom Prášil I. T., Nesvadba Z., Holubec V., Ovesná J.: Odezva vybraných genotypů planých ječmenů (Hordeum vulgare ssp. spontaneum, H. marinum) na sucho a zasolení na základě stanovení morfofyziologických charakteristik a akumulace dehydrinů 81

Ludvíková M., Dostálová R., Griga M.: Využití molekulárních markerů pro šlechtění hrachu setého (Pisum sativum L.) na odolnost vůči PEMV 89

Mrázková M., Bjelková M.: Výskyt Fusarium oxysporum f. sp. lini ve vybraných genotypech lnu setého (Linum usitatissimum L.) 97

Rosokha H., Klíma M., Vítámvás P., Kosová K., Prášil I.T., Balcar M.: Využití kultur izolovaných vajíček ve šlechtění řepy červené (Beta vulgaris var. vulgaris) 105

Trněný O., Dybová M., Řepková J., Šafář J.: Genetická diverzita genů fixace dusíku u jetele lučního (Trifolium pratense L.) 113

ROSTLINOLÉKAŘSTVÍ

Jílková B., Víchová J., Michutová M., Pokorný R., Kmoch M.: Testování účinnosti silic a jejich složek proti bakterii Pectobacterium atrosepticum na hlízách bramboru 121

Jílková B., Víchová J., Neoralová M., Sochorová A., Kmoch M.: Využití mikroorganismů a rostlinných extraktů v ochraně proti bakterii Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum 127

Kmoch M., Loubová V., Jílková B., Víchová J.: Antagonistická aktivita bakterií na patogen Dickeya solani, původce měkké hniloby hlíz a černání stonků bramboru 135

Kubíková Z., Sobotková J., Kintl A., Drda A.: Fytotoxicita herbicidně účinných látek ke komonici lékařské 143

Kumar R., Seidenglanz M., Horáček J.: Molekulární fylogenetické hodnocení biodiverzity hub v půdě v Olomouckém kraji: přístup založený na ITS.....149

Loubová V., Kmoch M.: Vnímavost vybraných odrůd bramboru s barevnou dužninou na Potato virus Y 157

Šafář J., Plachká E., Seidenglanz M.: Vliv insektofungicidních variant ošetření na zdravotní stav řepky ozimé.....165

Šafář J., Seidenglanz M., Plachká E.: Účinnost vybraných fungicidů na zdravotní stav slunečnice roční 171

Žabka M.: Skríning antifungálních vlastností vybraných rostlinných extraktů proti Monilinia laxa.....177

Žabka M.: Efekt majoritních složek silic fenyklu a anýzu proti Alternaria alternata, původci hnědé skvrnitosti bramboru 181

TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN, PŮDA A EKOLOGIE

Čunderlík J., Kizeková M., Vargová V.: Vplyv digestátu na primárnu produkciu trávneho porastu 185

Frei I., Vymyslický T., Raab S., Hlásná-Čepková P., Holubec V., Podrábský M., Vítámvás P.: Využití domácích genetických zdrojů rostlin pro ozelenění tramvajových točen a tratí 193

Frydrych J., Bradáčová L., Raab S., Macháč R., Gerndtová I., Andert D., Jezerská L.:Výzkum trav pro výrobu energie v souvislosti s nepotravinářským 203

Frydrych J., Bradáčová L., Raab S.: Nové herbicidy do množitelských porostů pohanky seté.....211

Hanzes Ľ., Britaňák N., Kizeková M, Vargová, V.: Hodnotenie produkcie a kvality trávneho porastu v podmienkach sucha.....217

Hlubina P., Hančinský R., Mihálik D., Hauptvogel P., Hauptvogel R., Matušíková I.: Aplikácia mykoríznych húb pre hodnotnejšie obilniny 223

Kinder A., Hlubina P., Matušíková I., Hauptvogel P..: Fenotypizáciou k selekcií pšenice s vyšším obsahom Zn v zrne 227

Kizeková M., Čunderlík J., Vargová V., Dugátová Z., Hanzes Ľ., Britaňák N., Jančová Ľ.: Vplyv manažmentu trávnych porastov na obsah pôdneho organického uhlíka.....231

Koprna R.1, Špíšek Z., Humplík J.F., Weger J., Mík V., Pospíšil T., Šolcová O., Dlasková M.: Využití hydrolyzátů z odpadních surovin v zemědělství a rekultivaci krajiny.....237

Král M., Dvořák P., Vršťala J.: Vliv nezapraveného kompostu na pěstování silážní kukuřice.....245

Kusá H., Růžek P., Vavera R., Kasal, P., Záruba J.: Půdoochranné postupy pro pěstování brambor na svažitých pozemcích.....251

Lhotská M., Haberle J., Raimanová I., Svoboda P., Wollnerová J.: Mezidruhové rozdíly v reakci rostlin pšenice na různou dostupnost vody.....259

Malá S., Jambor V., Vosynková B., Synková H.: Stanovení optimální doby sklizně porostu kukuřice pomocí bezpilotního dronu s multispektrální kamerou (DJI Mavic 3M) 265

Mühlbachová G., Růžek P., Kusá H., Vavera R.: Emise CO2 a zadržení vody po různém zpracování půdy 271

Mühlbachová G., Růžek P., Kusá H., Vavera R.: Emise CO2 po zapravení slámy a různých dusíkatých hnojiv 277

Nerušil P., Kincl D., Srbek J., Plisková J., Menšík L.: Výnosy silážní kukuřice zakládané půdoochrannými technologiemi do meziplodin na výrazně sklonitých pozemcích 283

Plisková, J., Pospíšilová, L., Nerušil, P., Menšík, L., Sedlák L.:Vliv heterogenních hnojiv na půdní organickou hmotu u intenzivně obhospodařovaných travních porostů 291

Prudil J, Badalíková B.: Komplexní pohled na digestát v kontextu udržitelného zemědělství 299

Rožnovský, J., Zahradníček P.: Proč systém BPEJ neodpovídá současnému podnebí 307

Rychlá A., Plachká E., Šafář J.: Posouzení vlivu modifikované agrotechniky na pěstování jarní a ozimé formy máku 315

Sedláková V., Dostálová R.: Hodnocení a porovnání vybraných znaků v kolekci genetických zdrojů cizrny beraní 323

Vašinka M., Badalíková B.: Vliv půdní aplikace bentonitu na výnos kukuřice seté (Zea mays L.) 329

Zemánek P., Burg P., Mašán V., Čížková A.: Hodnocení vybraných mechanicko-fyzikálních vlastností peletizovaného kompostu určeného pro oblast zahradnictví 337

KVALITA A ZPRACOVÁNÍ PRODUKTŮ

Dvořáček V., Jelínek M., Jágr M. Hermuth J.:Vybrané parametry pšenice tvrdé pěstované v klimatických podmínkách ČR 343

Dvořák P., Hradecká B., Pírová H., Satranský M., Král M., Vršťala J., Kouřimský T., Stará L., Capouchová I., Hajšlová J.: Vliv odrůdy a agroekologických podmínek na obsah volného asparaginu v zrnu různých druhů obilovin 353

Jambor V., Malá S., Synková H., Vosynková B.: Monitoring změn teploty konzervovaných krmiv a jejich aerobní stabilita 359

Loučka R., Homolka P., Jančík F., Kubelková P.: Vliv silážních přípravků na kvalitu siláže vojtěšky 365

Rysová J.: Obsah vybraných minoritních látek v jedlých květech planých rostlin 373

Sýkorová V., Jezerská L., Gelnar D., Prokeš R., Žídek M., Frydrych J.: Metody charakterizace energetických travin 379

Úvodní slovo

Multioborovost a tradice, tradice a multioborovost. To jsou dva aspekty, které jsou dle mého názoru spojeny se souborem prací, které se nyní dostávají k Vám, čtenářům časopisu Úroda. V Brně se již po 28 konala v listopadu mezinárodní konference, jejímž hlavním znakem je právě multioborovost. Čtyři sekce zaměřené na šlechtění rostlin, rostlinolékařství, technologie pěstování a v neposlední řadě technologie výroby potravin a kvality se pravidelně opakují již desetiletí. Vždy jsou naplněny příspěvky kolegů z tuzemska i zahraničí, které přinášejí posluchačům a nyní i Vám, čtenářům, vždy nejnovější poznatky v daných oblastech. Jsem vděčný vydavatelství ProfiPress, že již dlouhá léta tento sborník vychází i jako vědecká příloha časopisu Úroda. S rozvojem informatiky a technologií jsme se i ve sdílení informací posunuli od vkládaných CD až po dnešní čtení příspěvků přes přiložený QR kód. Letošní sborník je také dedikován k 30. výročí od privatizace Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s r.o. Troubsko.

Konference a z ní vydávané sborníky, v nichž jsou vždy všechny práce recenzovány členy vědeckého výboru, za což jim patří velký dík, vlastně začaly hned po privatizaci. Již v té době jsme si uvědomovali nutnost spolupráce, nutnost výměny informací a transferu výzkumných výsledků do praxe. Dnes se o transferu hodně hovoří jako o jednom ze slabých míst českého výzkumného ekosystému. Prostřednictvím časopisu Úroda se ke čtenářům dostala za ta dlouhá léta velmi početná řada informací a výsledků, o nichž u mnohých jsem přesvědčen i o jejich úspěšné praktické realizaci. Rád bych poděkoval všem autorům, kteří přispěli do letošního sborníku. Pestrá paleta témat svědčí jednak o diverzitě zemědělství a o nutnosti přinášet inovace v mnoha oborech, na kterých je zemědělství a potravinářství postaveno. Objevují se témata do určité míry tradiční, ale také zcela nová. Využívání genomických technik ve šlechtění, snaha o zefektivnění výběru šlechtitelského materiálu s požadovanými vlastnostmi je jeden okruh. Rostlinolékařská problematika je také velmi široká, objevují se příspěvky popisující nanočástice v ochraně rostlin, ale také popis varovných signálů např. v oblasti stále se zvyšujícího se počtu škodlivých činitelů s narůstající rezistencí vůči účinným látkám přípravků na ochranu rostlin. Technologie pěstování jsou stále více ovlivňovány aplikacemi principů SMART zemědělství, využití dálkového průzkumu země apod. A určitě jako konzumenty nás zajímá kvalita potravin, inovace v technologiích jejich zpracovávání a uchovávání i hledání potravin nového typu. Závěrem mi dovolte poděkovat dlouholetým partnerům konference, kterými jsou Ministerstvo zemědělství, Agrární komora ČR, Česká akademie zemědělských věd a hlavní mediální partner nakladatelství ProfiPress. Velmi si této spolupráce vážím.
Vážení čtenáři přeji Vám inspirativní čtení a všichni autoři doufají, že Vás i jejich výzkumné výsledky zaujmou a hlavně, že budou uplatněny v praktickém životě.

Jan Nedělník

1. Šlechtění rostlin

Prašníkové kultury ve šlechtitelském procesu mrkve obecné seté *(Daucus carota L. subsp. sativus)*

Anther cultures in the breeding proces of carrot

(*Daucus carota* L. subsp. *sativus*)

Bartošová P.[1], Klíma M.[1], Rosokha H. [1], Vítámvás P.[1], Kosová K.[1], Prášil I.T.[1], Horal P.[2]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.;*

[2]*MORAVOSEED CZ, a.s., šlechtitelská stanice Svijanský Újezd*

Abstrakt

Byla zavedena metoda prašníkových kultur u mrkve seté (*Daucus carota* L.) a úspěšně regenerovány celistvé rostliny šlechtitelského materiálu C6/23. Nejlepší varianta z hlediska regenerace embryí byla aplikace chladového předpůsobení po dobu 4 dnů (4° C, světlo) na odebraná květenství, kdy bylo u výše uvedeného genotypu dosaženo regenerace embryí u 16,5 % kultivovaných prašníků. U dalších tří genotypů bylo dosaženo převážně pouze somatické regenerace z nitek prašníků. Na základě srovnání typu převažující regenerace u výše uvedeného materiálu je důvodný předpoklad (na základě srovnání typu regenerace s již publikovanými zdroji), že šlo o regeneraci androgenetickou. To bude ale jednoznačně potvrzeno až molekulárními analýzami homozygotnosti a flowcytometrickými analýzami ploidie v navazujících experimentech.

Klíčová slova: *in vitro* regenerace, embrya, regenerace celistvých rostlin, chladové předpůsobení

Abstract

The method of anther cultures was introduced for carrot (*Daucus carota* L.) and successfully regenerated whole plants of breeding material C6/23. The best variant from the point of view of embryo regeneration was the application of cold pre-exposure for 4 days (4 °C, light) to the collected inflorescences, when 16.5% of responsive anthers were achieved for the above-mentioned genotype. For the other three genotypes, mostly only somatic regeneration from anther filaments was achieved. Based on a comparison of the predominant type of regeneration in the above-mentioned material, it is reasonable to assume (based on a comparison of the type of regeneration with already published sources) that it will be an androgenetic regeneration. This will be unequivocally confirmed only by molecular analyzes of homozygosity and flow cytometric analyzes of ploidy in follow-up experiments.

Keywords: *in vitro* regeneration, embryos, whole plant regeneration, cold exposure

Úvod

Mrkev obecná setá (*Daucus carota* subsp. *sativus*, dále i jen mrkev) patří mezi naše významné a tradičně pěstované kořenové zeleniny. Osevní plochy mrkve se v ČR stabilně pohybují okolo 900 ha (905 ha v r. 2022). Mrkev také patří mezi nejvíce pěstované druhy v rámci tzv. Integrované produkce zeleniny (IPZ). Mrkev byla v roce 2021 z hlediska sklizně (44 tis. t) naší třetí nejvýznamnější zeleninou hned po cibuli (59 tis. t) a zelí hlávkovém (45 tis. t). Z hlediska spotřeby se jedná o naši nejdůležitější kořenovou zeleninu; její obliba průběžně stoupá, v roce 2021 dosáhla tuzemská konzumace 8,2 kg/osobu, což ji řadí na čtvrté místo za rajčata (12,6), cibuli (12,3) a melouny (8,9 kg) (Buchtová a Němcová 2022).

Tato zelenina má specifickou technologii šlechtění, danou jejím genetickým pozadím. Z důvodu cizosprašnosti jsou tradiční odrůdy mrkve výsledkem populačního šlechtění, které s sebou vždy nese určitou míru nevyrovnanosti jednotlivých odrůd. Pokusy o snížení variability

pomocí samosprašování vedou k tzv. inbrední depresi, která se mj. projevuje výrazným snížením vitality a výnosu. Např. Stein a Nothnagel (1995) uvádějí, že vlivem inbrední deprese došlo po první generaci samosprašování u sedmi odrůd mrkve k průměrnému snížení výnosu kořene o 50,5 % a výnosu semen až o 72,8 %. Východiskem k dosažení kompromisu mezi vyrovnaností, vitalitou a výnosem je křížení nepříbuzných, opakovaným samosprašováním stabilizovaných inbredních populací, kdy je díky heteróznímu efektu do určité míry kompenzován vliv inbrední deprese, indukované při tvorbě výchozích hybridních komponent (tj. částečně ustálených populací). V současnosti je tak u mrkve (na rozdíl od celeru, petržele a pastináku, kde přetrvává šlechtění populační) u nás i ve světě dominantním způsobem šlechtění hybridní, založené na cytoplazmatické sterilitě.

Konvenční metody získávání ustálených populací či linií ale vyžadují opakovaný proces samosprašování vybraných rostlin, což je časově i finančně náročný postup z důvodu mnoha generačních cyklů, nutnosti izolace rostlin a negativních důsledků již zmíněné inbrední deprese. K rychlejšímu ustálení šlechtitelských materiálů lze v současnosti využít biotechnologické *in vitro* postupy, založené na indukci haploidů a následně dihaploidů (DH) androgenezí nebo gynogenezí. Technologie dihaploidů má v současnosti velký význam ve šlechtitelských programech řady hospodářsky významných plodin z následujících důvodů: (1) vznikají zcela homozygotní genotypy, čehož často není možné dosáhnout konvenčními postupy; (2) čas potřebný k získání homozygotních rostlin (obvykle jedna generace) je podstatně kratší ve srovnání s opakovaným procesem samoopylení (několik generací); (3) selekce v populaci DH rostlin je přesnější a účinnější, a to zejména u recesivně založených znaků u cizosprašných plodin; (4) pro vyšlechtění odrůdy pomocí DH systému postačí relativně malá výchozí populace DH rostlin, protože frekvence požadovaných gamet je vždy vyšší než frekvence odpovídajících rostlin v F_2 generaci; (5) získané DH genotypy jsou homozygotní ve všech lokusech a mohou se tak stát novou liniovou odrůdou (zejména u samosprašných plodin), popř. novými rodičovskými liniemi k produkci hybridních odrůd u plodin cizosprašných (podrobnější informace viz přehledový článek Kielkowska a Kiszczak 2023). I když se inbrední deprese manifestuje i při technologii dihaploidů, silný selekční tlak během *in vitro* kultivace a regenerace eliminuje neživotné genotypy a umožňuje získat životaschopné rostliny (Bohanec 2002).

První úspěšné experimenty se získáním haploidních i dihaploidních rostlin z nezralých pylových zrn v prašníkových kulturách mrkve byly publikovány v devadesátých letech minulého století výzkumnými týmy v Japonsku, Německu a Rusku. V posledních dvou dekádách výzkum v této oblasti akceleruje zejména v Polsku, kde se postupně podařilo v prašníkových kulturách získat dihaploidní regeneranty s ověřenou ploidií i homozygotností jak z embryogenního kalusu, tak i přímo z androgenetických embryí (např. Adamus *et al.* 2003, Górecka *et al*. 2009, Kiszczak *et al.* 2011, 2015,2021).

Cílem práce bylo uvést výsledky prvního roku řešení projektu MZE NAZV QL24010202 v oblasti indukce androgeneze *in vitro* a následné regenerace rostlin u mrkve obecné seté.

Materiál a metody

Zjarovizované donorové rostliny (čtyři šlechtitelské materiály C4/23, C6/23, C8/23 a C20/23) mrkve obecné seté byly napěstovány a průběžně udržovány ve skleníkových podmínkách firmou MORAVOSEED CZ, a.s. na pracovišti Svijanský Újezd, viz obr.1. Ještě před rozvitím nebo na počátku kvetení prvních květů ve vnějších okolíčcích byla celá květenství (okolík) i se stopkou o délce cca 100–150 mm odebrána a po dobu transportu udržována v cestovní chladničce v polyetylenových sáčcích s malým množstvím vody tak, aby nedošlo ke smáčení poupat. Květenství byla následně udržována v nádobách s vodovodní vodou v chladové komoře (3–5°C, fotoperioda 12 hod., světelná intenzita 100 μmol/m^2/s). Optimální velikost (průměr) poupat pro odběry byla stanovována před každým opakováním mikroskopicky (Olympus CKX

41, objektiv 40x) tak, aby převažující zastoupení nezralých pylových zrn (mikrospor) v prašnících bylo ve středně až pozdně jednojaderném – časně dvoujaderném stádiu, kdy vakuola vyplňuje minimálně 50 % objemu mikrospory, ale zároveň ještě nejsou patrná škrobová zrna v cytoplazmě (obr. 3). Před založením prašníkových kultur byly z květenství odebírány jednotlivé okolíčky i se stopkou (15 ks na opakování, obr. 2) a přeneseny do sterilního laminárního boxu. Následovala dvoufázová povrchová sterilizace, nejprve 70% vodným roztokem etanolu po dobu 2 minut, poté 10% roztokem komerčního bělidla (SAVO) na bázi chlornanu sodného po dobu 12 minut (umístění okolíčků v uzavřené 50ml kádince na orbitální třepačce, 200 RPM). V laminárním boxu následovaly 3 cykly oplachování (5–5–5 minut) ve sterilní, vychlazené destilované vodě. Okolíčky byly po posledním cyklu ponechány v kádince s destilovanou vodou, z vnějšku průběžně chlazenou ledovou drtí. Poupata byla z okolíčků odebírána a prašníky izolovány preparační jehlou a jemnou pinzetou pod sterilní binokulární lupou (M3B Wild). V každém ze dvou opakování bylo u každého genotypu a varianty chladového předpůsobení (viz níže) odebráno 500 ks prašníků pokud možno s co nejkratší částí nitky (obr. 4 uprostřed), kultivovaných po 50 ks na povrchu agarem zpevněného indukčního média (IMM, Kiszczak *et al.* (2021)) v 60mm Petriho miskách. Počáteční kultivace probíhala ve tmě (teplota 27 ± 1°C) až do fáze plně vyvinutých kotyledonárních embryí (obr. 16) , regenerujících v místě otevření prašných váčků (obr. 8). Jednotlivá embrya nebo celé prašníky s kotyledonárními embryi byly poté pasážovány na regenerační médium v 60mm Petriho miskách (REM, Kiszczak *et al.* (2021)) a kultivovány při teplotě 18 ± 1°C, světelné intenzitě 300 µmol/m^2/s a 16h fotoperiodě. Embrya, regenerující první pravé listy s kořínkem, dlouhým minimálně 30 mm, byla pasážována na povrch čerstvého regeneračního média v 50ml Erlenmayerových baňkách.

Byla sledována a vyhodnocena průměrná frekvence a typy regenerace z prašníků nebo dalších pletiv v závislosti na genotypu a na délce udržování květenství v chladové komoře (0, 4, 14, 21 nebo 42 dnů)

Výsledky

Některé prašníky začaly od počátečních fází kultivace nabývat na objemu a postupně docházelo k jejich prasknutí a otevření podél švů prašných váčků (obr.). Ostatní prašníky se nezvětšovaly a postupně nekrotizovaly (obr). První globulární embrya (průměr 100–150 µm) začala být viditelná mezi 18.–22. dnem kultivace v místech, kde došlo k prasknutí prašných váčků (obr. 5–7). Embrya svou bazální částí zůstávala spojena s prašníkem, další jejich růst a vývoj probíhal mimo prašník (obr. 8). Po 30. dnu od založení kultury už nebyla pozorována další nová embrya tohoto typu regenerace. Jen výjimečně docházelo k růstu embryí do pokročilejší fáze uvnitř prašníku. Vývoj embryí byl značně nerovnoměrný, na jednom prašníku byly v jeden okamžik embrya od kotyledonárních po globulární (např. obr. 8, 10, 16) Zároveň docházelo i k tvorbě kalusu nebo embryí ze somatických pletiv, především v místech, kde došlo k odtržení nitky prašníku z květu (obr. 15). Byly zjištěny výrazné genotypové rozdíly jak ve frekvenci, tak ve způsobu regenerace (viz tabulka 1). Bylo možno rozlišit několik základních typů: A) regenerace embryí v místech otevření prašníků (obr. 6–8), B) regenerace kalusu v místech otevření prašníku, s případnou regenerací embryí z kalusu (obr. 9, 10), C) regenerace embryí na povrchu viditelně neotevřeného prašníku v místech švu prašného váčku (obr. 14). a D), regenerace kalusu z porušené nitky prašníku s případnou regenerací somatických embryí (obr. 15, 21). Dále byly pozorovány i typy regenerace kombinovaného nebo nejasného původu (obr. 9–13). Naopak nebyla pozorována regenerace kalusu nebo přímo somatických embryí z neporušeného epitelu nitek nebo prašníků.

Nejproduktivnější z hlediska regenerace typu A byl materiál C6/23, kde bylo zaznamenáno v průměru 16,5 % prašníků u optimální varianty chladového předpůsobení (4 dny), tvořících embrya v místě otevření prašných váčků. U ostatních genotypů byl tento typ regenerace

výjimečný, u genotypu C8/23 nebyl pozorován (tabulka 1). Typ regenerace B byl v průměru mnohem méně častý a byl zaznamenán u všech genotypů. Regenerace typu C se vyskytla v součtu u tří prašníků (genotyp C6/23). U žádného z genotypu ani variant předpůsobení nebyla zaznamenána tvorba kalusu z epidermálních buněk prašníku nebo neporušeného epidermálního pletiva nitky. Regenerace kalusu ze somatických pletiv a následná regenerace embryí z kalusu se vyskytovala u všech genotypů, nejčastější byla u materiálu C4/23. Z hlediska morfologie byla embrya z různých typů regenerace srovnatelná (viz porovnání morfologie a regenerace na obrázcích 16–20 se sérií obrázků 21–26).

Tabulka 1: Typy a frekvence regenerace u jednotlivých materiálů a variant chladového předpůsobení v prašníkových kulturách mrkve seté

Chladové předpůsobení	**Materiál**	**Typ regenerace**			
[dny]		A	B	C	D
0	C4/23	-	-	-	++++
	C6/23	+++	+	-	+
	C8/23	-	+	-	+
	C20/23	-	-	-	+
4	C4/23	+	+	-	++++
	C6/23	++++	+	+	+
	C8/23	-	-	-	+
	C20/23	+	+	-	+
14	C4/23	-	-	-	++
	C6/23	++	++	+	++
	C8/23	-	-	-	-
	C20/23	-	-	-	-
21	C4/23	-	-	-	++
	C6/23	+	++	-	++
	C8/23	-	-	-	-
	C20/23	-	-	-	-
42	C4/23	-	-	-	+
	C6/23	+	+	-	++
	C8/23	-	-	-	-
	C20/23	-	-	-	-

Průměrná regenerační schopnost: - bez regenerace, + do 1 ks, ++ 2–5 ks, +++ 6–10, ++++ 11 a více prašníků nebo nitek v Petriho misce regenerovalo kalus a/nebo embrya; Typy regenerace: A – regenerace embryí v místech otevření prašníků; B – regenerace kalusu v místech otevření prašníku, s případnou regenerací embryí z kalusu; C – regenerace embryí na povrchu viditelně neotevřeného prašníku v místech švu prašného váčku; D – regenerace kalusu z nitky prašníku s případnou regenerací somatických embryí

Co se týče vlivu chladu na frekvenci regenerace, varianta bez chladového předpůsobení a varianta 4 dny chladu se ukázaly jako nejúspěšnější z hlediska všech typů regenerace u všech genotypů; od 14. dne chladu frekvence regenerace postupně klesala (tabulka 1). Zajímavý průběh byl u genotypu C6/23, kde frekvence regenerace embryí z otevřených prašníků od 14. dne klesala, ale frekvence tvorby kalusů ze somatických pletiv naopak vzrostla a následně stagnovala až do varianty s nejdelším chladovým předpůsobením.

Po přepasážování kotyledonárních embryí, tvarem připomínajících amforu (obr. 16), na regenerační médium a přenesením na světlo, tato začala rapidně nabývat na velikosti, zezelenala (obr. 25) a začala tvořit kořenový systém (obr. 17, 18) a v některých případech docházelo k regeneraci prvních pravých listů (obr. 19, 20). Čím méně vyvinutá embrya (např. raně kotyledonární, torpédovitá, srdčitá, globulární) byla pasážována na regenerační médium, tím obtížnější byla následná regenerace a častěji regenerovaly vitrifikované rostliny. Regenerace celistvých rostlin z embryí do fáze několika pravých listů a rozvinutého kořenového systému byla dosažena u materiálů C4/23 a C6/23 po 4 měsících od založení kultur (obr. 20 a 26). U

obou materiálů byly získány rostliny regenerací typu A i D (obr. 27, 28). Nebyly zjištěny rozdíly ve způsobu a rychlosti regenerace celistvých rostlin z embryí, získanými různými typy regenerace, pokud tyto dosáhly obdobné morfologie.

Diskuze

Z hlediska regenerace embryí byly zjištěny velké genotypové rozdíly. Podobné výsledky dosáhl např. i Li *et al.* (2013), kde ze 45 genotypů bylo dosaženo regenerace embryí jen u 16 z nich. Kiszczak *et al.* (2018) uvádí, že lepších výsledků bylo dosaženo při pěstování donorových rostlin v kontrolovaných podmínkách, kdy bylo dosaženo 18,8 % responzibilních prašníků. V našich experimentech jsme dosáhli obdobného výsledku (16,5 %) u nejlepšího genotypu i při jeho udržování ve skleníkových (nekontrolovaných) podmínkách. Po srovnání našich výsledků z hlediska typů regenerace s obrazovou dokumentací v experimentech Hu *et al.* (1993) lze důvodně předpokládat, že typ regenerace A, kterého jsme u tohoto materiálu dosáhli, se shoduje s typem regenerace, u kterého výše zmínění autoři získali haploidní (tj. z mikrospor pocházející) regeneranty v prašníkových kulturách. Obdobná byla i frekvence responzibilních prašníků (15 % vs. 16,5 % v našich experimentech).

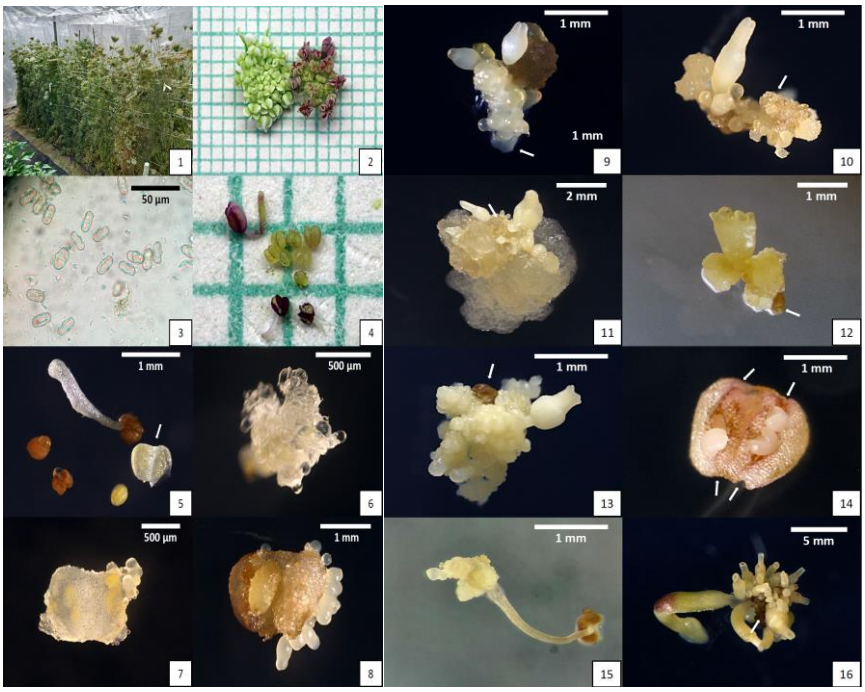
Závěr

Bylo ověřeno, že pomocí optimalizačních zásahů u již publikovaného postupu lze indukovat různé typy regenerace u různých genotypů v prašníkových kulturách mrkve seté a regenerovat celistvé rostliny. I když byly získány rostliny i z embryí, regenerovaných přímo z vnitřních pletiv prašníků (typ regenerace A), v této fázi experimentů nelze ještě jednoznačně prohlásit, že jde o regeneraci požadovanou, tj. androgenetickou (z mikrospor) a v jaké frekvenci. To bude potvrzeno až molekulárními analýzami homozygotnosti a flowcytometrickými analýzami ploidie (potvrzení 100% homozygotnosti resp. přítomnosti haploidů).

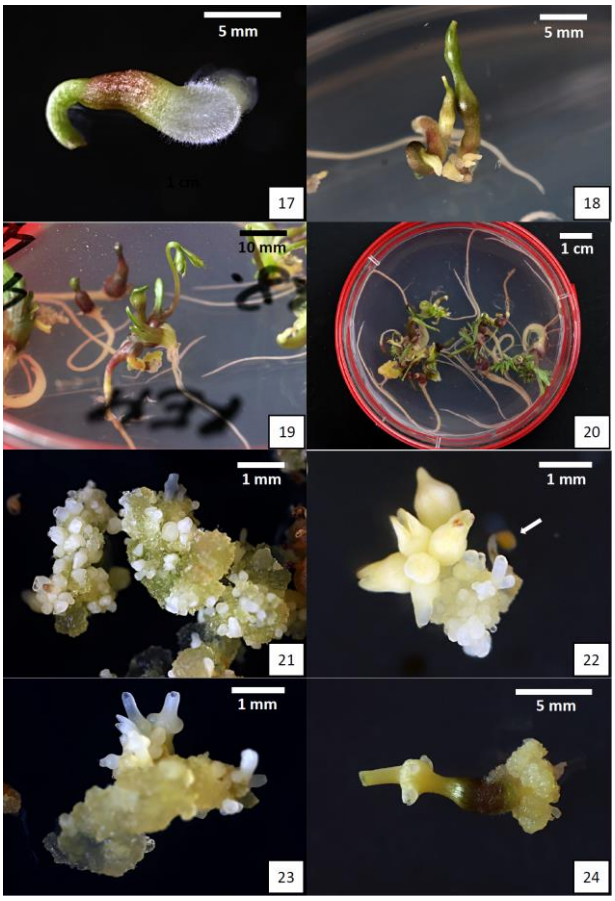
Poděkování

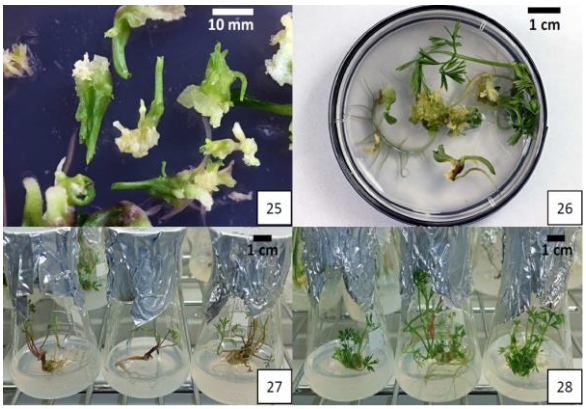
Prezentované výsledky byly získány za finanční podpory projektů Ministerstva zemědělství České republiky, MZE NAZV QL24010202.

Příloha:



Obrázek 1 – donorové rostliny mrkve seté ve skleníku na pracovišti Svijanský Újezd; 2 – okolíčky před povrchovou sterilizací: materiál C4/23 a C6/23; 3 – Mikrospory v pozdně jednojaderném až časně dvoujaderném stádiu, kdy vakuola vyplňuje většinu objemu mikrospor; 4 – Izolované prašníky optimálního stádia (uprostřed), prašník se zralými pylovými zrny (nahoře), prašníky po uvolnění části pylu (dole); 5 – prašníky na IMM médiu po 15 dnech kultivace (responzibilní prašník označen šipkou) ; 6 – Pletivo s globulárními embryi po uvolnění z prasklého prašníku (17 dní kultivace); 7 – Globulární embrya na okrajích prasklého prašníku (20 dní kultivace); 8 – Globulární až časně kotyledonární embrya 30. den kultivace; Obrázky 2 a 3: rozměry nejmenších čtverců na podkladu: 1 x 1 mm**;** Obrázek 9 – Globulární až časně kotyledonární embrya na okraji prasklého prašníku materiálu C6/23 (ve spodní části šipkou označen kalus v počáteční fázi růstu); 10 – Typ regenerace A a B u materiálu C6/23: přímá tvorba embryí + kalus z vnitřních pletiv prašníku; 11 – Kombinovaný typ regenerace u materiálu C6/23: A + nejasný zdroj tvorby kalusu(-ů) (z vnitřních pletiv prašníku a/nebo z nitky; prašník označen šipkou); 12 – Kotyledonární embryo, regenerující z kalusu nejasného původu (materiál C8/23, prašník označen šipkou); 13 – Globulární a kotyledonární embrya, regenerující z kalusu nejasného původu (materiál C20/23, prašník označen šipkou); 14 – Srdčitá embrya v místech švů prašných váčků (průběh švů označen šipkami; materiál C6/23); 15 – Regenerace kalusu a následně embrya z pletiv nitky, porušených při odběru prašníku (materiál C20/23); 16 – Prašník s kotyledonárními embryi 10 dní po přepasážování na regenerační médium (materiál C6/23, prašník označen šipkou)





Obrázek 17 – kotyledonární embryo materiálu C6/23 na počátku regenerace kořenového systému; 18 – Kotyledonární embrya materiálu C6/23; 19 – Regenerace prvního pravého listu z embrya materiálu C6/23 tři měsíce po založení kultury; 20 – Embrya materiálu C6/23 s pravými listy a s dobře vyvinutým kořenovým systémem před pasážováním na čerstvé regenerační médium; 21 – Masivní tvorba somatických embryí z kalusu na indukčním médiu u materiálu C4/23; 22 – Kotyledonární embrya na kalusu, regenerující z nitky prašníku (prašník označen šipkou, materiál C6/23 na regeneračním médiu); 23 – Kotyledonární somatická embrya s počáteční tvorbou sekundárních embryí (materiál C4/23); 24 – Kotyledonární somatické embryo se sekundárními embryi na regeneračním médiu (materiál C4/23); Obrázek 25 – kotyledonární somatická embrya materiálu C4/23 na regeneračním médiu 3 měsíce po založení prašníkové kultury; 26 – Somatická embrya materiálu C4/23 s pravými listy a s dobře vyvinutým kořenovým systémem před pasážováním na čerstvé regenerační médium; 27 – Celistvé rostliny materiálu C6/23 původem z embryí, regenerujících z prašníku (typ A), po 4 měsících od založení kultury (regenerační médium); 28 – Celistvé rostliny materiálu C4/23 původem ze somatických embryí na regeneračním médiu, 4 měsíce po založení kultury

Literatura

Adamus A., Michalik B., 2003: Anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). Folia Hort. 15: 49–58.

Bohanec B. 2002: Doubled haploid in onions. Allium Crop Science: Recent Advances, pp 145–58. Rabinowitch HD, Currah L (Eds). CABI Publishing, Wallingford, UK.

Buchtová I., Němcová V., 2022: Situační a výhledová zpráva – zelenina. Ministerstvo zemědělství. https://mze.gov.cz/public/portal/-q368427---xX1ZT9D_/zelenina-12-2022

Górecka K., Krzyzanowska D., Kiszczak W., Kowalska U., Górecki R. 2009: Carrot Doubled Haploids. In Advances in Haploid Production in Higher Plants; Touraev, A., Forster, B.P., Jain, S.M., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009; pp. 231–239.

Hu K.L., Matsubara S., Murakami K. 1993: Haploid plant production by anther culture in carrot (*Daucus carota* L.). J. Jap. Soc. Hort. Sci. 62: 561–565.

Kiełkowska A., Kiszczak W 2023: History and Current Status of Haploidization in Carrot (*Daucus carota* L.). Agronomy13: 676. https://doi.org/10.3390/ agronomy13030676 .

Kiszczak W., Burian M., Kowalska U., Górecka K. 2021: Production of Homozygous Carrot (*Daucus carota* L.) Plants by Anther Culture. Methods Mol Biol. 2288: 113–126. doi: 10.1007/978-1-0716-1335-1_7. PMID: 34270008.

Kiszczak W., Kowalska U., Burian M., Górecka K. 2018: Induced androgenesis as a biotechnology method for obtaining DH plants in *Daucus carota* L. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 93(6): 625–633.

Kiszczak W., Kowalska U., Kapuscinska A., Burian M., Górecka K. 2015: Effect of low temperature on *in vitro* androgenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Vitr. Cell Dev. Biol. Plant 51: 135–142.

Kiszczak W., Krzyzanowska D.M., Strycharczuk K., Kowalska U., Wolko B., Górecka K. 2011: Determination of ploidy and homozygosity of carrot plants obtained from anther cultures. Acta Physiol. Plant. 33: 401–407.

Li J.-R., Zhuang F.-Y., Ou C.-G., Hu H., Zhao Z.-W., Mao J.-H. 2013: Microspore embryogenesis and pro duction of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 112: 275–287. doi:10.1007/s11240-012-0235-5.

Stein M., Nothnagel T. 1995: Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). Plant Breeding, 114: 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00750.x

Kontaktní adresa:
Bc. Petra Bartošová
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
Telefon 233 022 368, bartosova@vurv.cz

Porovnání mrazuvzdornosti generativních orgánů u vybraných ovocných dřevin v průběhu jejich jarního vývoje

Comparison of frost resistance of generative organs of fruit trees during their spring development

Bilavčík A. [1], Bobrová O. [1,2], Zámečník J. [1], Faltus M. [1]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.*

[2]*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine*

Abstrakt

S ohledem na měnící se klimatické podmínky jsou generativní orgány ovocných dřevin stále více vystaveny riziku poškození jarními mrazíky, zejména během raných fází rašení. V České republice probíhá šlechtění nových odrůd ovocných dřevin, u nichž je třeba určit odolnost těchto orgánů vůči mrazu. Pro lepší pochopení průběhu poškození generativních pupenů a charakterizaci stavu vody v nich byly použity metody diferenční skenovací kalorimetrie, které umožnily sledovat termické události při vystavení těchto orgánů mrazovým teplotám.

Klíčová slova: generativní pupeny, slivoň, mrazové poškození, kalorimetrie

Abstract

Due to changing climate conditions, the generative organs of fruit trees are increasingly at risk of damage from spring frosts, particularly during the early stages of budburst. In the Czech Republic, new fruit tree varieties are being bred, and it is essential to determine the frost resistance of these organs. To better understand the process of damage to generative buds and to characterize the water status within them, differential scanning calorimetry methods were employed, enabling the monitoring of thermal events as these organs were exposed to freezing temperatures.

Key words: generative buds, plum tree, frost damage, calorimetry

Úvod

Klimatické změny stále více ovlivňují pěstování ovocných stromů, protože měnící se povětrnostní podmínky, rostoucí teploty a nepředvídatelné klimatické podmínky ohrožují kondici, produktivitu a přežití těchto stromů (Chawla a kol., 2021; Osorio-Marín a kol., 2024). Jednou z nejvýznamnějších výzev, které klimatické změny přinášejí, je zvýšené riziko poškození mrazem, zejména v oblastech s teplými zimami (Bublyk a kol., 2022; Drepper a kol., 2021). Klimatické změny v posledních desetiletích, teplejší zimy a předčasná jara urychlily nástup fenologie kvetení a zvýšily riziko poškození citlivých květů a pupenů mrazem (Cosmulescu, 2008; Augspurger, 2013). Pozdní jarní mrazy mohou obzvláště v době kvetení nebo raného nasazení plodů zničit celou úrodu. Především u švestky a dalších peckovin jsou jarní mrazy významnou hrozbou ovlivňující životaschopnost pupenů a výnos plodů (Ozhereleva a Bolgova, 2023; Nesheva a Bozhkova, 2021). K poškození mrazem obvykle dochází, když teplé březnové teploty následuje mrazová událost v dubnu (Augspurger, 2013). Proto se výzkum v poslední době zaměřuje na zlepšení tolerance vůči mrazu a podporu podchlazování jako opatření proti poškození mrazem (Wisniewski a kol., 2016). Rostoucí frekvence mrazových událostí poukazuje na potřebu adaptačních strategií při pěstování ovocných stromů (Iurea a kol., 2020).

Hodnocení odolnosti proti mrazu je klíčové pro pochopení zranitelnosti různých druhů a genotypů, stejně jako pro získání informací o adaptačních schopnostech ovocných stromů na měnící se klimatické podmínky. Hodnocení odolnosti proti mrazu pomáhá pěstitelům a výzkumníkům lépe pochopit, jak teplotní extrémy ovlivňují kritické fáze rašení pupenů a kvetení, které přímo ovlivňují životaschopnost stromů a přežití úrody. Identifikace odolných

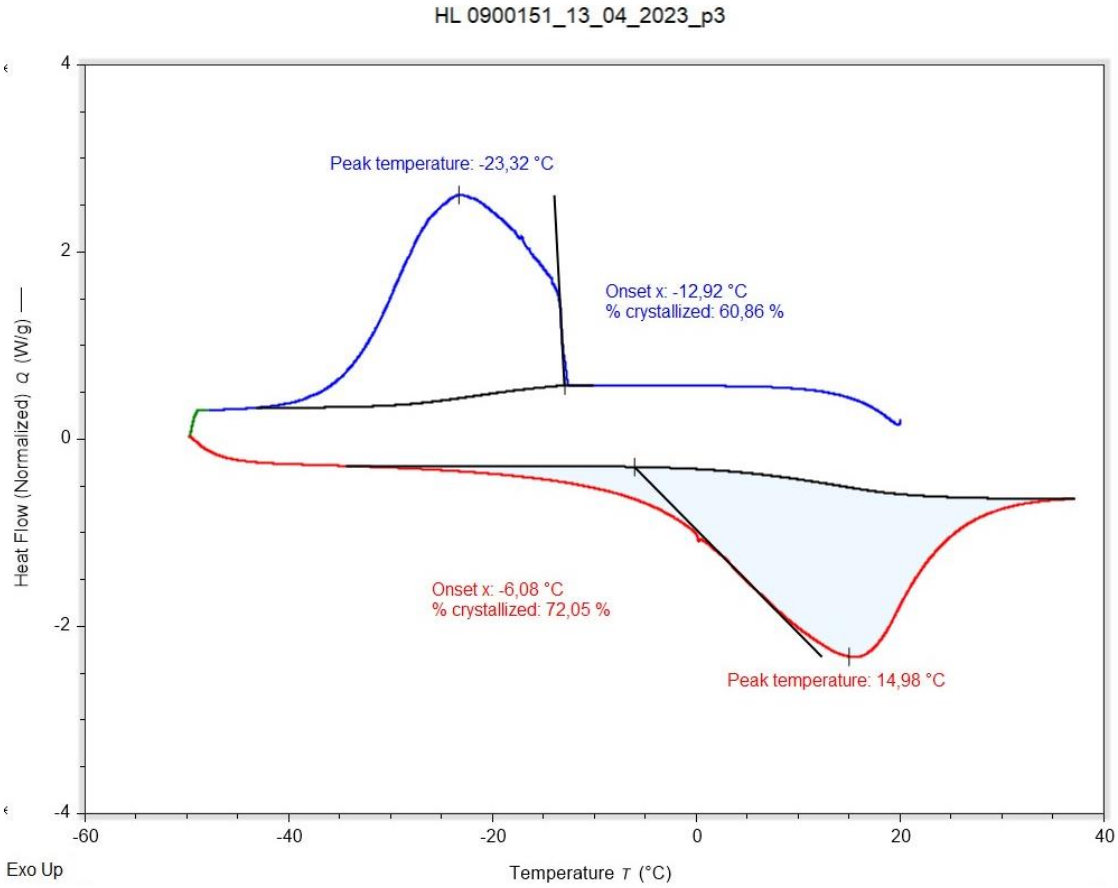
odrůd umožňuje pěstitelům činit informovaná rozhodnutí o výsadbě a údržbě, čímž se zvyšuje pravděpodobnost dostatečných sklizní v oblastech náchylných k nepředvídatelným mrazům. Vývoj efektivních adaptačních strategií se s nárůstem extrémních povětrnostních událostí stává nezbytným. Tyto strategie zahrnují šlechtění odrůd tolerantních vůči klimatickým změnám, zlepšení managementu sadů a optimalizaci efektivního využití vody. Přesto zůstává hodnocení odolnosti proti mrazu jedním z nejkritičtějších opatření pro zajištění produktivity stromů. Identifikace genotypů s vynikající odolností vůči mrazu pomůže zajistit dlouhodobou životaschopnost sadů v oblastech stále více ohrožených jarními mrazy. Je zapotřebí pokračujícího výzkumu a inovací, aby se mohli pěstitelé vyrovnávat s dopady klimatických změn a udržet produktivitu (Bacelar a kol., 2024).
Švestky, stejně jako mnoho dalších ovocných druhů, čelí na jaře značným výzvám v důsledku teplotních výkyvů, které mohou poškodit jejich generativní orgány a snížit výnos plodů. Pochopení toho, jak pupeny švestky reagují na procesy mrznutí a tání, je zásadní pro posouzení jejich tolerance vůči těmto teplotním výkyvům. Jedním ze způsobů, jak tuto problematiku zkoumat, je studium teplotních fázových přechodů uvnitř pupenů, protože krystalizace a tání vody hrají klíčovou roli při stanovení odolnosti proti mrazu.
Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je široce používaná technika pro analýzu fázových přechodů pomocí detekce exotermických a endotermických píků během cyklů chlazení a ohřevu (Tanner a kol., 2021). Charakteristiky získané prostřednictvím DSC, jako jsou onsety teploty krystalizace a tání a entalpie fázových přechodů, poskytují cenné informace o dynamice vody uvnitř generativních pupenů. Zejména teploty krystalizace a tání, stejně jako procento krystalizované vody, slouží jako indikátory odolnosti genotypu vůči mrazu (Bilavcik a kol., 2019). Nižší teploty krystalizace a vyšší schopnost podchlazení vypovídají o větší odolnosti vůči jarním mrazům, protože pupeny, které se vyhnou zmrznutí při vyšších teplotách, mají lepší šanci přežít náhlé změny okolní teploty.
Cílem práce byla analýza termických dějů v květních orgánech u vybraných odrůd a genotypů slivoně v různých fenofázích rašení pupenů pomocí metod diferenční skenovací kalorimetrie pro stanovení jejich poškození pod teplotami pod bodem mrazu.

Materiál a metody

Rostlinný materiál byl odebíraný v průběhu jarního období ze sadů Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o.. Pro experimenty byly použity generativní pupeny z jednoletých dormantních výhonů vybraných odrůd a genotypů slivoně (*Prunus domestica* L.). Pro charakterizaci mrazového poškození byla vybrána fenofáze vývoje generativního pupene zelené špičky. Pro kalorimetrické měření stanovení ledové krystalizace a celkového množství krystalické vody byly pupeny temperovány při 20 °C. Měření bylo prováděno v diferenčním skenovacím kalorimetru Discovery X3 (TA Instruments), který umožňoval měření třech vzorků pupenů současně. Generativní pupeny byly umístěny do hliníkové pánvičky a vloženy do DSC cely (20 °C). Termické charakteristiky byly měřeny v průběhu chlazení či ohřevu (10 °C min^{-1}, vzorkovací frekvence 0,2 s bod^{-1}, promývání průtokem 33 ml min^{-1} dusíkem) a analyzovány pomocí software TA Instruments TRIOS. Obsah vody (WC) ve vzorcích byl stanoven gravimetricky a vyjádřen jako procentní podíl z celkové hmotnosti vzorku (n=5). Aktivita vody (aw) byla měřena pomocí přístroje (HYGROPALM HC2-AW, Rotronic, Švýcarsko). Pro měření vodní aktivity byly nodální segmenty s květním pupenem (n=8) umístěny do měřicí cely a ponechány k ustálení po dobu 45–55 minut při teplotě 21,5–22,5°C. Po dosažení rovnovážného stavu byla zaznamenána vodní aktivita ve vzorcích (n=8). Statistické hodnocení bylo prováděno pomocí statistického software Statistica 7.0 (StatSoft).

Výsledky a diskuse

Ukázka termogramů květních pupenů slivoně genotypu HL0900151 v průběhu chlazení a ohřevu je na obr. 1. V průběhu chlazení (modrá křivka) byly měřeny exotermické píky odpovídající tvorbě krystalické vody v pletivech. Během ohřevu (červená křivka) krystalická voda přecházela do kapalného skupenství - na křivce ohřevu detekováno jako endotermický pík. Plocha píku odpovídala množství krystalické vody ve vzorku. Hlavními parametry měřených fázových přechodů jsou onsety píků krystalizace a tání, nikoli jejich maxima, protože teplota maxima píku silně závisí na hmotnosti vzorku a rychlosti skenování. Dalším důležitým parametrem je entalpie fázového přechodu, která je úměrná ploše píků zaznamenaných metodou DSC. Podle entalpie krystalizace a tání bylo možné kalkulovat procento vody v generativních pupenech, které zkrystalizovalo během chlazení a roztálo během ohřevu. Byla provedena analýza uvedených parametrů u 20 genotypů a odrůd slivoně, výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

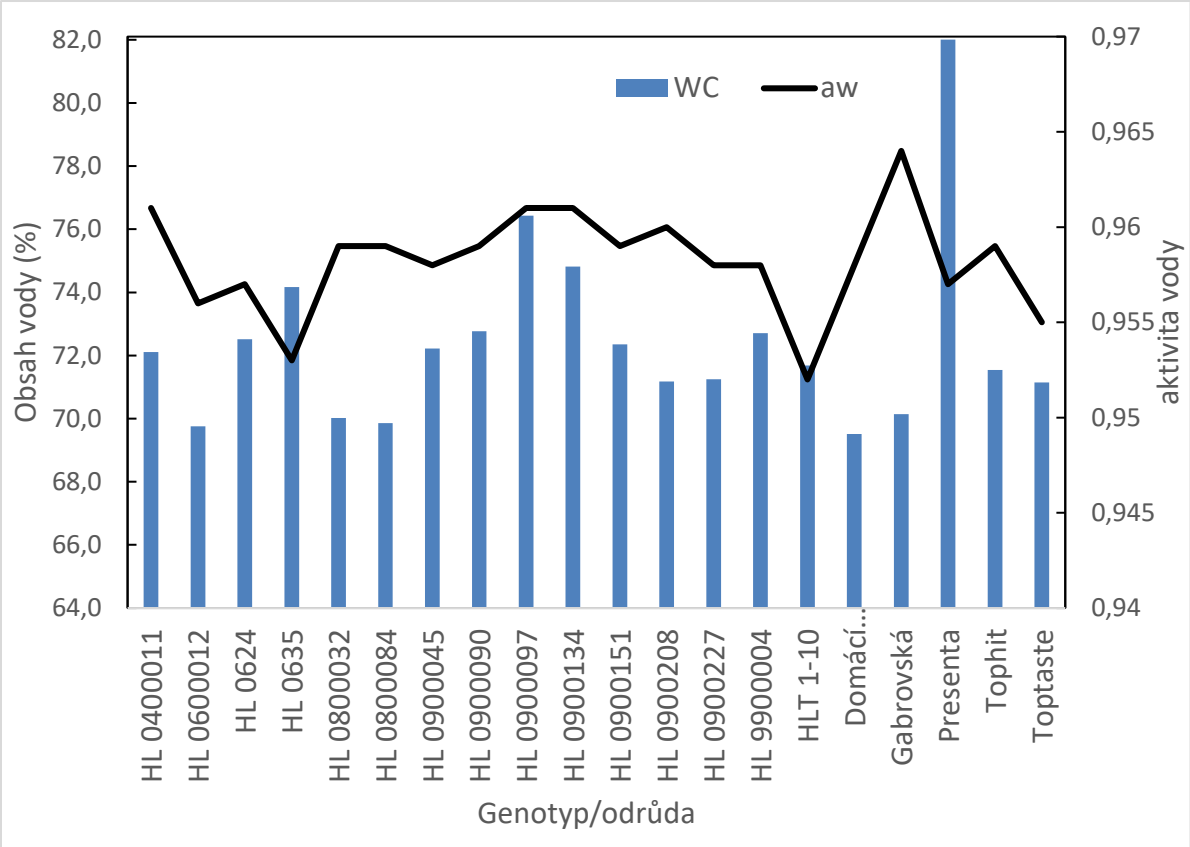


Obr. 1. DSC termogram generativního pupene slivoně HL0900151 s vyhodnocení onsetů píků krystalizace a tání a plochy píku krystalizované vody při chlazení (modrá křivka) a ohřevu (červená křivka). V horní části křivky je výrazný pík krystalizace během chlazení s vyznačenými krystalizačními onsety a v dolní části křivky je pík tání během ohřevu. Rychlost chlazení a ohřevu byla 10 °C min^{-1}.

Tabulka 1. Onsety píků krystalizace (modře) a tání (červeně) vody a procento krystalizované vody během chlazení (modře) a ohřevu (červeně) v generativních orgánech testovaných genotypů a odrůd slivoně. Data jsou uvedena jako průměr ± SE.

Slivoň	Onset píku (°C)				Množství krystalické vody (%)			
	krystalizace		tání		chlazení		ohřev	
	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE
HL 0400011	-11,8	0,73	-5,7	0,52	79,7	0,83	85,4	1,02
HL 0600012	-9,8	0,82	-4,2	1,48	77,1	0,88	81,7	1,98
HL 0624	-10,9	1,53	-5,7	0,94	80,1	2,03	82,9	0,58
HL 0635	-13,7	0,24	-3,8	1,49	77,3	2,49	77,8	2,23
HL 0800032	-19,1	0,30	-4,4	0,20	75,7	1,63	86,5	2,82
HL 0800084	-8,1	0,12	-5,1	0,65	81,1	1,26	87,8	1,31
HL 0900045	-15,6	0,96	-5,6	0,93	77,0	1,57	85,4	1,42
HL 0900090	-7,7	0,78	-6,0	0,43	80,5	1,71	85,5	1,06
HL 0900097	-17,3	1,53	-6,6	0,72	79,2	2,08	85,3	1,15
HL 0900134	-11,2	1,35	-5,6	0,65	79,9	1,00	87,1	1,02
HL 0900151	-11,7	1,41	-5,5	0,71	80,2	1,11	90,4	2,31
HL 0900208	-14,8	0,70	-6,8	1,25	78,8	1,06	86,4	2,21
HL 0900227	-11,1	0,87	-6,0	0,68	80,3	1,15	87,1	1,51
HL 9900004	-10,8	0,49	-4,7	2,06	78,2	2,23	85,0	4,12
HLT 1-10	-10,6	0,81	-1,5	0,33	77,5	1,60	85,4	0,66
'D. velkoplodá'	-8,0	0,36	-5,7	0,09	77,1	2,46	80,3	3,49
'Gabrovská'	-8,2	0,35	-5,1	0,69	77,5	1,33	81,0	1,42
'Presenta'	-9,7	0,28	-5,7	0,42	78,1	1,02	85,2	1,24
'Tophit'	-8,7	0,12	-4,9	1,00	77,8	1,60	80,6	1,83
'Toptaste'	-11,7	2,85	-6,0	0,66	77,7	4,72	82,6	6,06

Obecně lze předpokládat, že nižší teploty krystalizace a tání, stejně jako nižší procento krystalické vody, naznačují vyšší odolnost proti mrazu u daného genotypu/odrůdy. Je zřejmé, že teploty krystalizace a tání, stejně jako procento krystalické vody během chlazení a ohřevu, se neshodují. Rozdíl mezi těmito parametry ukazuje, jak velká je tendence pupenů konkrétního genotypu k podchlazení. Vysoká tendence k podchlazení pomáhá pupenům přežít prudké poklesy teploty vzduchu. Fázový stav vody v květních pupenech při klesající teplotě a jejich schopnost podchlazení může souviset s parametry, jako je obsah vody a jeho aktivita vody. Tyto parametry byly také změřeny pro všechny zkoumané genotypy/odrůdy slivoně a výsledky jsou uvedeny na obr. 2. Je patrné, že ne všechny genotypy vykazují korelaci mezi těmito parametry. To může souviset s vodní charakteristikou pupenů jako takových nebo případně s tím, že rostlinný materiál nebyl pro všechny genotypy či odrůdy odebrán ve stejný den, a mohou tedy být v mírně odlišných fenofázích generativního vývoje.



Obr. 2. Obsah vody (WC) a aktivita vody (aw) generativních pupenů testovaných genotypů a odrůd slivoně.

V příspěvku jsou porovnány možnosti využití termických charakteristik k posouzení mrazového poškození generativních orgánů ovocných dřevin, konkrétně slivoně, během jarního rašení. V dalším postupu prací se autoři zaměří na porovnání rozsáhlejšího spektra odrůd u dalších druhů.

Závěr

Hodnoty poškození generativních orgánů slivoně vlivem podnikových teplot v průběhu jarního rašení jsou charakterizovány fyziologickými znaky jako je podíl krystalické vody a teploty onsetů píku krystalizace a tání. Pro porovnání je vhodné charakterizovat i aktivitu a obsah vody ve sledovaných orgánech. V příspěvku uváděný postup charakterizace mrazového poškození generativních orgánů u testovaných odrůd slivoně bude na pracovišti VÚRV, v.v.i. v Praze Ruzyni ve spolupráci s VŠÚO Holovousy, s.r.o. využit pro stanovení mrazuvzdornosti nových perspektivních genotypů při šlechtění ovocných dřevin v souvislosti s výběrem vhodných odolnějších genotypů.

Literatura

Augspurger, C.K. (2013). Reconstructing patterns of temperature, phenology, and frost damage over 124 years: spring damage risk is increasing. *Ecology*, 94(1), 41-50.

Bacelar, E., Pinto, T., Anjos, R., Morais, M. C., Oliveira, I., Vilela, A., & Cosme, F. (2024). Impacts of climate change and mitigation strategies for some abiotic and biotic constraints influencing fruit growth and quality. *Plants*, 13(14), 1942.

Bilavcik, A., Zamecnik, J., Faltus, M., & Jadrná, P. (2019). Analysis of freezable water content by DSC for apple dormant bud cryopreservation. *Horticultural Science*, *46*, 163-170.

Bublyk, M.O., Fryziuk, L.A., Chorna, H.A., & Barabash, L.O. (2022). Analysis of global trends in

scientific developments for the protection of fruit plants against frosts. *Horticulture Interdepartment Subject Scientific Collection, 77*, 126-132.

Cosmulescu, S., Baciu, A., Cichi, M., Gruia, M., & Ciobanu, A. (2008). Phenologic changes in plum tree species in the context of current climate changes. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture, 65(1).

Drepper, B., Bamps, B., Gobin, A., & Van Orshoven, J. (2021). Strategies for managing spring frost risks in orchards: effectiveness and conditionality—A systematic review protocol. *Environmental Evidence*, 10(32).

Chawla, R., Sheokand, A., Rai, M.R., Kumar, R., & Sadawarti (2021). Impact of climate change on fruit production and various approaches to mitigate these impacts. *The Pharma Innovation Journal, 10*(3), 564-571.

Iurea, E., Chelaru, S., Gherghel, M.I., Sîrbu, S., Turcu, C.I., Ungureanu, I.V., & Perju, I. (2020). The influence of low temperatures during bloomin in fruit growing trees species. *Current Trends in Natural Sciences*, 9 (17), 341-345.

Nesheva, M., & Bozhkova, V. (2021). Spring frost damages of plum and apricot cultivars grown in the region of Plovdiv, Bulgaria. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*., 65(1), 194-197.

Osorio-Marín, J., Fernandez, E., Vieli, L., Ribera, A., Luedeling, E., & Cobo, N. (2024). Climate change impacts on temperate fruit and nut production: a systematic review. *Frontiers in Plant Science, 15*.

Ozhereleva, Z.E., & Bolgova, A.O. (2023). Selection for breeding use of plum varieties resistant to spring frosts from the bioresource collection of VNIISPK. *Vestnik of the Russian agricultural science*, (6), 65-70.

Tanner, J.D., Chen, K.Y., Jenderek, M.M., Wallner, S.J., & Minas, I.S. (2021). Determining the effect of pretreatments on freeze resistance and survival of cryopreserved temperate fruit tree dormant buds. *Cryobiology, 101*, 87–94.

Wisniewski, M., Artlip, T., & Norelli, J. (2016). Dealing with frost damage and climate change in tree fruit crops. *New York State Fruit Quart*, 24, 25-28.

Poděkování

Děkuji kolegům Ing. Luboru Zelenému a Ing. Pavlu Suranovi z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. za poskytnutí rostlinného materiálu. Tato práce vznikla za podpory MZe, projektu QK21010200 a Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. RO0423.

Kontaktní adresa:

RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D.
Tým fyziologie a kryobiologie rostlin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
Tel.: +420 233022433, e-mail: bilavcik@vurv.cz

Nadějné genotypy olejného lnu

Promising linseed genotypes

Bjelková M.[1], Mrázková M.[2]

[1]Agritec Plant Research s.r.o.; [2]AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o.;

Zemědělská 2520/16, Šumperk

Abstrakt

Cílem studie bylo stanovit výnosovou hodnotu semen pokročilých genotypů olejného lnu na základě srovnávacích pokusů s referenčními odrůdami, které jsou vedeny jako standardy pro zkoušky užitné hodnoty ÚKZÚZ. Terénní experimenty provedené v letech 2021–2024 byly posuzovány z hlediska výnosu hlavního produktu, semen a obsahu tuku a také obsahu mastných kyselin. Vzhledem k zásadně odlišným povětrnostním podmínkám ve vegetačních sezónách byly i výnosové charakteristiky jednotlivých linií odlišné, ale genotypy s vysokým obsahem kyseliny alfa linolenové prokázaly svou vyšší produkcí schopnost konkurovat standardním referenčním odrůdám.

Klíčová slova: Olejný len, *Linum usitatissimum* L., výnos, mastné kyseliny, tuk

Abstract

The aim of the study was to determine the yield value of seeds of advanced genotypes of linseed based on comparative experiments with reference varieties, which are conducted as standards for tests of the utility value of ÚKZÚZ. Field experiments conducted in 2021–2024 were assessed in terms of yield of the main product, seeds and fat content, as well as fatty acid content. Due to fundamentally different weather conditions in the growing seasons, the yield characteristics of the individual lines were also different, but genotypes with a high content of alpha-linolenic acid demonstrated their ability to compete with standard reference varieties with their higher production.

Keywords: Linseed**,** *Linum usitatissimum* L., yield, fatty acids, fat

Úvod

Čeleď Linaceae zahrnuje 22 rodů, z nichž nejznámější je rod *Linum*, který obsahuje více než 200 druhů. Rod *Linum* je dále dělen a obsahuje i pěstovaný druh *L.usitatissimum* L. a okrasné ekonomicky málo významné druhy *L. grandiflorum* a *L. perenne*. Počet chromozomů druhu *Linum* vykazuje široký rozsah pohybující se od 2n = 16 do 2n = 72 (Nožková a kol. 2011). *L.usitatissimum* a jeho divocí příbuzní obsahují 2n= 30 chromozomů (Muravenko et al. 2003). Historie šlechtění lnu není plně objasněna a někteří autoři se domnívají, že *L. bienne* je předchůdce lnu malosemenného, pocházejícího z Kurdistánu a Íránu, a naopak jiné zdroje zase uvádí jako předchůdce *L. angustifolium* s velkými semeny a vysokým obsahem oleje v semenech, pocházejícího z oblasti Středomoří (Murre 1955; Zeven a de Wet 1975). Studie s molekulárními markery naznačila, že oba typy mají společného předka, *L. angustifolium* (Muravenko et al. 2003). *Linum usitatissimum* L. je jednoletá plodina, naopak divoké formy mohou být i dvouleté nebo víceleté. Všechny druhy jsou převážně samosprašné (Zohary a Hopf 2000). K opylení může dojít prostřednictvím hmyzu (velmi nízké procento) nebo umělým způsobem. Předpokládá se, že pěstování lnu má ve světě dlouholetou tradici trvající téměř 9000 let (Kroes, 1995). Od doby jeho domestikace se pěstuje len pro vlákno a olej. Gill 1987 uvádí, že v západní oblasti euroasijského kontinentu se len pěstuje hlavně pro vlákno, zatímco v jeho východní oblasti zase pro olej a tyto typy také morfologicky charakterizují, že len pro vlákno má dlouhý nerozvětvený růstový habitus, tedy len přadný a len pro olej (len olejný) je mnohem kratší a vysoce rozvětvený. Významnou roli v diversifikaci využití lnu sehrává šlechtění a tvorba nových odrůd. Samotné šlechtění lnu je datováno do 19. století. Dá se říct, že první šlechtění bylo založeno na hromadné selekci. Singh, S., Sahu, P. (2017) uvádí, že v roce 1816 Gelf Jensma vytvořil landrace typ lnu FriescheWitbloei. Jeho postup spočíval v prvotním

výběru bíle kvetoucích rostlin z modře kvetoucího lnu pocházejícího z Ruska. Poté po několika kolech selekce bíle kvetoucích rostlin vznikla krajinná rasa FriescheWitbloei s dlouhými stonky. Například ve východní Evropě začalo šlechtění přadného lnu v roce 1922 v Litvě se dvěmi odrůdami, a to „Dotnuvos pluotinia“ a „Dotnuvos ilguneliai I“. Šlechtění odrůd lnu v české republice se datuje v 20. století od konce roku 1930. V té době se v ČR šlechtil především přadný len na čtyřech pracovištích a to na šlechtitelské stanici v České Bělé (odrůdy přadného lnu Keřkovský – 1938, Horal – 1950, Rekord – 1950, Modran – 1952, Věra – 1959, Belan – 1971, Horan – 1982), na pracovišti v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem (Domanínský jemný, Domanínský výnosný – 1937), a v tehdejším Výzkumném ústavu přadných rostlin v Šumperku Temenici (odrůdy přadného lnu Šumperský jemný – 1946, Šumperský lužický – 1948, Šumperský olejnopřadný – 1948, Textilák – 1950) a později na šlechtitelské stanici Slapy u Tábora (Agron – 1988, Bonet – 1996, Jordán – 1998). S historií společností AGRITEC s.r.o. jsou pak spjaty odrůdy přadného lnu (Texa – 1991, Jitka – 1996, Venica – 2007, Rina – 2009) a dále pak především odrůdy olejného lnu Amon (2007), Raciol (2011), Agriol (2016), Agram (2017) a Astella (2020). Pokrok ve vývoji nových odrůd se zlepšenou kvalitou a jeho promítnutí na trh jsou v posledních letech naprosto zřetelné. Rozdíl nastal v tom, že v české republice se přadný len po roce 2010 z důvodu úplné likvidace lnářského průmyslu přestal pěstovat a také šlechtit, ale naopak plná pozornost byla zaměřena na len olejný. Zde bylo využito možnosti sklizně obilním sklízečem, a tak docílení možného rozvoje pěstování tohoto typu lnu v České republice. V Evropě u přadného lnu je stálá pozornost věnována zvyšování podílu vlákna ve stonku, výnosu vlákna z hektaru, jeho kvalitě a stabilitě těchto vlastností. Naopak u olejného lnu je cíleno na výnos semen a vysoký obsah oleje a ve společnosti Agritec je směr rozšířen na obsah lignanů a obsah kyseliny alfa linolenové s cílem přizpůsobení se různým prostředím a agroekologiím a využitím pro vlákninu, probiotické a nutraceutické vlastnosti.

Materiál a metody

Zkoušený šlechtitelský materiál byl získán konvenční šlechtitelskou metodou křížením rodičovských odrůd/genotypů a výsledné materiály byl dále selektovány z pohledu odlišnosti, uniformity a stálosti dle deskriptoru pro danou plodinu (Nožková a kol. 2011). Byly provedeny polní experimenty dle metodiky pro pěstování olejného lnu ve čtyřletém období v letech 2021–2024, které porovnávaly genotypy s devíti odrůdami olejného lnu, které jsou i standardy pro zkoušení odrůd Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, (dále jako ÚKZÚZ). Genotypy i odrůdy jsou uvedeny v tabulce 1. Terénní pokusy byly prováděny na pokusných pozemcích společností skupiny Agritec. Předchozí plodinou byla vždy ozimá pšenice. Testované odrůdy lnu byly zasety ve třech opakováních, metodou náhodného bloku. Hustota setí byla 1000 semen.m^{-2}. Vzdálenost řádků byla 12,5 cm a setí bylo uskutečněno samojízdným secí strojem. Plocha pokusných ploch byla stanovena na 10 m^2. Z produkce semen byla stanovena vlhkost, výnosový potenciál z jednotky plochy a vzorky semen byly analyzovány na obsah mastných kyselin a obsah tuků (Analýza obsahu oleje v semenech byla provedena dle interní metodiky, založené na normě ČSN EN ISO 659:„Olejnatá semena – Stanovení obsahu oleje“. Metodika je validovaná s pravidelnou účastí mezilaboratorního porovnání, pořádanou ÚKZÚZ. Analýza poměrového zastoupení mastných kyselin byla stanovena podle normy ČSN EN ISO 5508: „Analýza methylesterů MK plynovou chromatografií“.).

Tabulka 1: Zkoušené genotypy a odrůdy olejného lnu

	Barva semen	Obsah kyseliny alfa linolenové	Původ
AGT 167/13	žlutá	vysoký	Genotypy Agritec Plant Research s.r.o.
AGT 517/14	žlutá	vysoký	
AGT 181/14	hnědá	vysoký	
AGT 183/14	hnědá	vysoký	
AGT 217/12	hnědá	vysoký	
AGT 237/12	žlutá	vysoký	
AGT 245/11	hnědá	vysoký	
AGT 298/12	hnědá	vysoký	
AGT 3/15	hnědá	vysoký	
AGT 316/02	žlutá	nízký	
AGT 369/11	hnědá	vysoký	
AGT 434/10	žlutá	vysoký	
AGT 5/40	žlutá	vysoký	
AGT 5/7	hnědá	vysoký	
AGT 85/14	žlutá	střední	
AGT 88/14	hnědá	střední	
AGT 891/05	hnědá	nízký	
Agram	hnědá	střední	Odrůda Agritec Plant Research s.r.o.
Agriol	žlutá	nízký	Odrůda Agritec Plant Research s.r.o.
Floral	hnědá	vysoký	Odrůda Laboulet Semences, Francie
Jantar	žlutá	nízký	Odrůda Sempra Praha a.s.
Libra	hnědá	vysoký	Odrůda Limagrain Nederland B.V., Nizozemsko
Lola	hnědá	nízký	Odrůda Limagrain Nederland B.V., Nizozemsko
Raciol	žlutá	střední	Odrůda Agritec Plant Research s.r.o.
Astella	hnědá	vysoký	Odrůda Agritec Plant Research s.r.o.
Aquarius	hnědá	vysoký	Odrůda Sasu Fontaine Cany, Francie

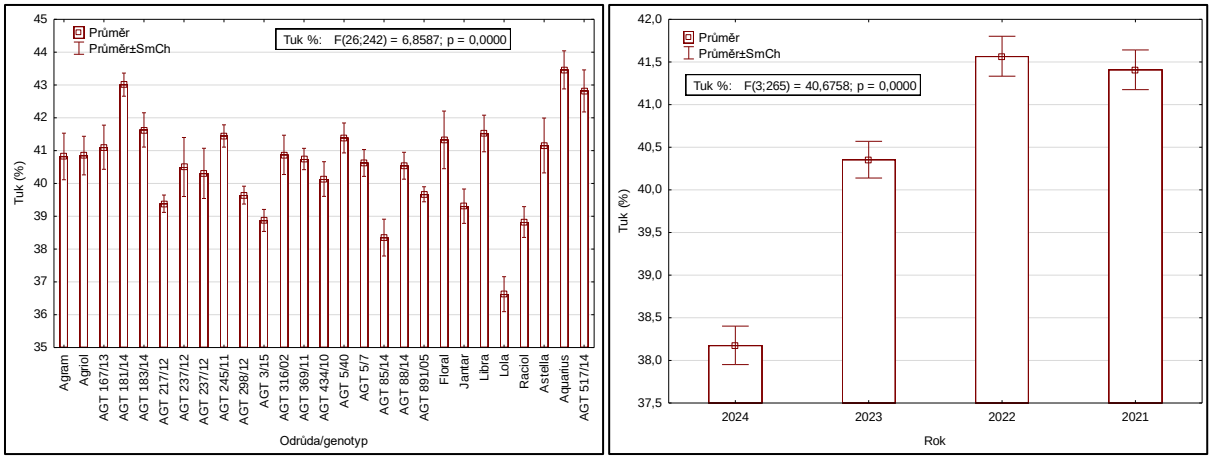
Výsledky

Tato studie ukazuje na vysoký možný potenciál nových genotypů olejného lnu. Jak ukazuje graf 1a, byl zjištěný obsah tuku u genotypů s vysokým obsahem kyseliny alfa linolenové AGT 181/14 a ATG 517/14 vyšší než u standardní odrůdy Libra, ke které byly srovnávány, ale mírně nižší než u odrůdy Aquarius. Středně linolenové genotypy, které byly zastoupeny liniemi AGT 85/14 a 88/14 dosáhly nižšího obsahu tuku oproti své kontrolní odrůdě Agram, ale vůči střednělinolenové (SLN) odrůdě Raciol linie 88/14 dosáhla vyšších hodnot. Genotypy (AGT 316/02 a AGT 891/05) s nízkým obsahem kyseliny alfa linolenové vůči své kontrolní odrůdě Agriol nevykázaly vyšší obsahy tuku v semenech, ale naopak vůči kontrolní odrůdě Jantar byly průkazně vyšší. Všechny zkoušené genotypy ve svých semenech měly vyšší obsah tuku než nízkolinolenová odrůda Lola. Graf 1b představuje situaci ve výnosu tuku v jednotlivých letech a zde byl zřejmý negativní vliv chladnějšího období v termínu sklizně let 2024 a 2023, které vykázaly průkazné rozdíly jak mezi sebou, tak vůči roků 2022 a 2021.

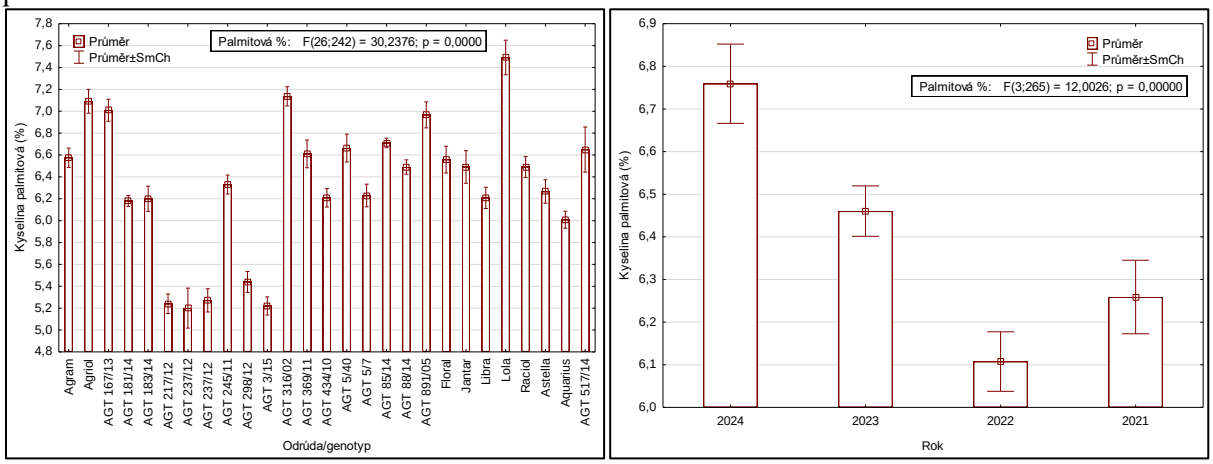
Profily mastných kyselin pro studované genotypy (průměrný vzorek ze všech experimentálních

roků), jsou uvedeny graficky (grafy 2a, 3a, 4a, 5a, 6a). Zajímavé výsledky prokazují grafy 2a a 4a. Genotypy AGT 217/12, AGT 237/12, AGT 245/11 a AGT 298/12 byly šlechtěny za účelem vyššího obsahu kyseliny olejové a toto se víceméně podařilo a zvýšení se naopak projevilo v neprůkazném zvýšení kyseliny stearové (graf 3a) a průkazném snížení obsahu kyseliny palmitové (graf 4a). Opět, i zde byl zřejmý vliv pěstitelského roku, kdy naopak chladné počasí v termínech zrání mělo vliv na zvýšení obsahu kyseliny palmitové (graf 2b, 4b).
Co se týká obsahu kyselin linolové a alfa linolenové byly jednotlivé genotypy po celou dobu selekčních postupů vedeny individuálně dle požadovaného obsahu dané kyseliny pro kterou bylo šlechtění genotypu vedeno. A jak ukazuje směrodatná odchylka u grafu 5a, jednotlivé genotypy nevykazovaly velkou variabilitu a měly vyrovnaný obsah. Obsah kyseliny alfa linolenové vykazoval vyšší obsah v letech 2022 a 2021, kdy v období zrání byly vyšší denní průměrné teploty (graf 6b). Tento fakt je známý a byl zjištěn i u jiných výsledků týkajících se samotných zkoušených odrůd.
Vedle parametru obsahu tuku je dalším směrodatným ukazatelem výnos semenné produkce, který je znázorněný na grafu 7a. Nízkolinolenové typy AGT 316/02 a AGT 891/05 byly porovnávané na standardní odrůdy Jantar a Agriol. Průměrná produkce semen genotypu AGT 316/02 vykazovala nižší produkci oproti standardní odrůdě Agriol v průkazné diferenci, ale vůči odrůdě Jantar byl nižší výnos semen neprůkazný, jak ukazuje grafické znázornění na grafu 7a. Středně linolenové genotypy (AGT 85/14 a AGT 88/14) testované vůči odrůdě Agram a Raciol dosáhly neprůkazně nižšího průměrného čtyřletého výnosu semen oproti standardům. Naopak vysokolinolenové typy byly ve výnosu semenné hmoty průkazně vyšší oproti standardním odrůdám Libra a Aquarius. Stejně jako u ostatních parametrů i v tomto případě měl pěstitelský rok vliv na výnos produkce semen (graf 7b).

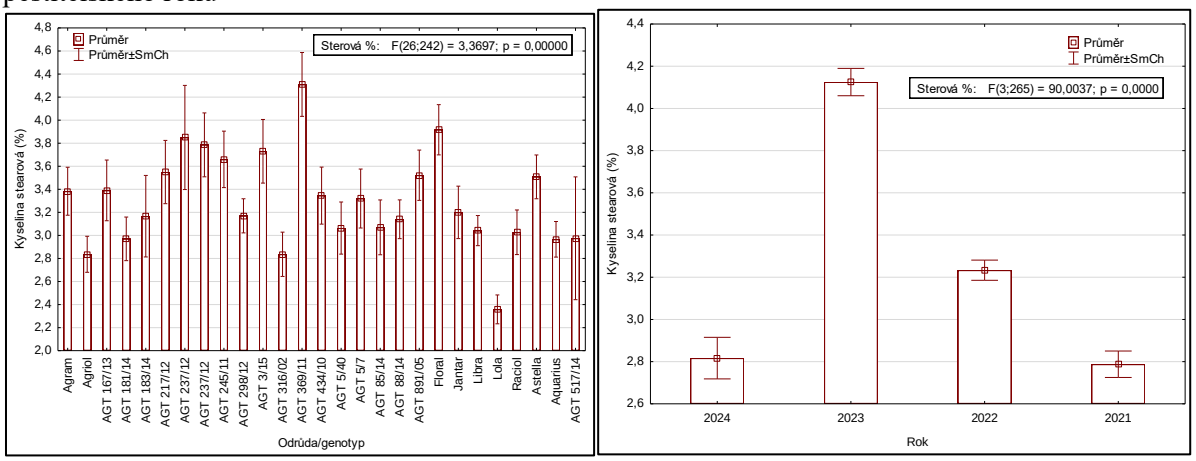
Graf 1a,b: Obsah tuku (%) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



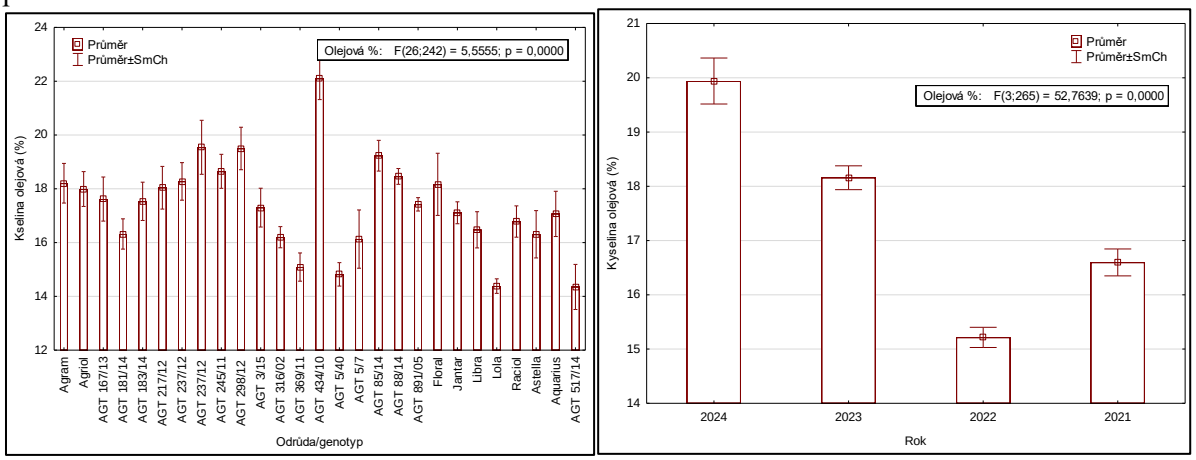
Graf 2a, b: Obsah kyseliny palmitové (%) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



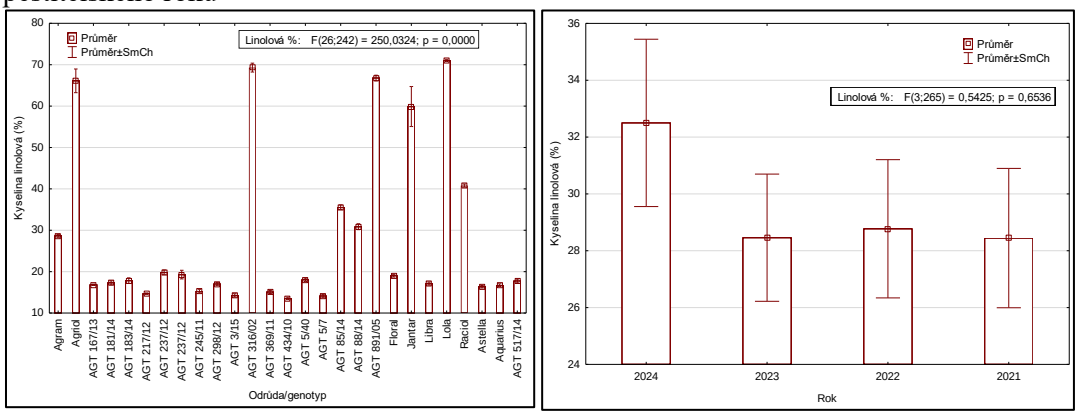
Graf 3: Obsah kyseliny stearové (%) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



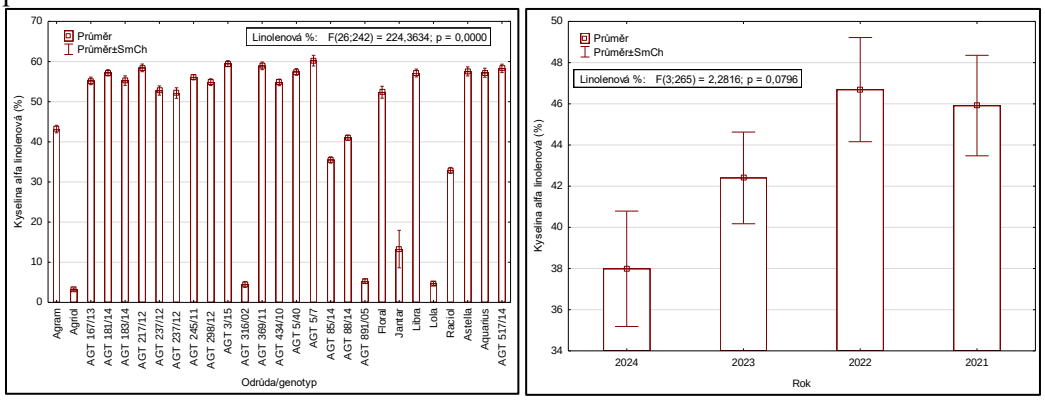
Graf 4: Obsah kyseliny olejové (%) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



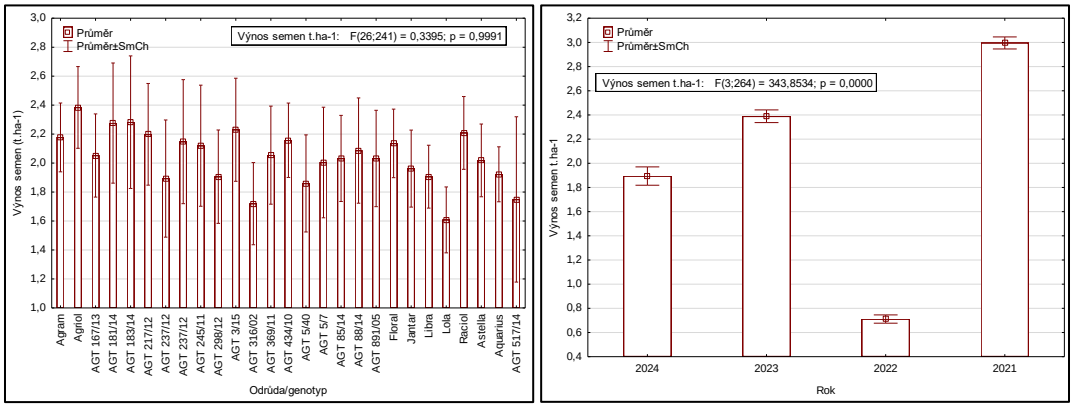
Graf 5: Obsah kyseliny linolové (%) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



Graf 6: Obsah kyseliny alfa linolenové (%) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



Graf 7: Výnos semen (t.ha^{-1}) u nových genotypů olejného lnu a standardních odrůd a vliv pěstitelského roku



Diskuze

Provedené studie ukázaly, že přizpůsobivost genotypů k různým povětrnostním podmínkám hraje klíčovou roli pro jejich výnosotvornou schopnost. Důsledná selekce pro optimální vlastnosti daného genotypu je zásadní pro zlepšení efektivity pěstování olejného lnu a jeho ekonomické hodnoty. Testované genotypy prokázaly, že vlastnosti klíčové pro odrůdové řízení, jako jsou výnos, odolnost vůči chorobám, uniformita, stálost nebo přizpůsobivost k různým podmínkám prostředí, mohou být stabilní a dědičné, což je podmínkou pro jejich zařazení do oficiálního odrůdového registru. Toto potvrdily výsledky hodnocených linií vysokolinolenových genotypů, které vykazovaly i vysokou odolnost vůči nepříznivým

klimatickým podmínkám. I další šlechtitelé v zahraničí sledují produkci semen olejného lnu. Nicméně jejich kontrolní standardní odrůdy jsou jiné než v ČR a jsou dány kontrolním orgánem příslušné země. Ve světovém měřítku jsou sledovány především ukazatele výnosu semen a odolnost vůči chorobám, ale také i další možná užití, jako je odolnost vůči těžkým kovům nebo salinitě půd a možná odolnost vůči chladovým podmínkám, jak například uvádí Praczyk aWielgusz (2021), kteří v Polsku porovnávali pokročilé linie lnu s referenčními odrůdami za účelem stanovení ekonomické hodnoty genotypů získaných šlechtitelskými pracemi institutu IWNiRZ. Z výsledků naší studie a v souladu s recenzovanou literaturou lze vyvodit, že faktory povětrnostních a půdních podmínek s největší pravděpodobností negativně ovlivnily výnos semen v roce 2021 a 2022 a podobné závěry ve své práci zjistil i kolektiv autorů Čeh, B. et al (2020) v podmínkách Slovinska.

Závěr

V případě nízkolinolenových genotypů nebyl během čtyřletého zkoušení zjištěn vhodný kandidát do zkoušek užitné hodnoty ÚKZÚZ a selekční zásah pro další výběr musí být razantnější. U střednělinolenových genotypů musí být provedena další selekční opatření a genotypy s vysokým obsahem kyseliny alfa linolenové byly vyhodnoceni jako optimální kandidáti do zkoušek užitné hodnoty ÚKZÚZ.

Literatura

Nožková, J., Pavelek, M., Bjelková, M., Brutch, N., Tejklová, E., Porokonovinova, E., Brindza, J. (2011). Descriptor list for flax (Linum usitatissimum L.). Slovak University of Agriculture in Nitra, 104 s. ISBN 978-80-552-0671-4.

Čeh, B.; Štraus, S.; Hladnik, A.; Kušar, A. (2020). Impact of Linseed Variety, Location and Production Year on Seed Yield, Oil Content and Its Composition. *Agronomy*, *10*, 1770. https://doi.org/10.3390/agronomy10111770.

Gill, K.S. (1987). Linseed. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, pp.386.

Kroes, G.M.L.W. (1995): Fusarium resistance in Flax, a case study in race specificity. In: Proceedings of the Third meeting of the International Flax Breeding Research Group „Breeding for fibre and oil quality in flax“. Centre pour l´Etude et l´Amélioration du Lin (CETEAL), St. Valéry en Caux, France, pp. 80 – 82.

Muravenko, O.V., Lemesh, V.A., Samatadze,T.E., Amosova, A.V., Grushetskaya,Z.E., Popov, K.V., Semenova, O.Y.,Khotyuleva, L.V. and Zelenin, A.V. (2003). Genome comparisons withchromosomal and molecular markersfor three closely related flax speciesand their hybrids. Russian Journal of Genetics39: 414-421.

Murre, M. Vezelvlas. (1955). Uitgeverij Ceres,Meppel, The Netherlands: 112.

Singh, S., Sahu, P. (2017). Omega-3 its Significance and Breeding Approaches in Linseed (Linum usitatissimum L.). 5. 1215-1228. 10.18782/2320-7051.2850.

Zeven, A.C. and de Wet, J.M.J. (1975). Dictionary ofcultivated plants and their regions ofdiversity. Pudoc, Centre froAgricultural Publishing andDocumentation, Wageningen, TheNetherlands: 263.

Praczyk, Marcin & Wielgusz, Katarzyna. (2021). Agronomic Assessment of Fibrous Flax and Linseed Advanced Breeding Lines as Potential New Varieties. Agronomy. 11. 1917. 10.3390/agronomy11101917.

Zohary, D. and Hopf, M. (2000). Domestication ofplants in the Old World: the origin andspread of cultivated plants in WestAsia, Europe and the Nile Valley.Oxford University Press, Oxford: 316.

Poděkování

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1023 a dále s podporou dotačního titulu „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“.

Kontakt:

Ing. Marie Bjelková, Ph.D.
Agritec Plant Research s.r.o.
Zemědělská 2520/16
+420728270748; bjelkova@agritec.cz

Calorimetric study of apricot flower buds

Kalorimetrická studie květních pupenů meruňky

Bobrova O.[1,2], Faltus M.[1], Zámečník J.[1], Bilavčík A.[1]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Prague, Czech Republic;*

[2]*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

Abstract

Apricots are highly susceptible to frost damage in early spring, impacting yields. This study evaluated the frost resistance of 27 apricot genotypes and varieties by examining phase transitions in their generative buds using differential scanning calorimetry (DSC). We measured onset temperatures for water crystallization and melting, as well as phase transition enthalpy. Water content and water activity were also analyzed to assess their effect on frost tolerance. Results revealed significant variability in crystallization and melting temperatures, with greater frost resistance linked to lower crystallization temperatures and a higher capacity for supercooling.

Keywords: *Prunus armeniaca* L., frost resistance, crystallization, water content, water activity.

Abstrakt

Meruňka je obzvláště citlivá na poškození mrazem během časného jara, což může výrazně ovlivnit výnosy. V této studii jsme hodnotili odolnost proti mrazu u 27 genotypů a odrůd meruňky analýzou fázových přechodů v jejich generativních pupenech pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). Byly měřeny parametry, jako jsou počáteční teploty krystalizace a tání vody, a entalpie fázových přechodů. Rovněž jsme zkoumali obsah vody a aktivitu vody v pupenech, abychom určili jejich vliv na odolnost vůči mrazu. Naše výsledky ukazují významnou variabilitu teplot krystalizace a tání mezi genotypy a odrůdami, přičemž vyšší odolnost je spojena s nižšími teplotami krystalizace a větší tendencí k podchlazení.

Klíčová slova: *Prunus armeniaca* L., mrazuvzdornost, krystalizace, obsah vody, aktivita vody.

Introduction

Climate change and its growing influence on fruit trees is a critical issue, as shifting weather patterns, rising temperatures, and unpredictable climatic conditions increasingly threaten the health, productivity, and survival of these trees (Chawla *et al.*, 2021; Osorio-Marín *et al.*, 2024). A key factor for many fruit trees is the requirement for winter chill hours, essential for breaking dormancy and ensuring proper flowering and fruit set (Fraga & Santos, 2021; Salama *et al.*, 2021). In Mediterranean climates, warmer winters result in fewer chill hours, disrupting dormancy cycles, causing irregular flowering and lower yields (Medda *et al.*, 2022). Insufficient chill hours due to milder winters lead to delay or inadequate flowering, poor fruit set, and reduced yields, posing challenges, especially in temperate regions where trees are adapted to colder winters. Among the most significant consequences of climate change is the heightened risk of frost damage (Bublyk *et al.*, 2022; Drepper *et al.*, 2021). Warmer winters and early springs can trigger premature blooming in fruit trees, leaving their delicate flowers and buds vulnerable to late spring frosts. These frosts, especially during the flowering or early fruit set stages, can devastate crops for an entire season. Early blooming species, such as apricots, cherries, and peaches, are particularly susceptible to frost damage due to the erratic temperature fluctuations characteristic of climate change.

Therefore, assessing the frost resistance of fruit trees is crucial for identifying resilient genotypes and mitigating crop losses caused by spring frosts. Frost resistance assessment is essential not only because it helps determine the vulnerability of different species and genotypes, but also because it provides valuable insights into the adaptive capacities of trees under changing climatic conditions. Evaluating frost resistance allows researchers and growers

to understand how temperature extremes affect the critical stages of budbreak and flowering, which directly influence tree fitness and crop survival. By identifying frost-hardy varieties, growers can make informed decisions about planting and management practices, improving the likelihood of successful harvests in areas prone to unpredictable frosts. The cumulative effects of climate change — frost damage, altered phenology, increased pest and disease pressures, and water stress — pose serious challenges to the sustainability of fruit production (Medda *et al.*, 2022; Osorio-Marín *et al.*, 2024). As the frequency of extreme weather events rises, effective adaptation strategies will be essential. These include the development of climate-tolerant fruit varieties, improved orchard management practices, and more efficient water use. However, assessing frost resistance remains one of the most critical measures for safeguarding fruit tree productivity. Identifying genotypes with superior frost resistance can help ensure the long-term viability of orchards in regions increasingly affected by spring frosts. Continued research and innovation are necessary to help growers mitigate the impact of climate change and maintain productivity in this rapidly changing environment (Bacelar *et al.*, 2024).

Trees can adjust their frost tolerance during eco-dormancy, with earlier-flowering species demonstrating higher tolerance (Amarante *et al.*, 2017). However, this ability declines sharply as budburst approaches, making budburst timing critical for tree fitness. Freeze stress is a major limiting factor in tree distribution and productivity, with frost risk occurring when hazard intersects with vulnerability. Management practices such as pruning, thinning, and irrigation can influence frost sensitivity and susceptibility.

Apricots, like many other fruit-bearing species, face significant challenges in early spring due to temperature fluctuations that can damage their generative organs and reduce fruit yield (Karshiev 2023). Understanding how apricot buds respond to freezing and thawing processes is critical to assessing their tolerance to such temperature fluctuations. One way to investigate this is to study the phase transitions in the water inside the buds, since the crystallization and thawing of water play a critical role in determining frost tolerance. Differential scanning calorimetry (DSC) is a widely used technique for analyzing these phase transitions by capturing exothermic and endothermic peaks during cooling and heating cycles, respectively (Tanner *et al.*, 2021). Parameters obtained by DSC, such as initial crystallization and melting temperatures, and the enthalpy of phase transitions, provide valuable information on the dynamics of water inside the generative buds. In particular, crystallization and melting temperatures, as well as the percentage of crystallized water, can be used as indicators of the frost tolerance of a genotype (Bilavcik *et al.*, 2019). A lower crystallization temperature and a high susceptibility to supercooling suggest greater resistance to spring frosts, as buds that can avoid freezing at higher temperatures have a better chance of surviving sudden changes in ambient temperature.

Materials and methods

Apricot shoots were collected in mid-March in the orchards of Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy (RBIP). The generative buds from one-year dormant shoots of apricot (*Prunus armeniaca* L. var. *armeniaca*) of several varieties were used for the measurements. Phase transitions in apricot buds were studied using the DSC method with a Discovery X3 (TA Instruments, USA). Simultaneous measurements were carried out in three separate apricot buds of the same genotype (Fig. 1). Thermal effects were recorded during cooling and warming at a rate of 10°C/min over a temperature range from -90°C to 30°C. Thermograms were analyzed using TA Instruments TRIOS software.

Water activity in single-node segments of apricot was determined using a Water Activity Meter HP23-AW-A (Rotronic, Switzerland). To measure water activity, single-node segments of branches with a bud (n=8) were placed in a measuring cell and equilibrated for 45–55 minutes at a temperature of 21.5–22.5°C. After equilibrium was established, water activity in the samples was recorded.

The water content of the samples was determined gravimetrically by measuring the change in the mass of fresh and dried raw materials. The nodal segments were dried after measuring the water activity (the fresh mass was determined before measuring water activity). After completing the DSC experiments, the pans with the samples were perforated and dried to a constant weight at 105°C to determine the dry mass of the buds and twigs separately.
All statistical analyses were conducted using Statistica 14.0.0.15 software (TIBCO Software Inc.). Results are presented as mean ± standard error (SE).

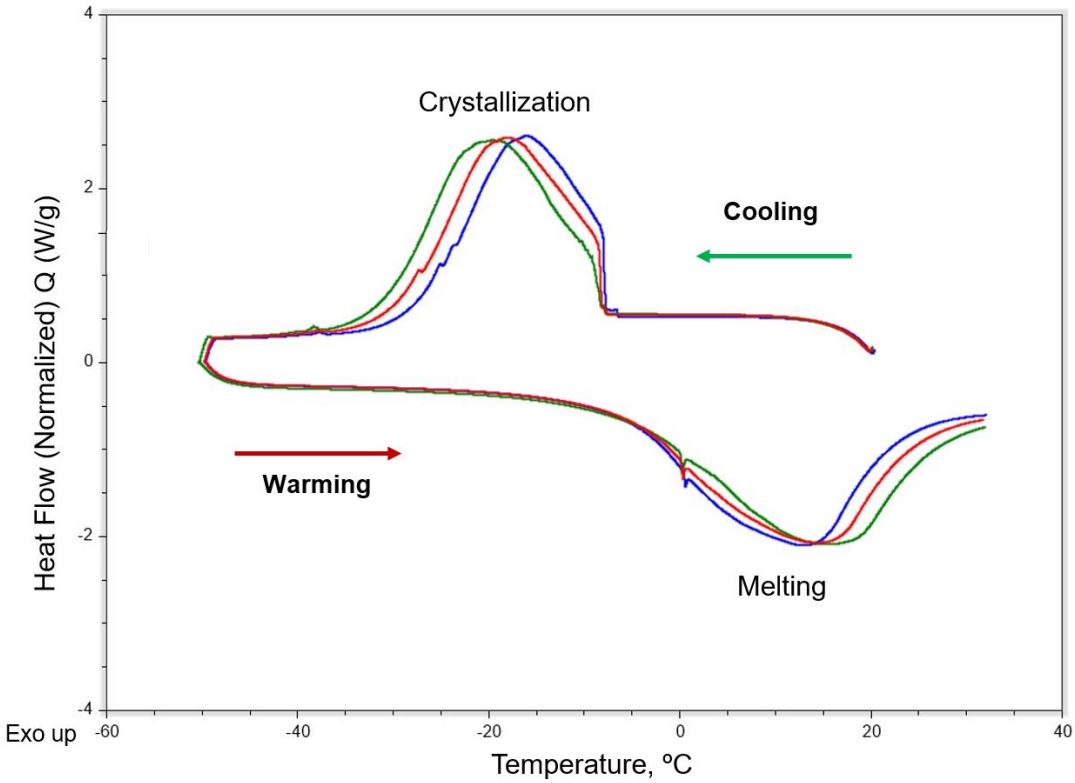


Fig. 1. DSC thermogram of apricot flower buds (genotype 09-010). The cooling and heating rate was 10°C/min.

Results and discussion

When cooling the generative organs of apricot, water crystallizes, and an intense exothermic peak is recorded on the DSC thermograms due to the release of latent heat of crystallization (Fig. 1). During subsequent warming, an endothermic peak of ice melting, which formed during the cooling stage, is recorded. The main parameters of these phase transitions are the onset temperatures of crystallization and melting, rather than their peaks, as the peak temperature strongly depends on the sample mass and scanning speed. Another important parameter is the enthalpy of the phase transition, which is proportional to the area of the peaks recorded by the DSC method. The enthalpy of crystallization and melting allows us to estimate the percentage of water in the generative buds that crystallized during cooling and melted during heating. We analyzed the above parameters for 27 apricot genotypes, and the results are presented in Table 1.

Table 1. Onset temperatures of water crystallization and ice melting, and percentages of crystallized water during cooling and warming in apricot generative organs of different genotypes. Data are presented as mean ± SE.

Genotype	Onset temperature, ºC		Crystallized water, %	
	Crystallization	Melting	Cooling	Warming
00-008	-8.3±0.12	-6.0±0.23	80.6±1.00	86.4±0.95
00-010	-7.9±0.09	-5.8±0.13	77.5±1.13	83.1±1.71
00-018	-11.4±0.48	-5.4±0.21	75.4±1.49	81.0±2.18
01-033	-8.8±0.20	-5.5±0.30	78.5±0.78	84.3±1.07
01-091	-7.4±0.12	-5.0±0.34	81.1±1.97	88.2±1.58
01-093	-8.4±0.12	-5.5±0.15	74.8±3.69	80.2±3.27
02-024	-10.1±0.21	-2.9±1.12	75.0±1.31	85.6±2.10
08-002	-9.9±0.65	-2.5±0.72	75.9±2.59	83.5±2.68
08-009	-9.2±0.17	-5.3±0.13	82.8±1.83	89.2±1.97
08-018	-10.4±1.60	-5.9±0.63	80.2±1.76	86.4±1.54
08-15	-8.2±1.19	-3.7±1.00	81.2±0.74	87.1±1.35
09-010	-8.0±0.11	-2.9±0.40	78.6±1.28	84.1±0.84
96-288	-12.0±2.21	-4.8±1.00	77.3±6.09	84.2±7.28
96-454	-8.0±0.27	-5.8±0.07	81.0±2.50	87.2±3.18
96-599	-9.5±1.03	-3.8±0.71	68.6±5.67	78.6±5.07
97-033	-9.8±0.76	-4.7±1.30	81.5±1.34	88.9±2.13
97-052	-8.8±0.70	-5.4±0.11	83.8±1.68	87.9±1.76
PL 3/242	-9.4±0.38	-5.5±0.69	84.1±1.04	89.2±2.84
VOJ 5/147	-8.9±0.12	-5.9±0.18	75.1±2.78	82.6±2.88
VOJ 5/150	-9.4±1.02	-3.5±1.93	78.5±1.80	85.7±1.23
'Bergeron'	-7.7±0.30	-4.0±0.55	80.6±0.83	84.2±2.52
'Betinka'	-8.0±0.42	-4.9±0.31	80.6±1.56	85.5±1.22
'Candela'	-8.1±0.42	-6.5±0.78	80.8±0.68	82.1±0.73
'Harcot'	-8.3±0.33	-4.3±0.70	77.5±1.26	80.0±1.23
'Harogem'	-7.7±0.20	-5.2±0.56	78.9±1.10	80.6±1.98
'Leskora'	-8.4±0.09	-6.1±0.63	76.9±0.98	77.4±0.89
'Sophinka'	-8.6±0.39	-5.7±0.48	79.5±2.66	83.5±4.08

It is assumed that lower crystallization and melting temperatures, as well as a lower percentage of crystallized water, indicate higher frost resistance in a particular genotype (Bakradze *et al.* 2008, Larcher 2005). It is evident that the crystallization and melting temperatures, as well as the percentage of crystallized water during cooling and heating, do not coincide. The difference between these parameters indicates how much the buds of a particular genotype are prone to supercooling. A high tendency for supercooling helps the buds survive sharp drops in air temperature.

Analysis of the DSC thermograms (Table 1) for the generative buds of apricot genotypes revealed significant differences in crystallization and melting behaviors. Genotypes with lower onset crystallization temperatures, such as 00-018 and 96-288, displayed a greater capacity for supercooling, which likely contributes to enhanced frost tolerance. This ability to supercool, delaying ice formation until lower temperatures are reached, minimizes intracellular ice damage

and allows these genotypes to survive sudden temperature drops. In contrast, genotypes with higher crystallization onset temperatures, such as 08-15 and 09-010, may have increased frost sensitivity due to a higher likelihood of ice nucleation at warmer temperatures. These findings align with previous research (Miranda et al., 2005), which identified a strong correlation between low crystallization temperatures and frost resilience in *Prunus* species.

The phase state of water in the buds with decreasing temperature and their tendency to supercooling may be related to parameters such as water content in apricot buds and water activity. These parameters were also estimated for all the studied genotypes, with results shown in Fig. 2. It is evident that not all genotypes show a correlation between the parameters. This may be related to the fact that the plant material was collected on the same day for all genotypes, and they may have been at slightly different phenophases of generative development.

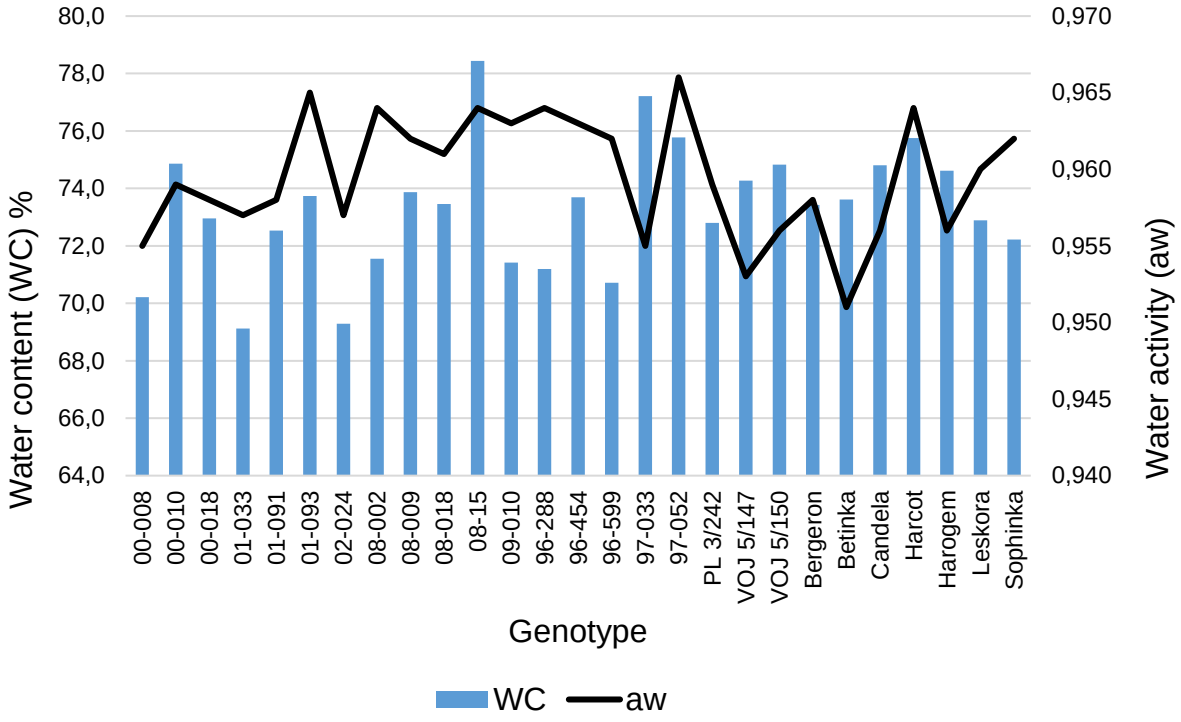


Fig. 2. Water content (WC) and water activity (AW) in apricot generative buds of different genotypes.

Additionally, water content (WC) and water activity (AW) measurements varied among genotypes (Fig. 2). While higher water activity generally increases the risk of ice formation, certain genotypes with elevated AW, such as 97-052 and 01-093, exhibited moderate frost resistance, possibly due to structural adaptations or biochemical factors that influence the freezing dynamics within buds. This suggests that while WC and AW provide valuable indicators of frost susceptibility, they are not the sole determinants. Phenophase differences may also play a role, as genotypes collected at slightly advanced developmental stages may display higher water activity and altered supercooling capacity, impacting their response to low temperatures.

Conclusion

This study evaluated 27 apricot genotypes to understand their frost resistance by analysing the thermodynamic properties of water within their generative buds. By utilizing differential scanning calorimetry, we identified key parameters—including crystallization and melting temperatures, and the enthalpy of phase transitions—that reveal significant variability in frost tolerance across genotypes. Our findings suggest that genotypes with lower crystallization onset

temperatures and higher capacities for supercooling are better equipped to withstand sudden temperature drops, providing valuable insights for identifying frost-resistant varieties.

In addition, our measurements of water content and water activity highlighted potential correlations between these factors and frost tolerance. However, not all genotypes showed a clear relationship, likely due to minor differences in phenological stages at the time of sampling. This suggests that frost resistance is a multifactorial trait influenced not only by water properties but also by genetic and structural factors unique to each genotype.

Understanding the interplay between these thermodynamic properties and frost tolerance can inform breeding programs and conservation strategies, aiding in the selection of apricot genotypes resilient to late-spring frosts. Further research on physiological and genetic factors underlying frost resistance could deepen our understanding and support the development of apricot varieties better adapted to changing climate conditions. This knowledge is crucial for sustaining apricot productivity and protecting genetic resources in regions increasingly affected by unpredictable frosts.

References

Amarante, V., Lenz, A., & Vitasse, Y. (2017). Frost hardening and dehardening potential in temperate trees from winter to budburst. *New Phytologist, 216*(1), 113–123. https://doi.org/10.1111/nph.14691

Bacelar, E., Pinto, T., Anjos, R., Morais, M.C., Oliveira, I., Vilela, A., & Cosme, F. (2024). Impacts of climate change and mitigation strategies for some abiotic and biotic constraints influencing fruit growth and quality. *Plants, 13*(1942). https://doi.org/10.3390/plants13141942

Bakradze, N., Kiziria, E., Sokhadze, V., & Gogichaishvili, S. (2008). The peculiarities of water crystallization and ice melting processes in the roots of one-year plants (Plantago major L.). *Cryo letters*, 29(3), 217–228.

Bilavcik, A., Zamecnik, J., Faltus, M., & Jadrná, P. (2019). Analysis of freezable water content by DSC for apple dormant bud cryopreservation. *Horticultural Science, 46*, 163-170. https://doi.org/10.17221/146/2018-HORTSCI

Bublyk, M.O., Fryziuk, L.A., Chorna, H.A., & Barabash, L.O. (2022). Analysis of global trends in scientific developments for the protection of fruit plants against frosts. *Horticulture Interdepartment Subject Scientific Collection, 77*, 126-132.

Drepper, B., Bamps, B., Gobin, A., & Orshoven J.V. (2021). Strategies for managing spring frost risks in orchards: effectiveness and conditionality—A systematic review protocol. *Environmental Evidence, 10*(32). https://doi.org/10.1186/s13750-021-00247-7

Fraga, H., & Santos, J.A. (2021). Assessment of climate change impacts on chilling and forcing for the main fresh fruit regions in Portugal. *Frontiers in Plant Science, 12*, 689121. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.689121

Chawla, R., Sheokand, A., Rai, M.R., Kumar, R., & Sadawarti (2021). Impact of climate change on fruit production and various approaches to mitigate these impacts. *The Pharma Innovation Journal*, *10*(3), 564-571.

Karshiev, A.E. (2023). Selection of cold-resistant apricot varieties. *The American Journal of Agriculture and Biomedical Engineering*, *5*(4), 14-20.

Medda, S., Fadda, A., & Mulas, M. (2022). Influence of climate change on metabolism and biological characteristics in perennial woody fruit crops in the mediterranean environment. *Horticulturae, 8*(273). https://doi.org/10.3390/horticulturae8040273

Larcher, W. (2005). Climatic constraints drive the evolution of low temperature resistance in woody plants. Journal of Agricultural Meteorology, 61(4), 189-202. https://doi.org/10.2480/agrmet.61.189

Miranda, C., Santesteban, L.G., Royo, J.B. (2005). Variability in the relationship between frost

temperature and injury level for some cultivated Prunus species. *HortScience*, 40(2), 357-361.

Osorio-Marín, J., Fernandez, E., Vieli, L., Ribera, A., Luedeling, E., & Cobo, N. (2024). Climate change impacts on temperate fruit and nut production: a systematic review. *Frontiers in Plant Science, 15*. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1352169

Salama, A.-M., Ezzat, A., El-Ramady, H., Alam-Eldein, S.M., Okba, S.K., Elmenofy, H.M., Hassan, I.F., Illés, A., & Holb, I.J. (2021). Temperate fruit trees under climate change: challenges for dormancy and chilling requirements in warm winter regions. *Horticulturae, 7*(86). https://doi.org/10.3390/horticulturae7040086

Tanner, J.D., Chen, K.Y., Jenderek, M.M., Wallner, S.J., & Minas, I.S. (2021). Determining the effect of pretreatments on freeze resistance and survival of cryopreserved temperate fruit tree dormant buds. *Cryobiology, 101*, 87–94. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.05

Acknowledgments

I thank my colleagues Ing. Lubor Zelený and Ing. Pavol Suran from Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy for providing plant material. This study was partly funded by the MSCA4Ukraine project, financed by the European Union, and project QK21010200 funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

Kontakt:

Olena Bobrova, Ph.D.
Tým fyziologie a kryobiologie rostlin
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507 16106 Praha 6
olena.bobrova@vurv.cz

Využití termické analýzy pro kryokonzervaci genetických zdrojů rostlin

Use of thermal analysis for cryopreservation of plant genetic resources

Faltus M., Bilavčík A., Bobrova O., Zámečník J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Abstrakt

Kryoprotektivní látky (CPA) jsou důležitou součástí mnoha současných metod vitrifikace. Schopnost CPA vytvářet sklovitý stav ovlivňuje pravděpodobnost výskytu skelného přechodu a krystalizace vody. Termální vlastnosti a vitrifikační schopnost dvou kombinovaných CPA (PVS2 a PVS3), běžných vitrifikačních roztoků pro rostliny, a čtyř jednotlivých CPA (ethylenglykol, DMSO, glycerol a sacharóza), které jsou součástí zmíněných PVS, byly hodnoceny pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) při standardních rychlostech chlazení/zahřívání 10 °C za minutu. U testovaných CPA byl prokázán vliv koncentrace rozpuštěných látek na jejich vitrifikační schopnost. Byly definovány čtyři typické koncentrační oblasti, ve kterých docházelo ke sklovitému stavu a/nebo krystalizaci. Doporučujeme koncentraci rozpuštěných látek 0,7 $g.g^{-1}$ jako univerzální vitrifikační koncentraci, která se vyznačuje skutečnou teplotou skelného přechodu CPA roztoku a omezenou krystalizací vody. Znalost termálních vlastností CPA umožňuje navrhovat nové kombinované CPA s požadovanou vitrifikační schopností s ohledem na použitou metodu kryoprezervace a vlastnosti kryoprezervovaného vzorku.

Klíčová slova: diferenciální skenovací kalorimetrie, krystalizace vod,y skelný přechod, vitrifikace

Abstract

Cryoprotective agents (CPAs) are an important part of many current vitrification methods. The ability of CPA to form a glassy state affects the likelihood of glass transition and water crystallization. The thermal properties and vitrification ability of two combined CPAs (PVS2 and PVS3), common vitrification solutions for plants, and four individual CPAs (ethylene glycol, DMSO, glycerol, and sucrose) that are part of the mentioned PVSs were evaluated using differential scanning calorimetry (DSC) at standard cooling/heating rates of 10°C per minute. The influence of the concentration of dissolved substances on their vitrification ability was demonstrated for the tested CPAs. Four typical concentration regions were defined in which the glassy state and/or crystallization occurred. We recommend a solute concentration of 0.7 $g.g^{-1}$ as a universal vitrification concentration that features the true glass transition temperature of the CPA solution and limited water crystallization. Knowledge of the thermal properties of CPA makes it possible to design new combined CPA with the desired vitrification ability, taking into account the cryopreservation method used and the properties of the cryopreserved sample.

Keywords: differential scanning calorimetry, glass transition, vitrification, water crystallization

Úvod

Kryoprezervované organismy nebo jejich části lze uchovávat beze změn po mnoho let. Jejich stabilita není dána pouze nízkou teplotou, která zpomaluje všechny procesy, ale především specifickým stavem hmoty. Během kryoprezervace dochází ke změně kapalného stavu na pevný, tzv. sklovitý stav, což zajišťuje stabilitu materiálu díky jeho extrémní viskozitě a zabraňuje růstu ledových krystalů, které by mohly poškodit strukturu a funkci buněk. Fázový přechod z kapalného do sklovitého stavu se nazývá vitrifikace (Fahy et al. 1984). Dehydratace a/nebo vitrifikace kryoprezervovaného organismu je základní podmínkou úspěšné kryoprezervace (Pegg 2007). Všechny kryoprotektivní postupy snižují obsah vody, aby zabránily tvorbě škodlivých ledových krystalů při ultranízkých teplotách. Tato dehydratace může probíhat pomocí suchého vzduchu, řízeného zmrazování nebo osmoticky aktivních roztoků, kryoprotektivních látek (CPA), které buňky dehydrují a napomáhají vitrifikaci během chlazení. CPA mohou obsahovat směs složek, které mohou, vzhledem k jejich velikosti, procházet přes buněčné membrány do buněk či nikoli. Nepenetrující složky působí mimo

buňky, zatímco penetrující kryoprotektiva působí i uvnitř buněk, kde brání krystalizaci vody, ale mají často vyšší cytotoxicitu. CPA mohou modifikovat nebo zcela zabránit zamrzání vody, přičemž při nízké koncentraci CPA dochází k řízenému zmrazování vody při pomalém chlazení; při vysoké koncentraci CPA je možné zamrzání vody obejít (Wowk 2010). Na základě koncentrace CPA může vitrifikace probíhat třemi způsoby: 1) nestabilní vitrifikace při nízké koncentraci vyžaduje extrémně vysoké rychlosti chlazení/ohřevu, 2) metastabilní vitrifikace nastává při střední koncentraci CPA a mírných rychlostech C/W, a 3) stabilní vitrifikace při vysoké koncentraci CPA, která je nezávislá na rychlostech C/W (Wowk 2010). Účinnost koncentrace kryoprotektantů (CPA) pro úspěšnou kryoprezervaci závisí na schopnosti vyvolat skelný stav bez krystalizace vody, což je ovlivněno koncentrací CPA a vlastnostmi jeho složek. Lze rozlišit dva typy skelných přechodů: 1) skelný přechod roztoku (Tg) a 2) skelný přechod maximálně zmrazeného koncentrovaného roztoku (Tg'), který vzniká v důsledku zamrzání vody a postupné koncentrace roztoku. Zatímco Tg ukazuje spolehlivý vitrifikační proces, Tg' odhaluje suboptimální podmínky vitrifikace. Využití specifických kryoprotokolů může být vylepšen znalostí termálních vlastností CPA, jako je bod tání/mrazu a změny specifické tepelné kapacity při fázových přechodech (Fahy, Wowk 2015). Tyto parametry lze měřit pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a mohou pomoci při výběru vhodných CPA pro konkrétní metody kryoprezervace. Tato studie se zaměřila na analýzu vlivu koncentrace roztoku na termické vlastnosti a vitrifikační schopnost dvou běžných CPA směsí (PVS2 a PVS3).

Materiál a metody

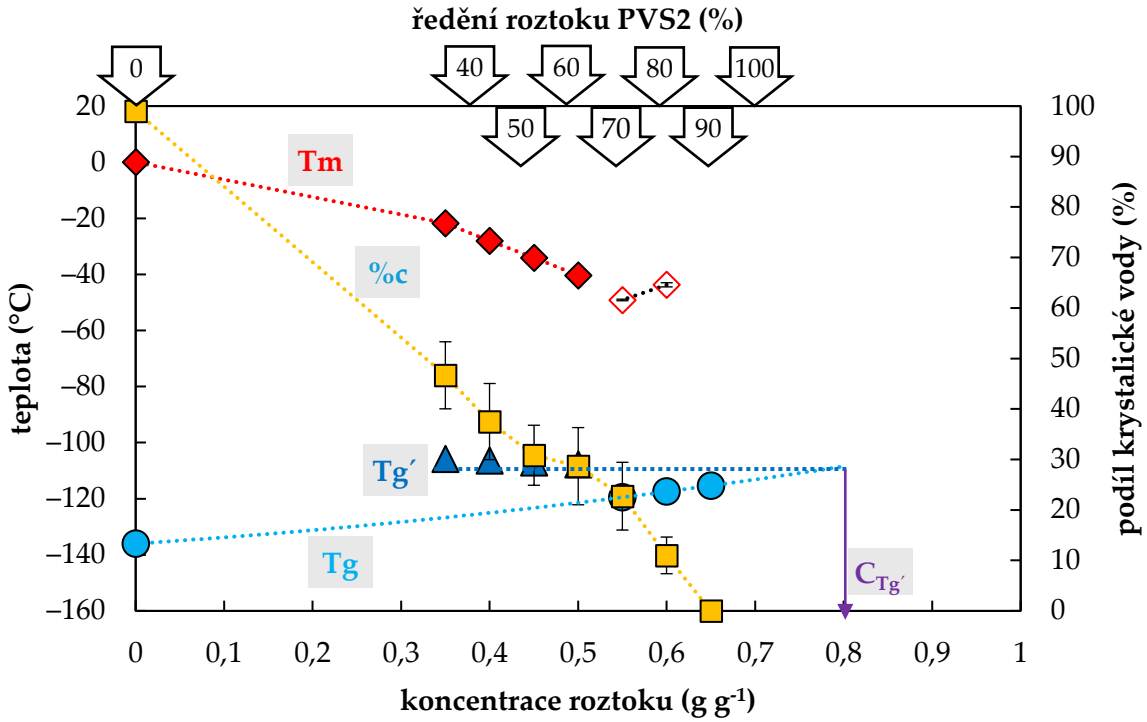
Osmotické směsi dvou běžných kombinovaných CPA a jejich jednotlivých osmotických složek byly testovány pomocí diferenční skenovací kalorimetrie. Složení PVS2 zahrnovalo 15 % ethylenglykolu, 15 % DMSO, 30 % glycerolu a 13,7 % sacharózy, přičemž směs byla ředěna vodou. Původní roztok byl definován jako 100 % PVS2, poté byly připraveny další koncentrace (90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % a 40 % PVS2). Druhý CPA, PVS3, obsahoval 50 % glycerolu a 50 % sacharózy. Původní roztok byl definován jako 100 % PVS3 a dále byly připraveny roztoky s koncentracemi 80 %, 60 %, 40 % a 20 % PVS3.

Termická analýza probíhala při standardních rychlostech chlazení/ohřevu 10 °C za minutu v rozmezí teplot od +25 do $^{-1}$40 °C při chlazení a od -140 do 30 °C při ohřevu. Software Universal Analysis byl použit pro hodnocení teploty skelného přechodu (Tg), teploty tání (Tm) a množství zmrzlé vody na základě změřené entalpie tání.

Výsledky a diskuze

Vitrifikační schopnost roztoků na bázi PVS2

Krystalizace vody v roztocích na bázi PVS2 během chladícího cyklu probíhala v rozmezí koncentrací od 0,35 do 0,5 $g.g^{-1}$, což odpovídalo 40–70 % koncentrace PVS2 (obr. 1). V této oblasti procento krystalizace vody kleslo ze 47 % na 29 % celkové hmotnosti vzorku se zvyšující se koncentrací rozpuštěné látky. V roztocích s vyšší koncentrací rozpuštěných látek nedošlo během chladícího cyklu ke krystalizaci vody. Krystalizace vody během ohřívacího cyklu byla detekována v roztocích s koncentracemi rozpuštěných látek 0,55 a 0,6 $g.g^{-1}$ (80 % PVS2 a 90 % PVS2). Křivka podílu krystalické vody rychle klesla na 23 a 11 % celkové hmotnosti vzorku v rámci těchto koncentrací rozpuštěné látky. V nejkoncentrovanějším roztoku obsahujícím 0,65 $g.g^{-1}$ (100 % PVS2) nebyla během C/W cyklů detekována žádná krystalizace vody.

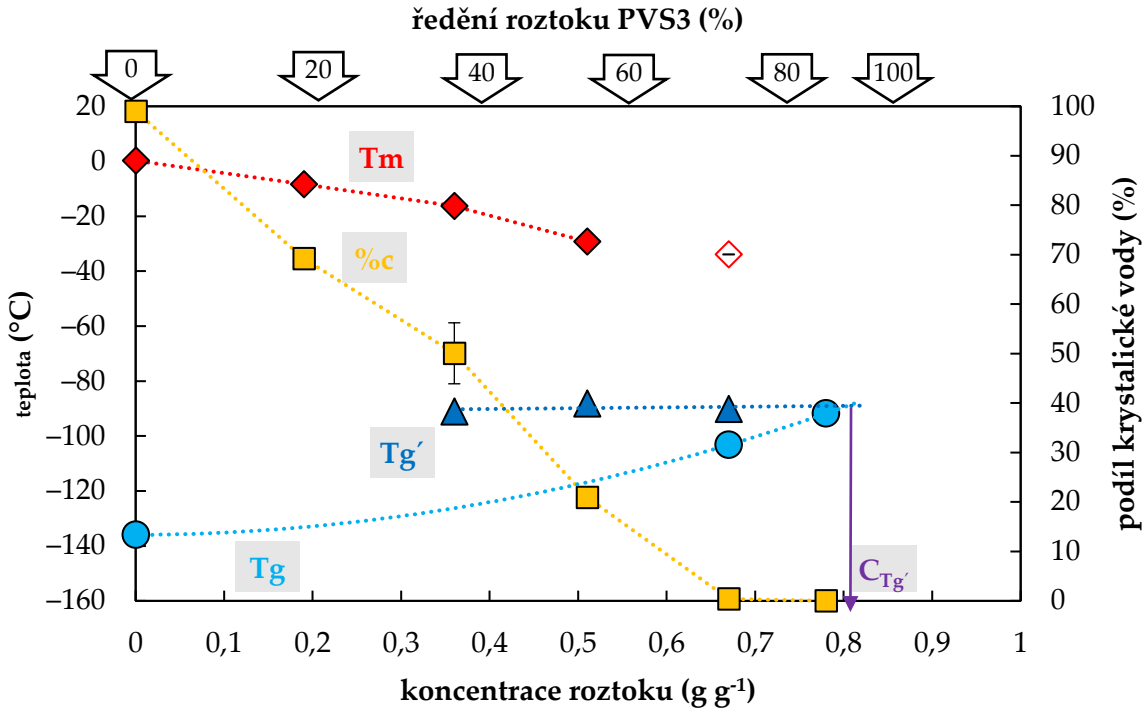


Obrázek 1. Tepelné charakteristiky osmotických složek rostlinného vitrifikačního roztoku 2 (PVS2). Osa x vyjadřuje celkovou koncentraci rozpuštěných látek (g) na hmotnost vodného roztoku (g). Hodnota Cg' označuje koncentraci lyofilizovaného roztoku. Vitrifikační schopnost (VA) demonstruje rozsah koncentrací rozpuštěné látky s vhodnou vitrifikační schopností. Všechny efekty byly měřeny během ohřevu rychlostí 10 °C min^{-1}. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ze tří opakování a svislé sloupce představují standardní chybu.

Výskyt a hodnota teploty skelného přechodu testovaných roztoků na bázi PVS2 byly ovlivněny koncentrací rozpuštěné látky a byly detekovány dvě křivky Tg (obrázek 1). První, křivka Tg‘, byla vždy doprovázena krystalizací vody během chladícího cyklu a vyskytovala se při nízkých koncentracích rozpuštěné látky (od 0,35 do 0,5 $g.g^{-1}$). V průsečíku s křivkou Tg křivka Tg‘ indikovala koncentraci (Cg‘) roztoku pocházejícího ze zmrznutí vody ve zředěných roztocích, která se vyskytla v blízkosti 0,8 $g.g^{-1}$ (obrázek 1). Tg' byl nezávislý na původních koncentracích rozpuštěné látky a osciloval od -108 do -106 °C (obrázek 1). Druhá, křivka Tg, byla detekována při vysokých koncentracích rozpuštěné látky (od 0,55 do 0,65 $g.g^{-1}$), kdy během chladicího cyklu nedošlo ke krystalizaci vody. Byla závislá na koncentraci rozpuštěných látek, když se s rostoucí koncentrací rozpuštěné látky zvyšovala z -120 na -115 °C (obrázek 1).

Vitrifikační schopnost roztoků na bázi PVS3

Krystalizace vody v roztocích na bázi PVS3 během chladícího cyklu probíhala v rozmezí koncentrací od 0,19 do 0,5 $g.g^{-1}$, což odpovídalo 20 až 60 % koncentrace PVS3 (obr. 2). V této oblasti se procento krystalizace vody snížilo z 69 % na 21 % celkové hmotnosti vzorku se zvyšující se koncentrací rozpuštěné látky. V roztocích s vyššími koncentracemi rozpuštěných látek nedošlo během chladicího cyklu ke krystalizaci vody. V roztoku s koncentrací rozpuštěné látky 0,67 $g.g^{-1}$ (80 % PVS3) byla zjištěna zanedbatelná krystalizace vody během cyklu zahřívání. Při této koncentraci rozpuštěné látky křivka podílu krystalické vody dramaticky poklesla na 0,4 % celkové hmotnosti vzorku. V nejkoncentrovanějším roztoku (100 % PVS3) obsahujícím 0,78 $g.g^{-1}$ rozpuštěných látek nebyla během C/W cyklů detekována žádná krystalizace vody.



Obrázek 2. Tepelné charakteristiky osmotických složek rostlinného vitrifikačního roztoku 3 (PVS3) v závislosti na jejich koncentracích ve vodném roztoku. Celková koncentrace rozpuštěných látek je vyjádřena jako hmotnost rozpuštěných látek (g) na hmotnost vodného roztoku (g). Procento zmrzlé vody (%c) je vztaženo na celkovou hmotnost roztoku. Vitrifikační schopnost (VA) demonstruje rozsah koncentrací rozpuštěné látky s vhodnou vitrifikační schopností. Cg´ udává koncentraci lyofilizovaného roztoku. Všechny efekty byly měřeny během ohřevu rychlostí 10 °C min^{-1}. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ze tří opakování a svislé sloupce představují standardní chybu.

Závěr

Vhodná vitrifikační schopnost dvou kombinovaných (PVS2 a PVS3) CPA se obvykle pohybovala v rozmezí koncentrací rozpuštěné látky 0,6 až 0,8 $g.g^{-1}$. Žádná krystalizace ve všech CPA během chladicího cyklu není spojena s detekcí Tg odpovídající skutečné koncentraci roztoku. Přítomnost skelného stavu vymraženého koncentrovaného roztoku, charakterizovaného Tg', indikuje výskyt krystalizace vody během chladícího cyklu a možné poškození vzorku růstem ledových krystalů. Na druhou stranu hodnota Tg‘ může pomoci identifikovat Cg‘ maximálně lyofilizovaného roztoku, který odpovídá koncentraci rozpuštěné látky typické pro stabilní podmínky vitrifikace. Koncentrace 100 % PVS3 blízko Cg' naznačuje její vyšší schopnost vitrifikace ve srovnání se 100 % PVS2.

Literatura

Fahy, G.M.; MacFarlane, D.; Angell, C.A.; Meryman, H. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 1984, 21, 407–426.

Pegg, D.E. Principles of cryopreservation. In Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2007; pp. 39–57.

Wowk, B. Thermodynamic aspects of vitrification. Cryobiology 2010, 60, 11–22, doi:10.1016/j.cryobiol.2009.05.007.

Fahy, G.M.; Wowk, B. Principles of cryopreservation by vitrification. Methods Mol. Biol. 2015, 1257, 21–82, doi:10.1007/978-1-4939-2193-5_2.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení institucionálního projektu MZE – RO0423.

Kontakt:

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
Drnovská 507
161 00 Praha 6
e-mail: faltus@vurv.cz

Hodnocení odolnosti genových zdrojů lupiny bílé (*Lupinus albus* L.) vůči antraknóze

Evaluation of the resistance of gene resources of white lupin (*Lupinus albus* L.) to anthracnose.

Frnková Ježková V.[1], Macháč R.[2]

[1]*OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská Zubří*

[2]*OSEVA vývoj a výzkum s. r. o., Zubří*

Abstrakt

V roce 2024 byl v rámci OSEVA PRO s. r. o. Výzkumná stanice travinářská Zubří založen a veden pokus s genovými zdroji lupiny bílé (*Lupinus albus*), ve kterém byla hodnocena míra napadení rostlin antraknózou (*Colletotrichum lupini*). Genové zdroje zahrnovaly jak staré, tak i novější odrůdy lupiny bílé, získané z Genové banky ve VÚRV v.v.i. v Praze a od soukromých firem. Pokus nebyl chemicky ošetřen ochrannými postřiky proti houbovým chorobám a příznaky napadení byly pozorovány v čase na rostlinách. Některé odrůdy vykazovaly již na počátku pozorování vysokou míru napadení, zatímco jiné genotypy nejevily žádné známky onemocnění až do ukončení experimentu. Jedná se o předběžné hodnocení genových zdrojů, které bude zopakováno v následujícím roce a na jeho základě budou vybrány položky pro analýzu genů zodpovědných za rezistenci.

Klíčová slova: lupina bílá, antraknóza, odolnost vůči antraknóze, šlechtění

Abstract

In 2024, as part of OSEVA PRO Ltd. Grassland Research Station Zubří, an experiment with genetic resources of white lupine (*Lupinus albus*) was set up and conducted, in which the rate of plant infestation by anthracnose (*Colletotrichum lupini*) was evaluated. Gene resources included both old and newer varieties of white lupine, provided mainly by the VÚRV Gene Bank, partially by private companies. The experiment was not treated with fungicides and symptoms of infestation were observed on the plants. Some varieties already showed a high level of attack at the beginning of the observation, while other genotypes did not show any signs of the disease until the end of the experiment. This is a preliminary evaluation of genetic resources, which will be repeated the following year, and based on it, varieties for the analysis of genes responsible for resistance will be selected.

Keywords: white lupine, anthracnosis, anthracnosis resistance, breeding

Úvod

Lupina bílá (*Lupinus albus* L.) patří mezi jednoleté rostliny čeledi bobovité (Fabaceae) a má vysoký pěstební potenciál jako zdroj bílkovin v sušším klimatu a na chudých kyselých půdách, čímž může konkurovat plodinám jako např. sója nebo hrách. Od dob, kdy byly vyselektovány první sladké kultivary (tj. s minimem hořkých a jedovatých alkaloidů), se pěstební plocha v různých částech světa zvýšila, zejména v Austrálii, Polsku a bývalém SSSR (López-Bellido et al. 1994).

Semena lupiny bílé se používají v lidské výživě již několik tisíc let, nicméně v současnosti je použití omezeno relativně malým rozsahem produkce. V posledních letech však byly objeveny zcela nové vlastnosti pro využití při výrobě různých druhů funkčních potravin. Jedinečné vlastnosti bílkovin, mastných kyselin s žádoucím poměrem omega-6 ku omega-3 a vlákniny, stejně jako další specifické složky, například oligosacharidy a antioxidanty, dělají z lupiny bílé vynikající surovinu pro výrobu dalších produktů, jako je např. bezlepková mouka, náhražky masa a vaječné bílkoviny, bílkovinné extrakty nebo alternativy mléčných produktů. Kvůli těmto vlastnostem lze rovněž pozorovat rostoucí zájem o produkci lupiny bílé jako krmiva pro zvířata (Chiofalo et al., 2012; Janusz 2017, Struţi et al. 2021).

Jedním ze zásadních problémů při pěstování této plodiny je onemocnění antraknóza, které se přenáší semeny, vzduchem či půdou. Antraknóza je u lupiny bílé způsobena houbovým patogenem *Colletotrichum lupini*. Jde o závažné onemocnění, které se vyskytuje ve všech

oblastech světa, kde se lupina pěstuje. Plocha osetá lupinou bílou a lupinou žlutou se kvůli antraknóze dramaticky zmenšila v zemích, kde se lupina tradičně pěstuje, jako je Polsko, Portugalsko, Rusko, Německo a Francie. Šlechtitelské programy se v těchto zemích přesměrovaly na šlechtění lupiny úzkolisté (*Lupinus angustifolius*) kvůli dostupnosti kultivarů rezistentních na antraknózu u tohoto druhu (Adhikari et al. 2009).
Infikovaná semena (primární infekce) a šíření deštěm (sekundární infekce) mohou za příznivých podmínek způsobit vysoké ztráty ve výnosu. Typickými příznaky jsou zkroucené a zohýbané stonky a oranžové nekrotické léze na stoncích a luscích (Alkemade et al. 2022). Tyto příznaky můžeme vidět na obr. 1.

Obr. 1: Typické příznaky antraknózy na stoncích a luscích lupiny bílé – světle hnědé oválné skvrny s tmavým okrajem, za vlhka pokryté světle oranžovým povlakem mycelia. V místech napadení pletiva zkroucená – typicky stáčející se stonky, později zasychají.

Chorobu lze omezit použitím čistého osiva, ošetřením osiva mořidly nebo opakovanou aplikací fungicidů, nicméně nejekonomičtějším způsobem potlačení choroby je použití rezistentních kultivarů. U lupiny bílé byla zjištěna vysoká úroveň rezistence u některých etiopských krajových linií, jako jsou P27174 a P27175, které byly vstupním zdrojem šlechtitelského programu rezistence vůči antraknóze v Austrálii (Adhikari et al. 2009).
Jednou z cest šlechtění lupiny bílé odolné vůči antraknóze by bylo zaměření selekce na rané kultivary s geny rezistence. U lupiny bílé však dosud nebyla nalezena úplná rezistence a tato vlastnost je považována za polygenní, tj. kódovanou více geny s různými účinky současně (Adhikari et al. 2009, Adhikari et al. 2013, Alkemade et al. 2022). Výzkum genů a podmínek, které jsou zodpovědné za odolnost této plodiny vůči antraknóze je proto na místě.
Cílem projektu *TA ČR FW10010461 Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin – zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin* je v případě lupiny přenos biotechnologických a molekulárně biologických metod do praktického šlechtění, modifikace stávajících šlechtitelských programů luskovin o tyto moderní metody a zefektivnění procesu novošlechtění tak, aby co nejdříve došlo k doručení odolných odrůd na trh.

Materiál a metody

8.3. 2024 byl v katastru města Zubří založen a následně veden pokus o celkové výměře 151,2 m^2 (obr. 2), ve kterém bylo shromážděno a hodnoceno 40 různých odrůd lupiny bílé (2 položky se vyskytovaly v duplikaci). Seznam těchto položek, včetně země původu a evidenčního čísla národního (ECN), je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: Hodnocené odrůd *Lupinus albus* L.

Odrůda	ECN*	Původ
Zulika	**	CZE
Butan	**	POL
Bila Langsberska A	05L0700002	ČSR
Bila Langsberska B	05L0700003	ČSR
Bila Langsberska C	05L0700004	ČSR
Bila Zagrepska	05L0700006	HRV
Kijevskij mutant-77	05L0700028	SSSR
R-933	05L0700029	POL
Wat	05L0700030	POL
Kalina	05L0700031	POL
Kijevsky Mutant-81	05L0700038	ČSR
Wolodja	05L0700040	SSSR
WTD	05L0700041	POL
POP I	05L0700042	POL
Gorizont	05L0700043	SSSR
Solnecnyj	05L0700044	SSSR
Start	05L0700046	SSSR
Maribanez	05L0700047	ESP
Los Palacios	05L0700048	ESP
Guadajina	05L0700049	ESP
Elvas	05L0700050	PRT

Odrůda	ECN*	Původ
Labon	05L0700051	ESP
Almendralejo	05L0700052	ESP
Marchena	05L0700053	ESP
Druzba	05L0700054	SSSR
Ultra	05L0700055	AUS
BAC	05L0700057	POL
Kali	05L0700058	POL
Hetman	05L0700059	POL
Satmarean	05L0700060	ROU
Golf	05L0700061	DEU
Lublanc	05L0700062	FRA
Lucky	05L0700063	FRA
Lutop	05L0700064	FRA
Amiga1	05L0700069	FRA
Amiga2	05L0700069	FRA
Bardo	05L0700071	POL
Sinij parus	05L0700073	UKR
Olezka	05L0700074	UKR
Sulimo	**	FRA
Dieta1	05L0700077	DNK
Dieta2	05L0700077	DNK

* evidenční číslo národní genetického zdroje
** ECN chybí/zatím nebylo přiděleno (Dle GRIN CZECH)

Jednotlivé položky byly vysety ve sponu 10x30 cm s hloubkou setí 3-6 cm. Od každé položky bylo z důvodů limitovaného počtu získaných semen vyseto 40 ks semen do 2 řádků. Pokus byl oplocen králičím pletivem, herbicidně ošetřen proti plevelům při zasetí a měsíc po výsevu, a rovněž byl průběžně ručně okopáván a byla provedená ruční selekce plevelů. Porost nebyl ošetřen žádným fungicidním prostředkem.

V červnu, 10.6.2024, bylo provedeno 1. pozorování a hodnocení rostlin – byly pozorovány pro každou položku zvlášť tyto charakteristiky:

1) počet vzejitých rostlin z celkového vysetého počtu semen
2) počet rostlin vykazujících znaky napadení antraknózou
3) počet rostlin vykazujících znaky jiné choroby než antraknózy

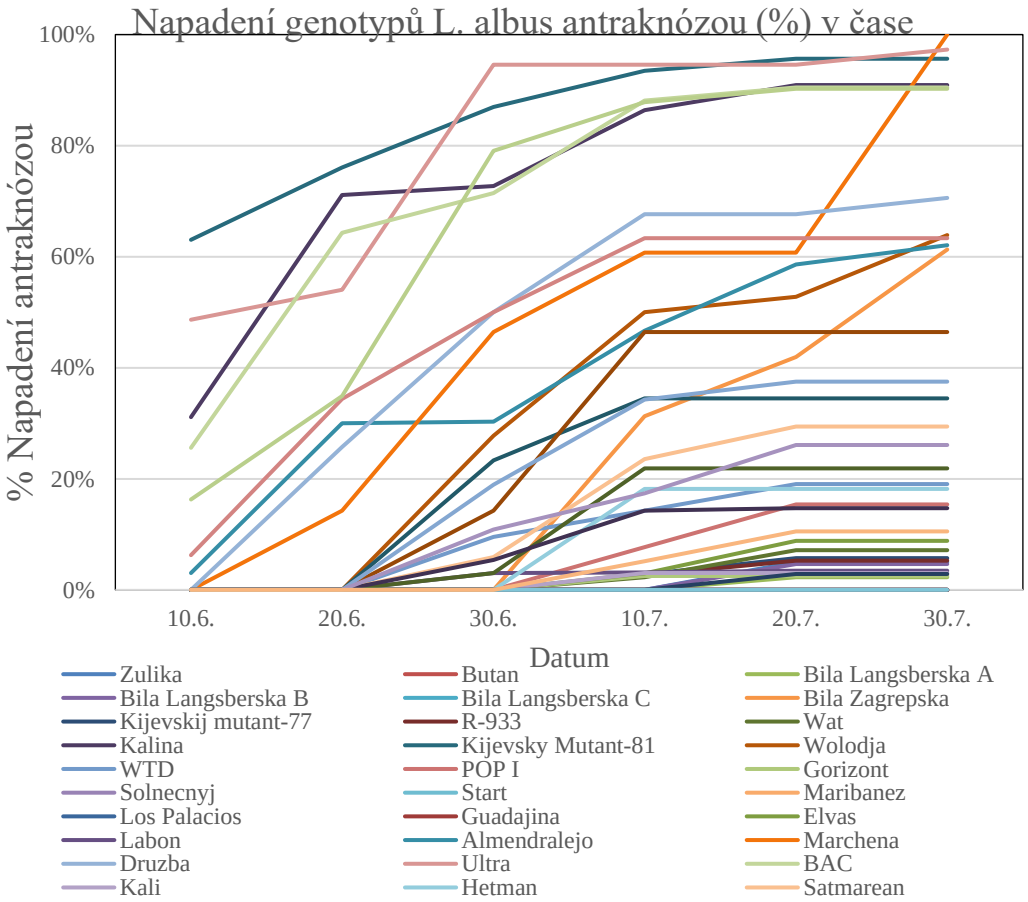
Toto hodnocení bylo opakováno každých 10 dnů (10.6., 20.6., 30.6., 10.7., 20.7., 30.7.) až do úplného zaschnutí, případně u odolnějších genotypů i dozrání rostlin. Nutno rovněž podotknout, že mnoho rostlin bylo infikováno jinou chorobou dříve, než je stihla napadnout antraknóza, což bylo v hodnocení rovněž zahrnuto. Hodnocení bylo ukončeno 1.8.2024.

Obr. 2: Letecký snímek pokusu

Získaná data byla vynesena do grafu jako popisná (graf 1), kdy se prozatím jedná o předběžné výsledky, které budou bude zopakovány v následujícím roce a doplněny tak o další opakování.

Výsledky a diskuze

V grafu č. 1 jsou znázorněny rozdíly v míře napadení rostlin antraknózou, které byly pozorovány v porostu během 2 posledních měsíců probíhajícího pokusu. Procento napadených rostlin je vztaženo vůči celkovému počtu vyklíčených rostlin v rámci genotypu. Některé genotypy (Kijevskij Mutant-77, Ultra, Olezka) vykazovaly silné známky choroby již v prvním termínu hodnocení a velmi rychle byl celý porost odrůdy napaden. Naopak, odrůdy jako Dieta, Butan nebo Langsberska C, po celou dobu pokusu neprojevily žádný příznak této choroby. Pokud se toto prokáže v dalších letech, mohly by mezi genotypy vyvstat odolné odrůdy a být tak potenciálními donory některých zajímavých genů pro rezistentní šlechtění.



Graf 1: Míra napadení genotypů antraknózou v čase

Odrůda Kijevskij mutant, která byla vyšlechtěna na Ukrajině v roce 1982, se poté stala jednou

z nejvíce pěstovaných odrůd po celém světě. V roce 1996 toto byl jediný pěstovaný kultivar v Austrálii, kde po masivním rozšíření antraknózy došlo ke kolapsu jejího pěstování a musela být nahrazena jinými, odolnějšími genotypy (Adhikari et al. 2009). S tímto tvrzením souhlasí i získaná data.

Naopak, například u odrůdy Dieta je šlechtitelem udávána vysoká míra rezistence vůči tomuto onemocnění, což opět tato data naznačují, a to by ji mohlo činit zajímavým donorem genů do rezistentního šlechtění a jedním z kandidátů na MAS (marker-assisted selekci). Podklady, které budou získány z polního hodnocení, budou následně využity pro výběr odrůd, které se podrobí diagnostice genů odolnosti. Inovace ve šlechtitelských programech bude zahrnovat využití molekulárních metod, které umožní rychlou a přesnou identifikaci nositelů genů odolných vůči antraknóze v rámci rezistentního šlechtění lupiny.

Mezi takové metody patří např. již výše zmíněná MAS (z anglického "Marker Assisted Selection"), což je metoda, která využívá molekulární markery (například DNA markery) k urychlení a zefektivnění procesu výběru rostlin s požadovanými vlastnostmi ve šlechtění. Tato metoda umožňuje šlechtitelům identifikovat jedince s genetickými rysy, které jsou spojeny s vysokou produktivitou, odolností vůči chorobám nebo jinými žádoucími charakteristikami ještě před tím, než se projeví fenotypově, tedy ve viditelných znacích. Metoda spočívá v analýze DNA jedinců a porovnávání jejich genetického profilu s cílovými vlastnostmi. Díky tomu mohou šlechtitelé selektivně vybírat jedince, kteří mají vyšší pravděpodobnost zdědit požadované rysy, a tím urychlit šlechtitelské postupy (Koebner 2003).

K zavedení takovýchto markerů do procesu šlechtění je třeba nejprve znaky a geny za ně zodpovědné identifikovat, a poté informace o markerech začlenit do existujících šlechtitelských programů, což ale může vyžadovat přebudování stávajících programů tak, aby bylo možné správně zjistit a odhadovat efekty daných genů a následně co nejefektivněji využít výhod plynoucích z jejich znalosti. Výhodou takového šlechtění může být zkrácení doby potřebné k výběru jedinců s požadovanými vlastnostmi a jejich rychlejší selekce, což může ve výsledku výrazně snížit náklady a lidské zdroje potřebné na celý tento proces (Alkemade et al. 2022).

Závěr

U pěstovaných genotypů lupiny bílé byly pozorovány zajímavé rozdíly v míře odolnosti vůči napadení antraknózou. Některé genotypy se jevily již od počátku pokusu jako velmi náchylné a vykazovaly silné příznaky napadení, jiné genotypy až do konce pokusu nejevily téměř žádný příznak napadení. Tento výsledek může předběžně posloužit jako vodítko k výběru vstupních odrůd s určitou mírou rezistence, mezi kterými budou následně hledány geny za tuto vlastnost zodpovědné. Pochopení genetické architektury rezistence vůči antraknóze u lupiny bílé by tak poskytlo důležité informace pro zásadní zrychlení a zefektivnění její selekce a umožnilo by tak větší rozšíření pěstování tohoto kvalitního zdroje rostlinných proteinů.

Literatura

ADHIKARI, K. N., BUIRCHELL, B. J., THOMAS, G. J., SWEETINGHAM, M. W., YANG, H. (2009). Identification of anthracnose resistance in *Lupinus albus* L. and its transfer from landraces to modern cultivars. Crop and Pasture Science, 60(5), 472.

ADHIKARI, K. N., THOMAS, G., DIEPEVEEN, D., TRETHOWAN, R. (2013). Overcoming the barriers of combining early flowering and anthracnose resistance in white lupin (*Lupinus albus* L.) for the Northern Agricultural Region of Western Australia. Crop and Pasture Science, 64(9), 914.

ALKEMADE, J.A., NAZZICARI, N., MESSMER, M.M. et al. (2022) Genome-wide association study reveals white lupin candidate gene involved in anthracnose resistance. Theor Appl Genet 135, 1011–1024.

CHIOFALO, B.; LO PRESTI, V.; CHIOFALO, V.; GRESTA, F. (2012) The productive traits, fatty acid profile and nutritional indices of three lupin (*Lupinus* spp.) species cultivated in a Mediterranean environment for the livestock. Anim. Feed Sci. Technol, 171, 230–239.

JANUSZ, P. (2017). White lupin *(Lupinus albus* L.*)* – nutritional and health values in human nutrition – a review. Czech Journal of Food Sciences, 35(2), 95–105.

KOEBNER, R.M.D. (2003). Crop improvement | Genetic Maps in Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Elsevier, 133-140, ISBN 978-01-222-7050-5.

LÓPEZ-BELLIDO, L., FUENTES, M., LHAMBY, J. C. B., CASTILLO, J. E. (1994). Growth and yield of white lupin (*Lupinus albus*) under Mediterranean conditions: effect of sowing date. Field Crops Research, 36(2), 87–94.

STRUŢI, D.I.; BUNEA, A.; POP, I.M.; PĂPUC, T.A.; MIERLIŢĂ, D.P. (2021). The Influence of Dehulling on the Nutritional Quality of Lupine Seeds (*Lupinus albus* L.) and the Effect of Their Use in the Feed of Laying Quails on the Live Performance and Quality of Eggs. Animals, 11(10), 2898.

Poděkování

Práce vznikla v rámci řešení projektu TA ČR FW10010461 Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin – zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin a dále z institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZE-RO1823.

Kontakt:

Ing. Vanda Ježková
OSEVA PRO s. r. o., Výzkumná stanice travinářská Zubří
Hamerská 698
756 54 Zubří
+420 571 616 839, frnkova@oseva.cz

In vitro kultivace chmele ve stresových podmínkách

In vitro cultivation of hops under stress conditions

Golosna L.[1,2], Bobrova O.[1], Svoboda P.[3], Faltus M.[1]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Prague, Czech Republic;* [2]*Institute of plant protection NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine;* [3]*Chmelařský institut Žatec, s.r.o.*

Abstrakt

Klimatické změny a zvyšující se teploty výrazně ovlivňují pěstování chmele v České republice, a to zejména nepravidelnými srážkami, které vedou k vodnímu stresu. Chmelové rostliny jsou vysoce citlivé na nedostatek vody v půdě, který může bránit růstu a snižovat výnosy. Tato studie zkoumá dopad vodního stresu simulovaného *in vitro* pomocí různých koncentrací sacharózy v živném médiu. Chmelové explantáty byly pěstovány za kontrolovaných podmínek pro hodnocení tvorby kalusu, vývoje kořenů, růstu výhonků a celkové výšky rostliny. Výsledky ukázaly, že zvyšující se koncentrace sacharózy významně inhibovaly růst, přičemž při vyšších koncentracích bylo pozorováno 99% snížení růstu. Tato zjištění podtrhují potřebu tvorby a výběru odrůd chmele odolných vůči suchu a prokazují účinnost metod *in vitro* pro simulaci stresu suchem v raných stádiích šlechtitelských programů.

Klíčová slova: *Humulus lupulus* L., explantátová kultura, stres ze sucha, sacharóza, inhibice růstu

Abstract

Climate change and rising temperatures are significantly affecting hop cultivation in the Czech Republic, particularly through irregular precipitation patterns that lead to water stress. Hop plants are highly sensitive to moisture deficits, which can hinder growth and reduce yields. This study explores the impact of water stress simulated *in vitro* using varying concentrations of sucrose in the nutrient medium. Hop explants were grown under controlled conditions to assess callus formation, root development, shoot growth, and overall plant height. Results showed that increasing sucrose concentrations significantly inhibited growth, with 99% growth reduction observed at higher concentrations. These findings underscore the need for developing drought-resistant hop varieties and demonstrate the effectiveness of *in vitro* methods for simulating drought stress in early-stage breeding programs.

Keywords: *Humulus lupulus* L., explant culture, drought stress, sucrose, growth inhibition

Introduction

Climate change, characterized by rising global temperatures, is significantly impacting the climate of the Czech Republic. Analysis of meteorological data from the past 30 years reveals clear trends that allow for predictions of future climate shifts in the region. The country has experienced increasing temperatures, more frequent droughts, and an uptick in extreme weather events. However, the rise in rare but intense rainfall events does not compensate for moisture deficits caused by prolonged dry periods, as dry soils struggle to absorb sudden influxes of water (Rulfová et al. 2017).

A study by Mozny et al. (2023) reports that drought occurrences in Czechia have quadrupled since 1991 compared to previous decades. While the overall annual precipitation has remained relatively stable, the number of soil drought days has risen significantly, posing serious challenges for agriculture (Mozny et al. 2023). These changes underscore the urgent need for climate adaptation strategies in the country.

Hop cultivation, with a rich tradition in the Czech Republic, remains a vital sector for the national economy (Šredl et al. 2020). The country currently ranks third globally in hop production, following the USA and Germany (Chris 2023). According to the Institute for Variety Expertise, in 2024, the total area planted with hops was 4,844 hectares (Krškova 2024). Hop plants are highly sensitive to water stress, with moisture deficits greatly impacting both plant growth and cone yield. Young plants with underdeveloped root systems are particularly vulnerable. In contrast, plants with well-established root systems can, under moderate drought

conditions, draw moisture from deeper soil layers, compensating for the lack of water at the surface (Nakawuka et al 2017).

Given this, hop breeding in the Czech Republic should focus on developing drought-resistant and tolerant varieties. The breeding process is lengthy, often taking up to 10 years from the initial work on a promising variety to its registration. Identifying drought-resistant and tolerant plants in the early stages of breeding will reduce costs in the long term. Conditions that limit water availability can be simulated in the laboratory under *in vitro* conditions by adding substances such as NaCl, various sugars, or polyethylene glycol to the nutrient medium, which restrict or replace water. The successful application of biotechnological methods to address abiotic stressors in crops has been noted in numerous studies, which emphasize the need to understand the mechanisms behind stress resistance and tolerance (Dita et al. 2006, Rai et al., 2011).

Research into stress-resistant plant selection using biotechnology has been conducted on various crops, including cabbage, rapeseed, barley, sunflower, tomatoes, rice, potatoes, wheat, and more. The use of sugars and polyethylene glycol in studying drought resistance and plant physiology *in vitro* is documented in the works of Gabryszewska (2015), Gago D. et al. (2022), and Gopal J. (2007), among others.

The aim of this study is to determine the effect of limiting water availability in hops through the addition of sucrose to the nutrient medium under *in vitro* conditions.

Material and methods

Preparation of Nutrient Media

For *in vitro* plant cultivation, a modified version of the Murashige and Skoog (1962) medium was used. The medium had reduced nitrogen content, no added phytohormones, and contained 20 g/L glucose and 6 g/L agar (Faltus 2012). To simulate water stress, sucrose with varying molar concentrations (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, and 0.7) was added to the nutrient medium. The medium without additional sucrose served as the control.

Plant Cultivation

The experiment used six-week-old *in vitro* hop (*Humulus lupulus* L.) plants from two varieties, 8765 and 12925. Under sterile conditions, adult plants were de-leaved and divided into uninodal segments, which were then transplanted into 25 cm³ test tubes containing the prepared sucrose media. Each concentration was tested in 10 replicates. The explants were cultured for seven weeks at 26°C with a 16/8 light cycle. The experiment concluded when the control plants had grown to the full height of the test tubes.

Growth Assessment

Growth parameters were measured weekly, including callus formation, root formation, root length, shoot development, and the height of the main shoot. Callus formation was observed during the first three weeks, root growth and length were recorded up to the fourth week, and shoot formation was noted during the initial four weeks of explant growth. Plant height was measured weekly throughout the experiment (7 weeks). Growth rate was calculated using the formula:

$$V = \frac{\mathrm{Lf} - \mathrm{Ls}}{\mathrm{T}}$$

Where:
V – growth rate (mm/week)
Lf – final plant height (mm)
Ls – initial plant height (mm)
T – cultivation time (weeks)

Growth inhibition was determined using the formula:

$$E = \frac{Lc - \mathrm{Lo}}{\mathrm{Lc}} * 100$$

Where:
E – growth inhibition (%)
Lc – plant height in the control (mm)
Lo – plant height in the treated variant (mm)

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica 7.0 (StatSoft). Results are presented as mean ± standard error (SE).

Results and discussion

Cultivation of hop explants on nutrient media supplemented with sucrose significantly impacted their growth indices due to the induced stress. As the sucrose molarity in the medium increased, callus formation declined. In variety 8765, callus formation decreased by 20% at 0.2 M sucrose, by 60% at 0.3 M, and completely stopped at 0.4 M. Variety 12925 showed greater sensitivity, with callus formation reduced to 20% at 0.2 M and halted at 0.3 M (Table 1).

Root formation is also a critical indicator for explant survival. The number of roots varied significantly depending on the variety. In the control, variety 8765 produced an average of 6.0 roots per explant, while variety 12925 averaged 1.8 roots. The addition of 0.1 M sucrose increased root formation in variety 8765 by 72%, but 0.2 M sucrose reduced it by 32%. The main root length increased by 18% at 0.1 M sucrose but decreased by 62.6% at 0.2 M. For variety 12925, root formation increased by 16% with sucrose addition, but the main root length decreased by 39.7% compared to the control. Root formation ceased entirely when sucrose concentrations exceeded 0.2 M.

It was observed that as stress increased in hop plants due to the sucrose addition, shoot formation significantly decreased. Normally, a healthy plant can form two shoots. In the control group, 90% of variety 8765 explants formed shoots, while 100% of variety 12925 did. However, increasing sucrose concentrations reduced the explants' ability to form shoots. For variety 8765, 90% of explants formed shoots at 0.1 M sucrose, 55% at 0.2 M, 40% at 0.3 M, and only 5% at 0.4 M. In variety 12925, 95% of explants formed shoots at 0.1 M sucrose, 59% at 0.2 M, 55% at 0.3 M, and 5% at 0.4 M. At concentrations above 0.4 M, dormant buds in explants did not form shoots.

The impact of stress on plants was most evident in their overall appearance, particularly in plant height and their ability to photosynthesize. As sucrose concentration increased, plant height decreased. Variety 12925 was especially sensitive to moisture deficits. At 0.1 M sucrose, the main shoot height decreased by 72.7%, by 98.3% at 0.2 M, by 99.8% at 0.3 M, and by 99.9% at 0.4 M. For variety 8765, the main shoot length decreased by 15.0% at 0.1 M, by 91.7% at 0.2 M, and by 99.4% at both 0.3 M and 0.4 M.

The trend of decreasing plant growth with increasing sucrose concentration is illustrated in Figures 1 and 2. As the sucrose concentration in the nutrient medium increased, the growth rate of hop explants decreased from 11.9 mm (variety 12925) and 15 mm (variety 8765) to 3.26 mm (12925) and 12.7 mm (8765) at 0.1 M, and to 1.24 mm (8765) and 0.21 mm (12925) at 0.2 M. At concentrations of 0.3-0.4 M, explants showed minimal development, with a growth rate of less than 1 mm per week. At sucrose concentrations between 0.5 and 0.7 M, growth ceased entirely.

Table 1. Influence of sucrose on the growth indicators of hops (*Humulus lupulus* L.) under *in vitro* conditions. Data are presented as mean ± SE.

	Sucrose concentration, M	Callus, %	Number of roots	Root length, mm	Number of shoots	Shoot length, mm	Growth inhibition, %
Variety 8765							
1	0	100	6.0±0.69	28.1±3.31	1.8±0.13	105.0±0.00	0
2	0,1	100	10.3±1.12	33.3±	1.8±2.08	89.2±10.18	15.05
3	0,2	80	4.1±1.38	10.5±3,68	1.1±0.27	8.7±3.32	91.7
4	0,3	40	0	0	0.8±0.33	0.65±0.39	99.4
5	0,4	0	0	0	0.1±0.1	0.6±0.6	99.4
6	0,5	0	0	0	0	0	100
7	0,6	0	0	0	0	0	100
8	0,7	0	0	0	0	0	100
Variety 12925							
1	0	100	1.8±0.44	18.4±4.48	2.0±0.0	83.6±11.48	0
2	0,1	100	2.1±0.78	11.1±4.07	1.9±0.1	22.8±7.99	72.7
3	0,2	20	0	0	1,8±0.2	1.45±0.48	98.3
4	0,3	0	0	0	0.5±0.27	0.15±0.07	99.8
5	0,4	0	0	0	0,1±0.1	0.05±0.05	99.9
6	0,5	0	0	0	0	0	100
7	0,6	0	0	0	0	0	100
8	0,7	0	0	0	0	0	100

Sucrose's impact resulted in growth inhibition from 15% to 100%, depending on the hop variety and sucrose concentration. A strong inverse correlation was noted between the growth indices of hop explants and sucrose concentration in the nutrient medium (Table 2). The correlation coefficients for plant length were -0.82 for variety 8765 and -0.87 for variety 12925, with $P < 0.001$.

Table 2. Correlation between sucrose concentrations and hop growth indices under in vitro conditions.

Hop variety	Correlation coefficients				
	Callus	Number of roots	Root length, mm	Number of shoots	Shoot length, mm
8765	-0.82*	-0.79*	-0.81*	-0.77*	-0.82*
12925	-0.77*	-0.59*	-0.60*	-0.83*	-0.87*

* - Correlations are significant at $P < 0.001$, based on Spearman Rank-Order Correlations.

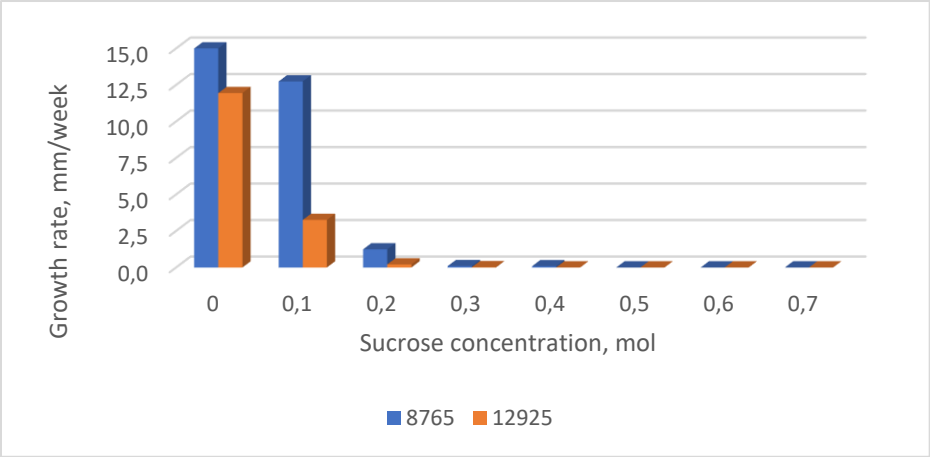


Fig. 1 Growth rate of hop plants depends on sucrose concentration in nutrient medium.

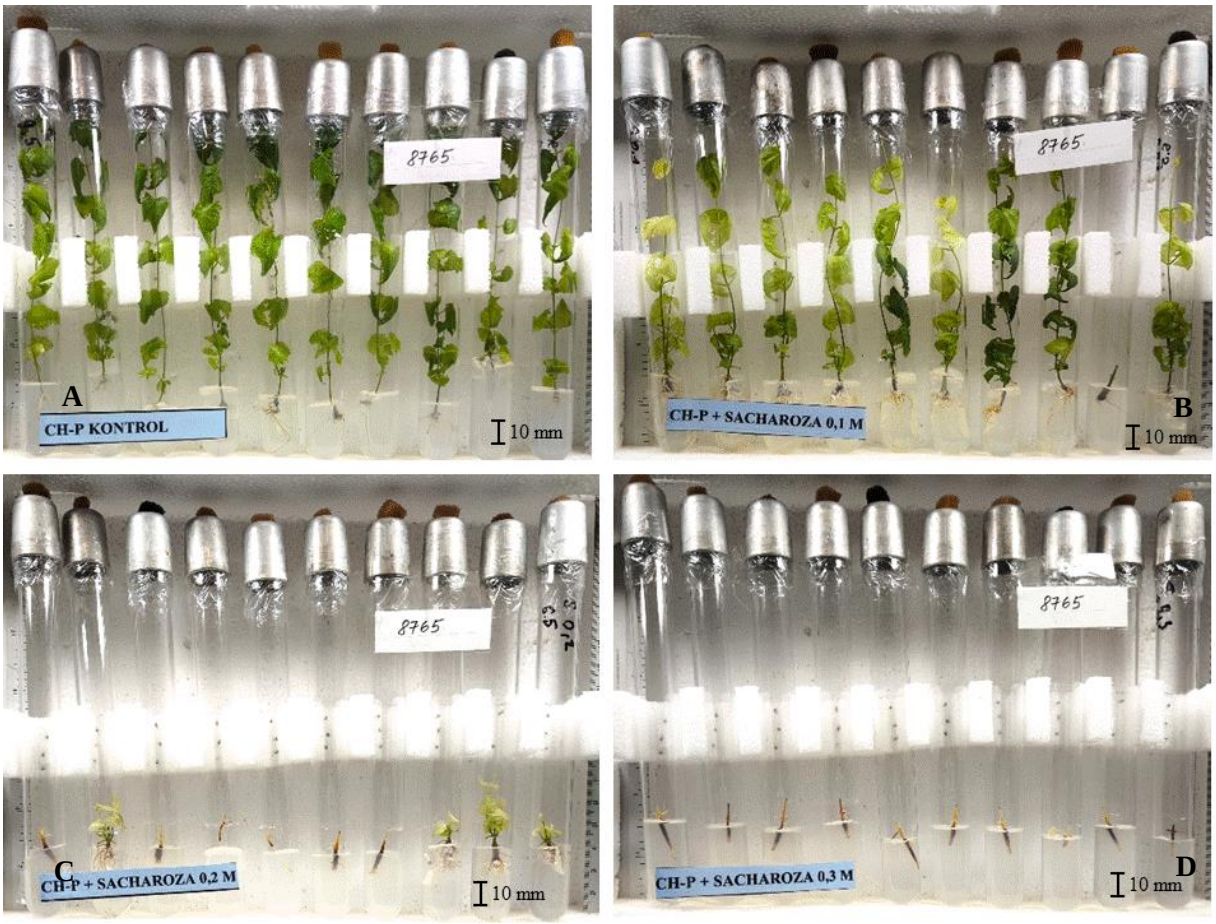


Fig. 2 Influence of stress caused by sucrose on the growth of hop plants under *in vitro* conditions (7 week).
A – Control, B – Sucrose 0.1 M, C – Sucrose 0.2 M, D – Sucrose 0.3 M

Conclusions

Water absorption and availability are crucial for plant development, and hop plants are highly sensitive to moisture deficits, with responses varying significantly based on genotype. The addition of sucrose to the nutrient medium simulates drought-like conditions for *in vitro* explants.

As sucrose concentration increases, the ability of explants to form calluses, roots, and absorb

nutrients diminishes, affecting survival. At critical concentrations of 0.2-0.4 M sucrose, explants nearly stop growing and lose their capacity for nutrient uptake. Root and callus formation is inhibited by over 99%, and at concentrations above 0.4 M, plants cease vital activity altogether. The reversibility of these physiological changes and genotype variability in sucrose sensitivity remain unresolved issues that will be addressed in future research.

References

Dita M. A., Rispail N., Prats E., Rubiales D., Singh K. B. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica 147 (2006) 1-24. https://doi.org/10.1007/s10681-006-6156-9

Faltus M., Zámečník J., Svoboda, P. Využití metody kryoterapie pro ozdravení chmele od virových patogenů. Certifikovaná metodika. (2012) Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. 18 s.

Gabryszewska E. A. Effect of different sucrose and nitrogen salt levels in the medium and temperature on in vitro propagation of *Helleborus niger* L. Acta Agrobotanica. 68 (2) (2015) 161–171. https://doi.org/10.5586/aa.2015.016

Gago D., Bernal M.Á., Sánchez C., Aldrey, A., Cuenca B., Christie C.B., Vidal N. Effect of Sucrose on Growth and Stress Status of Castanea sativa x C. crenata Shoots Cultured in Liquid Medium. Plants 11 (2022) 965. https://doi.org/10.3390/plants11070965

Gopal J., Iwama K. *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. Plant Cell Rep. 26 (2007) 693–700. https://doi.org/10.1007/s00299-006-0275-6

Chris. The Top 15 Hop Producing Countries in 2023. Accessed January 11, 2023. https://beermaverick.com/between-the-35th-and-55th-parallels-worlds-hop-production/

Kršková I. Aktuální plochy chmelnic v České republice. 20. 8. 2024. https://mze.gov.cz/public/portal/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/aktualni-plochy-chmelnic-v-ceske-republice-2.

Mozny M., Hajkova L., Vlach V., Ouskova V., Musilova A. Changing Climatic Conditions in Czechia Require Adaptation Measures in Agriculture. Climate 11 (2023) 210. https://doi.org/ 10.3390/cli11100210

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3) (1962) 473-497.

Nakawuka P., Peters T. R., Kenny S., Walsh D. Effect of deficit irrigation on yield quantity and quality, water productivity and economic returns of four cultivars of hops in the Yakima Valley, Washington State. Industrial Crops and Products. 98 (2017) 82-92. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.037

Rai M. K., Kalia R. K., Singh R., Gangola M. P., Dhawan A.K., Developing stress tolerant plants through in vitro selection-An overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany. 71 (1) (2011) 89-98. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.021

Rulfová Z., Beranová R., Kyselýa J. Climate change scenarios of convective and large-scale precipitation in the Czech Republic based on EURO-CORDEX data. International Journal of Climatology. 37 (2017) 2451–2465. https://doi.org/10.1002/joc.4857

Šrédl K., Prášilová M., Svoboda R., Severová L. Hop production in the Czech Republic and its international aspects. Heliyon. 6 (7) (2020) 04371. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04371

Poděkování

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství ČR QL24010353 a institucionálního projektu MZE – RO0423.

Kontaktní adresa

Lesia Golosna, Ph.D.
Tým fyziologie a kryobiologie rostlin,
Výzkumný ústav rostlinné výroby,v.v.i.,
Drnovská 507 16106 Praha 6
lesia.golosna@vurv.cz

Využitie moderných fenotypovacích techník pri skríningu pšenice v laboratórnych podmienkach

The use of modern phenotyping techniques in wheat screening under laboratory conditions

Hauptvogel P.[1], Hauptvogel, R.[1], Panzarová, K.[2], Matušíková, I[3]., Varga, M.[1]

[1]Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, Piešťany; [2]PSI (Photon Systems Instruments), spol. s r.o., Drásov 470, Drásov; [3]Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 577/2, Trnava

Abstrakt

Príspevok sa zameriava na využitie pokročilých fenotypovacích techník na skríning pšenice tvrdej v laboratórnych podmienkach. Cieľom bolo hodnotiť fenotypickú variabilitu 13 vybraných genotypov pšenice prostredníctvom moderných prístupov, ktoré zahŕňajú RGB, hyperspektrálne a fluorescenčné zobrazovanie, meranie chlorofylovej fluorescence, infračervenú termografiu a automatizované meranie kapacity retencie vody v pôde. Tieto techniky umožňujú presnejšie sledovanie reakcií pšenice na stresové faktory, ako sú sucho a choroby, čo je kľúčové pre šľachtenie odolných odrôd. Výsledky naznačujú významné rozdiely medzi genotypmi, čo poskytuje cenné informácie pre výber vhodných odrôd do stresových podmienok.

Klíčová slova: fenotypovanie, pšenica tvrdá, stresové faktory, hyperspektrálne zobrazovanie, chlorofylová fluorescencia, šľachtenie

Abstract

The article focuses on the use of advanced phenotyping techniques for screening durum wheat under laboratory conditions. The aim was to assess the phenotypic variability of 13 selected wheat genotypes using advanced approaches that include RGB, hyperspectral and fluorescence imaging, chlorophyll fluorescence measurement, infrared thermography and automated measurement of soil water retention capacity. These techniques allow more accurate monitoring of wheat responses to stress factors such as drought and disease, which is crucial for breeding resistant varieties. The results indicate significant differences between genotypes, providing valuable information for selecting suitable varieties for stress conditions.

Keywords: phenotyping, durum wheat, stress factors, hyperspectral imaging, chlorophyll fluorescence, breeding

Úvod

Fenotypovanie v poľnohospodárskom výskume a šľachtení pšenice zohráva kľúčovú úlohu pri hodnotení a selekcii genetických vlastností, ktoré ovplyvňujú rast a vývoj rastlín, výnosy a odolnosť voči stresom z prostredia. Fenotypovanie, ktoré zahŕňa meranie fyzických a biologických vlastností rastlín, je zásadné pre identifikáciu genotypov s požadovanými vlastnosťami, ako sú odolnosť voči suchu, chorobám a iným environmentálnym stresom (Ramazani & Izanloo, 2019). V súčasnosti sa využívajú pokročilé technológie, ako sú genomické a metabolomické prístupy, ktoré umožňujú presnejšie a rýchlejšie fenotypovanie, čo vedie k efektívnejšiemu šľachteniu (Ramazani & Izanloo, 2019). Fenotypovanie tak umožňuje identifikovať genotypy, ktoré sú schopné lepšie sa prispôsobiť meniacim sa podmienkam prostredia, čím sa zvyšuje ich potenciál na dosiahnutie vyšších výnosov (Ramazani & Izanloo, 2019). Okrem toho, fenotypovanie zohráva dôležitú úlohu aj v hodnotení odolnosti voči stresom, ako sú suchá a choroby. Rôzne štúdie ukazujú, že genotypy pšenice, ktoré vykazujú vyššiu toleranciu voči suchu, majú tendenciu mať lepšie výnosy aj v podmienkach s obmedzenou vodou (Ramazani & Izanloo, 2019). Celkovo, fenotypovanie je nevyhnutné pre efektívne šľachtenie pšenice, pretože umožňuje selekciu genotypov, ktoré sú

nielen produktívne, ale aj odolné voči rôznym stresom, čím prispieva k udržateľnosti poľnohospodárskej výroby v meniacich sa klimatických podmienkach (Ramazani & Izanloo, 2019). Problematikou fenotypovej diverzity pšenice sa zaoberalo viacero autorov. Ingver et al., 2024 poukazujú na význam fenotypovej diverzity pre vývoj klímovo-odolných odrôd. Výhody diverzity v pšenici sú spomenuté v práci Mondal a kol. (2016), ktorá popisuje, ako genetická diverzita podporuje výnos a odolnosť proti škodcom a chorobám, pričom zdôrazňujú, že moderné fenotypovacie technológie dokážu sledovať komplexné znaky, ako sú reakcie na choroby a rôzne stresové podmienky, čo má rozhodujúci význam pre odolnosť voči klimatickým výzvam. Práca Bloomfield et al. (2020) sa zameriava na rôznorodosť fenotypových vlastností, ktoré podporujú prispôsobenie pšenice prostrediu. Z dôvodu úbytku genetickej diverzity, využitie genetických zdrojov v selekcii a jej význam pre udržanie adaptabilných vlastností v rôznych ekologických podmienkach poukazuje Reif et al., 2005.
Pokročilé technológie v GWAS štúdiu Xiao et al. (2022) poukazujú na výhody vysokokapacitného fenotypovania v štúdiách asociácie celého genómu (GWAS) na identifikáciu kvantitatívnych znakov odolnosti pšenice voči stresu. Alotaibi a kol. (2021) zdôrazňujú význam viacerých techník fenotypovania pri riešení výziev spojených so zložitými vlastnosťami, ako je odolnosť proti suchu a vysoký výnos, čo je kľúčové pre moderné šľachtenie pšenice. Reynolds et al. (2020) vo svojom prehľade uvádzajú, že efektívne a dostupné fenotypovacie techniky môžu priamo podporiť šľachtiteľov pri vývoji kultivarov pšenice prispôsobených meniacim sa podmienkam. Výskum Tong a Nikoloski (2021) ukazuje na potrebu kombinovať fenotypové údaje s genomickými dátami pomocou strojového učenia, čo môže podstatne zrýchliť proces šľachtenia a identifikáciu dôležitých genetických znakov pšenice. Mir et al. (2019) poukazujú na zavedenie fenotypovacích platforiem, ktoré umožňujú sledovanie viacerých vlastností pšenice súčasne a sú použiteľné aj vo vonkajších podmienkach, čím sa zvyšuje relevantnosť fenotypovacích údajov pre reálne pestovateľské prostredie. Práca Furbanka a Testera (2011) analyzuje využitie fenomických technológií na fenotypovanie pšenice pre zlepšenie efektivity využívania vody a pre prispôsobenie sa podmienkam sucha.
Význam fenotypovania je podmienený niekoľkými faktormi:

1. **Identifikácia odolnosti voči stresu:** Moderné fenotypovacie techniky umožňujú efektívne sledovať, ako rôzne odrody pšenice reagujú na stresové faktory, ako sú sucho, teplotné extrémy alebo nedostatok živín.
2. **Optimalizácia výnosu a kvality:** Fenotypovacie metódy, ako je hyperspektrálne zobrazovanie alebo RGB zobrazovanie, umožňujú zmerať parametre, ktoré priamo ovplyvňujú výnos a kvalitu zrna, ako napríklad rastovú dynamiku, index zeleného listu alebo stav chlorofylu.
3. **Rýchlosť a presnosť výskumu:** Využitie automatizovaných a presných fenotypovacích systémov výrazne zrýchľuje a zefektívňuje proces fenotypovania v porovnaní s tradičnými metódami. Automatizované systémy dokážu poskytovať veľké množstvo dát o mnohých rastlinách súčasne, čo umožňuje rýchlejší výber vhodných genotypov pre ďalšie šľachtiteľské kroky.
4. **Podpora genetického výskumu:** Fenotypovanie umožňuje prepojiť fenotypové vlastnosti rastlín s ich genetickou informáciou, čím sa otvára možnosť lepšie porozumieť vzťahu medzi genotypom a fenotypom.
5. **Adaptácia na lokálne podmienky:** Fenotypizácia umožňuje hodnotiť, ako jednotlivé odrody pšenice reagujú na špecifické podmienky v rôznych regiónoch. To je dôležité najmä pre adaptáciu pšenice na lokálne prostredie a pre zabezpečenie stability výnosu v rôznych pestovateľských oblastiach.

Fenotypovanie teda významne prispieva k urýchleniu šľachtiteľských procesov a zvyšovaniu efektivity poľnohospodárskeho výskumu, čo je kľúčové pre produkciu udržateľných a výnosných odrôd pšenice, schopných čeliť súčasným aj budúcim výzvam.

Cieľom príspevku je demonštrovať, ako moderné fenotypovacie techniky môžu prispieť k efektívnejšiemu a presnejšiemu hodnoteniu rôznych odrôd pšenice v laboratórnych podmienkach.

Materiál a metódy

V súlade s cieľmi projektu sme vyselektovali genotypy pšenice tvrdej pre špeciálny experiment pokročilej fenotypizácie. Výber 13 genotypov pšenice tvrdej f. jarnej (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) zahŕňa rôznorodé genotypy z rôznych geografických oblastí, čo umožňuje pozorovať fenotypové variácie a identifikovať ich adaptabilné vlastnosti. Experiment bol vykonaný v kontrolovaných podmienkach s automatizovanou fenotypovou analýzou, ktorá umožnila presné monitorovanie a zaznamenávanie dát.

Zoznam genotypov zahŕňa nasledujúce: PI 264932, PI 264933, PI 264934, PI 264936 a PI 264989 – genotypy z USDA National Plant Germplasm System (NPGS), ktoré sú známe svojou variabilitou v raste a prispôsobivosti voči rôznym pôdnym a klimatickým podmienkam. PI 278269 (GRC) – genotyp z Grécka, ktorý sa vyznačuje dobrou adaptabilitou voči suchým podmienkam a je vhodný pre štúdium suchovzdornosti. Nursith (ISR) – izraelský genotyp, ktorý má potenciál pre vysokú produktivitu v oblastiach s obmedzeným prístupom k vode, vďaka čomu je vhodný pre štúdium vodného režimu a efektivity využívania vody. Kirmizi Yazlik (TUR) – turecký genotyp, známy svojou odolnosťou voči chorobám a prispôsobivosťou voči drsným podmienkam, čo z neho robí ideálny vzor pre štúdium rezistencie. 1296 (MAR) a 1352 (MAR) – marocké genotypy s dobrými agronomickými vlastnosťami, najmä v oblastiach s limitovanými zdrojmi. 1N1 – experimentálny líniový genotyp používaný v genetických a molekulárnych výskumoch pre jeho stabilný rast a fenotypovú konzistenciu. IWA8611094 (IRN) – iránsky genotyp so špecifickými vlastnosťami ako vysoký obsah živín a tolerancia voči soli, ideálny pre výskum v oblasti výživy. IS Durablank (SVK) – slovenský genotyp s dobrými výnosovými vlastnosťami a potenciálom pre pestovanie v rôznych klimatických podmienkach strednej Európy.

Experimentálne prostredie a metódy sú detailne opísané v nasledujúcich parametroch:

Riadená kultivácia: Genotypy boli pestované v kontrolovaných podmienkach s dôsledným riadením teploty, vlhkosti, osvetlenia a zavlažovania.

Substrátové faktory: Rastové médium obsahovalo štyri varianty substrátov, pričom každý z nich bol formulovaný na zistenie efektu vybraných faktorov na rast a vývoj rastlín: **(A)**: 3 l Klasmann substrátu zmiešaného s riečnym pieskom v pomere 2:1; **(B)**: Klasmann substrát obohatený o mykorhízne huby (45 g); **(C)**: Klasmann substrát s pridaným hnojivom so zinkom, aplikovaným vo fáze odnožovania a **(D)**: Klasmann substrát s mykorhíznymi hubami (45 g) a hnojivom so zinkom (tiež aplikovaným vo fáze odnožovania).

Každá z metód poskytuje unikátne údaje o stave rastlín:

RGB zobrazovanie: Používa sa na sledovanie rastu a vývoja rastlín pomocou vysokokvalitných farebných obrázkov. RGB kamery zachytávajú základné farby (červenú, zelenú a modrú), čo umožňuje hodnotiť veľkosť, tvar a celkovú štruktúru rastliny a monitorovať zmeny v raste v priebehu času.

Hyperspektrálna zobrazovacia technika: Poskytuje detailné spektrálne informácie o rôznych vlnových dĺžkach odrazených od rastliny. Týmto spôsobom umožňuje detekciu fyziologických parametrov, ako je obsah chlorofylu, vody a iných chemických látok, čo je užitočné pre identifikáciu zdravotného stavu a stresových odpovedí rastlín.

Fluorescenčné zobrazovanie a meranie kinetiky chlorofylovej fluorescence: Slúži na hodnotenie stresových reakcií rastlín prostredníctvom merania kinetiky chlorofylovej fluorescence, čo poskytuje údaje o efektivite fotosyntetického aparátu rastliny.

Infračervené zobrazovanie (FLIR kamera): Umožňuje meranie teploty listov, čo je dôležité pri posudzovaní vodného stresu. Keď je rastlina pod vodným stresom, znižuje sa odparovanie,

čo vedie k zvýšeniu teploty listov, a to je možné presne merať pomocou infračervených kamier. **Automatické meranie kapacity retencie vody v pôde (% SWRC)**: Táto metóda hodnotí, ako dobre pôda zadržiava vodu, čo je kľúčové pre pochopenie dostupnosti vody pre rastliny. Retenčná kapacita vody poskytuje informácie o schopnosti rastliny čerpať vodu z pôdy a tým reagovať na podmienky sucha.

Výsledky

V našej štúdii sme využili súbor pokročilých fenotypovacích metód na komplexné sledovanie fenotypickej variability pšenice tvrdej f. jarnej (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) v kontrolovaných podmienkach. Demonštrovanie prínosu moderných fenotypovacích techník v porovnaní s konvenčným fenotypovaním rastlín výrazne prispieva presnosti a reprodukovateľnosti údajov a umožňujú nám kvantifikovať rôzne parametre (napríklad stav chlorofylu či indexy stresu) s väčšou presnosťou, čo vedie k spoľahlivejšiemu a konzistentnejšiemu hodnoteniu. Tento prístup umožňuje v niektorých prípadoch nahradiť konvenčné fenotypovanie, ktoré je často časovo náročné a menej presné. Konvenčné fenotypovanie zahŕňa tradičné metódy hodnotenia morfologických, fyziologických a výnosových vlastností rastlín. Tieto spôsoby sú často manuálne, pracovne náročné a časovo nákladné. Tieto konvenčné metódy sú síce dlhodobo overené a môžu poskytnúť cenné informácie, avšak ich limitácie (časová a pracovná náročnosť, subjektivita, nízka presnosť) motivovali vývoj a zavádzanie moderných fenotypovacích techník, ktoré umožňujú objektívnejšie a rýchlejšie hodnotenie fenotypických vlastností.

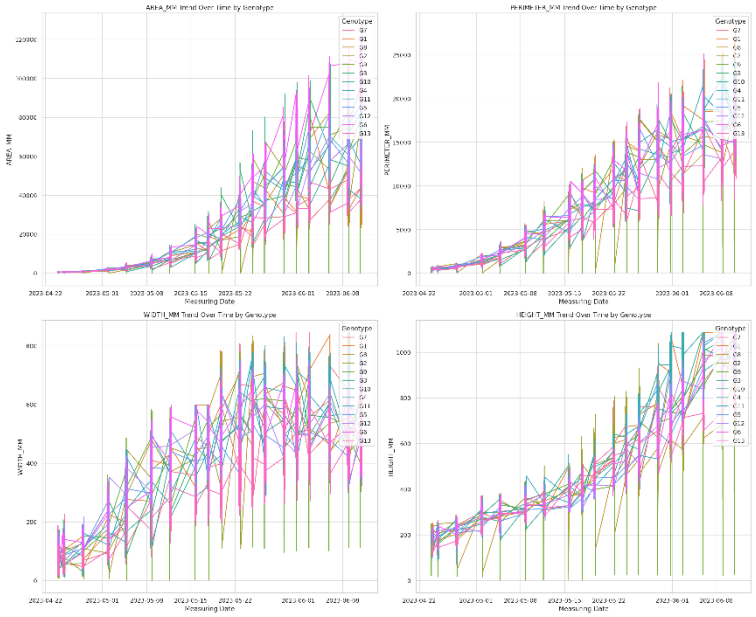
Výsledky ANOVA RGB zobrazovania pre jednotlivé morfologické parametre rastlín ukazujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami genotypov pre všetky analyzované parametre (tab. 1). Vo všetkých prípadoch sú ppp-hodnoty veľmi nízke ($p<0.00$), čo indikuje, že rozdiely medzi genotypmi sú štatisticky významné. Tieto výsledky naznačujú, že rôzne genotypy majú odlišné hodnoty v sledovaných morfologických parametroch, čo môže byť dôsledkom ich genetických odlišností alebo reakcií na podmienky experimentu.

Tabuľka č. 1: Hodnoty analýzy rozptylu RGB zobrazovania pre morfologické parametre

AREA_MM – Plocha [počet pixelov/mm^2]):	F=43,03	p<0,001
PERIMETER_MM - Obvod [počet pixelov/mm]:	F=20,62F	p<0,001
WIDTH_MM -Šírka [počet pixelov/mm]:	F=39,07F	p<0,001
HEIGHT_MM - Výška [počet pixelov/mm]:	F=20,45F	p<0,001

Celkovo najkonzistentnejším genotypom je G11 s priemerným variačným koeficientom (CV) 0,622 vo všetkých parametroch. Táto nízka hodnota CV naznačuje, že G11 si zachováva relatívne stabilný výkon v rôznych morfologických charakteristikách, čo z neho robí spoľahlivú voľbu z hľadiska konzistencie.

Čiarové grafy (Obr. 1) ukazujú trendy v čase pre každý morfologický parameter (AREA_MM, PERIMETER_MM, WIDTH_MM a HEIGHT_MM) podľa genotypu. Tieto vizualizácie nám umožňujú sledovať, ako sa charakteristiky každého genotypu vyvíjajú počas experimentu, pričom zvýrazňujú akékoľvek rastové vzorce, fluktuácie alebo stabilitu v rámci každého parametra.



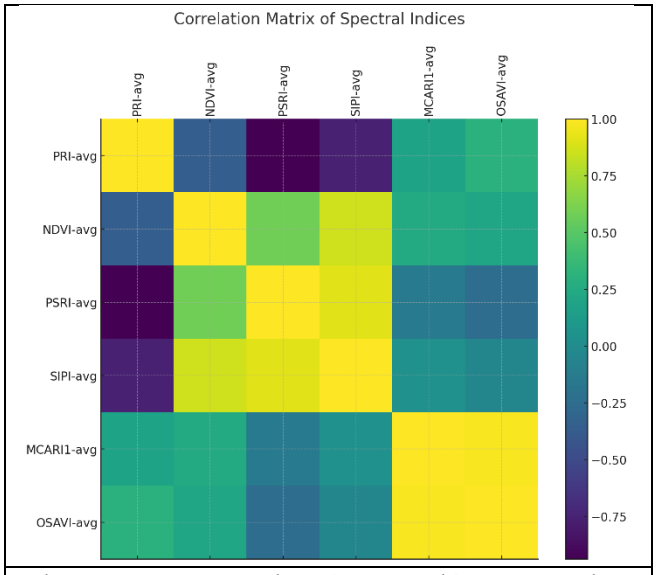
Obr. 1: Analýza trendov parametrov podľa genotypu

Pre štúdie tolerancie voči suchu sa často uprednostňujú genotypy s nasledujúcimi vlastnosťami: genotypy s nízkou variabilitou kľúčových parametrov rastu (t. j. nízky variačný koeficient) sú často odolnejšie a spoľahlivejšie pri strese; parametre ako nižšia AREA_MM (menšia plocha listov) a mierna HEIGHT_MM môžu naznačovať lepšiu účinnosť využívania vody a zníženú transpiráciu, čo je výhodné v suchu; aj keď sa tu priamo nehodnotí, genotypy, ktoré zachovávajú štruktúru a kompaktnosť a zároveň obmedzujú nadmernú plochu listov, môžu byť prospešné v podmienkach s obmedzeným obsahom vody.

Podľa zistení v analýze, G11 (1352) vykazoval najnižší celkový variačný koeficient medzi parametrami, vďaka čomu je spoľahlivý v konzistentnom výkone. Pri miernych hodnotách pre AREA_MM a HEIGHT_MM môže G11 vyvážiť rast efektívnym využívaním vody. G12 (IWA8611094) tiež preukázal nízke CV pre šírku a výšku, čo naznačuje stabilitu konštrukcie, ktorá môže korelovať s odolnosťou pri obmedzenej vode. Priemerné hodnoty pre WIDTH_MM a HEIGHT_MM sú mierne, čo môže prispieť k lepšej odolnosti voči suchu prostredníctvom konzervatívneho rastu. G13 (IS Durablank) má relatívne nižšiu AREA_MM a HEIGHT_MM v porovnaní s ostatnými, čo naznačuje menšiu listovú plochu, čo je výhodné pri znižovaní straty vody pri strese zo sucha. Tieto genotypy (G11, G12 a G13) by boli sľubnými kandidátmi na štúdie tolerancie voči suchu na základe ich stability a rastových charakteristík za kontrolovaných podmienok.

Hyperspektrálna zobrazovacia technika je pokročilá metóda, ktorá sníma rastliny v stovkách úzkych spektrálnych pásiem, pokrývajúcich rozsah od viditeľného svetla až po infračervené spektrum. Na rozdiel od RGB zobrazovania, ktoré používa len tri farebné kanály (červený, zelený a modrý), hyperspektrálna technika dokáže zachytiť oveľa viac detailov o optických vlastnostiach rastliny. To je mimoriadne užitočné na detekciu fyziologických parametrov, ktoré sú pre ľudské oko neviditeľné.

Údaje v súbore zahŕňajú merania súvisiace s rôznymi genotypmi hodnoty spektrálnych indexov: index fotochemickej odrazivosti na základe hyperspektrálneho VNIR (viditeľné a blízke infračervené spektrum) (PRI), normalizovaný rozdielový vegetačný index znak založený na hyperspektrálnom VNIR (NDVI), modifikovaný index absorpcie chlorofylu v odrazivosti znak založený na hyperspektrálnom VNIR (MCARI1), index pigmentov necitlivých na štruktúru znak založený na hyperspektrálnom VNIR (SIPI) a optimalizovaný pôdny vegetačný index znak založený na hyperspektrálnom VNIR (OSAVI). Korelačná analýza spektrálnych indexov odhalila nasledujúce vzťahy (obr. 2): PRI má silnú negatívnu koreláciu s priemerom PSRI (-0,94) a stredne negatívnu koreláciu s priemerom SIPI (-0,76), NDVI vykazuje silnú pozitívnu koreláciu s priemerom SIPI (0,86) a stredne pozitívnu koreláciu s priemerom PSRI (0,58), PSRI a SIPI-priemer sú vysoko pozitívne korelované (0,91) a MCARI1 a OSAVI majú veľmi silnú pozitívnu koreláciu (0,98), čo naznačuje, že tieto indexy by mohli zachytiť podobné



Obr. 2: Korelačná analýza znakov hyperspektrálných analýz

informácie naprieč meraniami.
Fluorescenčné zobrazovanie a meranie kinetiky chlorofylovej fluorescence sú pokročilé techniky používané na hodnotenie fotosyntetickej aktivity rastlín a ich reakcie na stresové podmienky. Chlorofylová fluorescence poskytuje údaje o stave fotosystému II, ktorý je kľúčový pre proces fotosyntézy. Parameter qP_Lss (Kvantový výťažok PSII - ΦPSII) vykazuje slabé korelácie s inými fluorescenčnými parametrami v súbore údajov. Väčšina ostatných parametrov, ako napríklad Fm_Lss (maximálna fluorescencia), Fo_Lss (minimálna fluorescencia) a Ft_Lss (premenlivá fluorescencia), vykazuje takmer nulové alebo veľmi slabé negatívne korelácie s qP_Lss. Táto slabá korelácia naznačuje, že qP_Lss môže byť ovplyvnená skôr vonkajšími faktormi (napr. podmienkami prostredia alebo stresom) než priamo týmito fluorescenčnými parametrami.
Infračervené (IR) zobrazovanie, často označované ako termovízia, je technológia, ktorá umožňuje vizualizovať tepelné žiarenie objektov. Týmto spôsobom je možné identifikovať teplotné rozdiely, ktoré sú voľným okom neviditeľné. Princíp fungovania je, že všetky objekty s teplotou nad absolútnou nulou vyžarujú infračervené žiarenie. Analyzovali sme priemerný rast veľkosti rastlín naprieč experimentom a výsledky ukazujú dynamické zmeny rastu rastlín v rôznych častiach a identifikovali sme dni s najväčším priemerným rastom, kde medzi top dátami dominujú dni v júni.
Automatické meranie kapacity retencie vody v pôde, označované ako % SWRC (Soil Water Retention Capacity), je kľúčové pri štúdiu vodnej bilancie a dostupnosti vody pre rastliny. Tento typ merania umožňuje presne a nepretržite sledovať množstvo vody, ktoré je pôda schopná zadržať pri rôznych úrovniach vlhkosti. Metóda % SWRC využíva senzory na monitorovanie vlhkosti pôdy, pričom sa údaje o obsahu vody odčítavajú v reálnom čase.

Diskuze

Moderné fenotypovacie techniky predstavujú významný pokrok v oblasti poľnohospodárstva a výskumu rastlín, najmä v súvislosti so skríningom odrôd pšenice s cieľom dosiahnuť lepšie vlastnosti a vyššiu výkonnosť. Efektívnosť týchto metód spočíva v ich schopnosti rýchlo a presne zachytiť fenotypové variácie a kvantifikovať ich, čo umožňuje výskumníkom a pestovateľom identifikovať odrody s vyššou odolnosťou voči stresovým faktorom (napr. suchu, chorobám) a zlepšiť kvalitu aj výnosnosť plodín. Tradičné metódy fenotypovania sú často časovo náročné a vyžadujú manuálnu prácu. Moderné techniky, ako napríklad obrazová analýza, vysokovýkonná spektroskopia, UAV (drony) a satelitné snímkovanie, zjednodušujú a urýchľujú tento proces. S využitím strojového učenia a umelej inteligencie je možné získať a spracovať veľké množstvo dát, čo vedie k presnejším výsledkom. Tieto techniky umožňujú lepšie sledovať kondíciu pšenice v reálnom čase a aplikovať presné agronomické postupy, čo vedie k optimalizácii vstupov, ako sú voda a hnojivá. Výsledkom je nielen vyššia produktivita, ale aj znižovanie environmentálnych dopadov.
Viaceré vedecké práce sa zameriavajú na hodnotenie efektívnosti týchto techník, napr.: štúdia *Precision Phenotyping for Wheat Breeding using UAV-Based Multispectral Imaging* analyzuje

využitie multispektrálnych UAV systémov pri fenotypovaní pšenice, pričom dokazuje presnosť a rýchlosť oproti tradičným metódam. Práca *Thermal and Chlorophyll Fluorescence Imaging in Drought Stress Detection in Wheat* demonštruje, ako termografia a fluorescenčná technológia umožňujú včasnú detekciu sucha, čo je kľúčové pre udržanie produkcie počas nepriaznivých podmienok. Štúdia *Utilizing High-Throughput Phenotyping for Genetic Gain in Wheat Yield and Quality* dokazuje, ako vysokovýkonné fenotypovanie priamo prispieva k zvyšovaniu genetického potenciálu pšenice. Článok *Challenges and Future Directions in High-Throughput Wheat Phenotyping* poskytuje celkový pohľad na výzvy a budúce možnosti fenotypovacích techník.

Fenotypizácia v laboratórnych podmienkach je ideálna pre základný výskum a presné, opakovateľné experimenty. Poskytuje kontrolované prostredie, ktoré umožňuje sledovanie špecifických faktorov, ale môže skresliť výsledky pre reálne aplikácie. Naopak, poľné fenotypovanie umožňuje skúšanie v reálnych podmienkach, je však náročné na kontrolu, čo môže ovplyvniť presnosť dát. Efektívne programy fenotypovania často kombinujú obe tieto metódy, aby dosiahli rovnováhu medzi presnosťou a praktickou aplikovateľnosťou výsledkov. Využitie zistených poznatkov z fenotypizácie má obrovský potenciál pre šľachtenie odrôd pšenice, najmä pre oblasti s obmedzenými zdrojmi a v podmienkach vystavených rôznym stresovým faktorom, ako sú sucho, vysoké teploty, nízka kvalita pôdy a obmedzená dostupnosť vody. Nasledujúce oblasti ukazujú, ako môžu byť tieto poznatky efektívne využité, napr.: vývoj odrôd odolných voči suchu, šľachtenie na vyššiu efektivitu pri využívaní živín, zvýšenie odolnosti voči teplotnému stresu, odolnosť voči chorobám a škodcom, šľachtenie pre zvýšenú fotosyntetickú účinnosť, optimalizácia výnosu pri nízkych vstupoch alebo použitie pri prechodných ekosystémoch a na marginálnych pôdach.

Závěr

Hlavné výsledky fenotypovania vybraných genotypov pšenice tvrdej f. jarnej (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) ukázali výraznú variabilitu v reakciách na stresové podmienky, čo naznačuje genetickú rozmanitosť a potenciál rôznych genotypov adaptovať sa na stres. Jednotlivé genotypy vykázali rozdielne reakcie na stres, čo bolo zaznamenané najmä cez údaje z chlorofylovej fluorescencie a teplotné rozdiely na listoch. Niektoré genotypy mali stabilnejšie reakcie pri stresových podmienkach, čo naznačuje ich väčšiu odolnosť. Pri hyperspektrálnom zobrazovaní boli identifikované rôzne odrazové spektrá, ktoré korelujú s fyziologickým stavom rastlín. Tieto rozdiely môžu signalizovať odlišnosti v obsahu chlorofylu, štruktúre listov a v obsahu vody. Merania chlorofylovej fluorescencie poukázali na variabilitu v efektivite fotosyntézy a stresových odpovediach genotypov. Tento parameter poskytol informácie o tom, ako efektívne rastliny využívajú svetlo a zvládajú stres, najmä z pohľadu fotoinhibície a možného poškodenia fotosystému II. Termálne snímky pomocou infračervenej kamery odhalili rozdiely v teplotách listov medzi jednotlivými genotypmi. Nižšie teploty listov počas stresu môžu indikovať lepšiu vodnú bilanciu alebo efektívnejšie chladenie listov cez transpiráciu.

Tieto výsledky poskytujú hodnotný pohľad na fenotypickú diverzitu a môžu byť použité na identifikáciu genotypov, ktoré sú perspektívne pre pestovanie v oblastiach s častými stresovými faktormi.

Literatura

Alotaibi, F., Alharbi, S., Alotaibi, M., Al Mosallam, M., Motawei, M., & Alrajhi, A. (2021). Wheat omics: Classical breeding to new breeding technologies. Saudi journal of biological sciences, 28(2), 1433-1444. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.083

Furbank, R. T., & Tester, M. (2011). Phenomics–technologies to relieve the phenotyping bottleneck. Trends in plant science, 16(12), 635-644. 10.1016/j.tplants.2011.09.005

Hyles, J., Bloomfield, M.T., Hunt, J.R. et al. Phenology and related traits for wheat adaptation. Heredity 125, 417–430 (2020). https://doi.org/10.1038/s41437-020-0320-1

Ingver, A., Gorash, A., Ivandi, E. et al. (2024) Phenotypic diversity of key adaptive traits in advanced Nordic and Baltic spring wheat (Triticum aestivum L.) breeding material. Euphytica 220, 147 (2024). https://doi.org/10.1007/s10681-024-03404-4

Mir, R. R., Reynolds, M., Pinto, F., Khan, M. A., & Bhat, M. A. (2019). High-throughput phenotyping for crop improvement in the genomics era. Plant Science, 282, 60-72. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.007

Mondal S, Rutkoski JE, Velu G, Singh PK, Crespo-Herrera LA, Guzmán C, Bhavani S, Lan C, He X and Singh RP (2016) Harnessing Diversity in Wheat to Enhance Grain Yield, Climate Resilience, Disease and Insect Pest Resistance and Nutrition Through Conventional and Modern Breeding Approaches. Front. Plant Sci. 7:991. doi: 10.3389/fpls.2016.00991

Ramazani, S. and Izanloo, A. (2019). Evaluation of drought tolerance of triticale (xtriticosecale wittm. ex a. camus) genotypes along with bread wheat and barley genotypes. Acta Agriculturae Slovenica, 113(2). https://doi.org/10.14720/aas.2019.113.2.15

Reif, J.C., Zhang, P., Dreisigacker, S. et al. (2005). Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. Theor Appl Genet 110, 859–864. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1881-8

Reynolds, M., Chapman, S., Crespo-Herrera, L., Molero, G., Mondal, S., Pequeno, D. N., & Sukumaran, S. (2020). Breeder friendly phenotyping. Plant Science, 295, 110396. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110396

Tong, H., & Nikoloski, Z. (2021). Machine learning approaches for crop improvement: Leveraging phenotypic and genotypic big data. Journal of plant physiology, 257, 153354. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153354

Xiao, Q., Bai, X., Zhang, C., & He, Y. (2022). Advanced high-throughput plant phenotyping techniques for genome-wide association studies: A review. Journal of advanced research, 35, 215-230. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.05.002

Poděkování

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-21-0504

Kontakt:

Ing. Pavol Hauptvogel, PhD.
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav rastlinnej výroby
Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
E: pavol.hauptvogel@nppc.sk ; T: +421 33 7947 272

Multiplexní sada primerů pro identifikaci rezistence proti *Hyaloperonospora parasitica* Pers. u *Brassica oleracea* L. pomocí SSR markerů

Multiplex primer set for identification of resistance to *Hyaloperonospora parasitica* Pers. in *Brassica oleracea* L. using SSR markers

Jungová M. a Ovesná J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73, 161 06 Prague 6 – Ruzyně, Česká republika

Abstrakt

Tato studie využívá pokročilou molekulární technologii SSR markerů (Short Sequence Repeats) pro přesnou identifikaci genotypů rezistentních vůči plísni zelné, způsobené patogenem *Hyaloperonospora parasitica* Pers. u variet druhu *Brassica oleracea* L. Multiplexní PCR reakce umožnila efektivní detekci 11 polymorfních alel asociovaných s rezistencí vůči tomuto houbovému patogenu. Analýza byla zaměřena na dva specifické mikrosatelitní lokusy (*Ppa*^{207} a *Pp3*), které přispívají k odolnosti rostlin. Použití tří párů primerů s fluorescenčně značeným společným primerem M13 umožnilo simultánní amplifikaci DNA v oblastech mikrosatelitních lokusů, což významně snížilo materiálové náklady. Tento přístup nejen že zlepšil přesnost identifikace délkových variant, ale rovněž odhalil nové varianty alel v různých odrůdách. Výsledky této studie poskytují zásadní přínos pro selekci rezistentních genotypů v komerčních odrůdách i šlechtitelských programech.

Klíčová slova: plíseň zelná, Brassicaeae, oomycety, mikrosatelity

Abstract

This study employs advanced molecular technology using SSR markers (short sequence repeats) to accurately identify genotypes resistant to downy mildew, caused by the pathogen *Hyaloperonospora parasitica* Pers., in varieties of the species *Brassica oleracea* L. The multiplex PCR reaction enabled the efficient detection of 11 polymorphic alleles associated with resistance to this fungal pathogen. The analysis concentrated on two particular microsatellite loci (*Ppa*^{207} a *Pp3*), which are associated with plant resistance. The utilisation of three pairs of primers with a fluorescently labelled universal M13 primer permitted the simultaneous amplification of DNA in microsatellite loci regions, thereby reducing material costs. This approach not only enhanced the accuracy of identifying length variants but also revealed new variants in different cultivars. The results of this study provide a crucial contribution to the selection of resistant genotypes in commercial varieties and breeding programmes.

Keywords: Downy mildew, Brassicaeae, oomycetes, microsatellites

Úvod

Brassica oleracea L. (*B. oleracea*) je jedním z nejvýznamnějších druhů čeledi Brassicaceae, zahrnující důležité zeleninové plodiny jako květák, brokolici, kedluben, kapustu či zelí (Bayer et al. 2019). Tento druh pochází ze středomořské oblasti a jeho diverzita hrála klíčovou roli ve vzniku morfologických variací. Sicílie je považována za oblast původu brokolice a květáku, kde se dodnes pěstují krajové odrůdy (Branca et al. 2005; Coelho et al. 2018). Brukvovité jsou citlivé na řadu patogenů, včetně původce plísně zelné, způsobené oomycetou *Hyaloperonospora parasitica* Pers. (Giovannelli et al. 2002). Tento patogen napadá listy, snižuje výnosy a kvalitu plodin (Monteiro et al. 2005; Saha et al. 2020). Může způsobit defoliaci dospělých rostlin a za příznivých podmínek se stát epidemií, což vede k významným ztrátám na výnosech (Coelho a Monteiro 2003; Saharan et al. 2017). V některých oblastech, jako je Čína a Austrálie, plíseň způsobuje značné ztráty ve výnosech (Yu et al. 2009; Mohammed et al. 2017), přičemž v Číně je zodpovědná až za 90 % ztrátu výnosu čínského zelí (Yu et al. 2009). Infekce sazenic je rozšířená hlavně ve sklenících a za příznivých podmínek může infikovat až 50–60 % semen zelí a snížit sklizeň o 16–20 % (Saharan et al. 2017). Problémem

při zvládání této choroby je rychlý epidemický nárůst plísně zelné v důsledku čehož je vývoj choroby rychlý a nepředvídatelný, a to je jeden z důvodů, proč kontrola pomocí fungicidů poskytuje pouze omezenou nebo jen částečnou kontrolu s vysokými náklady (Neik et al. 2017). Navíc používání fungicidů při kontrole choroby, často selhává, protože vede k evoluci virulentnějších patogenů (Vicente et al. 2012, Singh et al. 2015).
Rezistentní kultivary tak představují jednu z možných alternativ k použití fungicidů a mohou poskytnout praktické a dlouhodobé řešení účinné kontroly chorob. Vybrané rezistentní genotypy lze použít k hybridizaci (Vincente et al. 2012; Coelho a Monteiro 2018; Shaw et al. 2021). Nejrychlejší metodou pro identifikaci rezistentních rostlin ve šlechtitelském pokroku je selekce za pomoci genových markerů. Molekulární markery rezistence jsou zvláště vhodné pro nízké ekonomické a ekologické vstupy a šlechtitelé je využijí k vytvoření dalších konkurenceschopných odrůd ve stávajících programech šlechtění rostlin (Zhang et al. 2009; Saha et al. 2020). Mikrosatelity, definované jako opakování jednoduchých sekvencí (SSR), jsou náhodně rozptýleny v eukaryotických genomech. Jsou vysoce variabilní a vykazují dominantní dědičnost a jsou vysoce účinné při analýze rodokmenu různých plodin (Plieske a Struss 2000). Bylo popsáno několik zdrojů rezistence sazenic vůči plísni zelné u *B. oleracea* (Natti et al. 1967; Jensen et al. 1999; Farnham et al. 2002). Odolnost vůči plísni u juvenilních a zralých rostlin brokolice (Mahajan et al. 1995; Coelho a Monteiro 2003; Monteiro et al. 2004; Coelho a Monteiro 2018).
V naší studii byly vybrány dva lokusy spojené s rezistencí vůči plísni zelné. Saha et al. (2020) identifikovali dva SSR markery, BoGMS0486 a BoGMS0900, spojené s novým genem rezistence Ppa^{207} vůči plísni zelné na chromozomu C2 a následně Saha et al. (2021) navrhl další marker BoGMS0624, který je spojen s dominantním genem rezistence *Pp3* proti plísni zelné, a to jak u květáku (Mahajan et al. 1995), tak u brokolice (Coelho a Monteiro, 2003). Tyto studie poskytly důkazy o tom, že existují zdroje dostupné pro genetickou kontrolu této choroby. Z toho důvodu bylo rozhodnuto zaměřit se na validaci, multiplex a otestování těchto SSR markerů s cílem ověřit, zda mohou být účinně použity k charakterizaci odolnosti vůči plísni zelné u genetických zdrojů *B. oleracea*.

Materiál a metody

Na analýzy DNA, byly použity listy variet *B. oleracea*: brokolice (BR), květák (KV) a kapusta (KP) (kódy B180000 = BRESOV), které byly testovány na rezistenci (označena číslem 1 za zkratkou) a náchylnosti (označena číslem 4) vůči *Hyaloperenospora parasitica* podle metody Coelho a Monteiro (2003), ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci.
Pro analýzu byly použity listové čepele brukvovitých variet *B. oleracea* odebrané ve fázi 3 listů. Homogenizace byla provedena z 200 mg listů, které byly rozetřeny v tekutém dusíku a přeneseny do předem připravených zkumavek. Izolace DNA proběhla metodou CTAB (Doyle a Doyle 1987) s drobnou úpravou, která spočívala v přidání 10 mg polyvinylpyrrolidonu (PVPP) (Carl Roth) a 5 µl 10 mg/µl RNázy A (Thermo Scientific) v počáteční fázi před inkubací. Kvalita a výtěžek izolované DNA byly následně kontrolovány na 0,8 % agarózovém gelu v 1× TAE pufru.
Amplifikace DNA byla provedena v 10 µl reakci skládající se z 5 µl směsi QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 0,2 µl každého reverse a forward primeru a 0,2 µl M-13 fluorescenčního vzorku VIC® (10 µM každý v počátečním objemu) (tabulka 1), 100 ng DNA rozpuštěných v 2 µl TE pufru a 2,4 µl dH_2O. Protokol PCR byl proveden podle Schuelkeho (2000).

Tabulka 1: Sekvence primerů v multiplexní reakci

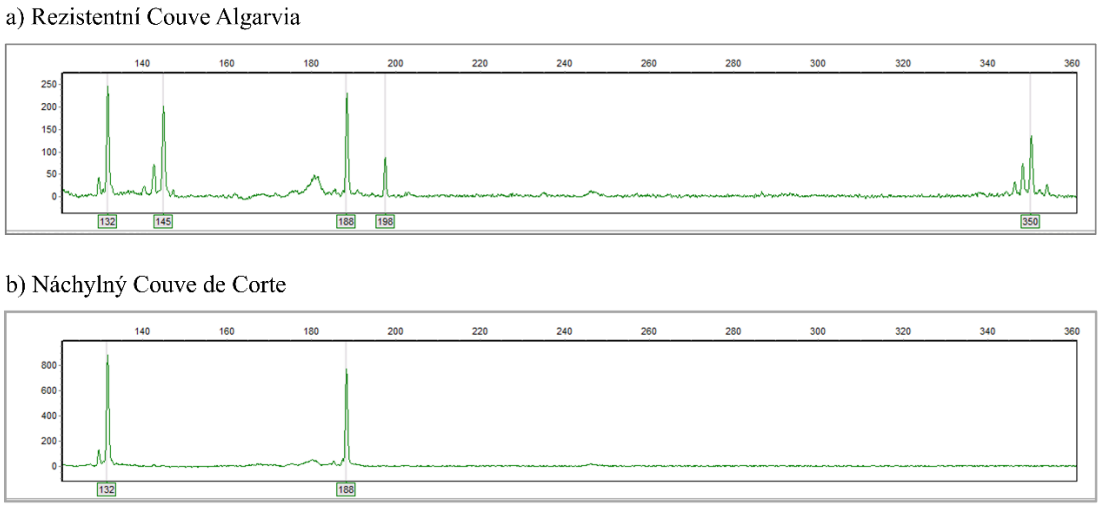
BoGMS0900		
Primer F1	CAACTGTAGAAGAACCCAACA-3'	***Ppa*^{207}**
Primer R1	5'-GGTGTAAAGAAGCATAGCAAG-3'	
BoGMS0486		
Primer F2	AAGGAGGAACCAAATGCC-3'	
Primer R2	5'-TGATAATGCCACTGATAGGAC-3'	
BoGMS0624		
Primer F3	AAGACGAAGTCAAGTCAAGGT-3'	***Pp3***
Primer R3	5'-CGTATCATCCAGAGTATCCAG-3'	
M13 - tail	5'VIC-TGTAAAACGACGACGGCCAGT	

PCR byla provedena pomocí cykleru Applied Biosystem (Applied Biosystems, USA) takto: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 15 min, následovaná 25 cykly: denaturace (95 °C po dobu 20 s), anealing (58 °C po dobu 30 s) a extenze (72 °C po dobu 20 s), následovaná 10 cykly denaturace (95 °C po dobu 30 s), anealing (53 °C po dobu 45 s), extenze (72 °C po dobu 45 s) a se závěrečnou extenzí při 72 °C po dobu 15 min. Během prvních 25 cyklů se vytvoří specifické produkty PCR a v následujících 10 cyklech se fluorescenční značka M13 naváže na forward primer M13-tail. Kvalita PCR produktů byla ověřena na 2% agarosovém gelu.
Analýza fragmentů byla provedena pomocí kapilární elektroforézy v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). Elektroforeogramy byly analyzovány a hodnoceny pomocí programu GeneMarker ver. 1.8 (SoftGenetics, USA). Software DARwin (http://darwin.cirad.fr/darwin) byl použit k sestavení fylogeneze pomocí algoritmu Neighbor-Joining s bootstrapovou analýzou. Pro analýzu genetické struktury brukvovitých byl použit program STRUCTURE verze 2.2 (Falush et al. 2007). Bylo použito 10 000 burn-in iterakcí a 20 000 vzorkovacích interakcí. K detekci neznámé populace byla použita metoda shlukování založená na modelu, která odhadla počet shluků (K) s posteriorní pravděpodobností Pr(X|K), podle modelu s příměsí a nekorelovanými frekvencemi alel (Pritchard et al. 2000).

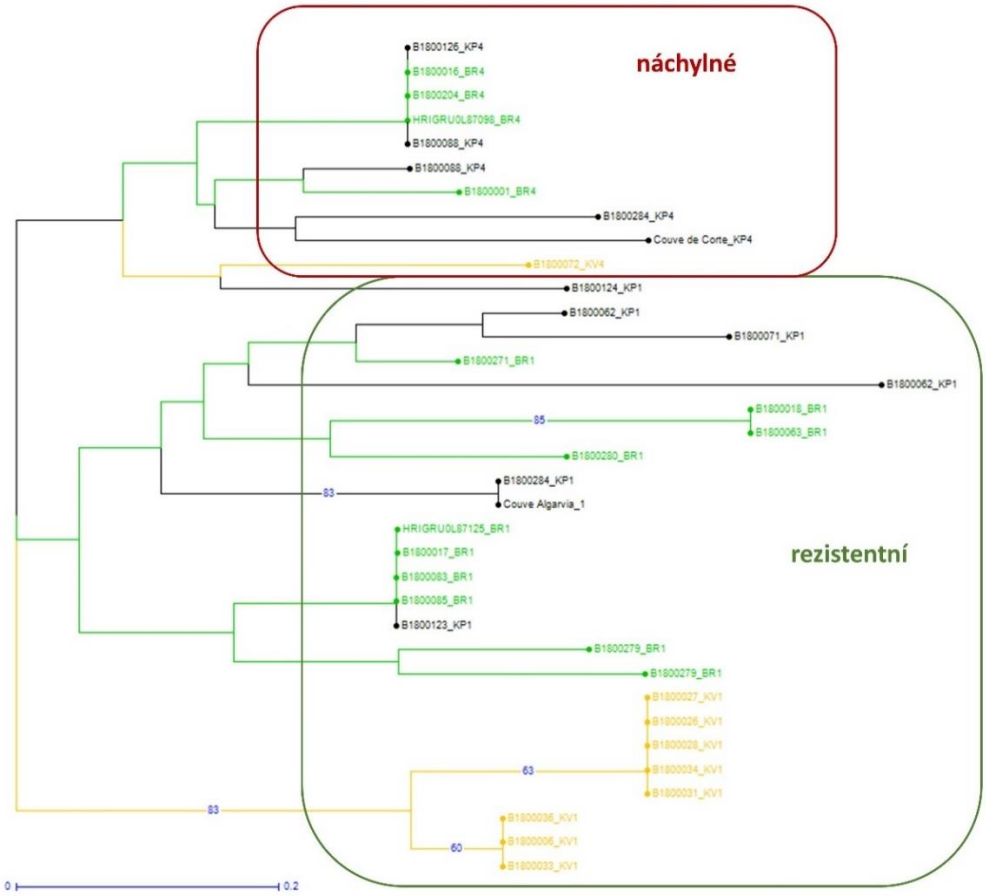
Výsledky

Použití primerů s označením M13-tail a různými délkami jejich produktů umožňuje amplifikaci čtyř markerů (mikrosatelitů) v jedné PCR reakci, čímž šetří čas i materiál potřebný pro detekci. Tato metoda také snižuje náklady, protože každý forward primer obsahuje na svém 5' konci připojenou sekvenci M13. Používají se primery M13 v kombinaci se značeným M13 primerem (5'VIC-TGTAAAACGACGACGGCCAGT), který má na svém 5' konci fluorescenční značku. Tento označený primer M13-tail funguje jako jediný zdroj fluorescence pro detekci a lze jej univerzálně použít s jakýmkoli M13-forward primerem. To umožňuje vytvoření značené amplifikované alely a identifikaci nových variant u dosud netestovaných materiálů (obrázek 1).
Byly testovány markery BoGMS0900 a BoGM0486 SSR, které jsou spojeny s lokusem *Ppa*^{207}. Výsledky pro marker BoGMS0900 ukázaly amplikony délky 146 bp (bp = párů bází) u rezistentního genotypu brokolice HRIGRU0L87125 a 132 bp u náchylného genotypu HRIGRU0L87098 (obrázek 1, tabulka 2). Rezistentní genotyp kapusty Couve Algarvia amplifikoval produkty o délce 132 bp i 146 bp, což pravděpodobně souvisí s heterozygotností na lokusu. U náchylné kapusty Couve de Corte se amplifikoval produkt délky 132 bp. Rezistentní květáky vykazovaly produkty délky 148 bp (obrázek 4). Marker BoGMS0486 produkoval fragmenty délky 198 bp u obou brokolic HRIGRU0L87125 (rezistentní) a HRIGRU0L87098 (náchylné), přičemž u jiných odrůd byla identifikována i alela délky 216

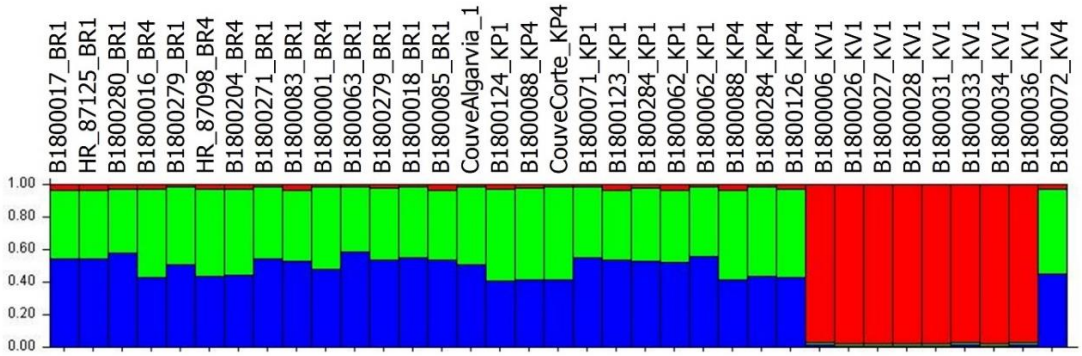
bp (obrázek 1, tabulka 2). U náchylné kapusty Couve de Corte byl zaznamenán produkt délky 188 bp. U markeru BoGMS0624, který je spojen s lokusem *Pp3*, byly detekovány amplikony délky 340, 346, 350 bp, přičemž nejčastěji se vyskytoval amplikon délky 354 bp (tabulka 2). Za zmínku stojí, že u Couve de Corte nebyla u tohoto markeru zaznamenána žádná alela.



Obrázek 1: Elektroforeogram multiplexu primerů BoGMS0900, BoGM0486, BoGMS0624



Obrázek 2: Dendrogram testovaných genotypů brokolice, květáku a kapusty zkonstruovaný na základě multiplexu molekulárních markerů. Zkratka BR (brokolice), KV (květák) a KP (kapusta). Číslo 1 (např. BR1) znamená rezistentní a číslo 4 náchylná odrůda.

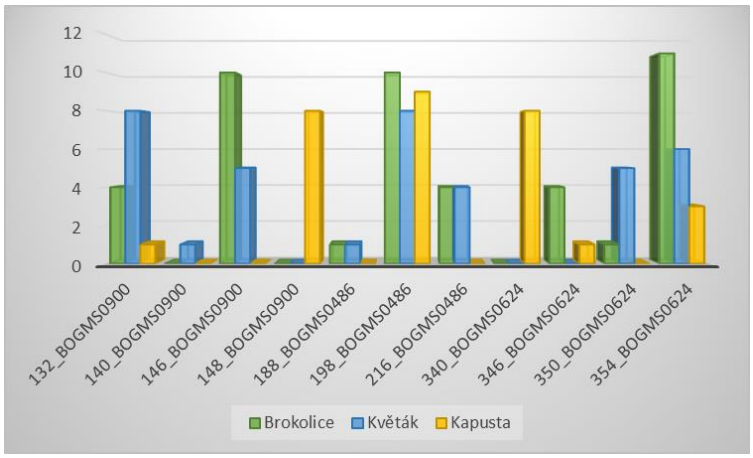


Obrázek 3: Analýza STRUCTURE variet *B. oleracea* s využitím K = 3, datový soubor je založený na 35 jedincích a třech lokusech (SSR markery)

Z dendrogramu (obrázek 2) je patrné, že testované vzorky byly jasně rozděleny do dvou hlavních klastrů, což naznačuje výraznou genetickou odlišnost mezi náchylnými a rezistentními genotypy. Analýza struktury (obrázek 3) dále ukázala detailnější rozdělení vzorků do tří genetických klastrů, přičemž zelenomodré shluky zahrnují především brokolice, kapusty a červený shluk především květáky.

Tabulka 2: Binární zobrazení odrůd *B. oleracea* podle přítomnosti alel na základě genotypového profilu

Kod odrudy	132_BoGMS0900	140_BoGMS0900	146_BoGMS0900	148_BoGMS0900	188_BoGMS0486	198_BoGMS0486	216_BoGMS0486	340_BoGMS0624	346_BoGMS0624	350_BoGMS0624	354_BoGMS0624
B1800017_BR1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
HRIGRU0L87125_BR1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800280_BR1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
B1800016_BR4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800279_BR1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
HRIGRU0L87098_BR4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800204_BR4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800271_BR1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1
B1800083_BR1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800001_BR4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
B1800063_BR1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
B1800279_BR1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
B1800018_BR1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
B1800085_BR1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Couve Algarvia_1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
B1800124_KP1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B1800088_KP4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Couve de Corte_KP4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
B1800071_KP1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
B1800123_KP1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800284_KP1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
B1800062_KP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B1800062_KP1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
B1800088_KP4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800284_KP4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
B1800126_KP4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B1800006_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
B1800026_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B1800027_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B1800028_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B1800031_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B1800033_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
B1800034_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
B1800036_KV1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
B1800072_KV4	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0



Obrázek 4: Graf znázorňuje výskyt jednotlivých alel tří variet *B. oleracea* spojených s markery BoGMS0900, BoGM0486 a BoGMS0624.

Diskuze

Cílem této studie bylo vytvořit multiplexní sadu primerů, která by umožnila rychlou a efektivní identifikaci známých zdrojů rezistence vůči plísni zelné u zelenin druhu *B. oleracea*. Předběžný screening testovaných vzorků odhalil významnou genetickou diverzitu mezi jednotlivými genotypy, což potvrzuje i dřívější studie (Shaw et al. 2021). Fenotypové a genotypové hodnocení ukázalo specifickou heterogenitu jak v rámci jednotlivých odrůd, tak mezi nimi, což odráží genetickou variabilitu a opylovací mechanismy u *B. oleracea*. Důležitým zjištěním bylo, že u některých vzorků byly přítomny jak duplikace, tak příměsi, což zdůrazňuje nezbytnost pečlivého fenotypového a genotypového screeningu při správě odrůdových kolekcí (Branca et al. 2005; Singh et al. 2019).

Výsledky ukázaly, že odrůdy často nesestávají z jediného genotypu, což potvrzuje také studie van Hintum et al. (2007). Pečlivý screening více jedinců z každé odrůdy by tak mohl odhalit dosud nepoznanou genetickou diverzitu na specifických lokusech. V této studii jsme zjistili, že náchylné genotypy tvořily samostatný klastr, který byl charakterizován odlišnými genetickými markery a rozdíly v sekvencích mikrosatelitů, což odráží jejich nižší úroveň rezistence vůči plísni zelné. Naopak rezistentní genotypy tvořily druhý klastr, který vykazoval větší genetickou variabilitu, což naznačuje, že odolnost je podmíněna přítomností několika různých alel (Farinhó et al. 2007; Gao et al. 2007; Carlier et al. 2012).

Výsledky této studie ukázaly, že SSR markery (BoGMS0900, BoGMS0486 a BoGMS0624) jsou efektivním nástrojem pro diagnostiku přítomnosti odlišných alel, přičemž výsledné shluky z analýzy STRUCTURE reflektují podobné genetické pozadí genotypů s rezistentními alelami. Analýza potvrdila, že červený klastr zahrnoval především rezistentní genotypy květáku z České republiky, což ukazuje na přítomnost specifických rezistentních alel, které se odlišují od ostatních druhů. Tento rozdíl poukazuje na adaptace jednotlivých odrůd v reakci na patogen *Hyaloperonospora parasitica* (Saha et al. 2020, 2021).

Do budoucna by bylo vhodné tyto markery otestovat na větším souboru vzorků a společně s dalšími markery souvisejícími s rezistencí vůči plísni zelné je začlenit do šlechtitelských programů. Důraz je kladen na možnost multiplexování, čímž se sníží náklady na materiál v PCR reakci díky využití primerů s připojenou sekvencí „tail“ M13, kde každý forward primer obsahuje na svém 5' konci připojenou sekvenci M13, která je fluorescenčně značená. Tento přístup umožňuje přesnější detekci alel a rychlejší screening většího množství vzorků (Šurinová et al. 2018; Jungová et al. 2023).

Závěr

Studie ukazuje, že vyvinutá multiplexní sada primerů poskytuje efektivní nástroj pro identifikaci rezistence vůči plísni zelné u zelenin rodu *B. oleracea*. Předběžný screening odhalil značnou genetickou diverzitu mezi genotypy, a to jak v rámci jednotlivých odrůd, tak mezi nimi, což je dáno genetickou variabilitou a opylovacími mechanismy. Výsledky potvrzují, že rezistence je ovlivněna přítomností několika alel a že náchylné a rezistentní genotypy tvoří odlišné klastry na základě specifických genetických markerů. SSR markery se ukázaly být efektivní při diagnostice alel a identifikaci genetických rozdílů mezi rezistentními a náchylnými genotypy. Studie také zdůrazňuje význam pečlivého screeningu při správě odrůdových kolekcí a doporučuje testování markerů na větším souboru vzorků, což by mělo přispět ke zlepšení šlechtitelských programů.

Literatura

Bayer PE (2019) Variation in abundance of predicted resistance genes in the *Brassica oleracea* pangenome. Plant Biotechnol. J. 17, 789–800.

Branca F, Bahcevandziev K, Perticone V & Monteiro A (2005) Sources of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) in Sicilian germplasm of cauliflower and broccoli. Biodivers Conserv 14:841–848 https://doi.org/10.1007/s10531-004-0652-9

Carlier JD, Alabaça CA, Coelho PS, Monteiro AA and Leitão JM (2012) The downy mildew resistance locus *Pp523* is located on chromosome C8 of *Brassica oleracea* L. Plant Breed. 131:170–175.

Coelho PS & Monteiro AA (2003) Expression of resistance to downy mildew at cotyledon and adult plant stages in *Brassica oleracea* L. Euphytica 133, 279–284

Coelho PS, Monteiro AA, Lope VR, Branca (2018) New sources of resistance to downy mildew in a collection of wild and cultivated brassicas. Acta Hortic 1202. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1202.14

Doyle JJ & Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19, pp. 11–15.

Falush D, Stephens M & Pritchard JK (2003). Inference of population structure, extensions to linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164, 1567–2587. https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567

Farinhó M., Coelho P, Monteiro, A & Leitão J (2007) SCAR and CAPS markers flanking the Brassica oleracea L. Pp523 downy mildew resistance locus demarcate a genomic region syntenic to the top arm end of Arabidopsis thaliana L. chromosome 1. Euphytica 157: 215 –221.

Farnham MW, Wang M, Thomas CE (2002) A single dominant gene for downy mildew resistance in broccoli. Euphytica 128:405–407.

Gao M, Li G, Yang B, Qiu D, Farnham M (2007) High-density Brassica oleracea linkage map: identification of useful new linkages. Theor. Appl. Genet. 115: 277–287.

Giovannelli JL, Farnham MW & Wang M (2002) Development of sequence characterized amplified region markers linked to downy mildew resistance in broccoli. J Am Soc Hortic Sci 127: 597 –601 117.

Jensen BD, Værbak S, Munk L, Andersen SB (1999) Characterization and inheritance of partial resistance to downy mildew, *Peronospora parasitica*, in breeding material of broccoli, *Brassica oleracea* con var. *botrytis* var. italica. Plant Breed 118: 549–54

Jungová M, Jurasová Müllerová V, Čepková Hlásná P, Svobodová Leišová L, Svoboda P, Hejcman M (2023) Origin and genetic variability of populations of the invasive plant *Rumex alpinus* L. in the Giant (Krkonoše) Mountains. Ecology and Evolution, 13, e10145. https://doi.org/10.1002/ece3.10145

Mahajan V, Gill HS & More TA (1995) Inheritance of downy mildew resistance in Indian cauliflower (group III). Euphytica 86: 1–3.

Mohammed AE, Yo MP & Barbetti M (2017) New resistances offer opportunity for effective management of the downy mildew (*Hyaloperonospora parasitica*) threat to canola. Crop Pasture Sci 68:234–242. https://doi:/10.1071/CP16363

Monteiro AA, Coelho PS, Bahcevandziev K & Valério L (2005). Inheritance of downy mildew resistance at cotyledon and adult-plant stages in 'Couve Algarvia' (*Brassica oleracea* var. tronchuda).

Euphytica 141, 85–92. https://doi:/10.1007/s10681-005-5696-8

Neik TX, Barbetti MJ & Batley J (2017) Current Status and Challenges in Identifying Disease Resistance Genes in *Brassica napus*. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01788

Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155, 945–959. https://doi.org/ 10.1093/genetics/155.2.945

Saha P (2020) Genetic analysis of downy mildew resistance and identification of molecular markers linked to resistance gene Ppa^{207} on chromosome 2 in cauliflower. Theor. Appl. Genet. 115, 277–287.

Saha P, Ghoshal C, Saha ND, Verma A, Srivastava M, Kalia P & Tomar BS (2021) Marker-Assisted Pyramiding of Downy Mildew-Resistant Gene *Pp3* and Black Rot-Resistant Gene Xca1bo in Popular Early Cauliflower Variety Pusa Meghna. Frontiers in Plant Science, 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.603600.

Saharan GS, Mehta N, Mehta PD (2017) Downy mildew disease of crucifers: biology, ecology and disease management. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7500-1$4eBook

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18: 233–234. https://doi.org/10.1038/72708

Shaw, R. K., Shen, Y., Zhao, Z., Sheng, X., Wang, J., Yu, H., & Gu, H. (2021). Molecular Breeding Strategy and Challenges Towards Improvement of Downy Mildew Resistance in Cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis L.). In Frontiers in Plant Science (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667757

Singh S, Sharma SR, Kalia P, Deshmukh R, Katara J, Sharma P, Sharma TR (2015) Identification of putative DNA markers for disease resistance breeding in Indian cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.). Indian J Biotechnol 14:455–460.

Šurinová M, Jarošová A & Münzbergová Z (2018) Microsatellite markers for study of the invasive species *Rumex alpinus* (Polygonaceae). Applications in Plant Sciences, 6, e1017. https://doi.org/10.1002/aps3.1017

van Hintum ThJL, van de Wiel CCM,Visser DL, van Treuren R, Vosman B (2007). The distribution of genetic diversity in a Brassica oleracea gene bank collection related to the effects on diversity of regeneration, as measured with AFLPs. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik, 114(5), 777-786. https://doi.org/ 10.1007/s00122-006-0456-2

Vincente JG, Gunn ND, Bailey L, Dac P & Holub EB (2012) Genetics of resistance to downy mildew in *Brassica oleracea* and breeding towards durable disease control for UK vegetable production. Plant Pathol. 61, 600-609

Yu S, Zhang F, Yu R, Zou Y, Qi J, Zhao X, Yu Y, Zhang D, Li L (2009) Genetic mapping and localization of a major QTL for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Mol Breed 23:573–590

Zhang NWW, Pelgrom K, Niks RE, Visser RGF, Jeuken MJW (2009) Three combined quantitative trait loci from non host *Lactuca saligna* are sufficient to provide complete resistance of lettuce against *Bremialactucae*. Mol Plant Microbe Interact 22:1160–1168

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory MZe ČR, číslo projektu MZE-RO423.

Kontakt:

Ing. et Ing. Michaela Jungová, Ph.D., DiS.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
Drnovská 507/73, 161 00 Praha 6 – Ruzyně
+420 771 136 065
michaela.jungova@vurv.cz

Využití nanočástic v *in vitro* kulturách řepky olejky (*Brassica napus* L.)

Utilization of nanoparticles in *in vitro* cultures of oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Klíma M.[1], Bartošová P.[1], Rosokha H.[1], Vrbovský V.[2], Baránek M.[3]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha-Ruzyně*

[2]*OSEVA vývoj a výzkum, s.r.o.*

[3]*Mendelova univerzita v Brně*

Abstrakt

Byla sledována antimikrobiální aktivita a vliv na embryogenezi u šesti vybraných nanočástic (NPs) v mikrosporových kulturách 8 materiálů ozimé řepky (*Brassica napus* L.). Navýšení frekvence embryogeneze oproti kontrole bylo zaznamenáno při koncentraci 0,5 µg Ag/ml u genotypu Navajo, Cadeli, 6/22 a 8/22 u nanočástic AgSeNP_11 a AgSeNP_13. Při koncentraci 12 µg Ag/ml již nebyla zaznamenána regenerace embryí u žádné z variant. Významné omezení rozvoje mikrobiální kontaminace bylo zaznamenáno u všech testovaných genotypů a variant NPs již u výchozí koncentrace (20 µg Ag/ml). Při nejvyšší testované koncentraci (60 µg/ml) byla po 14 dnech kultivace jako nejlepší vyhodnocena AgNP_33 (průměrně 93,3% nekontaminovaných explantátů, rozmezí 74,7–100,0%). Po 14 dnech kultivace na médiu bez NPs nastal opětovný rozvoj kontaminací u všech variant (genotyp × NPs × koncentrace), které na médiu s NPs nevykazovaly rozvoj kontaminace.

Klíčová slova: *in vitro* regenerace, mikrosporové kultury, mikrobiální kontaminace, embryogeneze

Abstract

The antimicrobial activity and effect on embryogenesis of several nanoparticles (NPs) was evaluated in microspore cultures of oilseed rape (*Brassica napus* L.) genotypes. An increase in the frequency of embryogenesis compared to the control was observed at a concentration of 0.5 µg Ag/ml in Navajo, Cadeli, 6/22 and 8/22 genotypes with AgSeNP_11 and AgSeNP_13 NPs. At a concentration of 12 µg/ml, regeneration of embryos was no longer recorded for any of the variants. A significant drop in microbial contamination was recorded for all tested genotypes and variants of NPs already at the initial concentration (20 µg Ag/ml). At the highest tested concentration (60 µg/ml) after 14 days of cultivation, AgNP_33 was evaluated as the best (on average 93.3% of uncontaminated explants, range 74.7–100.0%). After 14 days of cultivation on medium without NPs, re-development of contamination occurred for all variants, which did not show development of contamination on medium with NPs.

Keywords: *in vitro* regeneration, microspore culture, microbial contamination, embryogenesis

Úvod

Řepka olejka (*Brassica napus* L.) se dlouhodobě řadí mezi klíčové olejniny. Pokud srovnáme celosvětovou produkci rostlinných olejů, řepce náleží třetí místo, po palmě olejné a sóje. U nás i v Evropě je to olejnina nejvýznamnější; Česká republika stabilně patří mezi pět předních producentů řepkového semene v Evropské unii, s každoroční osevní plochou v rozmezí 350–400 tis. ha. Popularita této plodiny je dána vysokou poptávkou po rostlinných olejích obecně. Řepkový olej je díky své vysoké teplotní stabilitě ideální pro smažení a fritování; svou nutriční hodnotou se blíží oleji olivovému, v některých parametrech ho i předčí, protože obsahuje minimum nasycených mastných kyselin a naopak významné množství mononenasycených i esenciálních mastných kyselin omega6 a omega3 (Przybylski 2011).

S významem řepky souvisí i její intenzivní šlechtění, v současnosti ve světě i v ČR s rutinním využitím *in vitro* biotechnologií, které výrazně zrychlují a zefektivňují celý šlechtitelský proces. Jedním z těchto přístupů je využití mikrosporové embryogeneze v *in vitro* kulturách s následnou tvorbou zcela homozygotních genotypů (potenciálních liniových odrůd nebo komponent hybridů) prakticky během jedné generace (Vyvadilová *et al.* 2008).

S *in vitro* kulturami souvisí významný negativní aspekt: mikrobiální kontaminace (Mahajan *et al.* 2022). Zdrojem mikroorganismů je jak nedostatečná sterilizace kultivačních médií, nádob, pomůcek a zázemí pro aseptickou manipulaci, tak i nedostatečná nebo nevhodná povrchová sterilizace nebo manipulace s explantáty před, během nebo po jejich převodu z nesterilních podmínek do *in vitro*. Vedle kontaminací, manifestujících se již během krátkého časového období po introdukci patogenu do *in vitro* kultur, se vyskytuje i celá řada mikroorganismů, které často v kulturách dlouhodobě přežívají v mezibuněčných prostorách rostlin bez viditelných projevů a negativních účinků (Mano a Morisaki 2008). Jejich případný projev může být akcelerován stárnutím kultury, vlivem vyšších teplot během kultivace (Thomas a Kumari (2010)), nebo i repasážemi, spojenými s klonováním nebo seříznutím části explantátů. Takové mikroorganismy nemohou být eliminovány obvyklou povrchovou sterilizací (Panicker *et al.* 2007). K jejich omezení v *in vitro* kulturách se nejčastěji doporučují antibiotika (Misra *et al.* 2010); pak ale nejsou vyloučeny genetické nebo epigenetické změny následkem aplikace těchto látek (Srivastava *et al.* 2021). Je třeba zmínit i riziko vzniku rezistence patogenu během dlouhodobé aplikace, zdravotní riziko pro obsluhu při chybné manipulaci a zátěž pro životní prostředí při neodborné likvidaci kultur s antibiotiky.

Jednou z perspektivních možností omezení mikrobiální kontaminace v *in vitro* kulturách se jeví aplikace nanočástic. Nanočástice (NPs) jsou mikroskopické partikule (< 100 nm), které vykazují jedinečné fyzikální a chemické vlastnosti díky své malé velikosti a zároveň velkému poměru povrchu k objemu (Salem a Fouda 2021). Jejich výhodou (např. ve srovnání s antibiotiky) je mj. i jejich nižší toxicita (Awashra a Młynarz 2023). U nanočástic na bázi stříbra (AgNPs) byla zjištěna antimikrobiální aktivita i stimulace růstu rostlin (Mahajan *et al.* (2022)). AgNPs lze využít i pro zefektivnění mikropropagace *in vitro* (Manh Cuong *et al.* (2021)) a zvýšení frekvence somatické embryogeneze (Mahendran *et al.* (2018)). V poslední dekádě byla publikována řada studií, které se věnují vlivu NPs i na *in vitro* kultury řepky a příbuzných plodin: např. na morfologické a fyziologické změny (Tomaszewska-Sowa *et al.* (2024)), klíčení (Sarkhosh *et al.* (2022)), regeneraci (Al Ramadan *et al.* (2021)), na indukci kalusu (Kouhi a Lahouti (2018)), nebo je sledována jejich antimikrobiální aktivita (Mahajan *et al.* ((2022)).

Cílem práce je uvést výsledky *in vitro* aplikace vybraných nanočástic na bázi stříbra (AgNPs) z hlediska jejich vlivu na mikrosporovou embryogenezi a jejich antimikrobiální aktivitu v *in vitro* kulturách řepky olejky.

Materiál a metody

Pro experimenty byly použity dvě vysoce embryogenní liniové odrůdy Cadeli, Navajo a 6 šlechtitelských materiálů ozimé řepky, dodaných organizací OSEVA vývoj a výzkum, s.r.o. (tabulka 1). Nanočástice (NPs, tabulka 1) byly syntetizovány na pracovišti Mendelovy univerzity v Brně v rámci řešení projektu MZe NAZV QK22010031. Příprava a udržování donorových rostlin, odběr poupat a zakládání mikrosporových kultur a další *in vitro* kultivace probíhaly ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. dle standardního postupu (Vyvadilová *et al.* 2008). Donorové rostliny řepky (6 rostlin od genotypu) byly ve stádiu 5-6 pravých listů (cca 10–12 týdnů po výsevu) jarovizovány 90 dní při teplotě 3–5 °C, 12-ti hodinové světelné periodě a intenzitě osvětlení 50 μmol/m^2/s. Donor. r. byly po zjarovizování jednotlivě vysázeny do zahradnického substrátu v kontejnerech 19×19 cm a od počátku udržovány v řízených podmínkách kultivační komory (fotoperioda 16/8 h, světelná intenzita 180 μmol/m^2/s a teplota 18/15 °C den/noc).

Poupata byla odebírána z hlavních i postranních větví, 30 poupat od genotypu. Velikost poupat pro odběry byla stanovována mikroskopicky tak, aby převažující zastoupení mikrospor v poupěti bylo ve středně až pozdně jednojaderném stádiu. Po třetí centrifugaci byla peleta mikrospor resuspendována v 10 ml pracovního roztoku NLN média (Lichter 1985)

s nanočásticemi (AgNP_33, AgNP_34, AgSeNP_10, AgSeNP_11, AgSeNP_12 a AgSeNP_13) o dané koncentraci (0; 0,5 1,0; 3,0; 6,0; 12 µg Ag/ml média) pro experimenty, týkající se vlivu NPs na embryogenezi, nebo s antimitotikem trifluralin o koncentraci 5 µmol/l, zaměřených na testy antimikrobiální aktivity (tabulka 1). Suspenze byla v 90mm polystyrenové (PS) Petriho misce uzavřena dvojitou vrstvou Parafilmu a umístěna do termostatu (tma, 30,5 °C) na 24 hod. Po 24 hodinách byla suspenze mikrospor purifikována v čerstvém, temperovaném NLN médiu ve dvou cyklech (10 a 5 minut). Koncentrace suspenze byla upravena na 6×10^4/ml kultivačního média a kultury napipetovány do 90mm PS Petriho misek po 10 ml. Test vlivu NPs na frekvenci embryogeneze (embryogenní schopnost) byl proveden pro každou variantu ve třech časových opakováních po dvou Petriho miskách.
Další kultivace suspenze probíhala ve tmě až do objevení prvních proembryí, viditelných pouhým okem (obvykle 9–12 dní od založení kultury). Poté byly kultury přeneseny do kultivační místnosti (25/20 °C, fotoperioda 16/8 h a světelná intenzita 150 µmol/m^2/s) na orbitální třepačku (60 rpm). Jakmile největší embrya dosáhla délky 5 mm (obvykle po 20 dnech na světle), byl vyhodnocen vliv NPs na frekvenci embryogeneze a morfologické charakteristiky embryí. Z varianty s trifluralinem byla poté napasážována všechna zelená, dobře vyvinutá kotyledonární embrya o délce minimálně 4 mm po 25 ks/misku na tuhé diferenciační médium s benzylaminopurinem (0,2 mg/l), indolyl octovou kyselinou (0,2 mg/l) a 2% sacharózou, zpevněném 0,8% agarem (Klíma *et al.* 2004) v 90 mm PS Petriho miskách. Zde byly kultivovány při 19 °C, fotoperiodě 16/8 h a světelné intenzitě 300 µmol/m^2/s po dobu 7–10 dní. Po uplynutí této doby byly cca 2/3 obou děložních lístků embryí odříznuty ostrým skalpelem tak, aby nedošlo k poškození apikálního meristematického pletiva (místa regenerace budoucího prýtu). Takto upravená embrya byla pasážována na regenerační médium (Klíma *et al.* 2004) v 90mm PS Petriho miskách po 20 ks/misku pro inicializaci regenerace a prorůstání vzrostného vrcholu. V případě nedostatečné regenerace byla u příslušných embryí odříznuta kořenová část a takto upravená embrya repasážována na čerstvé regenerační médium. Na regeneračním médiu bylo poté udržováno průběžnými repasážemi dostatek rostlinného materiálu pro navazující experimenty.
Pro testy antimikrobiální aktivity bylo připraveno MS médium se třemi koncentracemi nanočástic výše uvedených typů + kontrola (0, 20, 40 a 60 µg Ag/ml média). Z aktuálně se vyskytujících mikrobiálních kontaminací v *in vitro* kulturách řepky bylo vybráno vizuálně 5 různých, nejčastěji se vyskytujících kolonií. Z každé kolonie byl očkovací kličkou odebrán vzorek a přemístěn do 50 ml NLN vychlazeného média v 250ml Erlenmayerově baňce (byl vytvořen jeden směsný vzorek ze všech pěti kolonií). Suspenze směsného vzorku byla následně homogenizována na orbitální třepačce (300 RPM 10 minut). Regeneranty šlechtitelských materiálů s 3–4 pravými listy byly z regeneračního média sejmuty, jejich spodní část seříznuta a smočena (cca 5 mm) ve směsném vzorku a takto ošetřené regeneranty pasážovány na MS médium s NPs (nebo kontrolu). Byla provedena 3 časová opakování po 100 regenerantech. Po 14 dnech byla vyhodnocena antimikrobiální aktivita a explantáty bez vizuální kontaminace byly pasážovány na čerstvé MS médium bez NPs. Případný opětovný rozvoj kontaminací byl vyhodnocen po dalších 14 dnech kultivace. Analýza rozptylu byla vyhodnocena programem Tibco Statistica 14.

Výsledky

U většiny genotypů, nanočástic a jejich koncentrací došlo k poklesu počtu regenerovaných embryí ve srovnání s kontrolní variantou již při koncentraci NPs 0,5 µg/ml (tabulka 1). Při koncentraci 12 µg/ml již nebyla zaznamenána regenerace embryí u žádné z variant.

Tabulka 1: Embryogenní schopnost materiálů řepky ve srovnání s kontrolou v závislosti na typu a koncentraci nanočástic

Materiál **Koncentrace [µg Ag/ml]**	**typ NPs a frekvence embryogeneze [v %] ke kontrole (= 100 %)** *označuje varianty s významně vyšší hodnotou než kontrola (Tukey HSD test; *P* = 0,05)					
Cadeli	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	51,3	67,5	77,1	133,1*	81,8	134,4*
1,0	32,4	36,6	56,5	66,3	60,3	77,5
3,0	8,2	13,4	12,0	17,8	17,3	29,2
6,0	0,0	0,0	1,2	2,5	2,4	4,6
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Navajo	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	59,9	88,1	94,1	104,7	91,1	112,5*
1,0	46,3	39,9	66,1	81,5	74,4	92,7
3,0	9,4	14,3	17,4	19,3	21,6	34,9
6,0	0,0	0,0	0,7	4,5	6,2	8,3
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6/22	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	77,3	95,4	87,4	101,3	94,9	103,2
1,0	63,3	51,8	67,6	84,6	79,3	98,8
3,0	7,6	11,8	19,4	14,7	18,4	37,0
6,0	0,0	0,0	1,9	7,4	5,3	11,7
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8/22	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	58,4	77,7	89,6	102,8	81,7	101,9
1,0	49,1	34,8	59,3	87,3	66,4	83,2
3,0	6,4	9,9	11,9	11,8	15,0	39,0
6,0	0,0	0,0	0,4	0,9	1,6	9,9
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9/22	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	39,9	56,1	44,9	66,3	49,1	76,3
1,0	19,5	28,4	29,2	37,0	44,1	63,4
3,0	3,9	4,1	11,5	16,3	8,0	19,2
6,0	0,0	0,0	0,8	3,3	2,8	5,2
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10/22	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	66,1	55,9	59,8	64,3	55,1	77,9
1,0	45,1	37,7	45,6	36,9	22,5	58,3
3,0	3,4	9,7	18,6	13,9	12,1	14,5
6,0	0,0	0,0	0,1	4,4	0,9	7,3
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11/22	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	47,2	23,0	46,3	74,6	89,9	98,8
1,0	55,0	9,0	25,4	54,9	39,0	73,5
3,0	6,6	3,5	7,9	7,3	5,1	27,7
6,0	0,0	0,0	0,6	3,4	3,6	8,3
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13/22	AgNP_33	AgNP_34	AgSeNP_10	AgSeNP_11	AgSeNP_12	AgSeNP_13
0,5	39,4	48,9	33,7	55,1	43,9	63,9
1,0	11,8	22,3	25,2	22,6	29,8	37,7
3,0	5,7	1,9	8,7	12,9	4,5	11,1
6,0	0,0	0,0	0,3	1,3	0,8	2,5
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

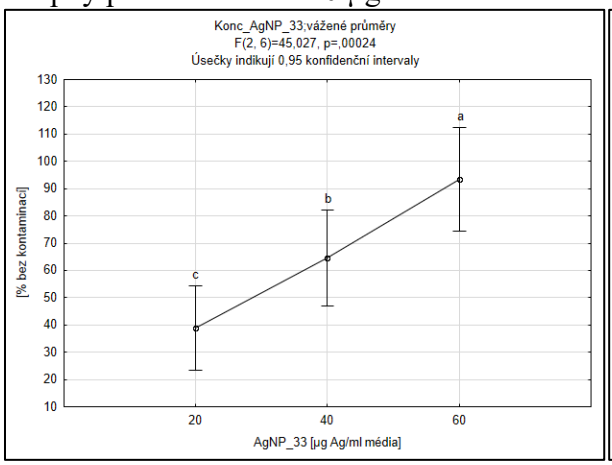
Naopak navýšení počtu embryí oproti kontrole bylo zaznamenáno při koncentraci 0,5 µg/ml u genotypu Navajo, Cadeli, 6/22 a 8/22 u nanočástic AgSeNP_11 (104,7 %, 133,1 %, 101,3 %, 102,8 %) a AgSeNP_13 (112,5 %, 134,4 %, 103,2 %, 101,9 %); statisticky významné toto navýšení bylo pro obě jmenované NPs u genotypu Cadeli a pro AgSeNP_13 u genotypu Navajo. U žádné z variant nebyl pozorován negativní vliv na morfologické charakteristiky embryí.

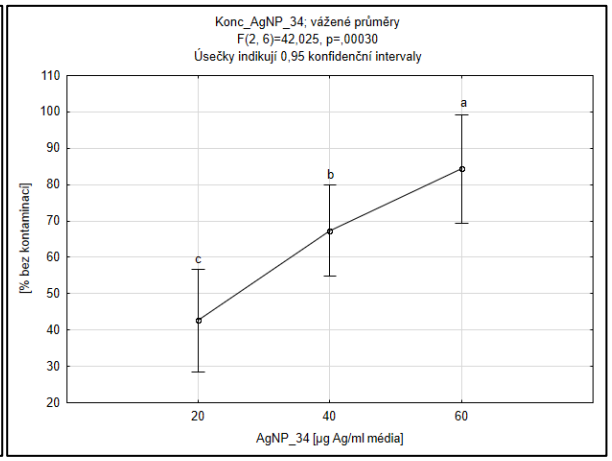
Všechny použité NPs měly významný negativní vliv na frekvenci embryogeneze při

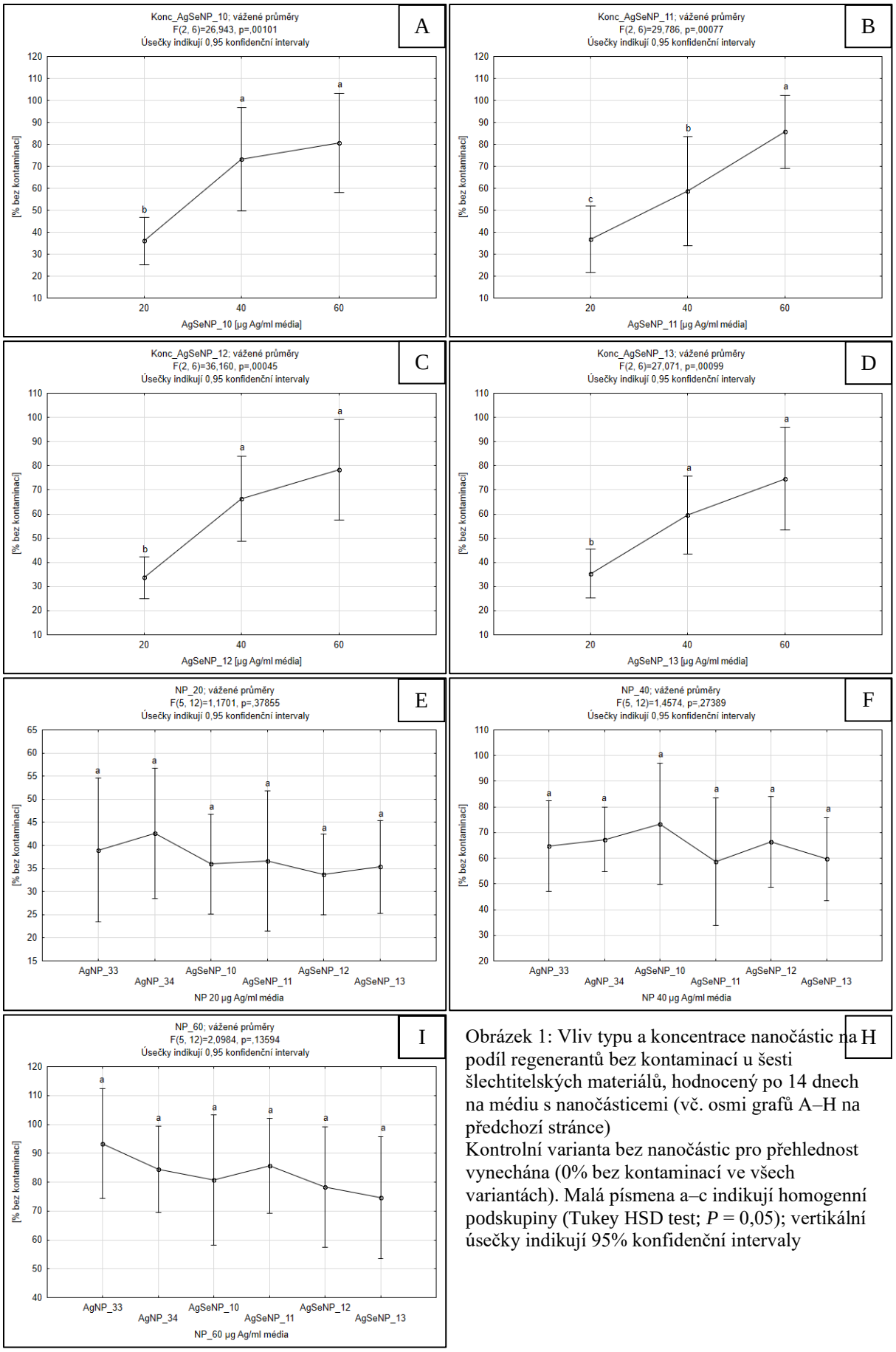
koncentracích 1 µg Ag/ml média a vyšších. Při koncentraci 11 µg/ml nebylo pozorováno dělení buněk a růst embryí u žádné z variant (tabulka 1).
Statisticky významné omezení rozvoje mikrobiální kontaminace ve srovnání s kontrolou bylo zaznamenáno u všech testovaných genotypů a variant NPs již u výchozí koncentrace (20 µg Ag/ml), viz obr. 1A–F. S každým zvýšením koncentrace NPs došlo vždy k významnému poklesu rozvoje mikrobiální kontaminace u AgNP_33 a AgNP_34 (obr. 1A, resp. 1B). Při nejvyšší testované koncentraci (60 µg/ml) byla po 14 dnech kultivace jako nejlepší vyhodnocena AgNP_33 (průměrně 93,3% nekontaminovaných explantátů, rozmezí 74,7–100,0%), viz obr. 1A. Rozdíly mezi NPs při dané koncentraci byly patrné, ale nebyly statisticky významné (obr. 1G–I); Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi genotypy u žádného ze sledovaných parametrů, týkajících se antimikrobiální aktivity, ani nebyl zaznamenán významný negativní nebo pozitivní vliv AgNPs na morfologické a růstové charakteristiky explantátů. Po 14 dnech kultivace na médiu bez NPs nastal opětovný rozvoj kontaminací u všech kombinací variant (genotyp × NPs × koncentrace), které na médiu s NPs nevykazovaly rozvoj kontaminace.

Diskuze

V našich experimentech byl zjištěn stimulační efekt vybraných AgNPs na mikrosporovou embryogenezi u některých genotypů řepky při koncentraci 0,5 µg/ml média, naopak inhibiční efekt byl zaznamenán u všech variant a genotypů při koncentraci 1 µg/ml a vyšší. Mahendran *et al.* (2018) zjistili stimulační efekt AgNPs (koncentrace 0,3, resp. 0,5 µg AgNPs/ml média) v *in vitro* kulturách *Gloriosa superba* na somatickou embryogenezi, resp. vývoj somatických embryí. Kouhi a Lahouti (2018) testovali vliv ZnNPs při koncentracích 10–100 µg/ml média na indukci kalogeneze a regeneraci rostlin z kalusu u hypokotylových segmentů řepky. Koncentrace 10 µg/ml měla stimulační efekt, vyšší koncentrace naopak inhibiční. Pokhrel a Dubey (2013) sledovali vliv AgNPs na klíčení a inhibici růstu kořenového systému u zelí (*Brassica oleracea*). Zjistili, že zatímco u růstu kořenů významnější inhibice (o cca 25 %) nastala až u nejvyšší testované koncentrace, tj. 73,4 µg Ag/ml média, významný vliv na inhibici klíčení (50 % ke kontrole) byl zjištěn již u 0,05 µg Ag/ml média a při koncentraci 1,0 µg klíčivost klesla pod 40 %. Zajímavým zjištěním bylo, že při dalším zvyšování koncentrace (na 3,7–73,4 µg) klíčivost vzrostla na 60 %. Sarabi *et al.* (2015) testovali v *in vitro* kulturách řepky vliv AgNPs na klíčení. Stimulační účinek byl zjištěn od koncentrace 10 µg/ml a stoupal až do koncentrace 100 µg. Naopak nejvyšší inhibice byla zjištěna při 500 µg. Zuverza-Mena *et al.* (2016) naopak nezjistili významný vliv na klíčení *in vitro* u ředkve ani při koncentraci AgNPs 500 µg/ml, došlo ale k inhibici růstu nadzemní části a kořene od koncentrace 125 µg/ml. Tymoszuk (2021) nezjistil u ředkve a kadeřávku vliv na klíčení při koncentracích AgNPs 50 a 100 µg/ml. Tomaszewska-Sowa *et al.* (2018) naopak zjistili stimulační efekt na *in vitro* klíčení u řepky při koncentraci 20 µg/ml.







Obrázek 1: Vliv typu a koncentrace nanočástic na podíl regenerantů bez kontaminací u šesti šlechtitelských materiálů, hodnocený po 14 dnech na médiu s nanočásticemi (vč. osmi grafů A–H na předchozí stránce)
Kontrolní varianta bez nanočástic pro přehlednost vynechána (0% bez kontaminací ve všech variantách). Malá písmena a–c indikují homogenní podskupiny (Tukey HSD test; $P = 0,05$); vertikální úsečky indikují 95% konfidenční intervaly

Co se týče antimikrobiální aktivity, Spinoso-Castillo *et al.* (2017) zjistili významný vliv AgNPs na dekontaminaci v *in vitro* kulturách *Vanilla planifolia* při koncentracích 50–200 µg/ml MS média. V našich experimentech došlo k významnému omezení kontaminací na médiu s AgNPs při koncentraci 60 µg/ml MS média, po repasáži na médium bez AgNPs byl ve všech případech zaznamenán opětovný rozvoj kontaminací. Naopak nebyl zaznamenán negativní ani pozitivní vliv AgNPs na růstové charakteristiky explantátů. Parzymies (2021) na druhou stranu popisuje inhibici a výskyt nekróz v *in vitro* kulturách *Aldrovanda vesiculosa* u koncentrace AgNPs 5 µg/ml MS média.

Závěr

Na základě výsledků je možné konstatovat, že vybrané kombinace a koncentrace AgNPs u některých genotypů řepky mohou stimulovat mikrosporovou embryogenezi v *in vitro* kulturách, u dalších genotypů naopak může docházet k její inhibici. Co se týče antimikrobiální aktivity, v našich experimentech byl zaznamenán významný pozitivní vliv vyšších koncentrací AgNPs na omezení kontaminací v mikrosporových kulturách ozimé řepky. Přestože na médiích bez AgNPs došlo k opětovnému rozvoji kontaminací, tato studie je výchozím informačním zdrojem pro další optimalizace postupu. Aktuální literární údaje u dalších rostlinných druhů naznačují, že lze experimentálně stanovit vhodnou kombinaci koncentrace, typu, doby a způsobu aplikace NPs, která umožní eliminovat mikrobiální kontaminace a zároveň udrží akceptovatelnou úroveň negativních vlivů AgNPs na klíčové růstové charakteristiky v explantátových kulturách.

Literatura

Al Ramadan R., Karas M., Ranušová P., Moravčíková J. 2021: Effect of silver nitrate on *in vitro* regeneration and antioxidant responses of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 10(6): e4494.

Awashra M., Młynarz P. 2023: The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an *in vitro* metabolomic perspective. Nanoscale Adv. Jan 30;5(10): 2674–2723.

Frauen M. 1994: Use of biotechnology in breeding new varieties of winter oilseed rape in Germany. Bui. GCIRC 10: 16–29.

Klíma M., Vyvadilová M., Kučera V. 2004: Production and utilization of doubled haploids in Brassica oleracea vegetables. Hort. Sci. (Prague), 31: 119–123.

Kouhi S. M. M., Lahouti M. 2018: Application of ZnO Nanoparticles for Inducing Callus in Tissue Culture of Rapeseed. International Journal of NanoScience and Nanotechnology 14: 133–141.

Lichter R. 1985: From microspores to rape plants. A tentative way to low glucosinolate strains. In: Sorensen H. (ed.): Advance in the Production and Utilisation of Cruciferous Crops. Martinus Dordecht, Boston, Lancaster, Nijhoff M., Junk W. Publishers, 268–277.

Mahajan S., Kadam J., Dhawal P., Barve S., Kakodkar S. 2022: Application of silver nanoparticles in *in-vitro* plant growth and metabolite production: revisiting its scope and feasibility. Plant Cell Tissue Organ Cult., 150: 15–39.

Mahendran D., Kavi Kishor P.B., Geetha N., Venkatachalam P. 2018: Phycomolecule-coated silver nanoparticles and seaweed extracts induced high-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gloriosa superba* L. J Appl Phycol 30: 1425–1436.

Manh Cuong D., Du Cong P., Tung H.T., Ngan H.T.M., Luan V.Q., Phong T.H., Khai H.D., Phuong T.T.B., Nhut D.T. 2021: Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*–a valuable medicinal plant. Plant Cell Tiss Organ Cult 146: 577–588.

Mano H. a Morisaki H. 2008: Endophytic Bacteria in the Rice Plant. Microbes and Environments, 23: 109-117.

Misra P., Gupta N., Toppo D.D., Pandey V., Mishra M.K., Tuli R. 2010: Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. Plant Cell Tiss Org Cult 100: 189–197.

Panicker B., Thomas P., Janakiram T., Venugopalan R., Narayanappa S.B. 2007: Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum "Arka Swarna" and activation of endophytic bacteria. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 43: 614–622.

Parzymies M. 2021: Nano-silver particles reduce contaminations in tissue culture but decrease regeneration rate and slows down growth and development of *Aldrovanda vesiculosa* Explants. Appl Sci 11: 3653.

Pokhrel L., Dubey B. 2013: Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. Sci Total Environ 452–453: 321–332.

Przybylski R. 2011: Canola/Rapeseed Oil. In: Gunstone F.D. (ed.): Vegetable oils in food technology: Composition, properties, and uses, 2nd edition 107-36. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Salem S.S., Fouda A. 2021: Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. Biol Trace Elem Res 199: 344–370.

Sarabi M., Safipour Afshar A., Mahmoodzadeh H. 2015: Physiological analysis of silver nanoparticles and $AgNO_3$ effect to *Brassica napus* L. J Chem Health Risks 5: 285–294.

Sarkhosh S., Kahrizi D., Darvishi E., Tourang M., Haghighi-Mood S., Vahedi P., Ercisli S. 2022: Effect of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) on Seed Germination Characteristics in

Spinoso-Castillo J.L., Chavez-Santoscoy R.A., Bogdanchikova N., Perez-Sato J.A., Morales-Ramos V., Bello-Bello J.J. 2017: Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks Ex Andrews) using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue Organ Cult 129: 195–207.

Srivastava V., Nerwal D.K., Kandan A., Akhtar J., Sharma N., Kiran R., Bansal S., Agrawal A. 2021: Management of microbial contaminants in the *In Vitro* Gene Bank: a case study of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 57: 152–163.

Thomas P., Kumari S. 2010: Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. Sci Hortic (Amsterdam) 124: 469–474.

Tomaszewska-Sowa M., Pańka D., Lisiecki K., Lemańczyk G. 2024: The Response of Rapeseed (*Brassica napus* L.) Seedlings to Silver and Gold Nanoparticles. Sustainability, 16: 977.

Tomaszewska-Sowa M., Siwik-Ziomek A., Figas A., Bocian K. 2018: Assesment of metal nanoparticle-induced morphological and physiological changes in *in vitro* cultures of rapeseed (*Brassica napus* L.). Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 21(4) DOI:10.30825/5.ejpau.166.2018.21.4, EJPAU 21(4), #07.

Two Brassicaceae Family Species: *Camelina sativa* and *Brassica napus* L. Journal of Nanomaterials, 1–15.

Tymoszuk A. 2021: Silver nanoparticles effects on *in vitro* germination, growth, and biochemical activity of tomato, radish, and kale seedlings. Materials 14: 5340.

Vyvadilová M., Klíma M., Kučera V. 2008: Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé. 1. vyd. Praha: VÚRV, v.v.i. ISBN 978-80-87011-80-5.

Zuverza-Mena N., Armendariz R., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. 2016: Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. Front Plant Sci 7: 90.

Poděkování

Prezentované výsledky byly získány za finanční podpory projektu Ministerstva zemědělství České republiky, projekt MZE NAZV QK22010031

Kontaktní adresa:

Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Telefon 233 022 325, klima@vurv.cz

Odezva vybraných genotypů planých ječmenů (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, *H. marinum*) na sucho a zasolení na základě stanovení morfofyziologických charakteristik a akumulace dehydrinů

Responses of wild barley (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*, *H. marinum*) to drought and salinity: Assessment of selected morphophysiological characteristics and dehydrin relative abundance

Klára Kosová, Pavel Vítámvás, Zdeněk Cit, Ilja Tom Prášil, Zdeněk Nesvadba, Vojtěch Holubec, Jaroslava Ovesná

Odbor genetiky, šlechtění a kvality produkce, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Abstrakt

Plané ječmeny, ječmen přímořský (*Hordeum marinum*) a ječmen (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*), se oproti pěstovaným kultivarům ječmene setého (*H. vulgare* ssp. *vulgare*) vyznačují zvýšenou odolností vůči abiotickým stresům spojeným s buněčnou dehydratací, především suchu a zasolení. V našich experimentech byla testována odezva 18 genotypů *H. spontaneum*, 6 genotypů *H. marinum* a kulturní odrůdy *H. vulgare* Atlas 68 a Tadmor na sucho (30% půdní vodní kapacity) a zasolení (300 mM NaCl) na základě vybraných morfofyziologických charakteristik (hmotnost čerstvé nadzemní biomasy, plocha 2. listu, čerstvá a suchá hmotnost 2. listu, osmotický potenciál, maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm) a relativní akumulace dehydrinových proteinů. Byly zjištěny rozdíly mezi různými druhy ječmenů, např. v případě osmotického potenciálu byly zjištěny významné rozdíly mezi *H. marinum* a *H. vulgare* ssp. *spontaneum* za sucha i zasolení, kdy *H. marinum* měl významně vyšší osmotický potenciál než *H. spontaneum*. Na úrovni relativní akumulace dehydrinů byly mezi jednotlivými druhy ječmenů (*H. vulgare* ssp. *vulgare*, *H. vulgare* ssp. *spontaneum*, *H. marinum*) zjištěny významné kvantitativní i kvalitativní rozdíly projevující se v odlišné poloze vysoko- i nízkomolekulárních dehydrinů YSKn typu na imunoblotech. Sucho i zasolení představovaly větší stres pro *H. vulgare* ssp. *spontaneum* ve srovnání s *H. marinum*, což indikuje nižší dehydratace listových pletiv a nižší míra relativní akumulace dehydrinů v *H. marinum*.

Klíčová slova: sucho; zasolení; *H. marinum*; *H. vulgare* ssp. *spontaneum*; dehydratace; dehydriny

Abstract

Wild barley genotypes of *Hordeum marinum* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* reveal enhanced tolerance to environmental stresses associated with cellular dehydration, namely drought and salinity, with respect to cultivated *Hordeum vulgare*. Eighteen *H. vulgare* ssp. spontaneum genotypes, six *H. marinum* and *H. vulgare* cultivars Atlas68 and Tadmor were grown under reduced watering (30% soil water capacity) or increased salinity (300 mM NaCl) to test their responses. Morphophysiological characteristics including fresh above-ground biomass, fresh weight, dry weight, length and width of 2nd leaf, osmotic potential, chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm, and dehydrin relative abundance were determined in all genotypes under both drought and salinity. Significant differences between barley species were found in both drought- and salt-treated variants when *H. marinum* revealed higher osmotic potential than *H. vulgare* variants indicating enhanced tolerance to dehydration. Dehydrin protein profiles also reveal both quantitative and qualitative differences between *H. marinum* and *H. vulgare*. Both drought and salinity treatments represent a more severe stress for *H. vulgare* including both *H. vulgare* ssp. *vulgare* and ssp. *spontaneum* than for *H. marinum* as indicated by lower leaf dehydration and dehydrin accumulation in *H. marinum*.

Keywords: drought; salinity; *H. marinum; H. vulgare ssp. spontaneum*; dehydration; dehydrins

Úvod

Abiotické stresové faktory spojené s buněčnou dehydratací, zejména sucho a zasolení, představují celosvětově nejvýznamnější stresové faktory limitující růst, vývoj a výnos obilnin. Příbuzné plané druhy kulturních obilnin se obvykle vyznačují zvýšenou odolností vůči environmentálním stresovým faktorům, např. planý ječmen přímořský (*Hordeum marinum*) je halofyt, což znamená, že je schopen dokončit svůj životní cyklus za zvýšené koncentrace soli.

Halofytní rostliny jsou přizpůsobeny zvýšené koncentraci soli nejen díky mechanismům aktivního vylučování iontů z pletiv („ion exclusion“), ale rovněž sekvestrace solných iontů v určitých organelách, např. ve vakuolách („tissue tolerance“; Munns a Tester 2008). V našem experimentu jsme hodnotili odezvu vybraných genotypů planých ječmenů v časné fázi vegetativního vývoje (2. plně vyvinutý list), a to 18 genotypů *H. vulgare* ssp. *spontaneum* a 6 genotypů *H. marinum* byly porovnávány s pěstovanými odrůdami ječmene setého (*H. vulgare*) Atlas 68 a syrskou odrůdou Tadmor. Pro hodnocení odezvy na sucho byly stanoveny vybrané morfofyziologické charakteristiky související s růstem a vývojem rostlin (hmotnost čerstvé nadzemní biomasy, plocha 2. listu), obsahem vody v listových pletivech (poměr čerstvé a suché hmotnosti 2. listu, osmotický potenciál) a fluorescenční parametr zvaný maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm, který lze považovat za nepřímý ukazatel stavu fotosyntetického aparátu (Krause a Weis 1991; Rizza et al. 2011).
Dehydriny z rodiny LEA-II proteinů jsou hydrofilní proteiny definované přítomností minimálně jedné kopie konzervativní lysinem bohaté sekvence, tzv. K-segmentu, proti němuž byla připravena specifická primární protilátka (Close et al. 1993; Kosová et al. 2007). V genomu ječmene (H. vulgare) bylo identifikováno 13 dehydrinových genů, které se liší svými strukturními charakteristikami, resp. počtem konzervativních segmentů Y, S a K (Dhn5 – K9, Dhn8 – SK3, Dhn13 – KS, ostatní YSKn typ) i profilem exprese (Kosová et al. 2014). Na základě předchozích experimentů je známo, že sucho i zasolení indukují v *H. vulgare* akumulaci vysokomolekulárního dehydrinu DHN5 i řady nízkomolekulárních dehydrinů (Kosová et al. 2015; Vítámvás et al. 2015). Odlišné pozice dehydrinů, zahrnující ovšem opět vysokomolekulární i nízkomolekulární proteiny, byly zjištěny v reakci na zasolení u *H. marinum* (Maršálová et al. 2016).
Cílem současné studie je porovnat odezvu na sucho (30% PVK) a zasolení (300 mM NaCl) u souboru 26 genotypů ječmenů zahrnujícího 2 kultivary ječmene setého (*H. vulgare* ssp. *vulgare*) Atlas68 a Tadmor, 18 genotypů *H. vulgare* ssp. *spontaneum* a 6 genotypů ječmen přímořského (*H. marinum*) na základě hodnocení klíčových morfofyziologických charakteristik a relativní akumulace dehydrinových proteinů.

Materiál a metodika

Rostlinný materiál a uspořádání experimentu

Semena 6 genotypů ječmene přímořského (*H. marinum*) pocházející z oblastí Bulharska, Řecka, Íránu, Jordánska, Portugalska a Španělska byla obdržena z Nordic Genetic Resource Center Nordgen (Alnarp, Švédsko). Semena 18 genotypů *H. vulgare ssp. spontaneum* byla získána z genové banky VÚRV, v.v.i. (Praha-Ruzyně, Česko), semena kultivarů Atlas68 a Tadmor byla získána od dr. Holkové, MENDELU (Brno, ČR). Osivo bylo před nakličováním promyto postupně studenou vodou, teplou vodou, 1% dezinfekčním roztokem chlornanu sodného (SAVO) a destilovanou vodou a bylo nakličováno za střídavého působení optimální teploty (20 °C) a chladu (5 °C) celkem po dobu 5 dnů (1 den při 20 °C následovaný 3 dny při 5 °C a 1 dnem při 20 °C), aby byla zajištěna co nejvyšší homogenita klíčení. Pro oba experimenty, tj. s vlivem sucha i zasolení, byly rostliny pěstovány v klimaboxu (typ Tyler T-64, Budapešť, Maďarsko) při teplotě 18 °C, iradianci 350 µmol $m^{-2}s^{-1}$ a dlouhodenním režimu (16 h světlo/ 8 h tma).
Sucho: Naklíčené osivo bylo vyseto po 8 zrnech do květináčů naplněných 200 g zahradnického substrátu B, překryto 60 g substrátu a zalito na 75% půdní vodní kapacity (PVK; zhruba 70 ml vody; výsledná hmotnost květináče zhruba 350 g) jako optimální zálivka. Každý genotyp byl vyset po 8 zrnech do tří květináčů sloužících jako kontrolní varianta a tří květináčů určených pro suchou variantu. Po dobu prvních 10 dnů od výsevu byly obě varianty zalévány gravimetricky na 75% PVK, poté byla u suché varianty zálivka snížena na 35% PVK, po 7 dnech na 35% PVK byly suché varianty ještě 5 dnů před odběrem zálivka zcela vynechána,

čímž došlo ke snížení obsahu vody na zhruba 20% PVK (bylo stanoveno gravimetricky). Kontrolní varianta byla odebírána 15 dnů od výsevu při stálé zálivce na 75% PVK, suchá varianta byla odebírána 22 dnů od výsevu po snížení zálivky z 75% PVK na 35% PVK a následném vyschnutí až na zhruba 20% PVK (Kosová et al. 2020).
Zasolení: Naklíčené osivo bylo vloženo do molitanových lišt, a následně bylo pěstováno v kontinuálně provzdušňovaném 1/3 Hoaglandově roztoku, pH 6,5. Jelikož je *H. marinum* halofyt, bylo i u kontrolních variant do kultivačního roztoku přidáno 0,2 mM NaCl. Po 14 dnech byly odebrány vzorky kontrolních variant. U variant vystavených zasolení bylo po 7 dnech kultivace v kontrolních podmínkách do kultivačního roztoku přidáno 100 mM NaCl a po dalších 7 dnech byla koncentrace soli zvýšena na 300 mM NaCl. Po 7 dnech kultivace v 300 mM NaCl byly odebrány vzorky pro následující analýzy.

Stanovení morfofyziologických charakteristik
Hmotnost čerstvé nadzemní biomasy, čerstvá a suchá hmotnost 2. Listu a u vzorků vystavených zasolení též čerstvá a suchá hmotnost kořenového systému byly stanoveny gravimetricky (analytické váhy Sartorius). Přibližná plocha 2. listu byla stanovena na základě změření délky d a šířky s dle vzorce (d*s)/2). Osmotický potenciál šťávy vymačkané ze zmrazených listů byl stanoven jako osmolarita pomocí osmometru VAPRO Dew Point Osmometer (WESCOR, Utah, USA) a vypočten dle van´t Hoffovy rovnice. Maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm byla stanovena u temnotně adaptovaných listů (30 min. tma) pomocí přenosného fluorometru FluorPen FP100 (PSI, Drásov, ČR).

Stanovení relativní akumulace dehydrinových proteinů
Dehydriny byly extrahovány ze zmražených odnožovacích uzlů dle Vítámváse et al. (2015), tj. přidáním 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 s rozpuštěnou tabletou inhibitoru proteáz (Roche), které byly rozetřeny ve vychlazených třecích miskách za přídavku kapalného dusíku. Poté byly extrakty centrifugovány (14000 g, 4 °C, 20 min.), zahřáty ve vodní lázni (95 °C, 10 min.), opět centrifugovány (14000 g, 4 °C, 20 min.) a následně vysráženy acetonem s 1% merkaptoetanolem, promyty čistým acetonem, vysušeny, rozpuštěny v Laemmli pufru a následně naneseny na 12,5% SDS-PAGE gel. Vzorky byly rozděleny při 10 mA (svrchní gel) a 25 mA (spodní gel) a následně přeneseny pomocí systému tzv. semi-dry blot na nitrocelulosovou membránu. Po skončení přenosu (blotování) byly membrány s přenesenými vzorky byly inkubovány v 4,5% (m/v) sušeném mléku v 100 mM Tris-buffered saline (TBS) pH 8, inkubovány s primární anti-dehydrinovou protilátkou ve zředění 1:1000 (Enzo, Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) rozpuštěnou v 1,5% sušeném mléku s 0,05% (v/v) Tween-20 (TTBS), promyty TTBS, inkubovány v TTBS se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou ve zředění 1:3000 a nakonec kolorimetricky vizualizovány pomocí NBT/BCIP (Bio-Rad). Membrány s dehydriny byly oskenovány pomocí denzitometru GS-800 (Bio-Rad) a analyzovány pomocí softwaru Quantity One v. 4.6.2 (Bio-Rad). Relativní molekulová hmotnost dehydrinů byla vypočtena na základě molekulového markeru (Bio-Rad).

Statistické hodnocení dat
Data vztahující se k jednotlivým charakteristikám (minimálně 4 biologická opakování; n=4) byla hodnocena pomocí analýzy variance (ANOVA) a signifikantní rozdíly na hladině významnosti 0,05 byly stanoveny pomocí Duncanova testu rozpětí (DMRT0.05) za použití softwaru STATISTICA 13 (TIBCO, Velká Británie).

Výsledky a diskuse
Byly hodnoceny morfofyziologické charakteristiky spojené s růstem a vývojem rostlin (hmotnost čerstvé nadzemní biomasy, plocha 2. listu), obsahem vody v listových pletivech

(poměr suché a čerstvé hmotnosti listu, osmotický potenciál), aktivitou fotosyntetického aparátu (fluorescenční parametr Fv/Fm) a relativní akumulací dehydrinových proteinů. Jelikož se absolutní hodnoty růstových charakteristik (hmotnost čerstvé nadzemní biomasy, čerstvá a suchá hmotnost listů, listová plocha) u jednotlivých druhů ječmenů významně lišily, byly pro hodnocení použity jejich poměrné hodnoty ukazující změny mezi kontrolní a suchou, resp. zasolenou variantou.

Hodnocení stresu sucha ukázalo významné rozdíly mezi genotypy *H. marinum* a *H. vulgare* ssp. *spontaneum* týkající se charakteristik spojených s obsahem vody v listových pletivech, tj. poměru suché a čerstvé hmotnosti listů (DW/FW) a osmotického potenciálu (OP). Kontrolní varianty *H. marinum* ve srovnání s *H. spontaneum* vykazují relativně vyšší dehydrataci (vyšší poměr DW/FW a OP), avšak suché varianty *H. marinum* ve srovnání s *H. spontaneum* naopak měly významně nižší hodnoty (DW/FW), resp. významně vyšší OP indikující nižší buněčnou dehydrataci suchých variant *H. marinum* ve srovnání s *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (Tabulka 1).

V případě zasolení byly u kontrolních i stresovaných variant zjištěny významné rozdíly mezi osmotickým potenciálem kořenů a 2. listu indikující vyšší míru dehydratace listů oproti kořenům. U halofytního ječmene *H. marinum* vedlo zasolení k významnému nárůstu hmotnosti čerstvé biomasy kořenů oproti hmotnosti čerstvé biomasy prýtu u stresovaných rostlin ve srovnání s kontrolou, zatímco u *H. vulgare* a *H. spontaneum* nebyl nárůst poměru hmotnosti čerstvé biomasy kořene oproti biomase prýtu při zasolení ve srovnání s kontrolou významný (Tabulka 2).

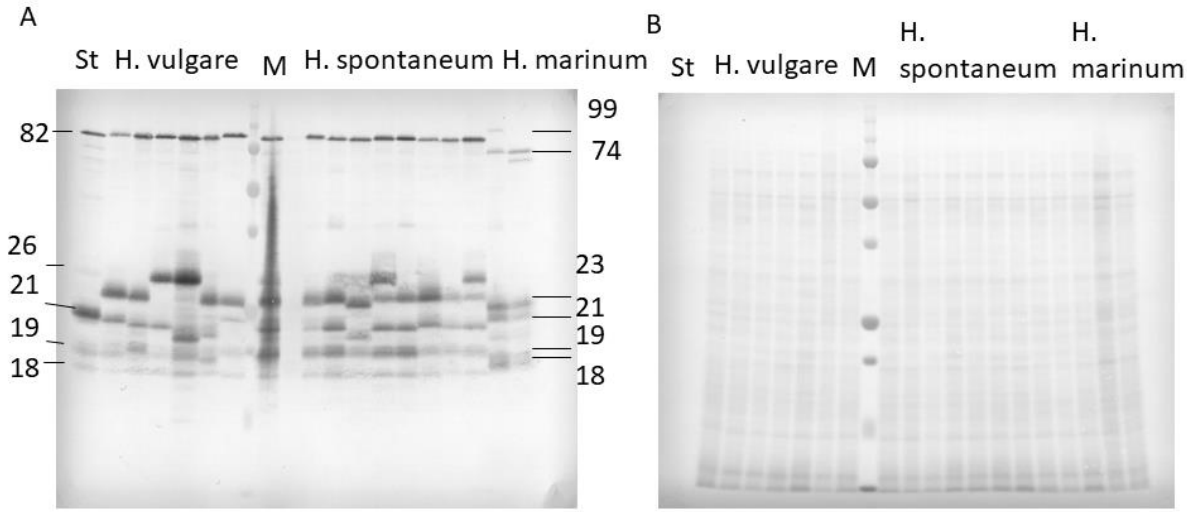
Byly zjištěny významné kvalitativní i kvantitativní rozdíly v akumulaci dehydrinů mezi genotypy *H. marinum* a *H. spontaneum* za obou stresů, přičemž *H. marinum* vykazoval za sucha i zasolení významně nižší relativní akumulaci sumy všech detekovaných dehydrinů oproti *H. spontaneum* (Obr. 1). Lišilo se rovněž spektrum detekovaných dehydrinových bandů, a to vysoko- i nízkomolekulárních dehydrinů. Oproti jednomu proužku odpovídajícímu DHN5 (K9; MW 82 kD) u *H. spontaneum* byly u *H. marinum* detekovány dva výrazně slabší proužky odpovídající MW 99 a 74 kD. Odlišné jsou rovněž pozice odpovídající nízkomolekulárním dehydrinům YxSKn typu, které u *H. spontaneum* odpovídají molekulovým hmotnostem 28, 21, 19 a 18 kD, zatímco u *H. marinum* molekulovým hmotnostem 23, 21, 20, 19 a 18 kD, což odpovídá našim předchozím výsledkům (Kosová et al. 2014; Maršálová et al. 2016).

Tabulka 1. Fluorescence chlorofylu maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm, suma relativních denzit dehydrinových proteinů v odnožovacích uzlech vystavených stresu, poměr suché a čerstvé hmotnosti (DW/FW) prýtu, osmotický potenciál 2. listu, redukce čerstvé nadzemní biomasy (S/C)*100(%) a redukce listové plochy za sucha oproti kontrole (S/C)*100(%) u *H. vulgare, H. vulgare* ssp. *spontaneum* a *H. marinum*. Data představují průměr minimálně ze 3 biologických opakování, odlišná písmena značí významné rozdíly na hladině 0,05 stanovené pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), Duncanova testu rozpětí. C- kontrola; S – sucho.

Genotyp	Fv/Fm	Suma dehydrin (odnož. uzel)	(DW/FW)*100 (%)	OP (MPa)	Redukce biomasy (%)	Redukce list. plochy (%)
H. marinum	0,613 c (C) 0,602 c (S)	0,239 a	18,32 b (C) 18,48 b (S)	-1,329 a (C) -1,998 b (S)	50,5 b	48 a
H. spontaneum	0,625 c (C) 0,699 b (S)	1,456 e	12,358 a (C) 32,58 c (S)	-1,092 a (C) -4,262 c (S)	34,2 a	69,9 b
H. vulgare	0,763 ab (C) 0,754 ab (S)	1,529 e	11,94 a (C) 35,63 c (S)	-1,027 a (C) -4,5568 c (S)	30,79 a	71,3 b

Tabulka 2. Fluorescence chlorofylu maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm, suma relativních denzit dehydrinových proteinů v odnožovacích uzlech vystavených stresu, poměr suché a čerstvé hmotnosti (DW/FW) prýtu a kořene, osmotický potenciál 2. listu a kořene, a redukce čerstvé nadzemní biomasy (S/C)*100(%) u *H. vulgare, H. vulgare* ssp. *spontaneum* a *H. marinum* vystavených zvýšené koncentraci soli (300 mM NaCl). Data představují průměr minimálně ze 3 biologických opakování, odlišná písmena značí významné rozdíly na hladině 0,05 stanovené pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), Duncanova testu rozpětí. C- kontrola; Z – zasolení; K – kořen; L – list.

Genotyp	Fv/Fm	Suma dehydrin (odnož. uzel)	(DW/FW)*100 (%)	OP (MPa)	Čerstvá biomasa (kořen/prýt)
H. marinum	0,589 c (C) 0,743 ab (Z)	0,684 bc	9,917 b (CK) 11,646 c (CL) 10,47 bc (ZK) 17,52 e (ZL)	-0,783 a (CK) -1,388 b (CL) -2,025 c (ZK) -3,113 f (ZL)	0,526 bc (C) 0,66 d (Z)
H. spontaneum	0,748 ab (C) 0,743 ab (Z)	0,92 d	7,129 a (CK) 11,62 c (CL) 11,16 bc (ZK) 18,33 e (ZL)	-0,635 a (CK) -1,406 b (CL) -2,272 cd (ZK) -3,704 g (ZL)	0,44 ab (C) 0,373 a (Z)
H. vulgare	0,793 a (C) 0,758 ab (Z)	0,77 bcd	6,258 a (CK) 10,01 b (CL) 9,95 b (ZK) 15,163 d (ZL)	-0,778 a (CK) -1,317 b (CL) -2,093 c (ZK) -2,77 e (ZL)	0,49 bc (C) 0,61 cd (Z)



Obrázek 1. Reprezentativní imunoblot (A) a reprezentativní Coomassie gel (B) ukazující spektrum dehydrinových proteinů detekovaných u vzorků odnožovacích uzlů *H. marinum, H. vulgare* ssp. *spontaneum* a *H. vulgare* ssp. *vulgare* vystavených zvýšené koncentraci soli 300 mM NaCl. Molekulové hmotnosti detekovaných dehydrinů byly stanoveny pomocí softwaru QuantityOne v. 4.6.2 na základě polohy molekulového markeru (M; Bio-Rad) a jsou uvedeny v kDa.

Celkově lze shrnout, že *H. marinum* je významně odolnější vůči stresu oproti *H. vulgare* ssp. *vulgare* a *H. vulgare* ssp. *spontaneum* – např. redukce list. plochy za sucha oproti kontrole dosáhla u *H. marinum* 48%, zatímco u *H. spontaneum* 69,9% a *H. vulgare* 71,3%. Naopak redukce čerstvé nadzemní biomasy za sucha oproti kontrole byla největší u *H. marinum* (50,5%) ve srovnání s genotypy *H. vulgare* a *H. spontaneum*, které vykazovaly průměrnou redukci čerstvé nadzemní biomasy 30,79%, resp. 34,2%.
Zvýšená koncentrace soli 300 mM NaCl vedla u *H. marinum* k významnému nárůstu poměru čerstvé biomasy kořene vůči prýtu (poměr čerstvá biomasa kořen/prýt 0,66) ve srovnání s kontrolními podmínkami (poměr čerstvá biomasa kořen/prýt 0,526), obdobně tomu bylo i u *H. vulgare* ssp. *vulgare*, zatímco u *H. vulgare* ssp. *spontaneum* byl nárůst poměru čerstvé biomasy kořene vůči prýtu za podmínek zasolení ve srovnání s kontrolními podmínkami nevýznamný (Tabulka 2).

Závěr

Genotypy *H. marinum* vykazují ve srovnání s *H. spontaneum* vyšší odolnost vůči suchu i zasolení, což je indikováno významně vyšším OP a nižšími hodnotami poměru suché a čerstvé hmotnosti (DW/FW) u *H. marinum* indikující nižší buněčnou dehydrataci suchých variant *H. marinum* ve srovnání s *H. vulgare* ssp. *spontaneum*. U halofytního ječmene *H. marinum* vedlo zasolení k významnému nárůstu hmotnosti čerstvé biomasy kořenů oproti hmotnosti čerstvé biomasy prýtu u stresovaných rostlin ve srovnání s kontrolou, zatímco u *H. vulgare* a *H. spontaneum* nebyl nárůst poměru hmotnosti čerstvé biomasy kořene oproti biomase prýtu při zasolení ve srovnání s kontrolou významný.
Genotypy *H. marinum* rovněž ve srovnání s *H. vulgare* ssp. *vulgare* a *H. vulgare* ssp. *spontaneum* vykazovaly za obou stresů významně nižší relativní akumulaci sumy všech detekovaných dehydrinů, což ukazuje, že dané podmínky (35% PVK anebo 300 mM NaCl) představovaly větší stres pro *H. vulgare* ssp. *vulgare* a *H. vulgare* ssp. *spontaneum* ve srovnání s *H. marinum*.

Poděkování
Publikace byla podpořena projektem Ministerstva zemědělství ČR QK1910197 a institucionálním projektem MZe RO0423.

Literatura

Close TJ, Fenton RD, Moonan F. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. Plant Mol Biol 1993;23:279–86.

Krause, G.H., Weis, E., 1991: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313–349.

Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T. 2007. The role of dehydrins in plant response to cold. Biol. Plant. 51: 601-617.

Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T., 2014. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity – what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? Front. Plant Sci. 5: 343.

Kosová K., Vítámvás P., Hlaváčková I., Urban M.O., Vlasáková E., Prášil I.T. 2015. Responses of two barley cultivars differing in their salt tolerance to moderate and high salinities and subsequent recovery. Biol. Plant. 59: 106-114.

Kosová K., Vítámvás P., Ovesná J., Nesvadba Z., Prášil I.T. 2020. Hodnocení odolnosti souboru jarních ječmenů (*Hordeum vulgare* L.) vůči suchu. Úroda 12: 107-114.

Maršálová L., Vítámvás P., Hynek R., Prášil I.T. Kosová K. 2016. Proteomic response of *Hordeum vulgare* cv. Tadmor and *Hordeum marinum* to salinity stress: Similarities and differences between a glycophyte and a halophyte. Front. Plant Sci. 7: 1154.

Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59, 651–681.

Rizza, F., Pagani, D., Gut, M., Prášil, I.T., Lago, C., Tondelli, A., et al., 2011: Diversity in the response to low temperature in representative barley genotypes cultivated in Europe. *Crop Sci.* 51: 2759–2779.

Vítámvás P., Urban M.O., Škodáček Z., Kosová K., Pitelková I., Vítámvás J., Renaut J., Prášil I.T. 2015. Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown under different drought conditions. Front. Plant Sci. 6: 479.

Kontaktní adresa:
RNDr. Klára Kosová, Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507/73
16106 Praha 6 – Ruzyně, Česká republika
Tel: +420 702087742

Využití molekulárních markerů pro šlechtění hrachu setého (*Pisum sativum* L.) na odolnost vůči PEMV

The use of molecular markers for pea (*Pisum sativum* L.) breeding for resistance to PEMV

Ludvíková M., Dostálová R., Griga M.

Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 16, 78701 Šumperk

Abstrakt

Pea enation mosaic virus (PEMV) způsobuje výrůstkovou mozaiku hrachu. Jedná se o jednu z nejzávažnějších viróz hrachu, která může způsobit výrazné snížení výnosu. Na základě hodnocení 564 genotypů polního a dřeňového hrachu prostřednictvím DArTseq sekvenování knihoven DNA s redukovanou komplexitou a následné asociační analýzy (GWAS) byly identifikovány SNP (Single-Nucleotide Polymorfisms; jednonukleotidový polymorfismus) markery spojené mimo jiných znaků také s odolností vůči PEMV. SNP markery spojené s odolností vůči PEMV byly převedeny na markery ve formátu CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; štěpené amplifikované polymorfní sekvence) vhodné pro selekci a šlechtění. Tato práce popisuje jejich využití jako účinný nástroj pro zpřesnění, zrychlení a finanční zefektivnění procesu selekce a tvorbu kvalitativně nových a konkurenceschopných odrůd hrachu.

Klíčová slova: hrách, *Pisum sativum*, SNP, CAPS markery, genomická selekce

Abstract

Pea enation mosaic virus (PEMV) causes pea enation mosaic disease. This is one of the most serious pea viruses, which can cause a significant reduction in yield. Based on the evaluation of 564 field and garden pea genotypes through DArTseq sequencing of reduced-complexity DNA libraries and subsequent association analysis (GWAS), SNP (Single-Nucleotide Polymorphisms) markers associated with agronomic traits were identified. The SNP markers associated with resistance to PEMV were converted to CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markers suitable for selection and breeding. This work describes their use as an effective tool for the refinement, acceleration and financial efficiency of the selection process and the creation of qualitatively new and competitive pea varieties.

Key words: pea, *Pisum sativum*, SNP, CAPS markers, genomic selection

Úvod

Hrách patří mezi nejrozšířenější druhy luskovin, pěstuje se v celém mírném pásmu převážně jako jarní plodina pro lidskou výživu a krmivo pro hospodářská zvířata. Je pěstován především pro semena. Ta mají vysoký obsah bílkovin (21–24 % hrubých bílkovin), který je asi 2 x vyšší než u obilovin. Skladba aminokyselin je rovněž příznivější než u obilovin, neboť má více nepostradatelných (sirných) aminokyselin, vyšší obsah vitaminů i minerálních látek.

Virózy na luskovinách se mohou projevovat zakrslostí, snížením výnosu a zhoršením kvality semen, a zároveň i zvýšením náchylnosti rostlin k napadení jinými patogeny. Na luskovinách nejvíce škodí viry rodu *Potyvirus*, čeledi *Potyviridae* (virus semenem přenosné mozaiky hrachu, virus žluté mozaiky fazolu, virus obecné mozaiky fazolu a virus mozaiky sóje) a rodu *Enamovirus*, čeledi *Solemoviridae* (virus výrůstkové mozaiky hrachu). Viry se často na rostlinách vyskytují ve směsných infekcích (Víchová, 2024).

Virus výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV – *Pea enation mosaic virus*) je celosvětově označován za nejnebezpečnější a ekonomicky nejzávažnější chorobu hrachu. Je přenosný mšicemi (např. kyjatkou hrachovou - *Acyrthosiphon pisum*), k přenosu dochází již po krátké době sání. Dobře se přenáší i mechanicky. Přežívá na jetelovinách nebo vikvích (Víchová, 2024). Příznaky napadení (Obr. 1 a 2) se projevují zesvětlením žilek, průhlednými chlorotickými skvrnami a na spodní straně listů tvorbou výrůstků (enací). Mezi typické a nezaměnitelné projevy na rostlinách hrachu, kromě výrůstků, patří i mozaika přecházející v typické „dvůrky“. Později vznikají deformace lusků, snižuje se HTS (Hull, 1981). Může

docházet ke zkrácení internodií a zakrslosti vegetačního vrcholu. Typické příznaky se vyskytují při teplotách kolem 22 °C, při vyšší teplotě může docházet k maskování příznaků.

Obr. 1 a 2: Příznaky napadení PEMV

Dědičnost rezistence proti viróze PEMV zajišťuje dominantní gen *En* (Schroeder a Barton, 1959), dle literatury lokalizovaný ve třetí vazebné skupině LGIII (Marx et al., 1985; Yu et al., 1995, Randhawa a Weeden, 2009). Virus může způsobovat významné výnosové ztráty od 10 až do 100 % (Hull, 1981; Jain et al., 2013).

Prakticky veškeré odrůdy polního a dřeňového hrachu v dosavadní historii šlechtění této plodiny byly vytvořeny dvěma klasickými postupy, (1) dřívější hybridizací rodičovských genotypů a (2) pozdější mutagenezí (chemomutageneze a radiomutageneze; cca od 50. let minulého století; Blixt, 1972; Jaranowski, 1976) většinou následovanou pozitivním výběrem v rámci různých šlechtitelských schémat. Celý proces byl značně zdlouhavý náročný na pěstební plochy, práci a finance.

Polymorfismy nukleových kyselin se vyznačují přítomností variabilních pozic v DNA, v nichž se vyskytují dvě nebo více variant alel, které jsou v populaci zastoupeny v určité frekvenci. Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) označuje variabilní stav pouze v jediném nukleotidu na konkrétním místě v genomu. SNP se mohou vyskytovat napříč celým genomem. V kódujících nebo regulačních sekvencích DNA mohou ovlivnit výsledný fenotyp daného jedince, avšak jejich častější výskyt je zaznamenán v nekódujících oblastech DNA, kde však mohou být ve vazbě s geny ovlivňujícími fenotypový projev zkoumaného znaku. Genetický marker je detekovatelný gen nebo variabilní sekvence DNA, u které je známo její umístění na chromozomu nebo kontigu. Lze je rozdělit na markery fenotypové, jejichž projevem je pozorovatelný rozdíl ve fenotypovém projevu alel, biochemické, u nichž je možno detekovat vznik rozdílných proteinových produktů (izoenzymů), a DNA markery, které se liší na úrovni sekvencí nukleotidů. Mezi posledně jmenované patří markery založené na délkovém polymorfismu fragmentů DNA vzniklých restrikčním štěpením (RFLP), analýza polymorfních segmentů DNA založená na PCR a celogenomové markery založené na sekvenaci DNA, ke kterým se řadí i detekce a analýza SNP.

Prudký rozvoj molekulární genetiky, funkční genomiky a vysoce výkonného celogenomového sekvenování (DArtSeq) umožňuje v ideálním případě přímo identifikaci a lokalizaci genů na jednotlivých chromozomech v rámci vazebných skupin, respektive molekulárních DNA markerů s předmětnými geny těsně svázaných. Tomu musí předcházet detailní fenotypování, tedy popis vybraných kvalitativních či kvantitativních znaků dle klasifikátoru dané plodiny a jejich přiřazení k datům genotypovým nástroji bioinformatiky (GWAS analýza). Kombinace metod molekulární genetiky (včetně recentního „přečtení“ kompletního genomu hrachu) a bioinformatiky dává šlechtitelům hrachu k dispozici účinný nástroj pro zpřesnění, zrychlení a finanční zefektivnění procesu selekce a tvorbu kvalitativně nových a konkurenceschopných

odrůd hrachu (Dostálová et al., 2020; Ludvíková et al., 2022).
Jako alternativa k využití molekulárních markerů k vyhledávání zdrojů rezistence byly v minulosti ve firmě Agritec jako výsledek experimentů s genetickými modifikacemi hrachu za pomoci konstruktů na bázi fragmentů obalového proteinu virů výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV) a svinování listů hrachu (Pisum Seed-borne Mosaic Virus - PSbMV) vytvořeny linie hrachu se zvýšenou odolností ke zmíněným virovým patogenům (Švábová a Griga, 2009).

Metodika
Za účelem identifikace DNA markerů spojených s agronomickými znaky (délka rostliny, počet větví, typ olistění, tvar a barva semene, počet a hmotnost semen, HTS, odolnost vůči padlí a PEMV a kvalitativními znaky semen (obsah N-látek a škrobu) byla provedena asociační analýza (GWAS) u hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Výběr 564 genotypů byl proveden tak, aby pokrýval genetickou diverzitu druhu a zároveň obsahoval šlechtitelský materiál selektovaný ve vybraných znacích.
Pro zjištění SNP variant byla použita metoda DArTseq analýzy sekvenování knihoven DNA s redukovanou komplexitou. Výsledky byly bioinformaticky zpracovány, přičemž detekovány byly zejména jednonukleotidové polymorfismy napříč celým genomem. Výsledky celogenomového genotypování byly následně propojeny s pozorovanými fenotypovými daty při celogenomové asociační studii (GWAS), jejímž výsledkem byla identifikace konkrétních SNP markerů asociovaných s danými fenotypovými projevy.
Asociační analýzou byla získána sada 376 SNP markerů spojených s výše uvedenými vlastnostmi, jejichž pozice na jednotlivých chromozomech byla určena na základě referenční sekvence hrachu. Pro detekci SNP je uvedena 69 bp dlouhá sekvence přiléhající k asociovaným SNP. Na základě vhodnosti využití pro metodu CAPS byly vybrány 3 markery spojené s odolností k PEMV (jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2). Na základě referenční sekvence (https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum/Pea-Genome-project) byly navrženy primery pro amplifikaci dané oblasti a dle kontrétních SNP markerů vybrány restrikční enzymy umožňující snadné testování přítomnosti referenční/alternativní alely.

Pro detekci mutací byla nejprve izolována DNA z rostlinného materiálu. Listy rostlin byly homogenizovány v kapalném dusíku a pomocí Isolate II Genomic DNA Kit (Bioline Meridian Bioscience) z nich byla izolována genomová DNA dle protokolu výrobce. DNA získaná z přibližně 100 mg materiálu byla rozpuštěna ve 200 µl elučního pufru a zamražena.
Vyizolováná DNA byla použita pro PCR amplifikaci a restrikční reakci s použitím odpovídajícího restrikčního enzymu (tabulka 3). Složení reakční směsi pro PCR bylo: 20–50 ng DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 µM každého nukleotidu, 0,4 µM každého primeru a 1 U Dream Taq polymerázy (Thermo Scientific). Produkty PCR reakce byly rozděleny na 1,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem, nasvíceny UV světlem a nasnímány. Teplotní profil PCR reakcí u markerů 74, 76, 78 a 81 byl 94 °C /10 min + 35x (94 °C /30 s, 55 °C /30 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /5 min. Pro PCR reakci u markeru 83 byl použit teplotní profil 94 °C /4 min + 35x (94 °C /30 s, 65 °C /30 min, 72 °C /40 s) se závěrečnou elongací 72 °C /10 min. 10 µl vzorku po PCR reakci bylo pro kontrolu naneseno na agarózový gel. Zbylých 5 µl bylo štěpeno pomocí příslušného restrikčního enzymu a rovněž naneseno na gel. Délky fragmentů po restrikci spolu s odpovídajícím genotypem (S-senzitivní, R-rezistentní) jsou uvedeny v tabulce 2.
Současně s ostatními PCR analýzami byla provedena také PCR detekce rezistence/ senzitivity vůči PEMV na základě délkového polymorfismu prostřednictvím metodiky dle publikace Jain et al. (2013).
Celkem bylo PCR analýzami v roce 2024 testováno 82 vzorků (genotypů) hrachu. První odběry

(34 vzorků) byly provedeny ve skleníku, kde byly kultivovány registrované odrůdy polního hrachu ze seznamu doporučených odrůd a šlechtitelské firemní linie. Druhý odběr (48 vzorků) byl proveden v polních podmínkách ze screeningového pokusu s odrůdami a liniemi hrachu z národních a evropských šlechtitelských organizací (Agritec, Selgen, KWS, LAMMC a CPSBB).

Tab. 1: SNP markery spojené s odolností vůči PEMV použité pro tvorbu CAPS markerů

Pořadí SNP	SNP ID	Chromozom	Alely (referenční/ alternativní)	Pozice SNP	Přilehlá sekvence
78.	3541931|F|0-16:G>A-16:G>A	1	G/A	16	TGCAGGATTGTATACTGATCCTTTCCTTGTATAATTTACAGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCC
81.	3549708|F|0-34:T>C-34:T>C	1	T/C	34	TGCAGCACCGACACCTATGAAAAATGTGTGTCCGTGTAAATGTCTGAAAGTGACACCGAAGTTTGTGAT
83.	19221983|F|0-23:C>T-23:C>T	1	C/T	23	TGCAGATACATTGCTTCAATGCACGCGGTACTTATTTATTTTGCTTCAAATTTTTTGCCCTTGCATTCT

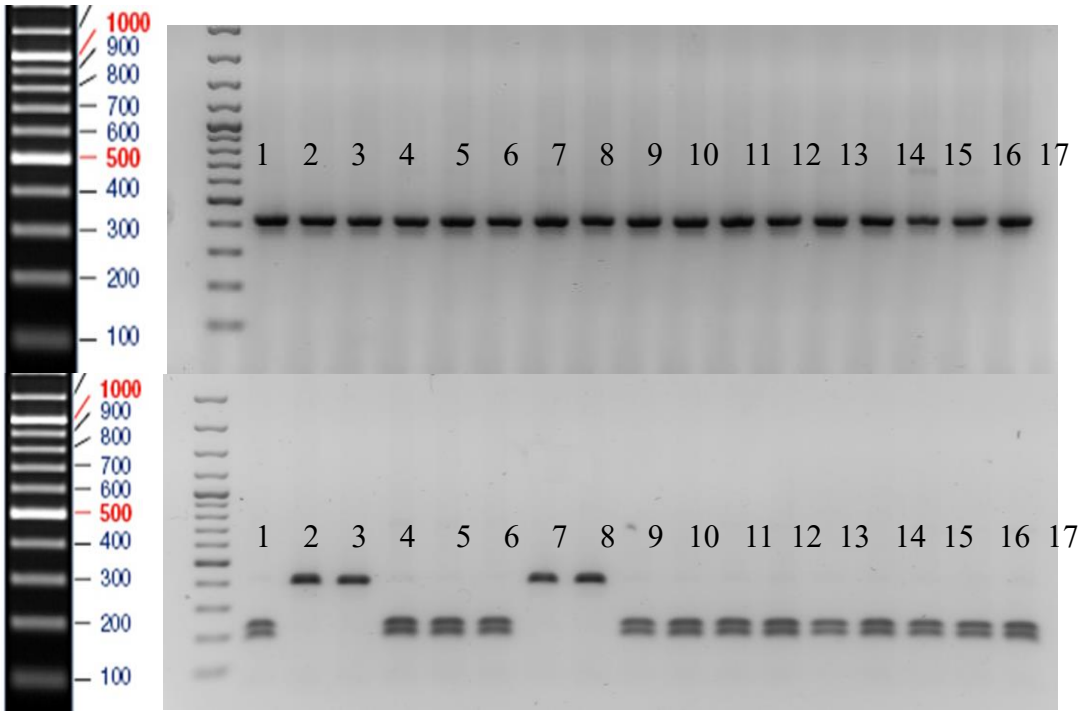
Tab. 2: Primery a restriktázy pro testování jednotlivých SNP/CAPS markerů (genotypy: S-senzitivní, R- rezistentní)

SNP	**Primery pro PCR**	**PCR produkt (bp)**	**Použitá restrikční endonukleáza**	**Fragmenty po restrikci (bp)**	**Genotyp na základě restrikce**
78.	F: CCTCTGCTCACACTTTCAACA R: CAGAAACTGGTGTAGGTAGATCA	422	*Mbo*I	206 a 216	R
				422	S
81.	F: AGTGGTTGAGCTAAGGTTTTGA R: ATCTCTGAAGCACGGACACT	409	*Bst*UI (*Bsh*1236I)	114 a 296	R
				409	S
83.	F: GGATAATCTTCCGCAACCCA R: GACAGCACTGAACCTCAACA	483	*Hin*1II (*NIa*III)	158, 222 a 103	R
				158 a 325	S

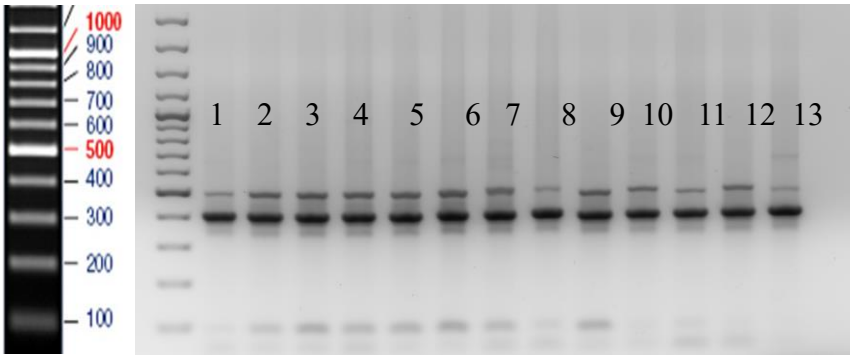
Výsledky a diskuze

Na základě hodnocení souboru genotypů polního a dřeňového hrachu prostřednictvím asociační analýzy (GWAS) a DArTseq analýzy byly identifikovány SNP markery spojené s agronomickými znaky a kvalitativními znaky semen. Pro detekci SNP byla v užitném vzoru (viz zdroje) uvedena 69 bp dlouhá sekvence přiléhající k asociovaným SNP. S využitím této přilehlé sekvence byly na základě referenční sekvence (https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum/Pea-Genome-project) navrženy primery pro amplifikaci dané oblasti. Pro detekci odolnosti vůči PEMV byly vybrány 3 SNP markery, u kterých je možné detekovat přítomnost referenční/alternativní alely na základě použití restrikčního enzymu.

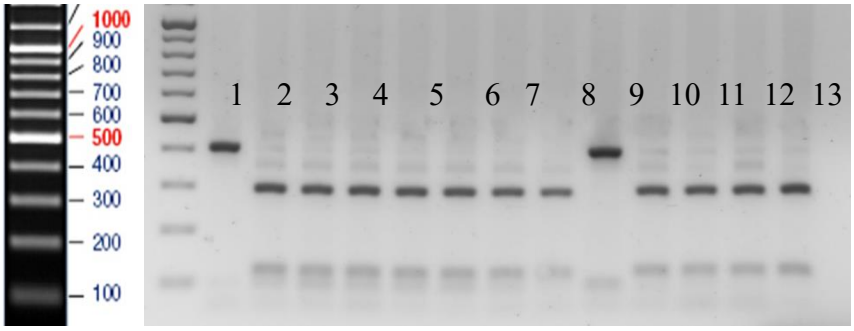
Výsledky amplifikace a restikce pro jednotlivé markery jsou uvedeny na obrázcích 3 až 8. U všech markerů se podařilo pomocí PCR naamplikovat fragment o očekávané délce. Při následných restrikcích byla u všech markerů v souboru patrná variabilita ve výskytu alel. Současně s ostatními PCR analýzami byla provedena také PCR detekce rezistence/ senzitivity vůči PEMV prostřednictvím metodiky dle publikace Jain et al., 2013 (obr. 9).



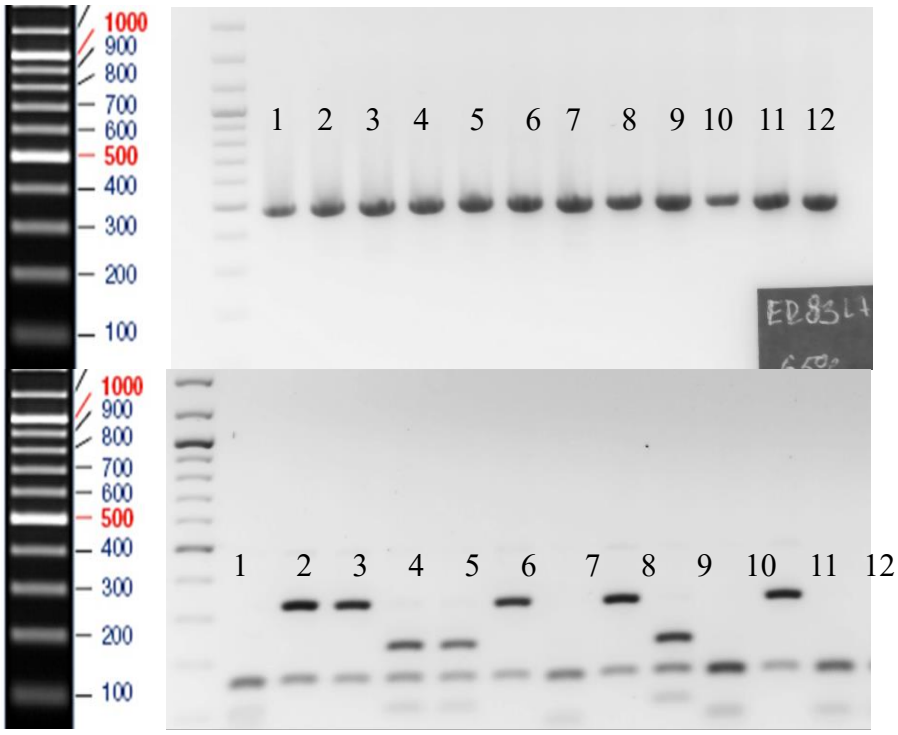
Nahoře Obr. 3: Výsledek PCR amplifikace pro marker 78 (odolnost k PEMV). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 17. amplifikované vzorky (422 bp)
Dole Obr. 4: Výsledek restrikční analýzy pro marker 78. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 17. amplifikované vzorky po restrikci (206 a 216/ 422 bp)



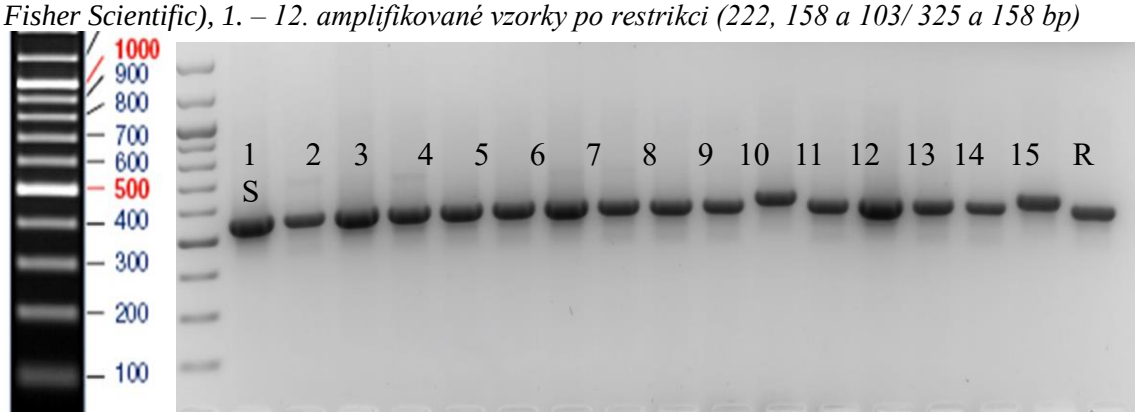
Obr. 5: Výsledek PCR amplifikace pro marker 81 (odolnost k PEMV). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 13. amplifikované vzorky (409 bp)



Obr. 6: Výsledek restrikční analýzy pro marker 81. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 13. amplifikované vzorky po restrikci (296 a 114/ 409 bp)



Nahoře Obr. 7: Výsledek PCR amplifikace pro marker 83 (odolnost k PEMV). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. amplifikované vzorky (483 bp)
Dole Obr. 8: Výsledek restrikční analýzy pro marker 83. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. amplifikované vzorky po restrikci (222, 158 a 103/ 325 a 158 bp)



Obr. 9: Výsledek PCR amplifikace pro marker odolnosti k PEMV dle publikace Jain et al. (2013). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. amplifikované vzorky, R a S senzitivní a rezistentní kontrola; u vzorku 11 patrný rezistentní genotyp

V dřívějších studiích byl lokus rezistence k PEMV *En* mapován ve vazebné skupině LGIII, jež v referenční sekvenci odpovídá chromozomu 5 (Marx et al., 1985; Randhawa a Weeden, 2009; Jain et al., 2013). Mapování využívající porovnání genu rezistence *En* dvou rodičů rezistentní odrůdy Lifter a náchylné odrůdy Radley (Jain et al., 2013) pomocí genotypování SSR markerů u RILs mapovací populace poskytuje markery pro šlechtění za předpokladu, že šlechtitel užije tento konkrétní gen rezistence *En*. Avšak s využitím GWAS mapovací populace u souboru jedinců s širokou genetickou základnou je zřejmé, že hlavní variabilita rezistence k PEMV v námi analyzované populaci hrachu je zprostředkována skrze geny na chromozomu 1 (vazebná skupina LGVI). Rozdílné výsledky mapování mohou být dány odlišným genetickým mechanismem rezistence k PEMV v mapovacích populacích obou studií nebo i odlišnými kmeny viru PEMV využitými k infekci v provedených testech. Výhodou dosažených výsledků GWAS studie je, že lze jako donora genů rezistence využít vyšší počet původů hrachu a případně lze do šlechtitelského záměru zahrnout a vzájemně kombinovat i vyšší počet lokusů

s nižším efektem na znak rezistence k PEMV.
Na základě využití GWAS mapovací populace u souboru jedinců s širokou genetickou základnou je hlavní variabilita rezistence k PEMV v námi analyzované populaci hrachu zprostředkována zejména skrze geny lokalizované na chromozomu 1 (vazebná skupina LGVI), dále pak na chromozomu 2, 4 a 5. Markery lokalizované na chromozomu 1 se nejevily jako vhodné pro využití restrikce. Testované markery (74 a 76) leží na chromozomech 5 a 2, odpovídající vazebným skupinám LGIII a LGI.

Závěr

V rámci této práce byl v roce 2024 testován soubor 82 genotypů hrachu prostřednictvím SNP markerů spojených s odolností vůči PEMV. CAPS markery navržené na základě referenční sekvence a přilehlých sekvencí byly použity pro snadnou a rychlou molekulární identifikaci referenční/alternativní alely ve vzorku. PCR fragmenty byly na základě navržených primerů amplifikovány, během následné restrikční analýzy byly detekovány štěpené i neštěpené alely v odpovídajících délkách. Nadále bude pokračovat ověření účinnosti těchto molekulárních markerů a potvrzení asociace jednotlivých alel s konkrétním fenotypem na širším souboru vzorků. Identifikované markery jsou využity pro efektivní šlechtění hrachu – selekci s využitím markerů (MAS = Marker-Assisted Selection).
Výsledkem využití markerů bude funkční vzorek, linie hrachu, která bude popsána dle deskriptoru a uložena do kolekce genových zdrojů do databáze GRIN Czech. Tyto genotypy jsou určeny pro šlechtění nových odrůd s ověřenými rezistencemi k PEMV.

Literatura

Dostálová R., Hýbl M., Trněný O., Říha L., Griga M. (2020): Asociační analýza (GWAS) hrachu setého (*Pisum sativum* L.) a identifikace SNP markerů pro genomickou selekci hospodářsky významných znaků. Úroda 12, roč. LXVIII, vědecká příloha časopisu - Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin, 27-34. ISSN 0139-6013.

Blixt S. (1972): Mutation genetics in *Pisum*. Agr. Hort. Genet. 30: 1–293.

Hull R. (1981): Pea enation mosaic virus. In: Kurstak, E. (ed): Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Pp 239–256.

Jain S., Weeden F.N., Porter L.D., Eigenbrode S.D., McPhee K. (2013): Finding linked markers to En for efficient selection of Pea Enation Mosaic Virus in pea. Crop Sci. 53: 1–8.

Jaranowski J. (1976): Gamma–ray induced mutations in *Pisum arvense* L. s. l. Genet. Polonica 17: 479–495.

Ludvíková M., Dostálová R., Hýbl M., Trněný O., Griga M. (2022): Vývoj CAPS markerů pro genomickou selekci hospodářsky významných znaků u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) Úroda – vědecká příloha, 70 (12), s.73–81, ISSN 0139-6013.

Marx G.A., Weeden N.F., Provvidenti R. (1985): Linkage relationships among markers in chromosome 3 and En, a gene conferring virus resistance. Pisum Newsl. 17: 57–60.

Randhawa H., Weeden N.F. (2009): Refinement of the position of En on LGIII and identification of closely linked DNA markers. Pisum Genet. 41: 33–35.

Schroeder W.T., Barton D.W. (1959): The nature and inheritance of resistance to the Pea Enation Mosaic Virus in garden pea, Pisum sativum L. Phytopatology 48: 628–632.

Švábová L., Griga M. (2009): Genetické modifikace hrachu pro zvýšení odolnosti. Úroda. 57(11): 46–48. ISSN 0139-6013.

Užitný vzor: Agritec Plant Research, s. r. o., SEMO a.s., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Zemědělský výzkum, s.r.o., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Sada asociovaných markerů jednonukleotidových polymorfismů v souboru znaků genotypů rodu Pisum L.: Radmila Dostálová, Miroslav Hýbl, Luděk Říha, Oldřich Trněný, Michaela

Matoušková, Jan Šafář, Miroslav Griga. Česká republika. Užitný vzor CZ 34578.

Víchová J. (2024): Choroby luskovin: Virové choroby; dostupné z https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/choroby-luskovin-virove-choroby.

Yu J., Gu W.K., Provvidenti R., Weeden N.F. (1995): Identifying and mapping two DNA markers linked to the gene conferring resistance to Pea Enation Mosaic Virus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 730–733.

Dedikace

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství ČR, institucionální podpora MZE-RO1023.

Kontakt:

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D., Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 16, 78701 Šumperk, 583382125, ludvikova@agritec.cz

Výskyt *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* ve vybraných genotypech lnu setého (*Linum usitatissimum* L.)

Occurrence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* in selected genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.)

Mrázková M.[1], Bjelková M.[2]

[1]*Agritec Plant Research s.r.o.*

[2]*AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.*

Abstrakt

Cílem této studie bylo vyhodnotit u vybraných genotypů lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) výskyt patogena *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Experiment s 98 genotypy lnu setého byl založen v roce 2022 systémem polního maloparcelového testování. Během vegetačního období bylo hodnoceno vizuálně napadení rostlin patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. K hodnocení byla použita pětičlenná stupnice míry napadení rostlin dle Deskriptoru schváleného pro hodnocení lnu setého. Bylo zjištěno, že v roce hodnocení ze souboru 98 genotypů se u většiny z nich (54,1 %) nebyl zjištěn žádný nebo jenom mírný atak patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Střední míru napadení vykazovalo 21,4 % genptypů, nízkou a velmi nízkou pak vykazovalo 24,5 % genotypů.

Klíčová slova: *Fusarium*, len setý, odolnost, genetické zdroje

Abstract

The aim of this study was to evaluate the occurrence of the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* in selected genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.). An experiment with 98 flax genotypes was established in 2022 by a field small-plot testing system. During the growing season, the infestation of plants by the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* was assessed visually. For the evaluation, a five-point scale of the degree of plant infestation was used according to the methodology of the Classifier approved for the evaluation of flax. It was found that in the evaluation year from the set of 98 genotypes, the majority of them (54.1%) did not detect or only a mild attack pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. The amount of 21.4% of the varieties showed a medium level of attack, 24.5% of the genotypes showed a low and very low level.

Key words: *Fusarium*, flax, resistance, genetic resources

Úvod

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) je jednou z nejstarších pěstovaných plodin. Důkazy o využívání lnu vyplývají z archeologických nálezů již z doby kolem 10 000–8 000 před naším letopočtem (Brát, 2021). Len setý se z hospodářského hlediska dělí na dva typy – *len přadný* a *len olejný*, řadíme sem i přechodný typ, *len olejnopřadný*. Na počátku 20. století se v České republice pěstoval len přadný na ploše necelých 30 000 ha. V současné době se přadný len v ČR pěstuje zhruba na ploše 1–3 ha. Olejný len je pěstován pro produkci semen na ploše kolísající kolem 2 000 hektarů ročně (Bouma, 2023a). Jak uvádí Bouma (2023b), v roce 2022 se olejný len v ČR pěstoval na ploše 1 932 ha, což je mírný nárůst oproti minulým rokům. Nejméně polovina těchto ploch byla semenářská k výrobě certifikovaného osiva vybraných českých i zahraničních odrůd.

Podobně jako jiné plodiny je len vystaven působení škodlivých organismů. V současném systému omezování nepříznivých vlivů škodlivých organismů v zemědělských plodinách se postupuje podle zásad integrované ochrany rostlin. To znamená, že nelze spoléhat jenom na chemickou ochranu, ale při pěstování polních plodin je nutné využívat všechny účinné metody k založení a udržení zdravého a výnosného porostu. Patří mezi ně odrůdy odolné vůči

chorobám, výběr pozemku, vhodné zařazení v osevním sledu, správná nebo příprava půdy a výživa (Bouma, 2023a).

Fuzarióza lnu je nejzávažnější chorobou této plodiny. V případě příznivých podmínek pro rozvoj patogenu, oslabených porostů a pěstování náchylných odrůd, dochází ke kalamitnímu výskytu a odumření rozsáhlých pěstitelských ploch. Nejčastější výskyt a největší škodlivost je uváděna z aridních a semiaridních oblastí.

Konkrétní druh *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* je teplomilnou houbou, u které schopnost parazitace lnu vzrůstá s teplotou půdy. Podmínkou silné infekce lnu jsou půdní teploty nad 15–18 °C. Při nižších půdních teplotách nemusí k napadení rostlin dojít anebo jsou napadeny pouze extrémně náchylné odrůdy. Tato houba zamořuje dlouhodobě půdu a přežívá saprofyticky na zbytcích rostlin. Přenos osivem je jen ojedinělý a málo významný. Do rostlin proniká přes kořenové špičky (hlavního kořene, bočních kořenů a vlášením), prorůstá vodivými pletivy a tyto postupně ucpává myceliem a mikrokonidiemi. V důsledku ucpání vodivých svazků (tracheomykóza) dochází k nedostatečnému zásobování nadzemních částí rostlin vodou a živinami. Infikované rostliny pak za sucha a vyšších teplot vadnou, zastavují růst, spodní listy žloutnou, postupně hnědnou a opadávají. Stonky hnědnou a usychají. Jak uvádí Sharma *et al*. (2002), patogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* patří k hlavním činitelům omezujícím produktivitu lnu setého.

U druhu F. *oxysporum* f. sp. *lini* však byla zjištěna existence značného množství rozdílně virulentních kmenů. Na různých lokalitách se v půdní struktuře vyskytuje mnoho odlišných kombinací kmenů VCG skupin (vegetative compatibility group). Důsledkem jsou značná, někdy i diametrálně odlišná rozdílnost v odrůdové citlivosti. Tato okolnost ztěžuje šlechtění lnu. Na některých lokalitách může být odrůda více odolná k napadení, zatímco na jiných v různých stupních náchylná. Odolnost lnu proti *F. oxysporum* f. sp. *lini* je kvantitativní povahy (parciální). Uvedený druh obsahuje nedefinované množství patotypů (kmenů, ras) v půdní populaci (Šmirous *et al*., 2015).
Cílem této studie bylo vyhodnotit napadení patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* na základě průzkumu 98 genotypů (*Linum usitatissimum* L.) vysetých na pokusném pozemku společnosti Agritec v roce 2022.

Materiál a metody
Jednoletý experiment se 98 genotypy lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) byl založen v roce 2022 systémem polního maloparcelového testování v závislosti na osivových parametrech jednotlivých genotypů ve výsevním množství 10 MKS (60-80 kg.ha^{-1}). Předplodinou byla obilovina. Komplexní pěstitelská agrotechnika porostů probíhala dle standardní metodiky pro pěstování této plodiny. Agrochemický rozbor půd z jara roku 2022 je uveden v tabulce 1. V tabulce 2 je zachycen průběh počasí na lokalitě v období duben–srpen 2022. Během vegetačního období bylo hodnoceno vizuálně napadení rostlin patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. K hodnocení byla použita pětičlenná stupnice míry napadení rostlin (Tab. 3). dle Deskriptoru pro hodnocení genových zdrojů lnu (Nôžková *et al*., 2011).

Tab. 1 Agrochemický rozbor půd – jaro 2022

Identifikátor vzorku	P mg-kg^{-1}	N-Kjeldahl %	Mg mg-kg^{-1}	Ca mg-kg^{-1}	pH	K mg-kg^{-1}	Poměr K/Mg
Pokusný blok – len	106,0 (D)	0,11	69,1 (N)	2438,7	6,6	222,7 (D)	3,22

Tab. 2 Průběh počasí na lokalitě duben–srpen 2022

Měsíc	Dekáda	Průměrná denní teplota (°C)	Teplotní normál (°C)	Teplota min. (°C)	Teplota max. (°C)	Srážky (mm)	Srážkový normál (mm)	Počet mrazových dnů	Dny se srážkou		Sluneční svit (hodina)
									< 5mm	> 5mm	
Duben	**1. –10.**	4,6		1,1	8,7	21,5		3	8	2	1,81
	11. – 20.	6,3		0,4	13,0	1,5		6	10	0	7,15
	21. – 30.	8,8		2,0	15,0	17,5		3	8	2	5,10
	1. – 30.	6,6	7,5	0,4	15,0	40,5	36,3	12,0	26,0	4,0	14,1
Květen	**1. –10.**	13,1		6,7	20,0	11,0		0	9	1	5,41
	11. – 20.	15,5		6,7	23,2	10,4		0	9	1	10,00
	21. – 31.	13,1		6,9	18,7	26,3		0	9	1	5,76
	1. – 31.	13,9	12,5	6,7	23,2	47,7	68,7	0,0	27,0	3,0	21,2
Červen	**1. –10.**	17,5		12,1	23,3	22,2		0	8	2	6,83
	11. – 20.	17,2		9,5	24,3	30,6		0	7	3	9,92
	21. – 30.	20,6		12,7	27,4	13,6		0	8	2	10,74
	1. – 30.	18,4	15,6	9,5	27,4	66,4	82,6	0,0	23,0	7,0	27,5
Červenec	**1. –10.**	17,0		11,7	23,6	23,0		0	8	2	5,78
	11. – 20.	17,3		8,5	25,6	13,7		0	9	1	10,40
	21. – 31.	20,6		13,6	27,8	23,0		0	10	1	7,30
	1. – 31.	18,3	16,7	8,5	27,8	59,7	77,5	0,0	27,0	4,0	23,5
Srpen	**1. –10.**	19,4		11,1	27,7	8,5		0	9	1	9,33
	11. – 20.	20,9		13,2	28,6	11,0		0	10	0	6,96
	21. – 31.	18,7		13,9	24,5	28,2		0	9	2	6,40
	1. – 31.	19,7	16,2	11,1	28,6	47,7	74,4	0,0	28,0	3,0	22,7

Tab. 3 Stupnice hodnocení míry napadení lnu setého druhem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*

Odolnost k *F. oxysporum* f. sp. *lini*	**Míra napadení rostlin**
velmi nízká	81 – 100 %
nízká	51 – 80 %
střední	21 – 50 %
vysoká	6 -20 %
velmi vysoká	< 6 %

Výsledky a diskuse

Tabulky 4-8 zachycují seznamy genotypů s rozdílnou mírou napadení rostlin druhem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Tabulka 9 a Graf 1 potom souhrnně vyjadřují celkový počet genotypů s rozdílným stupněm napadení k tomuto patogenu.

Bylo zjištěno, že ze souboru 98 genotypů v roce hodnocení 2022 nebyla nadpoloviční většina z nich (54,1 %) atakována patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Střední míru napadení

vykazovalo 21,4 % genotypů, nízkou a velmi nízký výskyt byl zjištěn u 24,5 % ze souboru genotypů. Vyšší stupeň napadení byl zjištěn u vzorků Alba, Mestnij nebo Tomskij 16, naopak vyšší odolnost byla například u odrůdy Concurrent, Borge, Dacota, Baikal, Recital aj.

Kumar *et al*. (2017) prováděli obdobný výzkum. Dle jejich výsledků z 200 testovaných genotypů tři linie, konkrétně LCK-6028, PKDL-71, T-397, nevykazovaly žádné napadení (0,00 %) a byly hodnoceny jako vysoce odolné, zatímco 2 genotypy, jmenovitě SLS-58 a NDL-2004-5, vykazovaly méně než 5 % napadení a byly hodnoceny jako odolné (R). 12 genotypů, jmenovitě Kiran, LMS-23-06, BAU-610-A, Polf-19, H-15, BAU-2K-20, NL-165, BAU-04-07, PKDL-58, NDL-05, LMS -95-4 a RKD-1 vykazovaly méně než 15% napadení a byly hodnocené jako středně odolné.

Simagin *et al*. (2023) provedli hodnocení odolnosti proti fuzariovému vadnutí odrůd a genotypů lnu setého (*Linum ussitatissimum* L.) ze „Sbírky ruského lnu“ Výzkumného ústavu lnářského (NIIL, Torzhok). Většina vzorků vykazovala průměrnou odolnost vůči patogenu. Největší stupeň odolnosti (87,5-100 %) vykazovala odrůda Sursky (86,9 %). Nejnižší odolnost vykazovaly vzorky B-100 (40,4 %) a Peresvet (37,1 %) a jejich ukazatele odolnosti byly nižší než náchylnost standardu AR-5 (45,6 %).Výzkum autorů Alam *et al.* (2022) byl proveden na 46 kultivarech lnu setého, z nichž 1 kultivar byl shledán jako odolný vůči chorobám, protože napadení činilo 0 a 10 %. 12 kultivarů spadalo do kategorie středně odolných s výskytem patogenu 10,1-25 %. Bylo zjištěno 8 genotypů středně citlivých s 25,1–50 % incidencí patogenu, 8 genotypů bylo shledáno citlivých s 50,1–75 % a 17 genotypů bylo shledáno vysoce citlivých (nad 75 %).

Ve srovnání s našimi výsledky je nutno zdůraznit, že pro rozvoj choroby nebyly v roce 2022 úplně standardní podmínky z důvodu optimálních srážek na počátku vegetace a jejich nižšího přísunu v průběhu jednotlivých fází zralosti lnu, jak ukazuje tabulka 3.

Tab. 4 Seznam genotypů s velmi vysokou odolností (míra napadení < 6 %) k *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lini*.

ECN	**Název**
05X1300011	Blatall-C.I. 724
05X1300021	Concurrent
05X1300022	P 6899
05X1300023	P 6906
05X1300024	La Prevision 18
05X1300027	Fleischmannuv
05X1300028	Borgen
05X1300029	Kenya C.I. 709
05X1300031	Bison x Red. Wing.
05X1300032	Newland (19x112)
05X1300034	Dacota
05X1300038	Marsic II
05X1300041	Barbarigo
05X1300043	311/30
05X1300044	311/794
05X1300045	311/837
05X1300046	312/28
05X1300047	312/796
05X1300048	IBM 8/1
05X1300049	IBM 57/1

05X1300053	AL CV 3
05X1300054	AL CVII 3
05X1301029	Baikal
05X1301031	Recital
05X1301040	Omega Golden Flax
05X1301127	8744-10
05X1301155	Omegalin

Tab. 5 Seznam genotypů s vysokou odolností (míra napadení 6-20 %) k *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

ECN	**Název**
05X1300002	C 22
05X1300009	Swt 0131
05X1300014	Blaauwe Ster
05X1300015	Blenda
05X1300016	Herkules
05X1300018	Martta
05X1300019	Stendes Ligo
05X1300025	Sort No. 31
05X1300026	Sort No. 188
05X1300033	Liral Sussex
05X1300035	Ilguneliai II.
05X1300036	Vaizgantes
05X1300037	Dona
05X1300039	Primus
05X1300040	Capace
05X1300042	311/15
05X1300051	AL CII 6
05X1300052	AL CII 33
05X1300057	No. 34
05X1301039	Amon-linie 1295/99
05X1301112	Bionda
05X1301114	Eyre
05X1301123	Ayoagi
05X1301126	Z 61783-81
05X1301132	l. k-4604 x k-4615
05X1301158	Floral

Tab. 6 Seznam genotypů se střední odolností (míra napadení 21-50 %) k *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

ECN	**Název**
05X1300004	Giganta
05X1300008	Stormont Cirrus
05X1300020	Linkopis
05X1300050	AL CII-2
05X1300055	J.W.S.
05X1300056	No. 33
05X1300060	Lyngby 2
05X1301075	Eyre 16-I-5i-601679
05X1301081	Raciol
05X1301101	LM 92
05X1301110	Mermilloid
05X1301115	Walaga
05X1301116	Belocka
05X1301118	Alizee
05X1301119	Evea
05X1301128	Kaminjar
05X1301130	China 1
05X1301133	Novotorzskij
05X1301135	Voronezskij 1308
05X1301142	Merlin
05X1301159	Aquarius

Tab. 7 Seznam genotypů s nízkou odolností (míra napadení 51-80 %) k *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

ECN	**Název**
05X1300003	Excello
05X1300005	Fi-7
05X1300007	Stormont Gossamer
05X1300010	Swt 0262
05X1300058	Texala
05X1300062	Perfecta
05X1301091	EYRE 16-I-5i-601680
05X1301111	Rabat 12
05X1301117	l.1373
05X1301120	AR 7
05X1301121	Toct 3
05X1301122	Soglasie
05X1301129	l. 323
05X1301131	Zarjanka
05X1301134	Svetoc
05X1301136	Orsanskij 2
05X1301137	Prizyv 81

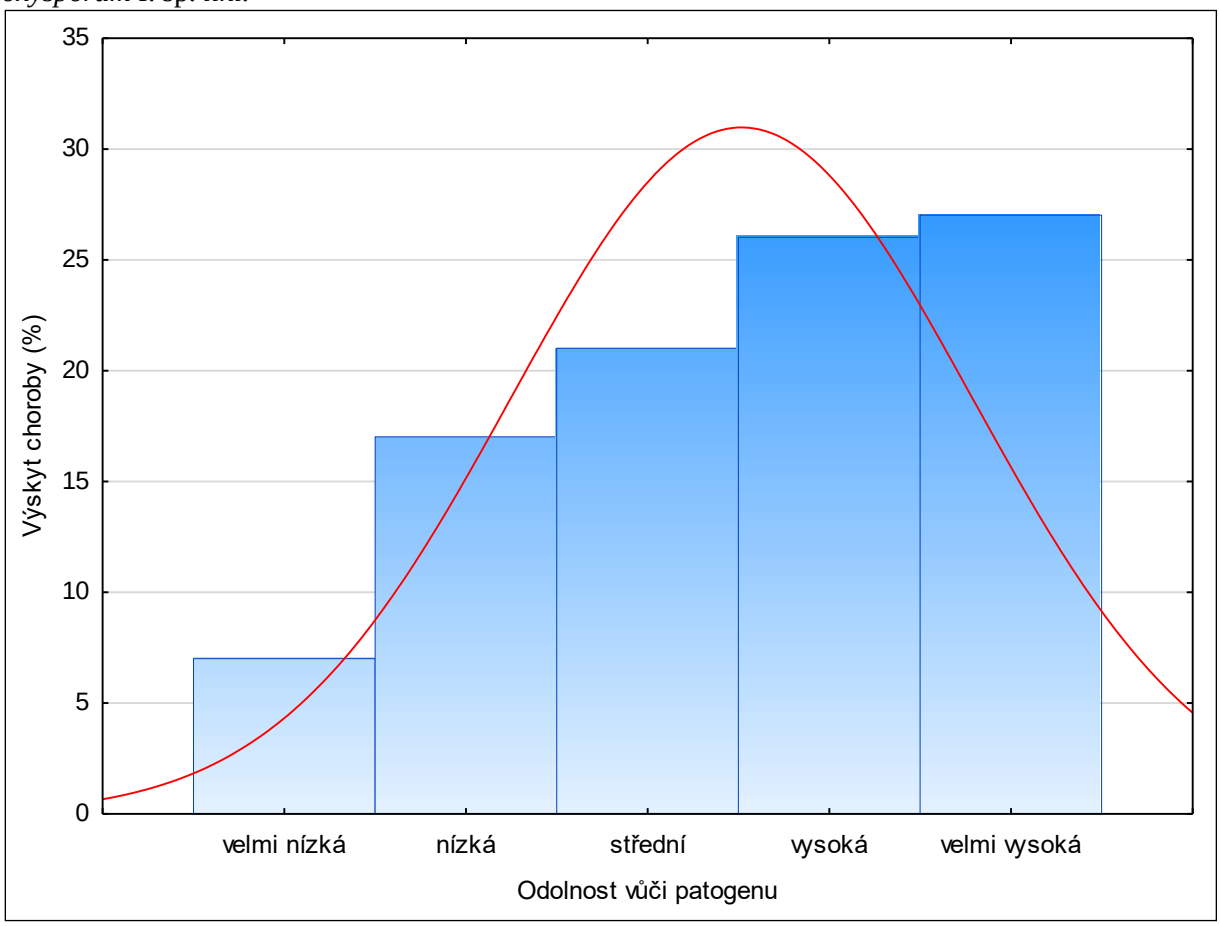
Tab. 8 Seznam genotypů s velmi nízkou odolností (míra napadení 81-100 %) k *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

ECN	Název
05X1300001	Alba
05X1301068	14 I-1 K-7022
05X1301105	Mestnij
05X1301138	Tomskij 16
05X1301140	VIR 8
05X1301141	Krom
05X1301143	Pecerskij krjaz

Tab. 9 Celkový počet genotypů s rozdílnou odolností k *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

Odolnost k *F. oxysporum* f. sp. *lini*	**Míra napadení rostlin**	**Počet genotypů**	**% genotypů**
velmi vysoká	< 6 %	27	27,6
vysoká	6-20 %	26	26,5
střední	21-50 %	21	21,4
nízká	51-80 %	17	17,4
velmi nízká	81-100 %	7	7,1
		Celkem: 98	**Celkem: 100 %**

Graf 1 Histogram četností procentuálního napadení genotypů lnu setého patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.



Literatura

ALAM, S. - AWADHIYA, G.K. – THAKUR, N. – PAIKRA, A.S. (2022): Evaluations on resistance genotypes against wilt of linseed caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (Bolley) Synd. and Hans. *The Pharma Innovation Journal*, 11(9): 2745-2748.

BOUMA, D. (2023a): *Regulace plevelů ve lnu v roce 2023* [on line] Vystaveno: 20.06.2023 [Cit. 03.01.2024] Dostupné z: https://uroda.cz/regulace-plevelu-ve-lnu-v-roce-2023/

BOUMA, D. (2023b): *Plochy lnu a konopí stále nízké*. [on line] Vystaveno: 17.04.2023 [Cit. 03.01.2024] Dostupné z: https://uroda.cz/plochy-lnu-a-konopi-stale-nizke/

BRÁT, J. (2021): Potenciál lepšího zhodnocení lnu v lidské výživě. In: Šmirous, P. a kol. *Zápisník len a konopí 2022*. Svaz lnu a konopí ČR, z.s. ISBN 978-80-87360-68-2

KUMAR, V. – KUMAR GAUTAM, D. – NARESH, P. (2017): Evaluations on Resistance Genotypes against Wilt of Linseed Caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht. Ex. fr. f. sp lini. (Bolley) Synder and Hansen. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(7): 2004-2016.

NÔŽKOVÁ, J. – PAVELEK, M. – BJELKOVÁ, M. – BRUTCH, N. – TEJKLOVÁ, E. – POROKHOVINOVA, E. – BRINDZA, J. (2011): *Descriptor list for flax (Linum usitatissimum L.).* Slovak University of Agriculture in Nitra, 104 s. ISBN 978-80-552-0671-4

SIMAGIN, A. – BARSUKOV, N. – ZAKHAROVA, S. – SIMAGINA, A. – KUDRYAVTSEVA, L. (2023): Assessment of the resistance of varieties and collection samples of flax to fusarium wilt. BIO Web of Conferences, 66(84). DOI: 10.1051/bioconf/20236606003

SHARMA, R.L. – SINGH, B.P. – THAKUR, M.P. – VERMA, K.P. (2002): Chemical management of linseed wilt caused by Fu*sarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Ann. Plant Protect Sci*.,10: 390-391.

ŠMIROUS, P. – BJELKOVÁ, M. – SOUČEK, J. (2015): *Metodická příručka pro pěstování olejného lnu*. Agritec Plant Research s.r.o. 54 s.

Poděkování

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1023 a dále s podporou dotačního titulu „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“.

Kontakt:

Mgr. Marie Mrázková, Ph.D.
Agritec Plant Research s.r.o.
Zemědělská 2520/16
787 01 Šumperk
Tel.: +420 583 382 105
E-mail: mrazkova@agritec.cz

Využití kultur izolovaných vajíček ve šlechtění řepy červené (*Beta vulgaris* var. *vulgaris*)

Use of isolated egg cultures in red beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) breeding

Rosokha H.[1], Klíma M.[1], Vítámvás P.[1], Kosová K.[1], Prášil I.T.[1], Balcar M.[2]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.;*

[2]*MORAVOSEED CZ, a.s., šlechtitelská stanice Svijanský Újezd*

Abstrakt

Byl úspěšně zaveden postup gynogenetické regenerace embryí a embryoidů v *in vitro* kulturách červené (salátové) řepy. Jako nejúspěšnější se ukázalo chladové předpůsobení (3–5°C) na celá květenství po dobu 3 týdnů, kdy regenerace dosáhla průměrné úrovně 11,3 % z kultivovaných nezralých vajíček. Zvolená metoda povrchové sterilizace poupat a následné manipulace s izolovanými vajíčky vedla k nízkému výskytu bakteriálních kontaminací (průměr 1,8 % ze všech variant). Bylo dosaženo různých typů regenerace; jen v malé míře (do 5 %) docházelo k regeneraci buď dobře morfologicky vyvinutých embryí, nebo naopak neorganizovaného pletiva (kalusu). Nejčastější formou byl tzv. embryoid, tj. více či méně organizovaná embryonální struktura, regenerující prýty až po opakovaných repasážích na kultivačních médiích.

Klíčová slova: gynogeneze, řepa salátová, *in vitro* kultury, embryoid, kalus

Abstract

The procedure of gynogenetic regeneration of embryos and embryoids in *in vitro* cultures of red beet was successfully introduced. Cold pretreatment (3–5°C) on whole inflorescences for 3 weeks proved to be the most successful, when regeneration reached an average level of 11.3% from cultured immature eggs. The method of surface sterilization of buds and subsequent handling of isolated eggs led to a low incidence of bacterial contamination (average 1.8% of all variants). Various types of regeneration have been achieved; only to a small extent (up to 5%) there was regeneration of either well-developed embryos, or, on the contrary, disorganized tissue (callus). The most common form was the so-called embryoid, i.e. a more or less organized embryonic structure, which regenerates the shoots only after repeated repasts on cultivation media.

Keywords: gynogenesis, red beet, in vitro cultures, embryoid, kallus

Úvod

Řepa červená (též řepa salátová, *Beta vulgaris L.* ssp. *vulgaris,* syn. *Beta vulgaris L.* ssp. *europaea* Krass. var. *atrorubra* Krass.) je dvouletá, cizosprašná rostlina z čeledi *Amaranthaceae* (*Chenopodiaceae* Vent.), patřící mezi naše tradičně pěstované kořenové zeleniny. Osevní plochy červené řepy (dále též jen řepy) se v ČR pohybují okolo 250 ha (241 ha v r. 2022). (Němcová a Buchtová 2022). Technologie šlechtění řepy je dána genetickým pozadím této plodiny. Z důvodu cizosprašnosti jsou tradiční odrůdy červené řepy výsledkem populačního šlechtění, které s sebou vždy nese určitou míru nevyrovnanosti jednotlivých odrůd. Pokusy o snížení variability pomocí samosprašování vedou k inbrední depresi, která se mj. projevuje výrazným snížením vitality a výnosu (Stein a Nothnagel 1995). Východiskem k dosažení kompromisu mezi vyrovnaností, vitalitou a výnosem je u tradičního šlechtění křížení nepříbuzných, stabilizovaných inbredních populací, kdy je díky heteróznímu efektu do určité míry kompenzován vliv inbrední deprese. V současnosti je tak u řepy u nás i ve světě dominantním způsobem šlechtění hybridní, založené na cytoplazmatické sterilitě. Získání sterilních rostlin a jejich fertilních analogů (udržovatelů sterility) klasickými postupy je ale časově náročný proces (odkaz).

Technologie dihaploidů (DH) má v současnosti velký význam ve šlechtitelských programech

řady hospodářsky významných plodin, protože lze obvykle během jedné generace získat zcela homozygotní genotypy, čehož často není možné dosáhnout konvenčními postupy (Kučera *et al.* 2002); selekce v populaci DH rostlin je přesnější a účinnější, a to zejména u recesivně založených znaků u cizosprašných plodin; pro vyšlechtění odrůdy nebo pro tvorbu komponenty hybridu pomocí DH systému postačí relativně malá výchozí populace DH rostlin, protože frekvence požadovaných gamet je vždy vyšší než frekvence odpovídajících rostlin v F_2 generaci; získané DH genotypy jsou homozygotní ve všech lokusech a mohou se tak stát novými liniovými odrůdami nebo rodičovskými liniemi k produkci hybridních odrůd (Kiszczak *et al.* 2021). I když se inbrední deprese manifestuje i při technologii dihaploidů, silný selekční tlak během *in vitro* kultivace a regenerace eliminuje neživotné genotypy (Bohanec 2002).
K rychlejšímu ustálení šlechtitelských materiálů v procesu liniového i hybridního šlechtění lze v současnosti již i u řepy salátové využít výše zmíněné biotechnologické *in vitro* postupy, založené na indukci haploidů a dihaploidů pomocí gynogeneze, tj. tvorbou haploidních embryí z nezralých, neoplozených vajíček. Uvedený postup byl poprvé úspěšně aplikován u blízce příbuzné řepy cukrové (Hosemans a Bossoutrot (1983)) a postupně optimalizován pro rutinní použití (např. Aflaki *et al.* (2017), Gurel *et al.* (2021)). Počáteční předpoklad, že přímé využití těchto postupů i u řepy salátové bude možné, se nepotvrdil. Pokrok přinesl až další paralelní výzkum (např. Zayachkovskaya *et al.* 2021), završený zveřejněním podrobné metodiky pro regeneraci homozygotních rostlin červené řepy v kulturách nezralých vajíček, vč. ověření homozygotnosti a ploidie (Kiszczak *et al.* (2021)).

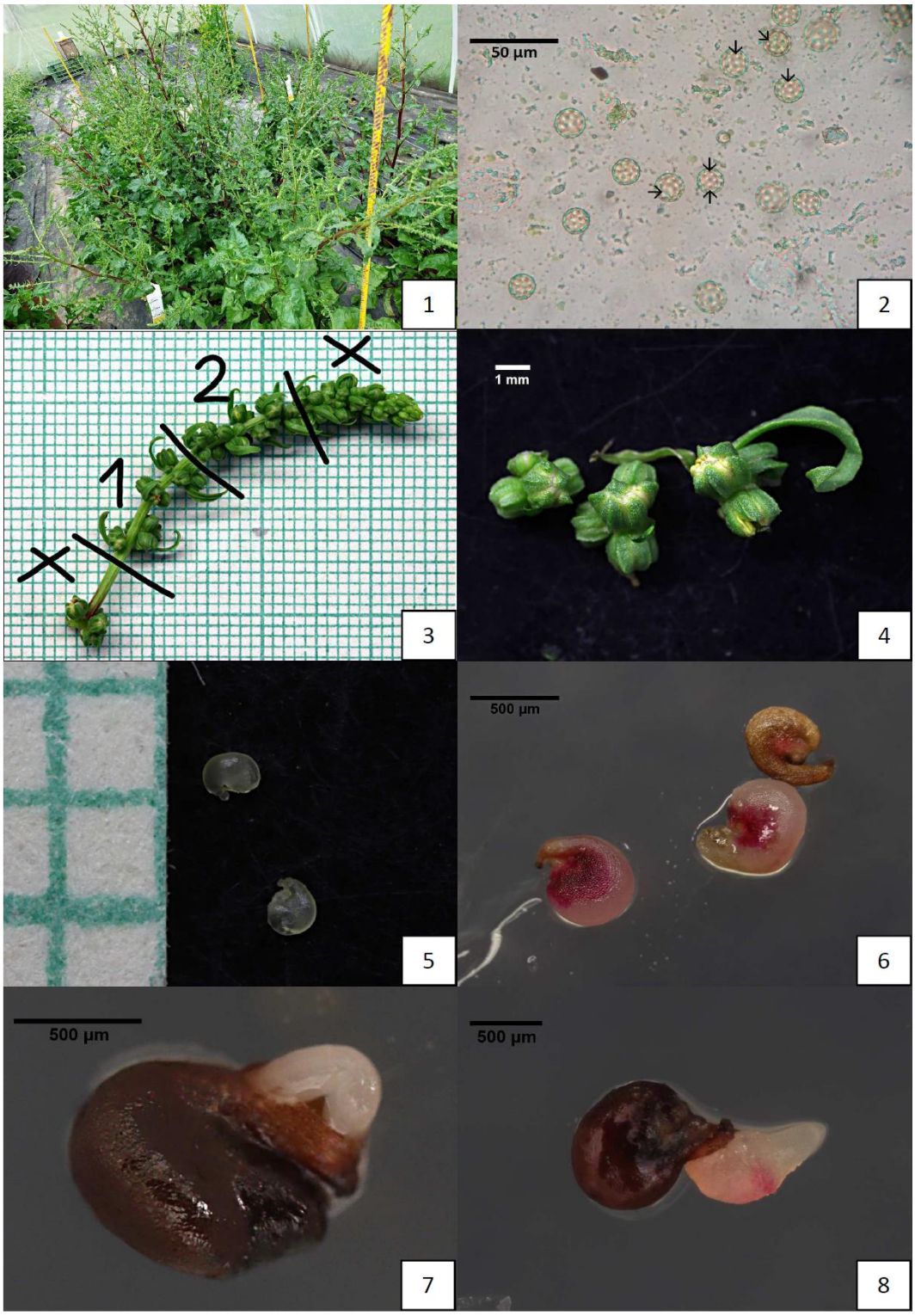
Cílem práce bylo uvést výsledky prvního roku řešení projektu MZE NAZV QL24010202 v oblasti indukce gynogeneze *in vitro* a následné regenerace rostlin u řepy červené.

Materiál a metody

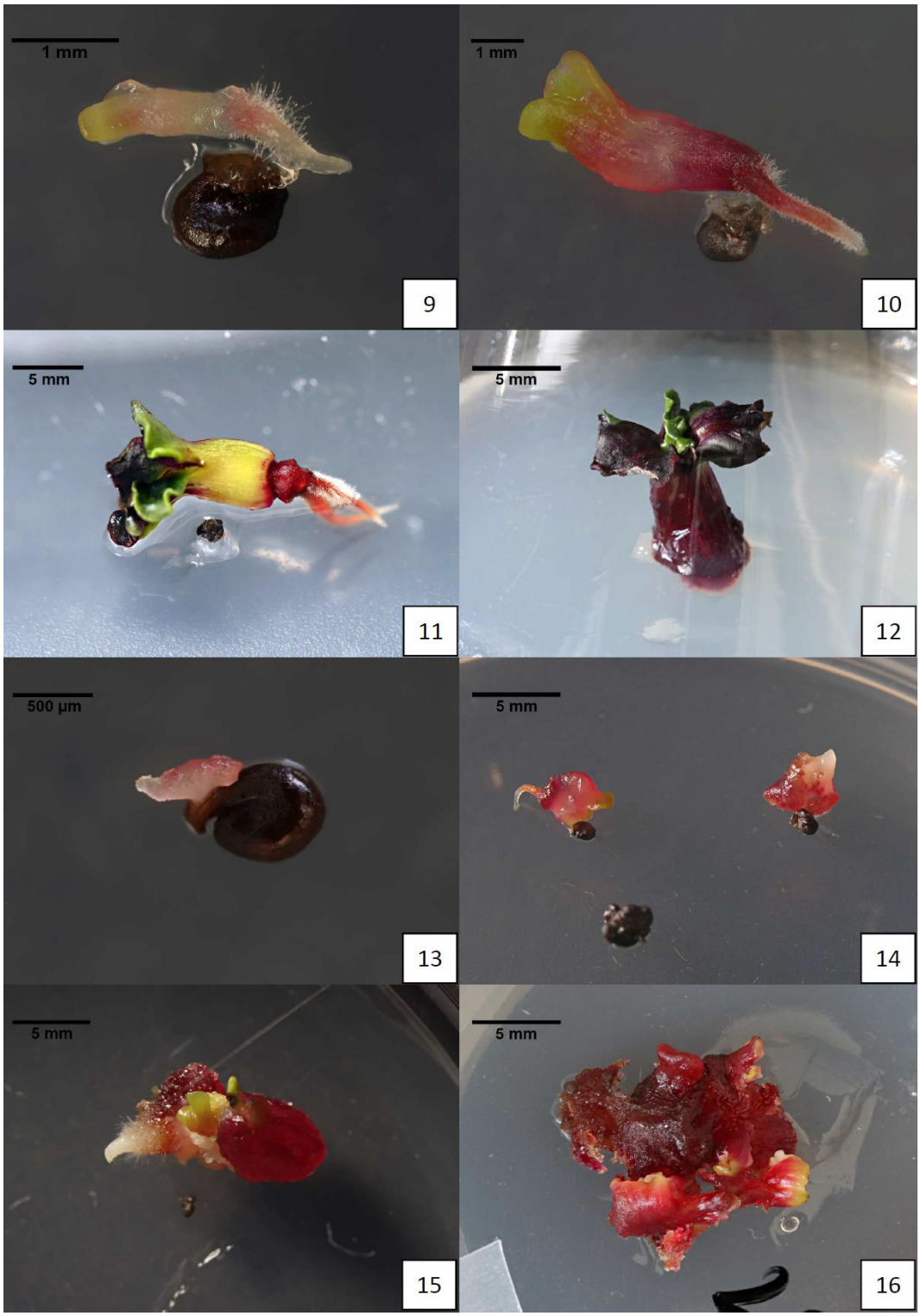
Pro pilotní experimenty byl použit zjarovizovaný šlechtitelský materiál červené řepy RB7/23, napěstovaný a udržovaný ve skleníkových podmínkách na šlechtitelské stanici Svijanský Újezd (MORAVOSEED CZ, a.s, viz obr. 1). Výchozí metodikou byl postup dle Kiszczak *et al.* (2021), modifikovaný na základě zkušeností s výchozím rostlinným materiálem a *in vitro* regenerací. Pro experimenty byla z donorových rostlin na počátku a v průběhu kvetení odebírána celá květenství nebo jejich vrcholové segmenty o délce cca 20 cm ve fázi, kdy u báze květenství nebo příslušného segmentu bylo pozorováno několik prvních, plně otevřených květů s prášivým pylem. Květenství byla po dobu transportu udržována v cestovní chladničce v polyetylenových sáčcích s malým množstvím vody tak, aby nedošlo ke smáčení poupat. Květenství byla následně udržována v nádobách s vodovodní vodou v chladové komoře (3–5°C, fotoperioda 12 hod., světelná intenzita 100 $\mu mol/m^2/s$). Minimální velikost (průměr) poupat pro odběry byla stanovována před každým opakováním mikroskopicky (Olympus CKX 41, objektiv 40x) tak, aby převažující zastoupení nezralých pylových zrn (mikrospor) v poupěti bylo ve stádiu, kdy vakuola vyplňuje minimálně 50 % objemu mikrospory a zároveň ještě nejsou patrná škrobová zrna v cytoplazmě (obr. 2). Maximální velikost poupat pro odběry pak odpovídala stádiu, kdy prašníky již prosvítaly skrze kališní plátky poupěte (obr. 4 uprostřed), event. už sice započalo rozestupování kališních lístků (obr. 4 vpravo), ale při preparaci poupěte ještě nedocházelo k uvolňování pylových zrn z prašníků. V každém ze tří opakování bylo odebráno celkem 20 segmentů lichoklasů (obr. 3) o délce 10–20 mm s převažujícím zastoupením poupat ve výše uvedených stádiích. Segmenty byly v laminárním boxu přemístěny do sterilní 50ml kádinky, povrchově sterilizovány 2 minuty v 70% etanolu a následně 12 minut v 10% SAVU v uzavřené kádince na orbitální třepačce (200 RPM). Následovaly 3 cykly oplachování (5–5–5 minut) ve sterilní, vychlazené destilované vodě. Segmenty byly po posledním cyklu ponechány v kádince s destilovanou vodou, z vnějšku průběžně chlazenou ledovou drtí. Poupata byla ze segmentů odebírána a nezralá vajíčka izolována preparační jehlou

a jemnou pinzetou pod sterilní binokulární lupou (M3B Wild). V každém ze tří opakování bylo odebráno 100 ks nezralých vajíček (obr. 5), kultivovaných po 10 ks na povrchu agarem zpevněného indukčního média (IMR, Kiszczak *et al.* (2021)) v 60mm Petriho miskách (obr. 6, 21). Kultivace probíhala za kontinuálního osvětlení (intenzita 300 µmol/m^2/s, teplota 27 ± 1°C) až do fáze regenerace kotyledonárních embryí nebo embryonálních struktur, uvolnivších se z původního nezralého vajíčka. Embrya (resp. struktury) o minimální délce (resp. průměru) 3 mm byla poté přemístěna na agarem zpevněné regenerační médium (RER, Kiszczak *et al.* (2021)) v 60mm Petriho miskách a kultivována při teplotě 18 ± 1°C, světelné intenzitě 300 µmol/m^2/s a 16h fotoperiodě. Explantáty s prvními pravými listy byly pasážovány na regenerační médium v 50ml Erlenmayerových baňkách.
Byla sledována a vyhodnocena frekvence indukce gynogenetické embryogeneze v závislosti na délce udržování květenství v chladové komoře (0, 7, 14, 21 nebo 42 dnů).

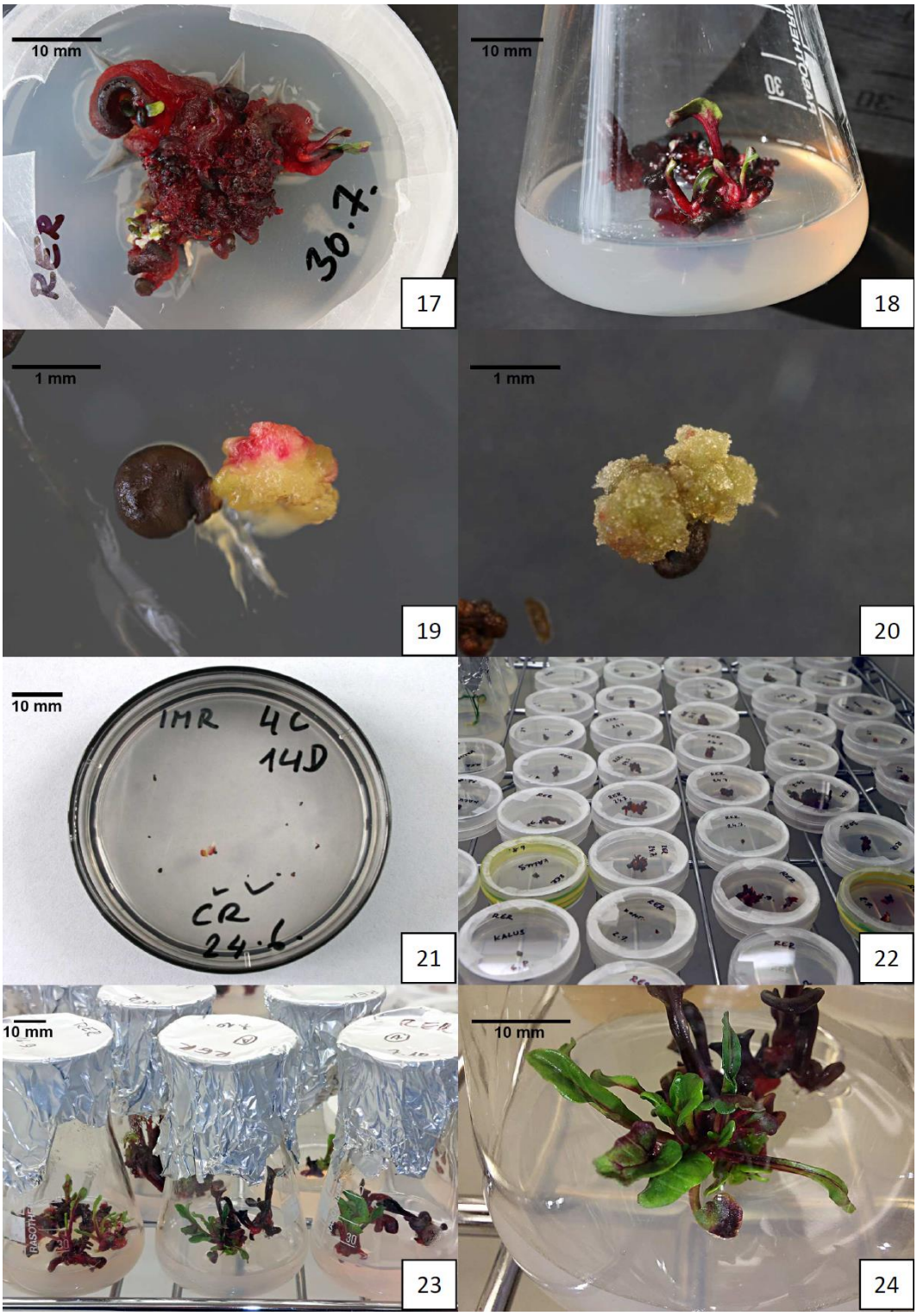
Výsledky
Velikost odebíraných poupat se pohybovala v širokém rozmezí (1–2 mm), v závislosti na počtu a pozici květů v klubíčku, pozici klubíček v lichoklasu a stupni jejich nahloučení, na pozici lichoklasu v latě, na lodyze apod. Optimální velikost bylo tedy nutné stanovovat individuálně, s ohledem na výše uvedené parametry.
Počáteční regenerace gynogenetických embryí nebo embryonálních struktur byla pozorována v rozmezí 19.–34. dne od založení kultury (obr. 7, 8, 13). Frekvence výskytu a rychlost růstu případných bakteriálních kontaminací, vnesených do kultur s jednotlivými izolovanými vajíčky významně neovlivňovala proces regenerace. Frekvence kontaminací jednotlivých vajíček v Petriho miskách dosáhla 1,8 % (průměr ze všech opakování a variant). Ve většině případů nedocházelo k masivnímu nárůstu velikosti bakteriálních kolonií a tím i ke znehodnocení ostatních vajíček v Petriho miskách, a to ani po několika týdnech kultivace na IMR médiu.
Významný vliv chladového předpůsobení byl zaznamenán u frekvence regenerace embryí, kdy nejvyšší hodnota (podíl embryí, regenerovaných ze 100 ks kultivovaných vajíček v daném opakování) byla zaznamenána u varianty 21 dnů (11,3 %), následovaná variantou 14 dnů (9,3 %), 42 dnů (5,3 %) a 7 dnů (3,3 %). Regenerace embryí byla dosažena i u varianty bez chladového předpůsobení (1,3 %). I když chladové předpůsobení po dobu 21 dnů dosahovalo lepší efektivity než varianta 14 dnů, delší doba udržování v chladových podmínkách vedla k postupnému vadnutí většiny květenství, což ztěžovalo odběr poupat z vadnoucích stonků, resp. izolaci vajíček z poupat. I když i z varianty 42 dnů bylo získáno dostatečné množství embryí pro navazující regenerace, u této varianty bylo kromě vadnutí květenství pozorováno i napadení vrcholových částí lichoklasů houbovými patogeny, které se postupně šířily i do nižších partií lichoklasů.
Počáteční regenerace byla pozorována v různých formách. Jen v malé míře docházelo k regeneraci buď dobře morfologicky vyvinutých embryí (obr. 7–12), nebo naopak neorganizovaného pletiva (kalusu, viz obr. 20). Velmi často hned v počátku docházelo k regeneraci struktur, jen vzdáleně připomínající embryo (tzv. embryoid, obr. 14, 19)). Ve většině případů také docházelo ještě na indukčním médiu, nebo po přepasážování embryí z indukčního na regenerační k rychlému nárůstu hmoty embryí a ke ztrátě jejich charakteristického tvaru (obr. 15, 16).



Obrázek 1 – donorové rostliny červené řepy ve skleníku na pracovišti Svijanský Újezd; 2 – Mikrospory v pozdně jednojaderném až časně dvoujaderném stádiu, kdy vakuola (její okraj označen šipkou) vyplňuje většinu objemu mikrospor ; 3 – Naznačení rozdělení lichoklasu na dva segmenty před jejich povrchovou sterilizací; 4 – Poupata v klubíčcích po povrchové sterilizaci (všechna vývojová stádia, používaná pro odběry); 5 – izolovaná nezralá vajíčka před umístěním na IMR médium; 6 – izolovaná vajíčka po 12 dnech kultivace na IMR médiu; 7 – Růst gynogenetického embrya z vajíčka 21. den kultivace; 8 – Embryo s kořenovou špičkou 23. den kultivace; Obrázky 3 a 4: rozměry nejmenších čtverců na podkladu: 1 x 1 mm



Obrázek 9 – Torpédovité embryo s kořenovým vlášením 26. den kultivace; 10 – Kotyledonární embryo 30. den kultivace; 11 – Kotyledonární embryo 55. den kultivace od založení kultury; 12 – Kotyledonární embryo s prvními pravými listy 10 dní po přepasážování na RER médium (78. den od založení kultury); 13 – nedostatečně vyvinuté embryo na IMR médiu, regenerující 25. den po založení kultury; 14 – Embrya, morfologicky nedostatečně vyvinutá (tzv. embryoid), 30. den od založení kultury; 15 – Embryo po přepasážování na RER médium, regenerující málo organizovanou embryonální strukturu (40. den od založení); 16 – Neorganizovaná embryonální struktura se známkami regenerace prýtů na RER médiu (62. den od založení kultury)



Obrázek 17 – Neorganizovaná embryonální struktura s regenerovaným prýtem (80. den od založení kultury); 18 – Prýt po repasážování na RER médium v Erlanmayerově baňce (3 měsíce od založení kultury); 19 – Embryoid: málo organizovaná embryonální struktura, regenerující 28. den od založení kultury; 20 – Neorganizované pletivo (kalus), regenerující 27. den od založení kultury; 21 – Embryo, regenerující z varianty 14 dní chladového předpůsobení, před pasážováním na RER médium (30. den po založení kultury); 22 – Celkový pohled na gynogenetické regeneranty červené řepy na RER médiu v 60mm Petriho miskách v různých fázích regenerace; 23 – Gynogenetické regeneranty červené řepy na RER médiu v 50ml Erlenmayerových baňkách na RER médiu (4 měsíce po založení kultury); 24 – Detail regenerantu na RER médiu s dobře vyvinutými pravými listy před pasáží na kořenící médium

Jen v několika případech byla pozorována přímá regenerace prvních pravých listů z úžlabí děložních listů výchozího embrya (obr. 12), většina embryí nejprve vytvořila neorganizovanou embryonální strukturu, ze které se postupně nepřímou regenerací začaly vytvářet jednotlivé prýty (obr. 17). Ty byly postupně odřezávány a pasážovány na čerstvé regenerační médium (obr. 18) pro dosažení regenerantů s dobře vyvinutými pravými listy (obr. 23, 24). V případě, že embryonální struktura nezapočala regenerovat prýt ani po 4 týdnech kultivace na regeneračním médiu, byla rozdělena na několik menších částí a ty přepasážovány na čerstvé regenerační médium. Tento proces byl několikrát opakován pro dosažení regenerace prýtu(-ů).

Diskuze

Zayachkovskaya *et al.* (2021) testovali 11 genotypů červené řepy, z nichž u 5 nebyla dosažena regenerace; frekvence regenerace embryoidů nebo kalusů u zbývajících šesti genotypů se pohybovala v rozmezí 3,4–21,2 %, což je srovnatelné s našimi výsledky, kde nejlepší varianta dosáhla 11,3 %. Odlišné byly naopak výsledky z hlediska typu regenerace; v našem případě více než 92 % regenerantů bylo ve formě embryoidů nebo embryí, u Zayachkovskaya *et al.* (2021) u třech genotypů byly regenerovány jen kalusy, a ostatních genotypů byl podíl kalusů vyšší než 75 %. Pazuki *et al.* (2017) u řepy cukrové testovali vliv chladového působení na izolovaná poupata. Zjistili, že optimální doba působení je 7 dní, poté již dochází k poklesu frekvence gynogeneze. V našem případě po aplikaci chladu na celá květenství byla naopak delší doba vhodnější (3 týdny). Zayachkovskaya *et al.* (2021) optimální velikosti poupat pro izolaci určovali podle pozice prvního otevřeného poupěte a zjistili, že z hlediska regenerace je optimální zóna pro odběr poupat v délce 2–6 cm nad prvním otevřeným poupětem. To odpovídá i našemu postupu. Rozdílná byla naopak velikost izolovaných vajíček. Velikosti izolovaných vajíček u šlechtitelského materiálu RB7/23 nikdy nepřekročily 1 mm, u Zayachkovskaya *et al.* (2021) naopak byly vždy větší (1–3 mm).

Závěr

Toto je první nám známá studie, zabývající se *in vitro* regenerací gynogenetických embryí a embryoidů u řepy červené v ČR. Bylo potvrzeno, že s využitím optimalizovaného výchozího metodického postupu lze vytvořit dostatečné množství gynogenetických regenerantů i u této zeleniny. Pozitivní je také skutečnost, že regeneraci lze indukovat i u materiálu, odebraného z donorových rostlin a udržovaného déle než 30 dní v chladové komoře. Tak lze prodloužit interval dostupnosti výchozího materiálu pro zakládání *in vitro* kultur. V dalších fázích bude u regenerantů inicializována tvorba kořenového systému, budou převedeny do nesterilních podmínek, stanovena homozygotnost pomocí molekulárních analýz a ploidie pomocí analýz flowcytometrických.

Poděkování

Prezentované výsledky byly získány za finanční podpory projektů Ministerstva zemědělství České republiky, MZE NAZV QL24010202

Literatura

Aflaki F., Pazuki A., Gurel S., Stevanato P., Biancardi E., Gurel E. 2017: Doubled haploid sugar beet: an integrated view of factors influencing the processes of gynogenesis and chromosome doubling. International Sugar Journal. 119: 884–895.

Bohanec B. 2022: Doubled-haploid onions. In: Rabinowitch H.D, Currah L. (eds.) Allium Crop Science: Recent Advances. Wallingford, UK: CABI Publishing (2002), pp. 515.

Buchtová I., Němcová V., 2022: Situační a výhledová zpráva – zelenina. Ministerstvo zemědělství. https://mze.gov.cz/public/portal/-q368427---xX1ZT9D_/zelenina-12-2022

Gurel S., Pazuki A., Aflaki F., Gurel E. 2021: Production of Doubled Haploid Sugar Beet

(*Beta vulgaris* L.) Plants Through Gynogenesis. In: Segui-Simarro, J.M. (eds.) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2289. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_21

Hosemans D., Bossoutrot D., 1983: Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.). Z Pflanzenzuchtung 91: 74–77.

Kiszczak W., Burian M., Kowalska U., Górecka K., Podwyszyńska M. 2021: Production of Homozygous Red Beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) Plants by Ovule Culture. Methods in Molelucular Biology 2289: 301–312. doi: 10.1007/978-1-0716-1331-3_20. PMID: 34270079.

Kučera V., Vyvadilová M., Klíma M. 2002: Utilisation of doubled haploids in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) breeding. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 38: 50–54.

Pazuki A., Aflaki F., Gürel E., Ergül A., Gürel S. 2017: Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pretreatment. Sugar Tech. doi: 10.1007/s12355-017-0522-x

Stein M., Nothnagel T. 1995: Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). Plant Breeding, 114: 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00750.x

Zayachkovskaya T., Domblides E., Zayachkovsky V., Kan L., Domblides A., Soldatenko A. 2021: Production of Gynogenic Plants of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) in Unpollinated Ovule Culture In Vitro. Plants 10: 2703. https://doi.org/10.3390/plants10122703

Kontaktní adresa:
Ing. Hanna Rosokha
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
Telefon 233 022 368, hanna.rosokha@vurv.cz

Genetická diverzita genů fixace dusíku u jetele lučního (*Trifolium pratense* L.)

Genetic diversity of nitrogen fixation genes in red clover (*Trifolium pratense* L.)

Trněný O.[1], Dybová M.[1], Řepková J.[2], Šafář J.[3]

[1]*Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Troubsko*

[2]*Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Brno*

[3]*Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky, v. v. i., Olomouc*

Abstrakt

Porozumění genetickým faktorům ovlivňujícím symbiotickou fixaci dusíku u jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) je zásadní nejen pro hlubší pochopení tohoto procesu, ale i pro šlechtění nových odrůd s vylepšenou schopností fixovat dusík. Zvýšení využití symbiotických plodin a zlepšení efektivity fixace dusíku by mohlo výrazně snížit závislost na syntetických hnojivech a podpořit udržitelnější zemědělské postupy. Zatímco obecné mechanismy fixace dusíku jsou dobře prozkoumány u modelových rostlin, naše studie o genetické variabilitě a alelických variantách genů fixace u jetele lučního poskytuje jedinečné informace, které mohou být využity při šlechtění odrůd s lepší schopností fixovat dusík. Výzkum se zaměřil na analýzu genetické rozmanitosti genů fixace dusíku v rámci celého druhu. S použitím celogenomového sekvenování jsme zhodnotili genetickou diverzitu 173 genů spojených s fixací dusíku. Identifikované ortologní geny fixace dusíku představují významné cíle pro šlechtění zaměřené na zlepšení fixace dusíku. Naše výsledky ukazují složitou genetickou strukturu tohoto znaku u jetele lučního a také proměnlivost genetické diverzity těchto genů. Konzervativní geny fixace byly identifikovány jako klíčové pro samotný proces fixace dusíku, zatímco dalších pět skupin genů sdílí společnou evoluční historii, což naznačuje jejich funkční propojení.

Klíčová slova: Symbiotická fixace dusíku, jetel luční, genetická diverzita, ortologní geny fixace dusíku

Abstract

Understanding the genetic factors influencing symbiotic nitrogen fixation in red clover (*Trifolium pratense* L.) is crucial not only for a deeper comprehension of this process but also for breeding new cultivars with improved nitrogen fixation. Enhancing the use of symbiotic crops and improving nitrogen fixation efficiency could significantly reduce reliance on synthetic fertilizers and support more sustainable agricultural practices. While the general mechanisms of nitrogen fixation are well-studied in model species, our study on the genetic variability and allelic variants of nitrogen fixation genes in red clover offers unique insights that can be applied in the breeding of better nitrogen-fixing cultivars. The research focused on analyzing the genetic diversity of nitrogen fixation genes across the species. Using whole-genome resequencing, we assessed the genetic diversity of 173 nitrogen fixation-related genes. The identified orthologous nitrogen fixation genes represent important genomic targets for breeding aimed at improving nitrogen fixation. Our findings reveal a complex genetic architecture underlying this trait in red clover, as well as the variable genetic diversity of these genes. Conserved nitrogen fixation genes were identified as key for the fixation process itself, while five additional gene clusters share a common evolutionary history, suggesting their functional interconnectedness.

Keywords: Symbiotic nitrogen fixation, red clover, genetic diversity, orthologous nitrogen fixation genes

Úvod

Symbiotická fixace dusíku umožňuje vybraným druhům rostlin, včetně jetele lučního (*Trifolium pratense* L.), čerpat atmosférický dusík pro vegetativní i reprodukční růst. Tento proces, který zahrnuje vztah mezi rostlinami a dusík fixujícími bakteriemi (u jetele lučního se jedná o druh *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), se vyvíjel miliony let. Evoluce symbiotické fixace dusíku sahá až k společnému předkovi přibližně 100 milionů let nazpět, avšak opakované ztráty schopnosti symbioticky fixovat dusík v různých vývojových liniích naznačují, že selekční tlak nemusí být vždy dostatečný pro její udržení (Griesmann et al., 2018; Pi et al.,

2024).
Samotný proces symbiotické fixace vykazuje značnou variabilitu a přizpůsobivost v rámci jednotlivých vývojových větví. V rámci leguminóz byla v kořenových hlízkách zjištěna anatomická, morfologická a fyziologická diverzita, což odráží genetickou rozmanitost mezi leguminózami a rhizobii a jejich interakcemi s půdním prostředím (Reinprecht et al., 2020), a lze předpokládat genetickou diverzitu genetických mechanismů fixace dusíku i v rámci jednotlivých druhů. Variabilita a složitost tohoto mechanismu potvrzují dynamický vztah mezi genetikou a ekologií, který ovlivňuje symbiotickou fixaci dusíku. I přes identifikaci a mapování nižších stovek genů spojených s genetickým mechanismem fixace dusíku v hostitelských rostlinách (Roy et al., 2020) pomocí „přímé“ i „reverzní“ genetiky u modelových organismů je jasné, že v aktivním pletivu hlízek je exprimováno mnohem více klíčových genů (Roux et al., 2014; Libourel et al., 2023), jejichž funkce zatím nejsou dostatečně prozkoumány. Moderní metody umožnily podrobný popis exprese genů v jednotlivých pletivech a zónách hlízek (Schnabel et al., 2023) a dokonce v konkrétních typech buněk díky transkriptomice jednotlivých buněk (Ye et al., 2022; Pereira et al., 2024). Nicméně výzkum mutantních fenotypů a specifických genů fixace, proteinů a efektorů v modelových organismech zůstává i nadále středobodem genetického výzkumu (Roy et al., 2020). Analýza mutací genů v modelových druzích poskytuje cenné informace, ale opomíjí přirozenou variabilitu genových sekvencí a evoluční vztahy, které ovlivňují fenotypové znaky v přirozených podmínkách. Skutečné projevy komplexních znaků překračují tyto zjednodušené modely a spíše odpovídají omnigenímu modelu vysoce polygenních znaků (Sinnott-Armstrong et al., 2021), avšak studium genetické diverzity fixace dusíku je málo popsané, zejména na úrovni vnitrodruhové variability.
V praxi je důležité zkoumat genetické mechanismy u nemodelových rostlinných druhů, zejména u významných hospodářských plodin, jako je jetel luční, což může přinést výhody pro pěstování a šlechtění nových odrůd se zvýšenou úrovní fixace dusíku. V naší studii bylo využito resekvenování celého genomu 471 rostlin jetele lučního, které odrážejí druhovou rozmanitost jetele luční a na základě informací z modelových organismů a transkriptomických studií jsme identifikovali ortologní geny zodpovědné za fixaci dusíku v genomu jetele lučního a popsali jejich genetickou variabilitu.

Materiál a metody
Celogenomové resekvenování bylo provedeno na DNA knihovnách rostlin (Trněný, 2024) reprezentujících genetickou diverzitu druhu *Trifolium pratense* (Kouamé a Quesenberry, 1993; Vymyslický, 2012) v počtu 471 jedinců. Rostliny byly vybrány zejména z populací získaných ze semenných sbírek Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., Česká republika, a ze sbírky USDA, USA. Knihovny byly připraveny pomocí TruSeqPCR a sekvenovány na sekvenátoru NovaSeq 6000 (Illumina, USA). Sekvence byly bioinformaticky zpracovány: přečištěny (BBTolls v38.73; Picard Toolkit, 2019), pomocí minimap2 (Li, 2021) mapovány na referenční genom ARS_RC_1.1 (RefSeqGCF_020283565.1), filtrovány pomocí SAMtools v1.13 (Danecek et al., 2021) a polymorfismy byly zpracovány pomocí ANGSDv0.941 (Korneliussen et al., 2014). Dále byl vybrán soubor genů pro fixaci dusíku, aby bylo možné analyzovat jejich diverzitu, alelické vztahy a jejich souvislost s fixací dusíku. Tento výběr vycházel z ortologů *Medicago truncatula* v genomu jetele lučního dle práce Roy et al. (2020), která poskytla přehledný seznam dosud popsaných genů pro symbiotickou fixaci dusíku. Ortologní geny byly identifikovány pomocí nástroje OrthoFinder (Emms a Kelly, 2019), který porovnával sekvence proteinů z *M. truncatula* (mt4.0v2) se sekvencemi jetele lučního. K vygenerování konsenzuální sekvence ortologních genů fixace byl použit software ANGSDv0.941, pro heterozygotní polymorfismy byly použity symboly IUPAC. Vícenásobné zarovnání sekvencí bylo provedeno pro 207 genů fixace dusíku pomocí MAFFT (Katoh a Standley, 2013), přičemž byly vyloučeny

sekvence s více než 30 % mezerami, s výjimkou sekvence pro zajištění outgroup z *Trifolium repens* L. Fylogenetické stromy maximální věrohodnosti byly sestaveny pomocí IQ-TREE2 (Nguyen et al., 2015) s bootstrapovým hodnocením spolehlivosti. Matice vzdáleností jednotlivých stromů genů fixace počítaná dle Robinson-Fouldsovy metody byla analyzována pomocí vícerozměrného škálování (MDS) a k-means shlukování. Diverzita genů byla hodnocena pomocí průměrné entropie a identity sekvencí. Geny s nižší, než průměrnou entropií byly identifikovány jako potenciálně konzervované.

Výsledky

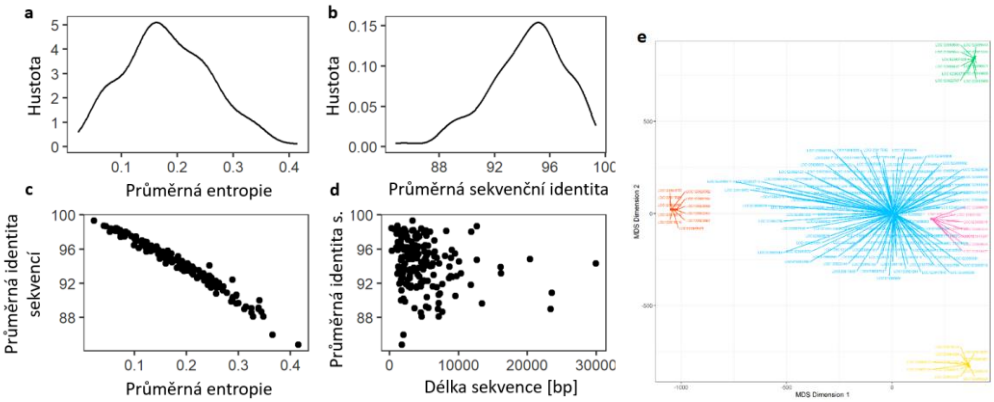
V referenčním genomu jetele lučního ARS_RC_1.1 jsme identifikovali 173 ortologních genů souvisejících se symbiotickou fixací dusíku, jak byly uvedeny v Roy et al. (2020). Diverzita těchto genů byla kvantifikována pomocí průměrné entropie a průměrné identity sekvencí (Obrázek 1) vypočtených z vícenásobného zarovnání sekvencí genů.

Na základě kritéria průměrné entropie mínus jedna směrodatná odchylka byly identifikovány nejvíce konzervované geny s mezní hodnotou průměrné entropie menší než 0,106 (Tabulka 11). Bylo zjištěno, že 31 z těchto genů fixace dusíku je vysoce konzervovaných napříč jednotlivci v rámci druhu (Tabulka 1). Mezi vysoce konzervovanými geny jsou ortologní geny různých funkčně charakterizovaných genů v kontextu fixace dusíku.

Abychom prozkoumali evoluční historii genů fixace dusíku, zkonstruovali jsme fylogenetické stromy metodou maximální věrohodnosti. Mezi jednotlivými fylogenetickými stromy byla vypočítána vzájemná vzdálenost dle Robinson-Foulds metody a bylo vytvořeno vícerozměrné škálování vzdáleností stromů (Obrázek 1e). Shlukování k-means odhalilo pět hlavních genových klastrů K1 až K5 (Obrázek 1e), pro které byly vybrány reprezentující geny (Tabulka 2) na základě nejnižší průměrné sekvenční identity v rámci vícenásobného zarovnání sekvencí v rámci klastrů. Rozřazení do klusterů naznačuje společné evoluční trajektorie a provázané funkce genů fixace dusíku.

Tabulka 1 Konzervované geny fixace dusíku u jetele lučního (geny s průměrnou entropii < 0,106).

Gen fixace dusíku ARS_RC_1.1	Identita [%]	Entropie	Ortologní gen	Anotace
LOC123902998	99.3	0.022	GmGγ1 – Gγ10	Sójové heterotrimerní G-proteiny (GmGγ1 – Gγ10)
LOC123902594	98.7	0.041	pvNod22	nodulin 22 u fazole obecné
LOC123902867	98.7	0.045	MsNADH-GOGAT	GLUTAMIN SYNTETÁZA(GS)/NADH-dependentní GLUTAMÁT SYNTÁZA (NADH-GOGAT)
LOC123914762	98.0	0.053	MtMOT1.2	MOLYBDÁTOVÝ TRANSPORTÉR TYPU 1.2
LOC123910808	98.4	0.054	GmINS1	ZVĚTŠOVÁNÍ VELIKOSTI HLÍZEK 1 (INS1)
LOC123919517	98.2	0.058	MtARF16a	AUXIN RESPONSE FACTOR 16a (ARF16a)
LOC123902449	98.2	0.060	LjERF1	FAKTOR REAKCE NA ETHYLEN 1 (ERF1)
LOC123905625	98.2	0.062	MtNIP/MtLATD/ MtNPF1.7	DEFEKT LATERÁLNÍHO KOŘENOVÉHO ORGÁNU (NIP/LATD)
LOC123883062	98.3	0.062	MtNSP1	SIGNÁLNÍ DRÁHA NODULACE 1 (NSP1)
LOC123912411	98.1	0.064	MtLIN, LjLIN	LUMPY InfectionS (LIN)
LOC123920638	98.4	0.065	MtN5	NODULIN 5 (N5)
LOC123889481	98.4	0.068	MtRSD	REGULÁTOR DIFERENCIACE SYMBIOSOMŮ (RSD)
LOC123907118	98.2	0.068	MtCNGC15a	CYKLICKÉ NUKLEOTIDEM HRAZENÉ KANÁLY 15A
LOC123908468	98.0	0.072	GmBEHL1	BES1/BZR1 HOMOLOG LIKE1
LOC123899392	98.2	0.073	LjSUNER1	SUNERGOS 1
LOC123915616	97.4	0.073	LjCHIT5	CHITINÁZA 5 (CHIT5)
LOC123919586	97.9	0.073	MtSYT	SYNAPTOGAMIN (SYT1/SYT2/SYT3)
LOC123920528	98.0	0.075	MtDME	DEMETER (DME)
LOC123902257	97.5	0.076	LjAMT1.1	TRANSPORTÉR AMONIAKU 1.1 (AMT1.1)
LOC123911112	97.5	0.080	LjNRSYM1	SYMBIÓZA NEREAGUJÍCÍ NA DUSIČNANY 1 (NRSYM1)
LOC123921190	97.5	0.081	LjSIP2	SYMRK INTERAGUJÍCÍ PROTEIN 2 (SIP2)
LOC123915527	97.5	0.081	MtKNAT3/5/9/10	KNOTTED-1 LIKE TAKE HOMEDOMAIN (3/5/9/10)
LOC123899244	98.0	0.084	LjSIP1	SYMRK INTERAGUJÍCÍ PROTEIN 1 (SIP1)
LOC123918708	97.8	0.084	LjSEN1	STACIONÁRNÍ ENDOSYMBIONTNÍ NODULE1 (SEN1)
LOC123923311	97.8	0.088	LjSIE3	SYMRK INTERAGUJÍCÍ E3 UBIKVITIN LIGÁZA (SIE3)
LOC123913922	97.5	0.094	LjHAR1	NADPOČETNÉ ČÍSLO NODULŮ (SUNN)
LOC123916628	96.5	0.100	GmGα	Sójové heterotrimerní G-proteiny (Ga)
LOC123910869	97.2	0.100	LjKLV	KLAVIER (KLV)
LOC123882862	97.1	0.102	MtVPY	VAPYRIN (VPY)
LOC123888513	97.5	0.103	GmACP	ACYL CARRIER PROTEIN (ACP)
LOC123919627	96.9	0.105	LjNENA	HYDROLÁZA NOD FAKTORU 1 (NFH1)



Obrázek 1: Rozložení průměrné entropie (a) a průměrné identity sekvencí (b) získaných z vícenásobného zarovnání sekvencí genů fixace dusíku, (c) negativní korelace mezi entropií a průměrnou identitou sekvence. (d) vztah mezi délkou genu a průměrnou sekvenční identitou. (e) Vícerozměrné škálování vzdáleností fylogenetických

stromů genů fixace dusíku s barevným rozlišením klusterů dle k-means.

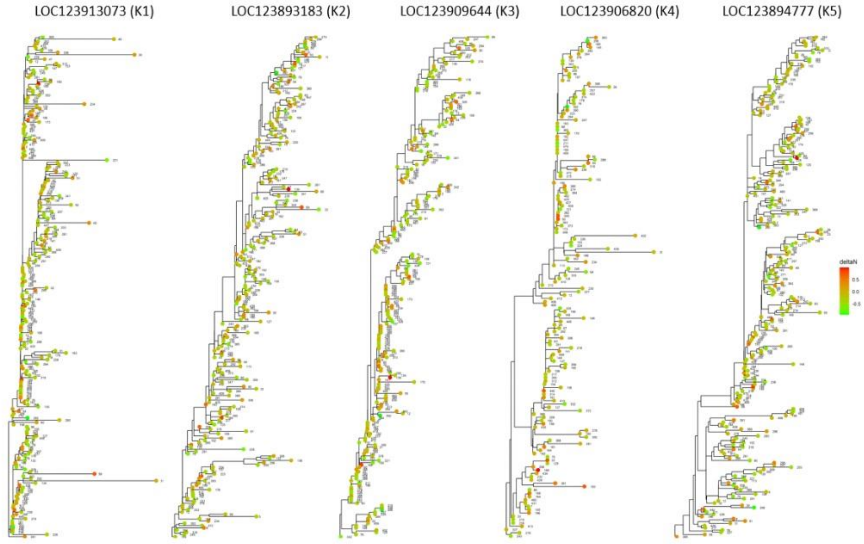
Pro další zkoumání rozmanitosti v rámci každého shluku byl pro každý shluk vybrán reprezentativní fylogenetický strom (Tabulka 2) na základě minimalizace průměrné sekvenční identity v rámci shluků. Tento výběr zajišťuje, že vybrané fylogenetické stromy zahrnují co nejširší evoluční rozpětí v rámci příslušných shluků. Jako zástupce klastrů byly vybrány s tímto kritériem ortology k *MtSYT* (K1), *MtNOOT* (K2), *GmRj4*(K3), *MtMMPL*(K4) a *MtRPG*(K5).

Tabulka 2: Reprezentativní geny fixace dusíku pro klastry K1 až K5 vybrané na základě nejnižší průměrné sekvenční identity vícenásobného zarovnání sekvencí v rámci klastrů.

Klastr K	Zástupce klastru	Ortolog genu fixace	Anotace
K1 (žlutá)	*LOC123913073*	*MtSYT1/MtSYT2; MtSYT2/MtSYT3*	SYNAPTOGAMIN
K2 (růžová)	*LOC123893183*	*MtNOOT*	NODULE ROOT
K3 (zelená)	*LOC123909644*	*GmRj4*	REGULATORY GENE
K4 (modrá)	*LOC123906820*	*MtMMPL*	MATRIX METALLOENDOPROTEINASE LIKE
K5 (oranžová)	*LOC123894777*	*MtRPG*	RHIZOBIUM-DIRECTED POLAR GROWTH

Pro pět hlavních evolučních cest genů fixace dusíku v rámci druhu, které odpovídají klusterům K1 až K5 byly vybrány zastupující stromy (Obrázek 2). Každý reprezentující strom klusteru odpovídá konkrétnímu klastru definovanému k-means shlukovou analýzou na základě Robinson-Fouldsových vzdáleností mezi stromy. Tyto stromy poskytují vhled do struktury variability klíčových genetických prvků fixace dusíku napříč různými genotypy jetele lučního a podtrhují složitost genetické variability různých genů v kontextu jejich příslušných klastrů.

Obrázek 2: Fylogenetické stromy s maximální věrohodností reprezentativních genů fixace dusíku vybrané na základě nejnižší průměrné sekvenční identity vícenásobného zarovnání sekvencí v rámci klastrů. Barevná škála ukazuje efektivitu fixace dusíku genotypů deltaN měřenou poměreme stabilních izotopů dusíku, nižší hodnota deltaN naznačuje vyšší podíl fixovaného dusíku v biomase genotypu (převzato z Trněný et al. 2024).



Diskuse

Charakteristickým rysem genetické diverzity jetele lučního je vysoká heterozygotnost, která je důsledkem jeho převážně cizosprašného způsobu rozmnožování. Analýza genetické diverzity jetele lučního odhalila, že více než polovina genetické variability (přes 50 %) se nachází uvnitř jednotlivých populací. Naopak, rozdíly mezi genetickými skupinami a původy v rámci těchto

skupin představují menší podíl variability (Jones et al., 2020). Ze zjištění vyplývá, že genotypy na individuální úrovni mají zásadní vliv na genetickou diverzitu, a proto nelze považovat populace jetele lučního za homogenní celky, a studie genetické diverzity genů je třeba hodnotit na úrovni jedinců. Význam genetické diverzity souvisí s jejím vlivem na přežití a reprodukci jednotlivců. Alely zvyšující fitness jedince mají vyšší šanci na pozitivní selekci, což může vést k jejich rozšíření v populaci, kdežto negativní účinek alel je předmětem negativní selekce, a v jistých případech též selekce stabilizující. Na druhou stranu i alely výrazně neovlivňující fitness mohou být fixovány náhodně následkem genetického driftu (Coyne et al., 2020; Teixeira a Huber, 2021).

Funkční genetická rozmanitost je klíčová pro schopnost druhů adaptovat se a přežít v měnícím se prostředí. Tato rozmanitost umožňuje druhům efektivně reagovat na nové podmínky, zvyšuje jejich odolnost vůči stresovým faktorům, a tím podporuje úspěšnost v reprodukci. V oblasti fixace dusíku hraje funkční diverzita také zásadní roli při vytváření a udržování selektivní rovnováhy. I když se počet hlízek na kořenech rostlin může měnit, rostliny s nadměrným množstvím hlízek neprokazují lepší schopnost fixovat dusík. Tento jev lze vysvětlit zvýšenými energetickými nároky, které jsou spojeny s udržováním činnosti hlízek a regulací procesu fixace (Ferguson et al., 2019). Některé geny v naší studii vykazují konzervativní charakter sekvencí, což naznačuje, že jejich funkční rozmanitost není tak zásadní, i když hrají důležitou roli v procesu symbiotické fixace dusíku. Naopak variabilita v sekvencích genů odráží funkční rozmanitost, která je předpokladem adaptace na různé environmentální podmínky. Trněný et al. (2019) prokázali, že funkční variabilita v genech zodpovědných za fixaci dusíku, může výrazně ovlivnit její účinnost. U jetele lučního byly popsány konkrétní benefitní alely genů, které mohou optimalizovat fixaci dusíku, čímž zvyšují příjem a využití dusíku rostlinami, zejména v prostředí s omezenou dostupností živin. Studie dalších autorů zaměřující se na soubory genů odpovědných za fixaci dusíku naznačují, že tyto geny sdílejí společnou evoluční historii a mají funkčně významnou roli. To může vést k novým přístupům k pochopení genetických a evolučních základů fixace dusíku nejen u jetele, ale také u dalších druhů (Henson et al., 2004; Vlk et al., 2022; Nzepang et al., 2023). Prezentované výsledky rozebírají hlouběji genetickou diverzitu na úrovni rozmanitosti sekvencí DNA a ukazují, že i v rámci genetického mechanismu podmiňujícího symbiotickou fixaci dusíku jsou odlišné skupiny genů, které mají různou evoluční trajektorii, v důsledku odlišnou variabilitu sekvencí. Další podrobné studie se zaměřují na kvantifikaci efektů specifických DNA polymorfismů, které jsou spojeny s vyšší efektivitou fixace dusíku. Tyto výzkumy se věnují funkční genetické diverzitě a mapování znaků fixace dusíku u jetele lučního (Trněný et al., 2019; Trněný, 2024) a zkoumají jejich potenciální aplikace pro efektivnější šlechtění prostřednictvím markery asistované selekce.

Závěr

V referenčním genomu jetele lučního byl nalezen soubor 173 ortologních genů, které mají známou roli v procesu symbiotické fixace dusíku. Rozmanitost těchto genů byla změřena prostřednictvím průměrné entropie a průměrné sekvenční identity, přičemž 31 z analyzovaných genů se ukázalo jako vysoce konzervovaných v rámci genetické diverzity druhu. Evoluční historie genů zapojených do fixace dusíku byla prozkoumána pomocí sestavení fylogenetických stromů pro skupiny ortologních genů za využití metody maximální věrohodnosti. Analýza shlukování založená na Robinson-Fouldsově vzdálenosti a následná vizualizace pomocí MDS analýzy odhalily pět hlavních shluků genů, které naznačují jejich společné evoluční dráhy a funkce.

Literatura

Coyne, C. J., Kumar, S., von Wettberg, E. J. B., Marques, E., Berger, J. D., Redden, R. J., et al. (2020). Potential and limits of exploitation of crop wild relatives for pea, lentil, and chickpea improvement. *Legume Science* 2, e36. doi: 10.1002/leg3.36

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., et al. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10, giab008. doi: 10.1093/gigascience/giab008

Emms, D. M. a Kelly, S. (2019). OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol* 20, 238. doi: 10.1186/s13059-019-1832-y

Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., et al. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment* 42, 41–51. doi: 10.1111/pce.13348

Griesmann, M., Chang, Y., Liu, X., Song, Y., Haberer, G., Crook, M. B., et al. (2018). Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* 361, 1–18. doi: 10.1126/science.aat1743

Henson, B. J., Watson, L. a Barnum, S. R. (2004). The Evolutionary History of Nitrogen Fixation, as Assessed by NifD. *Journal of Molecular Evolution* 58, 390–399. doi: 10.1007/s00239-003-2560-0

Jones, C., De Vega, J., Lloyd, D., Hegarty, M., Ayling, S., Powell, W., et al. (2020). Population structure and genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) germplasm. *Sci Rep* 10, 8364. doi: 10.1038/s41598-020-64989-z

Katoh, K. a Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010

Korneliussen, T. S., Albrechtsen, A. a Nielsen, R. (2014). ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics* 15, 356. doi: 10.1186/s12859-014-0356-4

Kouamé, C. N. a Quesenberry, K. H. (1993). Cluster analysis of a world collection of red clover germplasm. *Genet Resour Crop Evol* 40, 39–47. doi: 10.1007/BF00053463

Li, H. (2021). New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics* 37, 4572–4574. doi: 10.1093/bioinformatics/btab705

Libourel, C., Keller, J., Brichet, L., Cazalé, A.-C., Carrère, S., Vernié, T., et al. (2023). Comparative phylotranscriptomics reveals ancestral and derived root nodule symbiosis programmes. *Nature Plants* 9, 1067. doi: 10.1038/s41477-023-01441-w

Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. a Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32, 268–274. doi: 10.1093/molbev/msu300

Nzepang, D. T., Gully, D., Nguepjop, J. R., Zaiya Zazou, A., Tossim, H.-A., Sambou, A., et al. (2023). Mapping of QTLs Associated with Biological Nitrogen Fixation Traits in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using an Interspecific Population Derived from the Cross between the Cultivated Species and Its Wild Ancestors. *Genes (Basel)* 14, 797. doi: 10.3390/genes14040797

Pereira, W. J., Boyd, J., Conde, D., Triozzi, P. M., Balmant, K. M., Dervinis, C., et al. (2024). The single-cell transcriptome program of nodule development cellular lineages in *Medicago truncatula*. *Cell Reports* 43. doi: 10.1016/j.celrep.2024.113747

Pi, H.-W., Chiang, Y.-R. a Li, W.-H. (2024). Mapping Geological Events and Nitrogen Fixation Evolution Onto the Timetree of the Evolution of Nitrogen-Fixation Genes. *Mol Biol Evol* 41, msae023. doi: 10.1093/molbev/msae023

Reinprecht, Y., Schram, L., Marsolais, F., Smith, T. H., Hill, B. a Pauls, K. P. (2020). Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation in Common Bean Production. *Frontiers in Plant Science* 11. Available at: https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.01172 (Accessed February 23, 2024).

Roux, B., Rodde, N., ßoise Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., et al. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. doi: 10.1111/tpj.12442

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., et al. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* 32, 15–41. doi: 10.1105/tpc.19.00279

Schnabel, E., Thomas, J., El-Hawaz, R., Gao, Y., Poehlman, W. L., Chavan, S., et al. (2023). Laser Capture Microdissection Transcriptome Reveals Spatiotemporal Tissue Gene Expression Patterns of *Medicago truncatula* Roots Responding to Rhizobia. *MPMI* 36, 805–820. doi: 10.1094/MPMI-03-23-0029-R

Sinnott-Armstrong, N., Naqvi, S., Rivas, M. a Pritchard, J. K. (2021). GWAS of three molecular traits highlights core genes and pathways alongside a highly polygenic background. *eLife* 10, e58615. doi: 10.7554/eLife.58615

Teixeira, J. C. a Huber, C. D. (2021). The inflated significance of neutral genetic diversity in conservation genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2015096118. doi: 10.1073/pnas.2015096118

Trněný, O. (2024). Studium funkce a variability klíčových genů pro fixaci vzdušného dusíku u Trifolium pratense. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Available at: https://theses.cz/id/e495d0/ (Accessed

November 5, 2024).

Trněný, O., Vlk, D., Macková, E., Matoušková, M., Řepková, J., Nedělník, J., et al. (2019). Allelic variants for candidate nitrogen fixation genes revealed by sequencing in red clover (Trifolium pratense L.). *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1–26. doi: 10.3390/ijms20215470

Vlk, D., Trněný, O. a Řepková, J. (2022). Genes Associated with Biological Nitrogen Fixation Efficiency Identified Using RNA Sequencing in Red Clover (Trifolium pratense L.). *Life* 12, 1975. doi: 10.3390/life12121975

Vymyslický (2012). Evaluation of the Czech core collection of *Trifolium pratense*, including morphological, molecular and phytopathological data. *Afr. J. Biotechnol.* 11. doi: 10.5897/AJB11.3085

Ye, Q., Zhu, F., Sun, F., Wang, T.-C., Wu, J., Liu, P., et al. (2022). Differentiation trajectories and biofunctions of symbiotic and un-symbiotic fate cells in root nodules of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant* 15, 1852–1867. doi: 10.1016/j.molp.2022.10.019

Poděkování

Výzkum byl podpořen instituciální podporou DKRVO pro Zemědělský výzkum spol. s r. o (MZE-RO1723) financovanou Ministerstvem zemědělství ČR.

Kontakt:

Ing. Oldřich Trněný, Ph. D.
Zemědělský výzkum, spol. s r. o.
Zahradní 400/1, 664 41 Troubsko
+420 547 138 808, trneny@vupt.cz

2. Rostlinolékařství

Testování účinnosti silic a jejich složek proti bakterii *Pectobacterium atrosepticum* na hlízách bramboru

Efficacy of essential oils and essential oil components against *Pectobacterium atrosepticum* on potato tubers

Jílková B.[1], Víchová J. [1], Michutová M.[1], Pokorný R.[1], Kmoch M. [2]

[1]Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně; [2] Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Abstrakt

Bakterie *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) je jednou z původců měkké hniloby hlíz bramboru způsobující ztráty na kvalitě i kvantitě hlíz již za vegetace a následně po sklizni a v době skladování. V *in vitro* a také v *in vivo* testech byla zjišťována účinnost silic z dobromysli obecné, máty peprné, skořicovníku čínského a složek carvacrolu, cinnamaldehydu a L-menthonu proti bakterii *Pa*. V testech byla prokázána antibakteriální účinnost všech silic/složek silic. Za teploty skladování 22 ± 2 °C byla nejvyšší účinnost (>88 %) u moření silicí ze skořicovníku a také u cinnamaldehydu, u fumigace nejvyšší účinnost dosahovala 82 % (carvacrol). Při 15 °C byla nejvyšší účinnost (>81 %) u moření silicemi z máty a skořicovníku, ale za fumigace byly hodnoty účinnosti pouze do 61 % (silice ze skořicovníku). Moření bylo za daných testovaných podmínek účinnější než fumigace. Předskladovací moření silicemi ze skořicovníku a máty lze doporučit jako ekologickou variantu ošetření.

Klíčová slova: *in vivo* testování, fumigace, minimální inhibiční koncentrace, měkká hniloba, moření

Abstract

Pectobacterium atrosepticum is the causal agent of soft rot of potato tubers, which causes quality and quantity losses during the growing season, harvest and storage. *In vitro* and *in vivo* tests were carried out to evaluate the efficacy of essential oils of oregano, peppermint, cinnamon and the components carvacrol, cinnamaldehyde and L-menthone against *Pa*. The antibacterial activity of all essential oils/components was demonstrated. At a storage temperature of 22 ± 2 °C, the highest efficacy (>88%) was observed for cinnamon oil pickling and also for cinnamaldehyde, while the highest efficacy was 82% for fumigation (carvacrol). At 15 °C, the highest efficiencies (>81%) were obtained with mint and cinnamon oil pickling, while fumigation only achieved efficiencies up to 61% (cinnamon oil). Pickling was more effective than fumigation under the conditions tested. Cinnamon and mint oil pickling can be recommended as an environmentally friendly control option during tuber regeneration.

Keywords: *in vivo* condition, fumigation, minimum inhibitory concentration, soft rot, pickling

Úvod

Jedním z patogenů bramboru (*Solanum tuberosum* L.) je bakterie *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall, 1902) Garden et al., 2003, syn. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall, 1902) Dye 1969 (*Pa*), která způsobuje bakteriální černání stonku a měkkou hnilobu hlíz bramboru. Toto onemocnění může být však způsobeno i jinými pektinolytickými bakteriemi – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben et al., 1999 emend. Gardan et al., 2003, syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones 1901) Bargey et al., 1923 (*Pcc*) či *Dickeya* spp. *P. atrosepticum* je fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie s peritrichálně uspořádanými bičíky. Má G^- reakci a nevytváří spory. Na kultivačním médiu tvoří hladké krémové kolonie (Charkowski, 2006). Bakterie produkuje pektinolytické enzymy, celulázu, hemicelulázy, arabanázy a proteázu. Tyto enzymy degradují buněčné stěny rostlinných buněk, dochází k tzv. maceraci pletiv (Hossain et al., 2005).

Nejvýznamnějším zdrojem infekce bývají hlízy bramboru, na kterých patogen přežívá v lenticelách či v cévních svazcích, půda, rostlinné zbytky a kontaminovaná závlahová voda (Czajkowski et al., 2011). Příznaky měkké hniloby hlíz se mohou projevit již v půdě, následně i v průběhu sklizně a skladování. Napadené hlízy jsou charakteristické hnilobným zápachem. Při napadení přes lenticely se jejich okolí zabarvuje hnědými, vodnatými, propadajícími se lézemi. Při systémovém napadení se první příznaky projevují v pupkové části hlízy hnědnutím v místě napojení na stolon. V dužnině dochází k hnědnutí a rozkladu cévních svazků a postupné maceraci přecházející z krémové do tmavě hnědé až černé hmoty s polotuhou konzistencí (Rasocha et al., 2008; Víchová, 2020).

Šíření měkké hniloby ve skladech může způsobit ztráty až 30 % na množství a kvalitě skladovaných hlíz (Malko et al., 2019). Velmi důležitou roli hraje preventivní ochrana, především naskladňování suchých hlíz a pravidelné větrání skladovacích prostor (Víchová, 2020). Chemická ochrana je značně omezena. V Registru přípravků na ochranu rostlin jsou povoleny pouze přípravky s účinnou látkou hydroxid měďnatý. Pro zlepšení odolnosti rostlin jsou také povoleny přípravky s účinnými látkami chitosan a chitosan hydrochlorid. Jednou z možností ochrany, která je i zároveň šetrná k životnímu prostředí, je ošetření rostlinnými silicemi či jejich složkami. Proti pektinolytickým bakteriím byly *in vitro* potvrzeny účinky např. silic ze skořicovníku čínského (*Cinnamomum cassia* L.*)*, skořicovníku ceylonského (*Cinnamomum zeylanicum* Blume*)*, dobromysli obecné *(Origanum vulgare* L.*)*, tymiánu obecného *(Thymus vulgaris* L.*)*, máty peprné (*Mentha piperita* L.), kmínu kořenného *(Carum carvi* L.*)* a složek silic, např. carvacrolu, cinnamaldehydu, D-carvonu, L-menthonu a thymolu (Víchová et al., 2024; Jílková et al., 2024).

Materiál a metody

Bakteriální kmen

Bakterie *Pectobacterium atrosepticum* (agresivní kmen CPPB 81) byla zakoupena ze Sbírky fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v.v.i., Praha). Bakteriální kmen byl kultivovány na King B agaru (HiMedia, Indie) při optimální teplotě pro růst a rozmnožování bakterie 26 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace $1{,}5 \times 10^8$ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru (Den-1 McFarland Densitometer, BioSan, Lotyšsko).

Silice a složky silic

Do pokusů byly zařazeny silice ze skořicovníku čínského, máty peprné a dobromysle obecné a čisté složky silic carvacrol, cinnamaldehyde (≥95%, W228613-100G-K; Sigma-Aldrich, Německo) a L-menthone (≥96%; W266701-1KG-K; Sigma-Aldrich, Německo). Silice a carvacrol byly dodány firmou M+H Míča&Harašta s.r.o. (Česká republika) ve ≤100% čistotě. Silice ze skořicovníku čínského a cinnamaldehydu slouží v naší laboratoři jako pozitivní kontroly pro *in vitro* testy.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) – *in vitro* test

Metodika byla převzata od Hajian-Maleki et al. (2021) a EUCAST (2003) a modifikována dle testovaných podmínek.

Bakteriální suspenze byla připravena v Mueller Hinton Broth (MHB, HiMedia, Indie). Silice a složky silic byly ředěny 96% ethanolem pro získání základní koncentrace 100 µl/ml a pro lepší homogenitu bylo přidáno několika kapek Tween 20 (0.01% [w/v]) (Merck KGaA, Německo). Další koncentrace (75; 50; 25; 10; 5; 3; 2,5; 1,5; 0,5 µl/ml) byly připraveny ze základního ředění přidáním MHB a několika kapek Tween 20. Roztoky byly připraveny 1,1× koncentrovanější z důvodu přidání bakteriálního inokula.

Vzhledem k těkavosti silic/složek silic bylo zvoleno testování v 0,2 ml PCR mikrozkumavkách, do kterých bylo pipetováno 135 µl roztoku silice/složky silice v daných koncentracích a 15 µl bakteriálního inokula. Testování probíhalo ve čtyřech opakováních. Byly také připraveny

kontrolní varianty – negativní kontrola bakteriálního inokula, pozitivní kontrola (silice ze skořicovníku čínského či cinnamaldehydu ve zvolené koncentrační řadě), kontrola čistoty MHB, kontrola čistoty silice/složky silice v dané koncentraci. Destička s mikrozkumavkami byla zabalena do fólie a inkubována při optimální teplotě pro růst bakterie s nepřetržitým třepáním při rychlosti 100 rpm. Po 24 h třepání bylo do jednotlivých vzorků pipetováno 15 µl 0,01% roztoku barviva resazurinu (Merck KGaA, Německo), jehož změna zabarvení v roztoku sloužila jako indikátor živých bakteriálních buněk. Metodika byla částečně převzata od Mann a Markham (1998). Vzorky byly opět zabaleny do fólie a inkubovány další 2 h při optimální teplotě pro růst bakterie s nepřetržitým třepáním při rychlosti 120 rpm. Poté byly hodnoceny barevné změny vzorků oproti kontrolám. Fialové až růžové zbarvení testovaného vzorku znamenalo přítomnost živých bakterií, modré zbarvení znamenalo přítomnost mrtvých bakterií. Poslední koncentrace, u které bylo zjištěno modré zabarvení, byla hodnocena jako MIC.

In vivo testování

Do *in vivo* testování byly vybrány dvě odrůdy: odrůda 'Red Anna' o velikosti hlíz 30–38 mm (Vesa Velhartice, a.s., Česká republika) a odrůda 'Antonia' o velikosti hlíz 35–40 mm (Ovo-Sadba spol. s r. o., Česká republika). Testy byly založeny po 6 hlízách ve dvou opakováních s kontrolou růstu inokula bakterie. Hlízy byly nejprve povrchově desinfikovány 0,7% chlornanem sodným (SAVO, Česká republika) a 2× důkladně opláchnuty destilovanou vodou. Do hlíz byly udělány sterilní kovovou tyčinkou dva protilehlé vpichy o průměru 2 mm a hloubce 4 mm. Po ošetření mořením či při fumigaci byly hlízy inkubovány buď při teplotě 22 ± 2 °C, či 15 °C v temné místnosti. Po 7–10 dnech byly hlízy podélně rozříznuty přes místa poranění a hnilobné plochy byly vyfotografovány. Vyhodnocení velikosti hnilobné plochy bylo provedeno pomocí obrazové analýzy programem Assess 2.0 (APS Press, USA).

Preventivní ošetření máčením

Metodika byla částečně převzata od Hajian-Maleki et al. (2021). Poraněné hlízy byly máčeny na 20 min v silici/složce silice ve stanovené MIC a poté se nechaly oschnout. Po oschnutí bylo do ran pipetováno 15 µl bakteriálního inokula. Hlízy byly umístěny do krabice a uzavřeny víkem. Další postup *viz výše*.

Preventivní ošetření oplachem

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

Fumigace

Metodika byla částečně převzata od Song et al. (2009) a Perumal et al. (2017). Do ran v hlízách bylo pipetováno 15 µl bakteriálního inokula. Hlízy byly umístěny do krabice. Do krabice byla také vložena otevřená Petriho miska s buničitou vatou, na kterou byla pipetována neředěná silice/složka silice. Množství silice/složky silice bylo přepočítáno na objem použité krabice, tak aby bylo splněno množství 100 ml/m^3. Krabice byly uzavřeny víkem. Víko bylo ještě po obvodu fixováno parafilmem. Další postup *viz výše*.

Výsledky

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) – *in vitro* test

Nejnižší a zároveň totožná MIC byla zjištěna u silice ze skořicovníku čínského a její složky cinnamaldehydu (Tab. 1), které v testu sloužily jako pozitivní kontroly. Silice z máty peprné měla MIC vyšší než její složka L-menthone, naopak silice z dobromysli obecné měla MIC nižší než její složka carvacrol. Získané koncentrace MIC byly dále testovány v *in vivo* podmínkách.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace pro silice a složky silic

Silice/složka silice	Minimální inhibiční koncentrace (µl/ml)
dobromysl obecná	2,5
máta peprná	3
skořicovník čínský*	< 0,5
carvacrol	10
cinnamaldehyde*	< 0,5
L-menthone	2,5

** v laboratoři ÚPŠRR MENDELU slouží jako pozitivní kontroly pro in vitro testy*

In *vivo* testování – ošetření mořením

Z průměrné plochy hnilobné léze byla spočítána účinnost jednotlivých silic/složek silic vzhledem k průměrné ploše hnilobné léze kontroly inokula *Pa* (PLI). Pro teplotu skladování 22 ± 2 °C byla PLI pro odrůdu 'Red Anna' 11,4 cm^2 a pro odrůdu 'Antonia' 10,2 cm^2 a pro teplotu 15 °C 10,3 cm^2 u odrůdy 'Red Anna' a 8,1 cm^2 u odrůdy 'Antonia'.

Při hodnocení účinnosti silic/složek silic po teplotě skladování 22 ± 2 °C Tukey HSD testem při hladině významnosti $p \leq 0,5$ bylo zjištěno, že mezi účinností preventivních ošetření máčením (83,8 %) a oplachem (84,6 %) nebyly zaznamenány průkazné rozdíly, stejně tak se ani nelišily účinnosti u odrůd 'Red Anna' (83 %) a 'Antonia' (85,4 %). Významné rozdíly však byly prokázány mezi účinností jednotlivých silic/složek silic, a to mezi silicí z dobromysli obecné a silicí ze skořicovníku čínského a cinnamaldehydu (Tab. 2). Po skladování ošetřených hlíz při teplotě 15 °C byla Tukey HSD testem ($p \leq 0,5$) prokázána významná rozdílnost mezi máčením (81 %) a oplachem (70 %). Průkazné rozdíly byly také v účinnosti jednotlivých silic/složek silic (Tab. 2). Nejvyšší účinnost měla silice z máty peprné (89,4 %), nejnižší silice z dobromysli obecné (64,9 %).

Tabulka 2: Účinnost silic a složek silic při preventivním ošetření máčením a oplachem za dané teploty skladování

Silice/složka silice	Účinnost – moření (%)[1)]	
	Teplota 22 ± 2 °C	Teplota 15 °C
dobromysl obecná	72,09[a]	64,91[a]
máta peprná	87,03[ab]	89,36[c]
skořicovník čínský	90,94[b]	81,89[bc]
carvacrol	80,28[ab]	72,10[ab]
cinnamaldehyde	88,26[b]	74,68[abc]
L-menthone	86,46[ab]	71,36[ab]

[1)] Různé horní indexy (a–b) u průměrné účinnosti při teplotě skladování 22 ± 2 °C a (a–c) po skladování v 15 °C označují významné rozdíly ($p \leq 0,5$) podle Tukey HSD testu. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou teplotu skladování.

In vivo testování – fumigace

Pro teplotu skladování 22 ± 2 °C byla PLI pro odrůdu 'Red Anna' 11,4 cm^2 a pro odrůdu 'Antonia' 10,2 cm^2 a pro teplotu 15 °C 10,3 cm^2 u odrůdy 'Red Anna' a 8,1 cm^2 u odrůdy 'Antonia'. Při hodnocení účinnosti silic/složek silic po teplotě skladování 22 ± 2 °C Tukey HSD testem při hladině významnosti $p \leq 0,5$ nebylo prokázáno, že by mezi jednotlivými silicemi/složkami silic byly průkazné rozdíly (Tab. 3). Účinnost se pohybovala od 63,2 % (silice z máty peprné) do 82,2 % (carvacrol). Mezi celkovou účinností vzhledem k odrůdám byly již významné rozdíly zaznamenány – u odrůdy 'Antonia' byla účinnost fumigace 63,6 %, u 'Red Anna' 78,7 %. Při hodnocení účinnosti fumigace na hlízách skladovaných při teplotě 15 °C nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly mezi účinností jednotlivých silic/složek silic (Tab. 3)

ani mezi odrůdami. Účinnost silic/složek silic se pohybovala v rozmezí 34,6–60,6 %.

Tabulka 3: Účinnost silic a složek silic při ošetření fumigací za dané teploty skladování

Silice/složka silice	**Účinnost – fumigace (%)**[1)]	
	Teplota 22 ± 2 °C	**Teplota 15 °C**
dobromysl obecná	81,49[a]	54,29[a]
máta peprná	63,16[a]	50,89[a]
skořicovník čínský	69,97[a]	60,59[a]
carvacrol	82,17[a]	46,64[a]
cinnamaldehyde	67,15[a]	45,25[a]
L-menthone	63,19[a]	34,55[a]

[1)] Podle Tukey HSD testu (p ≤ 0,5) nebyly zjištěny průkazné rozdíly mezi účinností silic/složek silic po skladování při teplotách 22 ± 2 °C i 15 °C. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou teplotu skladování.

Porovnání moření a fumigace

Tukey HSD testem (p ≤ 0,5) bylo prokázáno, že fumigace měla za obou skladovacích teplot významně horší účinnost (71,2 % za 22 ± 2 °C a 48,7 % za 15 °C), než ošetření mořením.

Diskuze

Problematika *in vivo* testování účinku rostlinných silic proti *P. atrosepticum* na hlízách bramboru je oblastí zatím málo podpořenou vědeckými studiemi. Existují však odborné publikace, které se věnují jiným pektinolytickým bakteriím. Hajian-Maleki et al. (2021) zjistili, že silice z myrty obecné (*Myrtus communis* L.) a ločidla galbanorodého (*Ferula gummosa* Boiss.) snížily závažnost měkké hniloby způsobenou pektinolytickou bakterií *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* o 31,9–56,6 % při skladování ošetřených hlíz bramboru za teploty 22 °C. Zhang et al. (2023) při svých pokusech rovněž s bakterií *Pcc* zjistili, že silice z dobromysli obecné v koncentrační řadě ¼ MIC, ½ MIC, MIC a 2MIC (MIC = 200 µl/l) snížila závažnost onemocnění na cibuli kuchyňské (*Allium cepa* L.) o 62,3–100 % při skladování za teploty 22–25 °C. Potenciál antibakteriálního účinku silic je tedy velmi slibný.

Závěr

V *in vitro* a také v *in vivo* testech byla prokázána účinnost vybraných silic a složek silic proti kmenu CPPB 81 pektinolytické bakterie *Pectobacterium atrosepticum*. V *in vitro* testech byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace, která sloužila pro testování účinnosti silic/složek silic proti *Pa* již na samotných hlízách bramboru. Nejnižší MIC měla silice ze skořicovníku čínského a její složka cinnamaldehyde. V *in vivo* testech bylo zjištěno, že ošetření mořením je průkazně účinnější než fumigace, a to jak za teploty skladování 22 ± 2 °C, tak i za teploty 15 °C.
Preventivní moření silicemi ze skořicovníku čínského a máty peprné lze doporučit jako možnou variantu ekologického ošetření hlíz proti měkké hnilobě v době regenerace hlíz po sklizni.

Literatura

Charkowski, A.O., 2006. The soft rot *Erwinia*, in: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Plant-Associated Bacteria. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 423–505. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_13

Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., van Veen, J.A., van der Wolf, J.M., 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review: Control of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in potato. Plant Pathology 60, 999–1013. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x

EUCAST Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial

agents by broth dilution, n.d. . European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases 9, 1–7.

Hajian-Maleki, H., Baghaee-Ravari, S., Moghaddam, M., 2021. Herbal essential oils exert a preservative effect against the potato soft rot disease. Scientia Horticulturae 285, 110192. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110192

Jílková, B., Víchová, J., Holková, L., Pluháčková, H., Michutová, M., Kmoch, M., 2024. Laboratory efficacy of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* causing soft rot of potato tubers. Potato Research. https://doi.org/10.1007/s11540-024-09743-y

Malko, A., Frantsuzov, P., Nikitin, M., Statsyuk, N., Dzhavakhiya, V., Golikov, A., 2019. Potato pathogens in Russia's regions: An instrumental survey with the use of real-time PCR/RT-PCR in matrix format. Pathogens 8, 18. https://doi.org/10.3390/pathogens8010018

Mann, C.M., Markham, J.L., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. J Appl Microbiol 84, 538–544. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x

Perumal, A.B., Sellamuthu, P.S., Nambiar, R.B., Sadiku, E.R., 2017. Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. Food Bioprocess Technol 10, 1131–1141. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1891-6

Song, X., Bandara, M., Nash, B., Thomson, J., Pond, J., Wahab, J., Tanino, K.K, 2009. Use of essential oils in sprout suppression and disease control in potato storage. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 3,Global Science Books Special Issue 1, 95–101.

Víchová, J., Jílková, B., Michutová, M., Kmoch, M., 2024. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of selected essential oil components against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* causing bacterial soft rot of potato tubers. Heliyon 10, 11. doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32081.

Víchová, J., 2020. Choroby bramboru 3: Bakteriální choroby bramboru (II.). Agromanual 2020.

Zhang, J., Tian, Y., Wang, J., Ma, J., Liu, L., Islam, R., Qi, Y., Li, J., Shen, T., 2023. Inhibitory effect and possible mechanism of oregano and clove essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as onion soft rot in storage. Postharvest Biology and Technology 196, 112164. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112164

Poděkování

Tato práce byla vypracována se státní podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu NAZV QK21010083 – „Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům“. Poděkování patří i M+H Míča&Harašta s.r.o. za poskytnutí silic, Vesa Velhartice, a.s. za poskytnutí hlíz bramboru a Ing. Markovi Jahnovi za spolupráci.

Kontakt:

Ing. Barbora Jílková, Ph.D.

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

+420 545 133 049, jilkova@mendelu.cz

Využití mikroorganismů a rostlinných extraktů v ochraně proti bakterii *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Potential use of microorganisms and plant extracts for the control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Jílková B.[1], Víchová J.[1], Neoralová M.[1], Sochorová A.[1], Kmoch M.[2]

[1]Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně; [2] Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Abstrakt

V laboratorních podmínkách byly testovány vybrané potenciální bakteriální bioagens a rostlinné extrakty proti *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) způsobující měkkou hnilobu hlíz bramboru. Při testování potenciální bakteriální bioagens společně s *Pcc* na agarových plotnách nebyly zaznamenány žádné inhibiční zóny a ani v *in vivo* testu nebyly žádné disky hlíz bramboru bez vzniklých lézí. Došlo však k redukci plochy lézí, kde nejvyšší účinnost měly bakterie *Rhodococcus erythropolis* (69 %) a *Serratia plymuthica* (74 %). Proti *Pcc* na hlízách bramboru byly nejúčinnější lihové extrakty z dobromysli obecné, česneku medvědího, grapefruitu, heřmánku pravého, skořicovníku čínského, tymiánu obecného a yzopu lékařského. Tyto extrakty vykazovaly účinnost 75–96 %. Nejvyšší účinnost (97 %) byla však zjištěna u přípravku Champion 50 WG s účinnou látkou hydroxidem měďnatým. Také extrakční činidlo ethanol mělo účinnost přes 80 %, nelze proto vyloučit jeho vliv na výslednou účinnost rostlinných extraktů.

Klíčová slova: bioagens, lihové extrakty, měkká hniloba, pektinolytická bakterie, *Solanum tuberosum*

Abstract

The efficacy of selected potential bacterial bioagents and plant extracts against the bacterium *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) causing soft rot of potato tubers was tested under *in vitro* and *in vivo* laboratory conditions. No zones of inhibition were observed when potential bacterial bioagents were tested with *Pcc* on agar plates and no lesion-free potato tuber discs were observed in the *in vivo* test. However, there was a reduction in their size, with *Rhodococcus erythropolis* (69%) and *Serratia plymuthica* (74%) having the highest efficacy. The most effective plant extracts were oregano, wild garlic, grapefruit, camomile, cinnamon, thyme and hyssop. The efficacy of these extracts ranged from 75 to 96%. However, the highest efficacy (97%) was found for Champion 50 WG with copper hydroxide as the active ingredient. The extracting agent ethanol also had an efficacy of over 80 %, so its influence on the final efficacy of the plant extracts must be considered.

Keywords: bioagents, ethanol extracts, pectinolytic bacteria, soft rot, *Solanum tuberosum*

Úvod

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří celosvětově k důležitým plodinám nejen pro lidskou výživu, ale i krmné účely a průmyslové využití. V průběhu skladování hlíz dochází k řadě skládkových onemocnění, které snižují kvalitu i kvantitu, a tedy tržní hodnotu hlíz. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben et al., 1999 emend. Gardan et al., 2003, syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones 1901) Bargey et al., 1923 (*Pcc*) je v našich podmínkách jednou z nejčastějších pektinolytických bakterií způsobujících onemocnění bakteriální měkkou hnilobu hlíz bramboru. Tato fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie s peritrichálně uspořádanými bičíky a G- reakcí je polyfágním patogenem, která kromě bramboru napadá i zástupce z čeledí Solanaceae, Brasicaceae, Cucurbitaceae, Apiaceae, Papaveraceae a dalších (CABI Plant, 2022). Díky své schopnosti produkovat řadu enzymů dochází k rychlému rozvoji hniloby na hlízách bramboru, měknutí a maceraci pletiva. Napadené hlízy jsou charakteristické hnilobným zápachem. Příznaky měkké hniloby hlíz se mohou projevit již v půdě, následně i v průběhu sklizně a skladování (Rasocha et al., 2008). V současné době je možné zabránit rozvoji tohoto onemocnění na hlízách

bramboru prevencí ještě za vegetace a režimovými opatřeními ve skladu v podobě řízené teploty, vlhkosti a pohybu vzduchu (Víchová, 2020). Chemická ochrana hlíz bramboru je značně omezena. V Registru přípravků na ochranu rostlin jsou povoleny pouze přípravky s účinnou látkou hydroxid měďnatý, které se aplikují před výsadbou či po výsadbě hlíz bramboru. Pro zlepšení odolnosti rostlin jsou také povoleny přípravky s účinnými látkami chitosan a chitosan hydrochlorid. Vzhledem k nedostatku vhodných přípravků pro snížení posklizňových ztrát na produkci se hledají jiné možnosti ochrany na bázi rostlinných silic (Víchová et al., 2024), rostlinných extraktů, látek přírodního původu a mikroorganismů.
Cílem naší práce bylo určit a ověřit spektrum bakterií, které by mohly být vhodnými mikrobiálními bioagens vůči agresivnímu kmenu bakterie *Pcc*, který pochází z bramboru z České republiky. V předešlých studiích jiných autorů byly zjištěny zajímavé výsledky s bakteriemi *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces* spp. (Salem a Abd El-Shafea, 2018) proti *Pcc* nebo *Pseudomonas putida* (Cigna et al., 2015) a *Serratia plymuthica* (Hadizadeh et al., 2019) proti bakteriím *Dickeya* spp. Některé druhy rodu *Dickeya* jsou dalšími původci způsobující měkkou hnilobu hlíz bramboru. Druhým bodem naší práce bylo zjistit účinnost lihových extraktů z rostlin, u kterých jsou známy antimikrobiální účinky. Rostlinné extrakty jsou roztoky látek vyextrahovaných z různých rostlinných částí do rozpouštědla. Oproti čistým silicím extrakty obsahují i ostatní potenciálně účinné rostlinné látky (Eloff, 2019). Řada autorů potvrdila účinnost rostlinných extraktů proti *Pcc*, např. vodného extraktu z česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.), vodného extraktu z hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry), extraktu z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.) a extraktu z kmínu kořenného (*Carum carvi* L.) (Steglińska et al., 2022).

Materiál a metody

Fytopatogenní bakteriální kmen

Bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (agresivní kmen CPPB 56) byla zakoupena ze Sbírky fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v.v.i., Praha). Bakteriální kmen byl kultivovány na King B agaru (HiMedia, Indie) při optimální teplotě pro růst a množení bakterie 28 ± 1 °C po dobu 48 h. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace inokula $1{,}5 \times 10^8$ CFU/ml připravená v destilované vodě, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru (Den-1 McFarland Densitometer, BioSan, Lotyšsko).

Bakteriální kmeny potenciálních bioagens

Do testování byly použity kmeny bakterií: *Bacillus subtilis* (CCM 2267, CCM 2794), *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7140, CCM 4795), *Pseudomonas putida* (CCM 4827, CCM 4797), *Rhodococcus erythropolis* (CCM 2597) a *Serratia plymuthica* (CCM 640^T), které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity (Česká republika). Kmeny bakterií byly kultivovány na King B agaru za průměrné optimální teploty 30 ± 2 °C po dobu 48 h. Pro experimenty byla použita koncentrace inokula $1{,}5 \times 10^8$ CFU/ml připravená v destilované vodě, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.

Rostlinné extrakty

Pro testování byly použity rostlinné extrakty (První jílovská a.s. divize Exar, Česká republika) z česneku medvědího (*Allium ursinum* L.), dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.), grapefruitu (*Citrus paradisi* Macfad.), heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla L.)*, kmínu kořenného (*Carum carvi* L.), lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus L.)*, máty peprné (*Mentha piperita* L.), pelargonie vonné (*Pelargonium graveolens* L'Hér.), pelyňku pravého (*Artemisia absinthium* L.), skořicovníku čínského (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl), tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.) a yzopu lékařského ((*Hyssopus officinalis* L.). Extrakčním činidlem všech extraktů byl líh jemný kvasný rafinovaný zvláště denaturovaný denatonium-benzoátem

30 mg/l absolutního lihu ve směsi s vodou. Lihovitost extraktů se pohybovala v rozmezí 38,0–40,5 % obj.

Terčíková metoda pro testování inhibičního účinku potenciálních bioagens

Metodika vycházela z EUCAST (2021) pro diskovou difuzní metodu s uzpůsobením pro podmínky daného testování, které probíhalo v roce 2024. Bakteriální suspenze *Pcc* i případných bakteriálních bioagens byly připraveny do fyziologického roztoku.

Na Petriho misky s Mueller Hinton Agar (MHA, HiMedia, Indie) bylo pipetováno 100 µl připravené bakteriální suspenze a sterilní hokejkou byla suspenze rovnoměrně rozetřena. Po zaschnutí inokula bylo pipetováno 7,5 µl suspenze případného bakteriální bioagens na dva disky sterilního filtračního papíru o průměru 6 mm a do dvou jamek vytvořených sterilní tyčinkou. Disky a jamky byly na Petriho misce rovnoměrně rozmístěny do čtverce. Inkubace probíhala v termostatu za teploty 22 ± 2 °C. Po 48 h byl hodnocen růst testovaných bakterií a byly odečítány vzniklé inhibiční zóny (IZ). Testování probíhalo ve třech opakováních, s kontrolou růstu *Pcc* a kontrolami růstu potenciálních bakteriálních bioagens.

Testování potenciálních bioagens na discích hlíz bramboru

Na discích hlíz bramboru žlutomasé odrůdy ´Colomba´ (supermarket; původ hlíz Česká republika; rok sklizně 2024) byla testována maceračního schopnost *Pcc* za současné přítomnosti potenciálních bakteriálních bioagens. Metodika byla převzata od Jiang et al. (2021) a uzpůsobena našemu testování. Hlízy brambor byly povrchově dezinfikovány 0,7% chlornanem sodným (NaClO, SAVO, Česká republika) po dobu 10 minut, poté byly hlízy nakrájeny na disky o průměru 1 cm, opláchnuty vodou a nechány oschnout při pokojové teplotě. Disky byly umístěny do plastových krabiček na filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou. Do středu každého disku byl vytvořen otisk pomocí sterilní kovové tyčinky a do něj byly pipetovány 2 µl inokula *Pcc* a 2 µl suspenze daného potenciálního bakteriálního bioagens. Krabičky byly zakryty víkem a kultivovány za teploty 22 ± 2 °C. Test byl proveden na třech discích ve dvou opakováních s kontrolou růstu *Pcc* a kontrolami jednotlivých potenciálních bakteriálních bioagens. Plocha skvrny choroby byla vyfotografována po 72 h a vyhodnocena pomocí obrazové analýzy programem Assess 2.0 (APS Press, USA).

Účinnost rostlinných extraktů proti Pectobacterium carotovorum *subsp.* carotovorum *na skladovaných hlízách bramboru*

Do *in vivo* testování, které probíhalo v roce 2024, byla vybrána odrůda 'Red Anna' o velikosti hlíz 30–38 mm (OVO-SADBA, spol. s r.o.; původ hlíz Česká republika; rok sklizně 2023). Metodika byla částečně převzata od Hajian-Maleki et al. (2021). Hlízy byly omyty a jejich povrch byl dezinfikován 0,7 % chlornanem sodným. Poté byly hlízy 2x opláchnuty destilovanou vodou a po oschnutí byly poraněny na pupkové a korunkové části vpichem sterilního dřevěného párátka do hloubky 10 mm. Následovalo preventivní ošetření rostlinným extraktem. Extrakty byly ředěny sterilní destilovanou vodou na roztoky dvou koncentrací; 25% roztok odpovídající minimální inhibiční koncentraci (MIC) stanovené v předcházejících *in vitro* testech a 50% roztok odpovídající *in vitro* stanovené hodnotě minimální baktericidní koncentrace (MBC). Hlízy byly omyty v roztocích extraktů a po zaschnutí bylo do ran pipetováno 15 µl bakteriálního inokula. Od každé varianty bylo do uzavíratelných boxů umístěno pět hlíz. Zahrnut byl také vodný roztok přípravku CHAMPION 50 WG (účinná látka hydroxid měďnatý; šarže: 22080075; LOVELA Terezín s.r.o.; Česká republika) v koncentraci 0,2 g/100 ml a kontrola rozpouštědla (denaturovaného ethanolu) ve stanovených hodnotách MIC (10% ethanol) a MBC (20% ethanol). Hlízy byly inkubovány v temné místnosti při teplotě 15 °C, což odpovídalo teplotě v počátečních fázích skladování konzumních brambor. Po sedmi dnech od inokulace byl veden hlízou podélný řez tak, aby byl symetricky prořezán inokulovaný vpich, od kterého se tvořily bakteriální léze. Rozpůlené hlízy byly fotografovány. Vyhodnocení velikosti hnilobné plochy bylo provedeno pomocí obrazové analýzy programem Assess 2.0.

Statistická analýza

Výsledná data byla statisticky zhodnocena analýzou variance a následně Tukey HSD testem při hladině významnosti ($p \leq 0,05$) programem TIBCO Statistica® version 14.0.0.15 (USA).

Výsledky

Terčíková metoda pro testování inhibičního účinku potenciálních bioagens

V okolí jamek byl lépe viditelný růst zkoušených bakterií vzhledem k růstu *Pcc*, než při aplikaci bakteriální suspenze na disk z filtračního papíru. Délka ložiska bakteriálních kolonií byla mezi 6–8 mm (Tab. 1), přičemž byl u většiny bakterií rozpoznatelný růst testované bakterie a růst *Pcc*. Tvorba inhibičních zón však nebyla zaznamenána.

Tabulka 1: Průměrná délka ložiska kolonií potenciálních bioagens za současného růstu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* na agarové plotně

Bakterie – potenciální bioagens	**Průměrná délka ložiska kolonií (mm)**
Bacillus subtilis CCM 2267	7,2
Bacillus subtilis CCM 2794	6,9
Pseudomonas fluorescens CCM 7140	6,0
Pseudomonas fluorescens CCM 4795	6,4
Pseudomonas putida CCM 4827	7,4
Pseudomonas putida CCM 4797	7,5
Rhodococcus erythropolis CCM 2597	8,4
Serratia plymuthica CCM 640^T	7,4

Průměrná délka ložiska byla spočítána dohromady z jamek i z disků. Bakterie Pcc byla rozetřena po celé agarové plotně. Inkubace probíhala 48 h při teplotě 22 ± 2 °C.

Testování potenciálních bioagens na discích hlíz bramboru

Na discích hlíz bramboru byly sledovány velikosti lézí, jejich charakter a vznik měkké hniloby. Následně byla spočítána účinnost aplikace potenciálních bioagens. U žádné z testovaných variant nebyly zjištěny disky bez přítomnosti lézí, nicméně všechny léze byly menší než léze kontroly *Pcc* (Tab. 2). Světle i tmavě hnědé léze byly zaschlého a často propadlého charakteru pokryté výraznou vrstvou bramborového škrobu. Měkká hniloba se vyskytovala pouze u kmenů *Pseudomonas fluorescens*. U aplikace *Rhodococcus erythropolis* CCM 2597 a *Serratia plymuthica* CCM 640^T byla prokázána nejvyšší účinnost na redukci velikosti léze způsobené *Pcc* (Tab. 2).

Tabulka 2: Průměrná velikost lézí způsobená *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* na discích hlíz bramboru při současném působení potenciálních bioagens a účinnost aplikace potenciálních bioagens

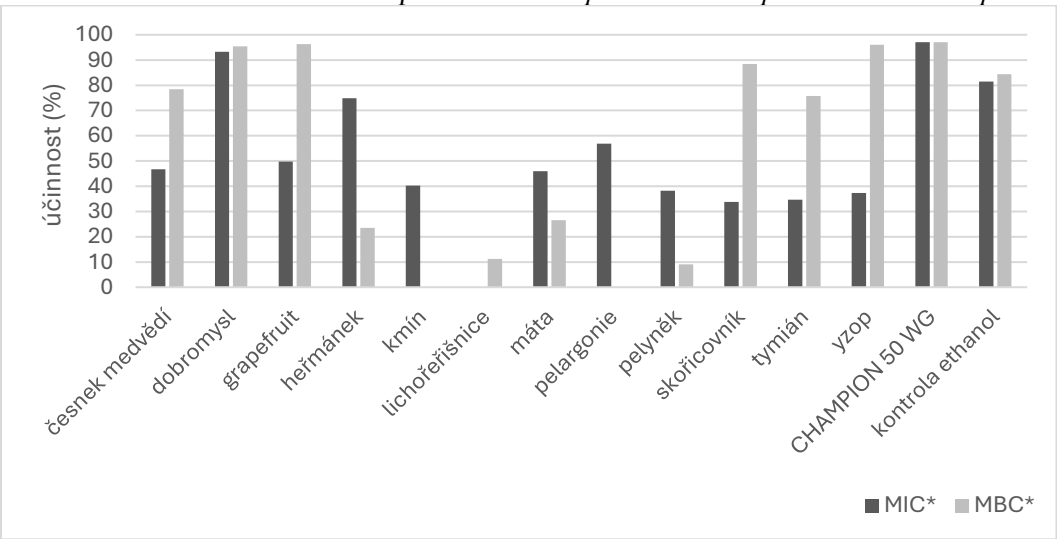
Bakterie – potenciální bioagens	**Průměrná velikost léze (mm^2)**	**Účinnost**
Bacillus subtilis CCM 2267	169,6	26,2
Bacillus subtilis CCM 2794	165,9	27,8
Pseudomonas fluorescens CCM 7140	192,2	16,3
Pseudomonas fluorescens CCM 4795	180,68	21,3
Pseudomonas putida CCM 4827	175,3	23,7
Pseudomonas putida CCM 4797	129,5	43,6
Rhodococcus erythropolis CCM 2597	71,0	69,1
Serratia plymuthica CCM 640^T	58,9	74,4

Velikost hnilobné léze kontroly inokula Pcc byla 229,7 mm^2. Účinnost působení potenciálních bioagens byla spočítána jako procentuální rozdíl léze kontroly inokula s lézí Pcc při současném působení potenciálního bioagens.

Účinnost rostlinných extraktů proti *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* na skladovaných hlízách bramboru

Mezi účinnostmi některých rostlinných extraktů a kontrol byly zjištěny průkazné rozdíly pomocí Tukey HSD testu ($p \leq 0,05$) při skladování za teploty 15 °C. Při hodnotě MIC byly průkazné rozdíly mezi účinností CHAMPIONU 50 WG a extraktu z dobromysli s extraktem z lichořeřišnice. Při hodnotě MBC byly rozdíly mezi účinností CHAMPIONU 50 WG, extraktů z dobromysle, grapefruitu a yzopu s extrakty z heřmánku, lichořeřišnice, máty a pelyňku a zároveň s extrakty z kmínu a pelargonie. Kontrola CHAMPIONU 50 WG dosáhla nejvyšší účinnosti 97,1 % (Graf 1). Nulovou účinnost vykazoval extrakt z lichořeřišnice v MIC a extrakty z kmínu a pelargonie v MBC.

Graf 1: Účinnost preventivního ošetření hlíz bramboru lihovými rostlinnými extrakty vůči Pectobacterium carotovorum *subsp.* carotovorum *při skladování po dobu 7 dnů a teplotě 15 °C*



*Účinnost byla vypočítána vůči neošetřené kontrole s plochou léze 1109 mm^2. *Testování extraktů a ethanolu v koncentraci odpovídající hodnotě minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). CHAMPION 50 WG byl v koncentraci 0,2 g/100 ml.*

Diskuze

Vzhledem k hledání alternativních a pro životní prostředí šetrnějších způsobů ochrany rostlin vůči patogenům, byla na téma antagonistických bakterií a účinku rostlinných extraktů vypracována řada studií. Salem a Abd El-Shafea (2018) ve své práci uvedli, že u bakterií *Pseudomonas fluorescence* a *Bacillus subtilis* zkoušených proti *Pcc* byly vytvořeny inhibiční zóny dosahující velikosti kolem 32 a 28 mm a při *in vivo* testech na hlízách bramboru došlo k redukci infekce po ošetření *P. fluorescence* o 15 % a u *B. subtilis* o 30 %. V našem testu jsme žádné inhibiční zóny nezjistili, ale na discích hlíz bramboru bylo dosaženo podobných hodnot účinnosti těchto bakterií. Benada et al. (2021) při testování *Serratia plymuthica* proti *Pcc* na discích hlíz bramboru zaznamenali úplnou redukci *Pcc*, tedy disky hlíz byly bez lézí. V našem pokusu se léze vytvořily, měly ale suchý charakter a oproti kontrole byla redukce jejich velikosti o 74 %. Při vzájemném porovnávání výsledků se ale musí se brát v potaz rozdílnost v metodikách a také v původu testovaných bakteriálních kmenů.

Zajímavých výsledků bylo dosaženo i při testování rostlinných extraktů. Kushalappa a Zulfiquar (2001); Son a Park (2022) uvedli, že na interakce mezi rostlinným extraktem, patogenem a hlízou bramboru má významný vliv teplota, při které jsou hlízy skladovány. Nižší teplota ovlivňuje účinnost složek extraktů, zpomaluje množení bakterií, a má vliv na obranné mechanismy rostlin. Při teplotě 15 °C se výrazněji projevila účinnost rozpouštědla ethanol, který měl v koncentraci MIC a MBC vyšší účinnost než některé rostlinné extrakty. Georgieva

et al. (2007) zjistili, že účinnost ethanolu vůči některým bakteriím může být vyšší při nižších teplotách. Zajímavé bylo i zjištění, že účinnost lihových extraktů z heřmánku, kmínu, máty, pelargonie a pelyňku v MBC byla nižší než účinnost těchto extraktů v MIC, tedy v nižší koncentraci. Vysvětlením by mohla být případná fytotoxicita. Fytotoxický efekt rostlinných složek uvádí řada autorů (Raveau et al., 2020; Verdeguer et al., 2011), kteří dokumentují různé mechanismy působení na rostlinné buňky. Verdeguer et al. (2020) zdůraznili význam silic a terpenoidů obsažených v rostlinných extraktech jako potenciálních biologických herbicidů.

Závěr

V *in vitro* testech nebyly zjištěny žádné inhibiční zóny kolem potenciálních bakteriálních bioagens na agarové plotně s *Pcc*. V *in vivo* testech se i přes ošetření potenciálními bakteriálními bioagens vyskytly léze způsobené *Pcc*, jejich plocha však byla oproti kontrole redukována. Nejvyšší účinnost měly bakterie *Rhodococcus erythropolis* a *Serratia plymuthica*. Z rostlinných extraktů byly v *in vivo* testech při skladování hlíz za teploty 15 °C nejúčinnější lihové extrakty z dobromysli, česneku medvědího, grapefruitu, heřmánku, skořicovníku, tymiánu a yzopu. Nejvyšší účinnost však byla zjištěna u přípravku Champion 50 WG. Také extrakční činidlo ethanol mělo vyšší účinnost, nelze proto vyloučit jeho vliv na výslednou účinnost rostlinných extraktů.

Literatura

Benada, M., Boumaaza, B., Boudalia, S., Khaladi, O., 2021. Isolation and efficacy of two bacterial strains antagonists of *Erwinia amylovora* and *Pectobacterium carotovorum*. Egypt J Biol Pest Control 31, 105. https://doi.org/10.1186/s41938-021-00443-0

CABI Plant, 2022. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (bacterial root rot of sweet potato). PlantwisePlus Knowledge Bank Species Pages, 21913. https://doi.org/10.1079/pwkb.species.21913

Cigna, J., Raoul Des Essarts, Y., Mondy, S., Hélias, V., Beury-Cirou, A., Faure, D., 2015. Draft genome sequences of *Pseudomonas fluorescens* strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, three biocontrol bacteria against *Dickeya* phytopathogens. Genome Announc 3, e01503-14. https://doi.org/10.1128/genomeA.01503-14

Eloff, J.N., 2019. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. BMC Complement Altern Med 19, 106. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3

EUCAST Antimicrobial susceptibility testing, EUCAST disk diffusion method, n.d. European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases 9, 1–21.

Georgieva, T.I., Skiadas, I.V., Ahring, B.K., 2007. Effect of temperature on ethanol tolerance of a thermophilic anaerobic ethanol producer Thermoanaerobacter A10: Modeling and simulation. Biotechnol. Bioeng. 98, 1161–1170. https://doi.org/10.1002/bit.21536

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hannukkala, A., Van Der Wolf, J.M., Nissinen, R., Pirhonen, M., 2019. Biological control of potato soft rot caused by *Dickeya solani* and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions. Plant Pathology 68, 297–311. https://doi.org/10.1111/ppa.12956

Hajian-Maleki, H., Baghaee-Ravari, S., Moghaddam, M., 2021. Herbal essential oils exert a preservative effect against the potato soft rot disease. Scientia Horticulturae 285, 110192. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110192

Jiang, S., Zhang, J., Yang, Q., Sun, D., Pu, X., Shen, H., Li, Q., Wang, Z., Lin, B., 2021. Antimicrobial activity of natural plant compound carvacrol against soft rot disease agent *Dickeya zeae*. Curr Microbiol 78, 3453–3463. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02609-3

Kushalappa, A.C., Zulfiquar, M., 2001. Effect of wet incubation time and temperature on infection, and of storage time and temperature on soft rot lesion expansion in potatoes

inoculated with *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. Potato Res 44, 233–242. https://doi.org/10.1007/BF02357901

Rasocha, V., Hausvater, Ervín., Doležal, P., 2008. Škodliví činitelé bramboru: abionózy, choroby, škůdci = Harmful agents of potato: abionoses, diseases, pests. Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod.

Raveau, R., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2020. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A Review. Foods 9, 365. https://doi.org/10.3390/foods9030365

Salem, E.A., Abd El-Shafea, Y.M., 2018. Biological control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Egypt J Biol Pest Control 28, 94. https://doi.org/10.1186/s41938-018-0100-x

Son, S., Park, S.R., 2022. Climate change impedes plant immunity mechanisms. Front. Plant Sci. 13, 1032820. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1032820

Steglińska, A., Bekhter, A., Wawrzyniak, P., Kunicka-Styczyńska, A., Jastrząbek, K., Fidler, M., Śmigielski, K., Gutarowska, B., 2022. Antimicrobial Activities of Plant Extracts against *Solanum tuberosum* L. Phytopathogens. Molecules 27, 1579. https://doi.org/10.3390/molecules27051579

Verdeguer, M., García-Rellán, D., Boira, H., Pérez, E., Gandolfo, S., Blázquez, M.A., 2011. Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. Molecules 16, 403–411. https://doi.org/10.3390/molecules16010403

Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A.M., Araniti, F., 2020. Phytotoxic Effects and Mechanism of Action of Essential Oils and Terpenoids. Plants 9, 1571. https://doi.org/10.3390/plants9111571

Víchová, J., Jílková, B., Michutová, M., Kmoch, M., 2024. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of selected essential oil components against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* causing bacterial soft rot of potato tubers. Heliyon 10, e32081. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32081

Víchová Jana, 2020. Choroby bramboru 3: Bakteriální choroby bramboru (II.). Agromanual 2020.

Poděkování

Tato práce byla vypracována se státní podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu NAZV QL24010148 – „Alternativní způsoby biologické ochrany bramboru za využití bioagens a látek přírodního původu“. Poděkování patří i České sbírce mikroorganismů Masarykovy univerzity za poskytnutí bakteriálních kmenů.

Kontakt:

Ing. Barbora Jílková, Ph.D.

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

+420 545 133 049, jilkova@mendelu.cz

Antagonistická aktivita bakterií na patogen *Dickeya solani*, původce měkké hniloby hlíz a černání stonků bramboru

Antagonistic activity of bacteria against the pathogen *Dickeya solani*, the causal agent of potato soft rot and blackleg

Kmoch M.[1], Loubová V.[1], Jílková B.[2], Víchová J.[2]

[1]*Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.;* [2]*Mendelova univerzita v Brně*

Abstrakt

Pektinolytické bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, do které patří *Dickeya solani*, jsou významnými původci měkké hniloby hlíz a černání stonků bramboru. Mezi velmi perspektivní alternativy ochrany rostlin bezesporu patří biologická ochrana pomocí mikroorganismů, tzv. bioagens. Cílem experimentů bylo zjištění antagonistické aktivity vybraných bakterií z několika rodů na patogenní bakterii *D. solani* v podmínkách *in vitro*. Antagonistická aktivita potvrzená u *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7140 a CCM 4795), *Lactiplantibacillus plantarum* (CCM 3627), *Bacillus subtilis* (CCM 2722) a *Pseudomonas putida* (CCM 4827 a CCM 4797) se významně lišila. Nejvyšší aktivita byla prokázána u *P. fluorescens* (CCM 7140), *P. putida* (CCM 4827) a *La. plantarum* (CCM 3627). Vybrané izoláty bakterií mají potenciál pro využití v biologické ochraně bramboru před patogenem *D. solani*.

Klíčová slova: Brambory, bakterie, bioagens, *in vitro*, biologická ochrana.

Abstract

Pectinolytic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, involving *Dickeya solani*, are important causal agents of soft rot and blackleg in potato. Biological control using microorganisms, so-called bioagents, undoubtedly belongs to very perspective alternatives of plant protection. The experiments aimed to find the antagonistic activity of the selected bacteria of several genera against the pathogenic bacterium *D. solani* under *in vitro* conditions. The antagonistic activity confirmed in *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7140 and CCM 4795), *Lactiplantibacillus plantarum* (CCM 3627), *Bacillus subtilis* (CCM 2722) and *Pseudomonas putida* (CCM 4827 and CCM 4797) significantly differed. The highest activity was confirmed in *P. fluorescens* (CCM 7140), *P. putida* (CCM 4827) and *La. plantarum* (CCM 3627). The selected bacterial isolates have a potential for use in biological control of *D. solani* in potatoes.

Keywords: Potatoes, bacteria, bioagent, *in vitro*, biocontrol.

Úvod

Mezi nejzávažnější bakteriální patogeny bramboru z hlediska ztrát produkce patří bakterie rodu *Pectobacterium* a *Dickeya* z čeledi *Enterobacteriaceae* (Skelsey et al., 2018). Jsou původci měkké hniloby hlíz a bakteriálního černání stonku bramboru (tzv. černé nohy) (Golanowska & Łojkowska, 2016; Pérombelon, 2002) a mohou způsobit značné ekonomické ztráty v produkci sadbových i konzumních brambor (Czajkowski *et al*., 2011). Během infekce produkují charakteristické extracelulární pektinolytické enzymy, které jsou příčinou degradace buněčné stěny rostlin projevující se typickou macerací pletiv (Adriaenssens *et al*., 2012; Czajkowski *et al*., 2011). Druhy rodu *Dickeya* (dříve *Erwinia chrysanthemi*) jsou gramnegativní fakultativně anaerobní fytopatogenní bakterie, které po celém světě napadají široké spektrum hospodářsky významných plodin a okrasných rostlin (Adriaenssens *et al*., 2012). Většina přímých ztrát produkce u brambor nastává v důsledku snížení kvality hlíz nebo zamítnutí sadby při certifikaci (Toth *et al*., 2011). *Dickeya* spp. mohou snížit výnos hlíz brambor až o 25 % (Day *et al*., 2017). *D. solani* se převážně přenáší sadbovými a konzumními bramborami (Toth *et al*., 2011), popřípadě závlahovou vodou (Parkinson *et al*., 2015). Ve srovnání s jinými druhy rodu *Dickeya* je *D. solani* pro rostliny bramboru vysoce patogenní (Czajkowski *et al*., 2013), má vyšší schopnost kolonizovat kořeny rostlin bramboru a šířit se přes cévní systém rostliny (Czajkowski *et al*., 2010). Nicméně bakterie ale není schopna přežívat v půdě v nepřítomnosti hostitele déle než tři týdny (Toth *et al*., 2011). V ochraně rostlin bramboru před pektinolytickými bakteriemi

hrají velmi důležitou roli preventivní opatření, která zahrnují používání certifikovaného sadbového materiálu, omezení mechanického poškození hlíz a regulace šíření a rozvoje ostatních patogenů (Rasocha *et al*., 2008). V současné době neexistují k potlačování infekce účinné chemické látky a pěstované kultivary bramboru nejsou proti *D. solani* dostatečně odolné, což může způsobit značné ekonomické ztráty (Adriaenssens *et al*., 2012; Czajkowski *et al*., 2014). Hlavní strategie biologické ochrany bramboru proti pektinolytickým bakteriím zahrnují použití bakteriálních antagonistů, bakteriofágů, *quorum-quenching* bakterií schopných inaktivovat signální molekuly mechanismu *quorum-sensing* produkované patogeny a přírodní sloučeniny, jako jsou elicitory rostlin a esenciální oleje (Czajkowski *et al*., 2011; Diallo *et al*., 2011). Cílem studie bylo zjištění antagonistické aktivity vybraných bakteriálních bioagens z rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rhodococcus* a *Lactiplantibacillus* na růst patogenní bakterie *Dickeya solani*, původce měkké hniloby hlíz a černání stonků bramboru, pomocí *in vitro* experimentů. Problematika je důležitá mimo jiné pro vývoj nových biopesticidů využitelných v biologické ochraně bramboru před pektinolytickými bakteriemi.

Materiál a metody

Pro pokusy byly vybrány kmeny bakterií s potenciální antagonistickou aktivitou z České sbírky mikroorganismů (Masarykova univerzita, Brno) uvedené v tab. 1. Patogenní bakterie *D. solani* (kmen CPPB-050) potřebná pro experimenty byla získána ze Sbírky fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v.v.i., Praha). Kmen CPPB-050 bakterie *D. solani* byl izolován z lenticel odrůdy bramboru 'Laura'. Před provedením experimentů byly všechny potřebné bakterie naneseny na plotny s King B Agar (HiMedia, Mumbai, India) a inkubovány po dobu 48 hodin při teplotě 25 ± 1 °C. Poté byly z těchto ploten seškrábnuty a suspendovány sterilní destilovanou vodou na koncentraci 1×10^9 CFU/ml. Koncentrace bakterií v roztoku byla stanovena pomocí denzitometru DEN-1 Photometer (Biosan, Latvia, Riga).

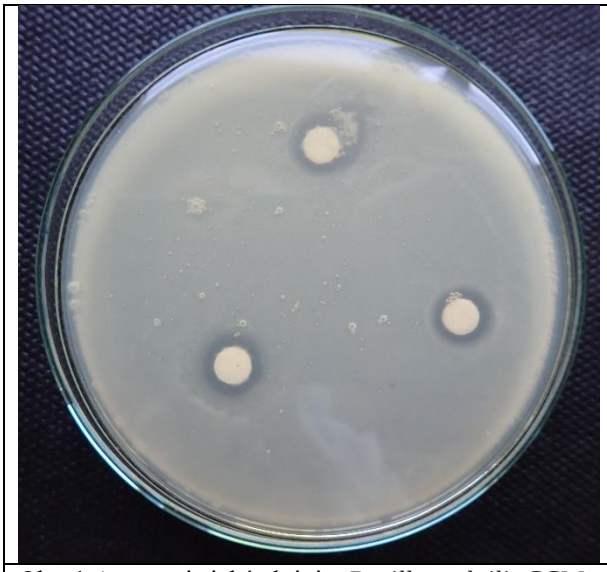
Antagonistická aktivita byla testována agarovou difúzní technikou (Ji *et al*., 2008, upraveno). Suspenze patogenní bakterie *D. solani* o koncentraci 1×10^9 CFU/ml (30 ml) byla smíchána s médiem King B Agar (300 ml) při teplotě 45 °C před nalitím na Petriho misky. Po ztuhnutí média byly na povrch agaru umístěny tři disky filtračního papíru o průměru 6 mm (Whatman, Sigma-Aldrich, Německo) nasycené suspenzí jednotlivých antagonistických izolátů bakterií o koncentraci 1×10^9 CFU/ml. Jako negativní kontrola byla použita sterilní destilovaná voda. Následně proběhla inkubace při 25 ± 1 °C po dobu 48 hodin. Antibakteriální aktivita izolátů byla definována vznikem inhibiční zóny, jejíž průměr byl změřen. Všechny varianty pokusu byly realizovány ve třech opakováních. Statistické vyhodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu a Tukey-HSD testu ($\alpha = 0{,}05$; program STATISTICA 7; StatSoft, Inc., USA).

Tab. 1 Přehled použitých kmenů antagonistických bakterií

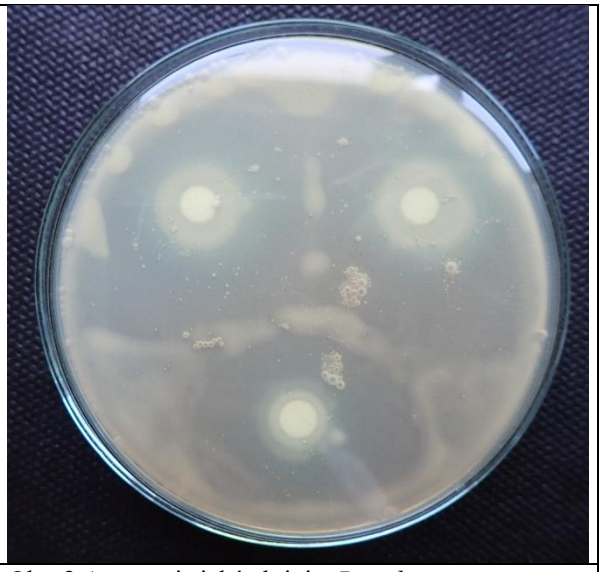
Číslo kmenu	**Vědecký název kmenu**	**Původ**
CCM 3627	*Lactiplantibacillus plantarum* (Orla-Jensen 1919) Zheng *et al*. 2020	Ovčí mléko
CCM 2722	*Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872	Pšeničné otruby
CCM 640	*Serratia plymuthica* (Lehmann and Neumann 1896) Breed *et al*. 1948	Voda
CCM 4827	*Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895	Půda
CCM 7140	*Pseudomonas fluorescens* Migula 1895	Jeskynní voda
CCM 2597	*Rhodococcus erythropolis* (Gray and Thornton 1928) Goodfellow and Alderson 1979	Půda
CCM 4797	*Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895	Sediment odpadní vody
CCM 2267	*Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872	-
CCM 4795	*Pseudomonas fluorescens* Migula 1895	Kal
CCM 2794	*Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872	Půda

Výsledky a diskuze

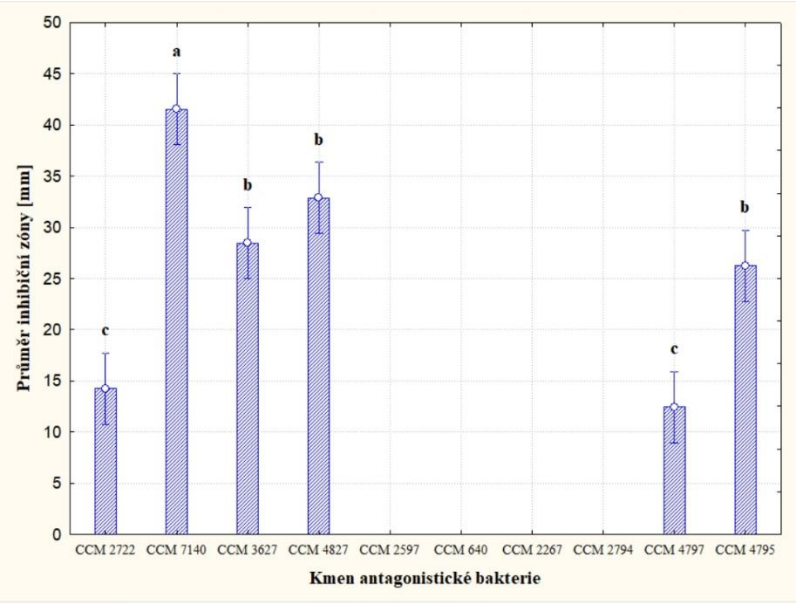
Ve studii byla pomocí *in vitro* experimentů zjištěna antagonistická aktivita vybraných bakteriálních kmenů z různých rodů na růst *Dickeya solani*. Z 10 vybraných izolátů použitých v této studii vykazovalo 6 jasný účinek proti testované bakterii. Antagonistická aktivita byla prokázána výskytem čiré zóny v agarovém médiu a byla zjištěna u *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7140 a CCM 4795), *Lactiplantibacillus plantarum* (CCM 3627), *Bacillus subtilis* (CCM 2722) a *Pseudomonas putida* (CCM 4827 a CCM 4797). Antagonistická aktivita jednotlivých kmenů bakterií se významně lišila (obr. 3). Maximální hodnoty byly zaznamenány pro *P. fluorescens* (CCM 7140), *P. putida* (CCM 4827) (obr. 2) a *La. plantarum* (CCM 3627) (obr. 4) s průměry 41,6, 32,9 a 28,4 mm. Minimální hodnota byla zaznamenána pro *B. subtilis* (CCM 2722) (obr. 1) a *P. putida* (CCM 4797) s průměry 14,2 a 12,4 mm. Na druhou stranu, izoláty *R. erythropolis* CCM 2597, *S. plymuthica* CCM 640, *B. subtilis* CCM 2267 a *B. subtilis* CCM 2794 nevykázaly inhibiční účinek proti kmenu *D. solani*.



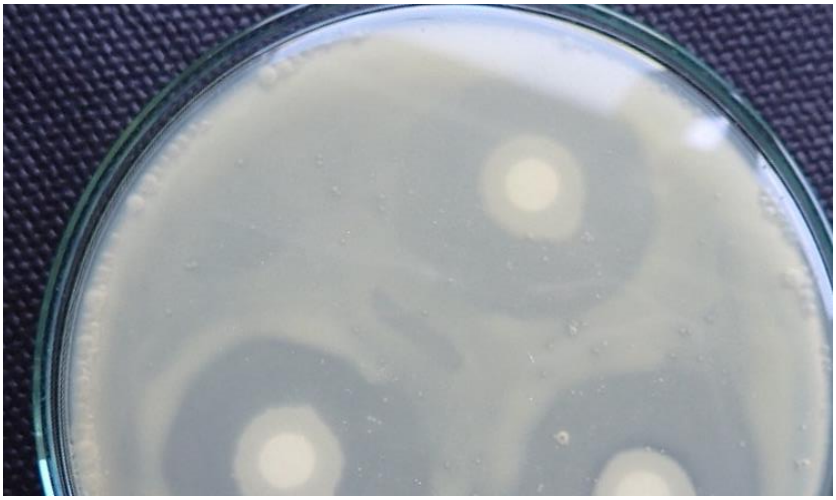
Obr. 1 Antagonistická aktivita *Bacillus subtilis* CCM 2722 na *Dickeya solani*



Obr. 2 Antagonistická aktivita *Pseudomonas putida* CCM 4827 na *Dickeya solani*



Obr. 3 Antagonistická aktivita kmenů bakterií na patogen *Dickeya solani*



Obr. 4 Antagonistická aktivita *Lactiplantibacillus plantarum* (CCM 3627) na *Dickeya solani*

Zjišťováním antagonistické aktivity různých bakterií na pektinolytické bakterie bramboru se zabývala řada autorů, kteří pomocí *in vitro* experimentů zjistili různou účinnost. Několik publikací popisuje pozitivní výsledky v biologické ochraně bramboru proti pektinolytickým bakteriím pomocí bakterií z rodů *Pseudomonas, Bacillus, Serratia, Lactobacillus, Lactococcus, Delftia, Ochrobactrum* a *Rhodococcus* (Czajkowski *et al*., 2011; Diallo *et al*., 2011; Jafra *et al*., 2006). Podle Algeblawi & Adam (2013) jsou bakterie *Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus thuringiensis* a *Pantoea aglomerans* nejslibnějšími prostředky biologické ochrany proti bakteriálním patogenům měkké hniloby hlíz bramboru. Tato bioagens produkují několik sekundárních antibakteriálních metabolitů včetně sideroforů, antibiotik, lytických enzymů a povrchově aktivních látek (Abd-El-Khair & Karima 2007). Mechanismy antagonismu bioagens zahrnují antibiózu, kompetici, popř. produkci enzymů degradujících buněčnou stěnu, produkci sekundárních metabolitů a organických sloučenin (Bélanger *et al*., 2012; Heimpel & Mills, 2017; Spadaro & Droby, 2016). Algeblawi *et* Adam (2013) zjistili antagonistickou aktivitu bakterií *Pseudomonas flouorescens, Bacillus subtilis* a *Bacillus thuringiensis* na *Pectobacterium carotovorum*. Zhao *et al.* (2013) prokázal ve své

studii vliv *Bacillus amyloliquefaciens* na *P. carotovorum*. Doolotkeldieva *et al.* (2016) prokázali účinnost druhů rodu *Streptomyces* na potlačování *P. carotovorum*. Azaiez *et al.* (2018) zjistil antagonistickou aktivitu *Bacillus amyloliquefacies* na *P. carotovorum*. Ochranou bramboru proti pektinolytickým bakteriím se také zabýval ve své práci Lapidot *et al*. (2015), který prokázal antagonistickou aktivitu *Paenibacillus dendriformis*. Hadizadeh *et al*. (2019) zjistil antagonistický vliv *Serratia plymuthica* na bakterie rodu *Dickeya*. Možnost biologické ochrany bramboru před pektinolytickými bakteriemi pomocí *Pseudomonas fluorescens* úspěšně prokázali ve studiích *in vitro* Kastelein *et al*. (1999) a Krzyzanowska *et al*. (2012). Trias & Bañeras (2008) použili proti pektinolytickým bakteriím bramboru tzv. bakterie mléčného kvašení. Druhy *Lactobacillus plantarum, La. acidophilus, La. buchneri, Leuconostoc* spp. a *Weissella cibaria* izolované z čerstvého ovoce a zeleniny vykazovaly v *in vitro* pokusech antagonistickou aktivitu vůči *P. carotovorum* připisovanou produkci peroxid vodíku a okyselení média. Bakterie mléčného kvašení jsou schopny inhibovat více než jeden fytopatogen. Mají širokou škálu růstové teploty v rozmezí 8 až 45 °C a poskytující možnosti pro široké aplikace (Trias & Bañeras, 2008).

Závěr

Ve studii byla pomocí *in vitro* experimentů zjištěna antagonistická aktivita vybraných bakteriálních kmenů z různých rodů na růst *Dickeya solani*, původce měkké hniloby hlíz a černání stonků bramboru. Antagonistická aktivita byla zjištěna u *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7140 a CCM 4795), *Lactiplantibacillus plantarum* (CCM 3627), *Bacillus subtilis* (CCM 2722) a *Pseudomonas putida* (CCM 4827 a CCM 4797). Mezi kmeny bakterií byly zjištěny významné rozdíly v antagonistické aktivitě na *Dickeya solani*. Nejvyšší aktivita byla prokázána u *P. fluorescens* (CCM 7140), *P. putida* (CCM 4827) a *La. plantarum* (CCM 3627). Vybrané izoláty bakterií s antagonistickou aktivitou mají potenciál pro využití v biologické ochraně bramboru před pektinolytickými bakteriemi. Antagonistickou aktivitu izolátů bakterií je nutné ještě ověřit pomocí *in vivo* experimentů přímo na hlízách bramboru.

Literatura

Abd-El-Khair H., Karima H.E.H., 2007. Application of some bactericides and bio-agents for controlling the soft rot disease in potato. *Research Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3: 463–473.

Adriaenssens, E. M., Van Vaerenbergh, J., Vandenheuvel, D., Dunon, V., Ceyssens, P.-J., De Proft, M., Kropinski, A. M., Noben, J.-P., Maes, M., & Lavigne, R., 2012. T4-Related Bacteriophage LIMEstone Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by '*Dickeya solani*'. PLoS ONE, 7(3), e33227. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033227

Algeblawi A., Adam F., 2013. Biological control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillu thuringiensis*. International *Journal of Chemical, Environmental and Biological Sciences*, 5: 70–79.

Azaiez S., Slimene I.B., Karkouch I., Essid R., Jallouli S., Djebali N., Tabbene O., 2018. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiological Research*, 217: 23–33.

Bélanger, R. R., Labbé, C., Lefebvre, F., & Teichmann, B., 2012. Mode of action of biocontrol agents: All that glitters is not gold. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4), 469–478. https://doi.org/10.1080/07060661.2012.726649

Czajkowski, R., de Boer, W. J., van der Zouwen, P. S., Kastelein, P., Jafra, S., de Haan, E. G., van den Bovenkamp, G. W., & van der Wolf, J. M., 2013. Virulence of ' *Dickeya solani* ' and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*): Comparison of *Dickeya* spp. on potato. *Plant Pathology*, 62(3), 597–610. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02664.x

Czajkowski, R., de Boer, W. J., Velvis, H., & van der Wolf, J. M., 2010. Systemic Colonization of Potato Plants by a Soilborne, Green Fluorescent Protein-Tagged Strain of *Dickeya* sp. Biovar 3. *Phytopathology*, 100(2), 134–142. https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0134

Czajkowski, R., Ozymko, Z., Zwirowski, S., & Lojkowska, E., 2014. Complete genome sequence of a

broad-host-range lytic *Dickeya* spp. Bacteriophage ϕD5. *Archives of Virology*, 159(11), 3153–3155. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2170-8

Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M., 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review: Control of Dickeya and Pectobacterium species in potato. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x

Day, A., Ahn, J., Fang, X., & Salmond, G. P. C., 2017. Environmental Bacteriophages of the Emerging Enterobacterial Phytopathogen, *Dickeya solani*, Show Genomic Conservation and Capacity for Horizontal Gene Transfer between Their Bacterial Hosts. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1654. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01654

Diallo, S., Crépin, A., Barbey, C., Orange, N., Burini, J.-F., & Latour, X., 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere: Biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 351–364. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01023.x

Doolotkeldieva T., Bobusheva S., Suleymankisi A., 2016. Biological control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* species. *Advanced Microbiology*, 6: 104–114.

Golanowska, M., & Łojkowska, E., 2016. A review on *Dickeya solani*, a new pathogenic bacterium causing loss in potato yield in Europe. *BioTechnologia*, 2, 109–127. https://doi.org/10.5114/bta.2016.60781

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hannukkala, A., Van Der Wolf, J. M., Nissinen, R., & Pirhonen, M., 2019. Biological control of potato soft rot caused by Dickeya solani and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions. *Plant Pathology*, 68(2), 297–311. https://doi.org/10.1111/ppa.12956

Heimpel, G. E., & Mills, N. J., 2017. Biological Control: Ecology and Applications (1. vyd.). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781139029117

Jafra, S., Przysowa, J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P., & Van Der Wolf, J. M., 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N- acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(10), 1006–1015. https://doi.org/10.1139/w06-062

Ji, G.-H., Wei, L.-F., He, Y.-Q., Wu, Y.-P., & Bai, X.-H., 2008. Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. *Biological Control*, 45(3), 288–296. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.004

Kastelein, P., Schepel, E. G., Mulder, A., Turkensteen, L. J., & Van Vuurde, J. W. L., 1999. Preliminary selection of antagonists of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye for application during green crop lifting of seed potato tubers. *Potato Research*, 42(1), 161–171. https://doi.org/10.1007/BF02358406

Krzyzanowska D.M., Potrykus M., Golanowska M., Polonis K., Gwizdek-Wisniewska A., Lojkowska E., Jafra S., 2012. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. *Journal of Plant Pathology*, 94: 367–378.

Lapidot, D., Dror, R., Vered, E., Mishli, O., Levy, D., & Helman, Y., 2015. Disease protection and growth promotion of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) by *Paenibacillus dendritiformis*. *Plant Pathology*, 64(3), 545–551. https://doi.org/10.1111/ppa.12285

Parkinson, N., Pritchard, L., Bryant, R., Toth, I., & Elphinstone, J., 2015. Epidemiology of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* in ornamental hosts and potato studied using variable number tandem repeat analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 63–70. https://doi.org/10.1007/s10658-014-0523-5

Pérombelon M.C.M., 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. 51(1), 1–12. https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x

Rasocha, V., Hausvater, E., & Doležal, P. (2008). Škodliví činitelé bramboru: Abionózy, choroby, škůdci = Harmful agents of potato: abionoses, diseases, pests. Výzkumný ústav bramborářský.

Skelsey, P., Humphris, S. N., Campbell, E. J., & Toth, I. K., 2018. Threat of establishment of non-indigenous potato blackleg and tuber soft rot pathogens in Great Britain under climate change. *PLOS ONE*, 13(10), e0205711. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205711

Spadaro, D., & Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39–49. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003

Toth, I. K., van der Wolf, J. M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsror Lahkim, L., & Elphinstone, J. G., 2011. *Dickeya* species: An emerging problem for potato production in Europe: *Dickeya* spp. on potato in Europe. *Plant Pathology*, 60(3), 385–399. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x

Trias, R., & Bañeras, L., 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11, 231–236. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.66

Zhao Y., Li P., Huang K., Wang Y., Hu H., Sun Y., 2013. Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 411–420.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR – projekt NAZV č. QL24010148 „Alternativní způsoby biologické ochrany bramboru za využití bioagens a látek přírodního původu“.

Poděkování patří pracovníkům České sbírky mikroorganismů (CCM) – Masarykově univerzitě za poskytnutí potřebných kultur hub a Sbírce fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (CPABB, VÚRV v.v.i.) za poskytnutí nezbytných bakteriálních kmenů. Obě sbírky patří pod Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu.

Kontakt:

Ing. Martin Kmoch, Ph.D.
Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.
Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod
569 466 231, kmoch@vubhb.cz

Fytotoxicita herbicidně účinných látek ke komonici lékařské

Phytotoxicity of preemergence herbicides on white sweet clover

Kubíková Z., Sobotková J., Kintl A., Drda A.

Zemědělský výzkum, spol. s r. o.

Abstrakt

Ve skleníkových pokusech byla u komonice bílé (*Melilotus albus* Medik.) zkoušena fytotoxicita herbicidů s imazamoxem při preemergentní aplikaci. Byly testovány tři varianty: 1. neošetřená kontrola; 2. kombinace účinných látek imazamox a pendimethalin; a 3. kombinace účinných látek imazamox a bentazone. Byly zkoušeny tři koncentrace účinných látek a byla hodnocena vzcházivost, fytotoxicita, výška a hmotnost nadzemní biomasy. Vzcházivost se pohybovala od 63 do 73 % a nejnižší vzcházivost byla zaznamenána v nejvyšší koncentraci u varianty 2. U této varianty byla zjištěna silná fytotoxicita (u všech koncentrací přes 90 %), která měla nepříznivý vliv jak na výšku rostlin, tak na produkci nadzemní biomasy.

Klíčová slova: selektivita, fytotoxicita, herbicidy, komonice bílá

Abstract

The phytotoxicity of imazamox, pendimethalin and bentazone were studied in greenhouse experiments to evaluate their effects on white sweet clover (*Melilotus albus* Medik.). There were three variants: 1. Untreated control; 2. imazamox with pendimethalin; and 3. imazamox with bentazone. Three application rates were tested for each herbicide combination. The influences of these herbicides on emergence, shoot phytotoxicity, plant height and shoot biomass production were evaluated. Emergence rate ranged from 63 to 73 %. The lowest emergence was in highest concentration of treatment 2. In the treatment 2 was detected strong fytotoxicity (more than 90 % in all concentrations). High levels of phytotoxicity had a negative effect on growth and biomass production.

Key words: emergence, selectivity, phytotoxicity, herbicides, *Melilotus albus*

Úvod

Komonice bílá (*Melilotus albus* Medik.) patří do čeledi bobovité (*Brassicaceae*). Pochází z Evropy a Asie (Zhang et al. 2018) a je původním druhem také v ČR. Je to jednoletá až dvouletá bylina (Chen et al. 2013) a byly vyšlechtěny jednoleté i dvouleté odrůdy (Smejkalová 2020). Je to jetelovina s kůlovitým kořenem prorůstajícím do větších hloubek. Lodyha je vzpřímená a dorůstá do výšky 30 až 150 cm, nejvíce větví ve spodní části. Listy jsou trojčetné s šídlovitými palisty. Lístky jsou podlouhle obvejčité, po okrajích zoubkované, s delším řapíčkem u prostředního lístku. Kvete od května do srpna a květenstvím je hrozen se 40 až 80 bílými kvítky. Plody jsou obvejčité až téměř kulovité lusky. Semena jsou vejčitá, žluté až žlutohnědé barvy s výrazným kořínkem odděleným hlubokou rýhou. HTS je 1,8 až 2,7 g. Pěstuje se jako pícnina a na zelené hnojení a jednoleté odrůdy se využívají jako pastva pro včely. Také se pěstuje jako rekultivační a meliorační rostlina (Smejkalová 2020). Pěstuje se samostatně nebo ve směsích s dalšími druhy. Na podmínky je nenáročná a je možné ji pěstovat téměř ve všech typech půd. Vzcházení a počáteční vývoj komonice jsou podobně jako u jiných jetelovin poměrně pomalé (Ţîţei 2022), a proto má v raných fázích vývoje nízkou konkurenční schopnost vůči plevelům.

Jednou z možností ochrany proti plevelům je aplikace herbicidních přípravků. V současné době je do komonice registrováno pět herbicidních přípravků. Dva přípravky (Agil 100 EC s účinnou látkou propachizafop a Targa Super 5 EC s účinnou látkou chizalofop-P-ethyl) jsou určeny proti jednoděložným plevelům. Další tři přípravky (Basagran s účinnou látkou bentazon; Escort Nový s kombinací účinných látek Imazamox a Pendimethalin; a Pulsar 40 s účinnou látkou Imazamox) jsou určeny k postemergentnímu ošetření proti dvouděložným plevelům. Studiem herbicidního ošetření u komonice se zabývala Smejkalová (2020), která zkoušela selektivitu

šesti přípravků, kdy u přípravků Wing-P (dimethenamid-P), Goltix Titan (chinmerak a metamitron), Nisshin 4 SC (nikosulfuron) a Laudis (tembotrion) byla v nádobových pokusech zjištěna dobrá selektivita do 20 %. Silnou fytotoxicitu až 75 % měl přípravek Starane Forte s účinnou látkou fluroxypyr. Herbicidním ošetřením komonice se zabývali také Conn a Seefeldt (2009), kteří studovali fytotoxicitu účinných látek chlorsulfuron, 2,4-DB, clopyralid, triclopyr, and 2,4-D a zjistili, že účinné látky chlorsulfuron triklopyr a 2,4-D snižují produkci nadzemní biomasy i produkci semen. Vozhehova et al. (2019) doporučují přípravek Pulsar s účinnou látkou imazamox k ošetření semenných porostů proti plevelům. Vliv přípravku Corum s kombinací účinných látek imazamox a bentazon na produkci nadzemní biomasy a biologickou fixaci dusíku studovali Kintl et al. (2023) a zjistili omezení produkce nadzemní biomasy ve srovnání s neošetřenou kontrolou od 7 do 44 % dle dávky přípravku.
V této práci byl u účinných látek imazamox, bentazon a pendimethalin v nádobových pokusech ověřován vliv na vzcházivost, fytotoxicitu, růst a produkci nadzemní biomasy u komonice bílé při preemergentní aplikaci.

Materiál a metody

Byly testovány tři varianty: 1. neošetřená kontrola, 2. kombinace účinných látek imazamox (16,7 g/kg přípravku) a pendimethalin (250 g/kg přípravku) a 3. kombinace účinných látek imazamox (22,4 g/kg přípravku) a bentazone (480 g/kg přípravku).
Jednalo se o nádobové pokusy prováděné ve skleníku. Světelná perioda byla 16 hodin světla 8 hodin tmy a průměrná teplota byla 19°C. Ve všech pokusech byla použita komonice bílá odrůda Meba, osivo pocházelo z pěstebních ploch v okolí Troubska. Osivo bylo vyseto do květináčů o rozměrech 18x18x16 cm, které byly naplněny hlinitopísčitou půdou s následujícím obsahem živin: N anorganický 28 mg/kg, K 271 mg/kg, Mg 350 mg/kg, P 93 mg/kg, Ca 3432 mg/kg, humus 1,18 %. Do každého květináče bylo vyseto 20 semen komonice. Ošetření bylo provedeno ihned po výsevu. Uspořádání pokusu bylo náhodné, ve třech opakováních pro každou variantu a koncentraci přípravku. Byla zkoušena účinná látka imazamox v kombinaci s pendimethalinem (Escort Nový) nebo v kombinaci s bentazonem (Corum). U každého přípravku byly zkoušeny tři koncentrace. Koncentrace byly zvoleny 0,5 N (poloviční aplikační dávka využívaná k hubení plevelů) a 1 N (běžná aplikační dávka přípravku), 2 N (dvojnásobná dávka přípravku). K aplikaci byl použit postřikovač Zems 08. Seznam variant je uveden v Tabulce 1.
Byl hodnocen počet vzešlých rostlin po 4 a po 7 dnech od výsevu a vypočítána vzcházivost. U vzešlých rostlin bylo provedeno hodnocení fytotoxicity, vizuálně ve třech termínech. Hodnocení probíhalo po 4, 7 a 21 dnech od postřiku (T4, T7 a T21). Fytotoxicita byla hodnocena v % celkového poškození rostlin. Ke každému hodnocení byl připojen podrobný popis příznaků fytotoxicity/poškození. Poškození rostlin bylo srovnáváno s neošetřenou kontrolou. Na konci pokusu (po 50 dnech od výsevu, T50) byla změřena výška rostlin v cm u jednotlivých variant. Také byla sklizena a zvážena nadzemní hmota a vypočítána průměrná hmotnost jedné rostliny. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Statistica 12 metodou analýzy rozptylu a následným testováním Tukeyho testem na hladině α 0,05.

Tabulka 1: Seznam variant

Varianta	Přípravek	Účinná látka	Dávka přípravku v l/ha	Dávka účinné látky g/l postřikové jíchy*		
				Imazamox	Pendimethalin	Bentazon
1	Kontrola	-	0	0	0	0
2_1	Escort Nový	Imazamox 16,7 g/l, pendimethalin 250 g/l	0,7	0,04	0,58	-
2_2	Escort Nový	Imazamox 16,7 g/l, pendimethalin 250 g/l	1,4	0,08	1,17	-
2_4	Escort Nový	Imazamox 16,7 g/l, pendimethalin 250 g/l	2,8	0,16	2,33	-
3_1	Corum	Imazamox 22,4 g/l, bentazon 480 g/l	0,625	0,05	-	1,00
3_2	Corum	Imazamox 22,4 g/l, bentazon 480 g/l	1,25	0,09	-	2,00
3_4	Corum	Imazamox 22,4 g/l, bentazon 480 g/l	2,5	0,19	-	4,00

**Pozn.: při dávce postřikové jíchy 300 l/ha*

Výsledky

Vzcházivost u zkoušených herbicidních variant

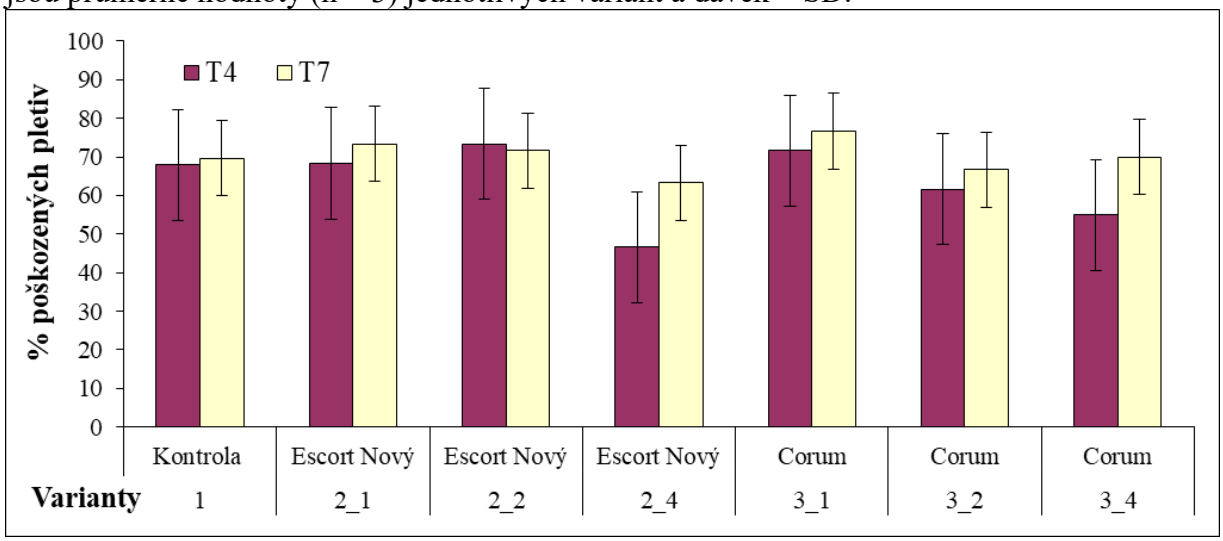
U komonice nebyly zjištěny rozdíly ve vzcházivosti u jednotlivých kombinací účinných látek. Výsledky vzcházivosti jsou uvedeny v Tabulce 2 a znázorněny v Grafu 1.

Tabulka 2: Vzcházivost klíčních rostlin v %

Varianta	Přípravek	Účinná látka	Dávka přípravku v l/ha	Vzcházivost klíčních rostlin v %	
				T4	T7
1	Kontrola	-	0	68a	70a
2_1	Escort Nový	Imazamox, Pendimethalin	0,7	68a	73a
2_2	Escort Nový	Imazamox, Pendimethalin	1,4	73a	72a
2_4	Escort Nový	Imazamox, Pendimethalin	2,8	47a	63a
3_1	Corum	Bentazon, Imazamox	0,625	72a	77a
3_2	Corum	Bentazon, Imazamox	1,25	62a	67a
3_4	Corum	Bentazon, Imazamox	2,5	55a	70a

Pozn.: písmenné indexy znázorňují statistické rozdíly na hladině α 0,05

Graf 1: Vliv ošetření herbicidními přípravky na vzcházivost (% vzešlých rostlin). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty (n = 3) jednotlivých variant a dávek ± SD.



Vzcházivost se po čtyřech dnech pohybovala od 47 do 73 %. Nejnižší průměrné hodnoty byly zjištěny u nejvyšších koncentrací herbicidního ošetření: varianty 2_4 (vzcházivost 47 %) a u varianty 3_4 (vzcházivost 55 %), ale rozdíly mezi variantami nebyly průkazné. Po sedmi dnech od výsevu se vzcházivost u jednotlivých variant vyrovnala a pohybovala se v rozmezí od 63 po 77 %. Nejnižší průměrná hodnota byla u varianty 2_4 (nejvyšší koncentrace u kombinace imazamoxu s pendimethalinem), ale rozdíl nebyl statisticky průkazný.

Selektivita zkoušených herbicidních variant

U komonice byly zjištěny rozdíly v selektivitě jednotlivých kombinací účinných látek. Výsledky fytotoxicity jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Fytotoxicita – celkové poškození rostlin v %

Varianta	Přípravek	Účinná látka	Dávka přípravku v l/ha	Fytotoxicita/poškození rostlin v %		
				T4	T7	T21
1	Kontrola	-	0	0,0a	0,0a	0,0a
2_1	Escort Nový	Imazamox, pendimethalin	0,7	0,0a	0,0a	94,3c
2_2	Escort Nový	imazamox, pendimethalin	1,4	0,0a	0,0a	98,0c
2_4	Escort Nový	imazamox, pendimethalin	2,8	0,0a	1,7a	97,0c
3_1	Corum	imazamox, bentazon	0,625	0,0a	0,0a	3,7a
3_2	Corum	imazamox, bentazon	1,25	0,0a	5,0a	25,0b
3_4	Corum	imazamox, bentazon	2,5	0,0a	5,0a	26,7b

Pozn.: písmenné indexy znázorňují statistické rozdíly na hladině α 0,05; červená – silná fytotoxicita – poškození nad 45 %, oranžová – zvýšená fytotoxicita – poškození 31–45 %, žlutá – uspokojivá fytotoxicita – poškození 21–30 %, zelená – dobrá selektivita – poškození 0–20 %

Fytotoxicita ke komonici v prvních dvou termínech hodnocení byla nízká. Po čtyřech dnech od výsevu – na začátku vzcházení nebyla pozorována žádná fytotoxicita. Po sedmi dnech od výsevu, pak bylo zaznamenáno mírné žloutnutí u některých rostlin, ale průměrná fytotoxicita byla od 0 do 5 % a nebyly zde jištěny statisticky průkazné rozdíly. Po 21 dnech od výsevu byla zjištěna silná fytotoxicita u kombinace účinných látek imazamox a pendimethalin. Ve všech zkoušených koncentracích docházelo k odumírání rostlin a fytotoxicita byla přes 90 %. Nejčastějšími projevy fytotoxicity byly deformace a nekrózy. U kombinace imazamoxu s bentazonem byla zjištěna dobrá selektivita u nejnižší koncentrace (3,7 %) a uspokojivá fytotoxicita u vyšších koncentrací (25 až 27 %). Hlavními příznaky fytotoxicity byly chlorózy a mírné nekrózy. Rozdíly mezi variantami byly statisticky průkazné.

Vliv ošetření na výšku rostlin a hmotnost nadzemní biomasy

V závěru pokusu (po 50 dnech od založení) byla vyhodnocena výška rostlin. Průměrná výška rostlin se pohybovala v rozmezí od 1,2 do 33 cm a byly zjištěny významné rozdíly mezi variantami. U neošetřené kontroly byla průměrná výška rostlin 29 cm. Nejmenší výška byla u kombinace imazamoxu s pendimethalinem (var. 2_1 až 2_4), kde byla zjištěna vysoká fytotoxicita. Výška rostlin se u této kombinace pohybovala od 1,2 do 7,27 cm dle koncentrace. Oproti neošetřené kontrole se výška snížila o 22 až 28 cm. Rozdíl oproti neošetřené kontrole byl statisticky průkazný. Naopak u kombinace imazamoxu s bentazonem (var. 3_1 až 3_4), kde byla fytotoxicita poměrně nízká, se negativní vliv ošetření neprojevil. Výška rostlin byla od 27 do 33 cm a u žádné koncentrace nebyl průkazný rozdíl ve výšce ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Rozdíly ve výšce rostlin jsou uvedeny v Tabulce 4 a znázorněny v Grafu 2.

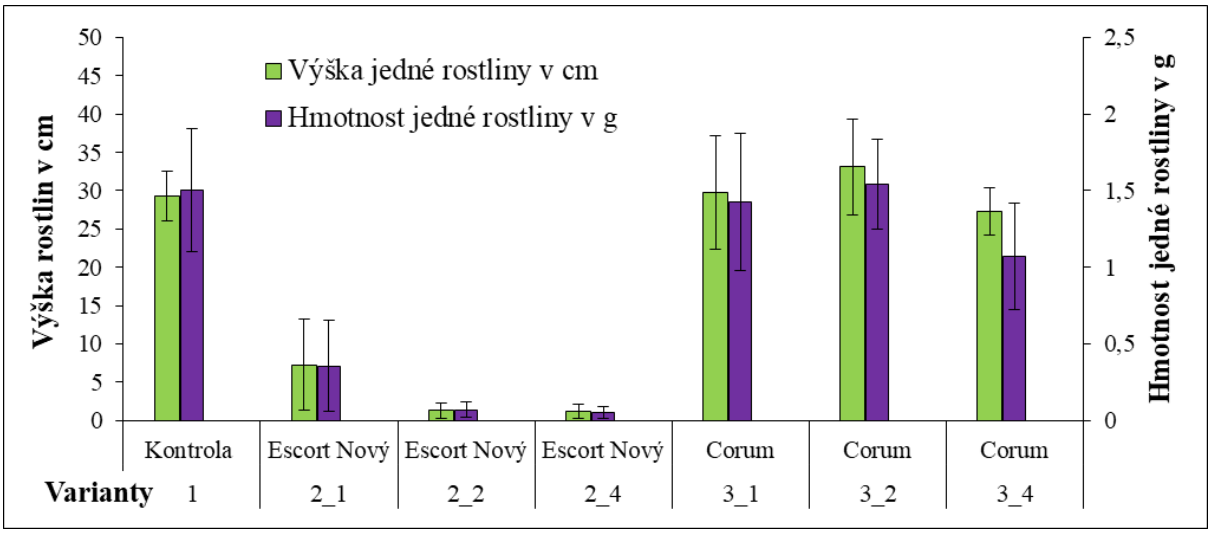
Poškození rostlin negativně ovlivnilo nejen výšku rostlin, ale také produkci biomasy. Hmotnost jedné rostliny se pohybovala v rozmezí od 0,05 do 1,54 g. Nejnižší hmotnost byla zjištěna u kombinace imazamoxu s pendimethalinem (var. 2_1 až 2_4), kde se průměrná hmotnost rostliny pohybovala od 0,05 do 0,36 g, dle koncentrace. Hmotnost se oproti neošetřené kontrole snížila o 1,14 až 1,44 g a rozdíl byl statisticky průkazný. U kombinace imazamoxu s bentazonem (var. 3_1 až 3_4) hmotnost dosahovala 1,07 až 1,54 g a nebyl zde průkazný rozdíl s neošetřenou kontrolou. Rozdíly v produkci nadzemní hmoty jsou uvedeny v Tabulce 4 a znázorněny v Grafu 2.

Tabulka 4: Výška a hmotnost rostlin

Varianta	Přípravek	Účinná látka	Dávka přípravku v l/ha	Výška jedné rostliny v cm	Hmotnost jedné rostliny v g
1	Kontrola	-	0	29,29 b	1,50 b
2_1	Escort Nový	Imazamox, Pendimethalin	0,7	7,27 a	0,36 a
2_2	Escort Nový	Imazamox, Pendimethalin	1,4	1,30 a	0,07 a
2_4	Escort Nový	Imazamox, Pendimethalin	2,8	1,20 a	0,05 a
3_1	Corum	Bentazon, Imazamox	0,625	29,82 b	1,43 b
3_2	Corum	Bentazon, Imazamox	1,25	33,11 b	1,54 b
3_4	Corum	Bentazon, Imazamox	2,5	27,26 b	1,07 b

Pozn.: písmenné indexy znázorňují statistické rozdíly na hladině α 0,05

Graf 2: Vliv ošetření herbicidními přípravky na výšku a hmotnost rostlin (fytotoxicita v % poškození rostliny). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty (n = 9) jednotlivých variant a dávek ± SD.



Diskuse

Ze zjištěných výsledků lze konstatovat, že účinné látky imazamox a bentazone, které jsou registrovány k postemergentní aplikaci, nemají ani při preemergentní aplikaci vysokou fytotoxicitu a významně neovlivňují vzcházivost ani následný růst rostlin. Účinná látka pendimethalin je v kombinaci s imazamoxem (přípravek Escort Nový) také registrována k postemergentní aplikaci, ale u ní se negativní vliv preemergentní aplikace projevil. Sice nebyl prokázán negativní vliv preemergentní aplikace na vzcházivost a vzcházení rostlin potlačeno nebylo, ale silně se projevil negativní vliv na růst a vývoj vzešlých rostlin a postupně docházelo k jejich zakrsnutí a odumírání.

Většina autorů se při studiu vlivu herbicidního ošetření na komonici zabývalo postemergentními aplikacemi. Vozhehova et al. (2019) studovali vliv postemergentní aplikace imazamoxu na výnos semenných porostů komonice a doporučili tuto účinnou látku k ošetření semenných porostů. Vlivem preemergentního ošetření na vzcházivost u komonice indické (*Melilotus indicus*) se zabývali Devi et al. (2018). Studovali vliv účinné látky pendimethalin a zjistili, že tato účinná látka při dávce 1000 g/ha snižuje vzcházivost komonice. V jejich pokusech byla vzcházivost velmi nízká (od 0 do 15 %), mnohem nižší než v našich pokusech, ale sledování vzcházivosti bylo prováděno po 2 a po 4 týdnech, což bylo později než v našich pokusech. Proto mohlo u časněji vzešlých rostlin dojít k odumření a nemusely být do hodnocení vzcházivosti zahrnuty. Navíc zkoušená dávka byla u této účinné látky vyšší než v našich pokusech, kde byly zkoušeny dávky od 175 do 700 g/ha. Fytotoxicita v jejich pokusech byla podobná a pohybovala se od 88 do 100 %. Devi et al. (2018) sledovali také vliv účinné látky imazamox v kombinaci s imazethapyrem na vzcházivost a fytotoxicitu, ale tato kombinace při

preemergentní aplikaci také omezovala vzcházivost (až na 0 % vzešlých rostlin) a měla vysokou fytotoxicitu (až 100 %). Vliv kombinace imazamoxu s bentazonem na produkci biomasy u komonice bílé studovali Kintl et al. (2023) a zjistili, že tato kombinace může ovlivnit produkci biomasy zejména ve vyšších koncentracích překračujících dávku přípravku doporučenou pro postemergentní aplikace. V našich pokusech nebylo průkazné snížení hmotnosti rostlin vlivem preemergentního ošetření imazamoxem s bentazonem zjištěno.

Závěr

Ošetření zkoušenými herbicidními látkami nemělo vliv na vzcházivost komonice bílé, ale u vzešlých rostlin byla zjištěna fytotoxicita, která se projevovala nekrózami, chlorózami a také omezením růstu a odumíráním rostlin. Silná fytotoxicita (přes 90 %) byla při preemergentní aplikaci zjištěna u kombinace imazamoxu s pendimethalinem a negativní vliv se projevil také snížením výšky rostlin a redukcí hmotnosti. U kombinace imazamoxu s bentazonem byla fytotoxicita poměrně nízká (od 4 do 27 %) a průkazná redukce výšky ani hmotnosti se u této kombinace neprojevila. Z toho lze usuzovat, že negativní vliv na vývoj rostlin měla při preemergentní aplikaci zejména účinná látka pendimethalin a nelze ji proto k preemergentnímu ošetření komonice doporučit.

Literatura

Conn J. S., Seefeldt S. S. (2009): Invasive white sweetclover (Melilotus officinalis) control with herbicides, cutting, and flaming. Invasive Plant Science and Management.;2(3):270-277. doi:10.1614/IPSM-08-118.1

Devi S., Thakral S. K., Hooda V. S., Singh, S. (2018): Bioefficacy of pre and post emergence herbicides against Coronopus didymus and Melilotus indicus, Int. J. Pure App. Biosci.6(5): 1191-1197. doi: http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.7094

Chen Ch., Huang D., Zhang Y., Zheng H., Wang K. (2013): Invasion of farmland-grassland ecosystems by the exotic sweet clovers, Melilotus officinalis and M. albus. Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.11 (1): 1012-1016.

Kintl A., Huňady I., Sobotková J., Kubíková Z., Elbl J. (2023): Effect of herbicide application on the production of shoot and root biomass and on the effectiveness of biological nitrogen fixation inwhite sweet clover (Melilotus albus Medik.). International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM; Sofia, Sv. 23, Čís. 3.1, DOI:10.5593/sgem2023/3.1/s13.25

Smejkalová H. (2020): Herbicidní ochrana komonice bílé. Agromanuál 5/2020.

Ţîţei Victor (2022): some agrobiological peculiarities and the economic value Of white sweetclover, Melilotus albus, and yellow sweet clover, Melilotus officinalis, in the republic of moldova. Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii şi comunicări. Ştiinţele Naturii. Tom. 38, No. 2/2022 ISSN 1454-6914

Vozhehova R., Konashchuk O., Drobit O., Lykhovyd P., Shapar L., Pryshchepo M., Vlashchuk A., Misievych O., Kokovikhin S., Naidionov V. (2019): Influence of herbicides on seed productivity and sowing qualities of white melilot in the steppe zone of ukraine. Agrolife Scientific Journal, 8(2).

Zhang J., Di H., Luo K., Jahufer Z., Wu F., Duan Z., Stewart A., Yan Z., Wang Y. (2018): Coumarin Content, Morphological Variation, and Molecular Phylogenetics of Melilotus. Molecules, 23, 810. https://doi.org/10.3390/molecules23040810

Poděkování

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1724.

Kontaktní adresa:

Zuzana Kubíková, Ing. Ph.D.
Zemědělský výzkum spol. s r. o.
Zahradní 1, 664 41
telefon: 547 138 831, e-mail: kubikova@vupt.cz

Molekulární fylogenetické hodnocení biodiverzity hub v půdě v Olomouckém kraji: přístup založený na ITS

Molecular Phylogenetic Assessment of Fungal Biodiversity in Olomouc Region Soil: An ITS-Based Approach

Ram Kumar, Marek Seidenglanz, Jiří Horáček

Agritec Plant Research, s.r.o., Zemědělská 2520/16, 787 01, Šumperk

Abstrakt

Nástup moderních technologií molekulárních markerů značně usnadnil rychlou identifikaci, charakterizaci a detekci důležitých půdních hub, jako jsou druhy Fusarium, které bylo dříve obtížné detekovat tradičními mikrobiologickými metodami. Molekulární nástroje nyní umožňují rychlou charakterizaci biologické rozmanitosti hub pomocí malých množství DNA nebo přímých vzorků mycelia hub. Různé molekulární markery, včetně RFLP, RAPD, SSR, AFLP, ITS a IGS, urychlily v posledních desetiletích identifikaci a charakterizaci půdních hub. Markery založené na ITS (internal trascribed spacer) regionu genů ribozomální RNA jsou široce využívány díky své schopnosti identifikovat houby na úrovni rodu a druhu a jsou proto značně zastoupeny v databázích sekvencí, jako je NCBI. Tato studie ITS sekvenování druhů hub poněkud rozšiřuje poznání o složení populací půdních hub v Olomouckém kraji a poslouží jako metodický základ pro širší hodnocení diverzity hub pomocí vzorků z různých ekosystémů v budoucích studiích.

Klíčová slova: Molekulární markery, půdní houby, Fusarium, internal transcribed spacer (ITS)

Abstract:

The advent of modern molecular marker technologies has greatly facilitated the rapid identification, characterization, and detection of important soil fungi, such as species of Fusarium, which were previously difficult to detect using traditional microbiological methods. Molecular tools can now rapidly characterize fungal biodiversity using small quantities of DNA or direct fungal mycelium samples. Various molecular markers, including RFLP, RAPD, SSR, AFLP, ITS, and IGS, have accelerated the identification and characterization of soil fungi over recent decades. Among these, the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal RNA genes is widely used due to its ability to identify fungi at the genus and species levels, supported by its extensive representation in sequence databases such as NCBI. This study, ITS sequencing of fungal species has expanded the understanding of soil fungal populations in the Olomouc region, paving the way for broader fungal diversity assessments using samples from different ecosystems in future studies.

Kye words: Molecular marker, soil fungi, Fusarium, internal transcribed spacer (ITS)

Introduction

Soil is a complex and dynamic habitat where microorganisms play key roles in ecosystem functioning. Among these microorganisms, fungi are highly diverse and perform crucial physiological and ecological functions within soil ecosystems (Miller, 1995). Fungi are ubiquitous in the environment, where they contribute to essential processes such as soil health, nutrient cycling, and carbon cycling (Christensen, 1989). Understanding the diversity of fungal communities in soil is critical for elucidating their specific roles in plant–fungus, pest–fungus, and microbe–fungus interactions.

Despite advancements in soil microbiota research, our knowledge of fungal diversity and their ecological functions remains relatively limited when compared to that of other soil organisms (Hattori et al., 1997; Ogram, 2000; Kent and Triplett, 2002). While molecular methods have advanced the study of fungi, these techniques have primarily been used to identify isolated fungi or investigate specific genera, such as Fusarium spp., Verticillium spp., and Mortierella spp.

The internal transcribed spacer (ITS) region has become an essential tool for assessing fungal

diversity, providing insights into the distribution, diversity, and activity of soil fungi. However, fungal-specific ITS primers remain limited in their ability to capture the full spectrum of fungal species present in soil. Recent developments in direct nucleic acid extraction methods, combined with PCR amplification, have significantly improved the exploration of genetic diversity in soil fungal communities. For instance, the use of specific direct PCR kit, such as the Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, United States), has facilitated deeper insights into soil fungal diversity.

This article focuses on the application of ITS-based methods for analyzing soil fungal diversity. We discuss the methodologies used, including PCR and phylogenetic analysis, and highlight key findings from this studies. By comparing the taxonomic coverage and diversity of fungal communities across different soil types using two ITS primer sets, we aim to assess the effectiveness of these primers in capturing fungal diversity. Accurate detection and identification of fungi are fundamental to soil microbiota studies. While traditional methods such as identifying fruiting bodies and morphological tests—have long been used, these methods are time-consuming, often non-quantitative, and prone to misidentification (Atkins and Clark, 2004). Molecular tools, such as ITS sequencing, offer a faster and more reliable alternative for fungal identification.

We used the internal transcribed spacer (ITS) region for fungal identification, significantly improving the assessment of fungal communities from soil samples. Fungal species were isolated, cultured, and identified using PCR on direct mycelium samples. Pairwise distances between aligned sequences were calculated using the pairwise deletion option, yielding a final dataset of 809 positions. Evolutionary analyses were performed in MEGA11 to explore phylogenetic relationships among the identified fungi. Our final aim was to compare the taxonomic coverage and fungal diversity captured by two ITS primer sets across a wide range of soil types.

Materials and Methods

Soil sampling and Fungi isolation

Soil samples were collected from five locations within the Olomouce Region, at a depth of 5-10 cm. Samples were immediately placed on ice and transported to the Agritec Plant Research laboratory for fungal isolation. A serial dilution method was employed to isolate fungal colonies. One gram of soil was suspended in 9 mL of double-distilled water and diluted five times (Ben-David & Davidson 2014). The diluted samples were then spread onto Potato Dextrose Agar (PDA, Himedia, India) plates and incubated at 24 °C for 24-48 hours. Plates were inspected every 12 hours to select and isolate pure fungal colonies onto new PDA plates. Isolated fungal colonies were preserved as PDA slants at 4 °C and as glycerol stocks at -80 °C for future use.

Fungal Colony Morphology and Microscopic Examination

Isolated fungal colonies were characterized macroscopically for their size, shape, margin, elevation, opacity, and color. Mycelia were examined microscopically using a field-emission microscope. For microscopic examination, isolates were diluted to achieve a final biomass dry weight of approximately 1 g/L. Methylene blue stain (50 µL/mL) was added to the diluted samples. A 50 µL aliquot of the stained sample was then pipetted onto a standard glass slide (25 × 75 mm) and covered with an extra-large cover slide (24 × 60 mm). Microscopic images were analyzed to characterize hyphal elements, which were classified into unbranched hyphae, branched hyphae, small clumps, large clumps, and pellets.

PCR Amplification and Sanger Sequencing

Isolated fungi were identified using molecular techniques targeting regions of the fungal ribosomal RNA genes. The ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS8 (CTTCACTCGCCGTTACTA) primers were employed for amplification, resulting in

fragments ranging from 550 to 700 base pairs. Amplified sequences were compared to a reference database for identification (White et al. 1990 and Egger 1995). Direct DNA amplification from plant samples was achieved using the Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States). PCR reactions were performed in a C1000 thermal cycler (BioRad) using a 20 µL reaction mixture containing 0.5 µL of fungal pathogen dilution, 10 µL of 2x Phire Plant Direct PCR Master Mix, 10 pmol of each primer, and sterile water. PCR cycling conditions included an initial denaturation step at 98 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 98 °C for 5 seconds, annealing at 55 °C for 5 seconds, and extension at 72 °C for 20 seconds. Amplified fragments were separated on 2% agarose gels and visualized using EtBr/UV. Selected fragments were purified using the InviSorb Fragment CleanUp Kit (Invitek) and sent for sequencing to an external laboratory. Purified PCR product sent to the Sanger sequencing to the Faculty of Science, Charles University, Prague.

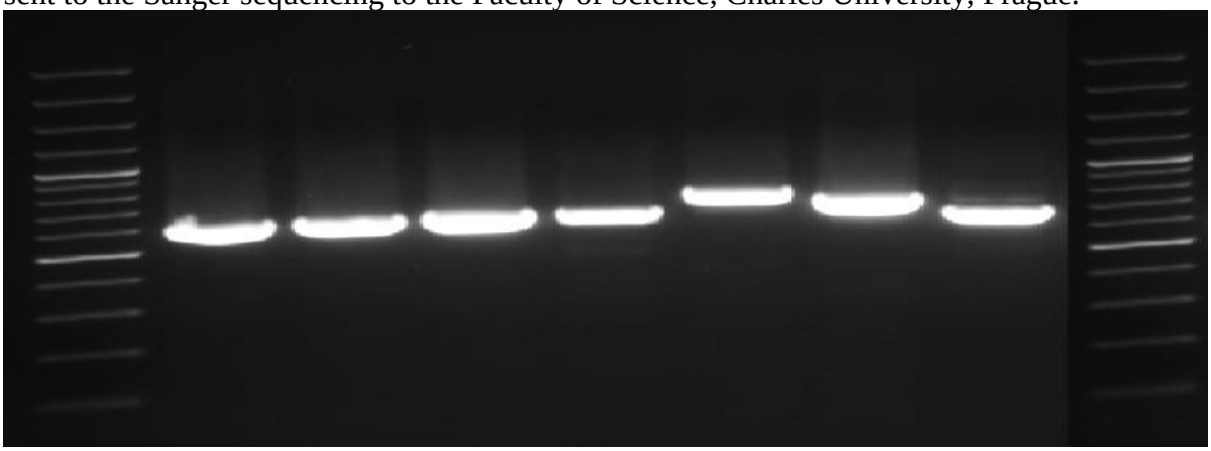


Figure 1. Agarose gel eletrophoresis for amplified of ITS primer. Amplified fragments were separated on 2% agarose gels and visualized using EtBr/UV.

Web-based BLAST

To identify soil fungi using Sanger sequencing data, the FASTA-formatted sequences were uploaded to the NCBI BLASTn database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). The nucleotide database was selected, and the search parameters were adjusted as needed. After initiating the BLAST search, the results were analyzed for taxonomic classification, sequence identity, E-value, and query coverage. If necessary, the search was refined by filtering by taxonomy or adjusting parameters. Based on the BLAST results, the soil fungi were identified. For critical identifications, additional methods like phylogenetic analysis or morphological examination were considered.

Phylogenetic Analysis

The phylogeny tree was constructed evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein J. 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. This method with bootstrap analysis. Fusarium spp., verticilium spp., and Mortierella spp. were used as outgroup. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There was a total of 809 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 (Tamura et al 2021).

Results

Selection of oligonucleotide primers and primer specificity

The sequence of ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS8 (CTTCACTCGCCGTTACTA) primers had no mismatch with Fusarium sequences. These ITS prives were choose because they were no mismatch with all three generas which were part of the study also able to distingius 3 other fungal genre Verticillium and Mortierella. They were located in the middle of the primer and were probably not destabilizing enough to hamper amplification. Figure 1 of PCR amplification products obtained with primers ITS5 and ITS8 and using the Phire Plant Direct PCR Kit from 10 fungal isoaltes.

Phylogenetic analysis

A phylogenetic tree was constructed using ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences obtained from Sanger sequencing to investigate the evolutionary relationships among Fusarium, Verticillium, and Mortierella species isolated from soil samples. The ITS region was selected as the molecular marker due to its high variability among fungal species, making it one of the most reliable regions for fungal identification and phylogenetic studies. This region is particularly valuable for studying fungal biodiversity because of its sequence variability, allowing for robust species-level resolution. In this analysis, the ITS sequences from the Fusarium, Verticillium, and Mortierella isolates were aligned and compared to reveal their evolutionary relationships. The phylogenetic tree, constructed using the Neighbor-Joining method, displays distinct clades representing each genus. Branch points in the tree represent divergence events, indicating common ancestors shared by the species clustered within each group. The clear separation of clades for each genus highlights the evolutionary divergence between Fusarium, Verticillium, and Mortierella species.

The tree shows that closely related species cluster within their respective clades, with Fusarium forming a distinct group separate from Verticillium and Mortierella, reflecting the genetic divergence between these genera. Bootstrap values, shown at branch nodes, provide statistical support for the evolutionary relationships inferred. A bootstrap value of 98% supports the close evolutionary relationship between Verticillium spp. and Fusarium ensiforme, indicating a highly reliable clustering of these taxa. In contrast, bootstrap values of 43% and 46% in certain branches reflect weaker support, suggesting that the evolutionary relationships among these species are less resolved.

Within the Fusarium clade, certain species show stronger evolutionary connections. *Fusarium avenaceum* and *Fusarium oxysporum* are closely related, with a high bootstrap support value of 97%, indicating strong confidence in their close evolutionary relationship. *Fusarium poae* and *Fusarium camptoceras* also form a distinct clade, with 93% bootstrap support, suggesting a moderately close evolutionary relationship between these species. The position of *Fusarium equiseti* suggests it is more distantly related to the other Fusarium species, indicating greater evolutionary divergence within the genus. The analysis also highlights the evolutionary separation of *Mortierella alpina* and *Verticillium dahliae* from the Fusarium species, as they appear on separate branches. The long branch leading to *Mortierella alpina* indicates significant genetic divergence, which is expected given that Mortierella belongs to a different fungal order (Mortierellales). These species likely serve as useful outgroups, reinforcing the distinction between Fusarium and non-Fusarium taxa and providing a clearer understanding of the evolutionary paths taken by each genus.

Overall, the varying branch lengths in the tree reflect the amount of genetic divergence between species, with longer branches indicating more substantial genetic changes over time. This tree provides valuable insights into the evolutionary history of these fungal genera and the genetic similarities and differences that shape their taxonomy and relationships.

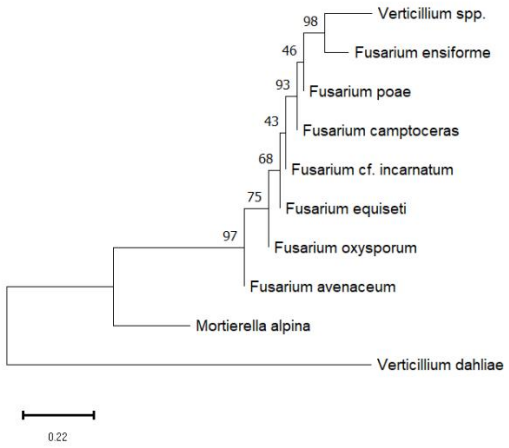


Figure 2. The evolutionary history was inferred using the Neighbour-Joining method (Saitou N. and Nei M. 1987). The optimal tree is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Saitou N. and Nei M. 1987). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura K. et al. 2004). and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 10 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1825 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 (Tamura K. et al 2021).

Discussion

The primary objective of this study was to develop a molecular approach to monitor the diversity of Fusarium communities in complex environmental samples, such as soils. To achieve this, we designed highly specific primers targeting the ITS region, a well-established marker for fungal identification due to its high variability among species. The phylogenetic analysis successfully revealed the diversity of Fusarium, Verticillium, and Mortierella species in soil samples. In comparison to more complex environments like plant samples, soil environments tend to have higher fungal diversity. This might be explained by the nature of the sample matrix or differences in the methods used to analyze PCR products. Previous studies, such as that by Yergeau et al. (2005), focused on sequencing dominant bands detected by denaturing gradient gel electrophoresis, whereas we sequenced all isolates systematically, providing a more comprehensive view of the fungal diversity present. Another factor may be the varying abundance of Verticillium and Mortierella communities in soils, which could affect the relative representation of different taxa.

Nevertheless, Fusarium species are known to be cosmopolitan and abundant in soils, as supported by previous studies (Druzhinina et al., 2011). In this study, seven Fusarium species or species complexes were detected. The broad distribution and environmental tolerance of species such as Fusarium spp. suggest their adaptability to a wide range of soil conditions (Rodriguez-Molina et al., 2000; Backhouse et al., 2001; Balmas et al., 2010; Summerell et al., 2010; Saremi and Saremi, 2013). This species complex is typically dominant in soils, further highlighting its ecological prevalence. Among the Fusarium species identified, *Fusarium avenaceum,* which is a potential parasite of cereals, was detected in soil. This species is generally absent or weakly represented in soil samples (Steinkellner and Langer, 2004), making its detection in this study notable. Morphologically, *F. avenaceum* is quite similar to *F. oxysporum,* and distinguishing between these two species often requires detailed morphological analysis or molecular data (Skovgaard et al., 2003). Although the ITS region serves as a reliable

marker for identification, certain soil-borne Fusarium genotypes might not be recovered through traditional isolation methods, suggesting that our current sampling effort may not have captured the full diversity of the fungal communities.

The phylogenetic tree further reinforces these observations by clearly delineating the evolutionary relationships among the identified species. High bootstrap support for the *Fusarium avenaceum* and *Fusarium oxysporum* clade (97%) underscores their close evolutionary relationship, while other species, such as *Fusarium equiseti*, are more distantly related, as indicated by their positioning in the tree. This evolutionary divergence highlights the complexity of Fusarium diversity in soil ecosystems. Overall, our results suggest that further sampling is required to reach saturation and provide a more accurate representation of Fusarium diversity in soil environments. The molecular approach applied here, coupled with comprehensive sequencing, offers a robust framework for future studies aimed at understanding fungal community dynamics in soils.

Conclusion

The phylogenetic analysis based on ITS sequences provides clear genetic differentiation between the fungal genera Fusarium, Verticillium, and Mortierella isolated from soil samples. The resulting phylogenetic tree illustrates that Fusarium spp. forms a distinct, well-supported clade, highlighting the close evolutionary relationships among the species within this genus. *Mortierella alpina* appears more distantly related to Fusarium, reflecting the evolutionary separation between these genera. The grouping of Verticillium spp. into a distinct clade further supports its genetic divergence from Fusarium and other soil fungi, including Mortierella. The detection of high bootstrap support for certain clades, such as the one formed by *Fusarium avenaceum* and *Fusarium oxysporum* (97%), emphasizes the close evolutionary relationship between these species. However, lower bootstrap values for other branches suggest that some evolutionary relationships remain unresolved, which indicates a need for further investigation.

This analysis contributes to our understanding of fungal diversity in soil and the evolutionary relationships among soil-borne pathogens, such as Fusarium and Verticillium, which are of particular concern due to their role in plant diseases. The inclusion of outgroup species like *Mortierella alpina* and *Verticillium dahliae* helps to clearly define the evolutionary boundaries between Fusarium and other fungal genera.

In summary, this phylogenetic analysis reveals well-supported clusters within the Fusarium genus and clear evolutionary distinctions between some species, while other relationships remain less certain due to weaker support. These findings provide a foundation for further studies aimed at understanding the ecological roles and evolutionary trajectories of soil fungi in agricultural ecosystems.

In future studies, incorporating high-throughput sequencing technologies and multiplexing techniques will allow for more in-depth analysis of fungal communities. Such approaches will facilitate monitoring of Fusarium diversity on a larger scale and offer insights into how environmental factors, land use, and agricultural practices influence fungal community dynamics.

Acknowledgments

This study was supported and funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (institutional support MZE-RO1023) and the European Union's Horizon Europe Research and Innovation program under grant agreement No. 101082289.

References

Ben-David, A., & Davidson, C. E. (2014). Estimation method for serial dilution experiments. Journal of microbiological methods, 107, 214-221.
White, T. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and applications/Academic Press, Inc.
Egger, K. N. (1995). Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. Canadian Journal of Botany, 73(S1), 1415-1422.
Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.
Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution https://doi.org/10.1093/molbev/msab120.
Miller, M. H., McGonigle, T. P., & Addy, H. D. (1995). Functional ecology of vesicular arbuscular mycorrhizas as influenced by phosphate fertilization and tillage in an agricultural ecosystem. Critical Reviews in Biotechnology, 15(3-4), 241-255.
Christensen, M. (1989). A view of fungal ecology. Mycologia, 81(1), 1-19.
Hattori, T., Mitsui, H., Haga, H., Wakao, N., Shikano, S., Gorlach, K., ... & Hattori, R. (1997). Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. Antonie van Leeuwenhoek, 72, 21-28.
Ogram, A. (2000). Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. Soil Biology and Biochemistry, 32(11-12), 1499-1504.
Kent, A. D., & Triplett, E. W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. Annual Reviews in Microbiology, 56(1), 211-236.
Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. J Appl Genet, 45(1), 3-15.
Yergeau, E., Filion, M., Vujanovic, V., & St-Arnaud, M. (2005). A PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to assess Fusarium diversity in asparagus. Journal of microbiological methods, 60(2), 143-154.
Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., ... & Kubicek, C. P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. Nature reviews microbiology, 9(10), 749-759.
Rodriguez-Molina, M. C., Tello-Marquina, J. C., Torres-Vila, L. M., & Bielza-Lino, P. (2000). Micro-scale systematic sampling of soil: Heterogeneity in populations of Fusarium oxysporum, F. solani, F. roseum and F. moniliforme. Journal of Phytopathology, 148(11-12), 609-614.
Backhouse, D., Burgess, L. W., & Summerell, B. A. (2001). Biogeography of Fusarium.
Balmas, V., Migheli, Q., Scherm, B., Garau, P., O'Donnell, K., Ceccherelli, G., ... & Geiser, D. M. (2010). Multilocus phylogenetics show high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). Mycologia, 102(4), 803-812.
Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C., & Leslie, J. F. (2010). Biogeography and phylogeography of Fusarium: a review. *Fungal Diversity*, *44*(1), 3-13.
Saremi, H., & Saremi, H. (2013). Isolation of the most common Fusarium species and the effect of soil solarisation on main pathogenic species in different climatic zones of Iran. *European Journal of Plant Pathology*, *137*, 585-596.
Steinkellner, S., & Langer, I. (2004). Impact of tillage on the incidence of Fusarium spp. in soil. *Plant and soil*, *267*, 13-22.
Skovgaard, K., Rosendahl, S., O'Donnell, K., & Nirenberg, H. I. (2003). Fusarium commune is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Mycologia*, *95*(4), 630-636.

Kontaktní adresa:

Mgr. Ram Kumar, Ph.D.
Agritec Plant Research, s.r.o.
Zemědělská 2520/16
78701 Šumperk
Kumar@agritec.cz

Úroda 12/2024, vědecká příloha časopisu

Vnímavost vybraných odrůd bramboru s barevnou dužninou na *Potato virus Y*

Susceptibility of selected potato genotypes with coloured flesh to *Potato virus Y*

Loubová V., Kmoch M.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod s.r.o.

Abstrakt

Potato virus Y (PVY) je významný virus bramboru. Cílem experimentu bylo stanovení vnímavosti vybraných genotypů bramboru s barevnou dužninou ke kmenům *Potato virus Y* pomocí umělé inokulace rostlin ve skleníku. Po inokulaci byly vizuálně hodnoceny primární reakce infikovaných rostlin, vnímavost genotypů k infekci na nadzemních částech rostlin a citlivost hlíz z hlediska nekrotické reakce (tzv. PTNRD – Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease). Byl zjištěn i vliv infekce PVY na výnos a počet hlíz bramboru. Příznaky napadení a jejich intenzita na nadzemních částech rostlin se lišila v závislosti na kmenu PVY a vnímavosti genotypu bramboru. Infekce jednotlivých genotypů kmeny PVY měla u většiny genotypů negativní vliv na počet a výnos hlíz.

Klíčová slova: viry, výnos, infekce, symptomatologie, genotypy bramboru.

Abstract

Potato virus Y (PVY) is an important potato virus. The aim of the experiment was to determine susceptibility of selected potato genotypes with coloured flesh to *Potato virus Y* strains using artificial inoculation of plants in the greenhouse. After inoculation primary responses of infected plants, susceptibility of genotypes to infection of above-ground plant parts and sensitivity of tubers to necrotic reaction (so-called PTNRD – Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease) were visually evaluated. The effect of infection on potato yield and tuber number was also recorded. Infection symptoms and their intensity on above-ground plant parts differed depending on PVY strain and susceptibility of potato genotypes. Infection of individual genotypes with PVY strains had a negative effect on tuber number and yield in most genotypes.

Keywords: viruses, yield, infection, symptomatology, potato genotypes

Úvod

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) jsou důležitou hospodářskou plodinou po celém světě (Vokál, 2013). Genotypy s barevnou dužninou jsou nutričně bohatší než odrůdy žlutomasé. Hlízy brambor představují ve výživě lidí významný zdroj antioxidantů. Významnou skupinou antioxidantů jsou přírodní barviva anthokyany, které jsou obsaženy v červeně a modře zbarvených odrůdách brambor. Červeně zbarvené hlízy obsahují glykosidy pelargonidinu, v menší míře peonidinu. Modročerné hlízy obsahují glykosidy petunidinu a větší množství glykosidu malvidinu. Antioxidační kapacita červeně nebo modře zbarvených brambor je 2–3krát vyšší ve srovnání s bramborami se žlutou, resp. bílou dužninou hlíz. Běžné metody tepelné úpravy neovlivňují obsah anthokyanů ani antioxidační kapacitu a tyto zdraví prospěšné faktory zůstávají zachovány (Lachman et Hamouz, 2004).

Infekce viry bramboru je velkým problémem (Kmoch et Dědič, 2020). Hospodářsky nejvýznamnější virus je Y virus bramboru (*Potato virus Y* – PVY), původce Y-virózy bramboru (Singh et al., 2008). PVY patří do čeledi *Potyviridae,* dělí se do třech hlavních kmenů (PVY^N, PVY^O, PVY^C) dle sérologických, molekulárních a biologických vlastností (Romancer et al., 1994; Glais et al., 2002; Nie et Singh, 2002). PVY ovlivňuje produkci brambor po celém světě snižováním výnosů a kvalitou hlíz (Singh et al., 2008). Kmeny PVY^N a PVY^O se v Evropě rekombinovaly a vytvořily $PVY^{N:O}$ (= $PVY^{N\text{-}Wi\ (Wilga)}$) a PVY^{NTN} (Boonham et al., 2002). PVY se přenáší infikovanými sadbovými hlízami, které jsou hlavním zdrojem infekce (Valkonen,

2007). Dále se PVY může šířit během vegetace neperzistentním přenosem mšicemi z infikovaných rostlin a zdravé rostliny. Jedná se o tzv. primární infekci (Brunt, 2001). PVY vytváří na rostlinách bramboru různé symptomy. Některé kmeny PVY (PVY^{N-Wi}) mohou způsobovat u většiny odrůd jen slabé příznaky nebo netvořit příznaky žádné (Warren et al., 2005). Mezi symptomy PVY na listech bramboru patří mozaika (mírná, těžká), kadeřavost, zakrslost, opadávání listů (leaf drop streak) a těžké systémové nekrózy. Při sklizni nebo během skladování může být na hlízách některých citlivých odrůd bramboru pozorována nekrotická kroužkovitost hlíz, PTNRD – Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease, kterou způsobují některé kmeny PVY, zejména PVY^{NTN} (Kmoch et Dědič, 2020). Závažnost infekce PVY se zvyšuje u smíšených infekcí s jinými viry (Kerlan, 2006; Valkonen, 2007).
Cílem experimentu bylo stanovení vnímavosti vybraných genotypů bramboru s barevnou dužninou ke kmenům *Potato virus Y*. Byly hodnoceny projevy symptomatologie na nadzemní části a na hlízách bramboru. Součástí bylo vyhodnocení vlivu PVY kmenů na výnos a počet hlíz.

Materiál a metody

Potato Virus Y

Kmeny Y^{NTN} Nicola a Y^{Wi} Agria byly získány ze Sbírky fytopatogenních virů brambor (VIRUBRA) se sídlem v Havlíčkově Brodě (Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu).

Rostlinný materiál

Genotypy bramboru - ('Rote Emma', 'Rosalinde', 'Highland Burgundy Red', 'Val Red', VEP 44/2, 'Cibared', 'Blaue Sant Galler', 'Val Blue', 'Valfi') byly poskytnuty z Kolekce brambor (Národní program konzervace a využití genofondu rostlin a agro-biodiversity).
Jako kontrola byla zvolena žlutomasá odrůda 'Hermes', která je typická svou citlivostí ke kmenům PVY (Tabulka 1).

Tabulka 1: Charakteristika vybraných testovaných genotypů

Genotyp	Původ	Základní informace	Varný typ
'Val Red'	Česká republika	Poloraná až polopozdní odrůda pro přímý konzum, hlízy jsou dlouhé, červenostrakatá dužnina, středně červená slupka	B
'Val Blue'	Česká republika	Raná odrůda pro přímý konzum, hlízy jsou velmi dlouhé až rohlíčkovité, modrá dužnina a modrá slupka	B
'Valfi'	Česká republika	Poloraná až polopozdní konzumní odrůda, oválné hlízy, modrofialová mramorovaná dužnina a modrofialová slupka	BC
VEP 44/2	Česká republika	Poloraný kříženec vhodný pro přímý konzum. Hlízy jsou oválné až rohlíčkovité se sytě fialovou dužninou a tmavě fialovou slupkou.	BC
'Cibared'	Česká republika	Poloraná konzumní odrůda, oválné hlízy, červená dužnina a červená	B

		slupka	
'Rote Emma'	Německo	Hlízy jsou oválné, červená dužnina a červená slupka	BC
'Highland Burgundy Red'	Anglie	Hlízy jsou oválné, červená dužnina s bílým prstencem pod slupkou a červená slupka	BC
'Blaue Sant Galler'	Švýcarsko	Hlízy jsou oválné, dužnina je fialová až částečně fialová a fialová slupka	B
'Rosalinde'	Německo	Raná až poloraná odrůda. Hlízy jsou oválné, růžová dužnina, růžová slupka	B
'Hermes' (kontrola)	Rakousko	Raná až poloraná odrůda. Hlízy jsou krátce oválné až oválné, světle žlutá až žlutá dužnina, žlutá slupka	C

Testování vnímavosti vybraných genotypů k PVY pomocí umělé inokulace rostlin ve skleníku

Vnímavost vybraných barevných odrůd byla testována pomocí metody mechanické inokulace rostlin za použití karborundového prášku (SiC) dle Zadina et Jermoljev (1976) s drobnými úpravami. Tato metoda lze použít při infekci viry, které svoji infekčnost udržuje ve šťávě získané rozdrcením pletiv rostlin, na kterých se virus po infekci rozmnožuje a přetrvává.

Jednotlivé barevné odrůdy byly vysazeny do kontejnerů o rozměru 10×10 cm obsahující zahradní substrát. Mechanická inokulace rostlin byla provedena kmeny PVY (Y^{NTN} Nicola a Y^{Wi} Agria) při výšce rostlin 30 cm. Pro mechanickou inokulaci byla získána šťáva z listů bramboru infikovaných virem PVY, které byly rozmělněny pomocí třecí misky s tloučkem s karborundem a destilovanou vodou. Aplikace infekční šťávy byla provedena u druhého a třetího listu (2 protilehlé listy) od vrcholu rostliny, a to tak, že listy testované rostliny byly nejprve poprášeny karborundovým práškem o velikosti zrn 400-600 mesh. a poté byly krouživými pohyby tloučku namočeného do infekční šťávy vybrané listy inokulovány. Pomocí karborundového prášku dojde k poranění některých buněk listu testované rostliny, virus vnikne do rostliny. Při mechanické infekci pomocí karborunda je nutné postupovat tak, aby došlo pouze k jemnému poranění buněk, nikoliv k poškození listů. Po 10 min od inokulace byly listy inokulovaných rostlin opatrně opláchnuty vodou. Do pokusu byla zařazena kontrola, kterou byla odrůda 'Hermes', která je velmi citlivá na infekci kmeny PVY a negativní kontrola bez inokulace virem. Byly provedeny vždy tři opakování od každé varianty inokulace.

Po třech týdnech byly vizuálně hodnoceny příznaky infekce na rostlinách bramboru. Hodnocení bylo po týdnu zopakováno. Příznaky byly zapsány do tabulky. Po sklizni byly vizuálně hodnoceny hlízy bramboru, měřena hmotnost a zaznamenán počet hlíz. Poté bylo provedeno statistické hodnocení výnosu hlíz a počtu hlíz v porovnání s negativní kontrolou (Zadina et Jermoljev 1976). Statistické vyhodnocení pokusu bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (MS Excel).

Výsledky a diskuze

Byla testována vnímavost vybraných barevných odrůd k PVY pomocí metody mechanické inokulace za použití karborundového prášku. Na inokulovaných rostlinách byly pozorovány různé symptomy (mozaika, kadeřavost, opad listů, nekróza listu, nekróza stonku, nekróza

inokulovaného listu, zakrslost, žilková nekróza listů). Mezi jednotlivými genotypy byly zjištěny rozdíly v projevech napadení kmeny PVY (Tabulka 2). Na symptomy měl vliv i kmen viru Y. Výsledky testů ukazují, že u odrůdy 'Cibared' nebyly na nadzemních částech rostlin pozorovány žádné symptomy u obou kmenů PVY. U odrůdy 'Rote Emma' byly zjištěny pouze slabé projevy infekce (mírná mozaika) u kmenu PVY^{NTN} Nicola. Slabé projevy infekce PVY byly pozorovány u odrůdy 'Val Red' v podobě lehké mozaiky u obou kmenů PVY. U odrůdy 'Highland Burgundy Red' byla zjištěna lehká mozaika u kmenu PVY^{NTN} Nicola, zatímco PVY^{Wi} Agria vytvořila na rostlinách těžkou mozaiku. Ostatní genotypy ('Val Blue', 'Valfi', VEP 44/2, 'Blaue Sant Galler', 'Rosalinde') byly velmi vnímavé na napadení kmeny PVY. Byly u nich pozorovány většinou těžké mozaiky a opad listů. Odrůda 'Hermes', sloužící jako kontrola, měla silné projevy symptomů po infekci kmenu PVY^{NTN} Nicola (těžká mozaika, žilková nekróza listů, nekróza listů, nekróza stonků, opad listů, kadeřavost, zakrslost) a PVY^{Wi} Agria (žilková nekróza listů a těžká mozaika listů). U testovaných genotypů brambor nebyly na hlízách pozorovány žádné nekrózy. U genotypu 'Hermes' (kontrola) byla nekróza zaznamenána u všech hlíz.

Tabulka 2: Hodnocení příznaků infekce PVY na rostlinách

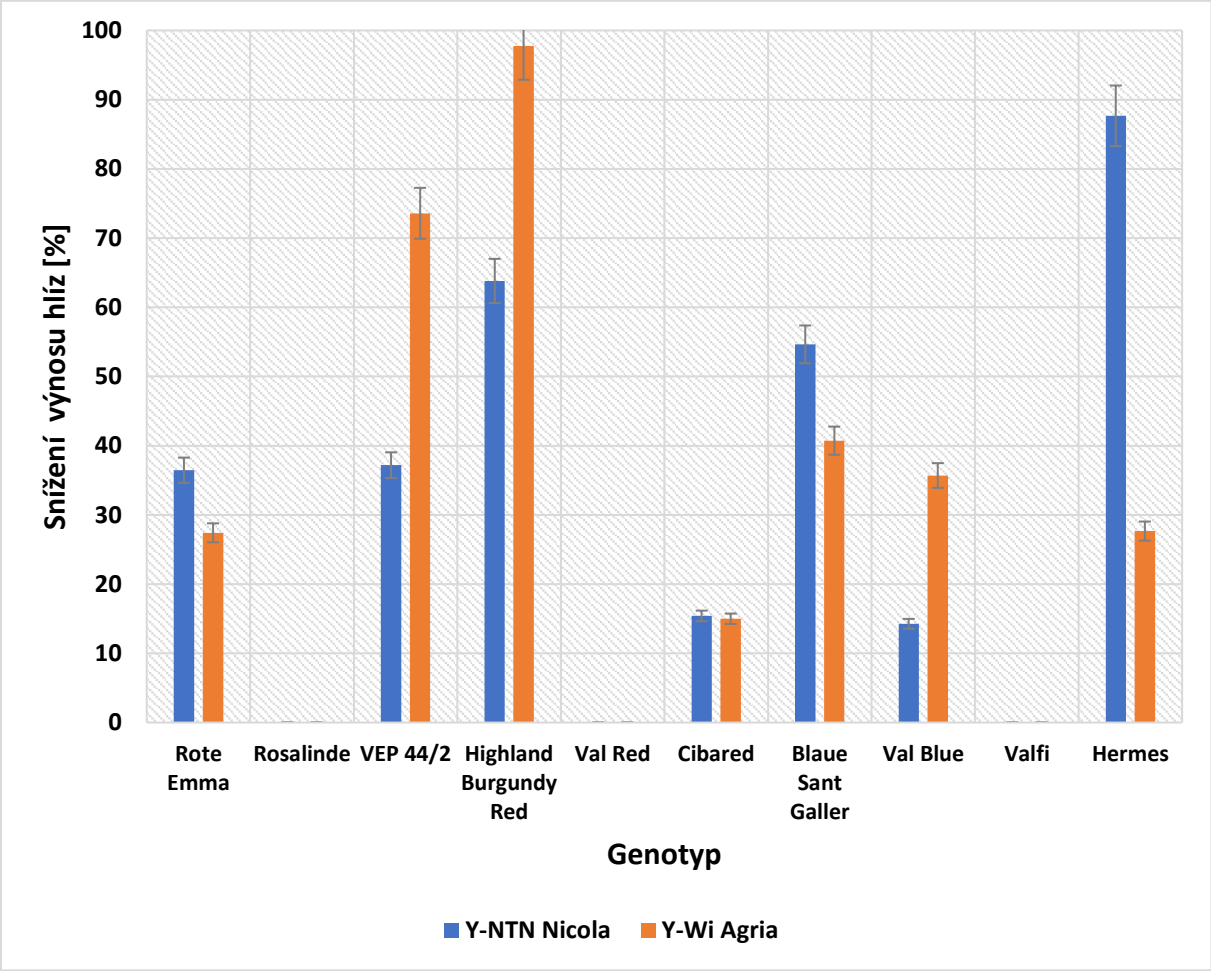
Genotyp	**Y^{NTN} Nicola**	**Y^{Wi} Agria**	**Kontrola (zdravá rostlina)**
'Val Red'	(M)	(M)	-
'Val Blue'	TM, K	Z, TM, NLi	-
'Valfi'	M, LD	TM	-
VEP 44/2	Z, LD, ŽNL, K, TM	Z, LD	
'Cibared'	-	-	-
'Rote Emma'	(M)	-	-
'Highland Burgundy Red'	(M)	TM	-
'Blaue Sant Galler'	Z, K, TM	TM, Z	-
'Rosalinde'	TM, NL, LD	TM, NL, LD	-
'Hermes' (Kontrola)	TM, ŽNL, NL, NS, LD, K, Z	ŽNL, TM	-

Legenda: (M) – lehká mozaika, M – mozaika, TM – těžká mozaika, K – kadeřavost, Z – zakrslost, NLi – nekróza inokulovaného listu, LD – leaf drop streak (opad listů), NL – nekróza listů, ŽNL – žilková nekróza listů, NS – nekróza stonků

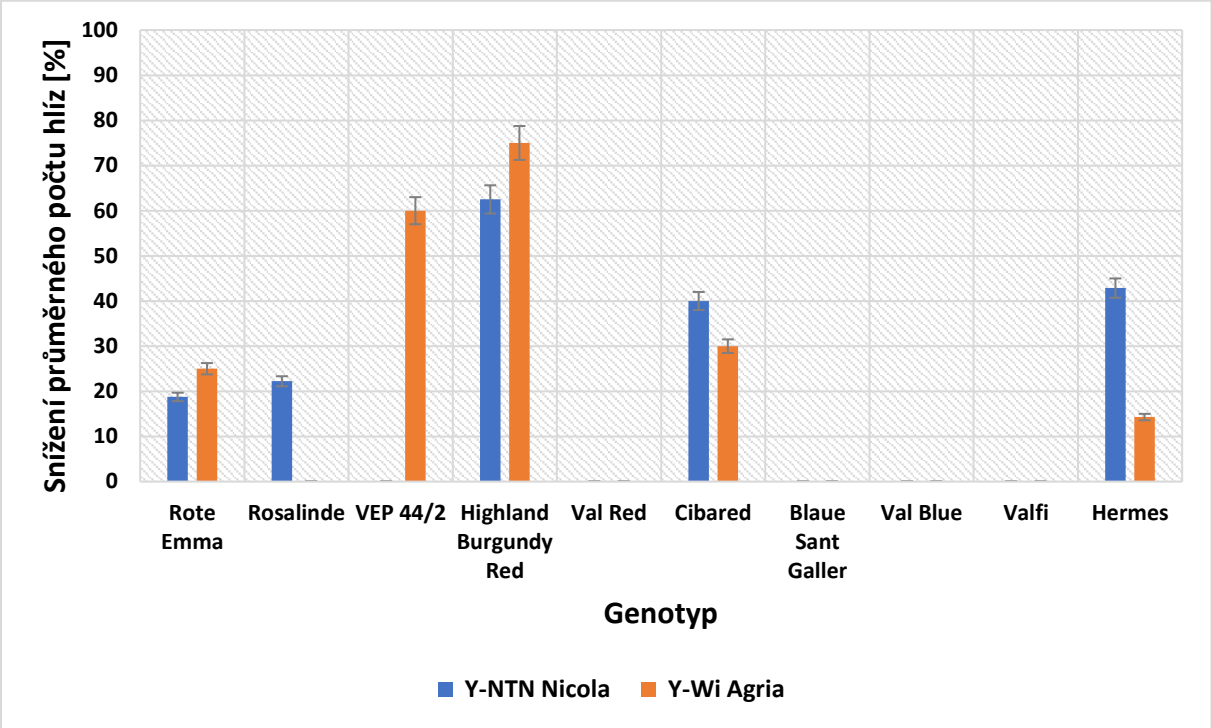
Z výsledků vyplývá, že infekce kmeny PVY měla také negativní vliv na výnos hlíz (graf 1). Výnos se u jednotlivých genotypů lišil. Na výnos hlíz měl vliv nejen genotyp, ale také infekce jednotlivým kmenem PVY. Po infekci kmeny PVY došlo k výnosové depresi u většiny genotypů. Infekce kmeny Y^{NTN} Nicola a Y^{Wi} Agria neměla vliv na výnos u genotypů 'Rosalinde', 'Val Red' a 'Valfi'. Největší vliv infekce PVY na snížení výnosu byl pozorován u genotypů VEP 44/2, 'Highland Burgundy Red', 'Blaue Sant Galler'. Zejména infekce kmenem Y^{Wi} Agria měla značný vliv na výnosovou depresi u VEP 44/2 a 'Highland Burgundy Red' (obr.3). Infekce kmeny PVY měla také vliv na počet hlíz bramboru (graf 2). Počet hlíz byl závislý na genotypu a kmenu PVY. Po infekci kmeny PVY došlo u odrůd 'Rote Emma', 'Highland Burgundy Red', ke snížení počtu hlíz u většiny genotypů. Infekce kmeny PVY neměla vliv na snížení počtu hlíz u odrůd 'Val Red', 'Blaue Sant Galler', 'Val Blue' a 'Valfi'. U genotypu 'Rosalinde' měla vliv na snížení počtu hlíz pouze infekce kmenem Y^{NTN} Nicola. U genotypu VEP 44/2 měl vliv na snížení počtu hlíz kmen Y^{Wi} Agria. Důvod proč u genotypů 'Blaue Sant Galler' a 'Val Blue' nedošlo ke snížení počtu hlíz, a přesto došlo ke snížení výnosu je ten, že po infekci kmeny PVY vznikly jen velmi drobné hlízy.

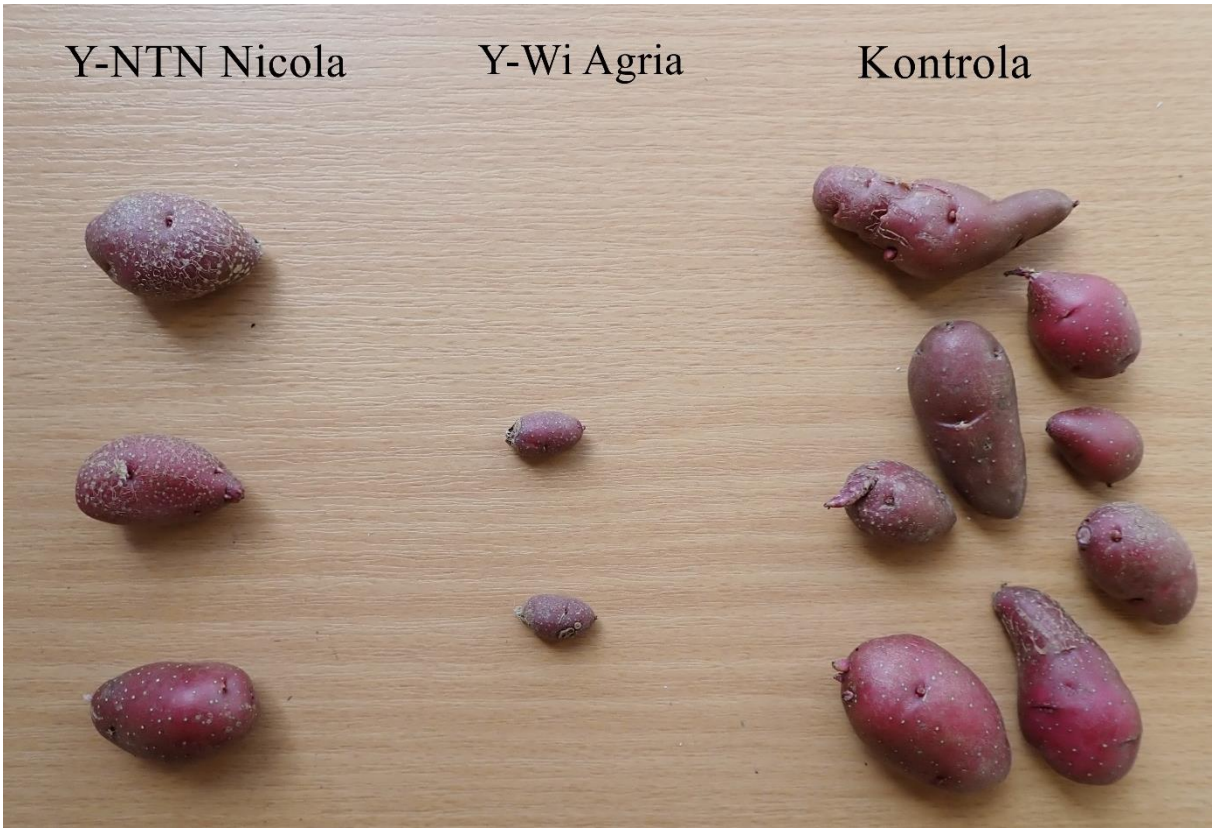
U některých genotypů nedošlo k vysokému snížení počtu hlíz po infekci kmeny PVY, ale hlízy byly velice drobné, což mělo vliv na snížení jejich výnosu. V zemědělství jsou takto malé hlízy neprodejné jako konzumní. U genotypů 'Val Red' a 'Valfi' infekce kmeny PVY neměla na snížení výnosu a počet hlíz vliv.

Graf 1: Vliv infekce rostlin genotypů bramboru kmeny PVY na snížení výnosu hlíz



Graf 2: Vliv infekce rostlin genotypů bramboru kmeny PVY na snížení počtu hlíz





Obr. 3: Vliv kmenů PVY na výnos genotypu 'Highland Burgundy Red'

Barevné odrůdy bramboru byly již v minulosti testovány z hlediska citlivosti k *Phytophthora infestans* (Pazderů et Hamouz, 2017), chemického složení (Lachman et al., 2016), výnosu a

tržního uplatnění. Nicméně testování barevných odrůd na viry nebyla věnována dostatečná pozornost. V minulosti byl zájem zaměřen na testování citlivosti genotypů odrůd se žlutou dužninou (Funke et al., 2017; Onditi et al., 2021).

Závěr

V experimentu byla testována vnímavost vybraných genotypů s barevnou dužninou ('Rote Emma', 'Rosalinde', 'Highland Burgundy Red', 'Val Red', VEP 44/2, 'Cibared', 'Blaue Sant Galler', 'Val Blue', 'Valfi') na kmeny PVY pomocí mechanické inokulace rostlin. Příznaky napadení a jejich intenzita na nadzemních částech rostlin se lišila v závislosti na kmenu PVY a vnímavosti genotypu bramboru. Infekce jednotlivých genotypů kmeny PVY měla také většinou vliv na počet hlíz a výnos. Při pěstování brambor je nutné věnovat virům PVY pozornost, neboť mohou způsobit značnou ztrátu výnosu hlíz.

Poznatky o reakci genotypů bramboru k infekci kmeny PVY jsou významné nejenom pro šlechtitele nových odrůd, ale i pro pěstitele konzumních brambor a množitele sadby. Šlechtění odolnějších odrůd bramboru k PVY je nezbytné pro snížení negativního dopadu na produkci. Na základě vnímavosti genotypů ke kmenům PVY mohou pěstitelé brambor vybírat vhodné odrůdy pro pěstování.

Literatura

Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., Barker, I. (2002). The detection of tuber necrotic isolates of Potato Virus *Y*, and the accurate discrimination of PVYO, PVYN and PVYC strains using RT-PCR. J. Virol. Meth., 102: 103–112.

Brunt, A. A. (2001). The Main Viruses Infecting Potato Crops. In: "Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seedpotatoes", (Ed.): G. Loebenstein, P. H. Berger., A. A. Brunt, R. H. Lawson, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, s. 65–67.

Funke, C. N., Nikolaeva, O. V., Green, K. J., Tran, L. T., Chikh-Ali, M., Quintero-Ferrer, A., Cating, R. A., Frost, K. E., Hamm, P. B., Olsen, N., Pavek, M. J., Gray, S. M., Crosslin, J. M., & Karasev, A. V. (2017). Strain-Specific Resistance to *Potato virus Y* (PVY) in Potato and Its Effect on the Relative Abundance of PVY Strains in Commercial Potato Fields. Plant Disease, 101(1), 20–28. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0901-RE

Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C. (2002). Genomic variability in Potato Potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. Arch. Virol., 147: 363–378.

Kerlan, C. (2006). *Potato virus Y*. AAB descriptions of plant viruses, no 414. Available at http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414.

Kmoch, M., Dědič, P. (2020). Metodika detekce Y viru bramboru (*Potato virus Y*) v listech a hlízách pomocí metod založených na PCR (Vydání první). Výzkumný ústav bramborářský, s.r.o.

Lachman J., Hamouz K. (2004). Anthokyany v hlízách brambor s červeně až modře zbarvenou dužninou - významný zdroj antioxidantů ve výživě. Bramborářství. 2004, roč. 12, č. 2, s. 12-15.

Lachman J., Hamouz K., & Orsák, M. (2016). Colored Potatoes. In Advances in Potato Chemistry and Technology (s. 249–281). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800002-1.00009-1

Nie, X.Z., Singh, R.P. (2002). Probable geographical grouping of PVYN and PVYNTN based on sequence variation in P1 and 5-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVYNTN. J. Virol. Meth., 103: 145–156.

Onditi, J., Nyongesa, M., & Van Der Vlugt, R. (2021). Screening for PVYN-Wi Resistance in Kenyan Potato Cultivars. Potato Research, 64(3), 469–488. https://doi.org/10.1007/s11540-020-09488-4

Pazderů, K., Hamouz, K. (2017). Yield and resistance of potato cultivars with colour flesh to potato late blight. Plant, Soil and Environment, 63(7), 328–333. https://doi.org/10.17221/371/2017-PSE

Romancer, M.L., Kerlan, C., Nedellec, M. (1994). Biological characterisation of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. Plant Pathol., 43: 138–144.

Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C. et al. (2008). The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. Archives of Virology, 153: 1–13.

Valkonen, J.P.T. (2007). Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Mackerron, D.K.L. et al. (eds) Potato Biology and Biotechnology Advances and Prospects. Elsevier, Oxford, United Kingdom, s. 619–641.

Vokál, B. (2013). Brambory: Šlechtění, pěstování, užití, ekonomika (1. vyd). Profi Press.

Warren, M., Krüger, K., Schoeman, A.S. (2005). *Potato virus Y* (PVY) and *Potato leafroll virus* (PLRV): Literature review for potatoes South Africa. Department of Zoology and Entomology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria.

Zadina, J., Jermoljev, E. (1976). Šlechtění Bramboru; 1st ed.; Academia: Praha, 1976

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR (Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu). Poděkování patří také Sbírce fytopatogenních virů brambor (Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu) za poskytnutí kmenů PVY a Kolekci brambor (Národní program konzervace a využití genofondu rostlin a agro-biodiversity) za poskytnutí vybraných genotypů bramboru.

Kontakt:

Mgr. Věra Loubová
Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.
Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův brod
569 466 232, loubova@vubhb.cz

Vliv insektofungicidních variant ošetření na zdravotní stav řepky ozimé

The impact of combination of insecticidal and fungicidal treatments on the diseases of winter oilseed rape

Šafář J.[1], Plachká E.[2], Seidenglanz M.[1]

[1]Agritec Plant Research, s.r.o.; [2]OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Abstrakt

Cílem této práce, jež probíhala mezi lety 2022-2024 bylo nalézt kombinaci fungicidní ochrany řepky ozimé s podporou dostupných látek s insekticidním účinkem na zdravotní stav řepky. Výsledky přinesly pozitivní přínos insekticidů, který se projevil snížením napadení stonkovými krytonosci (*Ceutorhynchus napi* Gyllenhal, 1837 a *C. pallidactylus* (Marsham 1802)) ale také sníženým napadením fomového černání stonků řepky (Leptosphaeria sp.). Insekticidní ochrana řepky v námi zvolených variantách demonstrovala nezastupitelnost insekticidní ochrany ve vztahu k sekundárnímu napadení fomovým černání stonků.

Klíčová slova: řepka ozimá, insekticid, fungicid,

Abstract

The aim of this work, which in trials showed between 2022-2024, was to find a combination of fungicidal protection of winter oilseed rape with the support of available active substances with an insecticidal effect on the lower infestation of oilseed rape. The results showed a positive benefit of insecticides, which was showed by a reduction in infestation by rape stem weevil and cabbage stem weevil (*Ceutorhynchus napi* Gyllenhal, 1837 and *C. pallidactylus* (Marsham 1802)) but also by a reduced infestation by black blackleg of rape or Phoma stem canker (Leptosphaeria sp.). The insecticidal protection of winte oilseed rape in the treatments we demonstrated the irreplaceability of insecticidal protection in relation to the secondary attack of blackleg of rape or Phoma stem canker.

Keywords: winer oilseed rape, insecticides, fungicides

Úvod

Vzhledem k turbulentním výkyvům v ceně merkantilu řepky, zařazením v osevních postupech, které pravidelně v České republice přesahuje 15 % orné půdy, lze očekávat v produkčních oblastech pokles zájmu o pěstování, což je zapříčiněno širokým spektrem škůdců, napadení houbovými chorobami a legislativním omezením v počtu účinných látek k aplikaci. Tristní je situace zejména u insketicidů, kdy částečně systemický účinek je prakticky u jedné neonikotinoidní látky, jež je naštěstí stále k dispozici (acetamiprid). Dále situaci zhoršují jevící se problémy se sníženou citlivostí blýskáčků, dřepčíka olejkového (jehož období kladení je přerušovaně od podzimu hluboko do jarního období) a krytonosců čtyřzubých v podmínkách severní Moravy. Smyslem autorů práce bylo vytvořit kombinace insekticidní a fungicidní ochrany, jež může efektivně omezit stonkové krytonosce, kteří vytvářejí požerky vstupní bránu pro fómové černání stonků (ale i saprofytických hub) a snižují zdravotní stav porostů řepky ozimé.

Materiál a metody

Mezi lety 2022-2024 byly založeny maloparcelní pokusy o velikosti parcel 25 m^2 v plně randomizovaných čtyřech opakováních. Pokusy byly realizovány v jednotlivých letech na rozdílných odrůdách řepky ozimé. Mezi lety 2022-2023 se jednalo o odrůdu Onca a v sezóně 2023-2024 byly foliární aplikace realizovány na odrůdě PT 312. Z každé parcely bylo odebráno 25 rostlin a stonky včetně kořenů byly hodnoceny z hlediska napadení stonku fómovým černáním stonků řepky (dále „foma“), na bílou hnilobu řepky (pokud byla přítomna) dle metodik EPPO PP 1/78(3)+(4), délky požerků od stonkových krytonosců, procento napadení

kořenových krčků. Dávky byly voleny pro insekticidy: Apis 0,25 l/ha, Jager 0,15 kg/ha, Magma 0,2 l/ha, Nexide 0,08 l/ha, Rapid 0,08 l/ha. Fungicidní látky byly použity v přípravcích Efillor 1 l/ha, Pictor Revy 0,9 l/ha, Prosaro 250 EC 1 l/ha, Propulse 0,9 l/ha, Toprex 0,3 l/ha. Statistické hodnocení bylo vypočítáno v programu ARM Tukeyovým HSD testem z průměrů na variantu.

Výsledky

V letech 2022-2024 proběhly v okolí města Šumperk pokusy s kombinacemi fungicidů a insketicidů (Vikýřovice, Šumperk) s předpokládaným dopadem na snížení fómového černání stonků způsobenou primární infekci spór ze vzduchu a zejména sekundární infekcí způsobenou poškození pletiv řepky ozimé od stonkových krytonosců. Byl ověřen vliv na snížení napadení fómou nejen u předpokládaných účinných fungicidních variant, ovšem i u variant čistě pouze s insekticidní ochranou. Lze tedy opatrně říct, že i insekticidní varianty dobře voleny dle signalizace letové aktivity pomocí žlutých misek v porostech řepky má vliv na snížení napadení fómovým černáním stonků řepky ozimé, jež sekundárně způsobuje hmyz umožněním penetrace pletiv a vstup spór fómy, který sebou nese i vstup saprofytických hub, které mohou podobně jako u fómy způsobit předčasné nouzové dozrávání řepky (Tab. 1-5).

Tab. 1: Vliv ošetření insekticidy a fungicidy na zdravotní stav řepky olejky (%), dozrávání BBCH 85, Šumperk, 2023

Varianta číslo	Popis varianty	Počet aplikací přípravků (podzim/jaro/květ)	foma koř. krček	foma stonek	bílá hniloba
1	Neošetřená varianta	0/0/0	34,7	76,3	8,7
2	Nexide Apis Rapid	1/2/3	17,2	46,3	8,6
3	*Prosaro 250 EC* *Propulse*	1/1/2	18,2	47,8	2,1
4	Nexide + *Prosaro 250 EC* Apis Jager + *Propulse*	1/2/5	11,9	30,1	1,9
5	Nexide + *Efilor* + *Prosaro 250 EC* Rapid + *Toprex* Jager *Propulse*	1/3/7	9,5	20,9	0,9

Legenda: fungicidy označeny kurzívou

Tab. 2: Vliv ošetření insekticidy a fungicidy na výnos řepky olejky ozimé (t/ha, %) a ekonomické zhodnocení provedených insekticidních a fungicidních zásahů: dosažené tržby za výnos a zisk po odečtení ceny přípravků na ochranu rostlin (POR) na 1 ha (Kč bez DPH), výkupní cena za 1 t řepky 16.000,00 Kč (bez DPH) 2022/2023

Varianta číslo	Popis varianty	Výnos (t/ha)	Výnos Relace (%)	Dosažené tržby za sklizeň z 1 ha (tis. Kč)	Cena POR na 1 ha (tis. Kč)	Zisk po odečtení ceny POR na 1 ha (tis. Kč)
1	Neošetřená varianta	4,11	100	65, 76	0,00	0,00
2	Nexide Apis Rapid	4,32	105,1	69,12	1,24	+ 2,12
3	*Prosaro 250 EC* *Propulse*	4,4	107,1	70,40	3,42	+ 1,22
4	Nexide + *Prosaro 250 EC* Apis Jager + *Propulse*	4,88	118,7	78,08	4,65	+7,67
5	Nexide + *Efilor* + *Prosaro 250 EC* Rapid + *Toprex* Jager + *Propulse*	5,23	127,3	83,68	6,99	+10,93

Legenda: fungicidy označeny kurzívou

Tab. 3: Vliv ošetření insekticidy a fungicidy na výnos řepky olejky ozimé (t/ha, %) a ekonomické zhodnocení provedených insekticidních a fungicidních zásahů: dosažené tržby za výnos a zisk po odečtení ceny insekticidů a fungicidů na 1 ha (Kč bez DPH), výkupní cena za 1 t řepky 11.100,00 Kč (bez DPH), Šumperk 2024

Varianta číslo	Použité přípravky a dávky na 1 ha	Počet aplikací přípravků (podzim/jaro/květ)	Dosažené tržby z 1 ha (tis. Kč)	Cena insekticidů a fungicidů 1/ha (tis. Kč)	Zisk po odečtení ceny POR na 1 ha (tis. Kč)
1	Neošetřená varianta	0	29970	0,00	0,00
2	Nexide Apis Magma	3× Insekticid (1/1/1)	34410	1300,9	+3,14
3	*Prosaro 250 EC* *Propulse* *Pictor Revy*	3× Fungicid (1/1/1)	38850	5645,0	+3,24
4	Nexide + *Prosaro 250 EC* Magma + *Toprex* Jager	4× Insekticid 3× Fungicid (2/3/2)	33300	7847,0	-4,52

	Jager + *Pictor Revy*				
5	Nexide Nexide + *Efilor* *Prosaro 250 EC* Rapid 2x	6× Insekticid 4× Fungicid (4/4/2)	39960	9115,3	+0,87
	Magma + *Toprex* Jager + *Pictor Revy*				

Legenda: fungicidy označeny kurzívou

Tab. 4: Poškození stonků řepky larvami stonkových krytonosců v roce 2023

Varianta číslo.	délka rostliny (cm)	poškození krytonosci (cm)	poškození krytonosci (% délky stonku)	foma krček (délka v cm)	foma stonek povrch (obvod v %)
1	138,26	72,36	52,34c	4,21c	24,4d
2	142,36	36,36	25,54a	2,89b	16,2c
3	139,46	55,56	39,84ab	1,92b	8,2b
4	145,56	35,56	24,43a	0,26a	8,0b
5	144,45	34,75	24,06a	0,32a	4,6a

Tab. 5: Vliv ošetření insekticidy a fungicidy na výskyt fomy a poškození stonkovými krytonosci v roce 2024

Varianta číslo.	Délka rostliny (cm)	Poškození krytonosci (cm)	Poškození krytonosci (% délky stonku)	foma kořenový krček (% plochy)	foma stonek povrch obvod (% plochy)
1	141,6	9,0	6,3 d	21,0 d	41,3 d
2	136,2	8,6	6,3 d	7,4 bc	14,0 bc
3	138,1	7,5	5,4 bc	4,9 bc	9,0 bc
4	134,5	9,1	6,7 c	8,4 c	16,0 c
5	141,4	7,4	5,2 a	3,7 a	6,5 a

Diskuze

Fómové černání stonků řepky je v České republice způsobenou dvěma organismy *Leptoshaeria maculan*s a *L. biglosa* (Kůdela et al 2012, Jedryczka 2010). Problematikou dopadu insekticidních aplikacích necílených na stonkové krytonosce se zabýval Seidenglanz et al (2022). Bylo zjištěno, že necílené aplikace na krytonosce v době zásahu proti blýskáčkům dovedou snížit napadení krytonosci, jež se ještě ve stoncích řepky vyvíjí a posléze vypadávají jejich larvy z rostlin na půdní povrch a kuklí se v půdě. Změny v letové aktivitě stonkových krytonosců směřující i do podzimního období bylo studováno Eikermanem (2014, 2015), což má obrovský potenciál z hlediska nebezpečnosti těchto škůdců, jež mohou mít i v našich podmínkách prostor kolonizovat porosty řepky po delší vegetační dobu a v případě špatně cílených insekticidních aplikací může docházet k selhání insekticidních zásahů, zvýšení ekonomických ztrát a neúčinnost převážně pyretroidních postřiků, jež jsou pouze s kontaktní

účinnosti. Z rostlinolékařského hlediska je velice nebezpečné, že k dispozici je pouze jedná systémová neonikotinoidní látka (acetamiprid), kterou při selhání pyretroidů mohou zemědělci nadužívat s rizikem vzniku nižších citlivostí vůči této látce i pro kupř. bejlomorku kapustovou, kdy vzhledem k obtížnému monitoringu bejlomorek cílíme postřikem acetamipridu zejména vůči ní.

Závěr

Pravděpodobnou příčinou silných výskytů dřepčíka olejkového v chladné oblasti Šumperska na podzim 2022 bylo teplé počasí. Ošetření proti stonkovým krytonoscům snížilo v obou pokusech poškození řepky původci fomového černání v období růstu šešulí a dozrávání. Ošetření prováděná na základě signalizace výskytů chorob (lapačem askospór Leptosphaeria sp.) a škůdců zvýšila výnos. Nejvyšší rentabilita ošetření byla dosažena u varianty s ošetřeními na základě signalizace výskytů chorob a škůdců, v chladné oblasti Šumperska u varianty ošetřované intenzivně ve sklizňovém roce 2023. Velice dobrých výsledků k snížení fómového černání stonků řepky bylo dosaženo u varianty pouze s insekticidním ošetřením. Princip založení pokusů byl v obou letech stejný. Pokusy se lišily v použitých přípravcích a četnosti ošetření. Zjištění, že založení porostu při letové aktivitě v raných vývojových fázích si všiml v minulosti Broschewitz et al (1993), jež napadení stonkovými krytonosci vcelku opatrně dává do souvislosti s vyším výskytem Phomy a *Botrytis cinerea* v porostech řepky. Tato práce navazuje a rozšiřuje zahraniční výsledky výzkumu, jež v daném sledovaném (recentním) období dává představu o ekonomickém dopadu insektofungicidních aplikací a o jejich kalkulaci, kdy absence některých ošetření dosahuje uspokojivého snížení napadení chorobami a škůdci pro snížení používání pesticidů v řepce ozimé, kterou obecná veřejnost vnímá spíše jako plodinu s negativními dopady na životní prostředí.

Literatura

Broschewitz B., Steinbach P., Goltermann S. 1993: Einfluss stengelbewohnender tierischer Schaderreger auf den Befall von Winterraps mit Phoma lingam und Botrytis cinereal. Gesunde Pflanzen, 45: 106-110. German.

Eickermann M., Beyer M., Gorgen K., Hoffmann L., Junk J. 2014: Shifted migration of the rape stem weevil Ceutorhynchus napi (Coleoptera: Curculionidae) linked to climate change. European Journal of Entomology, 111: 243-250.

Eickermann M., Junk J., Hoffmann L., Beyer M. 2015: Forecasting the breaching of the control threshold for Ceutorhynchus pallidactylus in oilseed rape. Agricultural and Forest Entomology, 17: 71-76.

Jedryczka M., Plachká E., Kaczmarek J., Poslušná J., LatundeDada A.O., Maczynska A. 2010: Monitoring of Leptosphaeria maculans and L. biglobosa ascospores around East Sudethian mountains - A joint initiative of Poland and the Czech Republic. Rosliny Oleiste - Oilseed Crops, 31: 49-66.

Kůdela V., Kocourek F., Bárnet M. (eds) 2012: České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin - Czech and English Names of Plant Diseases and Pests. Profi Press 272 pp.

Seidenglanz M., Šafář J., Arbeález M. M., Heděnec P., Hrudová E., Bajerová R., Kolařík P. 2022: Problems in cabbage stem weevil control (Ceutorhynchus pallidacytlus Marsh.) in winter oilseed rape. Plant Protect. Sci..;58(3):220-233. doi: 10.17221/153/2021-PPS.

Poděkování
Příspěvek byl zpracován za podpory Ministerstva zemědělství, QK21010332 a institucionální podpory MZE-RO-10/23 a MZE-RO-18/23.

Kontakt:
Ing. Jaroslav Šafář, Ph.D.
Agritec Plant Research, s.r.o.
Zemědělská 16
+420 776 748 289, safar@agritec.cz

Účinnost vybraných fungicidů na zdravotní stav slunečnice roční

Evaluation of fungicide application on plant diseases of Sunflower

Šafář J.[1], Seidenglanz M.[1], Plachká E.[2]

[1]Agritec Plant Research, s.r.o.; [2]OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Abstrakt

V letech 2021 až 2023 byla ověřena biologická účinnost fungicidních účinných látek v porostech slunečnice roční při aplikaci v počátku kvetení vůči alternáriové skvrnitosti (*Alternaria* sp.), červenohnědé skvrnitosti (*Diaphorte helianthi*), černé stonkové skvrnitosti slunečnice (*Phomopsis* sp.). Výsledky demonstrují účinnost strobilurinových fungicidů (mandestrobin, pyraklostrobin, azoxystrobin) a prothoikonazolu (jako zástupce azolového fungicidu). Tyto látky jsou obvykle používány v podmínkách České republiky jako kombinace látek registrovaných fungicidů a o ovlivnění zdravotního stavu slunečnice není pro jednotlivé účinné látky mnoho známo. Byl prokázán vliv azoxystrobinu vůči alternáriové skvrnitosti. Dobré účinnosti bylo dosaženo proti červenohnědé skvrnitosti slunečnice u mandestrobinu a pyraklostrobinu (v roce 2022-2023). Choroby způsobené bílou hnilobou slunečnice (*Sclerotinia sclerotiorum*) a verticiliovým vadnutím (*Verticilium* sp.) se projevily statisticky významně snížením napadení oproti neošetřené kontrole, ovšem autoři práce tyto zjištění ponechávají k diskuzi.

Klíčová slova: slunečnice roční, fungicidy, fytopatologie

Abstract

Between 2021 and 2023, was assessments of efficacy fungicidal active substances in sunflower three to four weeks after application at the beginning of flowering against *Alternaria* sp., *Diaphorte helianthi*, *Phomopsis* sp. The results further showed the efficacy of strobilurin fungicides (mandestrobin, pyraclostrobin, azoxystrobin) and prothoiconazole (as a representative azole fungicide). These active substances are usually used in the the Czech Republic as a combination of substances, and not much is known about the impact on the health of the sunflower for the individual active substances. The effect of azoxystrobin against *Alternaria* sp. has been demonstrated. For Phomosis stem canker, where mandestrobin and pyraclostrobin achieved convincing results (in 2022-2023). Diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticilium* sp. in sunflower, the reduction in infestation is statistically significant compared to the untreated control, but the authors of the paper leave these findings open for discussion.

Keywords: sunflower, fungicides, phythopathology

Úvod

Výskyt chorob slunečnice roční (*Helianthus annus*) je podmíněn momentálními klimatickými faktory, vlastnosti půdy dané lokality a dále vlastnostmi pěstované odrůdy/hybridu (Říha 2021). V současné době jsou zemědělské veřejnosti známy zejména výsledky odrůdové citlivosti slunečnice, o to méně jsou širší veřejnosti známy výsledky účinnosti jednotlivých účinných látek, jež jsou v zemědělské praxi využívány jako kombinace účinných látek v povolených fungicidech na ochranu rostlin slunečnice. Tudíž nemáme z našich podmínek dostatečné znalosti o míře účinnosti pro jednotlivé látky a jejich skutečný dopad na zdravotní stav slunečnice, resp. efektivnost na potlačení původců chorob, které se během vegetace v rostlinách slunečnic rozvíjí (Málek & Kazda 2005). Přestože moření semen této plodiny může potlačit ochoření rostlin v raných vývojových stádiích hlavně u chorob přenosných semenem, ale i půdou či vzduchem za daných podmínek v pokročilých fenologických fázích nelze mořením patogeny efektivně mírnit. Tato práce se tedy soustředí na aplikaci postřikem jednotlivých fungicidních látek a jejich dopad na potlačení chorob slunečnice v kritickém období butonizace a kvetení, jež je konfrontováno přenosem původců chorob nejčastěji vzduchem i hmyzem, protože ochrana slunečnice mořením je bez postřikové aplikace málo účinná. V průběhu třech

pokusných sezón byly používány fungicidní látky z registru povolených přípravků na ochranu rostlin využívaných k pěstitelským účelům zejména v kombinaci použitých látek.

Materiál a metody

V letech 2021-2023 byly založeny maloparcelní pokusy o velikosti parcel 30 m^2 v plně randomizovaných čtyřech opakováních. Pokusy byly realizovány v jednotlivých letech na rozdílných odrůdách slunečnice roční. Odrůdy byly v letech voleny: 2021 - ES Novamis CL, 2022 - ES Rosalia, 2023 - ES Bella při použití certifikovaného osiva fungicidně ošetřené pro ochranu ranných růstových fázích slunečnice. Aplikace fungicidů v jednotlivých letech proběhla v závislosti na fenofázi rostlin mezi BBCH 55-61 (fáze „hvězdy“ až počátek květu). Množství postřikové jíchy bylo 300 l/ha. Cílem bylo ověřit nakolik jednotlivé účinné látky dosahují fungicidní účinnosti. Z registru povolených přípravků na ochranu rostlin byly vyselektovány jednotlivé účinné látky, jež jsou v drtivé většině pěstitelům nabízeny jako kombinace azolových a strobilurinových látek s jinými. V případě Mandestrobinu byl zařazen mezi varianty pokusu produkt povolený v řepce ozimé proti bílé hnilobě. Nejužívanější povolené účinné látky jsou Mandestrobin (obchodní název Intuity 0,8 l/ha), Pyraklostrobin (Retengo 1 l/ha), Azoxystrobin (Amistar 250 EC 0,8 l/ha) a Prothiokonazol (Protiostar 0,7 l/ha). Tyto látky byly aplikovány samostatně v jednotlivých variantách, dávky v gramech účinné látky na ha jsou uvedeny v Tab. 1-5. Jednotlivé parcely (varianta ve čtyřech opakováních) byly hodnoceny vizuálně na procentuální napadení listů a stonků (úbory byly v průběhu pokusu nehodnotitelné z důvodu nízkého napadení) ve škále procent: 0, 1, 5, 1, 25, 50, 75, 100 % poškození danou chorobou. V každé parcele bylo hodnoceno 2 x 20 rostlin ze dvou vnitřích řádků parcely ze čtyřech celkových řádků na parcelu. Výsledkem vznikla průměrná hodnota napadení listové plochy (resp. stonkové plochy) všech 40ti rostlin na parcelu a účinnost jednotlivých variant byla vyjádřena pomocí statistického hodnocení Tukeyovým HSD testem v programu ARM. Sledované choroby byly ze skupin mykóz a oomycetóz: alternariová skvrnitost slunečnice (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., 1912); bílá hniloba slunečnice (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, 1884); černá skvrnitost slunečnice *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi, 1968 [anamorfa: *Phoma macdonaldii* Boerema, 1970]); červenohnědá skvrnitost slunečnice (*Diaporthe helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljč. et M. Petrov, 1981 (telemorfa) [anamorfa: *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljč et M. Petrov, 1981]); verticiliové vadnutí slunečnice (*Vericillium dahliae* Kleb., 1913 / *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold, 1879).

Výsledky

Během let 2021-2023 bylo hodnoceno poškození listů a stonků slunečnice v maloparcelním pokusu v okolí města Šumperk (2021 a 2023 katastr města Šumperk, 2022 lokalita Vikýřovice). V tabulce 1-5 jsou zobrazeny data hodnocení 5-6 týdnů po aplikaci mezi BBCH 79-81 (15. 9. 2021; 15. 9. 2022; 26. 9. 2023). Výsledky vykazují velice dobrou účinnost azoxystrobinu vůči alternáriové skvrnitosti slunečnice (Tab. 1) ale i pyraklostrobinu v sezóně 2022. Po celou dobu trvání pokusu byla přítomna červenohnědá skvrnitost slunečnice považovaná za málo významnou (Málek & Kazda 2005; Kazda et al. 2018, Kůdela et al 2012). Uspokojivou účinnost dosáhly všechny sledované účinné látky vůči červenohnědé skvrnitosti slunečnice na stoncích a dobrou na listech (Tab. 2 a Tab. 3), vynikající účinnost (>90 %) byla zřetelná pouze u aplikace pyraklostrobinu na listech. V roce 2021 došlo k slabému vlivu aplikovaných variant na napadení černé skvrnitosti, jež byla pravděpodobně přítomna v rostlinách v raných vývojových fázích slunečnice. V následujících letech byly dobré účinnosti zjištěny u mandestrobinu a pyraklostrobinu (Tab. 4). Vcelku hůře interpretovatelné výsledky byly dosaženy u potlačení bílé hniloby slunečnice, kde dobré účinnosti byly dosaženy pouze u aplikace prothiokonazolu, dostatečné napadení kontrol bylo pouze ve dvou letech. Pouze v roce 2023 bylo zaznamenáno

ojediněle se vyskytující verticiliové vadnutí (Kazda et al. 2018), potvrzeno z fotografií listů Ing. Říhou. Dobré účinnosti (>70 %) bylo proti verticiliovému vadnutí dosaženo u aplikace mandestrobinu a azoxystrobinu. Výnosy zrna slunečnice jsou zobrazeny v Tab. č. 6, kdy jednotlivé varianty vždy prokázaly většinou vyšší a v roce 2022 spíše zvýšené množství sklizeného zrna v tunách na hektar oproti kontrole, nicméně nutno dodat, že výsledky jsou statisticky neprůkazné (Tab. 6).

Tab. 1: Výsledky průměrného napadení alternariovou skvrnitostí slunečnice na listech (EPPO kód: ALTEHE) a účinnosti jednotlivých variant

Varianta	g úč. l./ha	2021		2022		2023	
		DS	ES	DS	ES	DS	ES
KONTROLA		50,1 d		11,8 c		8 c	
MANDESTROBIN	200	38,2 c	*23,7 c*	3,2 b	*73,2 b*	7,9 c	*0,5 c*
PYRAKLOSTROBIN	200	36,4 c	*27,3 c*	0,5 a	*95,6 a*	3,6 b	*45,0 b*
AZOXYSTROBIN	200	26,2 a	*52,3 a*	3,2 b	*73,3 b*	1,6 a	*79,9 a*
PROTHIOKONAZOL	175	30,7 b	*38,7 b*	3,0 b	*74,2 b*	3,4 b	*58,0 b*

Legenda: DS (Disease severity) napadení chorobou v procentech; ES (Efficacy severity) procento účinnosti vůči neošetřené kontrole.

Tab. 2: Výsledky průměrného napadení červenohnědou skvrnitostí slunečnice na listech (EPPO: DIAPHE) a účinnosti jednotlivých variant

Varianta	g úč. l./ha	2021		2022		2023	
		DS	ES	DS	ES	DS	ES
KONTROLA		100 c		6,2 b		47,2 c	
MANDESTROBIN	200	96,3 a	*3,7 a*	0,5 a	*92,62 a*	12,6 b	*69,2 b*
PYRAKLOSTROBIN	200	91,8 ab	*8,16 b*	0,2 a	*97,11 a*	0,2 a	*97,11 a*
AZOXYSTROBIN	200	95,2 a	*4,8 a*	0,4 a	*93,55 a*	9,6 b	*78,8 ab*
PROTHIOKONAZOL	175	83,8 b	*16,25 b*	0,1 a	*97,91 a*	4,2 ab	*89,7 a*

Legenda: DS (Disease severity) napadení chorobou v procentech; ES (Efficacy severity) procento účinnosti vůči neošetřené kontrole.

Tab. 3: Výsledky průměrného napadení červenohnědou skvrnitostí slunečnice na stoncích (EPPO: DIAPHE) a účinnosti jednotlivých variant

Varianta	g úč. l./ha	2021*		2022**		2023*	
		DS	ES	DS	ES	DS	ES
KONTROLA		20,3 d		25,3 c		53,3 c	
MANDESTROBIN	200	4,1 ab	*64,03 ab*	9,1 ab	*64,03 a*	24 b	*54,6 b*
PYRAKLOSTROBIN	200	5 b	*64,39 ab*	9 a	*64,39 a*	11,9 a	*77,5 a*
AZOXYSTROBIN	200	8,3 c	*52,57 c*	13,3 b	*47.4 b*	24,4 b	*54 b*
PROTHIOKONAZOL	175	5,3 b	*59,29 b*	10,3 ab	*59,29 ab*	9,3 a	*82,4 a*

Legenda: DS (Disease severity) napadení chorobou v procentech; ES (Efficacy severity) procento účinnosti vůči neošetřené kontrole.

Tab. 4: Výsledky průměrného napadení černou skvrnitostí slunečnice na stoncích (EPPO: LEPTLI) a účinnosti jednotlivých variant

Varianta	g úč. l./ha	2021		2022		2023	
		DS	ES	DS	ES	DS	ES
KONTROLA		5,4 c		10,8 c		23,8 c	
MANDESTROBIN	200	2,4 ab	*55,39 b*	0,5 a	*95,56 a*	3,1 ab	*83,3 ab*
PYRAKLOSTROBIN	200	1,9 a	*65,61 a*	0,5 a	*95,46 a*	2 a	*89,0 a*
AZOXYSTROBIN	200	2,5 ab	*53,53 b*	0,5 a	*95,37 a*	5 b	*73,6 b*
PROTHIOKONAZOL	175	4,9 bc	*9,85 c*	3 b	*72,5 b*	3,5 ab	*81,8 ab*

Legenda: DS (Disease severity) napadení chorobou v procentech; ES (Efficacy severity) procento účinnosti vůči neošetřené kontrole.

Tab. 5: Výsledky průměrného napadení bílou hnilobou slunečnice na stoncích (EPPO: SCLESC), verticiliovému vadnutí slunečníce (VERTDA) na listech a účinnosti jednotlivých variant

Varianta	g úč. l./ha	2021		2023		2021*	
		DS	ES	DS	ES	DS*	ES*
KONTROLA		33,3 c		26,65 d		26,1 d	
MANDESTROBIN	200	4,1 b	*87,69 b*	8,8 c	*66,8 b*	3,7 a	*85,82 a*
PYRAKLOSTROBIN	200	0,1 a	*99,7 a*	6,55 b	*75,2 b*	8,2 c	*68,74 c*
AZOXYSTROBIN	200	3,8 b	*88,59 b*	12 c	*54,6 c*	6,4 b	*75,48 b*
PROTHIOKONAZOL	175	0,1 a	*99,7 a*	4,65 a	*82,4 a*	8,6 c	*67,05 c*

Legenda: SCLESC DS (Disease severity) napadení chorobou v procentech; ES (Efficacy severity) procento účinnosti vůči neošetřené kontrole.
* DS, ES VERTDA

Tab. 6: Výnos zrna slunečnice v t/ha a procento vůči neošetřené kontrole

	2021		2022		2023	
	výnos	%	výnos	%	výnos	%
KONTROLA	2,4 a		3,4 a		2,2 a	
MANDESTROBIN	2,6 a	111,86	3,7 a	108,82	4,1 a	186,36
PYRACLOSTROBIN	2,6 a	111,02	3,5 a	102,94	4,3 a	195,45
AZOXYSTROBIN	2,6 a	110,17	3,5 a	102,94	3,2 a	145,45
PROTHIOCONAZOLE	2,5 a	105,08	3,8 a	111,76	4,3 a	195,45

Diskuze

Současný stav vlivu jednotlivých fungicidní látek na zdravotní stav slunečnice není v podmínkách České republiky příliš znám. Respektive je pozornost v České republice a podstatně více na Slovensku soustředěna na odrůdovou citlivost slunečnice k chorobám ve screeningových pokusech SPZO (Říha 2021, Málek & Kazda 2005). U námi sledovaných odrůd ES Novamis CL, ES Rosalia a ES Bella došlo k dostatečnému napadení různými chorobami pro vyhodnocení jednotlivých účinných látek, přičemž pouze dvě ze sledovaných chorob byly v minulosti považované za méně významné (Málek & Kazda 2005, Kůdela et. al. 2012). Napadení červenohnědou skvrnitostí slunečnice považované za málo nebo ojediněle škodlivé (Kazda et al. 2018) bylo patrno ve vysokém stupni napadení po několikaletou dobu trvání pokusu ve velmi vysokém rozšíření a napadení v porostu slunečnice. Obecně lze říct, že většina sledovaných chorob je přenosná osivem, proto ve všech sledovaných letech bylo osivo slunečnice ošetřeno fludioxonilem, který měl bezesporu dopad na zdravotní stav na začátku

vývoje zelených částí (Kazda et al. 2018). Obvyklá praxe je preventivní ošetření vzešlých rostlin mezi šestým a osmým listem proti chorobám způsobenou rodem *Alternaria* a *Sclerotinia* (primární napadení). V raných růstových fázích jsme do porostu fungicidně nezasahovali a soustředili jsme se na ošetření v kritickém období při butonizaci mezi fází „hvězdy“ a počátkem kvetení, kde dochází vlivem ideálních teplot k rozvoji chorob, několikahodinovém ovlhčení celých rostlin nebo přenosem hmyzem a kontaminací vektory chorob podobně jako rozšiřování větrem. Některé choroby zaznamenány v průběhu pokusu jsou považovány za ničivé a jsou to: alternáriová skvrnitost, černá skvrnitost stonků, bílá hniloba a verticiliové vadnutí slunečnice (Kazda et al. 2018, Kůdela et. al. 2012). Práce týkající se účinnosti fungicidních aplikací ve slunečnici (v polních podmínkách) je celosvětově publikováno v cca 10 % vědeckých pracech, ostatní se zabývají fungicidní účinností v laboratorních podmínkách, hodnocení citlivosti odrůd, agrotechnikou obdělávání slunečnice či hustotou porostu. Jednu z nejzávažnějších chorob slunečnice, které se věnuje z hlediska fytopatologie nejvíce pozornosti je alternáriová skvrnitost. V našich pokusech byly vypovídající sezóny 2022 a 2023, kdy účinnost přesahovala 70 % pro všechny studované látky a pro samotný azoxystrobin v roce 2023. Spolehlivost azoxystrobinu s dopadem na nižší infekci semen je známa z práce Kgatle et al (2020) či Karuna et al (2012), velmi dobré snížení napadení *Alternaria* sp. potvrzují studie od kupř. Whage 2015, Leite 2006, Saqib et al a Udayashankar et al 2011. Laboratorně byly velmi dobré výsledky strobilurinů oproti azolovým fungicidům potvrzeny v práci Nasima et al. 2020. Stojí za zmínku, že jisté pozitivní výsledky byly přesvědčivé i pro bioagens jako *Bacillus amyloliquefaciens* (Kgatle et al. 2020) a *Trichoderma* sp. (potvrzeno i laboratorně Whage 2015) vůči *Alternaria* sp. v práci Kgatle et al (2020). Existuje i práce, kde jsou azolové fungicidy jako difekonazol a hexaconazol s lepší účinností než azoxystrobin (Saqib et al 2020). Účinnost na červenohnědou skvrnitost slunečnice se věnoval kupř. Thompson et al (2011) či Dangal et al (2023) nebo Gulya et al (2010) s dost nepřesvědčivými výsledky, resp. jednalo se o molekulární analýzu a ověření polní účinnosti a snížení výnosu zrna sklizně o cca 40 %. Při námi vedených pokusech došlo k uspokojivých výsledků účinnosti zejména v záchraně listové plochy, jež u červenohnědé skvrnitosti závěrem sezóny prochází fotosynteticky dosud aktivní aparát rychlou nekrotizací listů způsobenou zmíněnou chorobou. Další velice nebezpečnou chorobu je černá skvrnitost slunečnice, kde přesvědčivých výsledků dosáhl mandestrobin i pyraklostrobin (v roce 2022-2023), v polních podmínkách je srovnatelná práce z USA, kde ovšem autoři uvádějí pouze skupiny fungicidních látek jako funkční skupiny (QoI, DMI, SDHI) Dangal et al (2023). Pro choroby způsobenou *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticilium* sp. ve slunečnici se nepodařilo nalézt srovnatelné studie. V našich pokusech se podařilo získat přesvědčivé účinnosti u varianty s pyraklostrobinem v roce 2021 a 2022 (v roce 2023 bylo nízké napadení bílou hnilobou). V roce 2021 došlo k silnému napadení *Verticilium* sp. (z fotografie potvrzeno Ing. Říhou), kdy uspokojivých výsledků dosáhli zejména strobilurinové fungicidy. Naprosto obsáhlou práci včetně návrhu škály hodnocení rzi slunečnice vytvořil Friskop et al. (2015), jež může zavdat na vznik chybějící EPPO metodiky pro hodnocení účinnosti napadení listů slunečnice.

Závěr

V letech 2021-2023 byla v maloparcelních pokusech prokázána účinnost vybraných (jednotlivých) látek fungicidů ze skupiny strobilurinů a u jedné látky ze skupiny azolů, jež jsou součástí ve vícesložkových fungicidech povolených v rámci České republiky ve slunečnici roční potažmo v řepce. Potvrdila se účinnost azoxystrobinu vůči původci chorob *Alternaria* sp., dále dopad strobilurinů a azolového fungicidu na ostatní choroby, jež jsou považovány za ničivé pro porosty slunečnice roční.

Literatura

Dangal N. K., Rekabdarkolaee H. M., Markell S. G., Harveson R. M. and Mathew F. M. 2023: Foliar Fungicides Containing FRAC 11 Mitigate Phomopsis Stem Canker in Sunflower (Helianthus annuus). *Plant Diseases*

107(3), 743-749.

Friskop A. J., Gulya T. J., Halley S. A., Schatz B. G., Schaefer J. P., Jordahl J. G., Meyer S. M., Misek K. W., Hendrickson P. A. and Marekll S. G. 2015: Effect of fungicide and timing of application on management of sunflower rust. *Plant Diseases* 99:1210-1215.

Gulya T. J., Marek L. F. and Gavrilova V. 2010: Disease resistance in cultivated sunflower derived from public germplasm collection. In: Breeding of sunflower on resistance to diseases, proceedings of the international symposium, Krasnodar, Russia, 23–24 June 2010; International Sunflower Association: Paris, France, pp. 7-18.

Kashyap R., Markell S. G., Harveson R. M., Rekabdarkolaee H. M. and Mathew F. M. 2023: Application of Pyraclostrobin Fungicide at Miniature Floral Head Development Growth Stage Is Efficacious Against Phomopsis Stem Canker Fungi in Sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Health Progreess* 24(1), 24-31.

Karuna, K., Jagadish K. S., Geetha K. N. and Shadakshari Y. G. 2012: Evaluation of efficacy ofchemical fungicides and a plant product for the management of Alternaria blight of sunflower. *Indian Phytopathology* 65: 305-306.

Kazda J., Říha K., Stejskalová M, Spitzer T. 2018: Ochrana slunečnice roční (Helianthus annuus) proti choroám a živočišným škůdcům podle zásad IOR, Uplatněná certifikovaná metodika pro praxi, ČZÚ, 59 pp.,

Kůdela V., Kocourek F., Bárnet M. (eds) 2012: České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin - Czech and English Names of Plant Diseases and Pests. Profi Press 272 pp.

Kgatle, M., B. Flett, M. Truter and T. Aveling. 2020: Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 132: 105-146.

Málek B., Kazda J., 2005: Metodika pěstování slunečnice. SPZO, Praha, 59 pp.

Leite, R. M. V. B. C., L. Amorim and A. Bergamin Filho.2006. Relationships of disease and leaf areavariables with yield in the Alternaria helianthi sunflower pathosystem. *Plant Pathology*, 55: 73-81.

Nasim M., Azizi M. I. and Shwoban S. 2020: Management of *Alternaria* blight of sunflower through fungicides. *International Journal Chemical Studies*, 8(2):1499-1502.

Říha K. 2021: Choroby slunečnice dominující v České republice v minulých třech letech. *Agromanuál,* 2021, (5), 38-40. ISSN 1801-7673.

Saqib H. M., Abid M., Chohan S. 2020: Chemical Management of *Alternaria* Leaf Blight of Sunflower. International Journal of Phytopathology Vol. 9 (3): 173-178.

Thompson, S. M., Tan, Y. P., Young, A. J., Neate, S. M., Aitken, E. A. B., and Shivas, R. G. 2011: Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. Persoonia 27: 80-89.

Udayashankar A. C., Chandra Nayaka S., Niranjana S. R. and Prakash H. S. 2011: Comparative efficacy of strobilurin fungicides against leaf spot and blight disease of sunflower. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 41: 11-19.

Waghe, K., S. Wagh, D. Kuldhar and D. Pawar. 2015: Evaluation of different fungicides, bioagents and botanicals against *Alternaria* blight caused by *Alternaria helianthi* (Hansf) of sunflower. *African Journal of Agricultural Research*, 10: 351-358

Poděkování

Příspěvek byl zpracován za podpory Ministerstva zemědělství, QK21010332 a institucionální podpory MZE-RO-10/23 a MZE-RO-18/23.

Kontakt:

Ing. Jaroslav Šafář, Ph.D.
Agritec Plant Research, s.r.o.
Zemědělská 16
+420 776 748 289, safar@agritec.cz

Skríning antifungálních vlastností vybraných rostlinných extraktů proti *Monilinia laxa*

Screening of antifungal properties of selected plant extracts against *Monilinia laxa*

Žabka M. [1]

[1]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně*

Abstrakt

Vodní extrakty specifikovaných částí celkem 12 druhů léčivých a/nebo aromatických rostlin byly užity při skríningové studii se zaměřením na testování antifungálních vlastností a možného použití v alternativní ochraně proti *Monilinia laxa*, původci moniliové spály peckovin. Vodní výluhy byly vybrány s ohledem na jejich jednoduchou potenciální přípravu v praxi. Efektivita a možnost užití některý testovaný rostlinných extraktů jako složku podpůrných, ekologicky nezávadných antifungálních preparátů na přírodní bázi, byla indikována v případě sedmi rostlinných druhů. Nicméně zdaleka nejvýraznější antifungální efekt vyjádřený inhibicí růstu cílového patogena byl pozorován u extraktu z *Laurus nobilis, Urtica dioica* a *Glycyrrhiza glabra*.

Klíčová slova: Rostlinný extrakt, Antifungální aktivita, Patogenní houby, Botanické fungicidy.

Abstract

Water extracts of a specific parts of a total of 12 medicinal and/or aromatic plants were used in a screening study focused on testing antifungal properties and possible use in alternative protection against *Monilinia laxa*, the causative agent of Monilinia brown rot blossom blight. Aqueous extracts were chosen with regard to their simple potential preparation in practice. The effectiveness and the possibility of using some of the tested plant extracts as a component of supportive, ecologically sound antifungal preparations on a natural basis was indicated in the case of seven plant species. However, by far the most pronounced antifungal effect expressed by the inhibition of the growth of the target pathogen was observed with the extract of *Laurus nobilis, Urtica dioica* and *Glycyrrhiza glabra*.

Keywords: Plant extract, Antifungal activity, Pathogenic fungi, Botanical fungicides.

Úvod

Z hlediska ochrany rostlin, rostlinných produktů a zdravotní bezpečnosti potravin je potlačování výskytu houbových patogenů primárním problémem. Obecně jsou patogenní houby kontrolovány aplikací syntetických fungicidů. Neustálý tlak, především v rámci zelené dohody v EU, ale i celosvětový trend omezovat, pomocí různých mechanismů, množství a spektrum povolených přípravků či účinných látek stává se ochrana proti patogenním houbám čím dál větší výzvou (Brauer et al., 2019; EC 2020). Je nutno ovšem uznat, že stále ještě je dáván prostor pro odborný a více racionální přístup k mnohdy aktivistickým a příliš ambiciózním plánům. Nicméně, v některých případech mohou syntetické fungicidy a jejich rezidua představovat reálné riziko díky přímé či nepřímé toxicitě (Costa et al. 2008; Nakanishi 2007; Scordino et al. 2008). V ekologickém zemědělství je sortiment použitelných látek velmi omezený a tak výzkum v oblasti environmentálně bezpečných a antifungálně působících preparátů na bázi rostlinných extraktů nabývá tím více na významu (Zabka 2022). Biologická aktivita těchto extraktů je způsobena a ovlivněna přirozeným obsahem biologicky aktivních látek, zahrnujících např. přirozené terpenoidy, fenoly a alkaloidy, které bývají obecně v rostlinách přítomny (Žabka et al., 2009). Houby ze skupiny *Monilinia* patří mezi polycyklické druhy způsobující tzv. moniliovou spálu a napadají a znehodnocují zralé plody na stromech či způsobují skládkové hniloby (Martini & Mari 2014). *Monilinia laxa* (dříve známá též jako *Monilia laxa*) bývá hlavním původcem moniliové spály peckovin. Tato práce se zabývá základním skríningem a selekcí vhodných druhů s účinkem na *M. laxa* a s předpokladem vývoje

preparátů s výhodou jednoduše proveditelné vodní extrakce.

Materiál a metody

Izolace determinace a uchovávání kultury *M.Laxa*

Testovaný izolát *M. laxa* (Ml-2308MZ) byl izolován v roce 2023 pod mikroskopem z infikovaného mumifikovaného plodu třešně. Po dvoustupňovém přečištění (pomocí kultivace na ATB/Chloramphenicol) je kultura udržována v pracovní laboratorní sbírce v nativním stavu v termostatu při teplotě 18 °C a pravidelně pasážována na potato dextrose agar (PDA). Determinace druhu byla provedena na základě makro a mikro morfologických znaků pod mikroskopem a následně ověření na základě molekulárně genetických metod.

Testování inhibičního efektu proti vybranému patogenu

Inhibiční vlastnosti testovaných rostlinných extraktů na myceliární růst patogenní houby *M. laxa* byly testovány pomocí diluční metody. Rostlinné extrakty byly získány vodní extrakcí vybraných sušených a homogenizovaných vzorků při počáteční teplotě 60 °C. Extrakce byla prováděna po dobu 24 hod. Získané vodní výluhy byly důkladně rozpuštěny v bramboro dextrózovém agaru (PDA) v přesné základní koncentraci při teplotě pod 50 °C. Základní koncentrace odpovídala v přepočtu ekvivalentu výluhu 0.4/10 droga/voda (w/w). Směs byla po té doplněna o agar a klávována při teplotě 105 °C po dobu 5 min. Kontrolní sada byla připravena přidáním ekvivalentního množství sterilní destilované vody. Připravené Petriho misky (9 cm) byly sterilně naočkovány pomocí myceliárních disků (0,4 cm) odebraných z okrajů 7denních povrchových kultur cílového patogena. Kultivace probíhala po dobu 7 dní ve 4 opakováních, při teplotě 18 °C v termostatu s režimem 14/10 (světlo/tma). Následné srovnání průměru kolonií v porovnání s kontrolními sety bylo převedeno na procentuální vyjádření inhibičního potenciálu. Hodnoty vykazující vyšší hodnoty inhibice než 50 % byly vybrány jako efektivní a zajímavé pro další výzkum. Seznam vybraných rostlinných druhů a jejich vybraných částí pro základní skríning antifungálního potenciálu je uveden v **Tab. 1**.

Tab. 1: Rostlinné druhy použité při základním skríningu antifungálních vlastností

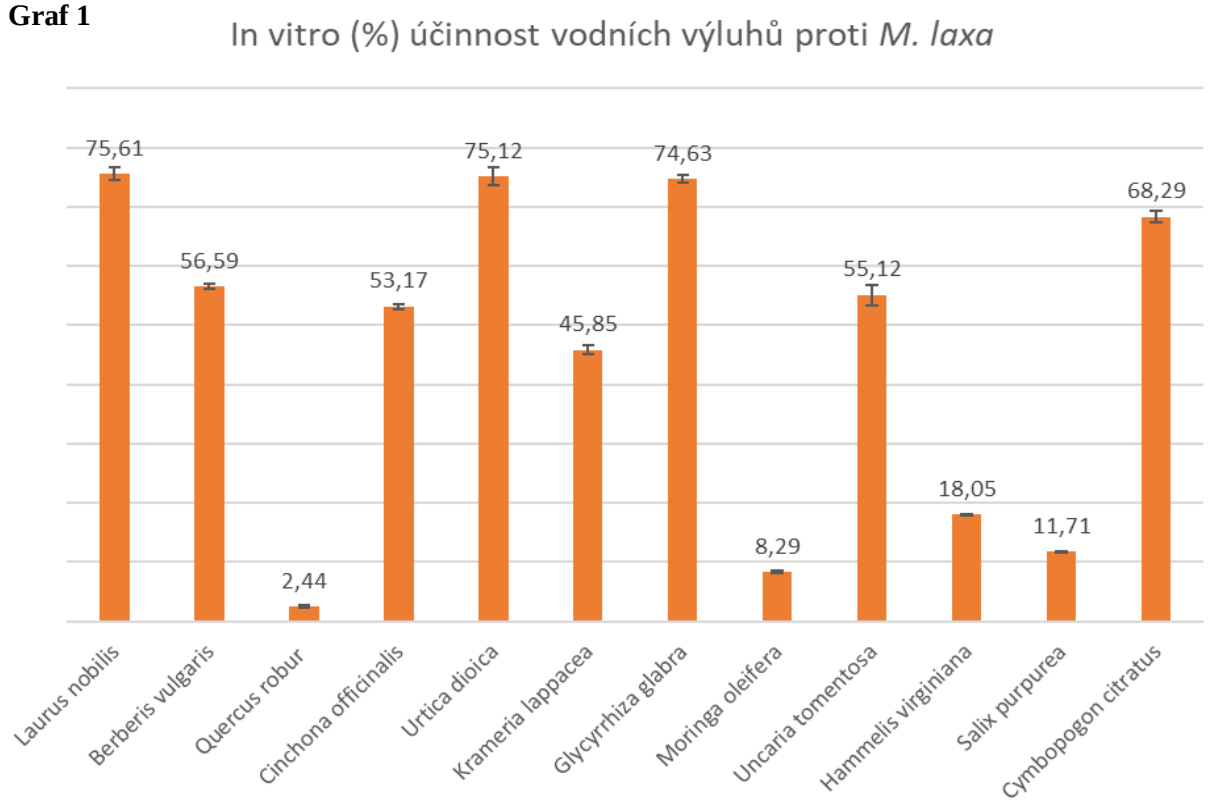
Druh	Český název	použitá část
Laurus nobilis L.	vavřín vznešený	list
Berberis vulgaris L.	dříšťál obecný	kůra
Quercus robur L.	dub letní	kůra
Cinchona officinalis L.	chinovník lékařský	kůra
Urtica dioica L.	kopřiva dvoudomá	list
Krameria triadra L.	kramerie trojmužná	kořen
Glycyrrhiza glabra L.	lékořice lysá	kořen
Moringa oleifera Lam.	moringa olejodárná	list
Uncaria tomentosa DC.	řemdihák plstnatý	kůra
Hamamelis virginiana L.	vilín virginský	list
Salyx purpurea L.	vrba purpurová	kůra
Cymbopogon citratus DC.	voňatka citronová	list

Výsledky a diskuse

Výsledky potvrzují, že v rámci testovaných rostlinných extraktů (**Graf 1**) většina prokázala měřitelný stupeň inhibice radiálního růstu. Inhibice v testovaném souboru 12 extraktů přesahovala 50% hladinu efektivity, a to v 7 případech. Nejzajímavější skupinou se však ukázaly extrakty s inhibičním potenciálem nad 70 %, konkrétně *L. nobilis, U. dioica* a *G. glabra.* U druhu *L. nobilis* byla vysoká inhibice patogena předpokládána ze všech testovaných druhů nejvíce, díky předem vytypovanému vysokému podílu antifungálně velmi potentních

látek jako je částečně ve vodě rozpustný eugenol a jeho izomery iso-eugenol a methyl-eugenol nebo dalších látek terpenoidní povahy (Belasli et al., 2020). Z účinku u vodního extraktu *L. nobilis* je patrné, že takto provedená vodní extrakce zajistí dostatečný obsah těchto jinak málo polárních a vodorozpustných látek. Překvapivou vysokou inhibici radiálního růstu *M. laxa* vykázal i extrakt z listů *U. dioica*. Zde se domníváme, že za antifungální aktivitu mohou být zodpovědny sloučeniny typu organických kyselin jako je kyselina kávová a její derivát kyselina chlorogenová s možným synergickým efektem spoluobsažených minoritních terpenů, proteinů, dalších fenolů a flavonoidů či vodorozpustných forem křemíku například kyseliny orto-křemičité (Behiry et al., 2022). Posledním druhem, jehož vodní extrakt potlačil výrazně růst houby M. laxa byl *G. glabra*, kde předpokládáme, že maximální účinek by mohl být způsoben antifungálně účinnými fenolickými látkami, jako je formononetin, liquiritigenin, a apigenin, u nichž byly účinky proti některým houbovým organismům popsány (Martins et al., 2016).

Graf 1



Závěr

V této práci se podařilo porovnat a prokázat účinnost jednoduše a prakticky realizovatelných vodních extraktů z různých částí velice známých rostlinných druhů s potenciálem inhibovat růst jednoho z důležitých patogenů ovocných dřevin způsobujících spálu peckovin a hnilobu plodů *M.laxa*. Tyto rostlinné druhy jsou historicky ověřené a používané pro různé léčivé, také často kulinářské účely. I velice jednoduchou vodní extrakcí je možno dosáhnout vysokého antifungálního efektu. Na rozdíl od vědecky prozkoumané klasické extrakce methanolem nebo jinými organickými a často drahými rozpouštědly je princip vodního výluhu daleko bezpečnější. I když mnohé účinné látky mají daleko větší potenciál extrakce organickými rozpouštědly, v této práci jsme prokázaly, že extrakce do vody může poskytovat dostatečnou antifungální účinnost proti tomuto významnému patogenu.

Dedikace
Tato práce byla financována z následujícího výzkumného projektu: FW06010376

Seznam použité literatury

Behiry, S. I., Philip, B., Salem, M. Z., Amer, M. A., El-Samra, I. A., Abdelkhalek, A., & Heflish, A. (2022). Urtica dioica and Dodonaea viscosa leaf extracts as eco-friendly bioagents against Alternaria alternata isolate TAA-05 from tomato plant. *Scientific Reports*, *12*(1), 16468.

Belasli, A., Ben Miri, Y., Aboudaou, M., Aït Ouahioune, L., Montañes, L., Ariño, A., & Djenane, D. (2020). Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis L.*): Potential use as wheat preservative. *Food science & nutrition*, *8*(9), 4717-4729.

Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, De Paula RG, Rangappa KS, Nayaka SC, Gupta V., Almeida F, (2019). Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules* 9, **21**

Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A (2008) Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci* 13:1240-1249.

EC (European Commission). (2020), "Farm to Fork Strategy: For a fair, healthy and environmentally-friendly foodsystem," May.

Martini, C., & Mari, M. (2014). *Monilinia fructicola, Monilinia laxa* (Monilinia rot, brown rot). In Postharvest decay (pp. 233-265). *Academic Press*.

Martins, N., Ferreira, I. C., Henriques, M., & Silva, S. (2016). In vitro anti-Candida activity of *Glycyrrhiza glabra* L. *Industrial Crops and Products*, 83, 81-85.

Nakanishi T (2007) Potential toxicity of organotin compounds via nuclear receptor signaling in mammals. *J Health Sci* 53:1-9.

Scordino M, Sabatino L, Traulo P, Gagliano G, Gargano M, Panto V, Gambino GL (2008) LC/MS/MS detection of fungicide guazatine residues for quality assessment of commercial citrus fruit. *Eur Food Res Technol* 227:1339-1347.

Zabka M., Pavela R., Slezakova L. (2009): Antifungal effect of Pimenta dioica essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi, *Industrial Crops and Products* 30: 250–253.

Zabka, M. (2022). Antifungal efficacy and convenience of *Krameria lappacea* new alternatives of antifungal treatment. *Agronomy*, 12(11), 2599.

Kontaktní adresa:

Ing. Martin Žabka, Ph.D
e-mail: zabka@vurv.cz;
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně

Efekt majoritních složek silic fenyklu a anýzu proti *Alternaria alternata*, původci hnědé skvrnitosti bramboru

The effect of the major components of fennel and anise oils against *Alternaria alternata*, the causative agent of potato brown spot

Žabka M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně

Abstrakt

V této práci byla testována účinnost přírodních látek anetholu a anisaldehydu hlavních kompozičních složek silic anýzu a fenyklu proti původci hnědé skvrnitosti bramboru *Alternaria alternata*. Pomocí *in vitro* kontrolovaných experimentů byly testovány efektivní koncentrace a dose-response křivky patogena v závislosti na koncentraci. Inhibiční efekt byl porovnán s inhibičním efektem syntetického fungicidu tebukonazolu, jako referenčního standardu. V práci byl potvrzen inhibiční efekt anetholu i anisaldehydu na testovaného patogena. Obě látky jsou přírodního původu a díky své ověřené nezávadnosti i účinnosti potenciálními kandidáty pro rozšíření alternativních preparátů na ochranu rostlin.

Klíčová slova: Anethol, Anisaldehyd, Aromatické rostliny, Antifungální aktivita, hnědá skvrnitost brambor, Alternaria.

Abstract

In this work, the effectiveness of the natural substances anethole and anisaldehyde, the main components of the essential oils of anise and fennel, against the causative agent of potato brown spot, Alternaria alternata, was tested. Using in vitro controlled experiments, effective concentrations and dose-response curves of the pathogen depending on the concentration were tested. The inhibitory effect was compared with the inhibitory effect of the synthetic fungicide tebuconazole, as a reference standard. The work confirmed the inhibitory effect of anethole and anisaldehyde on the tested pathogen. Both substances are of natural origin and, thanks to their proven harmlessness and effectiveness, potential candidates for the expansion of alternative preparations for plant protection.

Keywords: Anethole, Anisealdehyde, Aromatic plants, Antifungal actvity, Alternaria brown spot

Úvod

Chemické syntetické fungicidní látky v zemědělství, ale i v lékařství, kosmetice a jiných oblastech se již dávno stalo nedílnou součástí moderního vyspělého světa. Nicméně, ze všech uvedených oblastí nenaráží používání fungicidů tak výrazně a čím dál více na více či méně podložené environmetální a s tím spojené legislativní bariery. Čím dál více, především v EU, je ochrana rostlin spojena s rostoucími problémy v přístupu k novým či ekonomicky výhodným komerčním preparátům na trhu (Brauer et al., 2019). V zemědělství ekologickém je problém ochrany plodin ještě větší výzvou. Nadějnou cestou je výzkum antifungálních vlastností mnohých přírodních látek, které mohou zastoupit či snížit spotřebu syntetických pesticidů obecně (Zabka and Pavela, 2018; Zabka et al., 2020) Tato studie popisuje efektivitu anetholu a anisaldehydu, přírodních látek obsažených ve vonných silicích především anýzu (*Pimpinela anisum* L.) a fenyklu (*Foenicullum vulgare* Mill.), proti původci hnědé skvrnitosti *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. Obě látky byly navíc v předchozích studiích (Žabka 2023; Žabka 2022) velmi účinné proti jinému patogenu brambor, původci plísně bramborové, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

Materiál a metody

Izolace a udržování kultury *A.alternata*

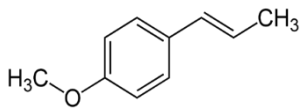
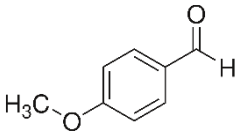
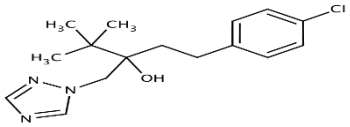
Testovaný izolát *A. alternata* (Aa-2408MZ) byl izolován v roce 2024 pod mikroskopem

z infikovaného listu bramboru se symptomy hnědé skvrnitosti. Po přečištění (pomocí dvoustupňové kultivace na ATB/Chloramphenicol-PDA) je kultura udržována v pracovní laboratorní sbírce v nativním stavu v termostatu při teplotě 18°C a pravidelně pasážována na PDA (Potato dextrose agar).

Testování inhibičního efektu anetholu proti vybranému patogenu

Inhibiční vlastnosti testovaných látek na myceliární růst *A.alternata* byly testovány pomocí diluční metody. Vybrané látky s antifungálním potenciálem byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich, v p.a. stupni chemické čistoty (Tab. 1). Stanovené množství látek bylo rozpuštěno v malém množství čistého MeOH a důkladně rozmícháno v PDA médiu při teplotě pod 60°C v přesně dané koncentrační řadě. Ta byla zvolena na základě předchozích testů následovně: 0.005; 0.01; 0.025; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 1 a 2 $mg.ml^{-1}$ tak, aby maximálně pokrývala předpokládané rozpětí „dose-response“ křivek u u jednotlivých látek a testovaného patogenního organismu *A. alternata*. Kontrolní sada byla připravena přidáním ekvivalentního množství stejného rozpouštědla MeOH. Jako pozitivní referenční kontrola byla připravena sada s četně používanou syntetickou fungicidní látkou tebukonazol dle (Majeed et al 2022; Javed et al 2023), který byl připraven ve stejné koncentrační řadě. Připravené Petriho misky (9 cm) byly sterilně naočkovány pomocí myceliárních disků (0,4 cm) odebraných z okraje čtrnáctidenních povrchových kultur *A. alternata*. Kultivace probíhala po dobu 10 dní, při teplotě 21°C. Světelný režim byl nastaven za použití black light (20 hod tma / 4 hod black light). Následné srovnání průměru kolonií v porovnání s kontrolními sety bylo převedeno na procentuální vyjádření inhibičního potenciálu jednotlivých látek.

Tab. 1: Vybrané látky použité pro testování antifungálních vlastností

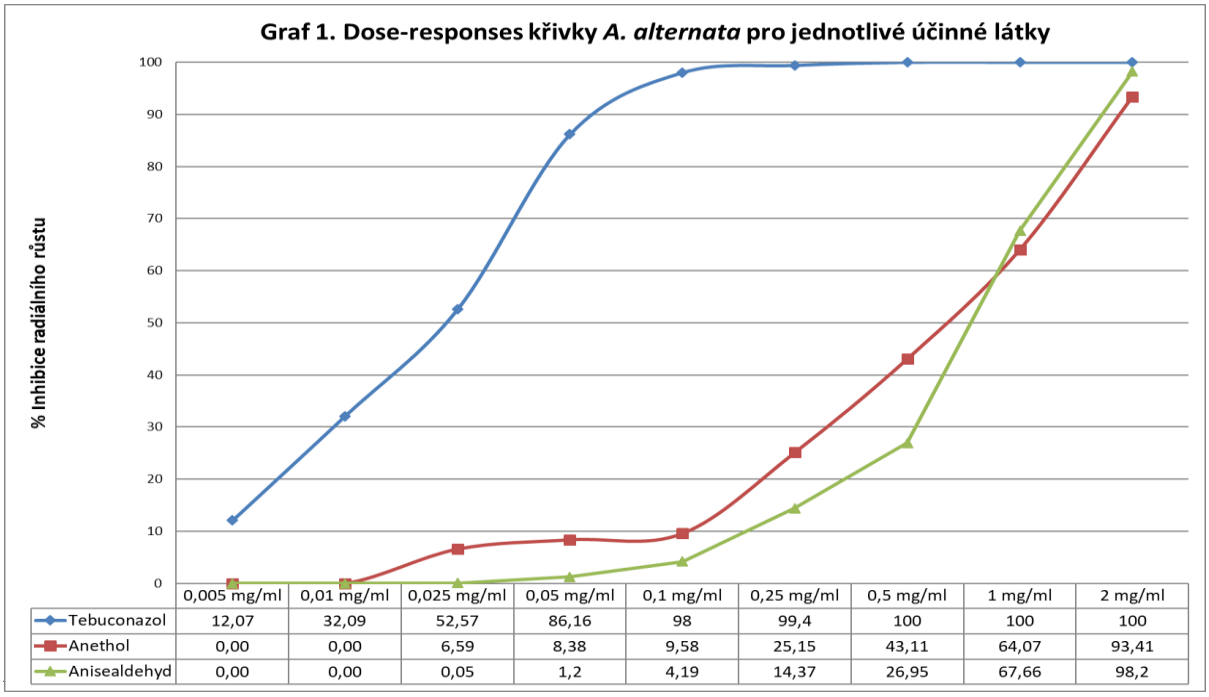
Látka	IUPAC název	Strukturní (*sumární) vzorec
Anethol (trans-anethol)	1-Methoxy-4-[(1*E*)-prop-1-en-1-yl]benzene (trans izomer)	
Anisealdehyd	4-Methoxybenzaldehyde	
Tebukonazol	(*RS*)- 1-(4-Chlorophenyl)- 4,4-dimethyl-3-(1*H*, 1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan- 3-ol	

Výsledky a diskuse

Výsledky potvrzují inhibiční účinky na růst *A. alternata* u obou testovaných přírodních látek (Graf 1.). Anethol i anisaldehyd prokazatelně inhibovaly růst patogena v závislosti na rostoucí koncentraci. Hladina efektivní koncentrace u obou látek, tedy nad 50%, byla dosažena při koncentraci mezi 0,5 - 1 mg/ml, přičemž anethol vykazoval v podstatné části dose response křivky mírně vyšší inhibiční efekt. Obě látky i přes svou prokazatelnou inhibiční efektivitu proti *A. alternata*. Na základě úrovně a průběhu dose response křivek vykazoval tebukonazol, syntetický fungicid, řádově vyšší inhibiční efekt. Hladina efektivní koncentrace (≥50%) zde byla dosažena již při 0,025mg/ml. V porovnání s účinností anetholu a anisaldehydu na *P. infestans*, která byla zjištěna v předchozích experimentech (Žabka 2022, 2023), kdy z průběhu dose response křivek byla patrná vyšší inhibiční efektivita než u tebukonazolu a dalších

fungicidů, je efektivita obou testovaných látek proti *A. alternata* nezanedbatelná, nicméně až desetinásobně nižší. Na druhou stranu by se však efektivita proti *A. alternata* dala srovnávat s efektivitou jiných přírodních látek a rostlinný extraktů proti evolučně podobným houbovým patogenům (Zabka 2017). Je zřejmé, že v případě *P. infestans* v předchozích studiích, byly obě látky účinnější než tebukonazol hlavně z důvodu náležitosti tohoto patogena do skupiny Oomycetes. Předpokládáme, že mechanismus účinku tebukonazolu více zasahuje do vývoje skupiny tzv. pravých hub jako je *A.alternata*, a proto díky morfologickým i fyziologickým odlišnostem skupiny oomycet není proti *P.infestans* až tak efektivní (Žabka 2018, He et al., 2019). Anethol i anisaldehyd je vzhledem k inhibičnímu efektu na *A. alternata* i na *P. infestans* (Zabka 2023) slibná přírodní látka, bez škodlivých environmentálních vlivů. Jedná se o aromatické sloučeniny ze skupiny fenylpropanoidů obsažených ve větším či menším množství ve velmi oblíbených a hojně používaných aromatických rostlinných druzích jako je fenykl, anýz nebo badyán (Ponte et al., 2012, Sharafan et al.,2020). Bylo zjištěno, že efektivita anetholu a anisaldehydu není příliš spojena s vlivem na membránové struktury (Fujita et al., 2004). Nicméně, byla popsána možnost mechanismu účinku narušením metabolismu při stavbě buněčné stěny, a to především při tvorbě důležité chitinové složky buněčné stěny (Yutani et al., 2021).

Graf 1. Reakce patogena v průběhu koncentrační řady v podobě dose-response křivek



	0,005 mg/ml	0,01 mg/ml	0,025 mg/ml	0,05 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
Tebuconazol	12,07	32,09	52,57	86,16	98	99,4	100	100	100
Anethol	0,00	0,00	6,59	8,38	9,58	25,15	43,11	64,07	93,41
Anisealdehyd	0,00	0,00	0,05	1,2	4,19	14,37	26,95	67,66	98,2

V této práci jsme v kontrolovaných primárních *in vitro* experimentech potvrdili vědecky i prakticky zajímavé významné účinky anetholu, přírodní látky obsažené ve vonných silicích mnoha užívaných rostlinných druhů. Bylo zjištěno, že anethol i anisaldehyd, které jsou již ve velmi nízkých koncetracích velmi efektivní proti *P. infestans* vykazují i inhibiční potenciál proti dalšímu závažnému houbovému patogenu brambor, původci hnědé skvrnitosti brambiru *A. alternata*. Oproti referenčnímu standardu, syntetickému a velmi účinnému fungicidu tebukonazolu, vykázal zdravotně nazávadný a zcela přírodní antehol a anisaldehyd nižší, nicméně nezanedbatelnou účinnost. Jedná se o vonné přírodní látky v životním prostředí rychle degradovatelné a především o látky s velmi nízkou zdravotní závadností pro člověka. V naší další práci se těmto látkám budeme dále věnovat s cílem poskytnout nové poznatky pro možnost tvorby preparátů, které by obohatily oblast ochrany rostlin především tam, kde není

možnost použití konvenčních syntetických fungicidů, či v kombinaci s nimi za účelem snížení jejich spotřeby.

Dedikace
Tato práce byla financována z následujících zdrojů QK22010073.

Seznam použité literatury

Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, De Paula RG, Rangappa KS, Nayaka SC, Gupta V., Almeida F, (2019). Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules* 9, **21**.

Fujita, K. I., & Kubo, I. (2004). Potentiation of fungicidal activities of trans-anethole against *Saccharomyces cerevisiae* under hypoxic conditions. *Journal of bioscience and bioengineering*, *98*(6), 490-492.

Hashimoto, Y., Ogita, A., Kubo, I., Tanaka, T., & Fujita, K. I. (2011). Morphological changes of the filamentous fungus Mucor mucedo and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phytotherapy research*, *25*(11), 1707-1713.

He, C., Zhang, Z., Li, B., Xu, Y., & Tian, S. (2019). Effect of natamycin on Botrytis cinerea and *Penicillium expansum*—Postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit. Postharvest Biology and Technology, 151, 134-141.

Javed, A., Adeel, M., Arshad, K., Mahmood, T., Anwer, M., Ikram, T.,& Hussain, M. (2023). Management of early blight of potato caused by Alternaria solani through fungicides under in vitro conditions. *Journal of Veterinary, Food and Agricultural Insights*, *1*(1), 01-08.

Majeed, M., Badri, Z. A., Bhat, Z. A., Makhdhoomi, M. I., & Parveen, S. (2022). Evaluation of different fungicides in management of early blight disease of tomato caused by Alternaria Solani. *Pesticide Research Journal*, *34*(1), 8-14.

Ponte, E. L., Sousa, P. L., Rocha, M. V., Soares, P. M., Coelho-de-Souza, A. N., Leal-Cardoso, J. H., Assreuy, A. (2012). Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacological Reports*, *64*(4), 984-990.

Sharafan, M., Jafernik, K., Ekiert, H., Kubica, P., Kocjan, R., Blicharska, E., & Szopa, A. (2022). *Illicium verum* (Star Anise) and Trans-Anethole as valuable raw materials for medicinal and cosmetic applications. *Molecules*, *27*(3), 650.

Yutani, M., Hashimoto, Y., Ogita, A., Kubo, I., Tanaka, T., & Fujita, K. I. (2011). Morphological changes of the filamentous fungus Mucor mucedo and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phytotherapy research*, *25*(11), 1707-1713

Žabka (2022) Inhibiční účinek anetholu, významné složky silice fenyklu a anýzu, na Phytophthora infestans. Úroda 12, 217-220.

Žabka (2023) Efekt anisaldehydu, ze silic anýzu a fenyklu, proti *Phytophthora infestans Phytophthora infestans*. Úroda 12, 201-204.

Žabka, M. & Pavela, R. (2017) Inhibiční efekt potravinářsky využitelných extraktů z aromatických rostlin na růst patogenních a toxigenních hub. Úroda 12, 367-370.

Žabka, M. & Pavela, R. (2018). Effectiveness of environmentally safe food additives and food supplements in an in vitro growth inhibition of significant Fusarium, Aspergillus and Penicillium species. *Plant Protection Science*, *54*(3), 163-173.

Žabka, M., Pavela, R., Trávníčková, M., & Barnet, M. (2020). Calcium disodium ethylenediaminetetraacetate as a safe compound for crop protection with the potential to extend the basic substances group. *Plant Protection Science*, *56*(2), 123-131.

Kontaktní adresa:
Ing. Martin Žabka, Ph.D
e-mail: zabka@vurv.cz;
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, Praha 6 –Ruzyně

3. Technologie pěstování rostlin, půda a ekologie

Vplyv digestátu na primárnu produkciu trávneho porastu

The effect of digestate on the primary production of grassland

Čunderlík J [1]., Kizeková M [1]., Vargová V [1].

[1]*NPPC-VÚRV- Ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva Banská Bystrica*

Abstrakt

Cieľom výskumnej úlohy bolo overiť vplyv rôznych dávok digestátu na kvantitatívne a kvalitatívne ukazovatele nadzemnej biomasy trávnych porastov. V priemere troch rokov (2019 a 2021) bola najvyššia produkcia sušiny 4,42 t.ha^{-1} v roku 2020. V sledovaných rokoch sa dosiahla najvyššia úroda 4,15 t.ha^{-1} na variante s dávkou digestátu 150 N kg.ha^{-1}. Najvyšší obsah dusíkatých látok 128,02 g.kg^{-1} bol v roku 2020. Optimálny pomer K:(Ca+Mg) bol dosiahnutý na variante s dávkou digestátu 90 kg N.ha^{-1}.

Klíčová slova: lúka, digestát, úroda, pomer živín

Abstract

The aim of the research task was to verify the influence of different doses of alternative organic fertilizer (digestate – wastewater after biogas generation) on quantitative and qualitative indicators of aboveground biomass of grassland. On average of three years (2019 and 2021) the higher dry matter production was 4.42 t.ha^{-1} in 2020. In terms of the production of treatments in the monitored years, the highest yield reached 4.15 t.ha^{-1} with treatment a dose of digestate at 150 N kg.ha^{-1} rate. The highest content of crude protein 128.02 g.kg^{-1} dry matter was in 2020. The optimal K: (Ca + Mg) ratio was achieved on the treatment with a digestate dose of at 90 kg N .ha^{-1} rate.

Keywords: grassland, digestate, harvest, ratio of nutrients

Úvod

Aplikáciou organických a minerálnych hnojív do pôdy, okrem dodávania živín pre rastliny sa môžu ovplyvniť fyzikálne a chemické vlastnosti pôdy a s nimi aj mikrobiálne populácie (Demo a Hričovský, 2002). Hospodárske hnojivá sú dôležité pre návrat živín do pôdy, ale môžu mať aj celý rad vedľajších účinkov na pôdu. V posledných rokoch však stavy hospodárskych zvierat v SR neustále klesajú, čo sa prejavuje aj v nedostatku maštaľného hnoja. Jednou z možností je využitie vyhnitého kalu získaného ako vedľajší produkt pri výrobe bioplynu (Mitrušková a Pospišil, 2008). Výroba bioplynu je posledným krokom v systéme využívania biomasy, v ktorom sa súčasne vyrába nosič obnoviteľnej energie – bioplyn s dezinfikovaným biohnojivom (digestát). Priame produkty z bioplynových zariadení (anaeróbnej digescie), teda energia a organické hnojivá prispievajú k napĺňaniu niekoľkých európskych cieľov v oblasti znižovania emisií skleníkových plynov a energetickej bezpečnosti, ako aj k rozvoju obehového biohospodárstva a ekologickej (zelenej) zamestnanosti (Honzík, 2001). Vyhnitý kal z bioplynovej stanice obsahuje značné množstvo živín a za predpokladu že spĺňa stanovené parametre, je možné ho použiť ako hnojivo. Existujú dôkazy, že aplikácia digestátu, okrem zvyšovania množstva živín v pôde, zlepšuje rast rastlín, úrodu a kvalitu produkcie, pričom môže potláčať výskyt fytopatogénnych druhov (Arthurson, 2008).

Materiál a metody

Cieľom riešenej výskumnej úlohy bolo overiť vplyv rôznych dávok vyhnitého digestátu, ako alternatívneho organického hnojiva na produkciu a kvalitu trávneho porastu v priebehu rokov

2019 - 2021. Úloha sa riešila na plochách pokusného areálu NPPC - VÚTPHP, stanovište Radvaň, ktoré sa nachádza v nadmorskej výške 480 m na sklonitom svahu so SV expozíciou a presnou pozíciou podľa GPS – s.š. 48º 71.875´ a v.d. 19º 10.378´. Priemerné ročné zrážky sú 853 mm, za vegetačné obdobie 441 mm. Priemerné ročné teploty sú 7,7 °C za vegetáciu 13,6 °C. Geologický substrát stanovišťa tvoria zvetraliny andezitov, pôdny typ – kambizem, pôdny druh – hlinitá. Jedná sa o pôdu stredne hlbokú, ktorá sa využíva striedavo, ako oráčina a po zatrávnení aj ako lúka na kosenie alebo na pasenie. Digestát bola tmavá, nepáchnuca, heterogénna suspenzia pevných a koloidných látok. Digestát sa aplikoval na povrch porastu na jar v každom sledovanom roku v nasledovanej dávke hnojenia:

V1 – nehnojená kontrola

V2 - N 90 v kg.ha^{-1} č.ž. digestát (jednorazová dávka na jar)

V3 - N 120 v kg.ha^{-1} č.ž. digestát (jednorazová dávka na jar)

V4 - N 150 v kg.ha^{-1} č.ž. digestát (jednorazová dávka na jar)

Na základe chemického rozboru vyhnitého digestátu sa vypočítali dávky digestátu, rovnajúce sa čistým živinám N vo variantoch V2,V3 a V4. Jeho zloženie je primárne ovplyvnené množstvom a chemickým zložením vstupných surovín, čo sú v našom prípade kukuričná siláž a trávna senáž (tab. 1). Vyhnitý digestát mal v roku 2019 pH 7,45, neokysľoval pôdu, a tým zlepšoval využitie fosforu z pôdy. Obsah sušiny bol 67,51 %. Výrazné rozdiely v chemickom zložení digestátu v roku 2020 sme nezistili. Najvyšší obsah sušiny (102,40 %) a fosforu (29,78 g.kg^{-1}) bol v roku 2021. Dávky digestátu sa aplikovali na trávny porast po zazelenaní porastu. Porasty sa v úžitkovom roku využívali 3 x kosbou, pričom 1. kosba sa uskutočnila na začiatku klasenia prevládajúcich druhov tráv, druhá s odstupom 7-8 týždňov po prvej a tretia (podľa stavu porastu) 8-10 týždňov po druhej.

Tabuľka 1 Chemické zloženie digestátu

Rok	pH/KCl	Sušina	N	P	K	Ca	Na	Mg
		%	(g.kg $^{-1}$)					
2019	7,45	67,51	47,90	15,11	49,46	25,97	9,95	12,32
2020	7,65	61,27	63,38	16,16	50,79	32,65	4,69	16,55
2021	7,41	102,40	46,29	29,78	36,13	15,62	2,93	25,39

Pred založením pokusu v roku 2019 a po skončení pokusu v roku 2021 sme z hĺbky 0-150 mm odobrali pôdne vzorky (tab. 2) na stanovenie základných agrochemických vlastností pôdy: pH (KCl), humus, Cox, N, Ca, P, K, Mg. V jarnom odbere pôdnych vzoriek v roku 2019 sa sledované varianty vyznačujú kyslou pôdnou reakciou, strednou zásobou humusu, vyššou zásobou dusíka a horčíka a vyhovujúcou zásobou draslíka. Obsah fosforu a vápnika je nízky. V jesennom odbere v roku 2021 sa varianty vyznačujú slabo kyslou pôdnou reakciou, obsah humusu bol vyšší (48,64 – 55,81 g.kg^{-1}) ako v jarnom odbere. Zvýšil sa aj obsah fosforu (3,42 – 3,86 g.kg^{-1}), ale celkovo bol nízky. Obsah draslíka bol dobrý. Vysoké obsahy horčíka sme zaznamenali na všetkých variantoch aj v jesennom odbere. Väčšina poľnohospodárskych pôd SR je vysoko zásobená horčíkom a to vďaka jeho prirodzeným zásobám tejto živiny v pôdotvorných substrátoch, eventuálne aplikáciou špeciálnych hnojív z obsahom horčíka, ako je aj digestát.

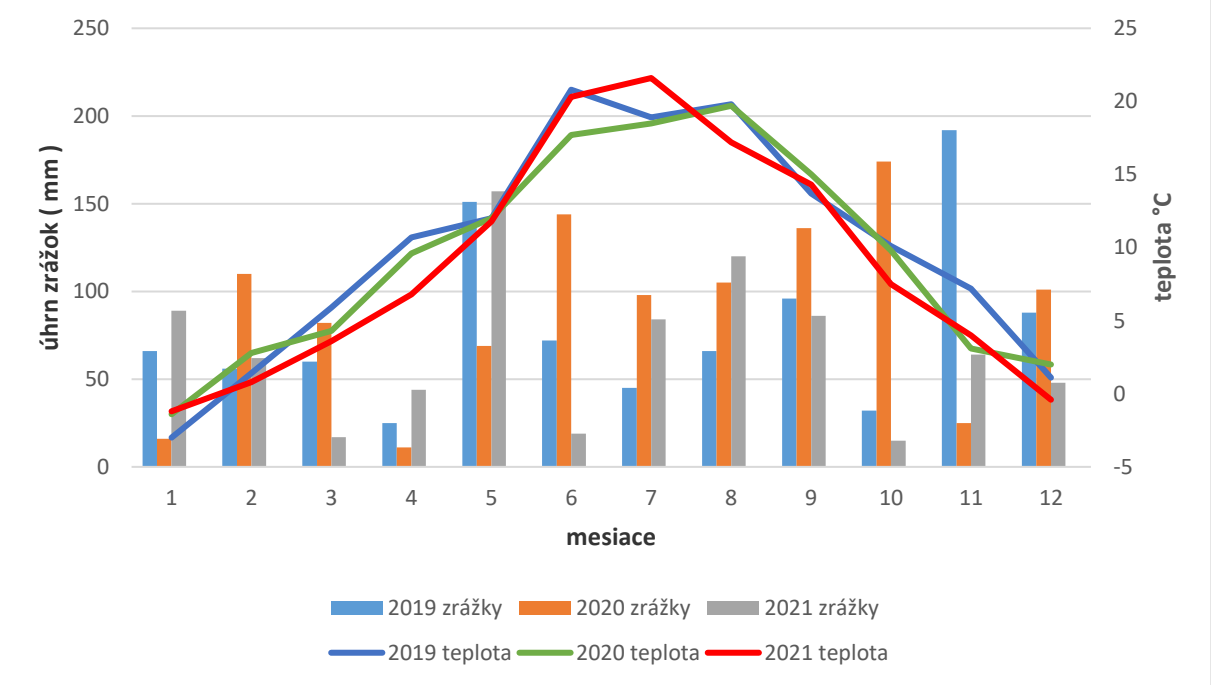
Tabuľka 2 Agrochemické vlastnosti pôdy (0-150 mm) v rokoch 2019 - 2021

Rok	Variant	pH/KCl	Humus	Cox	N	Ca	P	K	Mg
			g.kg^{-1}				mg.kg^{-1}		
2019 Jarný odber	Kontrola	5,10	52,06	30,20	2,31	1,13	1,73	115,28	884,83
	Biokal 90 kg.ha^{-1}	4,30	46,38	26,90	2,04	1,24	1,69	99,31	646,35
	Biokal 120 kg.ha^{-1}	4,66	42,76	24,80	2,31	1,24	1,52	138,74	705,56
	Biokal 150 kg.ha^{-1}	4,65	40,69	23,60	2,20	1,29	1,52	157,93	767,26
2021 Jesenný odber	Kontrola	5,81	51,20	29,70	1,97	2,05	3,42	135,78	671,17
	Biokal 90 kg.ha^{-1}	5,95	55,81	32,37	2,43	2,07	3,67	168,81	522,35
	Biokal 120 kg.ha^{-1}	5,74	54,28	31,48	2,32	2,11	3,86	152,29	613,28
	Biokal 150 kg.ha^{-1}	5,24	48,64	28,22	2,14	2,15	3,77	131,65	625,79

Výsledky

V roku 2019 bola najvyššia celková produkcia sušiny 2,73 t.ha^{-1} na variante s dávkou digestátu 150 kg N.ha^{-1} (tab. 3). Najnižšia celková produkcia 1,53 t.ha^{-1} bola na kontrolnom variante. Medzi dávkami digestátu 90 kg.ha^{-1}a 120 kg.ha^{-1} bol rozdiel úrod 0,31 t.ha^{-1} a medzi dávkami digestátu 120 kg.ha^{-1} a 150 kg.ha^{-1} bol rozdiel úrod len 0,22 t.ha^{-1}. Úrody sušiny na hnojených variantoch dosahovali vyrovnané hodnoty v kosbách. V tretej kosbe sa dosiahli najnižšie úrody sušiny (0,27 – 0,53 kg.ha^{-1}) na všetkých variantoch. Najvyšší percentuálny nárast úrod (62 %) sme dosiahli v prvej kosbe, kedy úhrny zrážok v mesiaci máj boli nadnormálne a dosahovali vysokú úroveň z dlhodobého priemeru 186 %. Podobne, ako v roku 2019, aj v roku 2020 bola najvyššia celková produkcia 5,38 t.ha^{-1} na variante s dávkou digestátu 150 kg N.ha^{-1} a najnižšia celková produkcia 2,96 t.ha^{-1} bola na kontrolnom variante (tab. 3). Medzi dávkami digestátu 90 kg N.ha^{-1}a 150 kg N.ha^{-1} bol rozdiel úrod 0,76 t.ha^{-1} a medzi dávkami digestátu 120 kg.ha^{-1}a 150 kg N.ha^{-1} bol rozdiel úrod 0,65 t.ha^{-1}. V tretej kosbe sa dosiahli najvyššie úrody sušiny (1,61 – 2,34 t.ha^{-1}) na všetkých variantoch, čo predstavovalo percentuálny nárast úrod (48 %) v porovnaní s prvou a druhou kosbou, kedy úhrny zrážok v mesiacoch august a september sa pohybovali v rozpätí od 105 – 136 mm(graf 1). Nízka pôdna vlhkosť v jarnom období a následne najvyššia v jesennom období mala vplyv aj na výšku úrod za jednotlivé kosby. Vplyv kosieb na celkovú produkciu sušiny mal klesajúcu tendenciu v smere: 3.kosba > 2.kosba >1.kosba. Celková produkcia sušiny bola vyššia v roku 2020 o 49 % v porovnaní s rokom 2019. V roku 2021 sme zaznamenali najvyššiu produkciu 4,35 t.ha^{-1} na variante s dávkou digestátu 150 kg N.ha^{-1}. Medzi dávkami digestátu 90 kg.ha^{-1} a 120 kg.ha^{-1} bol rozdiel úrod 0,11 t.ha^{-1} a dávkou 90 kg.ha^{-1} a 150 kg.ha^{-1} bol rozdiel 0,45 t.ha^{-1}. Rozdiel úrod sme zaznamenali aj medzi dávkami digestátu 120 kg N.ha^{-1} a 150 kg N.ha^{-1}, ktorý bol na úrovni 0,56 t.ha^{-1}. V poslednom úžitkovom roku sa dosiahli najnižšie úrody sušiny v druhej kosbe (0,30 – 0,42 t.ha^{-1}) na všetkých variantoch, kedy mesačné úhrny zrážok boli v dôsledku častých lokálnych prehánok a búrok veľmi premenlivé a počas mesiacov jún (19 mm) a júl (84 mm) nerovnomerne rozdelené (graf 1). To sa prejavilo aj na vplyve kosieb na celkovú produkciu sušiny, kedy mali klesajúcu tendenciu v smere: 1.kosba > 3.kosba > 2.kosba. Celková produkcia sušiny za celé sledované obdobie bola najvyššia v roku 2020, o 19 % vyššia v porovnaní s rokom 2021 a o 49 % v porovnaní s rokom 2019. Vplyv kosieb na celkovú produkciu sušiny za sledované roky mal klesajúcu tendenciu v smere: 1.kosba > 3.kosba > 2.kosba.

Graf 1 Agrometeorologické údaje za roky 2019-2021



Tabuľka 3 Produkcia sušiny v kosbách za roky 2019 – 2021

Rok	Variant	1. kosba		2. kosba		3. kosba		∑
		t.ha^{-1}	%	t.ha^{-1}	%	t.ha^{-1}	%	t.ha^{-1}
2019	Kontrola	0,90	59	0,36	23	0,27	18	1,53
	Biokal 90kg.ha^{-1}	1,41	64	0,43	20	0,36	16	2,20
	Biokal 120 kg.ha^{-1}	1,66	66	0,42	17	0,43	17	2,51
	Biokal 150 kg.ha^{-1}	1,60	59	0,60	22	0,53	19	2,73
	$\bar{x}$	1,39	62	0,45	21	0,40	17	2,24
2020	Kontrola	0,45	15	0,90	30	1,61	55	2,96
	Biokal 90kg.ha^{-1}	0,70	15	1,75	38	2,17	47	4,62
	Biokal 120 kg.ha^{-1}	0,90	19	1,76	37	2,07	44	4,73
	Biokal 150 kg.ha^{-1}	0,98	18	2,06	38	2,34	44	5,38
	$\bar{x}$	0,75	17	1,62	35	2,05	48	4,42
2021	Kontrola	0,80	34	0,42	18	1,13	48	2,35
	Biokal 90kg.ha^{-1}	2,07	53	0,35	9	1,48	38	3,90
	Biokal 120 kg.ha^{-1}	2,05	54	0,30	8	1,44	38	3,79
	Biokal 150 kg.ha^{-1}	2,20	51	0,38	9	1,77	40	4,35
	$\bar{x}$	1,78	48	0,36	11	1,46	41	3,60

Štatisticky preukazné rozdiely sme zaznamenali v úrodách a obsahu biogénnych prvkov v sušine za sledované roky a varianty (tab. „4,5,6,7). Preukazne ($P < 0,05$) vyššiu úrodu (4,42 $t.ha^{-1}$) sme dosiahli v roku 2020. Preukazné rozdiely boli aj pri obsahoch prvkov v rastlinnej hmote. Najvyšší ($P < 0,05$) sme zaznamenali pri obsahu NL (128,02 $kg.ha^{-1}$) v roku 2020. Preukazné rozdiely sme zaznamenali aj pri ostatných prvkoch, nepreukazný rozdiel v rokoch bol len pri sodíku. Preukazne ($P<0,05$) najnižšiu úrodu (2,22 $t.ha^{-1}$) mal kontrolný variant. Rozdiely medzi kontrolou a ostatnými variantami sú štatisticky preukazné. Nepreukazný rozdiel bol medzi variantmi s dávkami digestátu 90 kg $N.ha^{-1}$, 120 kg $N.ha^{-1}$ a s dávkou digestátu 150 kg $N.ha^{-1}$. Preukazne ($P<0,05$ najnižší obsah NL (116,14 $kg.ha^{-1}$) sme zaznamenali na kontrolnom variante. Preukazné rozdiely medzi kontrolou a dávkou digestátu 150 kg $N.ha^{-1}$ boli vo všetkých biogénnych prvkov a na všetkých variantoch. Preukazne ($P<0,05$) najvyššia hodnota (4,22) pomeru Ca: P bola v roku 2019, preukazné rozdiely medzi rokmi boli aj pri pomere K : (Ca+Mg). Preukazne ($P<0,05$) najvyššiu hodnotu (4,17) pri pomere Ca: P mal kontrolný variant. Rozdiel medzi kontrolou a variantom s dávkou digestátu 120 kg $N.ha^{-1}$ je štatisticky preukazný pri pomere Ca: P. Nepreukazné rozdiely pomeru Ca: P boli medzi kontrolou a variantami s dávkami digestátu 90 kg $N.ha^{-1}$ a 150 kg $N.ha^{-1}$. Rozdiely pomeru K :(Ca+Mg) medzi variantmi nie sú štatisticky preukazné.

Tabuľka 4 Analýza variancie pre hodnotenie úrod, koncentrácie biogénnych prvkov za roky 2019 – 2021

Rok	Úroda ($t.ha^{-1}$)	Koncentrácia biogénnych prvkov ($kg.ha^{-1}$)					
		NL	P	K	Na	Ca	Mg
2019	2,24 a	120,55 b	2,72 b	25,76 ab	0,29 a	11,18 c	4,42 c
2020	4,42 c	128,02 c	2,75 b	27,21 b	0,31 a	10,07 b	4,14 b
2021	3,60 b	111,17 a	2,46 a	25,11 a	0,32 a	9,06 a	3,70 a
Hd $\alpha_{0,05}$	0,441	5,244	0,167	2,018	0,028	0,725	0,127

Tabuľka 5 Analýza variancie pre hodnotenie úrod, koncentrácie biogénnych prvkov za varianty

Variant	Úroda ($t.ha^{-1}$)	Koncentrácia biogénnych prvkov ($kg.ha^{-1}$)					
		NL	P	K	Na	Ca	Mg
kontrola	2,22 a	116,14 a	2,27 a	24,25 a	0,29 a	9,44 a	4,02 a
Biokal 90 $kg.ha^{-1}$	3,57 b	119,11 ab	2,56 b	26,23 ab	0,29 a	10,00 a	4,03 a
Biokal 120 $kg.ha^{-1}$	3,68 bc	119,60 ab	2,77 c	25,61 ab	0,29 a	9,90 a	4,11 ab
Biokal 150 $kg.ha^{-1}$	4,15 c	124,81 b	2,97 c	28,02 b	0,37 b	11,08 b	4,20 b
Hd $\alpha_{0,05}$	0,562	6,682	0,213	2,571	0,036	0,924	0,160

Tabuľka 6 Analýza variancie pre hodnotenie pomeru prvkov za roky 2019 – 2021

Rok	Úroda ($t.ha^{-1}$)	Koncentrácia biogénnych prvkov	
		Ca : P	K : (Ca+Mg)
2019	2,24 a	4,22 b	1,72 a
2020	4,42 c	3,65 a	1,96 b
2021	3,60 b	3,75 a	2,11 c
Hd $\alpha_{0,05}$	0,441	0,373	0,140

Tabuľka 7 Analýza variancie pre hodnotenie pomeru prvkov za varianty

Variant	Úroda ($t.ha^{-1}$)	Koncentrácia biogénnych prvkov	
		Ca : P	K : (Ca+Mg)
Kontrola	2,22 a	4,17 b	1,89 a
Biokal 90 kg $N.ha^{-1}$	3,57 b	3,93 ab	2,00 a
Biokal 120 kg $N.ha^{-1}$	3,68 bc	3,54 a	1,94 a
Biokal 150 kg $N.ha^{-1}$	4,15 c	3,85 ab	1,88 a
Hd $\alpha_{0,05}$	0,562	0,475	0,178

Diskuze

Z hľadiska dosiahnutej produkcie a kvality bol zistený kladný vplyv biokalu na trávny porast. Zaznamenali sme tendenciu zvyšovania koncentrácie N- látok v trávnej hmote so stupňovanými dávkami hnojenia. Na koncentráciu draslíka v sušine fytomasy vplýva aj floristické zloženie porastov v tom zmysle, že najvyšší obsah draslíka je v bylinách a najnižší je v ďatelinovinách. V našom pokuse mala vyššie zastúpenie skupina bylín oproti ďatelinovinám. Juriš (2000) uvádza, že hnojivý účinok digestátu je dobrý a živiny z kalu, hlavne dusík, sú prijímané rýchlejšie ako z maštaľného hnoja, ale pomalšie ako z priemyselných hnojív. Hnojivové využitie vyhnitého biokalu znižuje nároky na potrebu priemyselných hnojív, zlepšujú sa hydrofyzikálne vlastnosti pôdy, čo má pozitívny vplyv na celkový vlahový režim pôdy (Igaz, 2001). Aplikáciou biokalu sa neokysľovala pôda, zvýšil obsah vápnika, fosforu a draslíka.

Závěr

Celková produkcia sušiny za celé sledované obdobie (4,42 $t.ha^{-1}$) bola najvyššia v roku 2020. Najvyššia produkcia, a to 4,15 $t.ha^{-1}$, bola na variante s dávkou digestátu 150 kg $N.ha^{-1}$. Za sledované roky bol obsah dusíkatých látok len na úrovni 111,17 – 128,02 $g.kg^{-1}$ sušiny. Pri každoročnom využívaní pri dostatočnej sušine je biokal dobrým organicko – minerálnym hnojivom so špecifickými pozitívnymi vlastnosťami (pH reakcia, potlačená klíčivosť semien burín, nízky zápach).

Literatura

Arthurson, V. 2008: Proper Sanitization of Sewage Sludge: a Critical Issue for a Sustainable Society. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74 (17), 5267-5275.

Demo, M., Hričovský, I. 2002: Hnojenie organickými hnojivami. In Trvalo udržateľné technológie v záhradníctve, Nitra: SPU 2002, s. 115 – 118. ISBN 80-8069-056-1

Honzík, R., 2001: Zkušenosti s využitím biologických odpadú pro produkci bioplynu v SRN. In Možnosti výroby a využití bioplynu v zemědělství ČR. Třeboň. 2001. s. 75 – 81. ISBN 80-238-7735-6

Igaz, D. 2001: Spracovanie tekutých organických odpadov a ich využitie v poľnohospodárskej krajine z hľadiska ochrany životného prostredia, autoreferát dizertačnej práce. Nitra: SPU, 2001. 25 s.

Juriš, P. 2000: Hygienické a ekologické požiadavky na recykláciu organických odpadov v poľnohospodárstve. Prešov: Vydavateľstvo M. Vaška, 2000, 158 s. ISBN 80-7165-257-1

Mitruškova, M., Pospíšil, R. 2008: Efektívnosť aplikácie biokalu v produkčnom procese poľných plodín. Dizertačná doktorandská práca. Nitra: SPU, 2008, s.145.

Poděkování

Táto práca vznikla s podporou projektu RE PowerEU a ÚOP MPRV SR „Vypracovanie plánov monitoringu vplyvu redukcie odpadovej biomasy a zvyškov z poľnohospodárskej pôdy na zásoby uhlíka v pôde pre účely plnenia Smernice EÚ č. 2018/2001“.

Kontakt: Ing. Jozef Čunderlík, PhD.
NPPC – VÚRV - Ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva Banská Bystrica
Mládežnícka 36, 974 21 Banská Bystrica
jozef.cunderlik@nppc.sk

Využití domácích genetických zdrojů rostlin pro ozelenění tramvajových točen a tratí

The use of domestic genetic resources of plants for the greening of tram turning points and tracks

Frei I.[1], Vymyslický T.[1], Raab S.[2], Hlásná-Čepková P.[3], Holubec V.[3], Podrábský M.[4], Vítámvás P.[3]

[1]*Zemědělský výzkum, spol. s r. o.*

[2]*OSEVA, vývoj a výzkum, spol. s r. o.*

[3]*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.*

[4]*Seed-Service, spol. s r. o.*

Abstrakt:
Za více než 30 let sběrové činnosti bylo na území České republiky shromážděno více než 5 500 položek trav, jetelovin a bylin, které byly následně zhodnoceny, přemnoženy a uloženy v národní genové bance. V rámci řešení projektu „Genofondy pro města a krajinu“, byly tyto položky použity do osivových směsí vhodných pro ozelenění měst, dopravních staveb, tramvajových a vlakových tratí. Bylo sestaveno devět speciálních směsí využívajících odolné genotypy, které byly od roku 2021 hodnoceny v poloprovozních pokusech na tramvajových tratích v Praze. V městských podmínkách se dokázal uplatnit pouze omezený počet druhů rostlin. Trávy se mnohem lépe vyrovnávají s těmito extrémními podmínkami než jeteloviny a byliny, které jsou ale cenné díky své estetické hodnotě a jako zdroj potravy pro hmyz a opylovače.
Klíčová slova: městské prostředí, osivové směsi, plané ekotypy, odolnost, biodiverzita

Abstract:
In more than 30 years of collecting activities, more than 5 500 accessions of grasses, legumes and herbs were collected in the territory of the Czech Republic. These materials were subsequently evaluated, regenerated and stored in the national gene bank. In the frame of the project "Gene pools for cities and landscapes", these items were used in seed mixes suitable for greening cities, transport structures, tram and train lines. Nine special mixtures using resistant genotypes were compiled and they were evaluated in pilot-plan trials on tram lines in Prague from 2021. Only a limited number of plant species could be used in urban conditions. Grasses cope much better with these extreme conditions than legumes and herbs. But both legumes and herbs are valuable for their aesthetic value and as a food source for insects and pollinators.
Keywords: urban environment, seed mixtures, wild ecotypes, resistance, biodiversity

Úvod

Tramvajové tratě jsou běžnou součástí městské infrastruktury. Ozeleňují se zejména z důvodu ekologického a ekonomického, a nemalou mírou mají efekt i na městský design. Jejich zatravnění je pozitivním faktorem pro jejich přijetí občany města. Tyto aspekty jsou zvláště důležité ve vysoce uzavřených městských oblastech. Vhodně sestavené osivové směsi pro zakládání druhově bohatých porostů nesou důležité mimoprodukční funkce jako druhová diverzita, estetická funkce, ochrana proti erozi, zadržování vody, snižovaní hluku, prašnosti, teploty, poskytování potravních zdrojů pro hmyz a opylovatele (Hitchmough et al., 2017; Vymyslický et al., 2023). Zelené tramvajové pásy a druhově bohaté travní porosty na tramvajových obratištích mají významné pozitivní dopady pro město. Mezi hlavní pozitiva patří lepší hospodaření s vodou (snížení množství odtoku vody), veřejné zdraví (snížení hlučnosti, prašnosti) a zlepšení kvality života (estetická hodnota). K vedlejším přínosům a pozitivním dopadům patří adaptace na měnící se klima (zmírnění městského tepelného ostrova), snížení povrchového odtoku srážek při přívalových deštích, obohacování biodiverzity v městském

prostoru (jsou zdrojem potravy pro hmyz a ptáky) a jsou výzvou pro městské plánování a urbanizmus (zvyšování počtu zelených ploch) (Southon et al., 2017).
Koncem 20. století prošlo ozeleňovaní tramvajových tratí postupným vývojem. Nejprve byly využívány přímé výsevy travních směsí přímo do kolejišť, potom se přešlo na předpěstované travní koberce, které byly složeny z několika mála běžně dostupných druhů trav a jejich odrůd. Tyto travní koberce ovšem vyžadovaly intenzivní péči (závlahu, hnojení, častou seč). Postupně byla snaha o extenzifikaci údržby těchto porostů. V současné době jsou čím dál častěji používány téměř bezúdržbové extenzivně založené porosty s rozchodníkem (Praha, Plzeň, Ostrava, Košice, Drážďany, Berlín, Brusel) nebo odolné více druhové travní koberce (Brno, Berlín) (Jakubcová et Horváthová, 2020; Sikorski et al., 2018).
V České republice není v současné době dostupné dostatečně široké spektrum odrůd pro ozeleňování, které by byly vhodné pro speciální podmínky měst, pro rekultivace v extrémním prostředí a pro měnící se klimatické podmínky. S ohledem na klimatické změny je potřeba zlepšovat zhoršující se životní podmínky ve městech. Zde se otevírá prostor pro využití domácích genofondů s vysokou odolností vůči extrémním podmínkám městského klimatu, a zároveň se širokou ekologickou amplitudou. Z více jak 5 000 položek planých druhů rostlin získaných za 30 let v rámci sběrových aktivit v ČR, pořádaných v rámci Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů rostlin a agro-biodiverzity, byly vybrány nejperspektivnější traviny, jeteloviny a další dvouděložné druhy rostlin pro sestavení speciálních osivových směsí s výrazným zastoupením planých ekotypů, vhodných k zatravňování tramvajových tratí a točen. Tyto směsi jsou složeny z trav, jetelovin a bylin, které splňují požadované podmínky a mohou tak díky své odolnosti vůči extrémním podmínkám prostředí výrazně prodloužit životnost travního porostu. Jejich předností je také široká ekologická amplituda, tj. lze je použít jak na osluněné, tak i na stinné lokality.
V rámci projektu SS01020023 „Genofondy pro města a krajinu“, který byl řešen za finanční podpory Technologické agentury ČR v rámci Programu Prostředí pro život, byly na vybraných úsecích tramvajových tratí a na vybraných tramvajových točnách v Praze zkoušeny tyto speciální osivové směsi.

Materiál a metody

Při sestavování směsí byl brán ohled na jednotlivé vybrané charakteristiky použitých druhů, jako jsou zápoj porostu, rychlost růstu, vytrvalost, odolnost k suchu, odolnost k vyššímu počtu sečí, odolnost k zasolení apod. Výběr komponent do jednotlivých směsí probíhal ve spolupráci pracovišť Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko (jeteloviny a ostatní dvouděložné druhy) a OSEVA vývoj a výzkum, spol. s r. o. Zubří (traviny). Ekotypy rostlin získané ze sběrových expedic a individuálních sběrů byly vybírány na základě lokality sběru, ekologické charakteristiky stanoviště, odolnosti k abiotickým stresorům, zdravotního stavu apod. Při výběru planých materiálů byl využíván systém ekologických indikačních hodnot jednotlivých druhů rostlin pro světlo, vlhkost, živiny a salinitu. Byly preferovány ekotypy z ekologicky extrémních stanovišť. Celkem bylo vybráno 51 genotypů trav (z toho 21 odrůd a 31 genotypů planého původu), 13 odrůd jetelovin a 30 druhů bylin. V případě odrůd byl kladen důraz na to, aby materiály pocházely od českých firem a měly český původ. U všech genotypů byla v laboratorních podmínkách stanovena klíčivost a hmotnost tisíce semen (HTS). Na základě těchto údajů byly sestaveny speciální osivové směsi.

Osivové směsi pro tramvajové točny

Na území hlavního města Praha byly na každé ze třech zvolených lokalit (Spořilov, Řepy, Hostivař) vysety a sledovány tři speciální osivové směsi určené pro tramvajové točny. Byla to a) Květnatá směs nižšího vzrůstu, b) Květnatá směs vyššího vzrůstu a c) Květnatá směs do sucha. Tyto směsi byly v září roku 2020 vysety na plochy, které byly před výsevem chemicky

ošetřeny totálním herbicidem a zrotavátorovány. Třikrát za vegetační období, a to v dubnu, červnu a září v letech 2021, 2022 a 2023 byly zapisovány všechny rostlinné druhy rostoucí na experimentálních plochách. Dále byly vždy v červnu a v září zapisovány na ploše 4x4 metru fytocenologické snímky za použití Braun-Blanquetovy stupnice.

Osivové směsi pro tramvajové trati

Pro těleso tramvajové trati na ulici Bělohorská byly sestaveny tři speciální směsi pro plné slunce: 1) Směs na osluněné stanoviště s travami, 2) Směs na osluněné stanoviště s travami a jetelovinami a 3) Směs na osluněné stanoviště s travami, jetelovinami a bylinami. Dále byly sestaveny a použity tři směsi pro zastíněné lokality: 1) Směs pro stinné stanoviště s travami, 2) Směs pro stinné stanoviště s travami a jetelovinami a 3) Směs pro stinné stanoviště s travami, jetelovinami a bylinami. Tyto směsi pro použití na tramvajových tratí byly vysety pro předpěstování travních koberců na lokalitě Zubří v září roku 2020. Zde byly pěstovány po dobu jednoho roku, a v listopadu roku 2021 byly tyto směsi sloupnuty, převezeny do Prahy a položeny na dva úseky tramvajové trati v ulici Bělohorská v Praze. Botanický monitoring těchto porostů probíhal ve stejných termínech jako v případě tramvajových točen, pomocí stejné metodiky byly rovněž zaznamenávány fytocenologické snímky.

Statistické vyhodnocení získaných dat

Fytocenologické snímky byly zapsány do databáze v programu Turboveg for Windows (Hennekens et Schaminée, 2001). Statistické analýzy byly provedeny v programu Canoco 5 (ter Braak et Šmilauer, 2012). Jako vysvětlující proměnné byly použity Ellenbergovy indikační hodnoty (EIH). Pro vyhodnocení dat z tramvajových točen byla použita přímá ordinace CCA (Canonical Correspondence Analysis), založená na primárních datech, vyjadřující unimodální odpověď druhů. Pro vyhodnocení dat z tramvajových tratí na ulici Bělohorská byla použita přímá ordinace RDA (Redundancy analysis) se statisticky významnými proměnnými prostředí.

Výsledky

Tramvajové točny

Na tramvajových točnách bylo za celou dobu řešení projektu zapsáno celkem 54 fytocenologických snímků, a bylo nalezeno celkem 126 druhů rostlin.

Pro statistické vyhodnocení dat shromážděných z tramvajových točen byla zvolena přímá ordinace CCA za použití Bonferroniho korekce. Vybráno bylo pět proměnných z významných faktorů prostředí získaných z průměrných EIH a to: světlo/Light, kontinentalita/Continentality, živiny/Nutrients, půdní reakce/Soil reaction ($p = 0{,}001$) a vlhkost/Moisture ($p=0{,}004$), které byly průkazně korelovány s prvními dvěma ordinačními osami a jejich hodnota průkaznosti byla vysoká (Tab. 2). Jako málo průkazný byl stanoven faktor prostředí teplota/Temperature ($p = 0{,}014$). Proto tento faktor nebyl do diagramu zahrnut. Celková variabilita (Tabulka 3) vysvětlená první osou je 8,43 %, první čtyři ordinační osy vysvětlily 21,79 %. První (hlavní) ordinační osa představuje gradient mezi plochami, které výrazně ovlivňuje zejména pH půdy a světlo. Druhá osa představuje kontrast mezi na živiny bohatými plochami a kontinentalitou.

Tabulka 2: *Výsledky CCA ordinačního diagramu – druhy a faktory prostředí (EIH)*

Analysis 'Interactive-forward-selection', step 'Forward Selection'					
Forward Selection Results:					
Name	Explains %	Contribution %	pseudo-F	**P**	P(adj)
Light	7.4	28.6	4.4	**0.001**	0.006
Nutrients	5.5	21.5	3.4	**0.001**	0.006
Cont	4.4	17.3	2.8	**0,001**	0,006
Reaction	3.5	13.7	2.3	**0.001**	0.006
Moisture	2.5	9.9	1.7	**0.004**	0.024
Temperature	2.3	9.0	1.6	0.014	0.084

Tabulka 3: *Výsledky CCA ordinačního diagramu – vysvětlení celkové variability a vysvětlujících proměnných*

Analysis 'Interactive-forward-selection', step 'Forward Selection' **Method: CCA**				
Total variation is 3.03126, explanatory variables account for 23.4% (adjusted explained variation is 15.9%)				
Summary Table:				
Statistic	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4
Eigenvalues	0.2557	0.1702	0.1358	0.0989
Explained variation (cumulative)	**8.43**	14.05	18.53	**21.79**
Pseudo-canonical correlation	0.8959	0.9044	0.8547	0.8428
Explained fitted variation (cumulative)	36.09	60.11	79.27	93.23

Ordinační diagramy CCA (Diagram 2 a Diagram 2) zobrazují jednotlivé lokality (tramvajové točny) a druhy bylinné vegetace, které nejvíce korelovaly s vybranými proměnnými prostředí. Z diagramu je patrné, že čím byla plocha na živiny bohatší a víc osluněná, tím víc se objevovaly druhy plevelné nebo ruderální jako například *Lamium purpureum*, *Euphorbia helioscopia*, *Stellaria media*, *Sinapis arvensis*, *Viola arvensis*, *Cerastium glomeratum*, *Arabidopsis thaliana*, *Papaver rhoeas*, *Veronica persica*, *Veronica arvensis* (druhy se vyskytující ve všech směsích na všech lokalitách v prvním roce po výsevu). S klesající vlhkostí půdy a s klesajícím výskytem živin v půdě přibývaly v plochách druhy jako *Potentilla argentea*, *Dianthus carthusianorum*, *Lotus corniculatus*, *Phleum bertolonii*. Na plochách se snižujícím se osluněním porostu a na půdách na živiny chudších s pH půdy mírně kyselé až mírně bazické převažovaly druhy jako *Galium album*, *Onobrychis viciifolia*, *Carduus acanthoides*, *Artemisia absinthium*.

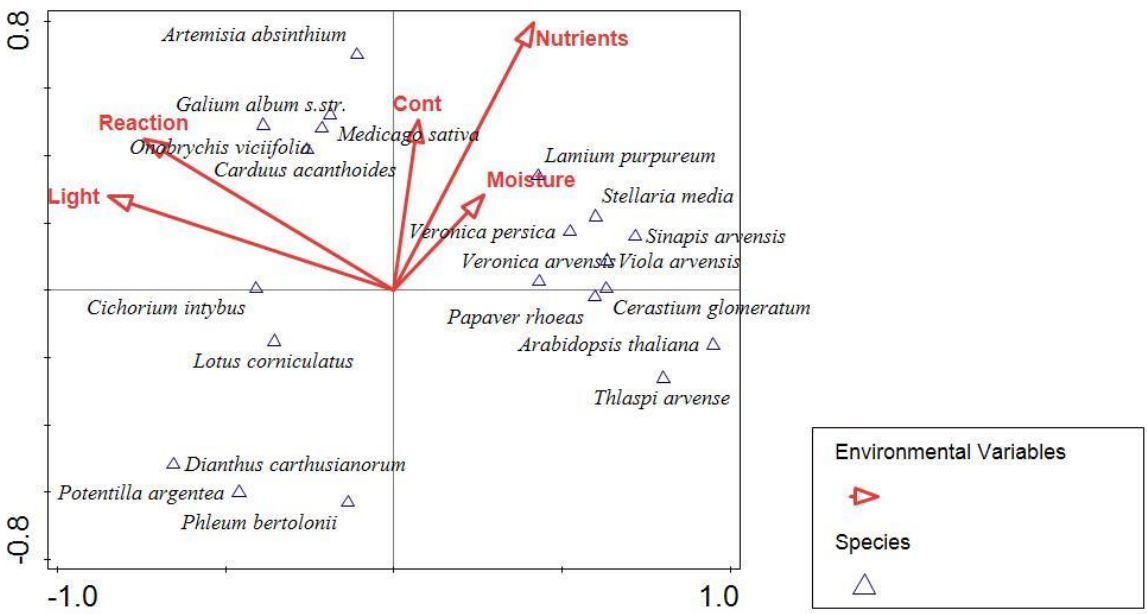


Diagram 1: Ordinační diagram CCA s Monte-Carlo testem s 999 permutacemi vyjadřující vztah mezi druhy a vybranými proměnnými prostředí (enviromental variables) za použití Bonferroniho korekce. Zvoleno bylo 20 nejlépe vyhovujících druhů, které mají nejvyšší fit k vysvětlujícím proměnným.

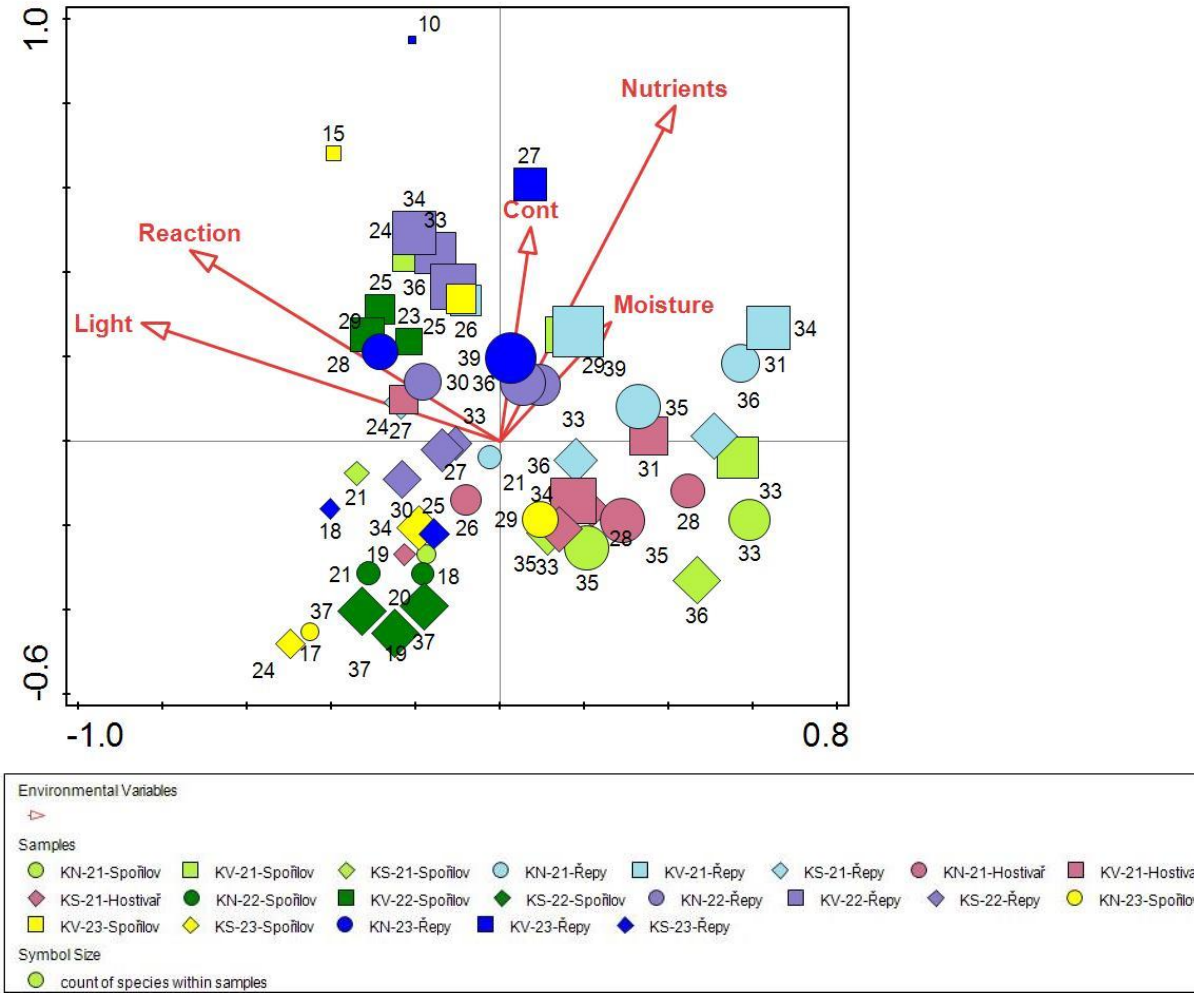


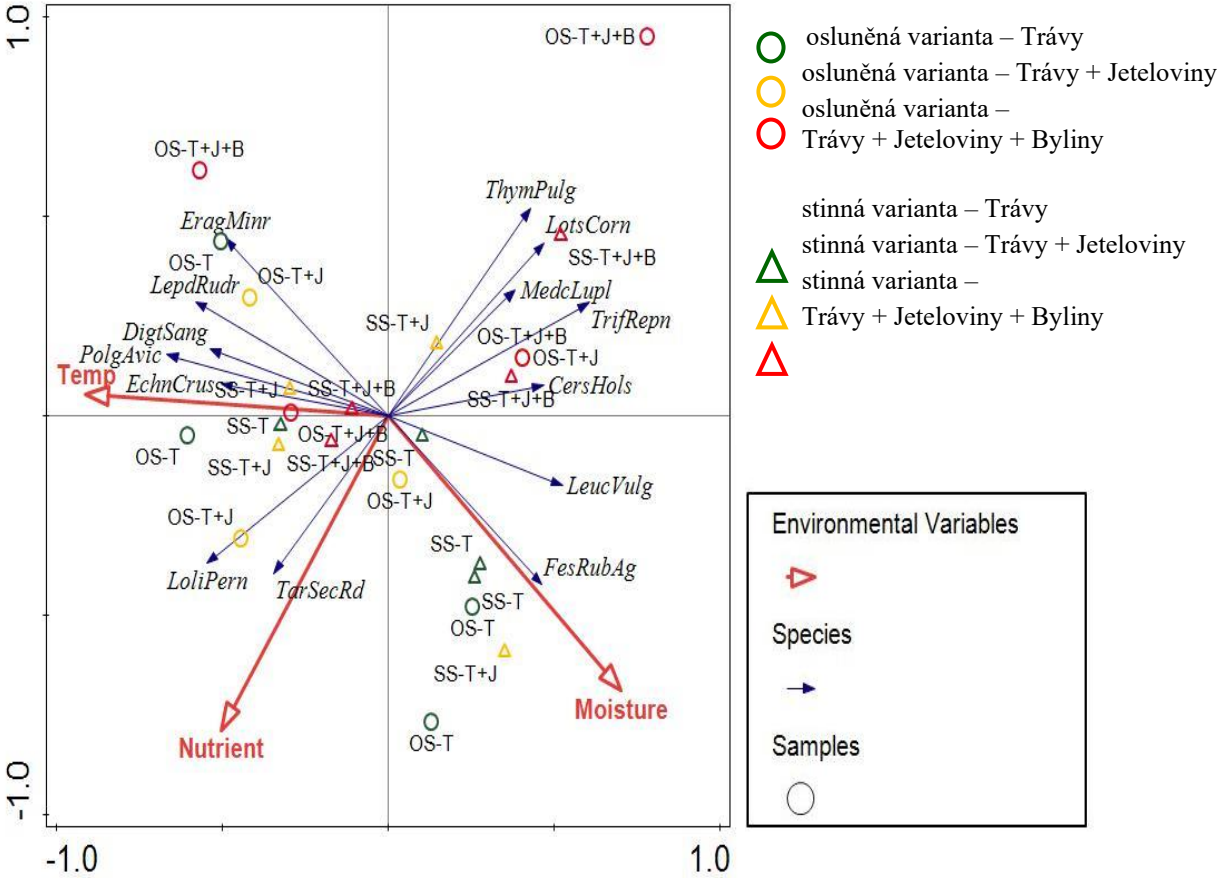
Diagram 2: Ordinační diagram CCA za použití Bonferroniho korekce a Monte-Carlo permutačním testem

Tramvajové trati

Na tramvajových tratích bylo za celou dobu řešení projektu zapsáno celkem 36 fytocenologických snímků, a celkem bylo nalezeno pouze 56 druhů rostlin.

Pro statistické vyhodnocení sesbíraných dat z osluněné a stinné varianty z tramvajového pásu na ul. Bělohorská byla zvolena přímá ordinace RDA (Diagram 3). Vybrány byly tři nejvíc významné proměnné z faktorů prostředí získané z průměrných EIH a to: vlhkost/Moisture, živiny/Nutrient a teplota/Temp, které nejlíp vysvětlují variabilitu dat. Do ordinačního diagramu bylo promítnuto pouze 15 nejlépe odpovídajících druhů: *Cerastium holosteoides*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galii*, *Eragrostis minor*, *Festuca rubra* agg., *Chenopodium album*, *Lepidium ruderale*, *Leucanthemum vulgare*, *Lolium perenne*, *Lotus corniculatus*, *Medicago lupulina*, *Polygonum aviculare*, *Taraxacum* sect. *Ruderalia*, *Thymus pulegioides* a *Trifolium repens*.

Diagram 3: Ordinační diagram zobrazující změnu v druhovém složení jednotlivých směsí a variant pomocí RDA analýzy.



V osluněné variantě byl ve všech třech vysetých variantách („trávy“, „trávy + jeteloviny“ a „trávy + jeteloviny + byliny“) z vysetých druhů trav zaznamenán výskyt druhů *Festuca rubra*, *Lolium perenne* a *Poa pratensis*. Tyto druhy zároveň představovaly dominanty porostu ve všech variantách. Ve variantě „trávy + jeteloviny“ byl z vysetých jetelovin zaznamenán výskyt druhů *Lotus corniculatus*, *Medicago lupulina* a *Trifolium repens*. Jejich výskyt byl zaznamenán i ve třetí variantě „trávy + jeteloviny + byliny“. Mimo zmíněných druhů byl ve třetí variantě zaznamenán i výskyt vysetých bylin *Achillea millefolium* agg, *Plantago lanceolata* a s malou pokryvností i druh *Thymus pulegioides*. Porosty výrazně reagovaly na období s nedostatkem srážek letní dormancí, čím vznikal mezerovitý porost. S tím souvisel zvýšený výskyt ruderálních druhů jako *Polygonum aviculare*, *Portulaca oleracea* a *Digitaria sanguinalis*.

Ve stinné variantě byl ve všech třech vysetých variantách („trávy“, „trávy + jeteloviny“ a „trávy + jeteloviny + byliny“) z vysetých druhů trav zaznamenán výskyt druhů *Festuca rubra, Lolium perenne* a *Poa pratensis*. Tyto druhy zároveň představovaly dominanty porostu ve všech variantách. Ve variantě „trávy + jeteloviny“ byl z vysetých jetelovin zaznamenán výskyt jen druhu *Trifolium repens*, který byl zaznamenán i ve třetí variantě „trávy + jeteloviny + byliny“. Mimo zmíněných druhů byl ve třetí variantě zaznamenán z vysetých bylin výskyt druhů *Achillea millefolium* agg., *Echium vulgare, Matricaria chamomilla* a *Plantago lanceolata* a navíc ještě jeden druh trávy *Agrostis capillaris*. Na experimentálních plochách byl zároveň zaznamenán kromě vysetých druhů i zvýšený výskyt ruderálních druhů jako *Digitaria sanguinalis, Poa annua, Echinochloa crus-galli* a *Polygonum aviculare*. Letní období sucha zvládly porosty ve stinné variantě v přijatelné kondici a porosty neupadly do letní dormance.
V roce 2023 v osluněné části ve všech třech variantách dominovaly vyseté trávy, a to zejména *Lolium perenne,* a pak v menší míře druhy *Festuca rubra* agg. a *Poa pratensis*, které vytvářely převážně zapojený porost. Z vysetých jetelovin a bylin byl zaznamenán pouze druh *Trifolium repens*. Porosty byly místy na okrajích vlivem vyšších teplot od silnice a betonových obrubníků mezerovité s nízkým zápojem. Na těchto volných plochách byly zaznamenány druhy ruderální a plevelné, jako *Lepidium ruderale, Polygonum aviculare, Tripleurospermum inodorum, Chenoposium album*. Ve stinné části u všech třech vysetých variant dominovaly vyseté trávy *Lolium perenne, Festuca rubra* agg. a *Poa pratensis*. Z vysetých bylin a trav byly zaznamenány druhy *Plantago lanceolata* a *Trifolium repens*. Porosty byly zapojené, s nízkým výskytem ruderálních a plevelných druhů (*Polygonum aviculare, Echium vulgare, Lepidium ruderale, Taraxacum* sect. *Ruderalia, Digitaria sanguinalis* atd.) zejména na okrajích, které byly více vystaveny působením sucha a vysokých teplot.

Diskuze

Na tramvajových točnách bylo nalezeno více než 120 druhů rostlin, z nichž většinu ale tvořily druhy, které na lokality nebyly vysety. Zde se ukázal významný vliv půdní semenné banky na vývoj vegetace nově osetých ploch. Tento zdroj životaschopných semen může být překvapivě bohatý (Thompon et al., 2005). Dále je patrný také vliv přísunu semen z okolní vegetace, zejména těch druhů, jejichž semena se šíří větrem. Tyto poznatky jsou v souladu s obecně známými trendy, které se uplatňují při výsevech osivových směsí a v ekologii obnovy (Mathey et al., 2018). Na základě statistických analýz lze konstatovat, že čím byla experimentální plocha na živiny bohatší a víc osluněná, tím víc se objevovaly druhy plevelné nebo ruderální. To je běžně pozorovaný jev během sukcese rostlinných společenstev (Guo et al., 2018). S klesajícím obsahem živin a vlhkostí v půdě přibývaly v plochách druhy suchých stepních trávníků. Většina z těchto druhů však byla obsažena v našich osivových směsích. Jako statisticky významný vliv se projevil vliv kontinentality. Interpretovat její vliv na tak malém území je docela složité, nicméně může to způsobeno tím, že kontinentální druhy spíše rostou na suchých a výhřevných stanovištích, zatímco oceánické druhy rostou spíše na vlhčích místech (Brandes 1995).

Na tramvajových tratích bylo za celou dobu řešení projektu nalezeno pouze něco málo přes 50 druhů rostlin. Nejčastěji se však vyskytovaly vyseté komerční kultivary druhů *Festuca rubra, Lolium perenne* a *Poa pratensis*. Tyto druhy zároveň představovaly dominanty porostu ve všech variantách. Uplatnění planých ekotypů bylo tedy na osluněných plochách pouze omezené, lepších výsledků dosáhly tyto ekotypy na stinných plochách, kde jsou přijatelnější klimatické podmínky (Fekete et al., 2024). I zde však stejně jako u tramvajových točen tvořily nadpoloviční většinu nalezených druhů rostliny, které nebyly na plochy vysety. V tomto případě však je role půdní semenné banky pouze omezená, a daleko větší roli zde hraje přísun semen z okolí.

Klimatické podmínky tramvajových tratí jsou opravdu extrémní, z tohoto důvodu upadá hodně vysetých nebo předpěstovaných druhů do letní dormance. Tento jev je ve městském prostředí běžnou reakcí na extrémní stresové podmínky (Brandes 1995). Pokud je sucho dlouhodobé a intenzivní, masivní odumírání vede ve svém důsledku k postupnému nárůstu ruderálních a někdy i invazních druhů rostlin. Ve svém důsledku tak mohou mít takovéto porosty negativní vliv na biodiverzitu ve městském prostředí (Southon et al., 2017). Proto je potřeba věnovat těmto porostům náležitou pozornost a péči, v obdobích dlouhodobého a intenzivního sucha je vhodné porosty kosit velmi omezeně a alespoň občas je zavlažovat, protože mělký a snadno vysýchavý půdní profil tramvajové trati nemůže zajistit dostatek vody pro přežití ani suchovzdorným druhům rostlin (Hitchmough et al., 2008).

Závěr

Na základě výsledků vyhodnocení dat získaných z tramvajových točen lze konstatovat, že druhovou variabilitu porostů nejvíce ovlivňovala půdní reakce, světlo a množství živin v půdě. První rok po výsevu převládaly druhy jednoleté a ruderální, které vyklíčily z půdní semenné banky. Tyto druhy vyžadují přímé oslunění a mají zvýšené nároky na živiny. V dalších letech se vyseté porosty začaly stabilizovat, postupně převládaly druhy vyseté, porosty byly zapojené a výskyt ruderálních druhů byl nízký. U směsí pro stinné a osluněné úseky tramvajových tratí lze konstatovat, že porosty ve stinné a v osluněné části zatravněné tramvajové trati jsou kvůli omezené hloubce, která je dostupná pro kořenový systém, silně ovlivňovány průběhem počasí a frekvencí sečí v daném roce. Druhové složení těchto porostů nejvíce ovlivňovala teplota a vlhkost půdy, a také množství živin v půdě. U osluněné varianty převládalo několik málo vysetých druhů trav, které jsou na živiny nenáročné, zároveň ale snáší oslunění a sucho. Ve stinné variantě se postupně vytvořily zapojené porosty z vysetých druhů trav s významnou příměsí bylin a jetelovin. Zároveň byl v této variantě výrazně nižší výskyt ruderálních a invazních druhů rostlin než v osluněné variantě. Na základě našich výsledků je patrné, že je potřeba věnovat těmto porostům náležitou pozornost a péči. V obdobích vysokých teplot a intenzivního sucha je potřeba kosit porosty pouze velmi omezeně a na vyšší výšku, alespoň občas je zavlažovat, protože mělký a snadno vysýchavý půdní profil tramvajové trati nemůže zajistit dostatek vody pro přežití ani suchovzdorným druhům rostlin. Také je potřeba věnovat pozornost výskytu invazních, expanzivních, alergenních nebo jedovatých druhů rostlin.

Literatura:

Brandes D. (1995): The flora of old town centres in Europe. Urban ecology as the basis of urban planning, 49–58.

Fekete R., Valkó O., Fischer L. K., Deák B. & Klaus V. H. (2024): Ecological restoration and biodiversity-friendly management of urban grasslands – A global review on the current state of knowledge. Journal of Environmental Management, 368, 122220.

Guo P., Yu F., Ren Y., Liu D., Li J., Ouyang Z. & Wang X. (2018): Response of ruderal species diversity to an urban environment: implications for conservation and management. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(12): 2832.

Hennekens S. M., Schaminée J. H. (2001): TURBOVEG, a comprehensive data base management system for vegetation data. J Veg Sci 12(4): 589–591

Hitchmough J., Wagner M., Ahmad H. (2017): Extended flowering and high weed resistance within two layer designed perennial “prairie-meadow” vegetation. Urban Forestry & Urban Greening, 27: 117–126.

Jakubcová E. & Horváthová E. (2020): Costs and benefits of green tramway tracks. Scientia Agriculturae Bohemica, 51(4): 99–106.

Mathey J., Arndt T., Banse J., Rink D. (2018): Public perception of spontaneous vegetation on brownfields in urban areas – Results from surveys in Dresden and Leipzig (Germany). Urban Forestry & Urban Greening, 29: 384–392.

Sikorski P., Wińska-Krysiak M., Chormański J., Krauze K., Kubacka K. & Sikorska D. (2018): Low-maintenance green tram tracks as a socially acceptable solution to greening a city. Urban Forestry & Urban Greening, 35: 148–164.

Southon G. E., Jorgensen A., Dunnett N., Hoyle H., Evans K. L. (2017): Biodiverse perennial meadows have aesthetic value and increase residents' perceptions of site quality in urban green-space. Landscape and Urban Planning, 158: 105–118.

Ter Braak C. J. F., Šmilauer P. (2012): Canoco Reference Manual and User's Guide: Software of Ordination (version 5.0). MicrocomputerPower, Ithaca.

Thompson K., Colsell S., Carpenter J., Smith R. M., Warren P. H. & Gaston K. J. (2005): Urban domestic gardens (VII): a preliminary survey of soil seed banks. Seed Science Research, 15(2): 133–141.

Vymyslický T., Frei I., Raab S. (2023). Využití domácích genetických zdrojů trav, jetelovin a bylin pro ozeleňování tramvajových tratí. Pícninářské a trávnikářské listy, XXIX: 18–21.

Poděkování

Tento výzkum byl realizován za finanční podpory Technologické agentury České republiky v rámci projektu ´Genofondy pro města a krajinu´ SS01020023.

Kontakt:

Ing. Ivana Frei, Ph.D.
Zemědělský výzkum, spol. s r. o.
Zahradní 1
664 41 Troubsko
Česká republika
Tel.: 547138806, e-mail: frei@vupt.cz

Výzkum trav pro výrobu energie v souvislosti s nepotravinářským využitím půdy

Research on grasses for energy production in relation to non-food land use

Frydrych J.[1], Bradáčová L.[1], Raab S.[1], Macháč R.[1], Gerndtová I.[2], Andert D.[2], Jezerská L.[3]

[1]*OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří*

[2]*Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Praha*

[3]*VŠB – Technická univerzita Ostrava, CEET, Centrum ENET, Ostrava*

Abstrakt

V první fázi výzkumu byly stanoveny nejvhodnější druhy trav pro energetické využití jako náhrada ladem ležící půdy tzv. spontánních úhorů v oblasti Beskyd. Ladem ležící půda byla posouzena z hlediska botanického, krajinářského a ekonomického. Výnos sušiny u jílku mnohokvětého pěstovaného na semeno s využitím vymlácené slámy pro energetické využití v letech 2016–2017 dosahoval průměru 9,07 t.ha^{-1}, u kostřavy červené v roce 2023 a 2024 3,32 t.ha^{-1}. Produkce sušiny u ladem ležící půdy dosahovala průměru v letech 2019–2020 1,13 t.ha^{-1}. Výnos sušiny byl přepočten na energetickou produkci sledovaných trav z jednoho hektaru. Energetická produkce u jílku mnohokvětého dosahovala 139 GJ.ha^{-1}, kostřavy červené 57 GJ.ha^{-1} a ladem ležící půdy 18 GJ.ha^{-1}. Výzkum travní biomasy využitelné pro energetické účely je v současnosti předmětem nového projektu VŠB – Technické univerzity Ostravy, Centra energetických a environmentálních technologií (CEET) a firmy OSEVA vývoj a výzkum s.r.o se sídlem v Zubří s názvem Výzkum procesů zahrnujících výrobu biopelet.

Klíčová slova: trávy, výzkum, energetické využití, spontánní úhory, biopeleta

Abstract

In the first phase of research the most suitable types of grasses for energy use were identified as a replacement for the fallow land of the so-called spontaneous fallows in the Beskydy area. The fallow land was assessed in terms of botanical, landscaping and economic. The dry matter yield for the multi-flowered seed hilt using beaten straw for energy use in 2016–2017 averaged 9.07 t.ha^{-1}, and 3.32 t.ha^{-1} for the ryegrass in 2023 and 2024. Fallow-land dry matter production averaged 1.13 t.ha^{-1} in 2019–2020. The yield on dry matter has been converted into the energy production of monitored grasses from one hectare. The energy production of reygrass reached 139 GJ.ha^{-1}, the red fescue 57 GJ.ha^{-1} and the fallow soil 18 GJ.ha^{-1}. Research on grass biomass usable for energy purposes is currently the subject of a new project by VŠB – Technical University of Ostrava, Centre of Energy and Environmental Technologies (CEET) and OSEVA Development and Research s.r.o., based in Zubří, entitled Research on processes involving the production of biopellets.

Keywords: grasses, research, energy use, spontaneous fallows, biopellets

Úvod

Hledání alternativních zdrojů energie nabývá v současnosti na významu. Energetické rostliny jsou součástí obnovitelných zdrojů energie v České republice. Změna způsobu a využití zemědělského půdního fondu se odráží v nárůstu podílu plochy trvalých travních porostů (TTP), ta se za posledních 25 let zvýšila cca o 20 %, ale stavy skotu se za tuto dobu snížily o více jak 60 %. V posledních letech klesá možnost využití travní produkce pro krmení, stává se tak v podmínkách ČR stále více odpadní biomasou a vyvolává potřebu racionálního řešení jejího využití. Vývoj výměry TTP a stavů skotu uvádí tabulka 1.

Tab. 1: Vývoj výměry TTP a stavů skotu v ČR

Rok	Výměra TTP	Stavy skotu	Výměra TTP na 1 ks skotu
	(tis. ha)	(tis. ks)	(ha.ks^{-1})
1992	768	2 512	0,30
2002	839	1 520	0,55
2007	932	1 391	0,67
2012	968	1 353	0,72
2017	978	1 421	0,69
2022	1 002	1 406	0,71

Zpracováno podle podkladů ČSÚ Praha

Trávy představují významný zdroj biomasy využitelné pro energetické účely. Výzkumem a využitím trav pro energetické účely se zabývala OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří ve spolupráci s Vysokou školou báňskou – Technickou univerzitou v Ostravě a Výzkumným ústavem zemědělské techniky, v.v.i. Praha. Výzkum trav probíhal se zaměřením na využití travní biomasy pro spalování a výrobu bioplynu. V České republice je téměř více jak 970 000 hektarů trvalých travních porostů. Jak uvádí Hrabě (2009), ekosystém mimoprodukčního zatravnění zaujímá v České republice 170 899 ha. Produkce travní hmoty u sportovních trávníků se pohybuje na úrovni 6–9 t.ha^{-1} za rok, užitkové trávníky vyprodukují 5,5–14 t.ha^{-1} zelené hmoty ročně. Produkce travní hmoty ze zemědělských i nezemědělských ploch představuje významný zdroj biomasy, kterou lze vhodným způsobem ekonomicky zhodnotit. Vytrvalé trávy jsou odolné vůči abiotickým stresům a spolu s jejich mnohostranným využitím, včetně krmiva a vlákniny, výroby obnovitelné energie a příspěvku k ekosystémovým službám, mohou být předními bylinnými rostlinami vhodnými pro multifunkční zemědělství. Vytrvalé energetické trávy mají schopnost růst v proměnlivých prostředích, včetně okrajových oblastí, čímž se minimalizuje konkurence s potravinářskými plodinami na účinky nepřímé změny ve využívání půdy (iLUC efekt) (Scordia et al. 2019).

Od poloviny 80. let 20. století v USA a Evropě vzrůstá zájem o využití víceletých trav jako energetických plodin. Charakteristiky, které činí vytrvalé trávy atraktivní pro produkci biomasy, jsou jejich vysoký výnosový potenciál, vysoký obsah ligninu a celulózy v jejich biomase a jejich obecně očekávaný pozitivní dopad na životní prostředí (Lewandovski et al. 2003). Zároveň trávy jsou vhodnou vstupní surovinou pro pelety, které jsou využitelné jak pro tepelné, tak energetické aplikace a jsou ve shodě s politikou snižování emisí skleníkových plynů (Whittaker et al. 2017). Peletizovaná biomasa potom produkuje méně emisních částic ve srovnání se svou původní formou (Shen et al. 2012).

V počátcích výzkumu zdrojů trav bylo navrženo 12 travních druhů vhodných pro energetické účely, které byly hodnoceny z hlediska výnosu zelené hmoty, suché hmoty a obsahu sušiny. Pro porovnání travních druhů byly provedeny rozbory na spalné teplo a výhřevnost. Sledované travní druhy byly pěstovány v podmínkách lokality v Zubří (Frydrych 2020). Počet sledovaných trav vhodných pro energetické využití byl rozšířen o jílek mnohokvětý a kostřavu červenou.

Současně byla na výnos sušiny a energetické ukazatele posouzena i ladem ležící půda, tzv. spontánní úhory, kde souvislý pokryv tvoří především plevelné rostliny. Úhory, které jsou zdrojem plevelů, téměř vždy sousedí se zemědělsky využívanou lokalitou. Spontánní úhory lze nahradit trávou pěstovanou na semeno s využitím travní slámy pro energetické účely (Frydrych 2001).

Nové směry ve výzkumu a využití travní biomasy pro energetické účely v současnosti v České republice

Výroba energie z travní biomasy vytváří nové možnosti a rozšiřuje široký potenciál trav z hlediska jejich zemědělského i nezemědělského využití o oblast fytoenergetiky pro zemědělskou praxi. Travní biomasa má energetický potenciál a lze ji uplatnit jako udržitelný obnovitelný zdroj energie. Praktické použití má však několik technických problémů jako například nerovnoměrná morfologická struktura, nižší obsah ligninu, nízká objemová hmotnost a průměrný obsah energie ve srovnání s jinými palivy. Výzkumné aktivity v této oblasti jsou značné. Je však zřejmá nutnost zvýšit dynamiku komerčního peletizačního procesu, s cílem využití různorodých vstupních kombinací. V roce 2024 byl podpořen projekt Vysoké školy báňské – Technické univerzity v Ostravě, Centra energetických a environmentálních technologií (CEET) a firmy OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří s názvem Výzkum procesů zahrnujících výrobu biopelet. Výsledkem projektu bude nová experimentální laboratorní technologická linka pro peletizaci různých materiálů a směsí. Kvalita připravených palivových pelet z energeticky využitelných trav bude vzájemně porovnávána a vyhodnocována.

Materiál a metody

V první fázi výzkumu byly trávy pěstovány na pokusných parcelách ve dvou variantách bez hnojení a s minimální dávkou živin v minerálních hnojivech (50 kg N, 36 kg P_2O_5 a 40 kg K_2O na 1 ha). Každá parcela o velikosti 10 m^2 pro variantu hnojenou i nehnojenou je čtyřikrát opakována. Počet řádků parcely je 9, šířka mezi řádky 14 cm. Před zasetím bylo předzásobně hnojeno 44 kg N, 48 kg P_2O_5 a 48 kg K_2O na hektar. Trávy byly v průběhu užitkových let hnojeny dávkou 50 kg dusíku na hektar. U této travní fytomasy bylo stanoveno spalné teplo a výhřevnost.

Palivoenergetické vlastnosti rostlinných materiálů byly zjišťovány v souladu s platnými technickými standardy. Jedná se o stanovení spalného tepla a výhřevnosti dle ČSN EN ISO 18125. Dále byl ve vzorcích fytomasy stanoven obsah vody (dle ČSN EN ISO 18134).

Pro produkci suché hmoty a sušiny využitelné pro energetické účely, stanovení spalného tepla a výhřevnosti byly dále vybrány jílek mnohokvětý a kostřava červená. Tyto travní druhy byly pěstovány klasickou technologií se sklizní na semeno. Zároveň byla sledována produkce sušiny a energetické ukazatele na ladem ležící půdě na třech lokalitách v oblasti Beskyd. U těchto travních porostů bylo provedeno botanické hodnocení.

Spontánní úhory byly hodnoceny v letech 2019 a 2020 z hlediska výnosu sušiny a energie. Byl vyhodnocen botanický snímek úhorů na bývalých loukách. V roce 2016 a 2017 byla stanovena produkce sušiny a energie jílku mnohokvětého a v roce 2023 a 2024 u kostřavy červené. Trávy pěstované na semeno jsou perspektivní pro pěstování na ladem ležící půdě s využitím sklizeného semene pro tržní účely a slámy pro spalování.

Zastoupení rostlinných druhů bylo hodnoceno metodou Braun–Blanqueta. Metoda Braun–Blanqueta je založena na odhadu celkové pokryvnosti rostlinných druhů a jednotlivých stupňů podle kombinované stupnice pokryvnosti a početnosti (vyšší stupně vyjadřují pokryvnost, nižší početnost druhových populací s nízkou pokryvností) podle Braun-Blanqueta.

<u>Braun-Blanquetova stupnice pokryvnosti a početnosti:</u>

5 – pokryvnost 75–100 %; **4** – pokryvnost 50–75 %; **3** – pokryvnost 25–50 %;
2 – pokryvnost 5–25 %; **1** – pokryvnost pod 5 %, dosti hojně až roztroušeně;
+ – pokryvnost zanedbatelná, roztroušeně; **r** – ojediněle.

Výsledky a diskuse

Výzkum trav pro výrobu energie jako náhrada ladem ležící půdy

Skupina 12 trav, která byla navržena v počátcích výzkumu, s výsledky spalného tepla a výhřevnosti v uvádí tabulka 2. Hodnoty výsledků jsou průměrem za 3 užitkové roky.

Tab. 2: Výsledky stanovení spalného tepla a výhřevnosti

Tráva	Spalné teplo ($kJ.kg^{-1}$)	Výhřevnost ($kJ.kg^{-1}$)		
		průměr	max.	min.
Bezkolenec rákosovitý	18 233	17 625	17 890	17 357
Kostřava rákosovitá	18 849	18 245	18 554	17 984
Lesknice kanárská	17 979	17 361	18 005	17 065
Lesknice rákosovitá	18 120	17 504	17 905	17 085
Ovsík vyvýšený	17 596	16 987	17 356	16 354
Ozdobnice čínská	19 669	19 066	19 186	18 830
Proso seté	19 321	18 716	19 078	18 510
Psineček veliký	19 270	18 661	18 825	18 432
Rákos obecný	18 469	17 852	18 154	17 542
Sveřep bezbranný	18 577	17 968	18 205	17 654
Sveřep vzpřímený	18 516	17 890	18 056	17 468
Třtina křovištní	18 895	18 281	18 745	17 958

Výsledky spalného tepla a výhřevnosti byly zjišťovány laboratorně, hodnoty jsou přepočteny na 100% sušinu. Na základě výsledků produkce sušiny a výhřevnosti byly stanoveny tři druhy trav nejvhodnější pro energetické využití: psineček veliký Rožnovský, kostřava rákosovitá Kora a ovsík vyvýšený Rožnovský. Výnos u těchto tří travních druhů se pohyboval v průměru 8–10 t/ha sušiny ve hnojené variantě.

Výhřevnost suchých dřevních peletek činí 18 $MJ.kg^{-1}$ a výhřevnost psinečku velikého kolem 16,8 $MJ.kg^{-1}$ (Andert 2007). Frydrych (2009) uvádí výhřevnost lučního sena kolem 15,88 $MJ.kg^{-1}$. Strašil (2010) uvádí průměrnou energetickou hodnotu sušiny fytomasy kostřavy rákosovité 17,77 $MJ.kg^{-1}$. Spalné teplo je silně závislé na vlhkosti fytomasy. Při vlhkosti 50 % je pouze 9,5 $MJ.kg^{-1}$. Při vlhkosti do 20 % vhodné pro přímé spalování ve většině kotlů s nižším výkonem je spalné teplo kostřavy 14,7 $MJ.kg^{-1}$.

Zajonc, Frydrych (2012) uvádí hodnoty výhřevnosti travin ve vysušeném stavu v rozmezí 15 489–18 068 $kJ.kg^{-1}$. Průměrná hodnota výhřevnosti energetických travin ve vysušeném stavu byla 16 167 $kJ.kg^{-1}$. Při odběru vzorků se hodnoty vlhkosti travin pohybovaly v rozmezí 32,31–54,84 %. Průměrná hodnota vlhkosti travin byla 48,9 %. Hodnoty výhřevnosti čerstvě odebraných vzorků travin se pohybovaly v rozmezí 5 855–11 487 $kJ.kg^{-1}$. Průměrná hodnota výhřevnosti čerstvě odebraných travin byla 7 173 $kJ.kg^{-1}$. Vlhkost travin snižuje jejich výhřevnost, proto je třeba traviny vysušit.

Výzkum energetických trav probíhal dále s cílem stanovení doby nejvhodnější pro sklizeň energetické trávy. Optimální doba pro pěstování trav pro energetické účely na stanovišti v našich podmínkách je 4–5 roků. U porostů víceletých trav je prvním užitkovým rokem rok následující po jejich založení. Víceleté trávy metají a tvoří plnohodnotný porost až v následujícím roce po zasetí, tj. v prvním užitkovém roce. Dalším rokem je druhý užitkový rok. Ekonomika pěstování trav pro energetické účely vychází z předpokladu využití navržených travních druhů. Nejvhodnějším obdobím sklizně trav pro energetické účely je sklizeň trav na

semeno s využitím vymlácené slámy, která je vhodná pro energetické využití spalováním. Ve spolupráci firmy OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. s Vysokou školou báňskou – technickou univerzitou v Ostravě a Výzkumným ústavem zemědělské techniky, v.v.i. Praha bylo ověřeno spalování travní biomasy v energetických zařízeních. Výzkum energetického využití trav má zázemí především v severských zemích a Dánsku. Pěstování trav pro energetické účely doporučuje Hovi (1994), jenž ji dává přednost před rychlerostoucími dřevinami z důvodu výrazně nižších nákladů na založení porostu. V průběhu výzkumu spalování travní biomasy v energetických zařízeních probíhaly zkoušky spalování v malých (tepelný výkon do 50 kW) i velkých kotlích (500 kW–2 MGW) tepelného výkonu. Pro zkoušky v malých kotlích byla travní biomasa lisována do pelet a briket. Pro zkoušení ve velkých kotlích byla využita travní biomasa lisovaná do balíků. Travní biomasa, zejména psinečku velikého Rožnovského, byla získána od pěstitelů této trávy na semeno.

Monokultury trav – travní druhy pěstované se sklizní na semeno

Výnos travní slámy závisí na druhu pěstované trávy. Příkladem rozdílných hektarových výnosů travní slámy je jílek mnohokvětý Lolita a kostřava červená Zulu. Výsledky výnosů slámy, sušiny a propočet energetické produkce jsou uvedeny v tab. 3 a 4.

Tab. 3: Výsledky výnosu slámy a sušiny jílku mnohokvětého s využitím pro energetické účely v roce 2016 a 2017

Rok sklizně	Travní druh	Výnos slámy	Výnos sušiny	Spalné teplo	Energetická produkce
		($t.ha^{-1}$)	($t.ha^{-1}$)	($GJ.t^{-1}$)	($GJ.ha^{-1}$)
2016	Jílek mnohokvětý Lolita	10,97	9,98	18,1	152,9
2017	Jílek mnohokvětý Lolita	9,60	8,16	14,8	125,1
Průměr	Jílek mnohokvětý Lolita	10,29	9,07	16,5	139,0

Tab. 4: Výsledky výnosu slámy a sušiny kostřavy červené s využitím pro energetické účely v roce 2023 a 2024

Rok sklizně	Travní druh	Výnos slámy	Výnos sušiny	Spalné teplo sušiny	Energetická produkce
		($t.ha^{-1}$)	($t.ha^{-1}$)	($GJ.t^{-1}$)	($GJ.ha^{-1}$)
2023	Kostřava červená Zulu	3,55	3,29	18,45	58
2024	Kostřava červená Zulu	3,65	3,34	17,58	56
Průměr	Kostřava červená Zulu	3,60	3,32	18,02	57

Výnosy sušiny jílku mnohokvětého Lolita jsou 3krát vyšší než kostřavy červené Zulu. Hodnoty výnosů se následně promítnou v energetické produkci na hektar pěstované trávy.

Výzkum spontánních úhorů

V letech 2019–2020 probíhal výzkum spontánních úhorů, především na bývalých loukách, se zaměřením na produkci biomasy a energie (viz tab. 5). Součástí sledování úhorů bylo botanické vyhodnocení porostů.

Tab. 5: Průměrný výnos sušiny a energie v letech 2019–2020 na ladem ležící půdě

Varianta úhoru	Druh úhoru	Výnos sušiny ($kg.ha^{-1}$)	Spalné teplo ($GJ.ha^{-1}$)	Energetická produkce ($GJ.ha^{-1}$)
1	Nevyužívaná louka Štěrk	1 214	23,2	19,7
2	Nevyužívaná louka Bečviska	1 083	20,2	17,1
3	Nevyužívaná louka Poruba	1 105	20,1	17,5
Průměrný výnos	Ladem ležící louka	1 134	21,2	18,0

Výnosy sušiny travních porostů u spontánních úhorů jsou velmi nízké. Na sledovaných lokalitách vykazovaly průměrný výnos sušiny do 1,2 t/ha. Energetická produkce spontánních úhorů je 3 až 7krát nižší než u trav pěstovaných na semeno.

Botanické hodnocení porostů úhorů

Zastoupení rostlinných druhů na spontánních úhorech bylo vyhodnoceno v roce 2020 podle metody Braun–Blanqueta.

Lokalita Štěrk – nejvyšší zastoupení ostružiník prodloužený 20 %, kopřiva dvoudomá 10 % šťovík kadeřavý 5 %, pcháč rolní 1 %, pýr plazivý 1 %;

Lokalita Bečviska – nejvyšší zastoupení pýr plazivý 50 %, kopřiva dvoudomá 30 %, pcháč zelinný 10 %, třtina křovištní 10 %, lesknice rákosovitá 10 %;

Lokalita Poruba – nejvyšší zastoupení kopřiva dvoudomá 70 %, ostružiník prodloužený 40 %, srha laločnatá 10 %, pýr plazivý 1 %, šťovík kyselý 1 %.

Na hodnocených úhorech byly zastoupeny plevele, které patří k nebezpečným z hlediska zemědělského hospodaření. Zejména šťovíky, pýr plazivý a pcháče. Úhory, které jsou zdrojem těchto plevelů, téměř vždy sousedí se zemědělsky využívanou lokalitou. Negativním jevem je i dispozice určitého kumulování chorob a škůdců. Plevele způsobují problémy v agrotechnice pěstovaných kulturních plodin. Rozšíření plevelů v zemědělské výrobě následně vyžaduje zvýšené náklady vkládané do ochrany pěstovaných plodin.

Výnos sušiny a energie u trav pěstovaných na semeno s využitím vymlácené slámy pro spalování je několikanásobně vyšší (3 až 7krát) oproti spontánním úhorům. U trav pěstovaných na semeno představuje v současnosti ekonomický přínos zejména tržní zhodnocení travního semene a využití vymlácené slámy pro energetické účely. Současně je třeba eliminovat spontánní úhory zejména z jejich negativního hlediska krajinářského, zemědělského a ekonomického. V podmínkách severní Moravy mají pěstitelé trav na semeno a zemědělci možnost po vymlácení porostů trav dodat přímo vymlácenou slámu firmě ke zpracování na pelety.

Závěr

V první etapě výzkumu byly trávy navržené pro energetické využití posouzeny z hlediska výnosu sušiny a rozborů na stanovení spalného tepla a výhřevnosti. Na základě výsledků byly vybrány jako nejvhodnějších psineček veliký Rožnovský, kostřava rákosovitá Kora a ovsík vyvýšený Rožnovský. Nejvyšší průměrnou výhřevnost vykazoval psineček 18 661 $kJ.kg^{-1}$. Výnos u těchto tří travních druhů se pohyboval v průměru 8–10 $t.ha^{-1}$ sušiny. Ladem ležící půda byla posouzena z hlediska botanického, krajinářského a ekonomického.

V letech 2019–2020 proběhlo hodnocení spontánních úhorů z hlediska výnosu sušiny a energie na vybraných lokalitách. U úhorů bylo provedeno botanické hodnocení porostů, které vyhodnotilo zastoupení plevelných rostlin. Výnosy sušiny u spontánních úhorů byly velice nízké v průměru 1,13 $t.ha^{-1}$. K porovnání výnosů sušiny a energetické produkce z hektaru porostu byly hodnoceny jílek mnohokvětý Lolita (výnos sušiny u jílku mnohokvětého pěstovaného na semeno s využitím vymlácené slámy pro energetické využití v letech 2016–

2017 dosahoval průměru 9,07 t.ha^{-1} a u kostřavy červené Zulu v roce 2023 a 2024 3,32 t.ha^{-1}. Výnos sušiny byl přepočten na energetickou produkci sledovaných trav z jednoho hektaru. Jílek mnohokvětý 139 GJ.ha^{-1}, kostřava červená 57 GJ.ha^{-1} a ladem ležící půda 18 GJ.ha^{-1}.

Produkce energie jílku mnohokvětého je až 7krát vyšší oproti produkci sušiny spontánních úhorů na ladem ležící půdě. Výnos cíleně pěstovaných travních druhů byl 3 až 9krát vyšší oproti výnosu ze spontánních úhorů. Spontánní úhory, tzv. ladem ležící půda, je nutné eliminovat a snižovat jejich plochu v naší krajině, zejména z hlediska negativních jevů z pohledu krajinářského a zemědělského hospodaření. Pěstování trav pro energetické účely se jeví nejvhodnější v systému sklizně trav pro semeno a využití travní slámy pro spalování.

Výzkum travní biomasy využitelné pro energetické účely je v současnosti předmětem nového projektu VŠB – Technické univerzity Ostravy, Centra energetických a environmentálních technologií (CEET) a firmy OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří s názvem Výzkum procesů zahrnujících výrobu biopelet.

Literatura

Andert, D., Frydrych, J., Juchelková, D., Gerndtová, I. (2007) Energetické využití trav a travních směsí. In Příručka pro pěstování, spalování a využití trav při výrobě bioplynu. Vydavatel Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Praha, 110 s. ISBN: 978-80-86884-35-6.

Frydrych, J. (1998) Spontánní úhory v marginální oblasti Beskyd. Úroda 8: 10–11.

Frydrych, J., Cagaš, B., Macháč, J. (2001) Energetické využití některých travních druhů. Praha, ÚZPI 2002. Zemědělské informace 3, č. 23, 35 s.

Frydrych, J., Gerndtová, I., Andert, D. Volková, P. (2020) Výsledky výzkumu energetických trav pro zemědělskou praxi. Pícninářské listy, Zubří: SPTJS, Olomouc: Vydavatelství AGRIPRINT s.r.o., r. 26, s. 38–42. ISBN 978-80-87091-87-6.

Frydrych, J, Andert, D, Juchelková, D. (2009) Výnosový potenciál trav vhodných k energetickému využití. Agritech Science, [online], www.agritech.cz, č. 2, článek 2, s. 1–5. ISSN 1802-8942.

Hovi, M. (1994) Perspektiven von Energiegräsern in der Republik Estland. REUR Technical Series 38, Sbor. FAO, Weihestephan, s. 58–61.

Hrabě, F. et al. (2009) Trávníky pro zahradu, krajinu a sport. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Ing. Petr Baštan, 335 s. ISBN 978-80-87091-07-4.

Ibler, Z., Ibler, Z. (2003) Možnosti rozvoje výroby tepla a elektřiny využitím biomasy v regionech a městech ČR. Online. Dostupné z: https://www.mpo-efekt.cz/dokument/biomasa.pdf. [cit. 2024-05-06].

Lewandowski, I. et al. (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. Biomass and bioenergy, 25 (4): 335–361.

Scordia, D., Cosentino, S. L. (2019) Perennial energy grasses: Resilient crops in a changing European agriculture. Agriculture, 9 (8): 169.

Shen, G., Tao, S., Wei, S., Zhang, Y., Wang, R., Wang, B., Li, W., Shen, H., Huang, Y., Chen, Y., Chen, H., Yang, Y., Wang, W., Wei, W., Wang, X., Liu, W., Wang, X., Simonich, S.L.M. (2012) Reductions in emissions of carbonaceous particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons from combustion of biomass pellets in comparison with raw fuel burning, Environmental Science and Technology, 46 (11): 6409–6416, DOI: 10.1021/es300369d.

Strašil, Z., Weger, J. (2010) Studium kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea* Schreb.) pěstované pro energetické využití. Acta Pruhoniciana, 96: 19–26.

Whittaker, C., Shield, I. (2017) Factors affecting wood, energy grass and straw pellet durability – A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 71: 1–11, ISSN 1364-0321, https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.119.

Zajonc, O., Frydrych, J. (2012) Mechanické vlastnosti pelet z energetických travin. [The

mechanical properties of pellets from energy grasses] AgritechScience [online], roč. 6, č. 2, s. 1–4. Dostupné z: http://www.agritech.cz/clanky/2012-2-9.pdf. ISSN 1802-8942.

Poděkování
Publikace je realizována na základě podpory projektu č. SS07020061 „Výzkum procesů zahrnujících výrobu biopelet“, který je spolufinancován se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu Prostředí pro život. Tento projekt je financován v rámci Národního plánu obnovy z evropského Nástroje pro oživení a odolnost. Současně je publikace realizována na základě finanční podpory MZe v rámci institucionální podpory na rozvoj výzkumné organizace OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří MZe RO-1823. Článek vznikl v rámci institucionální podpory MZe ČR na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚZT, v.v.i. RO0624.

Kontakt:
Ing. Jan Frydrych
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.
Hamerská 698, Zubří 756 54
frydrych@oseva.cz

Nové herbicidy do množitelských porostů pohanky seté

New herbicide products for breeding stands of buckwheat

Frydrych J., Bradáčová L., Raab S.

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří

Abstrakt

Cílem výzkumu bylo ověřit selektivitu pohanky seté (*Fagopyrum esculentum*) vůči vybraným herbicidům a jejich využití pro zemědělskou praxi. Hlavními výsledky výzkumu v letech 2022 a 2023 bylo ověření selektivity pohanky vůči herbicidům Select Super a Gramin. V roce 2024 na základě výsledků výzkumu v letech 2022–2023 byl podán Návrh na rozšíření povolení na menšinová použití přípravku na ochranu rostlin do množitelských porostů pohanky seté u herbicidních přípravků Select Super a Gramin. Výzkum se zaměřením na pěstitelskou technologii pohanky s testováním nových herbicidů a kvalitativních parametrů zrna bude pokračovat i v následujících letech. V roce 2022 bylo povoleno rozšíření menšinového použití přípravků Fusilade Forte 150 EC v dávce 0,8–1 l.ha^{-1} proti jednoletým jednoděložným plevelům a přípravku Agil 100 EC v dávce 0,5–0,8 l.ha^{-1} proti jednoletým lipnicovitým plevelům a v dávce 1,2 l.ha^{-1} proti pýru plazivému do množitelských porostů pohanky seté.

Klíčová slova: pohanka setá, herbicidy, fytotoxicita, výzkum, menšinové použití přípravků

Abstract

The aim of the research was to verify the selectivity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) against selected herbicides and their use for agricultural practice. The main results of the research in the years 2022 and 2023 were the verification of the selectivity of buckwheat against the herbicides Select Super a Gramin. In 2024, based on the research results in 2022–2023, a proposal was submitted to extend the use of the herbicides Select Super and Gramin in buckwheat. Research focusing on buckwheat growing technology with testing of new herbicides and grain quality parameters will continue in the coming years. In 2022, an extension of the minor use of Fusilade Forte 150 EC at a dose of 0.8–1 l.ha^{-1} was permitted against annual monocotyledon weeds and Agil 100 EC at a dose of 0.5–0.8 l.ha^{-1} against annual graminoid weeds and 1.2 l.ha^{-1} against *Agropyron repens* in breeding stands of buckwheat sown.

Key words: buckwheat, herbicides, phytotoxicity, research, minority use of preparations

Úvod

V roce 1993 bylo založeno celosvětově asi 2 milióny hektarů pohanky seté (Myers & Meinke, 1994). Mezi největší světové producenty pohanky můžeme zařadit Spojené státy americké, Čínu, Rusko, Ukrajinu a Francii (AG Canada Outlok, 2007; Alberta Agriculture and Food, 2001). Zvýšený zájem spotřebitelů v České republice o pohanku setou (*Fagopyrum esculentum*) se začíná projevovat od 90. let minulého století, zejména pro její nezastupitelnou úlohu v racionální výživě člověka a bezlepkové dietě. Zájem o pohanku v současnosti je motivován zejména důvody zdravotními, dietou, která posiluje imunitní systém člověka, zvyšuje pružnost cévních stěn, reguluje krevní srážlivost a obsah cholesterolu v krvi. Produkce pohanky se v posledních letech celosvětově zvýšila v důsledku poptávky na trhu se zdravou výživou po mouce, krupici a pohankovém medu (Myers & Meinke, 1994).

Tradičně u nás převažují názory, že pohanka je málo náročná na agroekologické podmínky. Dnes ovšem chceme využít pohanku jako perspektivní tržní plodinu k přímému potravinářskému využití s dobrou jakostí (Petr & al., 1997). Z toho vyplývá, že musíme vytvořit co nejlepší podmínky pro pohanku tak, aby byl využit co nejlépe její výnosový potenciál a dosaženo požadovaného výnosu a kvality produkce zrna. Pohanka má však všestranné využití nejen jako obilnina, ale i jako zelenina a krmivo pro hospodářská zvířata. Lze ji využít na zelené hnojení či k získávání fytofarmak. Pohanka je plodina vhodná pro pěstování v ekologickém

zemědělství a díky svým vynikajícím nutričním vlastnostem je považována za jednu z nejhodnotnějších plodin (Janovská & al., 2008).
Pohanka v současnosti začíná nabývat na významu jako minoritní plodina a výzkum selektivity pohanky vůči herbicidům významným způsobem inovuje pěstitelskou technologii této plodiny. V oblasti pěstitelských technologií ve všech plodinách je ochrana proti plevelům rozhodující opatření, které směřuje k zajištění odpovídajícího výnosu, ale také potřebné kvality produkce. Plevele negativně ovlivňují růst pohanky zejména v období vzcházení, tvorby pravých listů až do začátku tvorby poupat, a to zejména jednoděložné a dvouděložné plevele. Současně plevele způsobují snížení výnosu osiva pohanky. Z těchto důvodů je menšinové povolení herbicidů do pohanky velmi důležité. Pěstovaná plocha pohanky seté v ČR není ČSÚ evidována a její odhadovaná pěstovaná plocha se dle různých zdrojů pohybuje zpravidla kolem 3 000 ha. Pohanka setá tedy výměrou, na které je pěstována, splňuje kritérium menšinového použití dle § 37 odstavec 2a Zákona o rostlinolékařské péči.
Sama pohanka je dobrou předplodinou pro obilniny, dokonce s fytosanitárním účinkem. Jen u prosovitých obilnin se zjistilo, že výluhy z posklizňových zbytků pohanky inhibovaly klíčení a vzcházení. Ovšem po pohance je velmi dlouhé meziporostní období, takže se může tento vliv zmírnit (Petr & al., 1997). Regulace plevelů prostřednictvím kořenových exudátů potlačujících růst je slibnou alternativou k herbicidům. Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum*) je známá pro potlačení plevele a regulaci druhu laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus*), kterou pravděpodobně částečně způsobují alelopatické kořenové exsudáty (Gfeller & al., 2018).
Pohanka má dobrou konkurenční schopnost vůči plevelům za tepla a vlhka. Mechanická regulace plevelů se provádí plečkováním širokořádkového porostu nebo vláčením plecími branami s vysokými prutovými nebo plochými prsty. Úzké i široké řádky lze odplevelit vláčením porostu plecími branami ve fázi 3–5 listů, tj. do výšky 20–25 cm vždy v odpoledních hodinách, kdy jsou rostliny pružné a nelámou se (Janovská & al., 2008). Plevele škodí v pohance seté zejména po založení porostu, vedle pozdních jarních plevelů je to v současnosti zejména ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli*), která může výrazným způsobem oslabit porost pohanky před zapojením porostu (Frydrych & al., 2016).
Současný zvýšený zájem pěstitelů a spotřebitelů o pohanku vytváří nové možnosti pro výzkumnou práci. Zejména je třeba řešit otázku pěstitelské technologie pohanky a zaměřit se na její slabá místa. Cílem nového výzkumu bude inovace pěstitelské technologie pohanky v současné zemědělské praxi a zvýšení kvality výsledného produktu zrna, který bude odpovídat vysokou jakostí potravinářským parametrům. Jedním ze slabých článků pěstitelských postupů je chemická ochrana proti plevelům (Frydrych & al., 2016).
V roce 2022 a 2023 byl v pohance seté testován přípravek Select Super (účinná látka clethodim) v dávce 0,8 $l.ha^{-1}$ a 1,6 $l.ha^{-1}$. Select Super je selektivní graminicid, specialista na trávy v řepce, cukrovce a máku setém. Jeho účinnou látkou je clethodim, který patří do chemické skupiny cyklohexanonů. Přípravek účinkuje systemicky, jeho účinná látka proniká přes listy vzešlých plevelů v průběhu 1 hodiny po aplikaci a meristematickým pletivem je rozváděna do celé rostliny. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy mastných kyselin, tím dochází ke zničení pletiv u citlivých trav. Zasažené citlivé plevele přestávají růst a postupně odumírají. Dostatečná teplota a vzdušná vlhkost podporují účinnost přípravku. Herbicidní účinek se podle povětrnostních podmínek projeví za 7–10 dní po aplikaci Selectu Super je díky obsahu výjimečné účinné látky ze skupiny tzv. DIMů přetrvávající inovací a vyčnívajícím produktem mezi graminicidy do řepky, cukrovky, máku setého a dalších plodin. V dávce 0,8 $l.ha^{-1}$ přípravek působí proti jednoletým lipnicovitým plevelům, v dávce 2 $l.ha^{-1}$ proti pýru plazivému.
V roce 2022 a 2023 byl v pohance seté testován přípravek Gramin (účinná látka quizalofop-P-ethyl). Gramin je postemergentní systémový graminicid ve formě emulgovatelného koncentrátu pro spolehlivé hubení pýru plazivého, jednoletých trav a výdrolu obilovin v řepce, cukrovce,

krmné řepě, bramborách, slunečnici, bobu, hrachu, fazolích, čočce, sóji, lnu, brukvovité zelenině, cibuli, česneku, rajčatech, paprice, mrkvi, petrželi, červené řepě salátové, kmínu, víceletých pícninách, révě vinné, ovocných sadech a lesním hospodářství. Přípravek se aplikuje postemergentně, výhradně v době růstového optima plevelných trav, kdy většina z nich je ve fázi od 2 listů do konce odnožování. Aplikujte v období aktivního růstu trav. Dávku přípravku je třeba volit podle vývojových fází plevelných trav, ve fázi odnožování je třeba zvolit vyšší hranici dávkování. V dávce 1–1,5 $l.ha^{-1}$ přípravek působí proti jednoletým lipnicovitým plevelům, v dávce 2 $l.ha^{-1}$ proti pýru plazivému.
Jako standardní byl použit v pohance seté v letech 2022 a 2023 přípravek Agil 100 EC. Agil 100 EC je celosvětově intenzivně používán v mnoha zemích proti řadě významných druhů plevelných trav. V doporučených dávkách Agil 100 EC poskytuje vynikající a úplnou postemergentní ochranu proti širokému spektru jednoletých i vytrvalých trav. Agil 100 EC byl u pohanky seté testován v dávkách 1,2 $l.ha^{-1}$ a 2,4 $l.ha^{-1}$v letech 2017 a 2020 bez pozorovaných projevů fytotoxicity a vlivu na výnos semen, hmotnost tisíce semen a klíčivost.

Materiál a metody

Pro ověřování biologické účinnosti herbicidů v pohance seté (*Fagopyrum esculentum*) ve dvouletém období let 2022 a 2023 byly založeny maloparcelové pokusy o velikosti parcely 10 m^2. Výsevek pohanky činil 100 $kg.ha^{-1}$, pro testování byla vybrána odrůda pohanky seté 'Zita'. Pohanka byla vyseta do bloku se čtyřmi opakováními pro každý přípravek. V roce 2022 a 2023 byl testován přípravek Select Super (účinná látka clethodim 120 $g.l^{-1}$) v dávce 0,8 $l.ha^{-1}$ a 1,6 $l.ha^{-1}$, přípravek Gramin (účinná látka quizalofop-P-ethyl 50 $g.l^{-1}$) v dávce 1 $l.ha^{-1}$ a 2 $l.ha^{-1}$ a přípravek Agil 100 EC (účinná látka propaquizafop l00 $g.l^{-1}$) v dávce 1 $l.ha^{-1}$ a 2 $l.ha^{-1}$. Do pokusu byla zařazena i neošetřená kontrola.
Přípravky byly aplikovány v roce 2019 a 2020 v růstové fázi pohanky, kdy rostliny měly 3–5 listů. Dávka vody pro přípravky činila 200 $l.ha^{-1}$. Pozorování bylo provedeno ve dvou termínech, 14 dnů po aplikaci a měsíc po aplikaci přípravků, a zjišťovala se vizuální fytotoxicita po aplikaci. Fytotoxicita byla hodnocena vizuálně v % odhadem se zaměřením na chlorózu a deformaci rostlin. Výsledky byly zpracovány metodou ANOVA.

Výsledky a diskuze

Průměrné hodnoty odhadované fytotoxicity u rostlin po aplikaci přípravků jsou uvedeny v tabulce 1. Fytotoxicita u zkoušených přípravků v rozsahu 5–7 % se projevovala mírným zežloutnutím listů, pokroucením listů a nižším vzrůstem rostlin čtrnáct dnů po aplikaci u všech ošetřených variant. Měsíc po aplikaci přípravků příznaky fytotoxicity u nižších i vyšších dávek vymizely. Hodnocení fytotoxicity proběhlo v obou letech 2022 a 2023 v druhé polovině června a v první polovině měsíce července.

Tab. 1: Testované přípravky a dávky použité v roce 2022 a 2023 (odhady v %)

Varianta	Přípravek	Dávka ($l.ha^{-1}$)	Fytotoxicita za 14 dnů průměr dvou let	Fytotoxicita za 28 dnů průměr dvou let
1	Kontrola			
2	Select Super	0,8	5	0
3	Select Super	1,6	7	0
4	Gramin	1,0	5	0
5	Gramin	2,0	7	0
6	Agil 100 EC	1,0	5	0
7	Agil 100 EC	2,0	7	0

Autoři Petr & al. (1997) udávají na základě zkušeností pěstitelů v praxi v minulosti možnost použití přípravků pro postemergentní aplikace do pohanky Racer 25 EC 1,2–2 $kg.ha^{-1}$, Ramrod 5 $kg.ha^{-1}$, Synbetan D 3 $l.ha^{-1}$ + Citowet 0,1 $l.ha^{-1}$, Kusagard 1,5–2 $kg.ha^{-1}$ a Fusilade 1,5–2 $l.ha^{-1}$. Tyto přípravky rovněž nebyly registrovány v metodikách pro zemědělskou praxi. Frydrych (2016) uvádí ověření selektivity přípravků Garland Forte – ú. l. propachizafop – 100 $g.l^{-1}$ a Fusilade Forte 150 EC – ú. l. fluazifop-P-butyl – 150 $g.l^{-1}$ v roce 2015 a 2016 v pohance seté. Fytotoxicita u přípravků Garland Forte a Fusilade Forte 150 EC v pohance nebyla prokázána ve sledovaných znacích výnosu zrna a hmotnosti tisíce semen v obou letech 2015 a 2016.
Frydrych (2021) uvádí na základě výsledků výzkumu nebyla prokázána fytotoxicita po použití přípravků Betanal Tandem v dávce 0,5 $l.ha^{-1}$ a 1 $l.ha^{-1}$, Stemat Super v dávce 0,5 $l.ha^{-1}$ a 1 $l.ha^{-1}$, Lontrel 300 v dávce 0,4 $l.ha^{-1}$ a 0,8 $l.ha^{-1}$ v pohance seté v roce 2019 a 2020 u sledovaných znaků výnos zrna, hmotnost tisíce semen a klíčivost. Příznaky fytotoxicity na rostlinách vymizely měsíc po aplikaci přípravků. V roce 2021 na základě výsledků výzkumu v letech 2017–2020 byl podán Návrh na rozšíření povolení na menšinová použití přípravku na ochranu rostlin do množitelských porostů pohanky seté u herbicidních přípravků Betanal Tandem, Stemat Super, Lontrel 300, Agil 100 EC a Fusilade Forte 150 EC.
V roce 2022 bylo povoleno rozšíření menšinového použití přípravků Fusilade Forte 150 EC v dávce 0,8–1 $l.ha^{-1}$ proti jednoletým jednoděložným plevelům a přípravku Agil 100 EC v dávce 0,5–0,8 $l.ha^{-1}$ proti jednoletým lipnicovitým plevelům a v dávce 1,2 $l.ha^{-1}$ proti pýru. Aplikace přípravků Select Super, Gramin a Agil 100 EC v letech 2022 a 2023 proběhla v obou letech v první polovině měsíce června.
Dále byly stanoveny následující kvalitativní parametry osiva pohanky: výnos zrna, hmotnost tisíce semen a klíčivost. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v Tabulkách 2-4.

Tab. 2: Výnos semene v roce 2022 a 2023 ($kg.ha^{-1}$)

2022	Průměr ($kg.ha^{-1}$)	% na kontrolu	Průkaznost na kontrolu	2023	Průměr ($kg.ha^{-1}$)	% na kontrolu	Průkaznost na kontrolu
1	1351	100,00		**1**	1497	100,00	
2	1457	107,83	++	**2**	1620	108,25	++
3	1450	107,27	++	**3**	1609	107,52	++
4	1461	108,12	++	**4**	1623	108,44	++
5	1453	107,55	++	**5**	1615	107,90	++
6	1463	108,29	++	**6**	1632	109,02	++
7	1460	108,03	++	**7**	1626	108,65	++

Anova: md 0,05: 4,451 md 0,01: 6,56 Anova: md 0,05: 3,828 md 0,01: 5,208
++ vysoce průkazný rozdíl + průkazný rozdíl

U přípravků Select Super, Gramin a Agil 100 EC se neprojevila fytotoxicita ve sledovaném znaku výnos semene (Tab. 2). Nejnižší výnos v roce 2022 a 2023 byl zaznamenán u neošetřené kontroly.

Tab. 3: Hmotnost tisíce semen v roce 2022 a 2023 (g)

2019	Průměr (g)	% na kontrolu	Průkaznost na kontrolu	2020	Průměr (g)	% na kontrolu	Průkaznost na kontrolu
1	25,30	100,00		**1**	26,64	100,00	
2	26,29	103,90	++	**2**	27,70	103,97	++
3	26,11	103,19	++	**3**	27,58	103,50	++
4	26,32	104,05	++	**4**	27,74	104,10	++
5	26,26	103,81	++	**5**	27,65	103,76	++
6	26,43	104,46	++	**6**	27,78	104,28	++
7	26,31	103,98	++	**7**	27,67	103,87	++

Anova: md 0,05: 0,072 md 0,01: 0,098 Anova: md 0,05: 0,049 md 0,01: 0,066
++ vysoce průkazný rozdíl + průkazný rozdíl

Tab. 4: Klíčivost semen v roce 2022 a 2023 (%)

2022	Průměr (%)	% na kontrolu	Průkaznost na kontrolu	2023	Průměr (%)	% na kontrolu	Průkaznost na kontrolu
1	95,00	100,00		**1**	96,50	100,00	
2	96,25	101,32	++	**2**	97,50	101,04	++
3	96,00	101,05	+	**3**	97,25	100,78	+
4	96,75	101,84	++	**4**	98,25	101,81	++
5	96,50	101,58	++	**5**	97,75	101,30	++
6	97,25	102,37	++	**6**	98,75	102,33	0
7	97,00	102,11	++	**7**	98,50	102,07	0

Anova: md 0,05: 0,889 md 0,01: 1,209 Anova: md 0,05: 0,879 md 0,01: 1,196
++ vysoce průkazný rozdíl + průkazný rozdíl

U přípravků Select Super, Gramin a Agil 100 EC se neprojevila fytotoxicita ve sledovaném znaku hmotnost tisíce semen (Tab. 3) a klíčivost (Tab. 4) ve dvou zkušebních letech. U obou sledovaných znaků byly nejnižší hodnoty u neošetřené kontroly.

Autoři Sakaliene & al. (2008) uvádějí výsledky ověření herbicidů Lontrel 300 s účinnou látkou clopyralid a herbicidu Betanal AM s účinnou látkou desmedipham a jejich kombinací v pohance seté. Autoři uvádějí účinnost vybraných herbicidních variant na cílené plevele. U pohanky byl hodnocen vliv ošetření u jednotlivých variant na počet rostlin na metr čtvereční, výšku rostlin, hmotnost rostlin, počet semen, výnos zrna a hmotnost tisíce semen. Autoři zjistili, že kombinace herbicidních přípravků významně nezvyšovaly výnos zrna pohanky oproti neošetřené kontrole. U samostatných aplikací clopyralidu a desmediphamu docházelo k navýšení výnosu zrna u některých dávek účinné látky. Výzkum probíhal ve 4 letech.

V roce 2024 na základě výsledků výzkumu v letech 2022–2023 byl podán Návrh na rozšíření povolení na menšinová použití přípravku na ochranu rostlin do množitelských porostů pohanky seté u herbicidních přípravků Select Super v dávce 0,8 $l.ha^{-1}$ a Gramin v dávce 1–1,5 $l.ha^{-1}$ a 2 $l.ha^{-1}$ do množitelských porostů pohanky seté. Všechny herbicidy jsou určeny pro postemergentní ošetření ve fázi 3–5 listů pohanky seté (BBCH 13–15). V publikaci jsou uvedeny výsledky

výzkumu fytotoxicity testovaných herbicidů v pohance seté. Publikace je určena pro odbornou zemědělskou veřejnost.

Závěr

Na základě výsledků výzkumu nebyla prokázána fytotoxicita po aplikaci přípravků Select Super (účinná látka clethodim 120 $g.l^{-1}$) v dávce 0,8 $l.ha^{-1}$ a 1,6 $l.ha^{-1}$, Gramin (účinná látka quizalofop-P-ethyl 50 $g.l^{-1}$) v dávce 1 $l.ha^{-1}$ a 2 $l.ha^{-1}$ a Agil 100 EC (účinná látka propaquizafop l00 $g.l^{-1}$) v dávce 1 $l.ha^{-1}$ a 2 $l.ha^{-1}$ u sledovaných znaků výnos zrna, hmotnost tisíce semen a klíčivost.

Příznaky fytotoxicity na rostlinách vymizely měsíc po aplikaci přípravků. V roce 2024 na základě výsledků výzkumu v letech 2022–2023 byl podán Návrh na rozšíření povolení na menšinová použití přípravku na ochranu rostlin do množitelských porostů pohanky seté u herbicidních přípravků Select Super a Gramin. Výzkum se zaměřením na pěstitelskou technologii pohanky s testováním nových herbicidů a kvalitativních parametrů zrna bude pokračovat i v následujících letech. V současnosti je pohanka pěstována bez ošetření herbicidy, existují však plevele, které je nutno eliminovat již v počátečních stádiích vývoje této plodiny. Zvýšené množství odborných dotazů z řad zemědělské praxe na použití herbicidů v pohance tuto skutečnost dokládá.

Literatura

Ag Canada Outlook (2007) Buckwheat/Fababeans. http://www.fna.ca/index.php?option5com_content&task5view&id5341&Itemid51. Accessed: March, 2008.

Alberta Agriculture and Food, (2001) Common Buckwheat. http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex103?opendocument. Accessed: March, 2008.

Frydrych J., Bradáčová L. (2021) Nové herbicidy na ochranu rostlin do pohanky seté. Úroda r. 69, č. 12, vědecká příloha, s. 234–244. ISSN 0139-6013.

Frydrych J., Volková P. (2016). Selektivita pohanky seté vůči vybraným herbicidům. Úroda, vědecká příloha, roč. 64, č. 12, s. 205–208.

Gfeller A., Glauser G., Etter C., Signarbieux C., Wirth J. (2018) *Fagopyrum esculentum* alters its root exudation after *Amaranthus retroflexus* recognition and suppresses weed growth. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 9, 50. https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2018.00050/full#h1

Janovská D., Kalinová J., Michalová A. (2008) Metodika pěstování pohanky obecné v ekologickém a konvenčním zemědělství. Metodika pro praxi, 14 s.

Myers R. L., Meinke L. J. (1994) Buckwheat: a Multipurpose, Short Season Alternative. MU Extension G4306. https://extension.missouri.edu/publications/g4306. Accessed: March, 2008.

Petr J., Hradecká D. (1997) Základy pěstování pohanky a prosa. IVV MZe ČR Praha, 32 s.

Sakaliene O., Clay S. A., Koskinen W. C. & Source G. A. (2008) Early Season Weed Suppression in Buckwheat Using Clopyralid. Weed Technology, Vol. 22, No. 4, pp. 707–712.

Poděkování

Publikace vznikla za finanční podpory MZe v rámci institucionální podpory na rozvoj výzkumné organizace OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. se sídlem v Zubří č. MZE-RO1823.

Kontakt:

Ing. Jan Frydrych
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.
Hamerská 698, Zubří 756 54
frydrych@oseva.cz

Hodnotenie produkcie a kvality trávneho porastu v podmienkach sucha

Assessment of grassland production and quality in drought conditions

Hanzes Ľ., Britaňák N., Kizeková M, Vargová, V.

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva Banská Bystrica

Abstrakt

V roku 2013 bol na stanovišti Liptovská Teplička (990 m n. m.), v horskej výrobnej oblasti Slovenska založený experiment s cieľom hodnotenia uplatňovania rôznych pratotechnických zásahov na revitalizovanom, pôvodne opustenom trávnom poraste. V článku hodnotíme vplyv kosenia, mulčovania a rôznych dávok hnojív na produkciu sušiny zvolených pratotechnických opatrení na produkciu sušiny a kvalitu nadzemnej fytomasy vo veľmi suchom roku 2022. Produkcia sušiny korelovala s intenzitou zásahov, najmä s aplikáciou živín. Najvyššia úroda 3,47 t.ha^{-1} bola na dvojkosnom hnojenom poraste (variant 7) a najnižšia na jednokosnom poraste bez aplikácie živín (1,42 t.ha^{-1} sušiny). V priemere, vyššie hodnoty vlákniny boli na porastoch s oneskoreným termínom využívania. Pri dusíkatých látkach, ako aj pri iných makroživinách, boli vyššie hodnoty zaznamenané pri hnojených porastoch.

Kľúčové slová: úroda sušiny, trávny porast, kosenie, sucho, hnojenie

Abstract

In 2013 a field experiment was established on abandoned grassland in Liptovská Teplička (990 m a.s.l.) in Slovak mountain region with the aim to evaluate the effect of different management on grassland productivity, quality and biodiversity. In the paper, the effect of mowing, mulching and various doses of fertilizers on dry matter yield and quality of aboveground phytomass in very dry year 2022 is evaluated. Dry matter yield correlated with the management intensity, especially with the nutrient application. The highest dry matter yield (3.47 t.ha^{-1}) was found when grassland was mown twice a year and fertilized with NPK (treatment 7), the lowest dry matter yield showed grassland move once a year and without fertilization (1.42 t.ha^{-1}). On average, higher concentration of crude fibre was recorded in grasslands with a later mowing date. A higher concentration of crude protein and macronutrients was recorded with fertilized grasslands.

Keywords: dry matter yield, grassland, mowing, drought, fertilization

Úvod

Podstatnou funkciou trávnych porastov je aj funkcia produkčná. Na udržiavaní a samotnej existencii poloprírodných (seminaturálnych) trávnych porastov sa významne podieľa ľudská činnosť. Kosenie a pasenie sú klasické technológie ich obhospodarovania (Blakesley a Buckley, 2016; Blüthgen a kol. 2012). Spôsob a intenzita využívania TTP pritom ovplyvňuje súčasne tak druhové zloženie, ako aj produkciu krmu (Blüthgen a kol. 2012). Alternatívnym spôsobom obhospodarovania trávnych porastov je mulčovanie, pri ktorom sa nadzemná biomasa poseká, rozdrví a následne rozloží na povrchu (Gaisler a kol., 2019). Dôležitým aspektom obhospodarovania trávnych porastov, s dôrazom na produkciu krmovín je aj aplikácia živín, ktorá upravuje druhové zloženie v krmovinársky žiadanom stave. Samostatná aplikácia fosforečno-draselných živín podporuje vo fytocenóze zastúpenie ďatelinovín (Obersteiner a kol., 2013; Sattari a kol., 2016). Hnojenie dusíkom zase zvyšuje dominanciu trávnej zložky (Simkin a kol., 2016; Zhang, 2017). Okrem antropogénnych zásahov ovplyvňujú trávny ekosystém, okrem iného, aj klimatologické faktory. V posledných rokoch sa stretávame najmä s deficitom zrážok, ktoré spôsobujú dlhotrvajúce až extrémne suchá. Kombinácia vysokých teplôt a dlhšími obdobiami s deficitom zrážok tak výrazne ovplyvňujú aj produkčnú schopnosť trávnych porastov.

V príspevku hodnotíme produkciu a kvalitu sušiny nadzemnej fytomasy rôzne využívaného trávneho porastu v roku s nadmerným suchom.

Materiál a metódy

Experimentálne práce boli realizované na zrevitalizovanom trávnom poraste (technológiou kosenia a mulčovania) na stanovišti v Liptovskej Tepličke (990 m n. m.; GPS: N 48.92543, E 20.14078). Priemerná ročná denná teplota je 3,5 °C, priemerná denná teplota za vegetačné obdobie je 9,5 °C, ročný úhrn zrážok je 950 mm, úhrn zrážok za vegetačné obdobie je 525 mm. Pôdnym typom je organozem. Pokus bol založený metódou dlhých pásov v troch opakovaniach v roku 2013. V roku 2022 experimentálne práce pokračovali na porastoch s konštantným variantným prevedení (7 využívaných variantov + 1 kontrolný variant, bez zásahov), pozostávajúcom z kosenia, mulčovania a aplikácie minerálnych hnojív - NPK, v rôznych kombináciách. Podrobný variantný dizajn je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Variantné prevedenie pokusu

Varianty	Pratotechnické zásahy
1	Nevyužívaná kontrola
2	Jedna kosba
3	Dve kosby (hnojenie PK)
4	Dve kosby
5	Mulčovanie raz za rok
6	Dve kosby (hnojenie PK + N 45)
7	Dve kosby (hnojenie PK + N 90)
8	Tri kosby (hnojenie PK + N 90)

Kosba bola pri jednokosnom variante vykonaná pri maximálnej akumulácii nadzemnej fytomasy. Pri viackosných variantoch bol termín prvej kosby vo fáze začiatku klasenia a plného klasenia prevládajúcich druhov tráv v poraste. Pri dvojkosnom využívaní sa druhá kosba realizovala približne 60 až 65 dní po prvej kosbe. Pri trojkosnom využití nasledovala druhá a tretia kosba v intervaloch cca 40 až 45 dní. Termíny kosieb a aj hnojenia sa bližšie stanovovali podľa aktuálneho stavu porastov, z hľadiska fenofázy a nárastu fytomasy. Produkčná schopnosť porastov sa zisťovala úrodou sušiny ($t.ha^{-1}$) pri každom využití a zároveň sa z dvoch opakovaní odoberala aj vzorka na laboratórne stanovenie parametrov kvality sušiny. Výživná hodnota, sa vypočítala na základe laboratórne stanoveného obsahu živín, podľa rovníc uvedených v prílohe č. 8 Výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky č. 39/1/2002-100. Vybrané namerané parametre sme hodnotili metódami parametrickej a neparametrickej analýzy variancie.

Výsledky a diskusia

Meteorologické ukazovatele

Rok 2022, v porovnaní s priemernými hodnotami za roky 2016 – 2020, pri oboch sledovaných meteo ukazovateľoch zaostával. V priemere bola zaznamenaná nižšia denná teplota ale najmä pokles úhrnu zrážok (tab. 2). Ich deficit sa prejavil už na konci zimy a začiatku jari, ale najmä počas VO a to v mesiacoch máj (-27,2 mm), jún (-31,6 mm) a júl (-36,8). Tento trend následne pokračoval aj v mesiacoch september, október a november. Podľa uvedeného hodnotenia môžeme konštatovať, že rok 2022 bol extrémne suchý, čo sa prejavilo aj v predmetných ekologických a orografických podmienkach.

Tabuľka 2 Priebeh meteorologických ukazovateľov (teploty a zrážky) v roku 2022 na stanovišti v Liptovskej Tepličke - priemerná denná teplota (T), úhrn zrážok (R) a dlhodobý priemer (roky 2016 – 2020) oboch ukazovateľov

	Obdobie	Mesiac											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
T (°C)	Priemer	-5,00	-1,84	0,52	6,25	9,51	14,92	15,01	15,62	10,98	6,40	1,60	-2,4
	2022	-4,53	-1,76	-1,92	2,18	10,03	14,84	14,64	15,91	8,38	7,31	0,71	2,74
	odchýlka	+0,47	+0,08	-2,44	-4,07	+0,52	-0,08	-0,37	+0,29	-2,60	+0,91	-0,89	-0,34
R (mm)	Priemer	18,6	52,7	38,9	64,3	74,8	90,8	101,2	91,3	99,3	81,6	71,6	42,6
	2022	18,6	26,4	12,4	64,8	47,6	59,2	64,4	104,8	81,2	27,2	47,6	44,8
	odchýlka	±0,0	-26,3	-26,5	±0,5	-27,2	-31,6	-36,8	+13,5	-18,1	-54,4	-24,0	±2,2

Produkcia sušiny nadzemnej fytomasy

Okrem nepriaznivého priebehu poveternostných ukazovateľov v roku 2022, formovala produkciu jednotlivých porastov intenzita zásahov, vrátane hnojenia. Vyšší nárast fytomasy sme evidovali v porastoch s aplikáciou dusíka (tab. 3). Najvyššia úroda 3,47 t.ha^{-1} bola na dvojkosnom variante 7, ktorý bol hnojený fosforom a draslíkom, spolu s dávkou dusíka 90 kg.ha^{-1} za rok. Takmer identická produkcia (3,42 t.ha^{-1}) bola aj na variante 8, ktorý sa vyznačuje rovnakým spôsobom hnojenia, avšak trojkosným využívaním. Aplikácia minerálnych hnojív, najmä dusíka, ktorý má najväčší vplyv na tvorbu krmu z trávnych porastov, je v pozitívnej korelácii s rastom úrod (Simkin a kol., 2016; Zhang, 2017, Hanzes a kol., 2018). Najnižšou úrodou sa prezentoval jednokosný porast, bez aplikácie živín (1,42 t.ha^{-1} sušiny). Pri všetkých viackosných porastoch boli nasledujúce kosby menej produkčné. Najnižšia zaznamená produkcia bola v tomto roku pri 3. kosbe na variante 8, kde sa urodilo iba 0,47 t.ha^{-1}. Tieto nízke úrody, a to najmä na nehnojených porastoch (var. 2, 4), boli dôsledkom nepriaznivého priebehu meteorologických ukazovateľov v tomto roku, a to predovšetkým deficitu zrážok v jarnom, ale najmä vegetačnom období (tab. 2).

Vzájomným porovnaním päťročného priemeru (roky 2016 – 2020) produkcie sušiny v jednotlivých variantoch a dosiahnutých úrod počas sucha v roku 2022 vyplýva, že mierne vyššie úrody v roku 2022 sme zaznamenali len pri dlhodobo nevyužívanom poraste (var. 1), poraste mulčovanom (var. 5) a minimálny rozdiel bol aj pri dvojkosnom poraste vo variante 4 (tab. 3). V ostatných variantoch bola celková ročná produkcia sušiny v roku 2022 nižšia. Z hľadiska priemernej produkcie všetkých variantov, dosahovala úroda sušiny v roku 2022 2,61 t.ha^{-1} a v priemere rokov 2016 – 2020 zase 3,14 t.ha^{-1}. Pri štatistickom porovnaní týchto dvoch parametrov bol zaznamenaný signifikantný rozdiel (*t*-test = 3,15; df = 23; P = 0,0045).

Tabuľka 3 Úroda sušiny (t.ha^{-1}) v roku 2022 a ročná úroda v priemere rokov 2016 - 2020

Variant	1. kosba	2. kosba	3. kosba	∑	Priemer 2016-2020
1	2,90	-	-	2,90	2,59
2	1,42	-	-	1,42	1,63
3	1,35	0,77	-	2,12	3,41
4	1,01	0,92	-	1,93	1,90
5	2,48	-	-	2,48	2,13
6	2,31	0,84	-	3,15	3,91
7	2,15	1,32	-	3,47	4,66
8	1,84	1,11	0,47	3,42	4,89

Z hľadiska štatistického hodnotenia celkových ročných úrod v roku 2022 (ANOVA $F_{7,16} = 6,41$; P = 0,001), boli zaznamenané preukazné rozdiely (P < 0,05) medzi produkciou sušiny vo variante 4 (s druhou najnižšou produkciou) a variantoch 7 a 8 (tab. 4). Zároveň boli štatistické diferencie aj medzi variantmi 1 a 2. Štatisticky vysoko preukazné rozdiely (P < 0,01) boli zaznamenané medzi najprodukčnejšími porastmi vo variantoch 7, 8 a porastom s najnižšou

produkciou vo variante 2 (1,42 t.ha^{-1}).

Tabuľka 4 Celková ročná produkcia sušiny (t.ha^{-1}) vo variantoch 1 – 8 v roku 2022

Variant	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Produkcia sušiny	2,90bc	1,42a	2,12ab	1,93ab	2,48b	3,15c	3,47c	3,42c
$D\alpha_{0,05}$ = 0,61 , $D\alpha_{0,01}$ = 0,90								

Vysvetlivky: rôzne písmená znamenajú, že medzi porovnávanými variantmi sú štatisticky preukazné rozdiely na úrovni P < 0,05

Kvalita sušiny nadzemnej fytomasy

Optimálny obsah vlákniny trávneho porastu, by mal byť z hľadiska výživy zvierat do 250 g.kg^{-1} (Buchgraber, 2005). V našom experimente, sa obsah vlákniny zvyšoval s posunutým termínom využívania. Vyššie hodnoty tohto parametra vykazovali porasty vo variantoch 1 (278,84 g.kg^{-1}), 2 (281,53 g.kg^{-1}) a 5 (288,46 g.kg^{-1}) (tab. 5). Termíny využívania boli pri týchto variantoch posunuté, vzhľadom k tomu, že išlo o porasty s jedným zásahom počas roka. V ostatných porastoch (var. 3, 4, 6, 7, 8) bola vláknina v optimálnych hodnotách, prípadne mierne zvýšená. NDV vyjadruje obsah acidodetergentnej vlákniny a hemicelulózy, a jej podiel by nemal klesnúť pod 30 % a prekročiť 45 % v sušine. Hodnoty ADV vyjadrujú obsah celulózy, lignínu a lignifikovaných dusíkatých zložiek rastlín, pričom ich podiel by mal byť v ideálnom prípade v rozmedzí 17 – 22 % v sušine kŕmnej dávky (Pozdíšek a kol., 2008). Hodnoty ADV vo všetkých prípadoch prekračovali hornú hranicu optimálnej hodnoty (220 g.kg^{-1}). Podobné hodnotenie môžeme vysloviť aj pri NDV, pričom len v dvoch prípadoch, a to vo var. 2 (458,37 g.kg^{-1}) a var. 6 v prvej kosbe (452,06 g.kg^{-1}), sa jej hodnoty pohybovali tesne nad horným optimálnym intervalom (450 g.kg^{-1}). Kováč (1989), Velich (1986) a Holúbek (1986) podmieňujú kvalitu sušiny trávneho porastu, okrem iného, aj optimálnou koncentráciou minerálnych živín, ktorá by podľa autorov mala byť nasledovná: P: 2,8 - 3,5 g.kg^{-1}, Mg: 2 - 2,5 g.kg^{-1}. Koncentrácia fosforu v sušine nadzemnej fytomasy bola takmer vo všetkých prípadoch v dostačujúcich hladinách. Výnimku tvoril opustený trávny porast (var. 1) a mulčovaný (var. 5), kde boli jeho hodnoty 2,08 g.kg^{-1} a 1,62 g.kg^{-1} (tab. 5). Pri horčíku už boli všetky hodnoty nad optimálnou hornou hranicou (tab. 5).

Tabuľka 5 Koncentrácia živín a látok v sušine v roku 2022 (g.kg^{-1})

Var.	Kosba	Vláknina	Vláknina		Tuk	Popol	NL	P	Mg
			ADV	NDV					
1	1.	278,84	346,99	492,91	28,58	64,90	99,11	2,08	4,96
2	1.	281,53	302,14	458,37	42,24	82,40	128,31	2,66	5,13
3	1.	266,18	325,42	476,93	27,60	73,58	128,51	3,55	5,02
	2.	233,44	296,48	500,58	41,63	87,33	151,08	4,23	6,72
4	1.	235,80	283,74	475,47	28,22	65,84	128,57	2,91	5,40
	2.	229,94	308,15	502,29	44,43	83,62	130,20	4,02	6,43
5	1.	288,46	345,84	527,83	34,06	66,95	84,88	1,62	5,31
6	1.	261,81	283,47	452,06	33,19	69,57	132,49	3,66	5,42
	2.	263,02	332,56	483,41	42,44	91,05	137,01	4,41	7,07
7	1.	251,53	296,01	487,29	31,83	65,96	128,90	3,77	4,85
	2.	254,86	306,18	502,73	47,29	71,92	141,70	4,14	6,63
8	1.	248,50	296,10	517,14	29,68	71,38	132,89	4,10	4,95
	2.	233,39	280,98	490,63	43,00	76,37	136,80	3,81	6,91
	3.	238,97	286,81	484,30	40,41	83,01	121,48	3,71	6,34

Štatistickým hodnotením sa pri porovnaní priemerných hodnôt NL medzi jednotlivými variantmi nezistili preukazné diferencie (ANOVA $F_{2,91}$ = 2,29 ; P = 0,1341) (tab. 6). Rozdiely sme identifikovali pri obsahu vlákniny (ANOVA $F_{7,8}$ = 2,29 ; P = 0,0122) a to najmä medzi extenzívnymi (var. 2, var. 5) a intenzívnymi variantmi. (var. 7, var. 8). Pri parametri P (ANOVA $F_{4,31}$ = 9,43 ; P = 0,0026), bol štatisticky vysoko signifikantný rozdiel len medzi var. 5 (s najnižším obsahom P) a var. 8, kde bola priemerná hodnota fosforu najvyššia. Pri ostatných porovnaniach sa preukazne rozdiely zistili najmä medzi var. 1 (nevyužívaný porast) a variantmi s aplikáciou hnojenia (var. 3, 6, 7, 8) (tab. 6).

Tabuľka 6 Priemerná hodnota vlákniny ($g.kg^{-1}$), NL ($g.kg^{-1}$) a P ($g.kg^{-1}$) vo variantoch 1-8

Variant	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
vláknina	278,84ab	281,53b	266,18ab	235,80a	288,46b	261,81ab	251,53a	248,50a
$D\alpha_{0,05}$ = 12,67, $D\alpha_{0,01}$ = 18,75								
NL	99,11a	128,31a	128,51a	128,57a	84,88a	132,49a	128,90a	132,89a
$D\alpha_{0,05}$ = 19,46, $D\alpha_{0,01}$ = 28,79								
P	2,08ab	2,66abc	3,55cd	2,91bcd	1,62a	3,66cd	3,77cd	4,10d
$D\alpha_{0,05}$ = 1,13 , $D\alpha_{0,01}$ = 2,47								

Vysvetlivky: rôzne písmená znamenajú, že medzi porovnávanými variantmi sú štatisticky preukazné rozdiely na úrovni P < 0,05

Záver

K faktorom, ktorý výrazne ovplyvňuje produkciu a kvalitu sušiny nadzemnej fytomasy trávnych porastov patrí aj priebeh poveternostných ukazovateľ (zrážky a teploty). Deficit zrážok a dlhotrvajúce suchá sa v poslednom období začínajú periodicky vyskytovať aj v horských a podhorských oblastiach, lokalitách s vyššou nadmorskou výškou. Práve tieto regióny sú charakteristické vysokým zastúpením trávnych porastov. V roku 2022, ktorý bol poznačený nadmerným deficitom zrážok, poukazujú na úbytok produkcie sušiny trávneho porastu aj výsledky z nášho experimentu. Ten sa ukázal najmä na nehnojených porastoch (var. 2, 4), pričom nižšie úrody v tomto roku boli aj vo variantoch s aplikáciou živín. Na celkový pokles úrod poukazuje aj štatistické porovnanie s celkovými úrodami v priemere rokov 2016 – 2020. Obsah vlákniny sa zvyšoval s posunutým termínom zásahov, teda najmä pri jedno zásahových porastoch. Naopak, nižšie hodnoty NL sme evidovali pri extenzívnych a nevyužívanom poraste. Obsah P a Mg bol vo všetkých vzorkách dostatočný, pričom voči pratotechnickým zásahom boli ich koncentrácie indiferentné. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že v rokoch s nadmerným suchom, aplikácia živín (najmä N) čiastočne tlmí dramatický úbytok produkcie nadzemnej fytomasy.

Literatúra

BLAKESLEY, D., BUCKLEY, G. P. 2016. Grasslands restoration and management. Pelagic Publishing: Exeter, 2016, pp. 277, ISBN 978-1-78427-078-0.

BLÜTHGEN, N., DORMANN, C. F., PRATI, D., KLAUS, V. H., KLEINEBECKERJ, T., HÖLZEL, N., ALT, F., BOCH, S., GOCKEL, S., HEMP, A., MÜLLER, J., NIESCHULZE J., RENNER, S.C., SCHÖNING, I., SCHUMACHER, U., SOCHER, S.A., WELLS, K., BIRKHOFER, K., BUSCOT, F., OELMANN, Y., ROTHENWÖHRER, C., SCHERBER, C., TSCHERNTKE, T., WEINER, C. N., FISCHER, M., KALKO, E. K. V., LINSENMAIR, K. E., SCHULZE, E. D., WEISSER, W. E. 2012. A quantitative index of land-use intensity in grasslands: Integrating mowing, grazing and fertilization. In : Basic and Applied Ecology, 2012, 3 (13), 207−220 pp.

BUCHGRABER, K. 2005. Kann die Futterqualität am Grünland gesteigert werden?/Může se zvýšit kvalita píce luk a pastvin? In Sborník z mezinárodní vědecké konference, Praha:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, s. 5-18, 2005. ISBN 80-86555-75-5.
GAISLER, J., PAVLŮ, L., NWAOGU, C., PAVLŮ, K., HEJCMAN, M., PAVLŮ, V.V. 2019. Long-term effects of mulching, traditional cutting and no management on plant species composition of improved upland grassland in the Czech Republic. In : Grass Forage Science., 2019, 74 (3), p. 463–475, ISSN 01425242.
HANZES, Ľ., BRITAŇÁK, N., ILAVSKÁ, I. 2018. Vplyv revitalizačných zásahov na floristické zloženie a úrodu trávneho porastu. In : GÁLIK, B. Recenzovaný zborník vedeckých prác Slovenskej spoločnosti pre poľnohospodárske, lesnícke, potravinárske a veterinárske vedy pri SAV, SPU Nitra, 2018, s. 164−174, ISBN 978-80-552-1921-9.
HOLÚBEK, R. 1986. Produkčná schopnosť a kvality poloprírodných trávnych porastov v mierne teplej a mierne suchej oblasti. Bratislava : Veda, 1986, 132 s.
KOVÁČ, M. a kol. 1989. Výživa a kŕmenie hospodárskych zvierat. Bratislava : Príroda, 1989, 536 s. ISBN 80-07-00030-5
OBERSTEINER, M., PEÑUELAS, J., CIAIS, P., VAN DER VELDE, M., JANSSENS, I. A. 2013. The phosphorus trilemma. In : Nature Geoscience, 2013, (6) 11, p. 897-898
POZDÍŠEK, J. a kol. 2008. Metodická príručka pro chovatele k výrobě konzervovaných krmív (siláží) z víceletých pícnin a trvalých trávnich porostů. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu. 2008. 38 s., ISBN 978-80-87144-06-0
SATTARI, S.Z., BOUWMAN, A.F., MATINEZ RODDRIGUEZ, R., BEUSEN, A.H.W., VAN ITTERSUM, M.K. 2016. Negative global phosphorus budgets challenge sustainable intensification of grasslands. In : Nature Communications, 2016, 7, doi: 10.1038/ncomms10696
SIMKIN, S. M., ALLEN, E. B., BOWNAM, W. D., CLARK, C. M., BELNAP, J., BROOKS, M. L., CADE, B. S., COLLINS, S. L., GEISER, L. H., GILLIAM, F. S., JOVAN, S., E., PARDO, L. H., SCHULZ, B., K., STEVENS, C. J., SUDDING, K. N., THROOP, H. L., WALLER, D. M. 2016. Conditional vulnerability of plant diversity to atmospheric nitrogen deposition across the United States. In : Proceedings of the National Academies of the Sciences, 2016, (113) 15, p. 4086−4091.
VELICH, J. 1986. Studium vývoje produkční schopnosti trvalých lučních porostú a drnového procesu při dlouhodobém dusikatém hnojení a jeho optimalizace : doktorská dizertační práce. Videopres MON, 1986, 162 s.
ZHANG, X. 2017. Biogeochemistry: A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. In : Nature, 2017, 543, p. 322-323.

Poďakovanie
Tento príspevok bol spracovaný vďaka podpore RPVV „Environmentálne prínosy inovatívnych stratégií obhospodarovania trávnych porastov a využitia krajiny“, financovaného z kontraktu 720/2023/MPRVSR–930

Kontakt:
RNDr. Ľubomír Hanzes, PhD., Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, VÚRV, ÚTPHP, Gašperíková 599, 033 01 Liptovský Hrádok
lubomir.hanzes@nppc.sk

Aplikácia mykoríznych húb pre hodnotnejšie obilniny

Application of mycorrhizal fungi for more valuable cereals

Hlubina P.[1], Hančinský R.[1], Mihálik D.[1,2], Hauptvogel P.[2], Hauptvogel R.[2], Matušíková I.[1]

[1]Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied Námestie Jozefa Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko; [2]Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 92168 Piešťany, Slovensko ;

Abstrakt

Zinok (Zn) je pre rastliny esenciálny mikroelement, ktorý však vo vysokých koncentráciách môže byť toxický. Jeho dostupnosť a toxicita závisia od pôdnych podmienok. Arbuskulárne mykorízne huby (AMH) vytvárajú symbiotický vzťah s rastlinami, kde prostredníctvom hýfovej siete zlepšujú príjem mikroživín vrátane Zn. Výskum sa zameral na štúdium potenciálu AMH pri biofortifikácii a remedácii Zn v štyroch odrodách pšenice.

Klíčová slova: mykoríza, pšenica, biofortifikácia, zinok

Abstract

Zinc (Zn) is an essential trace element for plants, but can be toxic in high concentrations. Its availability and toxicity depend on soil conditions. Arbuscular mycorrhizal fungi form a symbiotic relationship with plants where they enhance the uptake of micronutrients including Zn through a hyphae network. This research focused on studying the potential of AMH in biofortification and Zn remediation in four wheat cultivars.

Keywords: mycorrhiza, wheat, biofortification, zinc

Úvod

Základné živiny potrebné pre rastliny sú výhradne anorganické látky, medzi nimi aj mikroelement zinok (Zn). Vysoké koncentrácie kovov, vrátane Zn, však môžu byť toxické pre rastliny, aj pre pôdne mikroorganizmy. (Acar and Alshawabkeh, 1993; Beesley et al., 2011)

Kovy sa dostávajú do pôdy nielen ako užitočné mikroelementy, ale sú tiež výsledkom znečistenia, môžu vplývať na zhutnenie pôdy, meniť jej štruktúru, zamokrenie, čím sa pôda stáva náchylnejšou na eróziu a môžu sa prenášať do povrchových vôd, čo nepriamo ohrozuje kvalitu potravín. (Acar and Alshawabkeh, 1993; Beesley et al., 2011)

Mikronutrient zinok je výnimočný kov, pretože jeho vplyv pre rastlinu sa pohybuje na škále od esenciality po toxicitu, v závislosti od množstva a podmienok (Fageria et al., 2002; He et al., 2005). Aj vlastnosti pôdy výrazne ovplyvňujú dostupnosť a toxicitu Zn (Gupta et al., 2016). V pôdach s nízkou dostupnosťou Zn rastliny dokážu meniť morfológiu koreňov, aby zlepšili príjem tohto mikronutrientu. (Fageria et al., 2002) Práve pri zmene štruktúry a dĺžky koreňov zohrávajú podstatnú úlohu arbuskulárne mykorízne huby (AMH). Arbuskulárne mykorízne huby, Glomeromycota, sú mutualistickí symbionti, ktorí vytvárajú vzťahy s viac ako 70 % rastlinnými druhmi. Prenikajú do koreňov rastlín, kde vytvárajú „arbuskule“ v bunkách koreňov. Tie zvyšujú biologickú dostupnosť mikroživín najmä tým, že vytvárajú hýfovú sieť, ktorá zväčšuje plochu pre absorpciu živín (Coccina et al., 2019). Na oplátku rastlina dodáva hubám zlúčeniny uhlíka pochádzajúce z fotosyntézy.

V rámci našich experimentov sme na štyroch odrodách pšenice, PI264934, PI264936, Kirmizi Yazik a IS Durablank skúmali potenciál využitia AMH ako spôsobu na obohatenie zŕn pšenice o Zn. Tento prístup sme skúmali nielen z hľadiska biofortifikácie, ale tiež jeho remediačný potenciál – odstránenie Zn zo znečistenej pôdy po prídavku AMH.

Materiál a metody

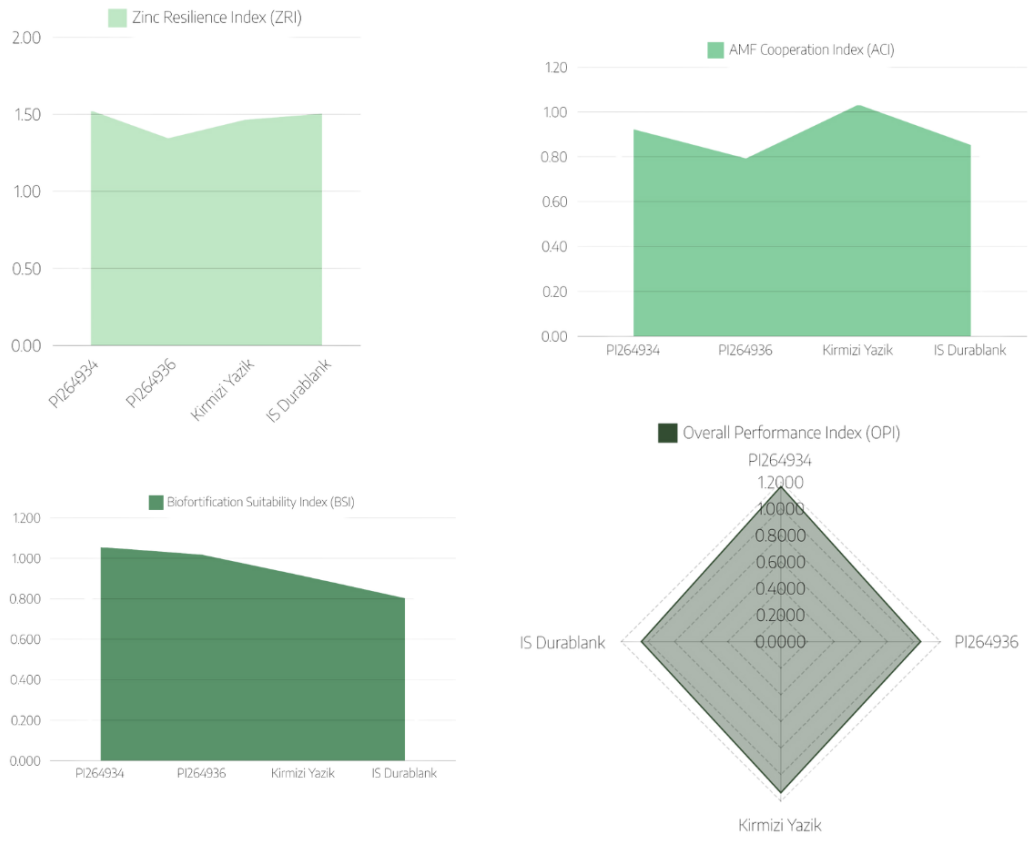
Ako experimentálny materiál sme použili odrody pšenice, ktoré poskytla Génová Banka Slovenska (Výskumný ústav rastlinnej výroby NPPC v Lužiankach). Štyri experimentálne odrody (PI264934, PI264936, Kirmizi Yazik a IS Durablank) sme vyselektovali z celkového screeningu 31 odrôd. Pri črepníkových experimentoch sme používali pôdne aditívum od výrobcu SYMBIVIT® - Mykorízne hybu. Symbivit obsahuje častice 6 druhov mykorhíznych húb vo forme spór. Do 3 l črepníkov sme zasadili po 3 zrná na odrodu. Pre každú odrodu sme sadili 3 replikáty každého z nasledujúcich 4 variantov: kontrola (bez akéhokoľvek aditíva), 45 g Symbivit® (variant s mykoríznymi hubami, AMH), 75 mg Zn2+/kg pôdy (variant s obsahom Zn), variant AMH+Zn.

Rastliny sme kultivovali počas vegetačného obdobia (marec-júl 2023) do štádia tvorby klasu v kultivačnej miestnosti pri fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma, maximálnej intenzite osvetlenia 11 450 lx a teplote do 28°C (svetlo) alebo 18°C (tma). Obsah listových pigmentov sme stanovili pomocou postupu podľa Lichtenthalera a Wellburna (1983). Absorbanciu supernatantu sme merali pri troch rôznych vlnových dĺžkach svetla (663 nm, 646 nm, 470 nm) a následne sme vyrátali koncentráciu chlorofylov. Zrná experimentálnych rastlín sme pomleli (TissueLyser LT) a po mineralizácii s roztokom HNO3 dali analyzovať na obsah Zn v Ekoanalytickom laboratóriu LABEKO, akreditovanom Slovenskou národnou akreditačnou službou.

Výsledky

Pri odrodách PI264936 a IS Durablank sme pri raste v prítomnosti AMH pozorovali nárast chlorofylu A, chlorofylu B aj karotenoidov, čo naznačuje mobilizáciu živín z pôdy. V dôsledku zálievky Zn u odrôd PI264934 a PI264936 došlo k zníženiu obsahu fotosyntetických pigmentov, naopak u odrôd Kirmizi Yazik a IS Durablank sme pozorovali výrazné zvýšenie. Pomer chlorofylov A a B bol významne vyšší iba u odrody PI264934 po aplikácii Zn, nezmenený u odrody PI264936 a nižší u odrôd Kirmizi Yazik a IS Durablank. Z výsledkov usudzujeme, že odrody Kirmizi Yazik a IS Durablank sú tolerantnejšie na Zn ako PI264934, PI264936.

Prítomnosť AMH v kombinácii so Zn prispela k transportu Zn do zŕn odrôd PI264934 a PI264936, nie však u ostatných dvoch odrôd (pri porovnaní s ošetrením so Zn). Z nameraných hodnôt sme stanovili tri indexy, ktoré naznačujú vhodnotnosť použitia jednotlivých odrôd pšenice pre biotechnologické uplatnenie v poľnohospodárstve: Index odolnosti voči Zn (ZRI – Zinc Resilience Index), Index spolupráce s AMH (ACI – AMH Cooperation Index), Index vhodnosti na biofortifikáciu (BSI – Biofortification Suitability Index), Celkový výkonnostný index (OPI – Overall Performance Index).



Obrázok 1: Stanovenie štyroch indexov pre vyhodnotenie interakcie skúmaných odrôd pšenice s arbuskulárnymi mykoríznymi hubami a zinkom. Najvhodnejšie na túto interakciu reagovali odrody PI264934 a Kirmizi Yazik. Index ZCI určuje reakciu na prídavok Zn, ACI je index spolupráce s mykoríznymi hubami a BCI je biofortifikačný index.

Diskuze

Prídavok arbuskulárnych mykoríznych húb (AMH) do pôdy v kombinácii so zálievkou Zn zvýšil obsah Zn v zrnách v porovnaní s kontrolným variantom u všetkých testovaných odrôd. Pre porovnanie, celosvetovo je obsah Zn v zrnách pšenice približne 31,84 mg/kg, pričom sa odlišuje na jednotlivých kontinentoch – v Európe je priemerne 25,10 mg/kg. (Wang et al., 2020) V našich experimentoch sme prídavkom AMH+Zn získali približne 50 mg/kg Zn v zrnách. Najviac Zn mobilizovala do zŕn odroda Kirmizi Yazik (pri zálievke so Zn). Synergiu AMH a Zn sme pozorovali o odrôd PI264934 a PI264936, ale nie pri odrodách Kirmizi Yazik a IS Durablank, zrejme ako výsledok interakcie genotypu, aplikovaných pôdnych aditív či rastových podmienok. Reakcia rastlín na zmenu obsahu Zn v pôde bola priemerne silnejšia, ako reakcie na prídavok AMH. Vysvetlením je prejavenie sa ochranného účinku AMH v podmienkach toxických koncentrácií Zn v pôde, ktorý mohol znížiť akumuláciu Zn v zrne (Tran et al., 2019). Mutualistická asociácia medzi arbuskulárnymi mykoríznymi hubami a hostiteľskými rastlinami reprezentuje komplexný metabolický „obchod“, v rámci ktorého rastlinný organizmus translokuje uhlík (primárne sacharidy) smerom k fungálnemu symbiontovi výmenou za minerálne nutrienty. V suboptimálnych podmienkach, kde benefity tejto výmeny nedosahujú

kompenzačnú hodnotu voči energetickým výdavkom, môže táto symbiotická interakcia indukovať stresovú odpoveď hostiteľského organizmu. (Li et al., 2020) Efektivita a fyziologický impakt AMH tak manifestuje signifikantnú variabilitu v závislosti od multiplicity edafických a environmentálnych parametrov, zahŕňajúc pedologické charakteristiky, termický režim, hydrologické podmienky a taxonomickú špecificitu hostiteľského organizmu.

Závěr

Pri výskume vplyvu AMH na akumuláciu Zn z pôdy na modelových organizmoch, štyroch odrodách pšenice, sme idektifikovali ako najvhodnejší druh na biofortifikáciu a využitie v environmentálnych biotechnológiách odrodu PI264934 a odrodu Kirmizi Yazik.

Literatura

Acar, Y.B., Alshawabkeh, A.N. 1993. Principles of electrokinetic remediation. Environ. Sci. Technol. 27, 2638–2647. DOI https://doi.org/10.1021/es00049a002

Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., Harris, E., Robinson, B., Sizmur, T. 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. Environ. Pollut. 159, 3269–3282. DOI https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.023

Coccina, A., Cavagnaro, T.R., Pellegrino, E., Ercoli, L., McLaughlin, M.J., Watts-Williams, S.J. 2019. The mycorrhizal pathway of zinc uptake contributes to zinc accumulation in barley and wheat grain. BMC Plant Biol. 19, 133. DOI https://doi.org/10.1186/s12870-019-1741-y

Fageria, N.K., Baligar, V.C., Clark, R.B. 2002. Micronutrients in Crop Production. pp. 185–268. DOI https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)77015-6

Founoune-Mboup, H., Diallo, B., Adigoun, R.F.R., Kane, A., Fall, A.F. 2024. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the bioavailability of micronutrients (iron and zinc) in millet accessions. Front. Plant Sci. 15. DOI https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1364469

Gupta, N., Ram, H., Kumar, B. 2016. Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 15, 89–109. DOI https://doi.org/10.1007/s11157-016-9390-1

He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. J. Trace Elem. Med. Biol. 19, 125–140. DOI https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010

Li, J., Awasthi, M.K., Xing, W., Liu, R., Bao, H., Wang, X., Wang, J., Wu, F. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi increase the bioavailability and wheat (Triticum aestivum L.) uptake of selenium in soil. Ind. Crops Prod. 150. DOI https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112383

Tran, B.T.T., Cavagnaro, T.R., Watts-Williams, S.J. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation and soil zinc fertilisation affect the productivity and the bioavailability of zinc and iron in durum wheat. Mycorrhiza 29, 445–457. DOI https://doi.org/10.1007/s00572-019-00911-4

Wang, M., Kong, F., Liu, R., Fan, Q., Zhang, X. 2020. Zinc in Wheat Grain, Processing, and Food. Front. Nutr. 7, 124. DOI https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00124

Poděkování

Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR v rámci grantu č. APVV-15-0051 a APVV-21-0504.

Kontakt:

Ing. Pavol Hlubina
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave
Fakulta prírodných vied
Námestie Jozefa Herdu 2
917 01 Trnava
+421 904 324 618 hlubina1@ucm.sk

Fenotypizáciou k selekcií pšenice s vyšším obsahom Zn v zrne

Phenotyping for the selection of wheat with a higher Zn content in the grain

Kinder Alexandra[1], Hlubina Pavol[1], Matušíková Ildikó[1], Hauptvogel Pavol[2]

[1]*Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Ústav chémie a environmentalistiky FPV, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko*

[2]*Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 92168 Piešťany, Slovensko*

Abstrakt

Podvýživa v dôsledku nedostatočného príjmu zinku je celosvetovým problémom. Najvýraznejšie dopady má v rozvojových krajinách, no aktuálne je relevantná aj pre vyspelé krajiny. Preto je potrebné nielen zvýšiť celosvetovú produkciu obilnín, ale aj modulovať jeho nutričnú kvalitu. Zlepšovanie nutričných vlastností plodín (Zn a Fe a ich biologická dostupnosť) je preto dôležitým cieľom v šľachtiteľských programoch. Rastliny tiež potrebujú zinok v správnom množstve, pretože sa podieľa na rôznych fyziologických funkciách a enzýmových aktivitách. Ekologickým riešením sa javí agronomická biofortifikácia pšenice. Jej predpokladom je odroda s dobrými agronomickými vlastnosťami ale aj genetickým pozadím pre príjem a transport Zn v pletivách. Analyzujeme súbor 13 odrôd tvrdej pšenice (*Triticum durum)* na toleranciu Zn a akumuláciu tohto elementu v zrnách. Konvenčnými laboratórnymi postupmi molekulárnej biológie, fenotypizácie a analytickej chémie selektujeme odrody vhodné pre programy biofortifikácie. Identifikujeme a porovnáme mechanizmy, ktoré by mohli byť zodpovedné za pozorované rozdiely, ako je akumulácia metabolitov či aktivita génov pre tvorbu fytochelatínov. Zhodnotíme aj vplyv arbuskulárnych mykoríznych húb (AMF) na príjem a akumuláciu Zn v zrnách testovaných odrôd. Parametre fotosyntetického aparátu hodnotené pri fenotypizácii odrážajú toleranciu odrôd na toxicitu Zn ako základný predpoklad pre úspešnú biofortifikáciu.

Kľúčové slová: biodostupnosť, biofortifikácia, fenotypovanie, minerálna výživa, zinok.

Abstract

Malnutrition due to insufficient zinc intake is a global problem. It has the most significant impacts in developing countries, but it is currently also relevant for developed countries. Therefore, it is necessary not only to increase the global production of cereals, but also to modulate its nutritional quality. Improving the nutritional properties of crops (Zn and Fe and their bioavailability) is therefore an important objective in breeding programmes. Plants also need zinc in the right amounts, as it is involved in various physiological functions and enzyme activities. Agronomic biofortification of wheat seems to be an ecological solution. Its prerequisite is a variety with good agronomic characteristics, but also a genetic background for the uptake and transport of Zn in tissues. We analyze a set of 13 varieties of durum wheat (Triticum durum) for Zn tolerance and accumulation of this element in grains. Using conventional laboratory procedures of molecular biology, phenotyping and analytical chemistry, we select varieties suitable for biofortification programs. We will identify and compare the mechanisms that could be responsible for the observed differences, such as the accumulation of metabolites or the activity of phytochelatin-producing genes. We will also evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the uptake and accumulation of Zn in the grains of the tested varieties. The parameters of the photosynthetic apparatus evaluated during phenotyping reflect the tolerance of varieties to Zn toxicity as a basic prerequisite for successful biofortification.

Keywords: bioavailability, biofortification, phenotyping, mineral nutrition, zinc.

Úvod

Tvrdá pšenica je jedným z hlavných zdrojov kalórií a bielkovín v mnohých rozvojových krajinách. V dôsledku obmedzeného prísunu zinku do nadzemných častí plodín a/alebo vplyvom antinutrientov v zrne populácia čelí nedostatku mikroživín ako je zinok, čo má vplyv na zdravie populácie. Biofortifikácia plodín, t. j. zvýšenie koncentrácie mikroživín v

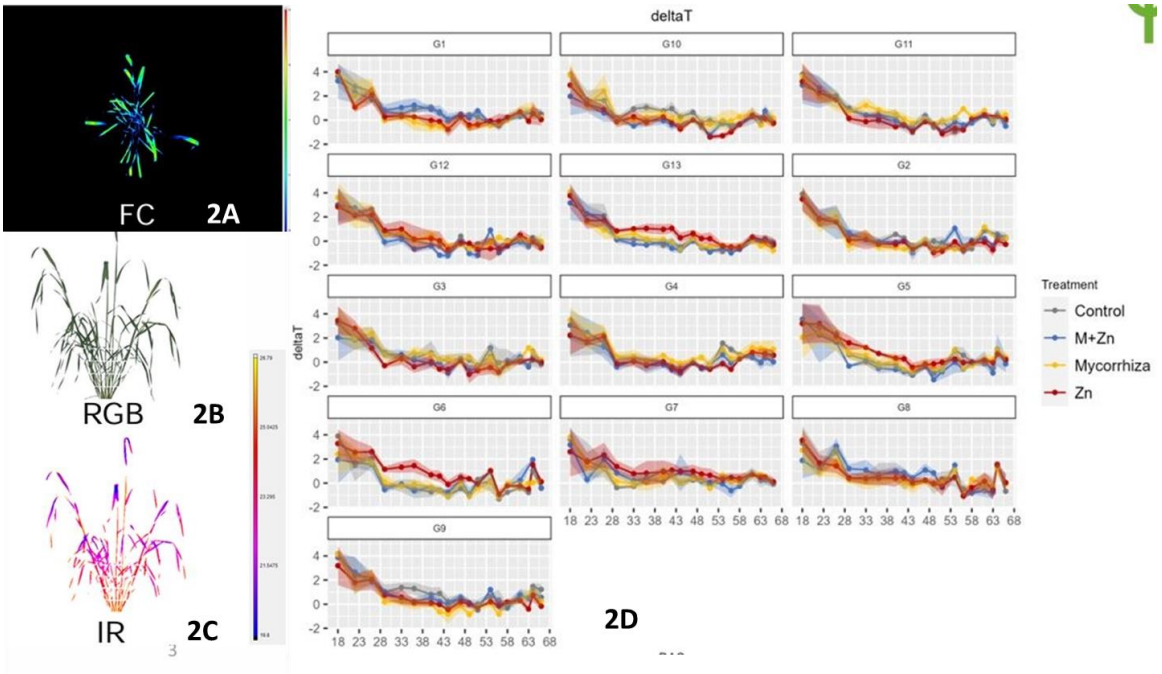
konzumných častiach plodín šľachtením či biotechnologickými prístupmi, bola navrhnutá ako jeden z nákladovo najefektívnejších a environmentálne bezpečných prístupov na zmiernenie podvýživy [1]. Agronomická biofortifikácia Zn sa považuje za primárne volenú metódu pre zvýšenie obsahu Zn v zrne. Zahŕňa aplikáciu hnojív do pôdy a/alebo na listy [2]. Obsah Zn v zrnách pšenice je ovplyvnený aplikačnou technikou a dĺžkou vegetačného cyklu plodín. Pokroky v genomike, najmä dostupnosť vysokovýkonných testov genotypovania (napr. sekvenovanie celého genómu, detekcia polymorfizmu nukleotidov atď.) uľahčili mapovanie znakov aj v rastlinných druhoch s veľkými a komplexnými genómami ako je pšenica [3]. Fenotypizácia rastlín je komplexné hodnotenie morfo-fyziologických vlastností rastlín ako rast, vývin, tolerancia, odolnosť, architektúra pletív a orgánov, odrážajú zdravotný stav rastlín pri príjme, translokácii a alokácii daných koncentrácií Zn [4].

Materiál a Metódy

V experimente študujeme nasledovné genotypy tvrdej pšenice: 1296, 1352, 1N1, IS Durablank, IWA8611094, Kirmizi Yazlik, Nursith, PI 264932, PI 264933, PI 264934, PI 267493 a 29PI 267493. Kultivácia rastlín prebiehala v štyroch opakovaniach pre každý variant: kontrola (C) – pôdny substrát Klasmann; Mykoríza (M)-Klasmannov substrát a aplikácia komerčnej dostupnej zmesi mykoríznych húb, aplikácia zinku (Zn)-Klasmann substrát a pridanie minerálneho hnojiva so zinkom (vo forme $ZnSO_4$ v koncentrácií 5 mg Zn na kilogram pôdy), (M a Zn): Substrát Klasmann a prídavok mykoríznych húb aj hnojiva so zinkom. Rastliny boli fenotypizované počas 7 týždňov. Stanovené boli dynamika rastu rastlín (RGB zobrazenie), teplota listov (IR zobrazenie) a parametre fotosystému II (napr. fluorescencia chlorofylu FC) (obr. 1 A-D) priamo na fenotypizačnej linke. Vzorky zrelých zŕn (200 mg) boli mineralizované v 8 ml koncentrovanej HNO_3 (Mikrovlnný digesčný systém Anton Paar) a nariedené v skúmavkách ultračistou vodou na objem 25 ml. Obsah vybraných elementov je aktuálne stanovovaný atómovou absorbčnou spektrometriou (Termoscientific?).

Výsledky a Diskusia

V skoršie publikovaných výsledkoch biofortifikačných štúdií bol dosiahnutý zvýšený obsah Zn v pšeničnom zrne [5, 6]. Parametre hodnotené počas fenotypizácie indikujú zdatnosť rastlín za daných rastových podmienok. Zmeny teploty listov sú znázornené pri aplikácii Zn, mykoríznych húb alebo ich kombinácie do pôdy (obr. 1 2D). Tieto údaje v súčasnosti vyhodnocujeme. Stanovujeme aj obsah zinku v pôde aj v zrnách pšenice. Predpokladáme, že za pozorovanú variabilitu v odpovediach odrôd sú zodpovedné jednotlivé mechanizmy pre antioxidačnú obranu, akumuláciu metabolitov a/alebo aktivita génov pre produkciu chelatujúcich látok ako sú fytochelatíny. V rámci experimentu stanovujeme aj dynamiku rastu rastlín (RGB zobrazenie) (obr.1 2B), teplotu listov (IR zobrazenie) (obr.1 2C) a vybrané fotosyntetické parametre (napr. fluorescencia chlorofylu, SC) (obr. 1. 2A)



Obr. 1 Reprezentatívne obrázky zaznamenaných snímok analyzovaných rastlín (panely A-C) a náhľad výsledkov zmien teploty listov za daných experimentálnych podmienok (D)

Záver

V rámci fenotypizácie ste zachytili zmeny v spektrách, ktoré jednoznačne poukazujú na vplyv jednotlivých faktorov prídavku zinku, ale aj mykoríz na teplotu listov či fotosyntetické parametre. Zatiaľ nie je jasné, ako sú tieto zmeny v súlade s obsahom Zn v zrnách. Výsledky by mohli byť užitočné pre šľachtiteľov pri vytváraní odrôd s významným obsahom kyseliny fytovej a mikroživín, čo môže viesť k vývoju odrôd bohatých na požadované mikroživiny na prekonanie skrytého hladu v populácii. Zároveň z výsledkov nášho projektu ekologicky vyhodnotíme možnosti modulácie príjmu a akumulácie Zn v zrnách, čo pomôže biofortifikačným programom.

Literatúra

[1] Ana María Magallanes-López, Nayeli Hernandez-Espinosa, Govindan Velu, Gabriel Posadas- , José Crossa, Karim Ammar, Carlos Guzmán,Variability in iron, zinc and phytic acid content in a worldwide collection of commercial durum wheat cultivars and the effect of reduced irrigation on these traits,Food Chemistry,Volume 237,2017,Pages 499-505,ISSN 0308-8146,

[2] Singh S, Kaur J, Ram H, Singh J, Kaur S. Agronomic bio-fortification of wheat (Triticum aestivum L.) to alleviate zinc deficiency in human being. Rev Environ Sci Biotechnol. 2023;22(2):505-526. doi: 10.1007/s11157-023-09653-4. Epub 2023 Apr 27. PMID: 37234132; PMCID: PMC10134721.

[3] Gupta OP, Singh AK, Singh A, Singh GP, Bansal KC, Datta SK. Wheat Biofortification: Utilizing Natural Genetic Diversity, Genome-Wide Association Mapping, Genomic Selection, and Genome Editing Technologies. Front Nutr. 2022 Jul 12;9:826131. doi: 10.3389/fnut.2022.826131. PMID: 35938135; PMCID: PMC9348810.

[4] Watt M, Fiorani F, Usadel B, Rascher U, Muller O, Schurr U. Phenotyping: New

Windows into the Plant for Breeders. Annu Rev Plant Biol. 2020 Apr 29;71:689-712. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041124. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32097567.

[5] Luís IC, Lidon FC, Pessoa CC, Marques AC, Coelho ARF, Simões M, Patanita M, Dôres J, Ramalho JC, Silva MM, Almeida AS, Pais IP, Pessoa MF, Reboredo FH, Legoinha P, Guerra M, Leitão RG, Campos PS. Obohatenie zinku v dvoch kontrastných genotypoch Triticum aestivum L. Grains: Interakcie medzi edafskými podmienkami a listovými hnojivami. Rastliny (Bazilej). 2021 21. januára; 10(2):204. DOI: 10.3390/plants10020204. PMID: 33494526; PMCID: PMC7910929.

[6] S. J. Watts-Williams, N. Jewell, C. Brien, B. Berger, T. Garnett, T. R. Cavagnaro. Použitie vysokovýkonnej fenotypizácie na skúmanie rastových reakcií na mykorhízne huby a zinok u troch druhov rastlín. Fenomika rastlín. 2019;2019:DOI:10.34133/2019/5893953

Poďakovanie
Práca je podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR v rámci grantu č. APVV-21-0504.

Kontakt:
Ing. Alexandra Kinder,
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta Prírodných vied, Námestie J. Herdu 2 917 01 Trnava,
Kinder2@ucm.sk, +421918105955.

Úroda 12/2024, vědecká příloha časopisu

Vplyv manažmentu trávnych porastov na obsah pôdneho organického uhlíka

The effect of grassland management on soil organic carbon content

Kizeková M.[1], Čunderlík J.[1], Vargová V.[1], Dugátová Z.[1], Hanzes Ľ.[1], Britaňák N.[1], Jančová Ľ.[1]

[1]*Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva Banská Bystrica*

Abstrakt

Pôdny organický uhlík zohráva dôležitú úlohu pri sekvestrácii uhlíka do pôdy a regulácii klímy. Cieľom príspevku bolo zhodnotiť vplyv manažmentu (pasenie a kosenie) a pôdneho typu (kambizem, fluvizem a organozem) na obsah pôdneho organického uhlíka, a ďalšie pôdne parametre ako je obsah celkového dusíka, prijateľného draslíka a fosforu, pH a pomeru C:N. Výskum prebiehal na 4 stanovištiach: Dolná Lehota (480 m n.m.), Suchý vrch (420 m n.m.), Veľká Lúka (308 m n.m.) a Liptovská Teplička (990 m n.m.). ANOVA potvrdila preukazný vplyv ($P < 0,05$) pôdneho typu na všetky hodnotené parametre. Naopak manažment trávnych porastov štatisticky významne ($P < 0,05$) ovplyvnil len pomer C:N, obsah prijateľného draslíka a fosforu.

Kľíčová slova: pôda, lúky a pasienky, pôdna organická hmota, manažment

Abstract

Soil organic carbon plays an important role in soil carbon sequestration and climate regulation. The aim of the paper was to evaluate the influence of management (grazing and mowing) and soil type (cambisol, fluvisol and organosol) on the content of soil organic carbon, and other soil parameters such as the content of total nitrogen, plant avaiable potassium and phosphorus, pH and the C:N ratio. The research was conducted at 4 sites: Dolná Lehota (480 m a.s.l.), Suchý vrch (420 m a.s.l.), Veľká Lúka (308 m a.s.l.) and Liptovská Teplička (990 m a.s.l.). ANOVA confirmed a significant impact ($P < 0.05$) of soil type on all evaluated parameters. On the contrary, grassland management statistically significantly ($P < 0.05$) influenced only the C:N ratio, the content of acceptable potassium and phosphorus.

Keywords: soil, meadows and pastures, soil organic matter, management

Úvod

Poľnohospodárstvo a zmeny vo využívaní pôdy významnou mierou prispievajú k emisiám skleníkových plynov. Elias a kol. (2023) uvádzajú, že 10 – 14 % antropogénnych emisií možno priradiť poľnohospodárskej výrobe, ako je chov hospodárskych zvierat a hospodárenie s pôdou. V procese sekvestrácie uhlíka v pôde zohráva kľúčovú úlohu pôdna organická hmota a jej základná zložka – pôdny organický uhlík (POC). Nevhodné pestovateľské postupy vedú k degradácii pôdy a emisiám uhlíka do atmosféry (Barančíková a Koco, 2022). Zameranie pozornosti na aplikovanie postupov, ktoré prispievajú k uchovaniu a zvyšovaniu POC v pôde je z vyššie uvedených dôvodov aktuálna dosiahnuteľná stratégia Európskej únie v oblasti zmierňovania dopadov klimatickej zmeny.

V trvalých trávnych porastoch sa nachádza približne 34 % z celkového uhlíka viazaného v suchozemských ekosystémoch, pričom viac ako 90 % je uložených pod zemou v koreňovej biomase a vo forme POC (Bai a kol., 2022). Podobne ako v prípade ornej pôdy, aj pri trávnych porastoch je spôsob obhospodarovania kľúčovou podmienkou akumulácie uhlíka v pôde. Pozitívny vplyv na obsah uhlíka v pôde trávnych porastov má pasenie, ktoré je spojené s relatívne vyššími vstupmi uhlíka do pôdy v porovnaní s kosením. Modelovanie zásob uhlíka

v pôde trávnych porastov ukázalo, že pri nízkom náraste teplôt v budúcnosti dokáže systém kosenia trávnych porastov kombinovaný s prepásaním dosiahnuť sekvestráciu uhlíka a jeho ukladanie v pôde (Barančíková a kol., 2023, Kizeková a kol., 2023). Ďalšími faktormi ovplyvňujúcimi sekvestráciu resp. uvoľňovanie uhlíka z pôdy je aj spôsob a hnojenia a množstvo dodávaných živín. Kľúčovú úlohu v regulácii suchozemských ekosystémov má dusík (Vitousek a Howarth, 1991). Vedomosti o jeho obsahu v pôde sú dôležité pre manažment pôdy, presné poľnohospodárstvo, hodnotenie toku živín a biochemické modelovanie. Fosfor a draslík patria k makroživinám, ktoré sa významnou mierou podieľajú na produkcii poľnohospodárskych plodín. Fosfor (P) sa v pôde nachádza najmä vo forme nedostupnej pre rastliny, a z tohto dôvodu sa musí dopĺňať vo forme hnojív. Draslík (K) je zase kľúčovou živinou z hľadiska fyziologických a biochemických funkcií v rastlinách (Kayser a Isselstein, 2005).

Na Slovensku sa v súčasnosti aktívne využíva viac 508 950 ha lúk a pasienkov, čo predstavuje 27 % z celkovej výmery poľnohospodárskej pôdy (MPRV SR, 2023). Z týchto údajov je zreteľné, že trávne porasty sa významnou mierou podieľajú na sekvestrácii uhlíka v pôde a regulácii živín. Pravidelné sledovanie, výskum a hodnotenie obsahu POC a makroživín v trávnych porastoch je zdrojom informácií o aktuálnom stave a schopnosti sekvestrovať uhlík v pôde trávnych porastov s rôznym manažmentom. Súčasne sa vytvára poznatková báza dôležitá pre plnenie európskych smerníc ako je napr. smernica EÚ č. 2018/2001 o monitoringu vplyvu redukcie odpadovej biomasy a zvyškov z poľnohospodárskej pôdy na zásoby uhlíka v pôde, a plánov manažmentu zachovania kvality pôdy a uhlíka.

Cieľom príspevku bolo zhodnotiť obsah POC a makroživín v lúčnych a pasienkových porastoch nachádzajúcich sa odlišných pôdnych a klimatických podmienkach.

Materiál a metódy

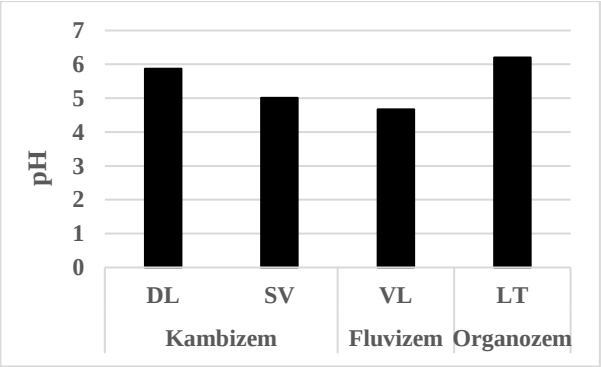
Hodnotenie obsah POC a makroživín prebiehalo na trvalých trávnych porastoch v rokoch 2019-2022 na lokalitách Dolná Lehota, Suchý vrch, Veľká lúka a Liptovská Teplička. Na každej lokalite boli odobrané pôdny vzorky v dvoch opakovaniach z hĺbky 0 - 10 cm. Stanovenie základných agrochemických vlastností pôdy (pH_{KCl}, humus, POC, N_t, P, K, Mg, Ca) sa vykonal podľa Vyhlášky ministerstva pôdohospodárstva SR z 21.marca 2016 Zz.č.151/2016 v laboratóriu NPPC – VÚRV - ÚTPHP Banská Bystrica nasledovne: výmenná pôdna reakcia v KCl (pH_{KCl}) potenciometricky, celkový dusík mineralizáciou v kyseline sírovej za prítomnosti zmesného katalyzátora K_2SO_4 a $CuSO_4$ a následnej analýzy na prietokovom analyzátore Skalár, organický uhlík C_{ox} oxidáciou chromsírovou zmesou a množstvo nespotrebovaného dichrómanu sa stanovil titračne. Extrakcia prijateľných živín (P, K) z pôdy sa uskutočnila podľa Melicha III. K sa stanovil plameňovou fotometriou, P kolorimetricky na prietokovom analyzátore Skalár.

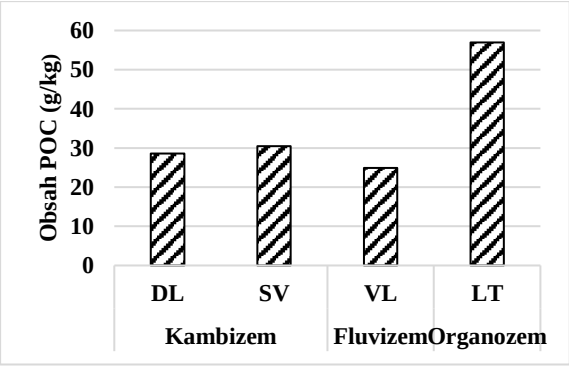
Tabuľka 1 Charakteristika lokalít

Lokalita	Dolná Lehota	Suchý vrch	Veľká Lúka	Liptovská Teplička
Okres	Brezno	Banská Bystrica	Zvolen	Poprad
Geomorfologické členenie	Nízke Tatry	Kremnické vrchy	Zvolenská kotlina	Nízke Tatry
Nadmorská výška [m]	480	420	308	990
Agroklimatická oblasť	mierne teplá	teplá	teplá	chladná
Agroklimatický okrsok	M5 mierne teplý, vlhký s chladnou až studenou zimou	T7 teplý , mierne vlhký s chladnou zimou	T7 teplý , mierne vlhký s chladnou zimou	C1 Chladný
Pôdny typ	kambizem	kambizem	fluvizem	organozem
Využitie trávneho porastu	pasienok extenzívne využívaný ovcami	3 kosné využitie	3 kosné využitie	2 kosné využitie

Výsledky a diskusia

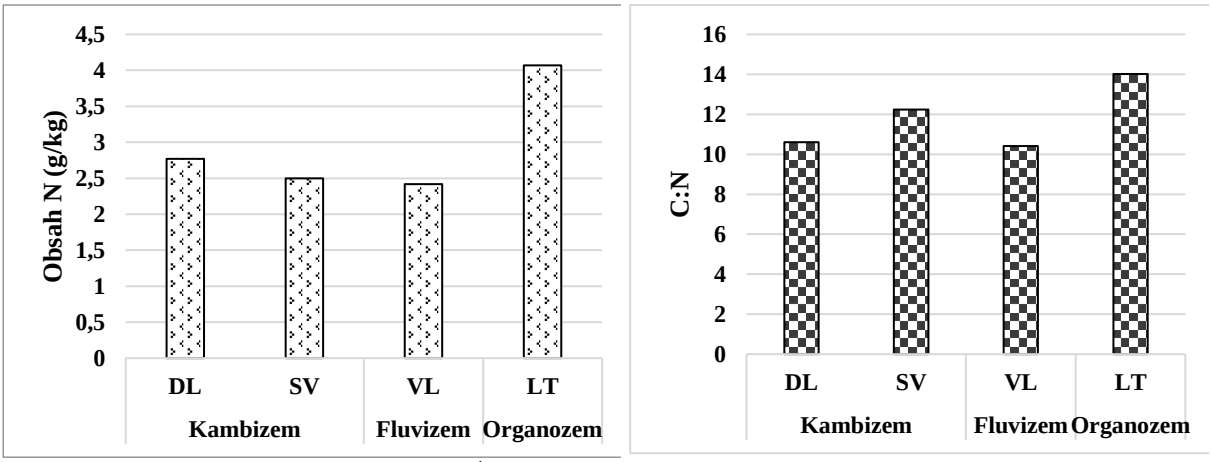
Priemerné hodnoty pôdnej reakcie sa pohybovali od veľmi kyslej (pH 4,67) na Veľkej Lúke po neutrálnu (pH 6,20) na organozemi v Litovskej Tepličke (obrázok 1). Kyslá pôdna reakcia na Veľkej Lúke a na Suchom vrchu môže byť pravidelné dlhodobé trojkosné využívanie trávneho porastu, ktoré odčerpáva živiny z pôdy a prispieva k acidifikácii pôdy (Vargová a kol., 2020).





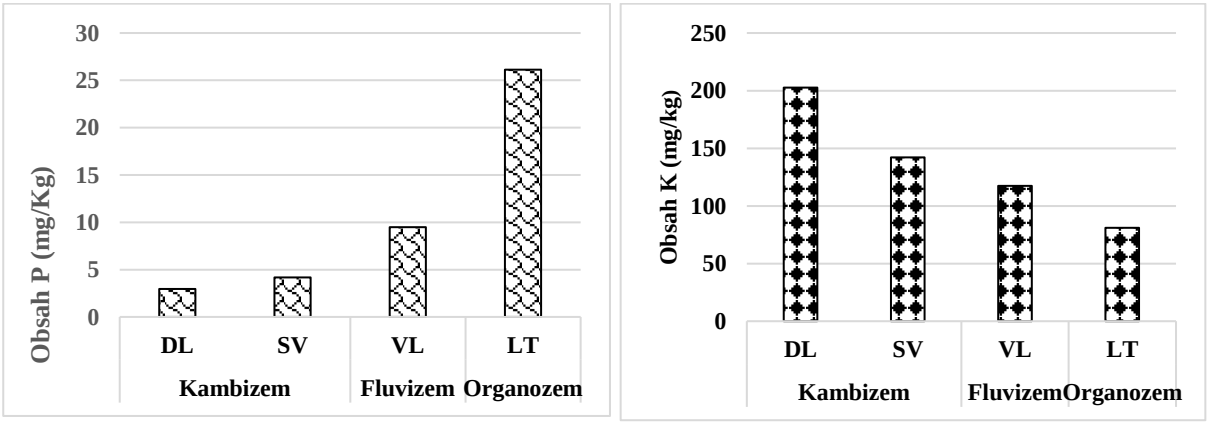
Obrázok 1 Pôdna reakcia a obsah POC (g.kg^{-1}) na sledovaných lokalitách

Obsah POC bol vysoký až veľmi vysoký a varíroval od 24,91 g.kg^{-1} na Veľkej Lúke do 56,98 g.kg^{-1} v Liptovskej Tepličke. Podobne ako obsah POC aj obsah celkového dusíka v pôde dosahoval na všetkých lokalitách priaznivé hodnoty (obrázok 2). Vysoké hodnoty POC sa premietli do priaznivého pomeru C:N: Hodnoty C:N sa pohybovali od 10,61 na kambizemi v Dolnej Lehote do 14,02 na organozemi v Liptovskej Tepličke a poukazujú na priaznivý pomer medzi mineralizáciou a imobilizáciou dusíka v pôde.



Obrázok 2 Obsah celkového N ($g.kg^{-1}$) a pomer C:N na sledovaných lokalitách

Z hľadiska zásobenia živinami možno vidieť rozdielny trend medzi pôdnymi typmi, lokalitou aj manažmentom. Pre kambizeme bola charakteristická veľmi nízka koncentrácia prijateľného P a naopak organozem v Liptovskej Tepličke sa vyznačovala nedostatočnou zásobou prijateľného K (obrázok 3).



Obrázok 3 Obsah prijateľného P a prijateľného K ($mg.kg^{-1}$) na sledovaných lokalitách

Analýza variancie ukázala, že všetky hodnotené pôdne parametre boli ovplyvnené pôdnym typom (tabuľka 2). Najnižší obsah POC na Veľkej Lúke korešponduje s tvrdením, že fluvizeme sú mladé pôdy so slabou tvorbou a akumuláciu humusu (Kanianska, 2012). V našej štúdii sa nepotvrdil signifikantný vplyv pasenia na akumuláciu POC v pôde, čo je v rozpore so štúdiou (Nadal Romero akol., 2021), ktorá zistila vyšší obsah POC na trávnych porastoch s nízkym zaťažením. Pri hodnotení vplyvu pasenia na obsah živín v pôde bol evidovaný jedine štatisticky významne vyšší obsah K na pasienkovom poraste v Dolnej Lehote v porovnaní s kosenými lúčnymi porastami na Suchom vrchu, Veľkej Lúke a v Liptovskej Tepličke.

Tabuľka 2 Analýza variancie vlastností pôdy

Pôdne vlastnosti	Lokalita		Pôdny typ		Manažment	
df	3		2		1	
	F	P	F	P	F	P
pH	10,60	**0,053**	9,21	**0,002**	1,39	0,248
POC	96,18	0,391	145,84	**0,004**	3,51	0,073
N_{tot}	18,28	0,388	26,72	**< 0,0001**	0,96	0,334
C:N	14,77	**0,035**	15,99	**< 0,0001**	4,79	**0,038**
P	31,81	0,345	49,38	**< 0,0001**	7,40	**0,011**
K	84,38	**< 0,0001**	28,85	**< 0,0001**	58,10	**< 0,0001**

Záver

Akumulácia POC v trvalých trávnych porastoch dosahuje vysoké až veľmi vysoké hodnoty. Hodnotenie vplyvu manažmentu a pôdneho typu ukázalo signfikantný efekt pôdneho typu na obsah POC, K, P aj N. Extenzívne pasenie nepreukázalo jednznačný vplyv na akumuláciu POC v porovaní s lúčnym využívaním. Vysoko preukazný efekt malo pasenie na vysokú koncetráciu prijateľného K v pôde.

Literatura

Bai, Y., Cotrufo, M.F. (2022): Grassland soil carbon sequestration: Current understanding, challenges, and solutions. Science, 377, 603-608.

Barančíková, G., Koco, Š. (2022): Sekvestrácia pôdneho organického uhlíkana poľnohospodárskej pôde. Dostupné na: https://www.agroporadenstvo.sk/nove-poznatky-poda?article=2603

Barančíková, G., Koco, Š., Takáč, J., Makovníková, J., and Kizeková, M. (2023): Modelling of soil organic carbon dynamic on grassland under different management and climate scenarios. Agriculture (Poľnohospodárstvo), 69, 105–117.

Corbett, D., Wall, D.P., Lynch, M.B., Tuohy, P. (2022): The influence of phosphorus application and varying soil pH on soil and herbage properties across a range of grassland soils with impeded drainage. The Journal of Agricultural Science, 160, 516–527.

Elias, D. M., Mason, K. E., et al. (2023): The potential to increase grassland soil C stocks by extending reseeding intervals is dependent on soil texture and depth. Journal of Environmental Management, 334, 117465.

Guo, Y., Jiang, M., Liu, Q., Xie Z., Tang, Z. (2020): Climate and vegetation together control the vertical distribution of soil carbon, nitrogen and phosphorus in shrublands in China. Plant Soil, 456, 15-26.

Kanianska, R. (2012): Environmentálna pedológia a manažment ochrany pôdy. Banská Bystrica: UMB. 216s. ISBN 978-80-557-0460-92012

Kayser, M., Isselstein, J. (2005): Potassium cycling and losses in grassland systems: a review. Grass and Forage Science 60: 213-224.

Kizeková, M., Britaňák, N., IlavskÁ, I., Pollák, Š., Jančová, Ľ., Hanzes, Ľ., Barančíková, G., Koco, Š., Takáč, J., Makovníková, J. (2023): Udržateľný manažment a modelovanie zásob uhlíka dočasných a trvalých trávnych porastov. Metodická príručka. 1. vyd. Banská Bystrica: NPPC-VÚRV-ÚTPHP. 108 s. ISBN 978-80-89800-22-

MPRV SR. (2016): Vyhláška ministerstva pôdohospodárstva SR z 21.marca 2016 Zz.č.151/2016.

MPRV SR. (2023): Správa o poľnohospodárstve a potravinárstve v Slovenskej republike za rok 2022. Dostupné na: https://www.mpsr.sk/zelena-sprava-2023/122---18997/

Nadal Romero, E., Rubio, P., Kremyda, V., Absalah, S., Cammeraat, E., Jansen, B., Lasanta, T. (2021): Effects of agricultural land abandonment on soil organic carbon stocks and

composition of soil organic matter in the Central Spanish Pyrenees. Catena 2021, 205, 105441

Nie, X., Xiong, F., Yang, L., Li, C., Zhou, G. (2017): Soil nitrogen storage, distribution, and associated controlling factors in the northeast Tibetan plateau shrublands. *Forests 8, 416*.

Vargová, V., Kanianska, R., Kizeková, M., Šiška, B., Kováčiková, Z., Michalec, M. (2020): Changes and Interactions between Grassland Ecosystem Soil and Plant Properties under Long-Term Mineral Fertilization. In Agronomy 2020, 10, 375;

Vitousek, P. M.; Howarth, R. W. (1991): Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? Biogeochemistry 13, 87–115.

Poděkování

Táto práca vznikla s podporou projektu REPowerEU a ÚOP MPRV SR „Vypracovanie plánov monitoringu vplyvu redukcie odpadovej biomasy a zvyškov z poľnohospodárskej pôdy na zásoby uhlíka v pôde pre účely plnenia Smernice EÚ č. 2018/2001“.

Kontakt:

Ing. Miriam Kizeková, PhD.
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum,
Výskumný ústav rastlinnej výroby,
Ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva
Mládežníkca 36, 974 21 Banská Bystrica
Tel.: + 421 48 310 026, e-mail: miriam.kizekova@nppc.sk

Využití hydrolyzátů z odpadních surovin v zemědělství a rekultivaci krajiny

Use of hydrolysates from waste raw materials in agriculture a landscape reclamation

Koprna R.[1], Špíšek Z.[1], Humplík J.F.[1], Weger J.[2], Mík V.[1], Pospíšil T.[1], Šolcová O.[3], Dlasková M.[3]

[1] Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra chemické biologie, [2] Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., [3] Ústav chemických procesů AV ČR, v.v.i.

Abstrakt

Hydrolyzáty z odpadních surovin (HZ), byly ověřeny v pokusech s jarním ječmenem, ozimou pšenicí a rychle rostoucími dřevinami (RRD). HZ byly aplikovány na osivo, postřikem i zálivkou samotně, nebo v kombinaci s cytokininem. Z výsledků vyplynulo, že HZ mohou být účelně využity, pro zvýšení výnosu obilnin i zakořenění a rychlejší růst RRD. Po aplikaci HZ, došlo také ke zvýšení obsahu chlorofylu v rostlinách. Využití HZ poukázalo, na možnosti následného efektivního využití rostlinných a živočišných odpadů v zemědělské produkci.

Klíčová slova: hydrolyzáty, obilniny, rychle-rostoucí dřeviny, chlorofyl, aminokyseliny

Abstract

Hydrolyzates from waste raw materials (HZ) were verified in experiments with spring barley, winter wheat and fast-growing woody plants (RRD). HZ were applied to the seed, by spraying and watering alone, or in combination with cytokinin. The results showed that HZ can be effectively used to increase the yield of cereals as well as rooting and faster growth of RRD. After the application of HZ there was also an increase in the chlorophyll content in the plants. The use of HZ pointed to the possibilities of subsequent effective use of plant and animal waste in agricultural production.

Keywords: hydrolyzates, cereals, fast-growing woody plants, chlorophyll, amino acids

Úvod

V konvenčním i ekologickém zemědělství, se biostimulanty na bázi aminokyselin, stávají stále běžnějšími v aplikacích, pro zlepšení růstu a výnosu plodin. Mnoho biostimulantů vzniká hydrolýzou bílkovin, přičemž tento proces spočívá v rozbití peptidových vazeb, což vede k uvolnění jednotlivých aminokyselin. Hydrolýza může probíhat různými metodami, a to chemickou hydrolýzou, která využívá kyseliny nebo zásady, nebo enzymatickou hydrolýzou, pomocí specifických enzymů. Chemická hydrolýza však často znamená zvýšené množství solí ve výsledném produktu, což může ovlivnit jeho kvalitu (Simpson et al., 1976). Alternativou je šetrná hydrolýza s použitím slabé karboxylové kyseliny, která efektivně rozkládá živočišné bílkoviny (odpad ze zpracování kuřecího masa a peří, vlny a dalších organických zbytků) a minimalizuje negativní dopady na kvalitu výsledného hydrolyzátu (Šolcová et al., 2021; Hanika et al., 2021). Při této hydrolýze byla použita kyselina jablečná, výsledný produkt obsahoval v závislosti na zdrojovém materiálu 23,3 – 36,9 g proteinu v 1 l, přičemž byla dominantní kyselina asparagová (57,9 – 64,5 %). Významnější bylo zastoupení serinu (3,1 – 9,6 %), prolinu (2,3 – 7,3 %) a alaninu (3,0 – 5,1 %). Zbylé aminokyseliny, byly zastoupeny do 5 % podílu. Z pohledu vhodného poměru aminokyselin pro polní plodiny, je možné využít i další suroviny, jako jsou pivovarské kvasnice, sladový květ a další vedlejší suroviny po zpracování živočišných a rostlinných produktů. Tyto hydrolyzáty, mohou sloužit jako základní nebo doplňková složka biostimulantů, které podporují růst a zakořeňování rostlin, včetně rychle rostoucích dřevin

(Špíšek et al., 2024). Zvláště zajímavé, se pak jeví i kombinace s fytohormony (cytokininy) a kyselinou gama-aminomáselnou (GABA).
Řada experimentů s foliární aplikací hydrolyzátů, potvrdila jejich pozitivní vliv na výnos a odolnost polních plodin a zeleniny, stejně jako zvýšení odolnosti vůči abiotickým stresům. Aminokyseliny, jako prolin, arginin, nebo glutamát, zvýšily obsah osmoprotektantů a odolnost rostlin vůči vodnímu stresu (Farroq et al., 2017; Franzoni et al., 2021). Jednotlivé aminokyseliny, mají známé účinky na rostliny po jejich foliární aplikaci. Například prolin, je znám svým antistresovým účinkem, alanin a arginin zvýšením odolnosti proti nízkým teplotám, glutamin působí jako růstový stimulátor, glycin jako prekurzor tvorby chlorofylu, glycin-betain vykazuje osmoprotektivní účinky, zejména při vodním stresu, serin a valin působí jako prekurzor tvorby auxinů (Nephali et al., 2020). Tryptofan, působí jako prekurzor auxinu, může stimulovat jeho syntézu v rostlinách i půdních bakteriích a podílet se tak na zlepšování stresové tolerance (Colla et al., 2017). Popko et al. (2018), sledoval vliv aplikace aminokyselin na tvorbu odnoží a počet zrn v klasech. Byl zjištěn vyšší počet odnoží (až o 50 %), což mohlo být způsobeno pozdní aplikací přípravků. Výnos zrna byl u jednotlivých variant vyšší o 2,0 – 11,0 % nad neošetřenou kontrolu. Zvýšil se také počet klasů na 1 m^2, a to na 4,0 – 17,3 % oproti kontrole. Aplikace biostimulantů (i těch na bázi aminokyselin), může vykazovat různou účinnost, v závislosti na ročníku. Foliární aplikace aminokyselin na pšenici, výrazně zvýšila počet odnoží, počet klasů na ploše, počet zrn v klasech, HTZ i výnos zrna (El Said, Mahdi, 2016). Výsledky prokázaly možnost mírného snížení výživy dusíkem při foliární aplikaci aminokyselin. Postřik ječmene v BBCH 21-23 přípravkem na bázi aminokyselin, významně zvýšil výnos zrna o 0,15 – 0,47 $t.ha^{-1}$ (Pranckietiené et al., 2015). Pozdější aplikace (v BBCH 26-29 a 32-35) zvýšily také výnos zrna, výrazněji se ale zvýšil obsah dusíku v rostlinách.
Byl zjištěn i pozitivní účinek hydrolyzátů, na velikost kořenového systému. Po aplikaci hydrolyzátů na kukuřici, došlo k navýšení plochy postranních kořenů na 1,5 – 7 násobek kontrolní varianty (Santi et al., 2017). Aplikace aminokyselin v pšenici, zvýšila obsah odnoží z 1,89 na 2,11 až 2,44, hmotnost sušiny kořene z 0,37 – 0,47 na 0,44 – 0,67 g. Ve všech variantách po ošetření, došlo také ke zvýšení obsahu chlorofylu a + b. Zvýšil se také počet klasů na 1 m^2, počet zrna v klasech, HTZ a výnos zrna z 1 ha (Hammad et al., 2016). Rostliny kukuřice, ošetřené chelatovaným Fe^+ s hydrolyzátem z kolagenní suroviny, měli ve stresových podmínkách větší kořenový systém o 37,6 až 78,1 %, délka kořene se po aplikaci zvýšila o 67 %. Hodnota SPAD byla po 4 dnech od ošetření vyšší o 37,5 a 42 %, po 7 dnech o 18,7 % (Ambrosini et al., 2021). Pokusy na rajčatech a využití hydrolyzátů jako prevence proti abiotickému stresu, zkoumali i Paul et al. (2019). Hydrolyzát, vyrobený enzymatickou hydrolýzou ze semen luštěnin, aplikovaný formou zálivky i postřiku, zvýšil nejen růst biomasy, ale i toleranci rostlin k oxidativnímu stresu. Tyto výsledky potvrdily i měření fluorescence chlorofylu, u takto ošetřených rostlin. Zaznamenána byla ale také ochranná či preventivní funkce vůči biotickým stresům, jako je *Bortrytis cinera* (Jindo et al., 2022).

Materiál a metody

Použitý materiál: biostimulanty na bázi hydrolyzátů (*HZ*), byly získány z odpadních a vedlejších surovin po zpracování surovin rostlinného a živočišného původu. *H-P* je hydrolyzát, získaný z odpadního peří z drůbežáren. Hydrolýza proběhla pomocí kyseliny jablečné, v inertní atmosféře bez kyslíku, následným zahřátím směsi na 90 až 150 °C, tlak min. 0,1 MPa po dobu 5 až 8 hodin. *H-M* je hydrolyzát z peří, hrudních chrupavek a kuřecího odpadu po oddělení masa, *H-R* je hydrolyzát z rybích zbytků po zpracování. Hydrolýza byla provedena v inertní atmosféře za pomocí kyseliny jablečné po dobu 5 hodin a teplotě 140 °C. *H-P* a *H-M*, byly vyrobeny na pracovišti Ústavu chemických procesů AV ČR, v.v.i. *H-PK* je hydrolyzát, vyrobený z pivovarských kvasnic, hydrolýza proběhla pomocí 50 % KOH, doba hydrolýzy byla 15 hod, teplota 145 °C. Složení HZ je uvedeno v Tab. 1. *CK* je cytokininový derivát (2F-3MeO-

BAP), který byl rozpuštěn v DMSO na poté naředěn v poměru 1:1000 do vodného roztoku a konečné koncentraci 5 µMol. *H-PK* a *CK* byly vyrobeny na Univerzitě Palackého v Olomouci.

Tab. 1: obsah hlavních aminokyselin ve vzorcích (mg.l^{-1})

	Ala	Arg	Asp	Phe	Glu	Gly	His	Ile+ Leu	Lys	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	*Suma*
H-PK	3229	979	0	425	749	1014	235	1545	ND	246	129	386	606	842	*12179*
H-R	49,6	38,8	925	21,7	1,6	71,3	120,9	32,6	69,8	40,3	27,9	24,8	14,0	57,4	*1550,0*
H-P	95,8	22,5	1194	48,8	ND	69,5	28,2	54,5	47,0	75,1	92,0	37,6	35,7	52,6	*1878,0*
H-M	28,4	25,9	459	14,6	16,2	40,5	16,2	31,6	28,4	16,2	27,5	25,9	12,2	25,9	*810,0*

Polní testování: Polní pokusy, byly provedeny podle metodiky GEP (Good Experimental Practice) a byly zasety na ploše 10 m^2 na každou variantu v počtu 5 randomizovaných opakování. Látky, byly aplikovány formou 1) moření (celková dávka mořidla byla 10 ml roztoku na 1 kg osiva) a 2) postřikem (celková dávka 300 l.ha^{-1}). Jarní ječmen – odrůda Francin (Selgen a.s.), výsevní množství 3,5 MKS.ha^{-1}, ozimá pšenice – odrůda Turandot (Selgen a.s.), výsevní množství 3,5 MKS.ha^{-1}. Aplikace látek postřikem byla provedena ve fázích BBCH 22-25 (začátek až plné odnožování), BBCH 32-33 (sloupkování 2. – 3. kolénko hmatné), BBCH 37-45 (praporcový list) a BBCH 51-61 (metání až začátek kvetení). Odnože byly hodnoceny odběrem 5 rostlin z každého opakování (celkem 25 rostlin) ve fázi BBCH 33-35, počet klasů byl hodnocen na 1 m^2 v každém opakování ve fázi BBCH 61-65. Hladiny statistické průkaznosti byly počítány pro $p \leq 0{,}05$-$0{,}01$ [*] a $p \leq 0{,}01$ [**].
Pokus s rychle rostoucími dřevinami (RRD): Pokus byl založen ve 12 nádobách o objemu 4 litry na každou variantu, do kterých byla umístěna zemina dovezená z výsypek. Obsah prvků byl: 29 mg P.kg^{-1}, 294 mg K.kg^{-1}, 5.994 mg Ca.kg^{-1}, 467 mg Mg.kg^{-1}, 2,67 mg Cox.kg^{-1}. Do homogenizovaného substrátu byly umístěny osové řízky druhu ***Populus nigra* × *Maximowiczii J-105***, každý řízek měl dvě vitální očka. Před výsadbou byly řízky macerovány po dobu 16 hod v roztoku *HZ*, příp. *HZ* s *CK*. Během pokusu, byl měřen nárůst nadzemní biomasy a průměr řízků. Biometrická data, byla vyhodnocena a konci experimentu.

Měření obsahu chlorofylu: Byl měřen parametr relativního obsahu chlorofylu, pomocí chlorofylmetru SPAD-502, bez nutnosti extrakce pigmentů. Hodnoty naměřené chlorofylmetrem, byly počítány z propustnosti listu pro vlnové délky – 650 nm a 940 nm. Měření bylo prováděno na poslední třetině praporcového listu, bylo provedeno 5 měření a vypočtena průměrná hodnota. V každé variantě, bylo změřeno 20 rostlin, měření bylo provedeno 10. den po aplikaci látek.

Výsledky a diskuze

Nanesení HZ na osivo (moření osiva), mělo pozitivní vliv na výnos zrna u ozimé pšenice (101,95 a 105,96 % na kontrolu) i jarního ječmene (110,66 a 106,28 % na kontrolu). Z hlediska výnosotvorných parametrů, u ječmene se mírně zvýšil počet klasů na 1 m^2 (Tab. 2.) Výsledky korespondují s informacemi od distributorů aminokyselinových biostimulantů, kteří tyto přípravky doporučují pro jejich pozitivní vliv na výnos i ve formě ošetření osiva. Rozsáhlejší vědecká studie vlivu aminokyselin na moření osiva však provedena nebyla.

Tab. 2: Výnos obilnin po aplikaci hydrolyzátů na osivo

plodina, odrůda, sklizňový rok	látka	forma aplikace / dávka	Výnos zrna ($t.ha^{-1}$) při 14 % vlhkosti	% na kontrolu	T-Test	počet klasů na 1 m^2	% na kontrolu	T-Test
Pšenice ozimá - Turandot, sklizeň 2024	**kontrola**		**9,71**	**100,00**		621,00	100,00	
	H-P	moření osiva 5 l/t	**9,90**	**101,95**	*0,663*	590,00	95,01	*0,529*
	H-PK	moření osiva 2 l/t	**10,29**	**105,96**	*0,405*	624,00	100,48	*0,911*
Ječmen jarní - Francin, sklizeň 2024	**kontrola**		**7,37**	**100,00**		703,20	100,00	
	H-P	moření osiva 5 l/t	**8,16**	**110,66 ***	*0,049*	750,40	106,71	*0,153*
	H-R	moření osiva 5 l/t	**7,84**	**106,28**	*0,169*	717,60	102,05	*0,563*

Foliární aplikace HZ v ječmeni, měla téměř u všech variant pozitivní vliv na výnos zrna (109,23 až 112,13 % na kontrolu v roce 2024 a 97,29 až 111,31 % v roce 2023) (Tab. 3.). Z hlediska termínu aplikace, nebyly zjištěny významné rozdíly ve výnosu zrna. U většiny variant, došlo k mírnému zvýšení počtu klasů na 1 m^2, zejména v roce 2023 (99,87 – 108,65 % na kontrolu). Tyto zjištěné výsledky, korespondují se experimenty Popka et al. (2018), když zjistili, že výnos zrna byl po aplikaci HZ vyšší až o 11 %. Nejvýhodnější z hlediska výnosu, se jevila aplikace látek v termínu BBCH 37-45 a pozdní aplikace v BBCH 51-61. Vhodnost aplikace HZ ve fázi BBCH 37-45, koresponduje se závěry Pranckietiené et al. (2015), kdy byly vhodné termíny k aplikaci od BBCH 21 do BBCH 35. HZ s přídavkem CK, měl výnos zrna nižší, než varianty bez CK (103,16 % na kontrolu).

Tab. 3: Výnos ječmene po aplikaci hydrolyzátů v letech 2023 a 2024

plodina, odrůda, slizňový rok	**látka**	dávka na 1 ha	fáze aplikace (BBCH)	**Výnos zrna ($t.ha^{-1}$) při 14 % vlhkosti**	**% na kontrolu**	*T-Test*	počet klasů na m^2	% na kontrolu	*T-Test*
Jarní ječmen - Francin, sklizeň 2024	**Kontrola**		37-45	7,37	100,00		725,60	100,00	
	H-R	4,0 l/ha	37-45	8,17	110,77	*0,11*	690,40	95,15	*0,27*
	H-P	4,0 l/ha	37-45	8,11	110,01	*0,13*	711,20	98,02	*0,75*
	H-M	4,0 l/ha	37-45	8,05	109,23	*0,13*	728,80	100,44	*0,91*
	H-PK	4,0 l/ha	37-45	8,27	112,13	*0,06*	748,50	103,16	*0,69*
Jarní ječmen - Francin, sklizeň 2023	**Kontrola**			7,77	100,00		620,00	100,00	
	H-P	5,0 l/ha	32-33	8,20	105,58	*0,11*	667,20	107,61	*0,26*
	H-P	5,0 l/ha	37-45	8,36	107,58	*0,09*	673,60	108,65	*0,19*

	H-P	5,0 l/ha	51-61	8,41	108,23	*0,20*	645,50	104,11	*0,47*
	H-P + CK	5,0 l/ha +5 µMol	51-61	8,02	103,21	*0,56*	655,20	105,68	*0,40*
	H-M	5,0 l/ha	34-45	8,20	105,52	*0,25*	619,20	99,87	*0,89*
	H-M	5,0 l/ha	51-61	7,56	97,29	*0,69*	645,60	104,13	*0,50*
	H-R	5,0 l/ha	51-61	8,65	111,31*	*0,05*	663,50	107,02	*0,15*

Foliární aplikace HZ v ozimé pšenici, zvýšila výnos zrna, zejména po časnějších aplikacích (v BBCH 22 – 25) (Tab. 4). Toto potvrdily i výsledky aplikace v roce 2023, kdy byl hydrolyzát H-P, aplikován v několika termínech a nejvyšší výnos byl dosažen u aplikace v BBCH 22-25 (103,67 a 103,96 % na kontrolu). Ke statisticky průkaznému rozdílu ve výnosu, došlo po aplikaci H-P + CK ve fázi odnožování (BBCH 22-25) a to 106,22 % na kontrolu. U většiny variant, došlo také ke zvýšení počtu klasů na 1 m^2. Zvýšení výnosu v roce 2023 bylo po aplikaci HZ nižší, pravděpodobně i z důvodu velmi vysokého výnosu v tomto ročníku (13,79 t/ha u kontroly). Ke stejnému závěru (zvýšení výnosu a odnoží), došli i Popko et al. (2018) a El Said (2016).

Tab. 4: Výnos pšenice po aplikaci hydrolyzátů v letech 2023 a 2024

plodina, odrůda, slizňový rok	**látka**	dávka na 1 ha	fáze aplikace (BBCH)	**Výnos zrna ($t.ha^{-1}$) při 14 % vlhkosti**	**% na kontrolu**	*T-Test*	počet klasů na m^2	% na kontrolu	*T-Test*
Pšenice ozimá - Turandot, sklizeň 2024	Kontrola			**10,11**	**100,00**		555,20	100,00	
	H-PK	2,0 l/ha	22-25	**10,16**	**100,52**	*0,914*	548,80	98,85	*0,863*
	H-P	4,0 l/ha	22-25	**10,44**	**103,25**	*0,651*	578,40	104,18	*0,470*
	H-P + CK	4,0 l/ha +5 uMol	22-25	**10,74**	**106,22 ***	*0,047*	607,20	109,37	*0,258*
	H-P	4,0 l/ha	32-33	**10,50**	**103,81**	*0,192*	583,20	105,04	*0,605*
	H-R	4,0 l/ha	32-33	**10,17**	**100,56**	*0,942*	572,80	103,17	*0,679*
	H-PK	4,0 l/ha	32-33	**10,51**	**103,96**	*0,431*	572,80	103,17	*0,679*
Pšenice ozimá - Turandot, sklizeň 2023	Kontrola			**13,79**	**100,00**		667,20	100,00	
	H-P	4,0 l/ha	22-25	**14,29**	**103,67**	*0,355*	689,60	103,36	*0,461*
	H-P + CK	4,0 l/ha +5 uMol	22-25	**14,33**	**103,96**	*0,272*	721,60	108,15	*0,762*
	H-P	4,0 l/ha	32-33	**13,79**	**100,07**	*0,984*	653,60	97,96	*0,336*
	H-P	4,0 l/ha	37-45	**13,74**	**99,69**	*0,942*	674,40	101,08	*0,843*
	H-P	4,0 l/ha	51-61	**13,78**	**99,96**	*0,992*	672,80	100,84	*0,843*

Při hodnocení počtu odnoží po aplikaci HZ ve fázi BBCH 22-25, byl zjištěn pozitivní vliv HZ na počet silných (produktivních) odnoží (tab. 5.). V roce 2024, byl významný nárůst silných

odnoží (110,3 – 113,8 % na kontrolu), v roce 2023 zase středních odnoží (135,1 a 162,2 % na kontrolu). V roce 2023, došlo k výraznějšímu nárůstu celkového počtu odnoží. Na tomto příkladu, byl patrný ročníkový vliv na jednotlivé odnože. Přídavek CK zvýšil počet produktivních odnoží v roce 2023 na 106,7 % oproti kontrole, tento nárůst ale nebyl nijak statisticky významný. Ke stejným závěrům, tedy zvýšení počtu odnoží po aplikaci aminokyselin, dospěli i Hammad et al. (2016) a Popko et al. (2018).

Tab. 5: Počet jednotlivých odnoží u pšenice po aplikaci hydrolyzátů v letech 2023 a 2024

plodina, odrůda, slizňový rok	Látka + dávka na 1 ha	fáze aplikace (BBCH)	silné odnože (n)	% na kon.	střední odnože (n)	% na kon.	slabé odnože (n)	% na kon.	Suma odnoží (n)	% na K
Pšenice ozimá - Turandot sklizeň 2024	Kontrola		1,93	100,0	1,53	100,0	2,53	100,0	6,00	100,0
	H-PK 2,0 l/ha	22-25	2,13	110,3	1,73	113,0	2,13	84,2	6,00	100,0
	H-P 4,0 l/ha	22-25	2,20	113,8	1,53	100,0	2,53	100,0	6,27	104,4
	H-P 4,0 l/ha + CK 5 µMol	22-25	2,13	110,3	1,40	91,3	2,73	107,9	6,27	104,4
Pšenice ozimá - Turandot sklizeň 2023	Kontrola		2,50		1,23		3,03		6,77	
	H-P 4,0 l/ha	22-25	2,47	98,7	2,00	162,2 *	3,13	103,3	7,60	112,3
	H-P 4,0 l/ha + CK 5 µMol	22-25	2,67	106,7	1,67	135,1	3,40	112,1	7,73	114,3

Z hlediska obsahu chlorofylu, byla zjištěna vyšší hodnota SPAD u variant, po aplikaci *H-R* a *H-P* (106,56 a 103,66 % na kontrolu). V obou případech se jednalo o statisticky průkazné zvýšení obsahu chlorofylu (Tab. 6). Zvýšenou hodnotu SPAD zjistili po aplikaci aminokyselin a HZ i Jindo et al. (2022), Paul et al. (2019) i Ambrosini et al. (2021). Vliv těchto látek byl výraznější v letech, kdy došlo k fyziologickému stresu rostlin.

Tab. 6: Obsah chlorofylu na jarním ječmeni a ozimé pšenici v roce 2024 po aplikaci HZ

plodina, odrůda, slizňový rok	látka	dávka na 1 ha	fáze aplikace (BBCH)	Chlorofyl - SPAD (hodnota)	% na kontrolu	T-Test
Jarní ječmen - Francin, sklizeň 2024	Kontrola		BBCH 37-45	48,63	100,00	
	H-R	4,0 l/ha	BBCH 37-45	51,82 **	106,56	0,000
	H-P	4,0 l/ha	BBCH 37-45	50,41 *	103,66	0,020
	H-M	4,0 l/ha	BBCH 37-45	47,45	97,58	0,330
	H-PK	4,0 l/ha	BBCH 37-45	49,47	101,74	0,400
Pšenice ozimá	Kontrola			51,08	100,00	

- Turandot, sklizeň 2024	H-P	4,0 l/ha	BBCH 32-33	56,06 **	109,75	0,0064
	H-R	4,0 l/ha	BBCH 32-33	53,18	104,11	0,0602
	H-PK	4,0 l/ha	BBCH 32-33	53,40	104,54	0,9158

Výsledky použití HZ u rychle-rostoucích dřevin (RRD), prokázaly výrazný vliv testovaných látek na parametry růstu (Tab. 7). Nejlepší růstové parametry, byly zjištěny u variant H-R a H-R + CK. Nárůst kořenového systému po aplikaci HZ potvrdil i Santi et al. (2017). Lepší zakořeňování po aplikaci HZ, zjistili i Špíšek et al. (2024) a Hammad et al. (2016). Došlo zde k navýšení délky nejdelšího výhonu na 131,53, resp. 129,64 % na kontrolu a hmotnosti stonku na 142,4 a 131,85 % na kontrolu. Tento nárůst byl statisticky průkazný. U parametru průměru stonku byl, byl zjištěn pozitivní vliv CK (+ 32,61 a +12,41 % nad kontrolu).

Tab. 7: růstové parametry RRD po aplikaci hydrolyzátů zálivkou

Varianta	průměr stonku – 1. měření (mm)	délka nejdelšího výhonu 1. měření (cm)	přírůstek nejdelšího výhonu (cm)	přírůstek průměru stonku (mm)	konečný průměr stonku (mm)	konečná délka nejdelšího výhonu (cm)	hmotnost kořene (g)	hmotnost stonku (g)
kontrola	**10,91**	**30,73**	**12,77**	**1,15**	**12,06**	**43,50**	**2,25**	**2,80**
H-R	11,96	40,42	14,17	0,87	12,84	54,58	2,53	3,98
% na kontrolu	109,63	131,53 **	110,91	75,93	106,42	125,48 **	112,81	142,40 **
T-Test	0,07	0,00	0,38	0,30	0,16	0,00	0,58	0,00
H-R + CK	11,14	39,83	13,21	1,52	12,67	53,04	2,52	3,69
% na kontrolu	102,13	129,64 **	103,41	132,64	105,04	121,93 **	112,03	131,85 *
T-Test	0,70	0,00	0,78	0,23	0,36	0,01	0,61	0,02
H-PK	11,70	36,67	11,83	1,18	12,88	48,50	2,33	3,30
% na kontrolu	107,22	119,33	92,65	102,76	106,79	111,49	103,64	118,02
T-Test	0,10	0,09	0,57	0,90	0,09	0,17	0,89	0,12
H-PK + CK	10,93	32,25	12,07	1,29	12,22	44,32	1,83	2,96
% na kontrolu	100,14	104,96	94,47	112,41	101,31	101,88	81,63	105,96
T-Test	0,98	0,55	0,66	0,66	0,79	0,81	0,46	0,60

Závěr

Hydrolyzáty z odpadních surovin, mohou výrazně podpořit růst a vývoj kořenů i nadzemní biomasy, zlepšit výnosotvorné znaky a v konečném důsledku i výnos zrna. Pozitivní vliv, byl po moření osiva, postřiku na list i po zálivce. Vliv na výnos měl zejména termín aplikace a přidání cytokininu do přípravků. Ačkoliv se v některých parametrech projevil ročníkový vliv, lze považovat hydrolyzáty, za cenné zdroje aminokyselin, které mohou rostlinu chránit před fyziologickým stresem. Data budou ověřena v dalších letech a na jejich základě bude navržen přípravek pro použití v konvenčním i ekologickém zemědělství.

Literatura

Ambrosini S., Sega D., Santi Ch., Zamboni A., Varanini Z., Pandolfini T. (2021): Evaluation of the Potential Use of a Collagen-Based Protein Hydrolysate as a Plant Multi-Stress Protectant. In: Front. Plant Sci., 09 Feb. 2021, Sec. Crop and Product Phys., Vol. 12–2021.

Colla, G. et al.: Biostimulant action of protein hydrolysates: Unraveling their effects on plant phys. and microbiome. Front.Plant Sci. 8(2017). doi.org/10.3389/fpls.2017.02202

El-Said M. A. A., A.Y. Mahdy (2016): Response of Two Wheat Cultivars to Foliar Application with Amino Acids under Low Levels of Nitrogen Fertilization. Middle East Journal of Agriculture Research, Vol. 5, Issue 04, pp 462–472, ISSN 2077-4605.

Farooq M., Nawaz A., Chaudhry M., Indrasti R., Rehman A. Improving resistance against terminal drought in bread wheat by exogenous application of proline and gamma-aminobutyric acid. J. Agron. Crop Sci. 2017; 203:464–472.

Franzoni G., Cocetta G., Ferrante A. Effect of glutamic acid foliar applications on lettuce under water stress. Physiol. Mol. Biol. Plants. 2021; 27:1059–1072.

Hammad S.A., Ali O.A. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. Ann. Agric. Sci. 2014; 59:133–145.

Hanika J., Rousková M., Šabata S., Kaštánek F., Šolcová O. (2021): New Green Animal Waste Hydrolysis Initiated by Malic Acid, In: Current Biochem. Eng., 2021, Vol. 7, No. 2.

Jindo, K. et al.: Application of biostimulant products and biological control agents in sustainable viticulture: A review. Front. Plant Sci. 13 (2022).

Nephali, L. et al.: Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. Metabolites 10 (2020). DOI: doi.org/10.3390/metabo10120505

Paul K., Sorrentino M., Lucini L., Rouphael Y. et al. (2019): A combined phenotypic and metabolomic approach for elucidating the biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate on tomato grown under limited water availability. Front. Plant Sci. 10:493.

Popko M., Michalak I., Wilk R., Gramza M., Chojnacka K., Górecki H. (2018): Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. In: Molecules 2018, 23, 470.

Pranckietiené I., Mazuolyté-Miškiné E., Prancietis V., et al. (2015): The Effect of Amino Acids on Nitrogen, Phosphorus and Potassium Changes in Spring Barley Under the Conditions of Water Deficit. Zemdirbyste-Agriculture, vol. 102, No. 3 (2015), p. 265–272.

Santi C., Zamboni A., Varanini Z., Pandolfini T. (2017): Growth Stimulatory Effects and Genome-Wide Transcriptional Changes Produced by Protein Hydrolysates in Maize Seedlings. Front. Plant Sci. 2017; 8:433. doi: 10.3389/fpls.2017.00433.

Simpson R.J., Neubberger M.R., Liu T.Y. (1976): Complete Amino Acid Analysis of Protein from a Single Hydrolysate. In: The Journal of Biological Chemistry, Vol. 251, No. 7. Issue April 10, pp. 1936-1940, 1976.

Šolcová O., Knapek J., Wimmerová L., Vávrová K. et al. (2021): Environmental aspects and economic evaluation of new green hydrolysis method for waste feather processing. In: Clean Technol. and Environmental Policy, Springer, doi.org/10.1007/s10098-021-02072-5.

Špíšek Z., Koprna R., Weger J., Humplík J. Možnosti využití hydrolyzátů z odpadních surovin při pěstování rychle rostoucích dřevin. Agromanuál. 12/2023.

Dedikace: Výsledky byly získány za podpory projektu NCK/NPO č. TN02000044 „Biorafinace a cirkulární ekonomika pro udržitelnost“.

Kontakt: Ing. Radoslav Koprna, Ph.D.
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta – Katedra chemické biologie
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc - Holice
Tel: 585 63 4945
e-mail: radoslav.koprna@upol.cz

Vliv nezapraveného kompostu na pěstování silážní kukuřice

The influence non-inversion of compost on silage maize cultivation

Král M., Dvořák P., Vršťala J.

ČZU Praha

Abstrakt

V 3-letém poloprovozním polním pokusu byl ověřován vliv aplikace kompostu ve zvýšené dávce 200 t/ha, ponechané na povrchu půdy při pěstování silážní kukuřice. Provedená měření neukázala významné ovlivnění obsahu rizikových prvků. Aplikace kompostu neměla průkazný vliv ani na jednotlivé výnosové prvky, výnos siláže a obsah makroživin v rostlinách. Pouze u výšky rostlin, počtu listů a hmotnosti listů a stonků na rostlinu byl ve srovnání s kontrolou zaznamenán pozitivní trend nárůstu. Jediný parametr ovlivněný aplikací kompostu byl obsah sušiny v zelené hmotě, který byl ve srovnání s kontrolou průkazně vyšší. V pokusném roce 2024 byl ještě zaznamenán u půdních vzorků varianty s kompostem pozitivní trend nárůstu dusíku ve srovnání s kontrolou.

Klíčová slova: mulč, výnos, siláž, rizikové prvky, dusík

Abstract

In a 3-year semi-operational field trial, the effect of applying compost at an increased rate of 100 t/ha left on the soil surface when growing forage maize was tested. The measurements made showed no significant influence on the content of risk elements. The application of compost did not have a conclusive effect on individual yield elements, silage yield and plant macronutrient content. Only plant height, number of leaves and weight of leaves and stems per plant showed a positive increasing trend compared to the control. The only parameter affected by compost application was the dry matter content of fresh biomass, which was significantly higher compared to the control. In the experimental year 2024, a positive trend of increase in nitrogen was still observed in the soil samples of the compost variant compared to the control.

Keywords: mulch, yield, forage, risk elements, nitrogen

Úvod

Rozkolísanost klimatu projevující se extrémy počasí, ale i narůstající tlak na udržitelné hospodaření v posledních letech, vede ke změnám v pěstitelských technologiích. Klíčovým aspektem v těchto ohledech bude kvalita půdy, která je dána hlavně obsahem půdní organické hmoty. Vedle bezorebných postupů, vhodných osevních sledů, zeleného hnojení, digestátu a statkových hnojiv, je kompost dalším způsobem, jak zvýšit obsah půdní organické hmoty (Sedláčková et al. 2019). Kompost, je-li na něj pohlíženo jako na organické hnojivo, je ze zákona nutné zapravit. Některé inovativní směry rostlinné produkce se však zabývají možností aplikace kompostu, s jeho ponecháním na povrchu, tedy jako mulče (Burg et al. 2023). Tento způsob aplikace přináší řadu výhod oproti zapravování do hloubky například s orbou, jako je vyšší zadržení půdní vláhy, zmírnění půdní ztráty smyvem nebo omezení růstu plevelných rostlin a je zde také úspora nákladů až do výše 30 % (Burg et al. 2023, Ruch et al. 2023). Mimo to kompost ponechaný na povrchu jako mulč může u obilnin pozitivně ovlivnit i výnos a kvalitu produktu (Sedláčková et al. 2019, Kuonen and Norgrove, 2022). Povrchová aplikace zralého kompostu bez zapravení, by tak měla přispět k optimalizaci pěstitelských podmínek, kdy hlavním přínosem zůstává přísun živin, zlepšení jejich sorpce a dostupnosti potřebám plodin (Altmann et. al. 2013, Pospíšilová et al. 2017, Demo and Asefa Bogale 2024). Navíc povrchová aplikace vyhovuje řadě současných přístupů a systémů zpracování půdy (No-till, Strip-till), kde je třeba zajistit možnosti aplikace organických látek do půdy i během vegetace. Pro rozvoj těchto přístupů můžeme na orné půdě využít aplikace zralého kompostu, a to především během vegetace bez zapravení.

Materiál a metody

Za účelem zkoumání vlivu nezapraveného kompostu na pěstování obilnin byl ve spolupráci s podnikem Hanácká Zemědělská Společnost Jevíčko a.s., na lokalitě Jevíčko (okr. Svitavy) založen pokus. Klimatická charakteristika regionu je: mírně teplý (5), mírně vlhký (MT2), dlouhodobá průměrná roční teplota 7 – 8 °C, průměrný dlouhodobý úhrn srážek 550 – 650 mm. Hlavní půdní představitel je zde kambizem modální eubazická (KAme), bezskeletovitá, s příměsí s celkovým obsahem skeletu do 25 %, půda hluboká až středně hluboká do 30 cm.

Pro tento tříletý poloprovozní pokus byla zvolena zvýšená pokusná dávka faremního kompostu ve výši 200 t/ha s jednorázovou aplikací do vymrzlé meziplodiny v únoru 2022. Modelovou plodinou byla kukuřice určená k výrobě siláže. Celkem v pokuse byly zahrnuty 2 varianty a to jedna s kompostem ponechaným na povrchu a druhá bez kompostu, obě se shodnou agrotechnikou. Pro přípravu půdy bylo použito pásového zpracování a kukuřice byla vždy seta do posklizňových zbytků předplodiny, dále byl porost kukuřice ošetřován standardně. Povětrnostní podmínky jsou zaznamenány v tabulce 1.

Během vegetace byl sledován a hodnocen účinek nezapraveného kompostu na kondici porostů, produkční a kvalitativní ukazatele. Výživný stav byl hodnocen ze sledování obsahu chlorofylu (nepřímý indikátor obsahu N), ruční chlorofylmetr SPAD 502 a obsah NO_3- z rostlinné šťávy (LAQUA Twin Nitrate Meter), i přímo (laboratorně) skutečný obsah minerálního N a dalších živin (K, Mg, Ca). Díky příležitosti naskytnuté v roce 2024, vyzkoušet měření s přístrojem 360 SOILSCAN byl zjišťován i obsah N z odebraných půdních vzorků v hloubkách 0 – 10 cm a 10 – 30 cm. Z důvodu, že komposty bývají často hodnoceny jako potenciální zdroje těžkých kovů, bylo provedeno i hodnocení změny obsahů Ni a Zn v rostlinné biomase. Produkční a kvalitativní změny byly hodnoceny pomocí výnosotvorných prvků jako hmotnost a výška rostlin, počet a hmotnost listů a byla zjišťována sušina rostlin. Dále byl z produkčního hlediska hodnocen i výnos z plochy, a to výnos čerstvé a suché hmoty v t/ha.

Tabulka 1. Povětrnostní podmínky za období 2022-2024

Rok	Teplota (°C)	Dlouhodobý normál (1991–2020)	Srážky (mm)	Dlouhodobý normál (1991–2020)
2022	11,3	10,2	566,7	615,0
2023	10,5		568,1	
2024	12,3		796,0	

Výsledky

Z hlediska povětrnostních podmínek se ze tří let pokusu výrazněji od dlouhodobého normálu lišil pouze rok 2024, který byl srážkově i teplotně nadprůměrný. Další roky byly srážkově podprůměrné a teplotně nadprůměrné (tabulka 1). Z tabulky 2 je patrné, že ani výrazně navýšená dávka kompostu nevyvolala významné odezvy v obsahu živin, zejména N v pěstovaných rostlinách kukuřice. Ukazují to hodnoty jak nepřímého sledování výživného stavu porostů (obsah chlorofylu), tak i obsah NO_3- zjištěný z rostlinné šťávy a minerálního N stanovený laboratorně. Tento trend byl patrný i pro výsledky dalších makroživin (K, Mg, Ca) a těžkých kovů (Ni a Zn), kdy se rostliny z kontrolní varianty a varianty s kompostem obsahem sledovaných prvků nelišili (tabulka 3).

Tabulka 2. Výživný stav, obsah chlorofylu a dusíku v rostlinách

	Obsah chlorofylu (SPAD)	NO_3-(ppm)	N (%)
2022			
Kontrola	42,5	3813,0	3,4
Kompost	43,0	2675,0	3,4
2023			
Kontrola	53,4	600,0	3,5
Kompost	50,0	570,0	3,3
2024			
Kontrola	51,6	1964,5	2,6
Kompost	51,7	2491,5	2,6
2022-2024			
Kontrola	48,3a	2085,0a	3,2a
Kompost	47,9a	2057,0a	3,1a
$HSD_{0.05}$	*2,7*	*89,2*	*0,6*

Tabulka 3. Obsah makroživin a rizikových prvků v rostlinách

	K	Mg	Ca	Ni	Zn
2022	(mg/kg)				
Kontrola	32799	2401,5	7489,5	1,705	48,04
Kompost	34000	2259,5	7132,5	0,75	37,58
2023					
Kontrola	0,535	0,23	2,655	2,495	21
Kompost	0,395	0,14	3,52	2,68	14,5
2024					
Kontrola	2,125	0,225	0,625	1,485	46
Kompost	2,675	0,19	0,465	1,515	46,5
2022-2024					
Kontrola	10933,9	800,7	2497,6	1,9	38,3
Kompost	11334,4	753,3	2378,8	1,6	32,9

Při sledování vlivu zvýšené dávky kompostu ponechané na povrchu na výnosové prvky a tvorbu zelené biomasy, byl u kompostu zaznamenán pozitivní trend mírného nárůstu u výšky rostlin, počtu listů na rostlinu a hmotnosti listů a stonků (tabulka 4). Výnos silážovatelné hmoty aplikací zvýšené dávky kompostu ponechané na povrchu, významně ovlivněn nebyl, nicméně oproti kontrole byla zaznamenána významně vyšší tvorba sušiny (tabulka 5).

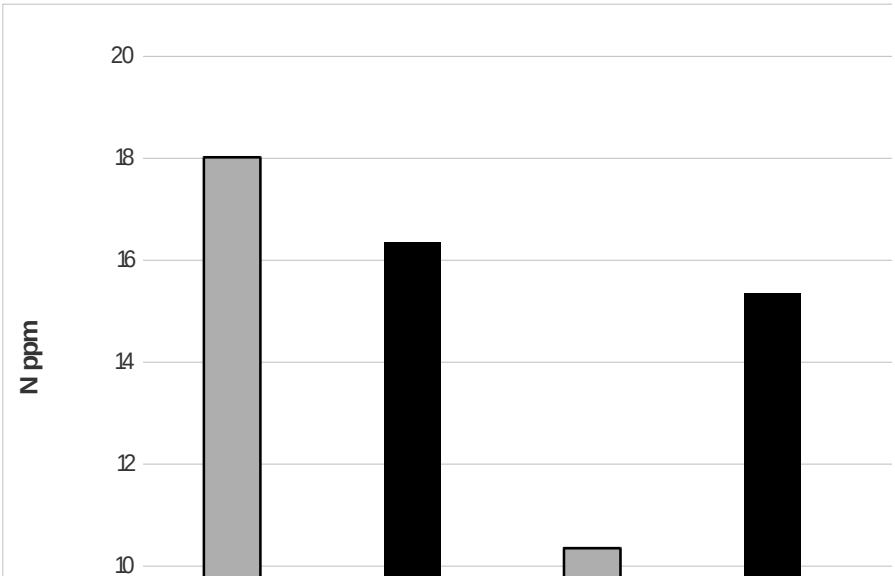
Tabulka 4. Výnosové parametry

	Výška rostlin (cm)	Počet palic / rostlina	Počet listů /rostlina	Hmotnost palic (g/rostlinu)	Hmotnost listů a stonků (g/rostlina)	Hmotnost rostlin (g)
2022						
Kontrola	271	1,6	11	218,9	552,3	771,2
Kompost	293	1,6	11,5	220,9	704,8	925,7
2023						
Kontrola	262	1,7	12,5	163,9	520,3	684,2
Kompost	230	1,7	13	68,6	583,7	652,3
2024						
Kontrola	328	1,8	12,5	353	566	920
Kompost	336	1,7	12,6	181	570	749
2022-2024						
Kontrola	202a	1,7a	11a	150,8a	362,4a	510,3a
Kompost	204,4a	1,7a	11,6a	98,9a	412,2a	510,8a
$HSD_{0.05}$	*31,2*	*0,41*	*2,66*	*64,3*	*86,6*	*86,6*

Tabulka 5. Výnos zelené hmoty

	Výnos zelené hmoty (t/ha)	Sušina rostlin (%)	Výnos hmoty v sušině (t/ha)
2022			
Kontrola	104,5	24,89	25,98
Kompost	112,6	26,12	29,36
2023			
Kontrola	66,4	32,15	21,3
Kompost	56,5	34,53	19,35
2024			
Kontrola	81,8	32,15	26,34
Kompost	66,6	34,53	23,01
2022-2024			
Kontrola	84,2a	29,7b	24,5a
Kompost	78,6a	31,7a	23,9a
$HSD_{0.05}$	*11,2*	*1,64*	*2,99*

Graf 1: Porovnání obsahu N v půdě mezi variantami, hloubkou a termíny, 2024



Při doplňkovém pozorování množství N v půdě byl u kompostu patrný jeho zvýšený obsah, zejména v hlubší vrstvě půdy (10-30 cm) u obou termínů měření (graf 1). Obecně vyšší hodnoty N byly zaznamenány z počátku vegetace, ve srovnání s pozdním termínem odběru půdy.

Diskuze

Výsledky pozorování z 3-letého poloprovozního polního pokusu naznačují, že ponecháním kompostu na povrchu v případě uplatnění technologie pásového zpracování půdy a použití stabilního, vyzrálého kompostu, bylo zajištěno jeho částečné zapravení. Tento způsob aplikace tak zajistil, že v následujících letech byl přísun kompostu, a tím i N do kořenové zóny kukuřice přiměřený a výrazněji se neprojevil během vegetace (obsah chlorofylu, NO_3-) ani zvýšeným obsahem minerálního N. Kvalita nebyla kompostem rovněž významně ovlivněna (K, Mg, Ca), což je v souladu s výsledky práce Sedláčková et al. (2019). Rovněž zanedbatelné změny v obsahu těžkých kovů Ni a Zn u rostlin nenaznačují negativní ovlivnění rostlinné biomasy kukuřice, což je v souladu s Erhart and Putz (2008), kdy ani po 10leté aplikaci kompostu nedošlo k nadlimitní zátěži půdy těžkými kovy. Na druhou stranu práce Bartl et al. (2002) uvádí, že při aplikaci kompostu byl zjištěn vyšší obsah Zn v půdě.

Výsledky z pozorování vlivu aplikace kompostu na výnosové parametry nepotvrdili zjištění prací Hossain et al. (2024), kdy byl kompost významným faktorem. Avšak výsledky polního pokusu s kompostem Sedláčková et al. (2019) jsou v souladu s výsledky této práce, kdy výnos a kvalita silážní kukuřice nebyly aplikací kompostu ovlivněny. Rovněž výsledky práce Mupangwa et al. (2007) nepotvrdily, vliv kompostového mulče v kombinaci s minimálním zpracováním půdy na výnos u kukuřice. Výsledky doplňkového měření N v půdě potvrzují stabilitu a vyzrálost použitého kompostu, kdy docházelo spíše k pozvolnému uvolňování N a jeho nízké mobilitě. Ruch et al. (2023) uvádí, že u kompostem mulčované půdy množství N klesalo s hloubkou odběru půdního vzorku, toto se z výsledků této práce nepotvrdilo. Jak je uvedeno ve výsledcích měření N v půdě, tak vyšší hodnoty N byly zaznamenány z kraje vegetace, což potvrzují i výsledky práce Ruch et al. (2023), kdy byly zjištěny nejvyšší hodnoty v jarních termínech odběru.

Závěr

Z výsledků tohoto 3-letého poloprovozního polního pokusu se zvýšenou dávkou kompostu ponechaného na povrchu, lze interpretovat obdobné závěry jako z dalších publikací zabývajících se daným tématem. V prvé řadě se ukázalo, že ani extrémní dávka kompostu nezpůsobila zvýšený obsah rizikových prvků v rostlinách, rovněž obsah N v rostlinách zůstal kompostem neovlivněn. Dále se ukázalo, že kompost neměl průkazný vliv ani na výnosové prvky, jediným průkazně ovlivněným parametrem byl nárůst sušiny v zelené hmotě. O něco vyšší bylo také množství N zaznamenané z půdních odběrů. Ze získaných výsledků pozorování účinků kompostu ponechaného na povrchu lze usuzovat, že vysoká, jednorázová dávka kompostu je vhodná hlavně v kombinaci s technologií redukovaného zpracování půdy (Strip till), kdy dochází k postupnému zapravování kompostu do hlubších vrstev půdy. Důležitým aspektem ovlivňujícím výsledek však zůstává vyzrálost a stabilita použitého kompostu.

Literatura

Burg P., Zemánek P., Souček J., Badalíková B. 2023. Povrchová aplikace kompostu na půdu. Farmář č. 11.

Demo AH, Asefa Bogale G. 2024. Enhancing crop yield and conserving soil moisture through mulching practices in dryland agriculture. Front. Agron. 6:1361697.

Hossain, S, Al-Solaimani SGM, Alghabari F, Shahzad K, Rashid M.I. 2024. Enhancing maize yield through sustainable and eco-friendly practices: the impact of municipal organic waste compost and soil amendments. Cogent Food & Agriculture 10.

Kuonen L, Norgrove L. 2022. Mulching on family maize farms in the tropics: A systematic review. Current Research in Environmental Sustainability 4:100194.

Mupangwa W, Twomlow S, Walker S, Hove l. 2007. Physics and Chemistry of the Earth 32: 1127–1134.

Ruch, B., Hefner M., Sradnick A. 2023. Excessive nitrate limits the sustainability of deep compost mulch in organic market gardening. Agriculture 13: 1080.

Sedláčková I., Hambálková M., Bílovský J., Látal O. 2019. Vliv aplikace biologicky transformované organické hmoty a biouhlu na výnosy a kvalitu obilovin. Obilnářské listy - 57- 27. ročník, č. 3–4.

Poděkování

Prezentované výsledky vznikly díky podpoře a projektu NAZV QK22020032 Analýza a úpravy aplikačních schémat kompostů směřujících k posílení systému ochrany půdy v rámci stabilizace produkční schopnosti.

Kontaktní adresa:

Ing. Martin Král, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129, Praha – Suchdol, 165 00
728 528 902, kralmartin@af.czu.cz

Půdoochranné postupy pro pěstování brambor na svažitých pozemcích

Soil protection technologies for growing potatoes on sloping land

Kusá H.[1], Růžek P.[1], Vavera R.[1], Kasal, P.[2], Záruba J.[3]

[1]Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; [2]Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o.;

[3]Výzkumný ústav monitoringu a ochrany půdy, v. v. i.

Abstrakt

V letech 2020-23 byly v poloprovozních pokusech s bramborami pěstovanými na svažitých plochách v technologii s odkameněním ověřovány různé úpravy tvaru hrůbků a brázd pro zvýšení zadržení vody ze srážek a omezení vodní eroze. Inovované postupy s důlkováním a hrázkováním při sázení, příp, v kombinaci s kypřením povrchu hrůbků a obnovou důlků v nekolejové brázdě vedly k většímu zadržení vody v půdě, omezení eroze, vyšším výnosům hlíz a jejich větší meziročníkové stabilitě. Varianty s pomocnou plodinou vysetou v kolejové brázdě při sázení nebo kypření snížily ztrátu půdy vodní erozí až o 67% ve srovnání s kontrolním miskovitým hrůbkem, přičemž nebyl zjištěn negativní vliv na výnos hlíz brambor. V přesných pokusech s hnojivy značenými izotopem ^{15}N využití dusíku z minerálních hnojiv aplikovaných při sázení do různých typů hrůbků dosahovalo 54-58%. Při dělené aplikaci hnojiv (při sázení + přihnojení do kořenové zóny rostlin při kypření) bylo zvýšeno až na 73%, v průměru činilo 63%.

Klíčová slova: důlkování, kypření hrůbků, eroze, využití dusíku, výnos hlíz

Abstract

Various modifications of the shape of ridges and furrows to increase the retention of water from precipitation and reduce water erosion were verified in pilot experiments with potatoes grown on sloped areas in technology with de-stoning in th eyears 2020-23. Innovative procedures with pitting and damming during planting, or in combination with loosening the ridges surface and renewing pits in the non-tracked furrow, led to greater water retention in the soil, reduction of erosion, higher yields of tubers and their greater interannual stability. Variants with an auxiliary crop sown in the track furrow during planting or loosening reduced soil loss by water erosion by up to 67% compared to the control bowl-shaped ridges, while no negative effect of auxiliary crop on the yield of potato tubers was detected. In precise experiments with fertilizers labeled with the 15N isotope, the utilization of nitrogen from mineral fertilizers applied when planting in different types of ridges reached 54-58%. It was increased up to 73% (on average 63%) with split fertilizers application: at planting + fertilizing during loosening into root zone of plants

Keywords: pitting, ridges loosening, erosion, nitrogen efficiency, tuber yield

Úvod

Více než 50% zemědělské půdy v ČR je ohroženo vodní erozí. Mezi neproblematičtější plodiny patří brambory, pěstované v tradiční bramborářské oblasti ČR téměř výhradně v technologii s odkameňováním. Ve většině zemědělských podniků je na podzim zaoráván hnůj, minerální hnojiva jsou aplikována na jaře před sázením plošně, dusíkatá hnojiva pak při sázení přímo do hrůbku, což vede k vyššímu využití dusíku rostlinami, nižšímu obsahu Nmin. v půdě po sklizni a menšímu riziku znečištění vod vyplavením nitrátů v mimovegetačním období (Maidl et. al., 2002; Kasal a kol., 2013) ve srovnání s plošnou aplikací užívanou u konvenční technologie. I takto uložená hnojiva v blízkosti kořenové zóny rostlin mohou zůstat nevyužita při nevhodném tvaru hrůbků, kdy dochází ke stékání vody do brázd a nedostatečnému provhlčení hrůbků. Úpravou tvaru hrůbku, zejména rozšířením jeho vrcholu, případně vytvořením důlků a hrázek lze zadržet větší množství vody v hrůbcích, protože voda zachycená v důlcích má více času na průsak dovnitř hrůbku. Vymělčením nekolejové brázdy a její opatření důlky a hrázkami přispívá k výraznému snížení povrchového odtoku (Čáp, 2021; Záruba et al. 2023). K omezení odtoku a zejména ztráty půdy po srážkách výrazně přispívá přísev pomocné ochranné plodiny (např. Jemison, 2019), které však nesmí mít negativní dopad růst rostlin a dosažený výnos hlíz brambor (Gitari et al., 2018). Po srážkách během vegetace dochází často k vytvoření krusty na povrchu a srážková voda

neproniká do hrůbků (k hlízám a hnojivům). Zde se osvědčilo kypření povrchu hrůbků před vzejitím porostu, při kterém zároveň dochází k obnově důlků a hrázek v nekolejové brázdě a je možné aplikovat hnojiva do kořenové zóny rostlin (Růžek a kol., 2018). Přihnojení před vzejitím porostu umožňuje snížit dávku dusíku aplikovanou při sázení, což je žádoucí z hlediska vzcházení porostu, které je dle Zebartha a Rosena (2007) zpožděno při vysokých koncentracích minerálních forem dusíku v půdě do 50. dne po sázení.

Cílem práce bylo zjistit, (i) zda různé úpravy tvaru hrůbků a nekolejové brázdy za účelem zadržení většího množství vody ze srážek v hrůbcích povedou k vyšším výnosům hlíz, (ii) zda tyto úpravy a rozdělení celkové dávky dusíku na dvě – při sázení a při kypření před vzejitím porostu zvýší využití dusíku z hnojiv, (iii) zda úpravy hrůbků a brázd omezí povrchový odtok a ztrátu půdy vodní erozí.

Materiál a metody

Na odkameněném pozemku VS Valečov VÚB, s.r.o. Havlíčkův Brod (49.6464158N, 15.4958211E; BVO, 460 m n.m., roční úhrn srážek 632 mm, průměrná roční teplota vzduchu 7,4°C; kambizem písčitohlinitá) byl v letech 2019-23 založen maloparcelkový pokus s různými způsoby aplikace minerálních dusíkatých hnojiv a s různým tvarem hrůbků(Tab. 1). Předplodinou byla ozimá pšenice. Po ní v roce v roce 2018 následovala meziplodina - hořčice, jež byla zaorána spolu s chlévským hnojem (26 t/ha, 1. 11. 2018), v následujících letech byl aplikován pouze hnůj (15-25 t/ha). Před sázením bylo hnojivo Patentkali v dávce 400 kg/ha (tj. 120 kg K_2O, 40 kg MgO a 68 kg S), v roce 2021 pouze 115 kg N/ha v močovině, kvůli vysokému obsahu draslíku v půdě. Pro formování hrůbků byl použit sazeč Grimme GB 230 vybavený modulátorem hrůbků vytvářejícím rozšířený miskovitý povrch a mělkou nekolejovou brázdu. Sázení (poloraná odrůda Antonia) a aplikace hnojiv značených izotopem ^{15}N bylo provedeno ručně. U variant 2 - 4 bylo při sázení aplikováno 100 kg N/ha U varianty 5 pouze 70 kg N/ha. Kypření hrůbků a přihnojení var. 5 hnojivem DAM (všechny formy N značeny ^{15}N) bylo provedeno na počátku vzcházení porostu.

Ve společnosti ZAS Věž, a.s. (okr. Havlíčkův Brod; BVO; 510–580 m n. m.) byly v letech 2020-23 založeny poloprovozní pokusy s bramborami v technologii s odkameněním na svažitých MEO plochách (sklonitost 3,9°– 5,4°, sázení po spádnici) se střední, příp. lehkou půdou. Před rýhováním byla aplikována část z celkové kalkulované dávky dusíku, zpravidla síran amonný v dávce 250–300 kg/ha nebo 150 l DAM/ha a PK hnojiva podle obsahu živin v půdě. Při sázení bylo do hrůbků po obou stranách hlíz aplikováno 80 (příp. 40) kg N/ha. Sázení (odr. Antonia) bylo provedeno inovovaným sazečem Grimme GB 230 s úpravami tvaru hrůbků a nekolejových brázd dle variant pokusu (Tab. 2) a možností osevu kolejové brázdy pomocnou plodinou, jíž byla ozimá pšenice (odnoživá odrůda s rychlým počátečním růstem). Tři až čtyři týdny po sázení před/na počátku vzcházení porostu bylo strojem VARIOR (600) provedeno kypření povrchu hrůbků s obnovou důlků v nekolejové brázdě u třech variant pokusu. Současně byla u některých variant do kolejové brázdy zaseta pomocná plodina nebo speciálním dlátem aplikováno kapalné hnojivo do kořenové zóny rostlin směrem z nekolejové brázdy opatřené důlky zadržujícími vodu ze srážek. Hnojiva byla volena dle obsahu živin v hrůbku stanoveného před kypřením tak, aby bylo aplikováno zbývajících 40 kg N/ha a mikroprvky potřebné z hlediska kvality hlíz brambor (DAM + Bor 150, AmisaN MnZn + Bor 150 v dávce 3 g B/ha, AmisaN).

Obě pokusné plochy byly preemergentně ošetřeny herbicidem. V průběhu vegetace byly aplikovány obvyklé pesticidy dle aktuálního stavu porostu.

Hlavním účelem poloprovozního pokusu bylo ověření odolnosti různě upravených hrůbků vůči vodní erozi, což bylo zjišťováno pomocí simulátoru deště, kdy je ohraničená plocha o výměře 21 m^2 pomocí čtyř trysek zadešťována s intenzitou 1,2 mm/min., měřen povrchový odtok a stanovena celková ztráta půdy z množství nerozpuštěných látek odebraných z výustě odtokového žlabu. Byl použit standardizovaný postup: 30 minutové zadeštění, technologická přestávka 15 minut, po níž bylo provedeno druhé zadeštění o délce 15 minut. První zadeštění se provádělo na půdě s přirozenou vlhkostí, druhé pak na půdě nasycené vodou po prvním zadeštění. Měření probíhalo každý rok ve dvou termínech, které vycházejí z pěstebních období uváděných v Janeček kol. (2012), což zde představovalo 10–16 dní po kypření hrůbků a o měsíc později.

Výsledky byly statisticky hodnoceny s využitím softwaru (Statistika.cz) za pomoci jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova HSD testu na hladině významnosti ($P < 0,05$). Statisticky průkazně rozdílné hodnoty jsou označeny rozdílnými písmeny (a,b,c).

Tab. 1 Varianty maloparcelkového pokusu

	Hnojení při sázení		**Přihnojení při kypření**		**Hrůbky upravené s miskou**
	Po stranách hlíz		Dlátem do hrůbku		
Var.	hnojivo	kg N/ha	hnojivo	kg N/ha	+další úpravy
1	-	0	-	0	0
2	UREA^{stabil}	100	-	0	0
3	UREA^{stabil}	100	-	0	+ důlky na vrcholu hrůbků + důlky v nekolejové brázdě
4	UREA^{stabil}	100	-	0	+ důlky na vrcholu hrůbků + důlky v nekolejové brázdě + kypření spolu s dláty a důlky v nekolejové brázdě
5	UREA^{stabil}	70	DAM^{stabil}	30	+ důlky na vrcholu hrůbků + důlky v nekolejové brázdě + kypření spolu s dláty a důlky v nekolejové brázdě + přihnojení

Tab. 2 Varianty poloprovozního pokusu

Varianta		**Minerální hnojení kg N/ha**	**Hrůbky upravené s miskou, vymělčená nekolejová brázda + další úpravy:**	
			Hrůbků a nekolejové brázdy	**Kolejové brázdy**
1	**Kontrola „Miska“**	80+0	0	0
2	**Důlkování**	80+0	+ velké důlky a příčné hrázky na vrcholu hrůbků + důlky a hrázky v nekolejové brázdě	0
3	**Důlkování + osetí při sázení**	80+0	+ velké důlky a příčné hrázky na vrcholu hrůbků + důlky a hrázky v nekolejové brázdě	Při sázení: + osetí + dezén pneu
4	**Důlkování + kypření**	80+0	+ velké důlky a příčné hrázky na vrcholu hrůbků + důlky a hrázky v nekolejové brázdě + kypření hrůbků s obnovou důlků v nekol.brázdě	
5	**Důlkování + kypření s osetím**	80+0	+ velké důlky a příčné hrázky na vrcholu hrůbků + důlky a hrázky v nekolejové brázdě + kypření hrůbků s obnovou důlků v nekol.brázdě	Při kypření: + osetí + hrázkování
6	**Důlkování + kypření s přihnojením**	40+40	+ velké důlky a příčné hrázky na vrcholu hrůbků + důlky a hrázky v nekolejové brázdě + kypření hrůbků s obnovou důlků v nekol.brázdě + přihnojení do kořenové zóny	

Výsledky a diskuze

Výnos hlíz a využití N v maloparcelkovém pokusu

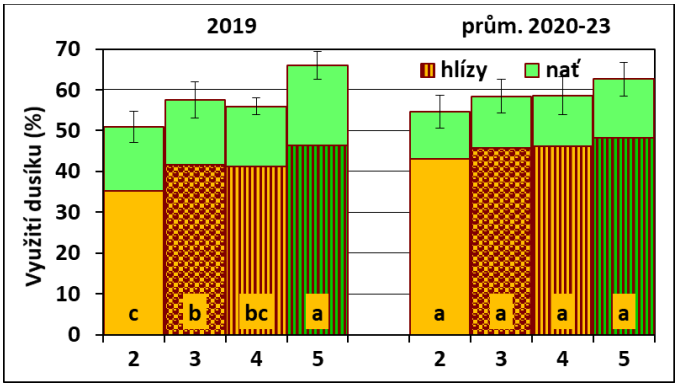
Předpokladem pro využití živin (zde dusíku) z hnojiv rostlinami je dostatek vody pro jejich zpřístupnění a transport ke kořenům. Prvotním cílem bylo zvýšit množství vody ze srážek zadržené v hrůbcích a přivést ji k hnojivu. Z grafu 1 je patrné, že důlkování hrůbků a nekolejové brázdy, příp. s kypřením, zvýšilo využití dusíku z hnojiv aplikovaných při sázení v průměru o 7–13 % ve srovnání s kontrolními miskovitými hrůbky s vymělčenou nekolejovou brázdou bez dalších úprav. V průměru sledovaného

období bylo rostlinami brambor využito nejvýše 58 % dusíku z hnojiva aplikovaného při sázení, a to u varianty s důlkováním a kypřením, u kontrolního hrůbku s miskovitou horní stranou dosáhlo v průměru 54%. Rozdíly mezi jednotlivými tvary hrůbků nebyly z hlediska využití dusíku velké, protože pro většinu sledovaného období byl charakteristický dostatek (až nadbytek) srážek na počátku vegetace. I proto, větší vliv než tvar hrůbku a zadržení vody v něm, mělo rozdělení dávky dusíku na aplikaci při sázení a při kypření. Nejvyšší využití dusíku z hnojiv za celé sledované období bylo zjištěno právě u této varianty - v průměru 63%, v sušším roce 2022 dokonce 73%. Pozdější aplikace části dávky dusíku při kypření zvýšila jeho využití ve většině let o 8 % ve srovnání s jednorázovou aplikací při sázení a stejném tvaru hrůbků. To potvrzuje poznatky Maidla et. al. (2002), kteří ve víceletém polním pokusu zjistili stoupající efektivnost u hnojiv s pozdějším termínem jejich aplikace, jež se při umístění do hrůbku zvyšovala od 33,9% (hnojení při sázení) do 43,7% při hnojení vzešlého porostu. Rens et al. (2016) zjistili rozpětí využití dusíku z hnojiv od 11% do 62% pro aplikace před sázením a na počátku tvorby hlíz. Nízkou efektivnost hnojiv aplikovaných při sázení přisuzovali převážně imobilizaci N během raných vývojových fází.

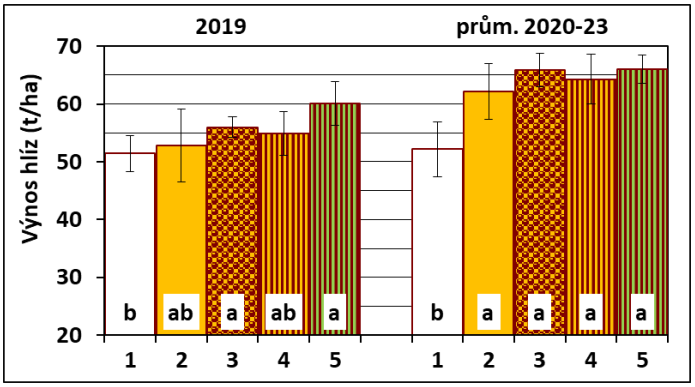
Využití N z hnojiv i jeho celkový odběr rostlinami brambor stoupaly s rozsahem úprav hrůbků a většinou i výnosy hlíz (graf 2). Ve vlhkých ročnících s nadprůměrnými srážkami v květnu po sázení (2019 a 2020) byly dosaženy nejvyšší výnosy hlíz u variant s důlkováním, kypřením a dělenou dávkou minerálního dusíku (60 a 74 t/ha), následované důlkováním s kypřením (55 a 69 t/ha). V ročnících s letními přísušky (2022 a 2023) byly nejvýnosnější varianty s důlkováním, i když v roce 2022 byly rozdíly mezi jednotlivými typy hrůbků minimální (71–74 t/ha). Navzdory dlouhému období sucha v červenci a srpnu se jednalo o nejvýnosnější ročník z celého sledovaného období. Rozdíly mezi jednotlivými typy hrůbků při stejné úrovni hnojení zpravidla nebyla statisticky významné, ale různé úpravy se vždy projevily zvýšením výnosu ve srovnání se standardním miskovitým tvarem.

Důvodem vyčlenění ročníku 2019 mimo průměr celého sledovaného období bylo zařazení meziplodiny po pšenici a několikanásobně vyšší obsah N_{min} v půdě (183 mg /kg) na počátku vegetace brambor než v dalších letech (33-71 mg/kg). V důsledku toho, se aplikace 100 kg N/ha při sázení projevila minimálním zvýšením výnosu hlíz – u miskovitého hrůbku bez dalších úprav (var. 1 a 2) rozdíl činil jen 1,4 t/ha. Po sklizni byl zjištěny vysoké obsahy residuálního dusíku v půdě – v profilu do 0,6 m bylo zjištěno 98–132 kg N_{min}/ha. V následujících letech nepřesáhly 60 kg N_{min}/ha. To dokládá účelnost snížení dávky dusíku aplikovaného při sázení a případné přihnojení na počátku vzcházení porostu při kypření dle aktuálního obsahu živin v hrůbcích.

Graf 1 Využití dusíku rostlinami brambor z minerálních hnojiv aplikovaných při sázení a kypření (maloparcelkový pokus Valečov, popis variant v tabulce 1)



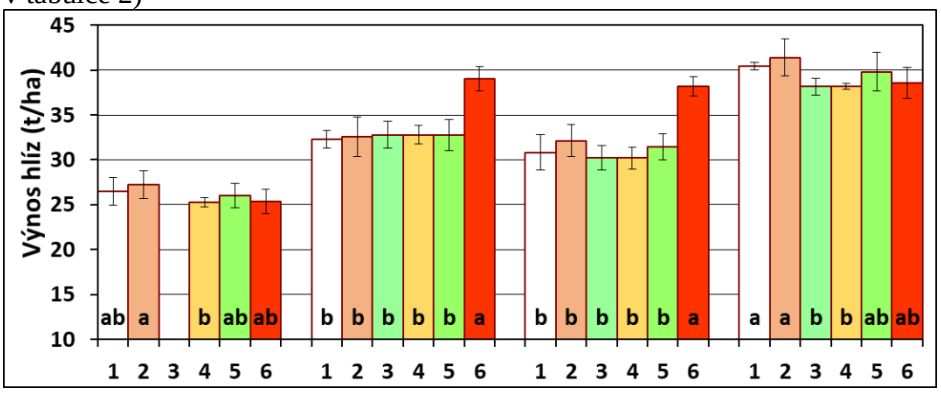
Graf 2 Výnos hlíz brambor (maloparcelkový pokus Valečov)



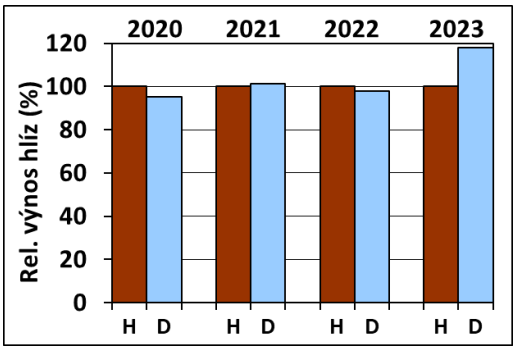
Vliv nových postupů na výnos hlíz (poloprovozní pokus)

Různá dostupnost vody pro rostliny v jednotlivých typech hrůbků se v suchých letech projevuje významnými rozdíly ve výnosech hlíz. Během sledovaného období byly dva ročníky srážkově nadnormální a dva se vyznačovaly suchými periodami v letním období. Na počátku byl vždy patrný vizuálně lepší stav porostu u variant s důlkováním a vyšší vlhkostí půdy, ale její zásoba nebyla dostatečná pro překonání několikatýdenního období s minimálními srážkami. V letech 2020 a 2021 byla výše dosažených výnosů hlíz negativně ovlivněna krátkou vegetační dobou způsobenou pomalým vzcházením porostu během chladného a vlhkého května, v roce 2020 navíc předčasně ukončenou kvůli vysokému tlaku plísně bramboru. V roce 2022 byl porost negativně ovlivněn opakovanými aplikacemi herbicidů. Nejhorší dopad však měl suchý červenec – polovina srpna, kdy zaschla z větší části nať brambor. Vzhledem ke stádiu zralosti byly obavy ze zmlazování po avizovaných srážkách a poškození kvality hlíz, proto byla předčasně ukončena vegetace desikací nati již 22. 8. Výnosy hlíz brambor s aplikací celé dávky dusíku při sázení v těchto letech dosahovaly pouze 25–33 t/ha, nejvyšší byly po důlkování při sázení bez dalších úprav (graf 3). Rovněž Gordon et al. (2011) zjistili zvýšení výnosů hlíz v důsledku zadržení většího množství vody v půdě po důlkování, ale rozdíly nebyly stat. významné. Samotné kypření výnosy hlíz neovlivnilo. Pokud proběhlo současně přihnojení druhou polovinou kalkulované dávky dusíku a doplnění deficitních mikroprvků, nastalo v letech 2021 a 2022 zvýšení výnosu hlíz o 7-8 t/ha. Příznivě se zde projevila aplikace hnojiva do kořenové zóny v době, kdy rostliny začínají odebírat živiny z půdy i případný vliv dalších živin (S, B, Mn, Zn). V roce 2023 byly, i přes pozdní sázení (převlhčená půda po dubnových intenzivních srážkách), nejlepší podmínky pro růst brambor za celé sledované období. Mezi různými variantami hnojení a úprav hrůbků a brázd nebyly významné rozdíly ve výnosu hlíz (38–42 t/ha), nejvyšší byl dosažen po důlkování při sázení bez dalších úprav. V průměru 4 let ověřování poskytla nejvyšší výnosy varianta s přihojením za vegetace, následovaná právě důlkováním při sázení Mělčí uložení matečných hlíz pod důlky (min. 10 cm při sázení) nemělo negativní dopad na výnos této varianty, za celé sledované období výnos z rostlin pod důlky dosáhl 103% výnosu z rostlin pod hrázkami (graf 4). Negativně se neprojevilo ani osetí kolejové brázdy, i když zde bylo zvažováno riziko snížení výnosu v důsledku konkurence brambor a pomocné plodiny o vodu a živiny. Výnos z hrůbků vedle osetých brázd dosáhl v průměru sledovaného období úrovně 104 % výnosu z hrůbků bez konkurence pomocné plodiny v brázdě (graf 5). Nyiraneza et al. (2020) zjistili zvýšení výnosu hlíz brambor dokonce o 9-24% při osetí brázd obilninami. Naopak použití leguminóz vedlo k významně nižším výnosům hlíz i odběru dusíku rostlinami brambor (Gitari et al., 2018).

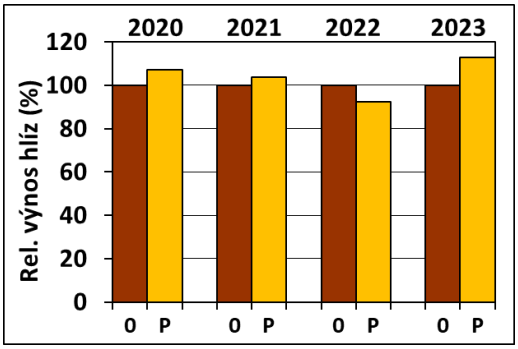
Graf 3 Výnos hlíz brambor při různé úpravě hrůbků a brázd (poloprovozní pokus Věž, popis variant v tabulce 2)



Graf 4 Výnos hlíz brambor u varianty s důlkováním: relativní výnos z rostlin pod hrázkami (H) a důlky (D), kde výnos pod hrázkou = 100 % (ruční odkopy, poloprovozní pokus Věž)



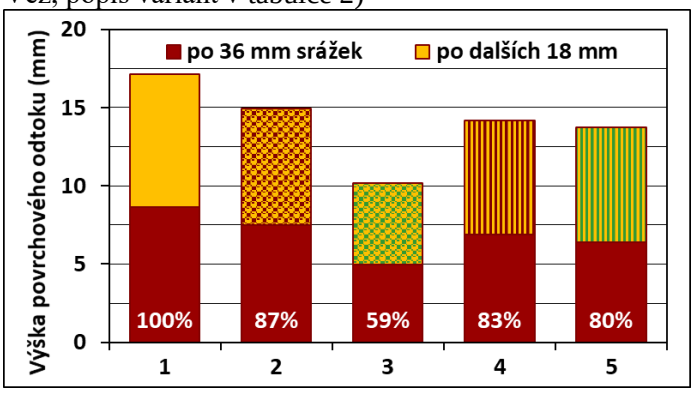
Graf 5 Výnos hlíz brambor u varianty s důlkováním, kypřením a osetím kolejové brázdy při kypření: relativní výnos z hrůbků vedle neoseté brázdy (0) a vedle brázdy s pomocnou plodinou (P), kde hrůbek u prázdné brázdy = 100 % (ruční odkopy, poloprovozní pokus Věž)



Protierozní účinky nových postupů

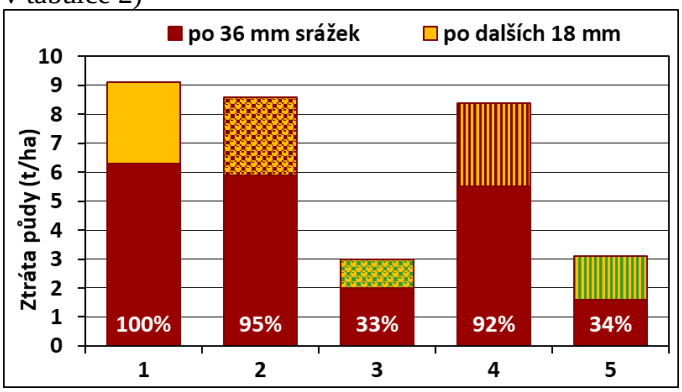
Kontrolní variantou byla „miska“ – hrůbky s miskovitým povrchem a mezi nimi vymělčená nekolejová brázda, která vzhledem k robustnosti hrůbků a ploše jejich vrcholu již představuje zlepšující postup ve srovnání s běžným tvarem hrůbků. V rámci tohoto pokusu z ní odtékalo nejvíce vody a všechny inovované technologie jí dokázaly zadržet větší množství (graf 6). Větší rozdíly byly patrné při první 36 mm srážce na přirozeně vlhkou půdu, kdy důlkování a důlkování s kypřením omezilo odtok o 11% a 6%, nejefektivnější byla varianta s důlkováním a osevem kolejové brázdy již při sázení, které omezila odtok z první srážky o 44%, a z celé simulace o 41% ve srovnání s „miskou“.

Graf 6 Výška povrchového odtoku po simulovaných srážkách průměr 2020-23 (poloprovozní pokus Věž, popis variant v tabulce 2)



Ještě větší přínos mělo osetí kolejové brázdy z hlediska omezení ztráty půdy, kterou dokázalo snížit až o 67%, z 9,1 na 3,0 t/ha. Během čtyřletého měření vykázaly všechny ověřované úpravy hrůbků i obou typů brázd vyšší odolnost vůči vodní erozi než srovnávací miskovité hrůbky bez dalších úprav. V obou ukazatelích byly nejúčinnější nové postupy se setím pomocné plodiny do kolejové brázdy. Kořenový systém rostlin v brázdě urychlil a zvýšil infiltraci vody do půdy, zpevnil dno brázdy a zabránil splavení půdy z ní. Nadzemní část rostlin zpomalila povrchový odtok, čímž podpořila sedimentaci unášených částic půdy. Kypření mělo příznivý vliv na infiltraci vody, a to zejména při srážce na suchou půdu. Důlky na vrcholu hrůbků i v brázdě vytvořily retenční prostor pro srážkovou vodu, která tak měla více času na infiltraci do půdy a rovněž sloužily jako sedimentační pasti pro erodovanou půdu, čímž omezily její ztrátu. Při opakovaných intenzivních nebo dlouhotrvajících srážkách dochází k zanášení důlků erodovanou zeminou sedimentující v důlcích. Proto je důležité, aby při sázení byly vytvořeny robustní hrůbky se širokým vrcholem, na němž je možné vytvořit důlky s velkou kapacitou a pevnými přehrádkami mezi důlky, protože je není možné během vegetace obnovit na rozdíl od důlků v nekolejové brázdě.

Graf 7 Ztráta půdy po simulovaných srážkách průměr 2020-23 (poloprovozní pokus Věž, popis variant v tabulce 2)



Závěr

Inovované půdoochranné postupy pro pěstování brambor, zejména na svažitých pozemcích spočívají v úpravě tvaru hrůbků a brázd při sázení důlkováním-hrázkováním a v kypření povrchu hrůbků a obnově důlků v nekolejové brázdě při vzcházení porostu s možností přihnojení do kořenové zóny rostlin. Byla vyvinuta a ověřena nová technologie osetí kolejové brázdy pomocnou plodinou, kterou lze realizovat v jedné operaci se sázením brambor nebo kypřením hrůbků. Inovované postupy prokázaly schopnost zadržet větší množství vody ze srážek (až o 41%) a tím výrazně omezit ztrátu půdy vodní erozí (až o 67%, z 9,1 na 3,0 t/ha). Lepší provlhčení hrůbků se projevilo vyššími výnosy hlíz brambor u variant s důlkováním, příp. důlkováním a kypřením. Nejvyšší výnosy za celé sledované období na obou stanovištích byly dosaženy při snížení dávky minerálních dusíkatých hnojiv aplikované při sázení a následném přihnojení do kořenové zóny rostlin při kypření před/při vzcházení brambor. Při tomto

způsobu hnojení bylo zjištěno i významně vyšší využití dusíku z aplikovaných hnojiv, jež dosáhlo až 73%, v průměru 63%.

Literatura

Čáp, P. 2021. Pozemkové úpravy. 29(1): 3–6.
Gitari, H.I. et al. 2018. Field Crops Research 222: 78–84
Gordon, R. J. et al. 2011. Agricultural Water Management 98: 1782-1788.
Janeček, M. et al. 2012. Ochrana zemědělské půdy před erozí 1.ISBN 978-80-87415-42-9.
Jemison J.M. 2019. Am. J. Pot. Res., 96: 13–20.
Maidl, F. X., et al. 2002. Geoderma, 105: 167-177.
Nyiraneza, J. et al. 2020. Can. J. Plant Sci. 100: 697–706 (2020)
Rens, L. et al. 2016. Nutr. Cycl. Agroecosyst., 104: 175-185.
Růžek P. et al. 2018. Úroda, 66(4): 97-101
Záruba, J. et al. 2023. Plant, Soil and Environment [online]. 69(5), 238-246
Zebarth, B. J., Rosen, C. J., 2007. Am. J. Pot. Res., 84: 3-18

Poděkování

Publikované výsledky byly získány za finanční podpory MZe ČR v rámci projektu QK1910382.

Kontakt:

Ing. Helena Kusá. Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha 6
Tel. 702 087 695, kusa@vurv.cz

Mezidruhové rozdíly v reakci rostlin pšenice na různou dostupnost vody

Interspecies differences in wheat plants response to various water availability

Lhotská M., Haberle J., Raimanová I., Svoboda P., Wollnerová J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha

Abstrakt

Dostupnost vody má výrazný vliv na výnos plodin a je ovlivněna mnohými faktory. Dvě odrůdy jarní pšenice dvouzrnky (TAPIRUZ, RUDICO) byly pěstovány v maloparcelovém pokusu při různé úrovni dostupnosti vody (K, S, V) a při diferencovaném hnojení dusíkem. Pro srovnání byla využita komerční odrůda jarní pšenice ODETA. Cílem bylo otestovat vhodnost pšenice dvouzrnky pro polní pěstování za různých vláhových podmínek. Jako hlavní srovnávací parametr byl zvolen výnos a efektivita využití vody (WUE), tedy množství vody, které porost spotřebuje na růst a tvorbu hospodářského výnosu. Dalšími pomocnými analýzami bylo stanovení sklizňového indexu (HI) a obsah dusíku v praporcovém listu. Výsledky prokázaly nižší citlivost pšenice dvouzrnky na měnící se vláhové podmínky a zároveň vyšší schopnost přizpůsobit se. Tato vlastnost spolu s dalšími pozitivními vlastnostmi pšenice dvouzrnky má potenciál pro využití při šlechtění nových odrůd pšenice seté.

Klíčová slova: Efektivita využití vody, WUE, dvouzrnka, sklizňový index

Abstract

Water availability has a significant impact on crop yield. It is influenced by many factors. Two spring emmer wheat varieties (TAPIRUZ, RUDICO) were grown in a small plot field experiment at different levels of water availability (K, S, V) and differentiated nitrogen fertilisation. The spring variety ODETA was used for comparison. The aim of this experiment was to test the suitability of emmer wheat to different moisture conditions. Yield and water use efficiency (WUE) were used as the main comparison parameters. The WUE is the amount of water used by the canopy to grow and produce yield. The harvest index (HI) and nitrogen content in the flag leaf were used as auxiliary parameters. The results showed that emmer wheat had the lower sensitivity to changing moisture conditions and the higher ability to adapt. These and other characteristics of emmer wheat have potential for breeding new wheat varieties.

Keywords: Water use efficiency, WUE, emmer wheat, harvest index

Úvod

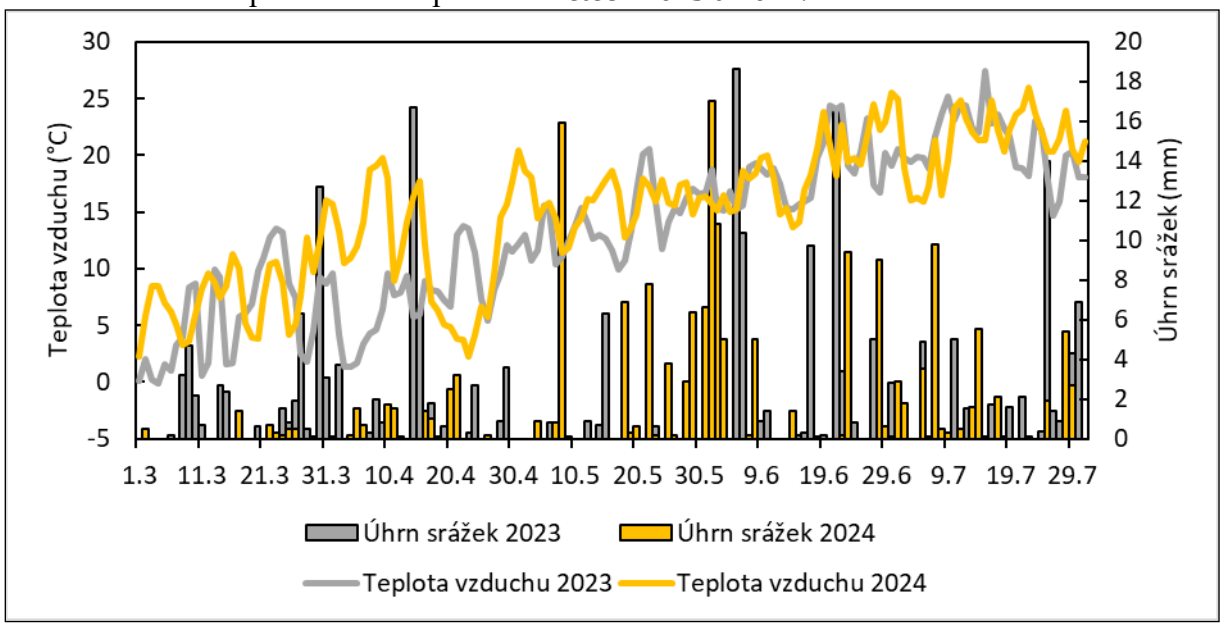
Domestikace osinatých pšenic (jednozrnka, dvouzrnka) sahá 10 až12 tisíc let do historie. Rostliny jsou charakteristické dlouhým stéblem (vysoká náchylnost k poléhání), rozpadavým klasem, horší uvolnitelností zrna od plev a odlišným počtem zrn v rámci jednoho klásku. To jsou důvody, proč se aktuální pěstební plochy ostatních obilovin v ČR, kam se řadí i pšenice dvouzrnka, pohybují kolem 6,8 tis ha (MZe, 2023). Přesto mají tyto plodiny neopomenutelné klady. Osinaté pšenice jsou svým původem lépe nastavené na nepřízeň počasí. Měnící se klimatické podmínky již mají a budou mít stále větší vliv na systémy hospodaření na zemědělské půdě. Přestože celkové množství srážek zůstává podobné jako dříve, rozložení se v rámci vegetačního období mění. Dochází ke střídání období jednorázových intenzivních srážek a následně delšího období sucha (Trnka *et al.*, 2021; Gall, 2022). Pěstované rostliny se tak často musí vypořádat s dlouhodobým nedostatkem vody a následně pak s jeho náhlým přebytkem. Pro optimální růst a výnos běžných komerčních odrůd pšenice je však důležitý rovnoměrný přísun vody v podobě mírných srážek v období aktivního růstu a následně pak omezený v období dozrávání. Atraktivita pšenice dvouzrnky pro šlechtitele je podpořena výbornou výživovou hodnotou, pěstební nenáročností a odolností proti houbovým chorobám. Jak dále uvádějí Konvalina *et* Grausgruber (2012), zrno dvouzrnek obsahuje vysoký podíl bílkovin. Svojí nenáročností se pšenice dvouzrnka hodí také do pěstebního schématu ekologického nebo low input zemědělství.

Ve VÚRV se podařilo vyšlechtit a uvést na trh dvě odrůdy pšenice dvouzrnky, TAPIRUZ a RUDICO. Právě tyto dvě odrůdy byly otestovány v porovnání s běžnou komerčně dostupnou odrůdou pšenice seté při různé úrovni dostupnosti vody a různé úrovni dusíkatého hnojení.

Materiál a metody

Maloparcelový pokus byl proveden v letech 2023–2024 na pokusných plochách VÚRV nacházejícího se v 340 m n. m. v městské části Praha 6 – Ruzyně. Charakteristika pozemku: černozem luvická, průměrný roční úhrn srážek 477 mm, průměrná teplota 8,5 °C. Průběh počasí je zaznamenán na Obrázku 1. V rámci pokusu byly sledovány 3 odrůdy jarní pšenice: komerční odrůda pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) ´ODETA´ (výsevek 170 kg/ha) a 2 odrůdy pšenice dvouzrnky (*Triticum diccocon SCHRANK*) ´TAPIRUZ´ a ´RUDICO´ (výsevek 140 kg/ha) ve 3 různých úrovních dostupnosti vody (diferenciace od počátku metání): varianta se závlahou (V) - pro dosažení optimální zásoby vody byla vedena pod kapkovou závlahou; varianta sucho (S) - realizována pomocí posuvného krytu, který odstínil srážky; a kontrolní varianta (K) - vedena stejným agrotechnickým postupem, bez závlahy i zakrývání, tato varianta představovala běžné podmínky pole. Ve variantách K a V byly 2 různé úrovně hnojení dusíkem (varianta 1 – 30 kg N/ha a 2 – 75 kg N/ha); varianta S byla vedena pod úrovní hnojení 2. Pokus tak celkem zahrnoval 5 testovaných variant pro každou odrůdu. Během pokusu bylo dle klasických agrotechnických postupů prováděno mechanické, herbicidní a insekticidní ošetření. V obou letech byl aplikován fungicidní postřik při napadení rzí (BBCH 50). Srážky a teploty byly měřeny ve stanici vzdálené 50–100 m od pokusu (www.vurv.cz/meteostanice).

Obrázek 1: Průběh počasí během pokusu v letech 2023 a 2024.



Výnos byl přepočítán na čisté zrno (zbavené osin a plev) pomocí zjištěného koeficientu poměru zrn a plev. Sklizňový index (HI) byl stanoven jako poměr mezi hmotností čistých zrn a hmotnosti celkové nadzemní biomasy.

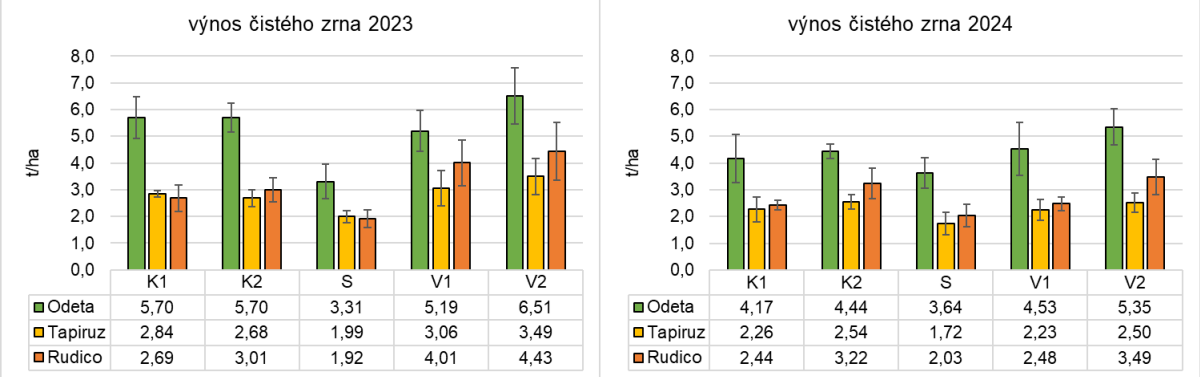
Efektivita využití vody pro tvorbu zrna (WUE) byla vypočtena jako podíl výnosu a celkové spotřeby vody a vyjádřena v gramech suché hmoty čistého zrna vytvořené na litr spotřebované vody. Objem vody v půdě byl počítán z údajů o vlhkosti půdy (gravimetricky) do hloubky 90 cm a objemové hmotnosti vrstev půdy. Spotřeba vody byla vypočtena z rozdílu obsahu vody v půdě před setím a ve zralosti, se započtením vody ve srážkách a závlaze. Vzhledem k náročnosti získání dat byly vzorky půdy odebírány jako směsný vzorek z opakování.

Obsah celkového dusíku v praporcovém listu (mg N/g DW listu) byl stanoven

spektrofotometricky v mineralizovaném vzorku na automatickém analyzátoru Skalar San Plus System (Breda, Nizozemí). Odběr vzorků praporcových listů byl realizován ve třech termínech (kvetení, 25. den po kvetení a v den sklizně) důležitých pro vývoj klasu, ze stébel ve stejné vývojové fázi, označených na začátku kvetení (BBCH 61).

Výsledky a diskuze

Graf 1: výnos čistého zrna v letech 2023 a 2024 pro jednotlivé odrůdy a varianty (průměrné hodnoty ± std. odchylka).

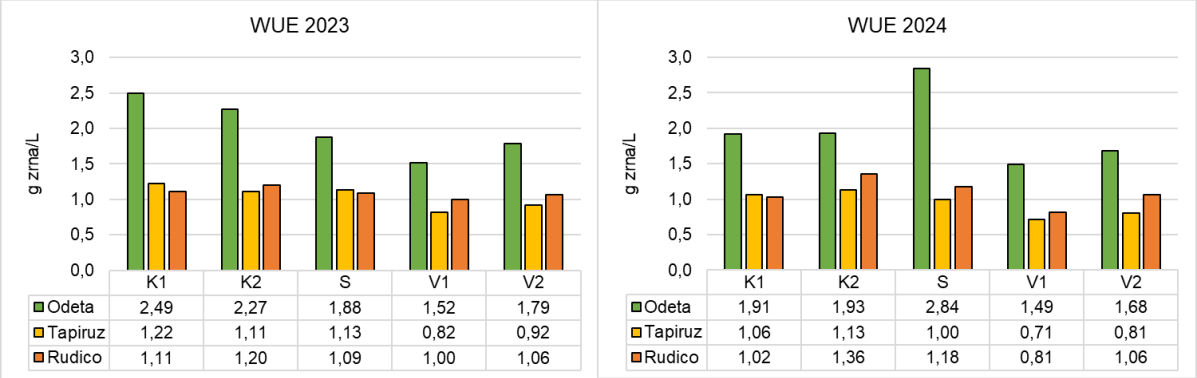


Celková výnosová odezva na testované podmínky byla v obou letech srovnatelná (Graf 1). Ve srovnání odrůd měla komerční odrůda Odeta o poznání vyšší výnosy oproti dvouzrnkám. Rostliny udržované v omezeném vodním režimu (S) měly nejnižší výnosy. V porovnání k výnosu varianty K2 dosahovaly v roce 2023 58, 74 a 64 % výnosu dané odrůdy (Odeta, Tapiruz, Rudico), a v roce 2024 pak 82, 68 a 63 %. Reakce na zvýšenou dávku dusíkatého hnojiva byla v reakci na úroveň dostupnostui vody odlišná. Nejvíce se projevila zvýšená dávka dusíkatého hnojiva společně s optimální závlahou (V2). Hodnota sklizňového indexu u dvouzrnek je obecně nižší ve srovnání s běžně pěstovanými odrůdami pšenice; z Tabulky 1 je vidět, že obě odrůdy dvouzrnek měly srovnatelné hodnoty HI. Jednotlivé testované varianty a průběh vegetačního období měly na HI malý, zanedbatelný vliv, protože tato vlastnost je dána především geneticky (Shani *et al.*, 2024). Podle Konvalina *et al.* (2012) je HI u dvouzrnek ve srovnání s běžnou pšenici obecně nižší.

Tabulka 1: Hmotnost tisíce semen (HTS) a sklizňový index (HI) v letech 2023 a 2024 pro jednotlivé odrůdy a varianty (průměrné hodnoty ± std. odchylka).

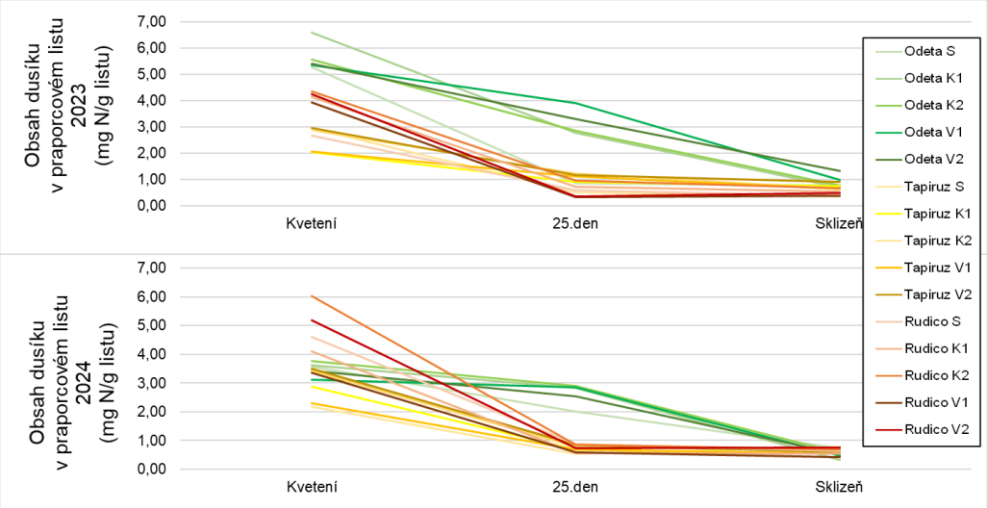
Odrůda a varianta		HTS (g)		Sklizňový index – HI	
		2023	2024	2023	2024
Odeta	K1	36,30 ± 1,17	36,42 ± 2,06	0,54 ± 0,02	0,54 ± 0,01
	K2	33,92 ± 0,97	35,40 ± 1,58	0,52 ± 0,00	0,53 ± 0,02
	S	31,30 ± 1,43	37,58 ± 1,98	0,49 ± 0,03	0,52 ± 0,01
	V1	34,36 ± 1,96	34,76 ± 1,80	0,52 ± 0,03	0,54 ± 0,04
	V2	34,78 ± 1,81	35,47 ± 1,26	0,54 ± 0,01	0,55 ± 0,02
Tapiruz	K1	22,71 ± 1,42	31,25 ± 3,13	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,01
	K2	23,05 ± 1,59	31,05 ± 0,59	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,02
	S	25,19 ± 1,69	27,55 ± 3,29	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,01
	V1	27,66 ± 0,56	30,93 ± 2,16	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,02
	V2	27,24 ± 1,44	30,90 ± 1,91	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,00
Rudico	K1	22,05 ± 1,01	33,98 ± 1,55	0,28 ± 0,02	0,32 ± 0,01
	K2	21,34 ± 1,20	34,96 ± 1,96	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,01
	S	22,77 ± 1,90	26,08 ± 2,05	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01
	V1	25,64 ± 1,06	34,32 ± 0,82	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01
	V2	25,95 ± 1,43	34,42 ± 1,62	0,29 ± 0,03	0,31 ± 0,02

Graf 2: Efektivita využití vody v letech 2023 a 2024 pro jednotlivé odrůdy a varianty.



Efektivita využití vody vyjádřená jako podíl výnosu zrna na 1 litr spotřebované vody korespondovala s výnosem zrna, zatímco celkové množství spotřebované vody (evapotranspirace) bylo u všech 3 odrůd pšenic, u stejných variant, podobné. Nejvyšší odezva byla vyvolána u komerční odrůdy Odeta, kde se negativně projevil nedostatek i optimum vody v půdě. Odrůdy pšenice dvouzrnky se v hodnotách WUE napříč variantami příliš nelišily. Reakce rostlin na diferencované hnojení dusíkem se projevila pouze u variant s optimální závlahou u všech 3 testovaných odrůd. Rostliny, které měly k dispozici optimální množství vody, ale nebyly dostatečně zásobené dusíkem, nedokázaly tohoto zvýhodnění využít – jejich WUE bylo dokonce nižší než u rostlin rostoucích v nedostatku vody. Studie Zhang *et al.* (2020) uvádějí, že pro zvýšení výnosu zrna je důležitá kombinace optimální dostupnosti vody v kombinaci s dostatečnou úrovní dusíkatého hnojení. Při pěstování byl v obou letech zaznamenám tento efekt ve srovnání variant V1 a V2 u všech testovaných odrůd (Graf 2), kde vyšší dávka aplikovaného dusíkatého hnojiva měla na WUE pozitivní vliv. Armstrong *et al.* (2019) doplňují, že kromě vhodné míry aplikovaného dusíkatého hnojiva je při pěstování důležité také střídání plodin, odrůda a termín setí. Zajímavostí je reakce odrůdy Odeta v roce 2024 ve variantě s omezeným množstvím vody (S), kde se WUE zvýšilo. Vysvětlením může být, že při stresu ze sucha dochází u různých genotypů pšenice k rozdílné regulaci specifických metabolitů (flavonoidy, aminokyseliny, fenolové kyseliny a cukry) souvisejících s obranou (Mutanda *et al.*, 2024). Prezentovaný výnos ze stresované varianty v obou letech (Graf 1) ukazuje, že tato obrana nebyla účinná – varianta dosáhla nejnižšího výnosu. I když v porovnání roku 2023 a 2024 bylo snížení výnosu v roce 2024 méně výrazné (58 oproti 82 % v porovnání s variantou K2).

Graf 3: Obsah dusíku v praporcovém listu v letech 2023 a 2024 pro jednotlivé odrůdy a varianty



Z Grafu 3 je na první pohled patrné, že translokace dusíku se u dvouzrnky v porovnání s komerční odrůdou pšenice odlišuje. Zatímco odrůda Odeta ponechala dusík v praporcovém listu do poslední chvíle. Obě odrůdy pšenice dvouzrnky měly 25. den po kvetení 80 % veškerého dusíku translokováno z praporcového listu do klasu. Vliv různých stupňů dostupnosti vody se v rámci variant a odběrů lišil, stejná tendence však v rámci ročníků ověřena nebyla. Pokles obsahu N v listech je spojován se snížením obsahu chlorofylu a zároveň snížením fotosyntetické aktivity, která se pak odráží ve výnosu (Fathi, 2022). Tato tendence pšenice dvouzrnky byla provedeným pokusem potvrzena (Graf 1).

Závěr

Ve srovnání s komerčně pěstovanou pšenicí nebyla efektivita využití vody pro tvorbu zrna u pšenice dvouzrnky natolik ovlivňována měnícími se závlahovými podmínkami. Přestože obecně pšenice dvouzrnka nedosahuje tak vysokého výnosu jako komerční pšenice, její potenciál využití se může nacházet právě v přenosu jejích pozitivních vlastností ve vztahu k nižší citlivosti na vláhové podmínky v průběhu vegetace.

Literatura

Armstrong, R., Perris, R., Munn, M., Hekmeijer, P., Dunsford, K., Bell, K., Waldner, F., Hochman, Z., (2019). Relative importance of various factors on the water use efficiency of wheat. GRDC Adviser Update, Bendigo, February 2019.

Fathi, A., 2022. Role of nitrogen (N) in plant growth, photosynthesis pigments, and N use efficiency: A review. Agrisost 28, 1–8. https://doi.org/10.5281/ZENODO.7143588

Gall, J. (2022). Změna klimatu a zemědělství. Agromanuál, 17.1.2022, dostupné z: https://www.agromanual.cz/cz/clanky/management-a-legislativa/management/zmena-klimatu-a-zemedelsti

Konvalina, P., Grausgruber, H., (2012). Pšenice dvouzrnka [*Triticum diccocum* (Schrank) Schuebl.] in Konvalina, P., Pěstování a využití minoritních obilnin a pseudoobilnin v ekologickém zemědělství. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Konvalina P., Capouchová I., Stehno Z., Moudrý J. (2012): Differences in yield parameters of emmer in comparison with old and new varieties of bread wheat. African journal of agricultural research, 7: 986–992.

Mutanda, M., Figlan, S., Chaplot, V., Madala, N.E., Shimelis, H., (2024). Selection of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes using yield components, water use efficiency and major metabolites under drought stress. Journal of agronomy and crop science 210, e12766.

https://doi.org/10.1111/jac.12766

MZe: Heřmanská, A., Kůst, F., (2023) Situační a výhledová zpráva Obiloviny 2022. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha. ISBN: 978-80-7434-742-9. Dostupné z: https://mze.gov.cz/public/portal/-a33826---r5pqyWAw/svz

Shahi, D., Guo, J., Babar, M.A., Pradhan, S., Avci, M., Khan, N., McBreen, J., Rayamajhi, S., Liu, Z., Bai, G., *et al.*, (2024). Deciphering the genetic basis of novel traits that discriminate useful and non-useful biomass to enhance harvest index in wheat. Plant Genome, e20512. https://doi.org/10.1002/tpg2.20512

Trnka, M., Balek, J., Brázdil, R., Dubrovský, M., Eitzinger, J., Hlavinka, P., Chuchma, F., Možný, M., Prášil, I., Růžek, *et al.*, (2021). Observed changes in the agroclimatic zones in the Czech Republic between 1961 and 2019. Plant Soil & Environment 67, 154–163. https://doi.org/10.17221/327/2020-PSE

Zhang, Z., Zhang, Y., Shi, Y., Yu, Z., (2020). Optimized split nitrogen fertilizer increase photosynthesis, grain yield, nitrogen use efficiency and water use efficiency under water-saving irrigation. Scientific reports 10(1), 20310. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75388-9

Dedikace: Výsledek vznikl za podpory projektu MZe ČR RO 0423.

Kontakt:
Ing. Marie Lhotská
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73, Praha 6–Ruzyně 161 06
607 060 324, marie.lhotska@vurv.cz

Stanovení optimální doby sklizně porostu kukuřice pomocí bezpilotního dronu s multispektrální kamerou (DJI Mavic 3M)

Determining the optimal harvest time to maize crops using an unmanned drone with a multispectral camera (DJI Mavic 3M)

Malá S.[1], Jambor V. [1], Vosynková B. [1], Synková H. [1]

[1] *NutriVet s.r.o., Vídeňská 1023, 691 23 Pohořelice*

Abstrakt

Stanovení optimální doby sklizně je důležitý faktor pro zúročení celoroční práce na poli a startovací bod pro výživu skotu. V posledních letech byly zaznamenány meziroční extrémní klimatické rozdíly, které způsobovaly velké výkyvy ve výnosech, ale také výrazně odlišnou nutriční hodnotu nejen z pohledu kvantitativního (výnos hmoty kukuřice), ale i kvalitativních ukazatelů (podíl škrobu, podíl klasu, obsah NDF, stravitelnost NDF atd.). Plošné mapování porostu kukuřice pomocí bezpilotního dronu nám nabízí oproti tradičním metodám informace o kvalitě porostu neinvazivní cestou (nedochází k poničení porostu). Nahradíme tak jednotky odběrů rostlin a jejich stanovení obsahu sušiny porostu za komplexní informaci z celého porostu. Pro jednotlivá měření dronem jsme schopni porovnat měnící se vlastnosti pole jako jsou průměr z celého pole a podíl porostu v optimu.

Klíčová slova: bezpilotní dron, fotometrie, nutriční analýza, optimální doba sklizně, spektrometrie, kukuřice

Abstract

Determining the optimal harvest time is an important factor for making the most of year-round field work and a starting point for cattle nutrition. In recent years, extreme interannual climatic differences have been recorded, which caused large fluctuations in yields, but also significantly different nutritional value not only in terms of quantitative (corn mass yield), but also qualitative indicators (starch proportion, cob proportion, NDF content, NDF digestibility, etc.). An area mapping of the maize crop using an unmanned drone offers us information about the quality of the crop in a non-invasive way (no damage to the crop) compared to traditional methods. In this way, we replace the units of plant sampling and their determination of the dry matter content of the crop with comprehensive information from the entire crop. For each drone measurement, we are able to compare changing properties such as the average from the field and the proportion of the crop in the optimum.

Keywords: UAV (unmanned aerial vehicle), photogrammetry, nutritional analysis, optimal harvest time, spectrometry, maize

Úvod

Úloha dálkového průzkumu Země hraje důležitou roli v precizním zemědělství již několik let. K snímkování zemědělských oblastí lze použít satelitní snímky, nebo hyperspektrální či multispektrální kamery. Tento příspěvek vychází z případové studie popsané v publikaci a staví na popsané skutečnosti, kterou je existující korelace mezi nutričními hodnotami rostlin a vegetačními indexy. V uvedené literatuře jsou zpracovány výsledky získané během jedné sklizňové sezóny. Tato práce je založena na datech naměřených za tři roky (sezónní sklizně) a má za cíl ověřit a rozšířit výsledky popsané v literatuře [1] a [2].

Celé rostliny kukuřice tvoří celkovou biomasu sklizené plodiny. Základním ukazatelem rostlinné fenofáze je stanovení obsahu sušiny v rostlině. To se výrazně zvyšuje, jak plodina

dozrává. U kukuřice je sušina ukazatelem stupně vegetativní zralosti plodiny a její množství ovlivňuje kvalitu procesu skladování v podobě silážování [3]. Chemické složení rostlin kukuřice se během vegetačního období mění. V období, kdy rostlina nemá nasazené klasy, je energie v rostlině především ve formě vlákniny. Obsah se liší rostlinu od rostliny v závislosti na zvolené době sklizně. Aby následně zpracovaná kukuřičná siláž obsahovala nejen vlákninu, ale i škrob, sklízí se ve fázi zralosti mléčného vosku, kdy se sušina celé rostliny pohybuje mezi 280 a 330 g/kg. V tomto případě je stupeň mléčné linky 2/3 kukuřičného zrna. Dalším ukazatelem vegetativní zralosti kukuřice je schopnost vyrábět siláž nebo produkovat fermentační kyseliny, které siláž konzervují.

Velmi důležitý vliv na kvalitu procesu fermentace siláže má doba sklizně a množství celkové biomasy. Kvalita pěstování kukuřice a následné silážování je rok od roku velmi proměnlivá vlivem povětrnostních podmínek, výběru vhodného hybridu s příslušným číslem ranosti kukuřice FAO (Food and Agriculture Organisation) a efektem ošetření včetně kvality setí kukuřice.Vzorky kukuřice se běžně odebírají na poli z různých míst na poli, aby se posoudil stav a fenofáze kukuřice. Když je dosaženo stádia mléčné linky, vzorky jsou odebrány do laboratoře k chemické analýze ke stanovení obsahu sušiny zrna a celé rostliny. Podle vývoje rostliny a sušiny je pak předem stanovena doba sklizně, která se liší podle účelu použití na produkci mléka nebo metanu v bioplynové stanici (BPS).

Vzhledem k tomu, že obsah sušiny je důležitým parametrem pro stanovení optimální doby sklizně, zabývali jsme se otázkou, zda lze získat přesnější informace o průměrné hodnotě sušiny celého sklizeného pole, které je nehomogenní. Náš článek poskytuje odpověď na tuto otázku popisem efektivní integrace různých metod a technologií, konkrétně dronu s multispektrální kamerou, analýzy obrazových dat pro získání vegetačních indexů a chemické analýzy vzorků odebraných v terénu a porovnání s NIR analyzátorem v komíně řezačky.

Materiál a metody

Použili jsme křivky zveřejněné v článku, které vznikli na základě našeho měření od roku 2019 na několika lokacích v Jihomoravském kraji. Měření porostu kukuřice ke sklizni na siláž, byla provedena v týdenních intervalech zhruba od poloviny srpna (období od začátku mléčné zralosti kukuřice) do poloviny října, kdy na zrnu je již patrná černá skvrna a sušina rostliny přesahuje 65 %.

Pro zachycení pole jsme zvolili cenově dostupný dron DJI Mavic 3M a pomocí softwaru Pix4D získali orthomapu pole s rozlišením 3cm / pixel, což odpovídá stovkám měření na jednu rostlinu kukuřice.

Kamera použitého dron disponuje multispektrální kamerou, která reprezentuje snímek 5 obrazovými soubory. A to klasickým barevným snímkem a 4 soubory zachycují odrazivost snímaného objektu pro následující vlnové délky:

- NIR – Near Infrared, 860 nm ± 26 nm
- RE - RedEdge, 730 nm ± 16 nm
- R - Red, 650 nm ± 16 nm
- G - Green, 560 nm ± 16 nm

Ze zmíněných vlnových délek je možné vypočítat následující vegetační indexy:

- **NDVI** (Normalized Difference Vegetation Index) - počítá se z odrazivosti červeného a NIR spektra. Určuje zdravotní stav rostliny.
- **GNDVI** (Green Normalized Difference Vegetation Index) - počítá se z odrazivosti zeleného a NIR spektra. Určuje aktivitu chlorofylů (kvalita fotosyntézy -> obsah vody, n-látek).

Nejvyšší přesnost dosahuje křivka pro stanovení sušiny porostu vypočítaná na základě GNDVI.

Pro praktické využití výše zmíněné křivky jsme se zaměřili na stanovení sušiny výrazně heterogenního porostu kukuřice v Jihočeském kraji. Pro kontrolní stanovení sušiny porostu jsme udělali odběr několika vzorků porostu za použití běžně používaných metod:

- odběr 3x10 rostlin kukuřic po sobě jdoucích v řadě z náhodně vybrané lokality (1 vzorek)
- průsek porostu kukuřice řezačkou s přístrojem AgriNIR v komíně (celkem 6 vzorků)

Nejdříve byl nasnímán snímek pomocí multispektrální kamery, aby byly zachyceny i odebrané rostliny a následně byly odebrány vzorky z lokalit zachycených na Obrázku 1.

Obrázek 1: Lokality odběru rostlin pro stanovení sušiny porostu kukuřice

Pro běžné použití v praxi pak využíváme ověření výsledku za pomoci jednoho odběru kukuřice s přesnou GPS polohou.

Výsledky a diskuze

Tabulka 1 shrnuje naměřené hodnoty. Budeme-li vycházet z definované přesnosti NIR přístroje, pak porost kukuřice má sušinu 40,5 % s chybou 3procentních bodů. Stanovení dle jednotlivých metodik odpovídá tomuto tvrzení.

Ověřili jsme si na 7 vzorcích, že chybovost AgriNIRu oproti laboratorním vzorkům je v rámci standardní chyby metodiky **odběru.** Jde o to, že AgriNIR nasnímá homogenizovanou hmotu tisícem dílčích analýz, kdežto do laboratoře se dostane jen cca 2 kg vzorek této homogenizované hmoty z cca 12 řádků.

Oproti AgriNIRu má dron výrazně vyšší odchylku. Nicméně snímá jen část rostliny, která je viditelná z ptačí perspektivy. Navíc snímá jednotlivé rostliny nikoliv homogenizovanou hmotu z řezačky. Pro porovnání uvádíme odběr 3x5 rostlin, jehož hmota nebyla homogenizována řezačkou. Je patrné, že průměr odebrané plochy je dle GNDVI blízký laboratornímu výsledku,

kdy rozdíl je necelé 2procentní body a uváděná přesnost přístroje AgriNIR je 3procentní body.

Nutné poznamenat, že pro přesné výsledky z dronu je potřeba znát polohu odebraných rostliny v GPS souřadnicích. Nepřesně zaznamenaná poloha může hrát velkou roli, pokud je porost výrazně heterogenní. Údaje v tabulce využili GPS souřadnice z přístroje AgriNIR. Pokud se použila poloha zaznamenaná pomocí běžného smartphonu, výsledky byly zkreslené a nepřesné.

Tabulka 1: Srovnání různých metodik pro stanovení sušiny porostu kukuřice (v %)

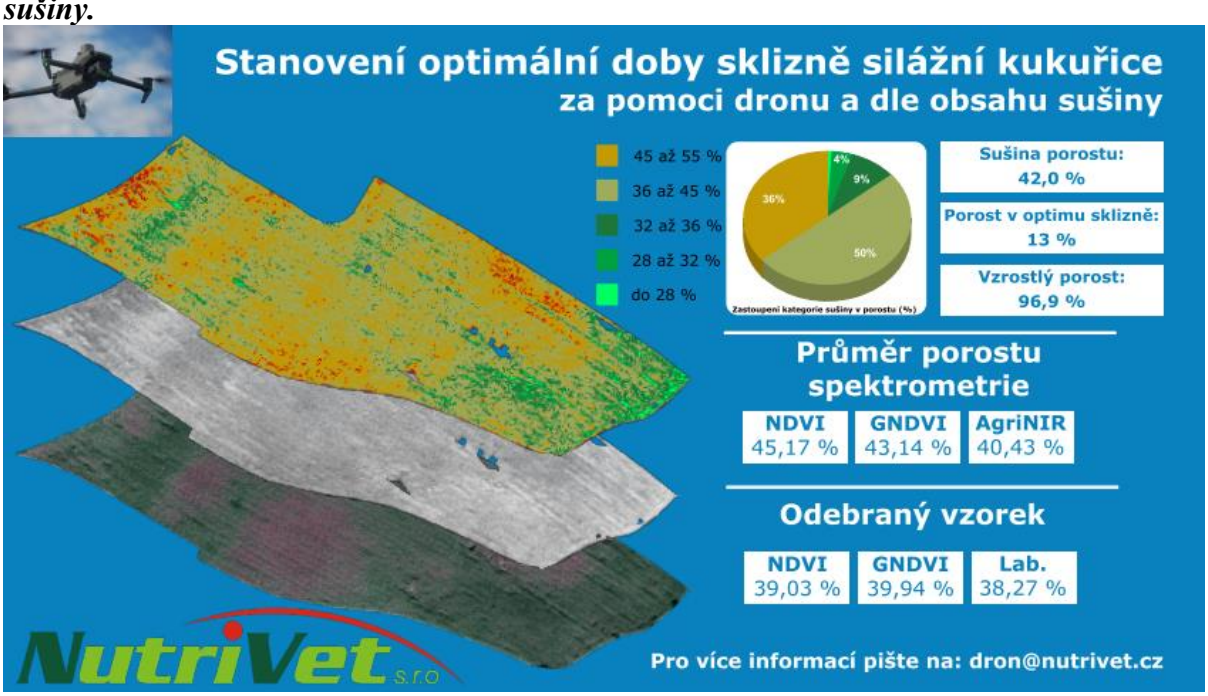
Vzorek	NDVI	GNDVI	Laboratoř	Zel.Část	Klas	AgriNIR
řezanka 1	43,6	42,5	38,27	NA	NA	38,09
řezanka 2	44,2	43,7	37,12	NA	NA	40,56
řezanka 3	56,3	45,9	35,48	NA	NA	39,15
řezanka 4	39,9	39,7	40,58	NA	NA	40,75
řezanka 5	43,0	43,3	37,97	NA	NA	39,38
řezanka 6	45,7	43,3	40,62	NA	NA	38,09
3x5 rostlin	38,1	46,3	44,56	36,82	62,34	40,00
Průměr z odebraných vzorků	**47,0**	**44,5**	**38,34**	**NA**	**NA**	**39,68**
Průměr pole	**45,1**	**43,1**	**NA**	**NA**	**NA**	**40,43**

Pro odhad doby sklizně nám dron oproti tradičnímu odběru vzorků pro laboratorní analýzu nabízí sledování následujících parametrů pole a jejich vývoj v čase:

- **Průměrná sušina celého pole:** pro poškozené pole má pouze informativní charakter.
- **Průměrná sušina zelené části pole:** je-li pole poškozené (divočáci, chybějící rostliny apod.) má větší vypovídající hodnotu než průměr celého pole, odpovídá číslu získanému z NIR přístroje na řezačce.
- **Podíl porostu s optimálním obsahem sušiny (30 až 38 %) z celkové plochy porostu:** díky predikci vývoje na 3 až 6 dní je možné sledovat, zda podíl poroste nebo bude klesat.
- **Podíl porostu mimo optimální obsah sušiny z celkové plochy porostu:** umožňuje sledování rizik sklizně (nevyzrálý / přezrálý porost) pro stabilitu siláže.
- **Podíl poničeného porostu (porostu s nízkým výnosem):** nevzrostlé rostliny, rostliny poničené krupobitím nebo zvěří.

Obrázek 2 zachycuje heterogenitu snímaného pole a jeho další analýzu. Porost je silně přezrálý. Pouze 13 % porostu je v optimu a tato hodnota bude časem klesat, protože již není porost, který by dozrál do optima. Porost je lehce poničený cca 3 %, jedná se převážně o chybějící rostliny. Zároveň je vidět, že není potřeba se bát, že by sklizeň bylo potřeba zastavit kvůli vlhkým ložiskům. Dron zároveň lokalizuje problematická místa a je možné navázat variabilním setím, hnojením apod. Obrázek 2 částečně shrnuje výsledky z Tabulky 1 a rozšiřuje o hodnoty, které lze stanovit pouze na základě snímku z dronu.

Obrázek 2: Stanovení optimální doby sklizně silážní kukuřice za pomoci UAN podle obsahu sušiny.



Dále uvádíme výsledky z dalších měření v Tabulce 2. Tyto měření jsou napříč jednotlivými kraji a hybridy. Jsou měřeny v reálných podmínkách a zachycují přesnost stanovení sušiny na základě GNDVI a NDVI indexu.

Tabulka 2: Srovnání stanovení sušiny UAN a laboratorních výsledků z odběru 3x10 po sobě jdoucích rostlin kukuřice z různých lokalit a hybridů.

Hybrid kukuřice		DKC3117	**neznámý**	**DKC5911**	**Neutrino**	**DKC5911**
Kraj		Vysočina	Jihočeský	Jihomoravský	Pardubický	Olomoucký
Stanovená sušina **[g.kg^{-1}]**		34,69	40,58	33,24	31,61	31,84
NDVI	Sušina **[g.kg^{-1}]**	36,74	40,17	33,03	33,74	31,03
GNDV	Sušina **[g.kg^{-1}]**	36,34	41,14	32,34	31,34	34,74

Stejně jako další NIR přístroje je potřeba měřit jen jednu plodinu, pokud snímek zachytí jiný materiál je celý datový soubor zkreslený. Je proto výhodné měřit zapojený porost, kdy listy kukuřice zakryjí meziplodinu, půdu nebo plevel. Dobrých výsledků se dosahuje cca 10 dní před předpokládanou sklizní, kdy agronom může detekovat rozdíly ve vyzrálosti porostu a připravit se na sklizeň. Je ještě čas zopakovat měření a zjistit reálný přírůstek sušiny a jiných nutričních parametrů. Pro podniky, které nemají možnost použít NIR přístroj při sklizni, může sloužit jako doklad stavu porostu a přípravu pro další sezónu.

V sezóně 2024 sklizeň kukuřice začala velmi brzo, již v první půlce srpna. Lokality, které běžně sklízeli kukuřici až v říjnu měli začátkem září po sklizni. Setkávali jsme se často s vyprahlou kukuřicí. Přestože počasí v červnu a červenci bylo přívětivé a dovolilo rostlinám získat patřičnou výšku porostu a mléčnou zralost zrna, tak v půlce srpna již bylo pozdě přemýšlet nad dosažením optima kukuřičné siláže do 35 %. Díky nadprůměrnému počtu tropických dní se v srpnu přírůstek obsahu sušiny kukuřice pohyboval na hraně 1% bodu za den. V některých lokalitách se sklízel porost se sušinou 40 % a více. Často obchůzka porostu vypadala tragicky, kdy rostlina zaschla již v mléčné zralosti zrna. Také výsledky z dronu byly zkresleny a

průměrná sušina porostu byla ovlivněna suchými listy, zatímco stonek si ještě uchovával přijatelnou vlhkost. Přesto bylo použití dronu přínosem pro odhalení významných zelených ložisek, která mohla zastavit sklizeň. Více než kdy jindy se ukázal vliv podloží na kvalitě porostu kukuřice a schopnost půdy uchovat vláhu.

Závěr

Měření za pomocí dronu s multispektrální kamerou heterogenního porostu vykazuje lepší nebo srovnatelné výsledky jako měření běžným NIR přístrojem bez další kalibrace zahrnující adaptaci na lokální podmínky použití. Výhodou je, že se jedná o neinvazivní měření, a tudíž rostlina není znehodnocena. Díky algoritmům pro potlačení vlivu intenzity okolního slunečního záření je metoda stabilní vůči vlivům počasí.

Monitoring porostu dronem umožňuje porovnávat vyzrálost porostu v čase a sledovat, kdy je sklizňové okno otevřené a kdy zavřené. Je možné predikovat vývoj porostu na 3 až 6 dní dopředu. Přestože nemusí dosahovat takové přesnosti jako laboratorní a NIR analýza, přináší důležitá data pro plánování sklizně.

Literatura

[1] Janoušek, J.; Jambor, V.; Marcoň, P.; Dohnal, P.; Synková, H.; Fiala, P. Using UAV-Based Photogrammetry to Obtain Correlation between the Vegetation Indices and Chemical Analysis of Agricultural Crops. Remote Sens. 2021, 13, 1878. https://doi.org/10.3390/rs13101878

[2] Janoušek, J.; Marcoň, P.; Jambor, V. 19th International Symposium FORAGE CONSERVATION: Conference Proceedings. Brno: Mendova univerzita v Brně, 2023. ISBN 978-80-7509-919-8.

[3] GRACIA-ROMERO, Adrian, Omar VERGARA-DÍAZ, Christian THIERFELDER, Jill E. CAIRNS, Shawn C. KEFAUVER a José L. ARAUS. Phenotyping Conservation Agriculture Management Effects on Ground and Aerial Remote Sensing Assessments of Maize Hybrid Performance in Zimbabwe. Proceedings [online]. 2018, 2(7), 7. DOI: 10.3390/ecrs-2-05181. ISSN 2504-3900. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2504-3900/2/7/367

Kontakt:

Ing. Soňa Malá
NutriVet, s.r.o.
Vídeňská 1023
691 23 Pohořelice
nutrivet@nutrivet.cz
www.nutrivet.cz

Emise CO_2 a zadržení vody po různém zpracování půdy

CO_2 emissions and water retention after different tillage practices

Mühlbachová Gabriela, Růžek Pavel, Kusá Helena, Vavera Radek

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73, CZ 16106 Praha 6 – Ruzyně

Abstrakt

Emise CO_2 a ztráty vody z půdy byly zjišťovány v letech 2022 – 2024 na dlouhodobém polním pokusu, kde jsou od roku 1995 používány různé technologie zpracování půdy: orba do 20 – 22 cm, podmítka do 8 – 10 cm a půda bez zpracování. Výsledky ukazují, že nejvyšší emise CO_2 a současně nejnižší vlhkost půdy byly zjišťovány po orbě. Naopak v průměru nejnižší emise CO_2 a největší vlhkost půdy byly zjištěny u půdy bez zpracování. Emise CO_2 a zadržení vody v půdě ovlivňuje období, kdy je půda zpracovávána. Letní období je z tohoto hlediska nejrizikovější, protože vysoké teploty spolu s intenzivním zpracováním půdy vedou k nejvyšším emisím CO_2 a ztrátám vody z půdy. Co nejnižší intenzita zpracování půdy spolu s mulčem slámy na povrchu půdy je jednou z možností jak snížit emise CO_2 a zadržet vodu v půdě ve stále častějších obdobích sucha a nepravidelných srážek.

Klíčová slova: Emise CO_2; Orba; Podmítka; Bez zpracování; Mulč

Abstract

CO_2 emissions and water losses from the soil were determined in the years 2022 – 2024 in a long-term field experiment, where various tillage practices have been used since 1995: ploughing up to 20 – 22 cm, chiselling up to 8 – 10 cm and no-tillage. The results showed that the highest CO_2 emissions and the lowest soil moisture were found after ploughing. On the other hand, on average, the lowest CO_2 emissions and the highest soil moisture were found in no-tillage. CO_2 emissions and water retention in the soil affect the period of the soil tillage. Summer is the most risky from this point of view, as high temperatures together with intensive tillage lead to the highest CO_2 emissions and water losses from the soil. The lowest tillage intensity together with straw mulch on the soil surface is one of the ways to reduce CO_2 emissions and retain water in the soil in periods with increasingly frequent drought periods and irregular precipitation.

Keywords: CO_2 emissions; Ploughing; Chiselling; No-tillage; Mulch

Úvod

CO_2 je jeden ze skleníkových plynů, které významně přispívají ke klimatické změně. Jedním ze zdrojů emisí CO_2 je také půda, kde v různé intenzitě probíhají mineralizační procesy. Intenzivní zpracování půdy vede k jejímu většímu provzdušnění, mineralizaci půdy a v důsledku ztrátám uhlíku ve formě CO_2 (Mühlbachová et al., 2022, 2023). V posledních letech zaznamenáváme stále častější periody sucha (Zahradníček et al., 2015), které mohou být následovány extrémními srážkami, na které je nutné se adaptovat (Žalud et al., 2019). Letní období je z hlediska výše emisí CO_2, a ztrát vody z půdy jedno z nejkritičtějších, přitom v něm probíhá celá řada zemědělských operací, mezi nimi i zpracování půdy.

V současné době je již okolo 40 % půd v České republice obděláváno některou z bezorebných technologií, které mají za cíl udržet organickou hmotu v půdě zlepšit kvalitu půdy a snížit erozi. Bezorebné způsoby zpracování půdy vedou ke snížení emisí CO_2, stabilizaci organické hmoty v půdě, a pokud po sklizni na povrchu zůstává mulč, vedou i ke zmírnění nežádoucích výkyvů teplot v půdě (Mühlbachová et al., 2024). Udržitelné způsoby zpracování půdy by proto měly být v příštích letech co nejvíce využívány, protože jsou spojeny s lepším zadržením vody, nižšími ztrátami uhlíku i emisemi CO_2 z půdy.

Cílem práce bylo vyhodnotit emise CO_2 a možnosti zadržení vody v půdě na dlouhodobém polním pokusu v Praze – Ruzyni, kde jsou od roku 1995 používány různé způsoby zpracování půdy. Emise CO_2 byly proto sledovány v letech 2022-2024, tak aby bylo možné zhodnotit i různé povětrnostní podmínky daného roku.

Materiály a metody

Měření emisí CO_2 se provádělo na dlouhodobém pokusu v Praze – Ruzyni, kde jsou od roku 1995 zavedeny různé způsoby zpracování půda – orba do 20 – 22 cm, podmítka do 8 – 10 cm a půda bez zpracování. Posklizňové zbytky zůstávají vždy na půdě a jsou zapraveny podle dané technologie – zcela po orbě, po podmítce zůstává ca 30 % na povrchu a u půdy bez zpracování je povrch půdy pokrytý mulčem. Osevní postup je následující: Pšenice ozimá – řepka ozimá – pšenice ozimá – hrách. Měření emisí CO_2 proběhlo v letech 2022 po přípravě půdy a setí řepky ozimé. V roce 2023 měření CO_2 proběhlo až v pozdějším období, kdy po sklizni řepky byla půda ponechána v klidu až do zpracování půdy před setím pšenice ozimé. V roce 2024 měření CO_2 započalo již druhý den po zpracování půdy a v případě orby probíhalo ještě před přípravou pro setí řepky ozimé. V průběhu sledování emisí CO_2 byla půda dále připravena pro setí a následně byly použity pěchy. Měření CO_2 probíhalo přímo na poli na každé technologii zpracování půdy celkem ve čtyřech opakováních a v několikadenních intervalech v průběhu letního a podzimního období. Pro měření byl použit automatický analyzátor firmy LI_COR LI 8100 s Multiplexerem LI-8250 (Lincoln, Nebraska, USA). Vlhkost půdy byla měřena gravimetricky po vysušení půdy při 105 C.

Výsledky a diskuze

Zpracování půdy ovlivnilo vlhkost půdy, která ve všech třech letech většinou zůstávala nejvyšší na půdě bez zpracování s ponechaným mulčem slámy (Graf 1 a-c). Pouze u některých stanovení se vlhkost po podmítce zvýšila více než na půdě s mulčem, což v některých případech mohlo být ovlivněno předchozími srážkami. Vlhkost půdy po orbě byla ve všech letech v průměru nejnižší. Prokypření půdy po orbě vede k větší aeraci i prohřívání půdy (Mühlbachová et al., 2024), a tedy i ztrátám vody v porovnání s méně intenzivními způsoby zpracování. Zejména ponechání mulče na povrchu půdy snižuje ztráty vody z půdy, což by v příštích letech, kdy se dají očekávat stále častější periody sucha (Zahradníček et al., 2015, Žalud et al., 2019) a nepravidelné srážky, mělo být upřednostňováno, protože dochází nejen k lepšímu zadržení vody v půdě, ale i k jejímu menšímu prohřívání.

Emise CO_2 v roce 2022 byly měřeny od 17.8. 2022 po setí řepky ozimé (Graf 2a). Prakticky celou dobu měření byly emise CO_2 nejvyšší po orbě a snižovaly se s intenzitou zpracování půdy a také v průběhu podzimu, kdy se snižovaly i teploty. Celkově nejvyšší emise CO_2 byly zjištěny v srpnu a v první dekádě září. Následně již emise CO_2 dosáhly hodnoty 6 μmol $CO_2/m^2/s$ a vyšší pouze po orbě. Emise CO_2 ovlivnilo i počasí, kdy po zpracování půdy následovaly srážky 41 mm a 22 mm, které vytvořily příznivé podmínky pro mineralizaci půdy, a tím i emise CO_2 z půdy, které se nejvíce projevily po orbě.

V roce 2023 měření započalo 15.9. z důvodu pozdějšího zpracování půdy pro pšenici ozimou (Graf 2b). V porovnání s předchozím rokem byly emise CO_2 nízké a nedosahovaly ani 3 μmol CO_2 m^2/s. Září roku 2023 bylo velmi suché, v Praze – Ruzyni spadlo celkem 6 mm srážek. Tato podmínky se odrazily na výši emisí CO_2 u všech technologií zpracování půdy včetně orby, kde s výjimkou posledního měření byly zjištěny mírně vyšší emise CO_2 v porovnání s dalšími technologiemi .

V roce 2024 měření emisí CO_2 započalo 7.8. po prvním zpracování půdy před přípravou pro setí (Graf 2c). V tomto období byly naměřeny nejvyšší emise CO_2 po orbě, které ale dosahovaly zhruba poloviny v porovnání s rokem 2022. Výše emisí CO_2 mohla být ovlivněna vyššími srážkami na počátku srpna, které dosáhly 40 mm. Příprava půdy pro setí a setí řepky ozimé spolu s vyššími srážkami (57 mm) vedly k celkově nižším emisím CO_2. Podobně jako v předchozích letech většina měření CO_2 byla nejvyšší po orbě. V některých dnech výši emisí CO_2 po orbě pravděpodobně ovlivnily srážky, které těsně předcházely měření. Výsledky také ukazují na postupné snižování emisí CO_2 v průběhu podzimu. Zpracování půdy, jak ukazují i

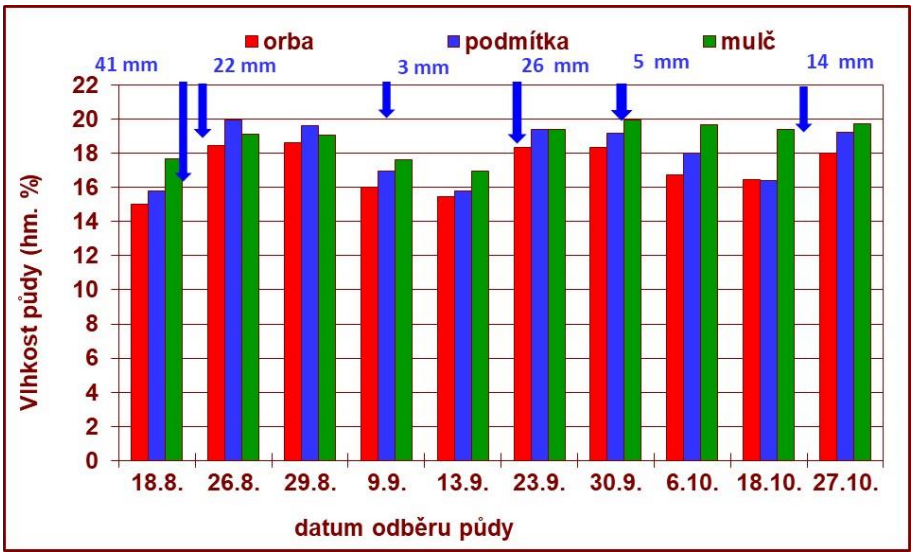
výsledky například z roku 2022, by proto mělo být pokud možno prováděno až v chladnějším podzimním období, kdy je riziko ztrát uhlíku emisemi CO_2 nižší.
S emisemi CO_2 úzce souvisejí i ztráty uhlíku z půdy. Dosažené výsledky ukázaly, že v některých dnech mohou hodinové ztráty uhlíku po orbě představovat až 8 kg C/ha/h, přičemž v letním období mohou běžně dosahovat 3 – 5 kg C/ha/h (Graf 3a,c). Po podmítce přitom ve stejném období ztráty uhlíku dosahovaly jen 2 – 4 kg C/ha/h a u půdy bez zpracování byly ztráty C ještě nižší. V roce 2023 byla půda zpracována později, což v suchém období vedlo k nejnižším ztrátám uhlíku z půdy (Graf 3b).
Udržitelné systémy hospodaření s půdou v příštích letech jsou proto spojeny s lepším zadržováním vody, uhlíku a živin v půdě než při použití většiny současných zemědělských postupů. Mulčování slámy, ponechání strniště po sklizni a pozdější zpracování půdy by mělo být v příštích letech zejména v letním období více uplatňováno. Půda bez zpracování s mulčem na povrchu se zahřívá v teplém letním období méně a lépe zadržuje vodu.

Závěr

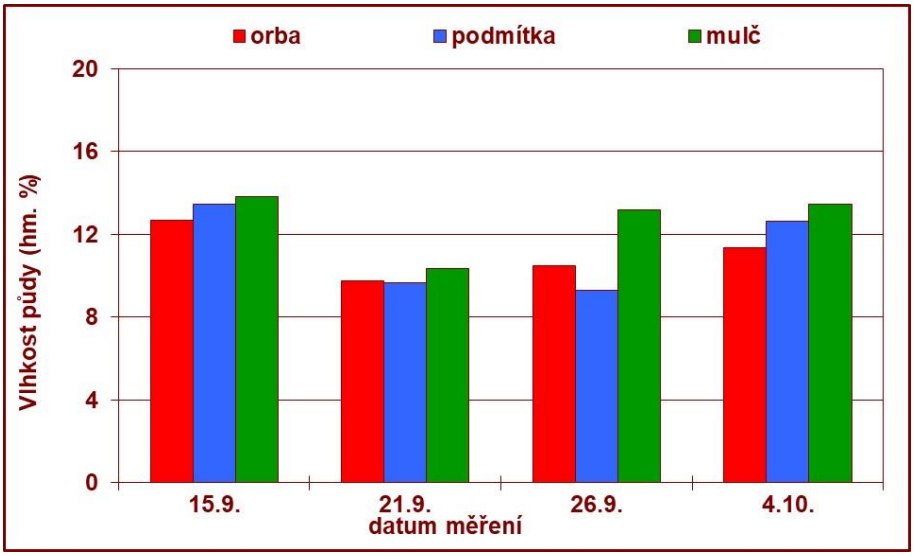
Emise CO_2 z půdy ovlivňuje způsob zpracování půdy, teplotní a vlhkostní podmínky, které jsou spojeny s intenzitou provzdušnění půdy a úrovní zapravení posklizňových zbytků. Rizikové pro výši emisí CO_2 je především letní období, kdy probíhá příprava půdy pro setí řepky nebo meziplodin. V budoucnu lze předpokládat vyšší teploty i v průběhu podzimu a zimy, což bude souviset i s vyšší mineralizaci půdy a ztrátami uhlíku. Proto bude třeba dbát na co nejnižší ztráty uhlíku v podobě emisí CO_2 při zpracování půdy. Ztráty uhlíku po orbě jsou značné, omezení zpracování půdy je může v závislosti na zvolené technologii významně snížit. Jednou z možností je také mulčování slámy na povrchu půdy, která přispívá ke snížení emisí CO_2, ale pomáhá lépe zadržovat vodu, což je podstatné ve stále častějších obdobích sucha, která se střídají s nepravidelnými srážkami, které ale mohou v krátkém časovém období dosahovat významných celkových úhrnů. Udržitelné způsoby zpracování půdy budou do budoucna spojeny s lepším zadržováním vody v půdě, snížením ztrát uhlíku emisemi CO2, omezením zpracování půdy v teplém letním období a vzhledem k vyšší mineralizaci půdy v podmínkách klimatické změny také dodáváním organické hmoty ve větším množství než v minulosti.

Graf 1a,b: Vlhkost půdy po různých způsobech zpracování půdy v letech 2022 – 2024

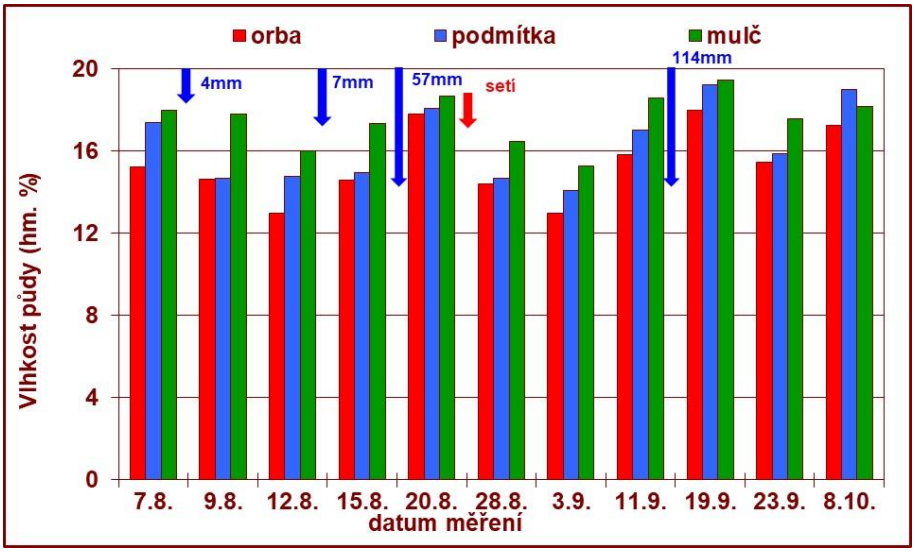
a) 2022



b) 2023

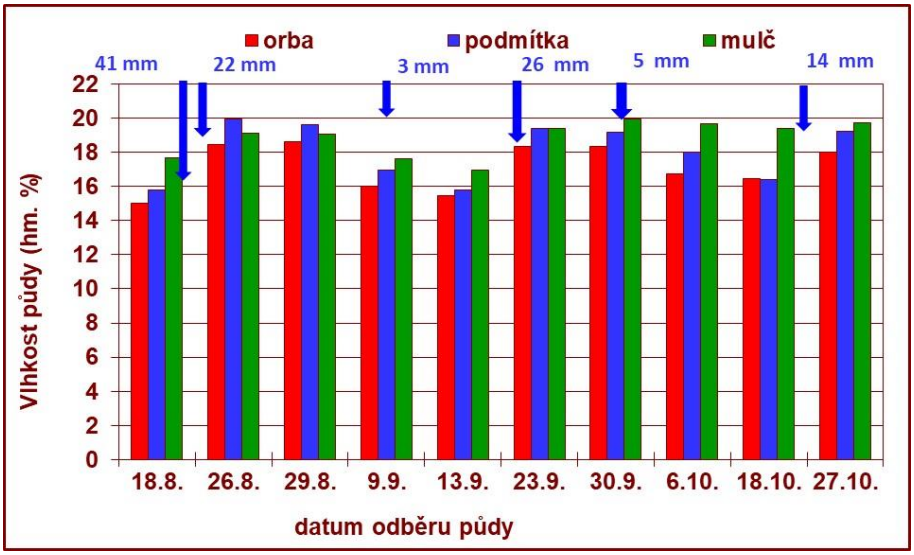


c) 2024

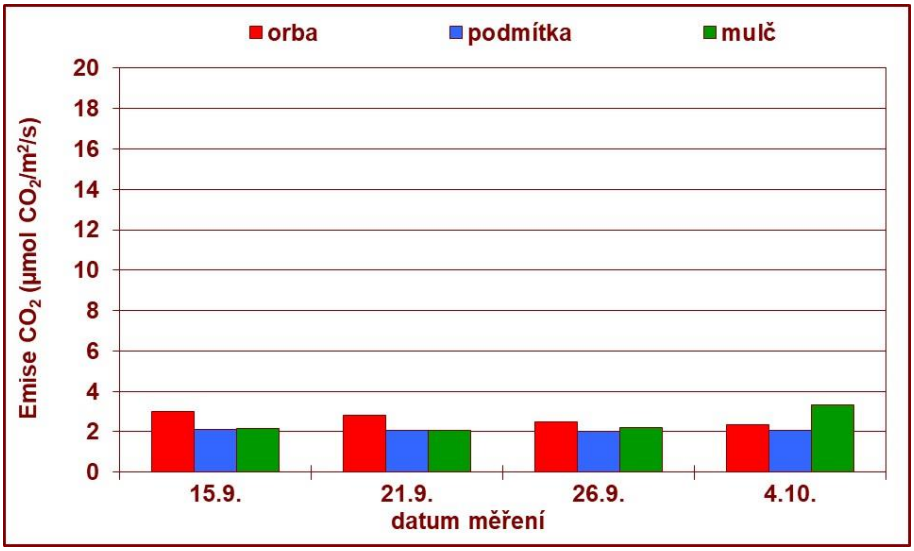


Graf 2a-c: Emise CO_2 po různých způsobech zpracování půdy v letech 2022 – 2024

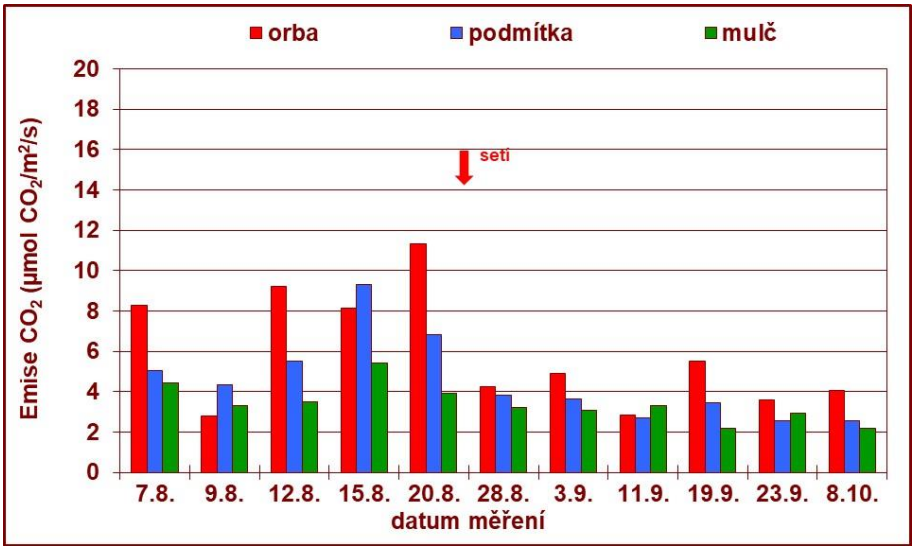
a) 2022



b) 2023

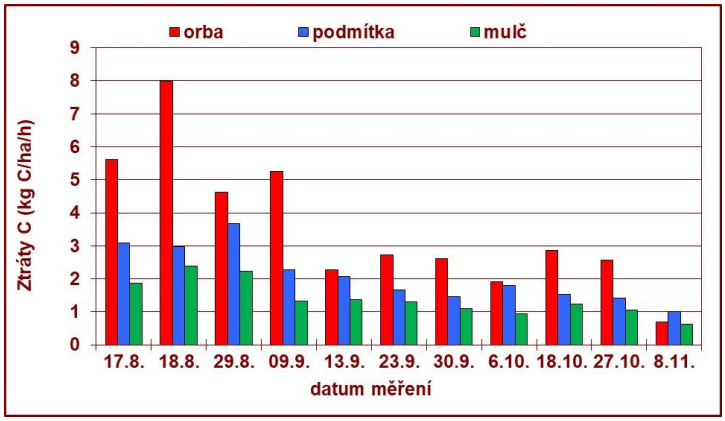


c) 2024

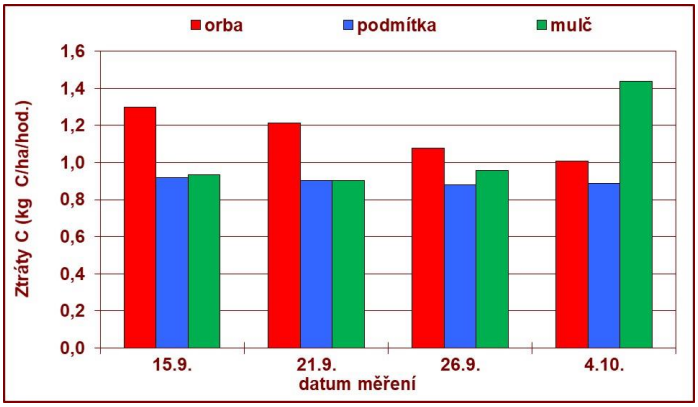


Graf 3a-c: Ztráty uhlíku po různých způsobech zpracování půdy v letech 2022 – 2024

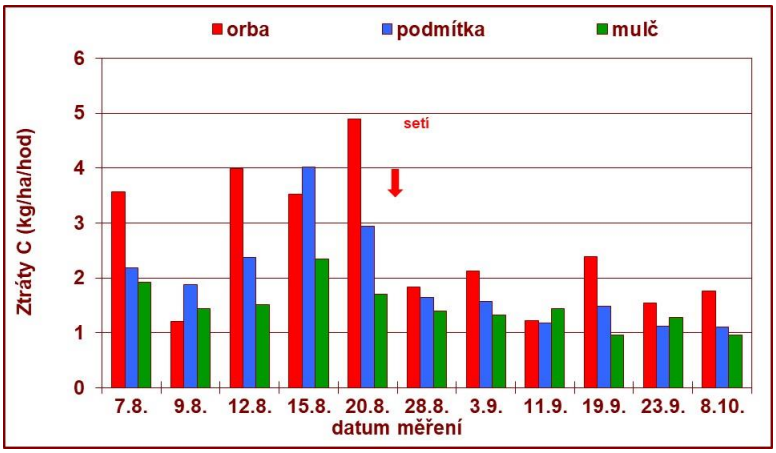
a) 2022



b) 2023



c) 2024



Literatura

Mühlbachová G., Kusá H., Vavera R., Růžek P. (2019): Emise CO_2 a změny v obsahu organického uhlíku při různých způsobech zpracování půdy. In: Skleníkové plyny z půdy a zemědělství: vlastnosti, produkce, spotřeba, emise a možnosti jejich snížení. ACADEMIA, 164-168

Mühlbachová G.,Růžek P., Kusá H., Vavera R. (2022): CO_2 emissions in a soil under different tillage practices. Plant, Soil and Environment, 68(6): 253-261

Mühlbachová G.,Růžek P., Kusá H., Vavera R. (2024): Emise CO2 po různém zpracování půdy. Agromanuál, 19(8): 86-87

Zahradníček P., Trnka M., Brázdil R., Možný M., Štěpánek P., Hlavinka P., Žalud Z., Malý A., Semerádová D., Dobrovolný P., Řezníčková L. (2015): The extreme drought episode of August 2011–May 2012 in the Czech Republic. Int. J. Clim., 35, 3335–3352.

Žalud Z., Trnka M., Hlavinka P., Bláhová M., Dobrovolný P., Klem P., Kudláčková L., Kusá H., Možný M., Mühlbachová G., Pavlík F., Růžek P., Štěpánek P., Vopravil J., Zahradníček P. (2019): Zemědělské sucho v České republice – vývoj, dopady a adaptace. Agrární komora České republiky, 115 str.

Poděkování: Příspěvek byl zpracován s podporou projektů NAZV QL24020280 a MZE-RO0423

Kontaktní adresa:
Ing. Gabriela Mühlbachová, Ph.D.,
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73,
PSČ: 161 06 Praha 6 – Ruzyně,
e-mail: muhlbachova@vurv.cz

Emise CO_2 po zapravení slámy a různých dusíkatých hnojiv

CO_2 emissions after incorporation of straw and different nitrogen fertilizers

Mühlbachová Gabriela, Růžek Pavel, Kusá Helena, Vavera Radek

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73, CZ 16106 Praha 6 – Ruzyně

Abstrakt

Vliv různých dusíkatých hnojiv na emise CO_2 z půdy při rozkladu slámy byl sledován ve dvouletém pokusu v Praze-Ruzyni. Sláma byla zapravena po sklizni do hloubky 10 cm v množství odpovídajícím 6 t/ha. Dusíkatá hnojiva (močovina, kejda prasat, digestát) byla aplikována v dávce 60 kg N/ha. Pro porovnání byla hnojiva aplikována i na půdu bez slámy. Měření emisí CO_2 probíhalo v letech 2023 a 2024 od aplikace hnojiv v srpnu po dobu nejméně dvou měsíců. Výsledky ukázaly na větší emise CO_2 po aplikaci kejdy prasat v porovnání s ostatními hnojivy. V porovnání s kejdou prasat byly emise CO_2 po digestátu nižší a srovnatelné s aplikací močoviny. Aplikaci minerálních dusíkatých látek a jejich dávky na slámu je třeba zvážit, protože podobné účinky může mít i rozklad slámy na povrchu půdy, kde byly zjištěny i nižší emise CO_2.

Klíčová slova: Emise CO_2; Sláma; Pšenice ozimá; Močovina; Kejda prasat; Digestát

Abstract

The effect of different nitrogen fertilizers on CO_2 emissions from the soil during straw decomposition was studied in a two-year experiment in Prague-Ruzyně. Straw was incorporated after harvesting to a depth of 10 cm in an amount corresponding to 6 t/ha. Nitrogen fertilizers (urea, pig slurry, digestate) were applied at a dose of 60 kg N/ha. For comparison, fertilizers were also applied to soils without straw. CO_2 emissions were measured in the years 2023 and 2024 for at least two months after the application of fertilizers. The results showed higher CO_2 emissions after application of pig manure compared to other fertilizers. Compared to pig manure, CO_2 emissions after digestate were lower and comparable to urea application. The application of mineral nitrogenous substances and their dose to straw should be considered, as the decomposition of straw on the soil surface can have similar effects, where lower CO_2 emissions have also been found.

Keywords: CO_2 emissions; Straw; Winter wheat; Urea; Pig slurry; Digestate

Úvod

V současné době se do půd dostává méně organických látek pocházejících ze živočišné výroby. Ponechání posklizňových zbytků na poli a jejich zapravení proto představuje jednu z možností, jak dodat do půdy organickou hmotu. Jednu z možností představuje sláma obilnin, jejíž poměr uhlíku k dusíku je ale vysoký (přibližně 100:1). Zapravená sláma se proto nemusí dostatečně rozložit a naopak může využít i dusík obsažený v půdě, který později nemusí být dostupný pro rostliny. Proto jsou pro podporu rozkladu slámy používána dusíkatá hnojiva, která poměr C:N přibližují na úroveň vhodnější pro půdní mikrobiální aktivity (Mühlbachová et al., 2021).

Zapravení slámy samo o sobě představuje zásah, kterým zvýšíme provzdušnění půdy a probíhají v ní intenzivní mineralizační procesy spojené s emisemi CO_2, které mohou být dále podporovány aplikací dusíkatých hnojiv. Úroveň rozkladu posklizňových zbytků se proto může měnit nejen v závislosti na aktuálním obsahu dusíku v půdě, intenzitě zpracování půdy, konkrétních povětrnostních podmínkách daného stanoviště, ale i aplikovaných hnojivech. Méně intenzivní způsoby zpracování půdy, zvláště pokud na povrchu zůstávají posklizňové zbytky, vedou ke snížení emisí CO_2, stabilizaci organické hmoty v půdě a zmírnění nežádoucích výkyvů teplot v půdě (Mühlbachová et al., 2021, 2023a).

Zvyšující se teploty a častější epizody sucha následované extrémními srážkami, které sledujeme v souvislosti se změnou klimatu půdy (Zahradníček et al., 2015), ovlivní i emise skleníkových plynů, mineralizaci organické hmoty, ztráty uhlíku z půdy, narušení půdních agregátů a ztráty půdy erozí.

Cílem pokusů bylo porovnat a vyhodnotit vliv minerálního, statkového a organického dusíkatého hnojiva na emise CO_2 po zapravení slámy do půdy při přirozených povětrnostních podmínkách daného ročníku.

Materiály a metody

Polní pokus byl proveden v Praze-Ruzyni v letech 2023 a 2024. V polních podmínkách byl sledován vliv zapravení slámy pšenice ozimé společně s různými dusíkatými hnojivy na emise CO_2. Sláma pšenice ozimé (odrůda Tobak) byla v množství odpovídajícím 6 t/ha zapravena do hloubky 10 cm spolu s hnojivy ve dnech 17. 8. 2023 a 7.8. 2024. Hnojiva aplikovaná v dávce 60 kg N/ha byla následující: močovina, kejda prasat, digestát. Pro porovnání byly stejné dávky hnojiv aplikována také na půdy bez slámy. Jako kontroly sloužily půdy bez aplikovaných hnojiv jak se zapravenou slámou, tak bez ní. Další pokusnou variantou byl mulč slámy ponechaný na povrchu půdy. Emise CO_2 byly měřeny od založení pokusu v několikadenních intervalech automatickým analyzátorem firmy LI-COR (USA), typ LI-8100 s měřícími komorami LI-8104. Teploty a srážky byly měřeny meteorologickou stanicí VÚRV, v.v.i., Praha- Ruzyně.

Výsledky a diskuze

Emise CO_2 z půdy závisí na různých faktorech jako je způsob zpracování půdy, její teplota a vlhkost a vzájemné interakci mezi těmito faktory. Významný vliv na emise CO_2 má i zapravení slámy a aplikace různých dusíkatých hnojiv. Průběh počasí se lišil v obou letech (Graf 1 a,b). V roce 2023 se sklizeň obilnin opozdila z důvodu vyšších srážek na počátku srpna. Z tohoto důvodu následné zpracování půdy a zapravení slámy proběhlo 17.8. 2023. Další vyšší srážky přišly na konci srpna, poté následovalo sucho v září, kdy spadlo pouze 18 mm srážek. V říjnu 2023 celkové srážky dosáhly 45 mm. V roce 2024 byl pokus založen 6.9. 2024, kdy následně po zapravení slámy a hnojiv spadly 4 mm srážek. V dalších dnech nepršelo a až 15.8. spadlo 6,7 mm a ve dnech 18 - 19. 8. celkem téměř 57 mm. Následovalo suché období až do poloviny září, kdy spadlo celkem 114 mm. Další srážky již byly nízké, celkem do poloviny října dosáhly 29 mm.

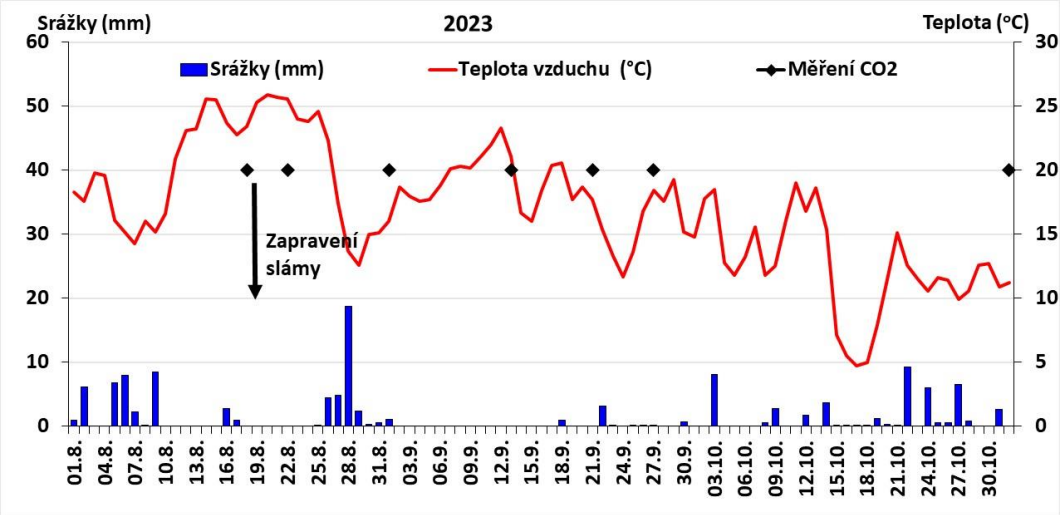
První měření CO_2 v letech 2023 a 2024 proběhla ve dnech následujících po zapravení slámy (Graf 2a,b). Výsledky měření ukázaly na vyšší emise CO_2 po zapravení slámy v porovnání s emisemi CO_2 v půdách, kde byla pouze aplikována hnojiva. Jak u půdy bez zapravené slámy, tak především u půdy se slámou byly nejvyšší emise CO_2 zaznamenány po aplikaci kejdy prasat, které byly přibližně 2,5násobné v porovnání s digestátem a močovinou a také s kejdou aplikovanou na půdu. Následující měření ukázalo, že se rozdíly v emisích CO_2 po jednotlivých aplikovaných hnojivech snížily, ale po kejdě prasat zůstaly v průměru nejvyšší. Srážky v posledním týdnu srpna 2023 vedly mezi použitými hnojivy k vyrovnaným emisím CO_2, kde rozdíl byl patrný pouze mezi hnojivy aplikovanými pouze na půdu a zapravenými se slámou. Vyšší emise CO_2 po kejdě prasat pak byly zaznamenány pouze dne 6.9. 2023, tedy v době, kdy již několik dní nepršelo. V dalším období byly již emise CO_2 poměrně nízké, vždy nižší než 5 μmol CO_2/m2/s. V tomto období byly mírně vyšší emise CO_2 po močovině (21.9. 2023).

V roce 2024 první měření proběhlo dne 9.8. 2024. Podobně jako v roce 2023 byly nejvyšší emise CO_2 zjištěny po zapravení slámy s kejdou prasat. V porovnání s rokem 2023 byly ale vzájemné rozdíly výrazně nižší pravděpodobně i kvůli předchozím srážkám. Emise CO_2 ve variantě s kejdou prasat po zapravení slámy byly v obou letech na počátku měření podobné. Po aplikaci digestátu a močoviny ve variantách se slámou se emise CO_2 v roce 2024 přiblížily těm s kejdou prasat. V srpnu a první polovině září pak již byly emise CO_2 oproti prvnímu měření nižší a varianta s kejdou prasat po zapravení slámy již nevykazovala nejvyšší emise CO_2. V pokusu byly v obou letech porovnávány i emise CO_2 ve variantě s mulčem slámy na povrchu půdy, které zůstávaly v průběhu pokusu nejnižší ze všech sledovaných variant. Emise CO_2 ovlivnil také průběh počasí, kdy po srážkách byly zpravidla naměřeny nižší hodnoty z důvodu nižších teplot i větší vlhkosti půdy, což potvrdily i výsledky u různého zpracování půd

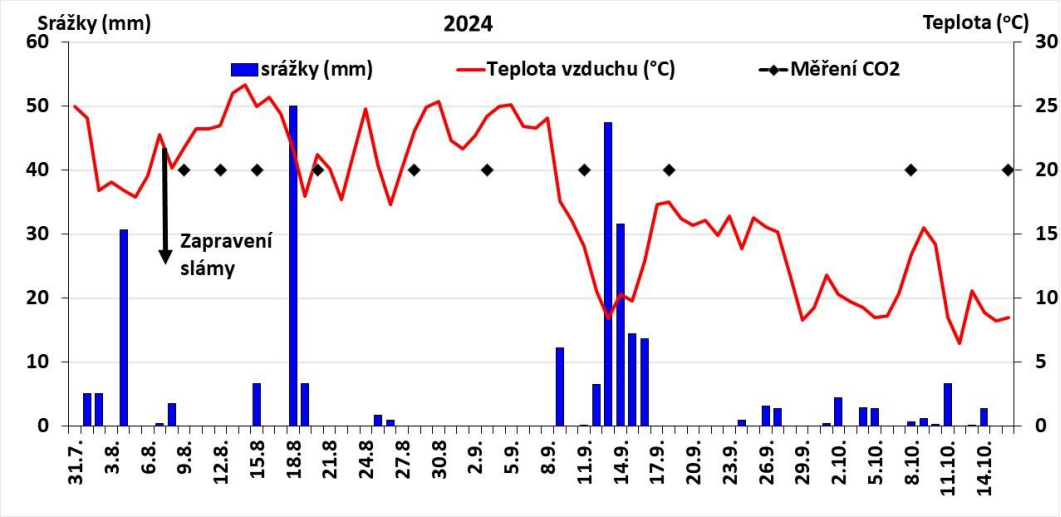
(Mühlbachová et al., 2019, 2022, 2023b).

Graf 1a,b: Průběh teplot a srážek vletech 2023 a 2024

a)



b)



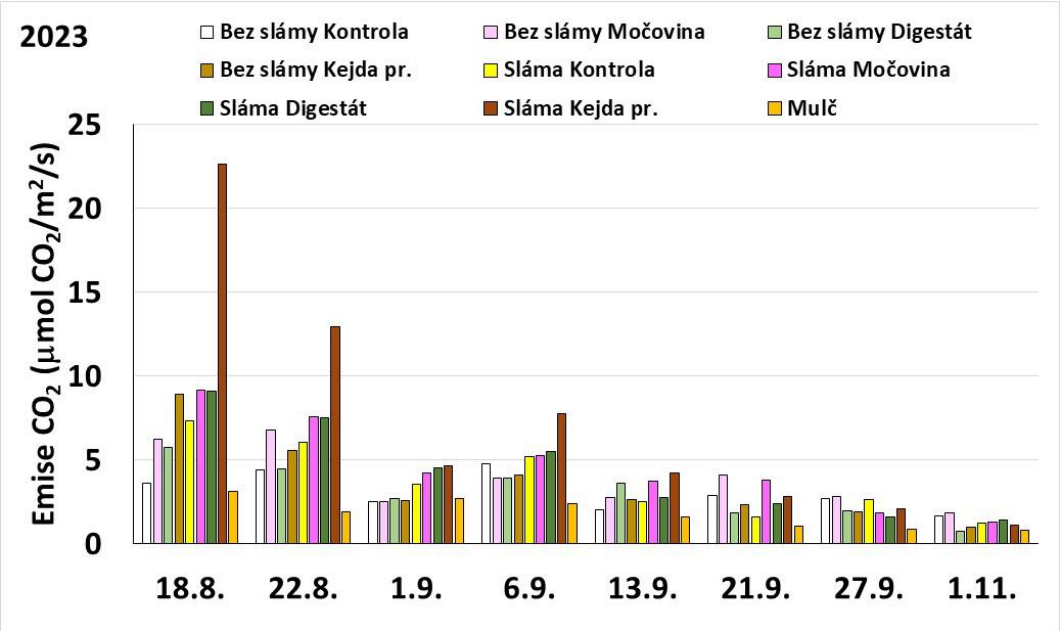
Ztráty uhlíku v prvních dnech po zapravení slámy mohou u kejdy prasat v některých dnech dosahovat téměř 10 kg C/ha/hod. (Graf 3 a,b). U močoviny a digestátu se v roce 2023 hodinové ztráty C pohybovaly do 4 kg C/ha/hod., v roce 2024 přesáhly 8 kg C/ha/hod. Později se ztráty C úměrně snížily. V teplém letním počasí je ale nutné počítat s denními ztrátami uhlíku v řádu několika desítek kg C/ha.

Digestát pocházející z bioplynových stanic je produkt po anaerobní digesci, který obsahuje okolo 40–50 kg dusíku v 10 tunách digestátu. Vzhledem k uhlíku, který je po digesci do značné míry stabilizovaný, se ale zvyšuje riziko, že při využití dusíku (N) obsaženého v digestátu půdními mikroorganismy bude využíván uhlík z lehce hydrolyzovatelných organických látek nacházejících se v půdě (Tambone et al. 2013, Duffková et al. 2016, Mühlbachová et al., 2016). Oproti digestátu, kejda prasat žádným podobným procesem neprošla, obsahuje tedy i více labilních organických látek, které pravděpodobně vedly k vyšším emisím CO_2 z půdy a nejvyšším po společném zapravení se slámou. Navíc digestát i kejda prasat lépe slámu oproti močovině provlhčily, čímž se zlepšily podmínky pro rozklad slámy a logicky i pro emise CO_2. Lze předpokládat, že nárůst emisí CO_2 po kejdě prasat pocházel jak z rozkladu zapravené slámy, tak podobně jako u digestátu, částečně i z lehce hydrolyzovatelných organických látek v půdě. Větší nárůst emisí CO_2 oproti digestátu pravděpodobně částečně pocházel i z většího

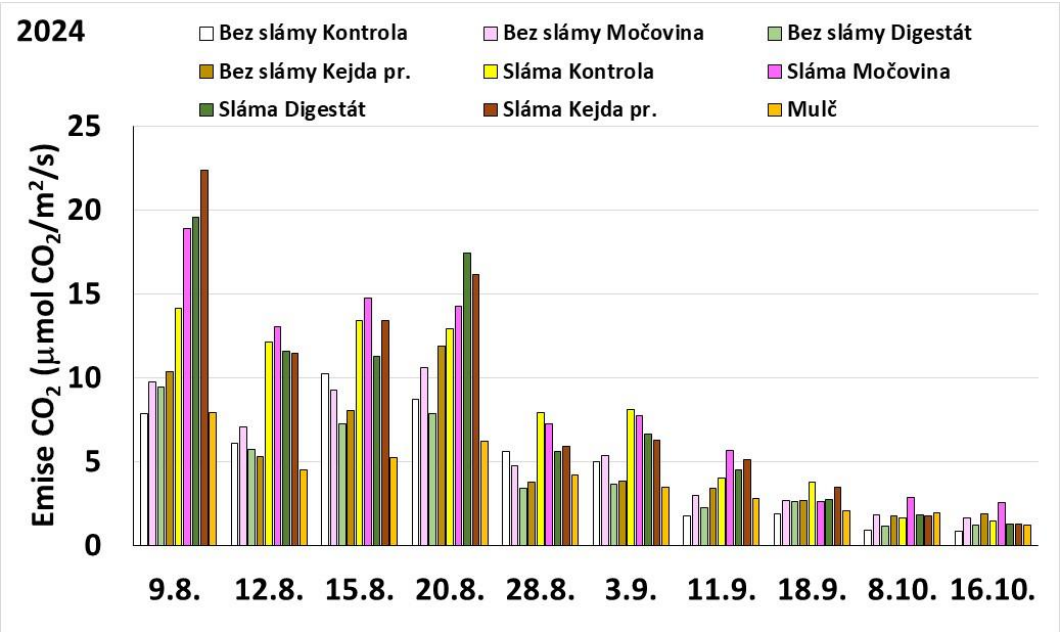
podílu labilních organických látek v kejdě prasat.

Graf 2a,b: Emise CO_2 po zapravení slámy a dusíkatých hnojiv v letech 2023 a 2024

a)

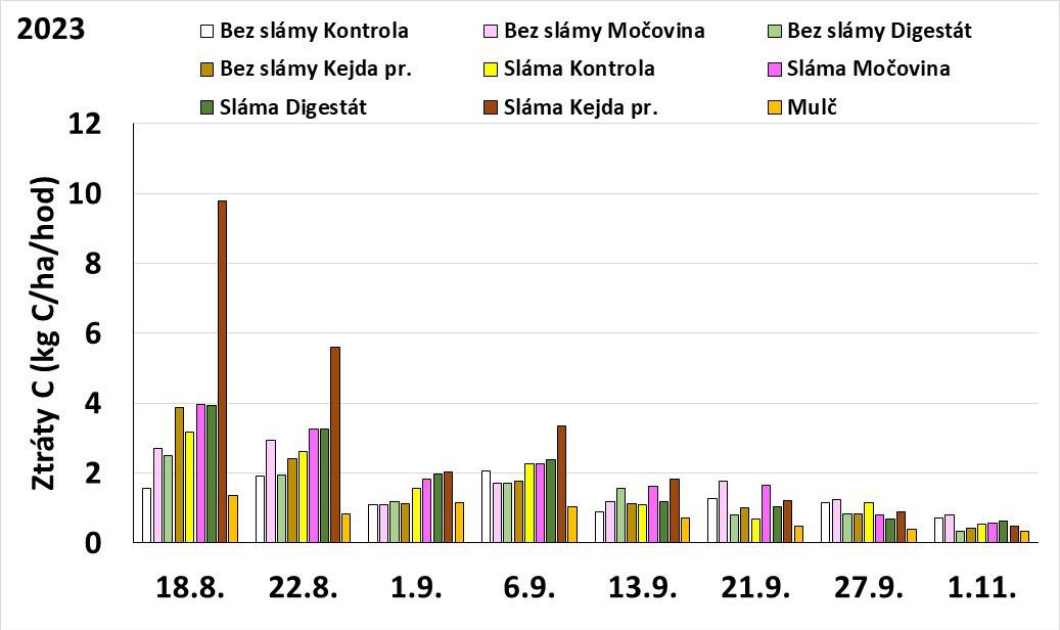


b)

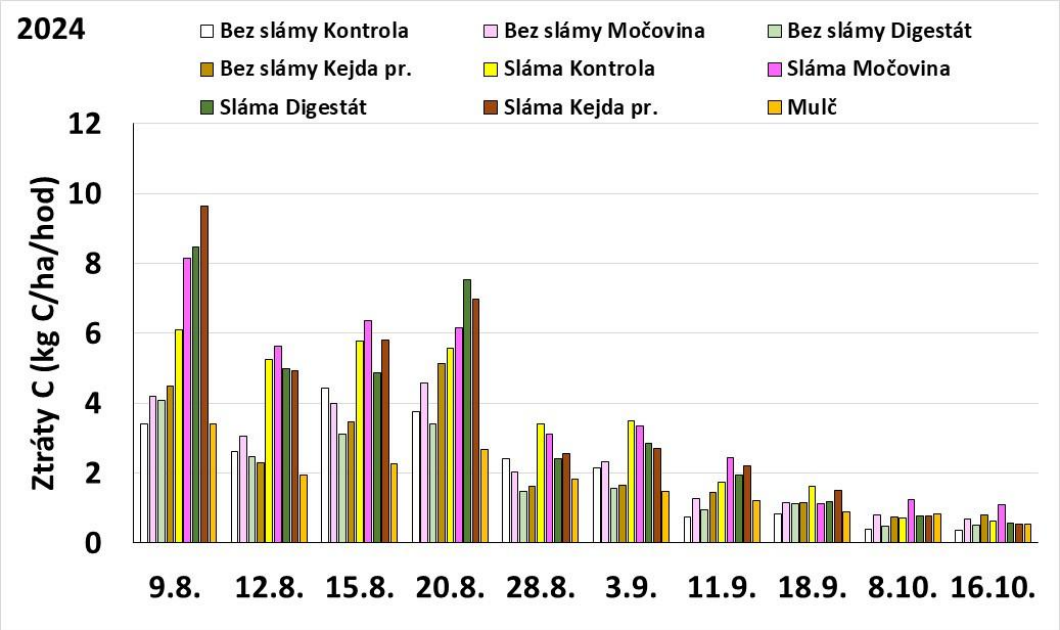


Graf 3a, b: Ztráty C po zapravení slámy a dusíkatých hnojiv v letech 2023 a 2024

a)



b)



Závěr

Emise CO_2 byly měřeny po zapravení slámy a minerálních, statkových a organických hnojiv. Každý ze sledovaných roků ukázal jiný průběh počasí, a spolu s ním i jiný průběh emisí CO_2. Výsledky ukázaly na větší emise CO_2 po aplikaci kejdy prasat v porovnání s ostatními hnojivy. Emise CO_2 po digestátu byly nižší a srovnatelné s aplikací močoviny. Z hlediska emisí CO_2 se sice pro potřeby rozkladu slámy oproti kejdě prasat vhodněji jeví aplikace digestátu, ale je třeba uvážit i fakt, že k digestát obsahuje stabilizovanější organické látky, kde existuje riziko většího rozkladu původní organické hmoty v půdě. Ponechaný mulč vykázal nejnižší emise CO_2. Z hlediska emisí CO_2 se tato varianta jeví jako nejvýhodnější. Aplikace dusíkatých hnojiv na podporu rozkladu slámy je proto nejvhodnější, pokud následuje meziplodina nebo ozimá řepka, která může aplikovaná hnojiva využít. U statkových a organických hnojiv se část dusíku vyskytuje v organické formě, která se uvolňuje pozvolněji. Navíc mají díky větší vlhkosti a lepším adhezním vlastnostem příznivý vliv na rozklad slámy. Pokud jde o minerální hnojiva, je

i vzhledem k jejich ceně jejich aplikace na zvážení.

Literatura

Duffková R., Mühlbachová G., Matějka J., Zajíček A., Kusá H., Fučík P., Káš M., Nobilis L., Bartoš P., Fendrych B. (2016): Metodický postup pro efektivní užití digestátu ze zemědělských bioplynových stanic. Certifikovaná metodika. VÚMOP, VÚRV. ISBN 978-80-7427-227-1

Mühlbachová G., Duffková R., Kusá H., Vavera R., Káš M., Zajíček A. (2016): Hnojení kukuřice digestátem a fugátem z bioplynových stanic. Úroda, 64(11):16-20

Mühlbachová G., Kusá H., Vavera R., Růžek P. (2019): Emise CO_2 a změny v obsahu organického uhlíku při různých způsobech zpracování půdy. In: Skleníkové plyny z půdy a zemědělství: vlastnosti, produkce, spotřeba, emise a možnosti jejich snížení. ACADEMIA, 164-168

Mühlbachová G.,Růžek P., Kusá H., Vavera R., Káš M. (2021): Winter wheat straw decomposition under different nitrogen fertilizers. Agriculture-Basel, 11(2): 83

Mühlbachová G.,Růžek P., Kusá H., Vavera R. (2022): CO_2 emissions in a soil under different tillage practices. Plant, Soil and Environment, 68(6): 253-261

Mühlbachová G.,Růžek P., Kusá H., Vavera R. (2023a): Aplikace dusíkatých hnojiv pro rozklad slámy. Agromanuál, 18(7): 60-62

Mühlbachová G.,Růžek P., Kusá H., Vavera R. (2023b): CO_2 emissions from soils under different tillage practices and weather conditions. Agronomy-Basel. 13(12): 3084

Tambone F, Adani F, Gigliotti G, Volpe D, Fabbri C, Provenzano MR. (2013). Organic matter characterization during the anaerobic digestion of different biomasses by means of CPMAS 13C NMR spectroscopy. Biomass Bioenergy 48:111–120.

Zahradníček P., Trnka M., Brázdil R., Možný M., Štěpánek P., Hlavinka P., Žalud Z., Malý A., Semerádová D., Dobrovolný P. et al. (2015): The extreme drought episode of August 2011–May 2012 in the Czech Republic. Int. J. Clim., 35, 3335–3352.

Poděkování: Práce byla uskutečněna za podpory MZe ČR NAZV ČR č: QK23020085

Kontaktní adresa:
Ing. Gabriela Mühlbachová, Ph.D.,
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73,
PSČ: 161 06 Praha 6 – Ruzyně,
e-mail: muhlbachova@vurv.cz

Výnosy silážní kukuřice zakládané půdoochrannými technologiemi do meziplodin na výrazně sklonitých pozemcích

Yields of silage maize established into intercrops by soil protection technologies on strongly inclined lands

Nerušil P.[1], Kincl D.[2], Srbek J.[2], Plisková J.[1], Menšík L.[1]

[1] *Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6, VS Jevíčko*
[2] *Výzkumný ústav monitoringu a ochrany půdy, v.v.i., Praha 5*

Abstrakt
Zařazení kukuřice seté v osevních postupech s sebou přináší specifická rizika především v důsledku vodní eroze půdy, a proto je kladen důraz na využití půdoochranných technologií. Cílem práce bylo vyhodnotit výnosové charakteristiky, kvalitu píce a protierozní účinnost zakládání silážní kukuřice do meziplodin na výrazně sklonitých pozemcích. V letech 2022–2024 byly v oblasti Středočeské pahorkatiny testovány varianty zakládání kukuřice do pásově zpracovaných meziplodin 1) porost jílku mnohokvětého, 2) porost směsi žita setého s jetelem inkarnát a konvenční orebná technologie (kontrola). Výsledky pokusů prokázaly, že při zakládání kukuřice technologií striptill (pásově zpracované půdy) do meziplodin na sklonitých pozemcích dochází oproti klasické orební technologii ke snížení výnosů o 10–20 % (9 % u varianty žita s inkarnátem, resp. o 20 % u varianty s jílkem), avšak při srovnatelné kvalitě píce a příznivě vysoké protierozní ochraně půdy. Ztráta půdy erozí měřená v období 1 měsíc po zasetí kukuřice (BBCH 13–14) činila po 30 minutách simulace intenzivních srážek (1,2 mm.min^{-1}) 0,38–0,83 t.ha^{-1}, což bylo o 75–88 % méně než u kontroly s orbou (3,3 t.ha^{-1}).
Klíčová slova: svažité pozemky, silážní kukuřice, půdoochranné technologie, výnos, ochrana půdy

Abstract
The incorporation of sown maize into crop rotations presents specific risks, primarily due to soil erosion caused by water. As a result, there is an emphasis on the implementation of soil conservation technologies. The objective of this study was to evaluate the yield characteristics, forage quality, and erosion control efficacy of intercropping silage maize on severely sloping terrain. From 2022 to 2024, various methods of establishing maize in strip-tilled intercrops were tested in the Central Bohemian Upland region. These methods included a stand of multi-flowered ryegrass (1), a mixture of rye and clover incarnate (2), and a control group utilizing conventional ploughing technology. The results of the trials indicated that establishing maize using strip-till technology in intercrops on sloping land resulted in a 10–20 % reduction in yield compared to conventional ploughing (with reductions of 9 % and 20 % for the rye and ryegrass incarnate variants, respectively). However, this yield reduction was accompanied by comparable forage quality and beneficial soil protection. The soil loss due to erosion, measured one month after sowing maize (BBCH 13–14), ranged from 0.38 to 0.83 t ha^{-1} following 30 minutes of simulated heavy rainfall (1.2 mm.min^{-1}). This represented a reduction of 75–88% compared to the ploughed control, which experienced a soil loss of 3.3 t ha^{-1}.
Key words: sloping land, silage corn, soil protection technologies, yield, soil protection

Úvod

Kukuřice setá je v celosvětovém měřítku jednou z nejvíce pěstovaných a nejproduktivnějších plodin. Rozlohou pěstitelské plochy patří kukuřici třetí místo na světě po pšenici a rýži, přičemž v produkci zrna zaujímá dokonce první místo. Celková výměra osevních ploch silážní kukuřice v ČR v roce 2023 podle údajů ČSÚ činila více než 213 tis. ha, přičemž v posledním období je patrný spíše pokles osevních ploch a celkové produkce (viz. tab. 1). Průměrný výnos silážní hmoty se v posledních letech zpravidla pohyboval na úrovni 35–37 t.ha^{-1}, avšak v roce 2023 došlo vlivem nepříznivého počasí (výskyt period sucha ve vegetačním období) k propadu průměrného výnosu na 30,56 t.ha^{-1} (ČSÚ, 2024). K obdobným propadům výnosů dochází obvykle v těch ročnících, kdy v důsledku dlouhodobého nedostatku srážek v kombinaci vysokými teplotami vzduchu a intenzivním výparem z půdy rostliny trpí výrazným stresem ze sucha a předčasně zasychají, než fyziologicky dozrávají při nižší kvalitě vyprodukované píce (např. sklizňové roky 2015 a 2018).

Tab. 1. Osevní plochy, produkce a průměrný výnos kukuřice na siláž v ČR (2019–2023).

Sklizňový rok	Výměra kukuřice (ha)	Produkce kukuřice (t)	Průměrný výnos ($t.ha^{-1}$)
2019	231 367	8 243 654	35,63
2020	234 742	8 832 117	37,62
2021	228 486	8 431 655	36,90
2022	212 067	7 615 122	35,91
2023	213 596	6 526 873	30,56

Pozn.: Průměrný výnos v zelené hmotě (sušina 35 %). Zdroj: ČSÚ 2024

Pěstování širokořádkových plodin na svažitých pozemcích je v ČR limitováno zpřísněnými podmínkami ochrany půdy v nedávné minulosti označovanými jako „redesign erozní ohroženosti půdy“. V souvislosti s omezením rozsahu pěstebních ploch pro erozně rizikové plodiny vznikla potřeba vývoje a testování nových technologií, které by splňovaly podmínky zařazení do standardu DZES5. Při nastavování těchto podmínek na erozně ohrožených pozemcích pak byly do DZES5 zařazeny protierozní technologie relativně snadno dostupné a bezprostředně uplatnitelné. V případě kukuřice seté jejich účinnost relativně odpovídá současnému použití na mírně erozně ohrožených pozemcích. Jak některé práce naznačují, kukuřici za určitých podmínek lze pěstovat i mimořádně šetrnými způsoby, kdy ztráta půdy je omezena na minimum a významně je redukován i povrchový odtok. V této souvislosti byly zaznamenány některé práce z našeho i zahraničního prostředí, jako např. Procházková et al. (2020), Prasuhn (2012), Babalola et al. (2007), Wischmeier W.H. et al. (1978) apod. Základem těchto agrotechnických protierozních opatření je pěstování kukuřice v umrtveném mulči víceletých pícnin či vybraných ozimých meziplodin. Přestože se může zdát, že toto téma je již dostatečně prověřené, ve vztahu k použití na výrazně sklonitých pozemcích tomu tak není. Uváděné studie jsou často prováděny na pozemcích s nižším sklonem, což může mít vliv na výsledné ztráty půdy a povrchový odtok. Používány jsou druhy předplodin a meziplodin netypické pro naše podmínky a nejsou zjištěny ani výnosové a kvalitativní parametry produkce kukuřice. Výzkum vysoce účinných půdoochranných technologií pro pěstování kukuřice seté se ukazuje potenciálně správný, což dokládají i některé zkoušky ze zemědělských podniků.

Cílem příspěvku je vyhodnotit výsledky výnosů, kvality píce a protierozní účinnosti půdoochranných technologií pěstovaní silážní kukuřice, zakládané do umrtveného porostu pícnin na orné půdě na výrazně sklonitých pozemcích v oblasti Středočeské pahorkatiny.

Materiál a metody

Na pokusné lokalitě Skoupý (Středočeská pahorkatina, 525 m n.m., průměrná roční teplota 7,8 °C, dlouhodobý úhrn srážek 668 mm za rok /klimatická stanice Nadějkov, ČHMÚ České Budějovice, půdní typ kambizem; půdní druh hlinitopísčitá, svažitost 19 %) byly v letech 2022–2024 založeny pokusy s půdoochrannými technologiemi (POT) setí kukuřice do porostů pícnin na orné půdě. Hodnocenými variantami byly: pásově zpracovaný porost (1) jílku mnohokvětého (výsevek 20 $kg.ha^{-1}$), resp. (2) žita trsnatého s jetelem inkarnát (výsevek 80 + 15 $kg.ha^{-1}$), s šířkou kypřeného pásku 0,15 m a hloubkou zpracování 0,20–0,25 m (podzimní termín kypření) a (3) konvenční orebná technologie (kontrola). Setí kukuřice bylo provedeno na počátku května do desikovaného porostu obou variant s pícninami (porost před setím umrtven herbicidem s účinnou látkou glyphosate v dávce 3–4 $l.ha^{-1}$). Současně byl proveden výsev i na konvenčně připravené ploše (varianta kontrola) pomocí secího stroje Väderstad Tempo, meziřádková vzdálenost 0,75 m. Použito bylo osivo raného hybridu kukuřice (FAO 230), výsevek činil 95 tis. $zrn.ha^{-1}$. Výživa porostů kukuřice byla zabezpečena organickým hnojivem digestát (30 m^3) aplikovaného na podzim před orbou, dále na jaře minerálními hnojivy močovina v dávce 150 $kg.ha^{-1}$ a Amofos v dávce 100 $kg.ha^{-1}$ při setí pod patu. Ochrana proti jednoděložným a dvouděložným plevelům byla provedena postemergentně (4–6 listů kukuřice) aplikací herbicidního přípravku MaisTer power v dávce 1,5 $l.ha^{-1}$. Sklizeň kukuřice proběhla při doporučené sušině řezanky pro konzervaci silážování (28–35 %). Potenciální

produkce sušiny byla stanovena na základě výnosu zelené hmoty (ručně, n=4, úseky o počtu 10 rostlin, výška strniště 0,05 m) a laboratorně stanovené sušiny řezanky (DMY). Dále byla měřena výška porostu a počet rostlin před sklizní (n=4). Kvalita píce suché, laboratorně upravené řezanky byla stanovena pomocí techniky NIRS (FOSS NIRSystems 6500, resp. čerstvé hmoty řezanky celých rostlin přístrojové techniky AgriNir^{TM} v parametrech obsah škrobu, stravitelnost organické hmoty (SOH) a stravitelnost neutrodetergentní vlákniny (SNDF), a vypočtena potenciální produkce mléka a metanu (NutriVet 2016).
Protierozní účinnost půdoochranných technologií byla testována pomocí polního simulátoru deště VÚMOP, v.v.i. (detailní popis metody měření eroze viz. Janeček et al. /2013/). Princip měření spočívá v rozstřiku vody na přesně definovanou a ohraničenou plochu, snímání počátku povrchového odtoku, množství smyté zeminy a obsahu nerozpuštěných látek v sedimentu. Pro ověřování účinnosti protierozních opatření byly zvoleny jednotné a standardizované podmínky na všech pokusných plochách. Režim postřiku probíhá ve dvou fázích, při prvním zadeštění po dobu 30 minut na přirozeně suchou půdu a 15 minut při druhém na již nasycenou. Postřikovaná plocha je tvořena dopadovými kužely 4 trysek firmy Spraying System s intenzitou 1,2 mm.min^{-1}. Celková zadešťovaná plocha je 21 m^2 a trysky ve zvoleném režimu postřikují plochu po celou dobu měření. Provozní tlak trysek během simulace je nastaven na 0,05 MPa. Průběžné ztráty půdy se získávají odběrem vzorků na začátku povrchového odtoku, a poté opakovaně po 3 minutách až do konce měření. U odebraných vzorků je proveden rozbor sedimentu a vyhodnocen obsah nerozpuštěných látek. Vyhodnocení je prováděno pomocí softwaru pro následné zpracování zaznamenaných údajů a výpočet požadovaných veličin. Jednotlivé půdoochranné varianty jsou porovnány s kontrolou (konvenční orba a černý kypřeným úhor), které slouží jako referenční. Termíny simulací byly voleny tak, aby postihovaly tři různé vývojové fáze růstu kukuřice, a vycházely z pěstebních období dle metodiky Janeček a kol. (2012). První termín simulace se provádí v období od přípravy pozemku k setí do jednoho měsíce po zasetí, druhý termín v období po dobu druhého měsíce od jarního nebo letního setí a třetí termín v období od konce druhého termínu zadeštění do sklizně.
Statistické analýzy včetně grafických výstupů byly provedeny v programu STATISTICA ver. 14.0. K hodnocení bylo využito průzkumové analýzy vícerozměrných dat /EDA/, ANOVA (HSD test) a faktorové analýzy /FA/ (Meloun et al. 2012). Statistická průkaznost byla posuzována na hladině významnosti p = 0,05.

Výsledky produkce a kvality píce

Výnosy silážní kukuřice v provedených experimentech byly výrazně ovlivněny průběhem počasí. Klimatické podmínky na pokusné lokalitě Skoupý v letech 2022–2024 jsou uvedeny v tab. 2 a 3. Pro hodnocení byla použita data naměřená na blízké stanici Petrovice a dlouhodobé údaje ze stanice ČHMÚ v Nadějkově. Vegetační období roku 2022 bylo v úhrnu srážek nadprůměrné, v následujících dvou letech podprůměrné (75–85 % normálu). Teplotně bylo vegetační období ve všech uvedených ročnících nadprůměrné, zejména pak v roce 2024 (122 % normálu). Jako problematické se ukazuje nerovnoměrné rozložení srážek a výskyt period sucha, které měly výrazný vliv na dosažené výnosy a kvalitu píce silážní kukuřice.

Tab. 2: Měsíční srážkové úhrny stanice Petrovice (mm).

Srážky/rok (mm)	Měsíc												Úhrn	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	za rok	za veget. období**
2022	20,9	3,7	12,6	30,6	80,3	154,9	40,1	94,7	73,7	19,4	24,5	35,3	590,7	474,3
2023	14,7	13,7	38,8	62,9	20,7	82,2	57,8	91,0	8,4	40,9	53,3	40,6	525,0	323,0
2024	38,3	44.9	19,9	12,2	35,2	57,7	65,7	59,8	137,8	-	-	-	-	368,4
Normál*	38,0	30,8	46,4	38,9	75,4	88,3	89,5	86,9	52,6	47,3	37,9	36,9	668,2	431,6

/ Meteorologická stanice ČHMÚ Nadějkov (1991–2020)* */ Vegetační období 1.4.–30.9.*

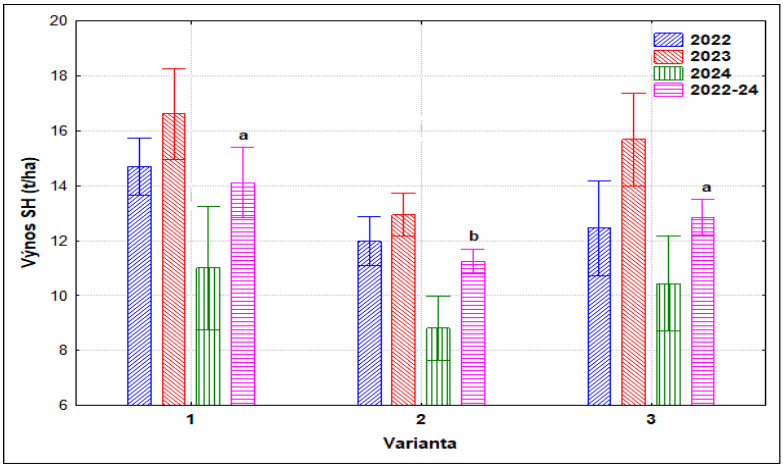
Tab. 3: Průměrné denní teploty vzduchu stanice Petrovice (°C).

Teplota/rok (°C)	Měsíc												Průměr	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	za rok	za veget. období**
2022	1,8	4,1	4,0	7,3	15,3	19,8	19,3	19,8	12,9	11,9	4,6	0,3	10,1	15,7
2023	2,0	1,7	5,2	6,6	14,9	17,2	20,1	19,2	16,6	11,3	4,3	2,6	10,1	15,8
2024	-0,2	5,9	7,6	10,8	15,3	19,4	21,0	21,6	14,4	-	-	-	-	17,1
Normál*	-1,8	-0,7	2,9	8,1	12,4	15,7	17,5	17,5	12,8	7,7	2,8	-0,9	7,8	14,0

/ Meteorologická stanice ČHMÚ Nadějkov (1991–2020)* */ Vegetační období 1.4.–30.9.*

Jak je patrno z grafu 1, úroveň dosažené produkce suché hmoty řezanky silážní kukuřice v jednotlivých ročnících značně kolísala, přičemž nejvyšších hodnot dosahovala u všech hodnocených variant v roce 2023, naopak nejnižší výnosy byly v roce 2024. V průměru ročníků byla zjištěna nejvyšší produkce u konvenční varianty s orbou (14,10 t.ha^{-1}). U obou variant s technologií striptill byly výnosy jak v jednotlivých letech, tak i v průměru ročníků nižší.

Graf 1: Produkce suché hmoty řezanky silážní kukuřice (Skoupý, 2022–2024)



Pozn. SH – suchá hmota, 1 – konvenční způsob, 2 – striptill porostu jílku mnohokvětého, 3 – striptill porostu žita s jetelem inkarnát.

U pásového zpracování porostu žita s inkarnátem byl zjištěn výnos v průměru ročníků 12,86 t.ha^{-1} (91 % kontroly), v případě varianty s jílkem mnohokvětým byla produkce suché hmoty 11,25 t.ha^{-1}, což bylo statistický významně méně (80 % kontroly) – viz tab. 4. Tyto výsledky potvrdila i faktorová analýza (FA), která v jednotlivých letech významně diferencovala (v hodnocených parametrech) dané tři varianty, kdy varianta porostu žita s inkarnátem se nejvíce podobá variantě kontrola (konvenční technologie) viz graf 2.

Tab. 4: Výnos a kvalita píce silážní kukuřice (Skoupý 2022–2024).

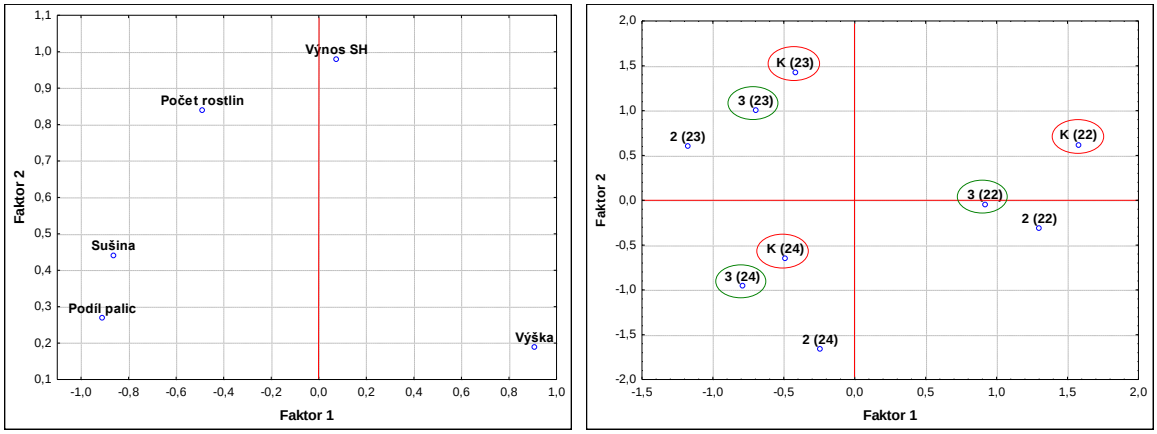
Varianta	Výnos suché hmoty (t.ha^{-1})	Výška rostliny (cm)	Podíl palic na rostlině (%)	Obsah škrobu (%)	SOH (%)	SNDF (%)	Produkce mléka (tis. kg.ha^{-1})	Produkce metanu (l.kg^{-1} suš.)
1/ Kontrola	14,10^{a}	1,93^{a}	41,87	31,05	71,49	58,07	38,25	363,48
2/ ST JM	11,25^{b}	1,82^{a}	40,97	30,88	71,25	57,99	30,66	363,48
3/ ST Ž+JI	12,86^{a}	1,77^{b}	42,99	30,62	70,26	57,58	35,57	361,41

Pozn.: Kontrola - konvenční technologie, ST JM - striptill porostu jílku mnohokvětého, ST Ž+JI - striptill porostu žita a jetele inkarnátu; SOH - stravitelnost organické hmoty; SNDF - stravitelnost neutrálně-detergentní vlákniny; ^{a,b} statisticky významné rozdíly mezi variantami p = 0,05 (HSD test); pokud indexy chybí, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl na p = 0,05.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i při testování půdoochranných variant s technologií striptill na mírně erozně pozemcích ve shodné půdně-klimatické oblasti v letech 2015–2018 (Menšík et al. 2018, Nerušil et al. 2018).

Z hodnocených parametrů v tab. 4 vyplývá, že statisticky rozdíly byly zjištěny už jen u výšky rostlin (u varianty striptill porostu žita s inkarnátem byla významně nižší oproti kontrole. V případě hodnocených znaků kvality píce silážní kukuřice nebyly zjištěny významné rozdíly žádného ze sledovaných parametrů, což je dáno zejména použitím stejného hybridu. Podobné výsledky a závěry, kdy nebyl zjištěn vliv půdoochranných technologií na kvalitu píce řezanky kukuřice jsou uvedeny v publikaci Menšík et al. 2018.

Graf 2: FA výnosových parametrů kukuřice lokality Skoupý (2022–2024)



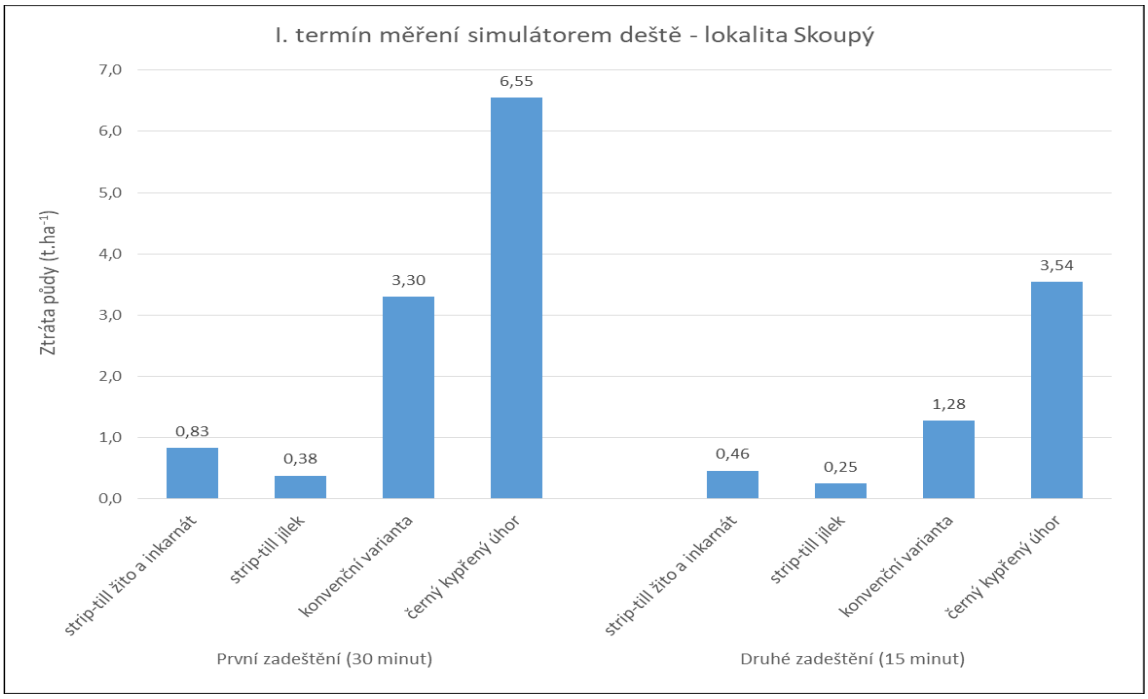
Výsledky protierozní účinnosti ověřovaných technologií

Pro demonstraci protierozního účinku jednotlivých technologií byl zvolen první termín simulace, který odpovídá cca jednomu měsíci od setí. Porosty kukuřice v této době dosahovaly výšky 15–25 cm, rostliny měly vyvinuty 3–4 listy (BBCH 13–14) a celková pokryvnost plochy plodinou dosahovala přibližně jen 15 %. Pokud se v této době vyskytne přívalová srážka, jsou způsobené škody vodní erozí nejvyšší. Situaci lze částečně předejít použitím vhodných půdoochranných technologií. V našem případě byla ověřována protierozní účinnost technologie striptill na výrazně sklonitém pozemku se sklonem 19 % u dvou různých variant s porosty meziplodin (jílek mnohokvětý, resp. směs žita trsnatého s jetelem inkarnát).

Při první simulaci byl nejnižší odnos půdy zaznamenán u varianty striptill s jílkem mnohokvětým. Oproti konvenčnímu postupu dokázala tato varianta redukovat ztrátu půdních částic o 88 % (94 % ve srovnání s černým kypřeným úhorem). Tento výsledek potvrdila i druhá simulace na již vlhkostně nasycené půdě, kde redukce ztráty půdy byla nižší o 80 % (proti černému kypřenému úhoru o 93 %). Technologie striptill v jílku mnohokvětém měla výrazný vliv i z hlediska omezení množství

povrchového odtoku. Při první simulaci byl odtok oproti konvenční variantě nižší o 67 % a při druhé simulaci na nasycené půdě o 52 %.

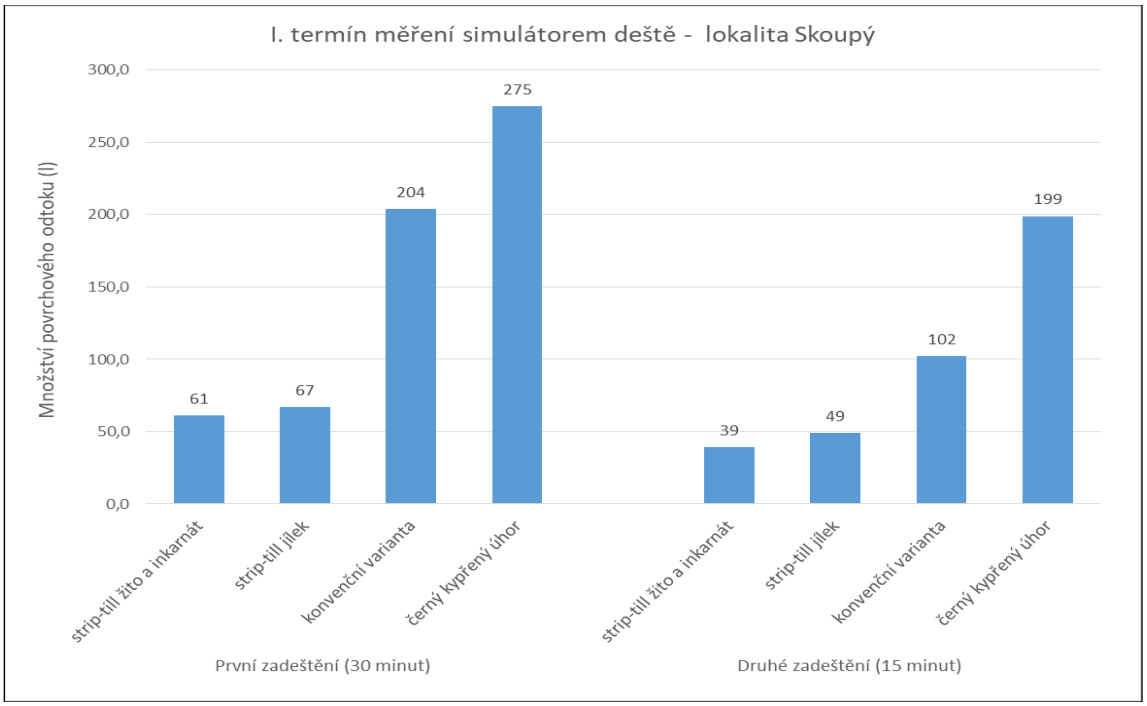
Graf 3: Ztráta půdy erozí v prvním termínu simulace (Skoupý 2022)



Poměrně dobré výsledky byly zaznamenány i u druhé ověřované varianty striptill porostu směsi meziplodin žito-inkarnát. Při první simulaci byla ztráta půdy oproti konvenci nižší o 75 % (oproti černému kypřenému úhoru o 87 %). Pozitivní vliv technologie však prokázala i druhá simulace na vlhkostně nasycené půdě, kde ztráta půdy byla menší o 64 % (87 % při srovnání s černým úhorem). Určitým překvapením bylo, že tato varianta měla mírně lepší redukci povrchového odtoku než již uváděný striptill v porostu jílku mnohokvětého. Při první simulaci byl povrchový odtok oproti konvenci snížen o 70 % a při druhé simulaci na nasycenou půdu o 62 %. Tento drobný rozdíl ovšem není statisticky průkazný a mohl být ovlivněn nepozorovatelnými externalitami obou pokusných ploch. Výsledky měření ztráty půdy a množství povrchového odtoku jsou zobrazeny v grafu 3 a 4.

Jak je patrno z uvedených výsledků, oproti konvenční orbě dochází u půdoochranných variant k významnému omezení povrchového odtoku. Pokud k povrchovému odtoku dojde, půdní částice se uvolňují díky pásovému zpracování z mnohem menší plochy než v případě klasického zpracování. Zároveň je pro kypřené pásky charakteristické, že mají obvykle hrubší povrchovou strukturou s většími půdními agregáty (Kincl et al. 2017). V důsledku toho má povrchová voda mnohem delší čas infiltrovat do půdního prostředí.

Graf 4: Množství povrchového odtoku v prvním termínu simulace (Skoupý 2022)



Závěr

Výsledky tříletých pokusů prokázaly, že při zakládání kukuřice seté do porostů pícnin (jílek mnohokvětý a směs žita trsnatého s jetelem inkarnát) na orné půdě pomocí půdoochranné technologie striptill lze dosahovat oproti klasické orební technologii o 10–20 % nižších výnosů, avšak se srovnatelnou kvalitou píce (obsah škrobu, SOH, SNDF) a příznivě vysoké protierozní ochraně půdy. Ztráta půdy erozí měřená v prvním roce pokusu v období 1 měsíc po zasetí kukuřice (BBCH 13–14) činila po 30 minutách simulace intenzivních srážek (1,2 mm.min^{-1}) 0,38–0,83 t.ha^{-1}, což bylo o 75–88 % méně než u kontroly s orbou (3,3 t.ha^{-1}). Během řešení projektu byly dále opakovaně zaznamenány mimořádně příznivé výsledky v protierozní ochraně u technologie striptill v kombinaci s travními porosty. Zvláště pokud porost na pozemku není pěstován pouze jako meziplodina, ale nachází se zde více užitkových let. Právě kvalita travního porostu a následné množství rostlinných zbytků jsou hlavní faktory, které určují míru protierozního účinku a schopnost redukce povrchového odtoku.

Literatura

Babalola, O., Oshunsanya, S. O., & Are, K. 2007: Effects of vetiver grass (*Vetiveria nigritana*) strips, vetiver grass mulch and an organo-mineral fertilizer on soil, water and nutrient losses and maize (*Zea mays* L.) yields. *Soil and Tillage Research, 96* (1-2), 6-18. https://doi.org/10.1016/j.still.2007.02.008

CZSO, 2024. Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizní zemědělských plodin.

Janeček, M. et al. 2012: Ochrana zemědělské půdy před erozí. *Metodika.* 1. vyd. Praha, Powerprint, 113 s. ISBN 978-80-87451-42-9.

Janeček, M., Kubátová, E., Procházková, E. 2013: Využití simulátorů deště ve výzkumu eroze. Vodní hospodářství *63* (5), s. 168–172.

Kincl, D., Procházková, E., Srbek, J., Nerušil, P., Menšík, L. (2017) Kukuřice bez eroze. Úroda 3, roč. LXV, s. 41-45. ISSN 0139-6013.

Meloun, M., Militký, J., Hill, M., 2012: Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech. Academia Praha, 760 s.

Menšík, L. et al. 2018: Pěstování kukuřice seté půdoochrannými technologiemi – příkladová studie Boskovická brázda a Středočeská pahorkatina. VÚRV, v.v.i. a VÚMOP, v.v.i., 102 s. ISBN 978-80-7427-288-2.

Nerušil, P. et al. 2018: Využití půdoochranné technologie Strip-Till pro zakládání kukuřice do pícnin na

orné půdě. *Úroda 12, roč. LXVI, vědecká příloha*, pp. 339-343. ISSN 0139-6013.

NutriVet 2016: Software pro výpočet potenciálního výnosu a nutriční hodnoty rostlin kukuřice určených k výrobě siláže.
Dostupné na: https://www.nutrivet.cz/nutrivet/hybridy.php

Prasuhn, V. 2012: On-farm effects of tillage and crops on soil erosion measured over 10 years in Switzerland. *Soil and Tillage Research*, *120*, 137-146. https://doi.org/10.1016/j.still.2012.01.002

Procházková, E., Kincl, D., Kabelka, D., Vopravil, J., Nerušil, P., Menšík, L., & Barták, V. 2020: The impact of the conservation tillage" maize into grass cover" on reducing the soil loss due to erosion. *Soil & Water Research*, *15*(3), 158-165. https://doi:10.17221/25/2019-SWR

Wischmeier, W. H., & Smith, D. D. 1978: Predicting rainfall erosion losses: a guide to conservation planning (*No. 537*). Department of Agriculture, Science and Education Administration.

Poděkování

Příspěvek byl vypracován s podporou projektu NAZV QK22020053 a dále projektů MZe ČR - RO0223 a RO0423.

Kontaktní adresa:

Ing., Pavel Nerušil, Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., VS Jevíčko
K. H. Borovského 461, 569 43 Jevíčko
Tel.: +420 461 327 814, e-mail: nerusil@vurv.cz

Vliv heterogenních hnojiv na půdní organickou hmotu u intenzivně obhospodařovaných travních porostů

Effect of heterogeneous fertilisers on soil organic matter in intensively used grasslands

Plisková, J.[1,2], Pospíšilová, L.[1,3], Nerušil, P.[2], Menšík, L.[2], Sedlák L.[3]

[1]*Mendelova univerzita v Brně, AF, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Zemědělská 1, 61200 Brno, e-mail: xplisko2@mendelu.cz*
[2] *Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Obhospodařování a využívání trvalých travních porostů, VS Jevíčko, K. H. Borovského 461, 569 43 Jevíčko*
[3] *Mendelova univerzita v Brně, LDF, Ústav geologie a pedologie, Zemědělská 3, 613 00 Brno*

Abstrakt
Vliv aplikace různých hnojiv na množství a kvalitu půdní organické hmoty je zkoumán u intenzivně obhospodařovaných travních porostů. Statková, organická i minerální hnojiva výrazně ovlivňují produkci píce, stabilitu ekosystému a cykly živin. Polní pokus byl založen v roce 2004 na výzkumné stanici VURV u Jaroměřic (okr. Svitavy). Sledovaná fluvizem glejová je pod trvalým travním porostem ovsíkového typu (*Arrhenathereum*) s intenzivním obhospodařováním (4-seče/rok). Na základě výsledků dlouhodobého experimentu lze konstatovat, že ke zkvalitnění půdní organické hmoty (POH) a zvýšení jejího obsahu přispívají nejvíce statková (hnůj, kejda) a organická hnojiva (digestát). Varianta Hnůj byla statisticky průkazně odlišná všech dalších variant hnojení. Rovněž lze učinit závěr, že aplikaci minerálních hnojiv je vhodné kombinovat s organickými nebo statkovými hnojivy.
Klíčová slova: půdní organická hmota, trvalé travní porosty, hnojení, multikriteriální hodnocení

Abstract
The effect of different fertiliser applications on soil organic matter content and quality was studied in intensively managed grasslands. Exogenous organic and mineral fertilisers affect fodder production, ecosystem stability, and nutrient cycles. The field experiment was established in 2004 by the Crop Research Institute (locality Jaroměřice, Svitavy region). Gleyic Fluvisol is under permanent grassland (species *Arrhenathereum*). The management is intensive, with 4 cuttings per year. Obtained results showed, that higher quality and quantity of soil organic matter (SOM) was after farmyard manure application. Statistical evaluation showed significant differences between Control and NPK variants and Digestate, Farmyard manure, and Slurry variants. A recommendation was given to combine organic fertilisers with mineral fertilisers.
Keywords: soil organic matter, grasslands, fertilizing, multicriterial evaluation

Úvod

Půdní organická hmota je klíčový parametr při hodnocení kvality, resp. úrodnosti půdy v agroekosystémech (Doran, 2002). Kromě půdní úrodnosti hraje zásadní roli v ochraně životního prostředí a je důležitá pro udržitelný rozvoj zemědělství (Voltr et al. 2021; Hu et al. 2023). Množství a kvalita POH, tj. obsah stabilních a labilních organických látek, je ovlivněna mnoha faktory, jako např. střídání plodin, agrotechnické postupy a management, systém orby nebo bez orby, hnojení, zavlažování atd. POH a její kvalitu lze hodnotit různými metodami. Většinou jsou založeny na odlišných analytických principech (mikromorfologie, spektroskopie, oxidimetrická titrace apod. Stanovení stabilních forem humusových látek (tj. poměr huminových a fulvokyselin) je zásadní pro hodnocení kvality POH. Rovněž se využívají

modernější spektrální metody, např. UV-VIS, FTIR (infračervená) a SFS (synchronní fluorescenční) spektroskopie (Pospíšilová a Tesařová, 2009). Dále je možné hodnotit kvalitu POH stanovením celkového obsahu uhlíku a dusíku. Trvalé travní porosty (TTP) zajišťují produkci píce a plní i další mimoprodukční funkce (Hoover et al., 2014; Lei et al., 2020). Jejich výměra se ve struktuře výroby zemědělských podniků soustavně zvyšuje a činí 1 002 tis. ha, což představuje podíl ve výši 23,8 % na celkové ploše obhospodařované zemědělské půdy.
Cílem příspěvku je vyhodnotit vliv hnojení minerálními, statkovými a organickými hnojivy na množství a kvalitu humusových látek pod trvalým travním porostem ovsíkového typu (*Arrhenathereum*) v oblasti Boskovické brázdy (Malé Hané).

Materiál a metody

Dlouhodobý maloparcelní pokus v TTP (lokalizace: 49.6282881N, 16.7317036E) byl založen roku 2004, VÚRV, v.v.i. v katastrálním území Jaroměřice (Pardubický kraj). Pokusné plochy mají výměru 10 m^2 ve 4 opakováních a leží v nadmořské výšce 342 m n. m., průměrná roční teplota na této lokalitě činí 8,4 °C. Dlouhodobý roční úhrn srážek 545 mm. Půdní typ je klasifikován jako fluvizem slabě glejová (FLg´). Geologickým podkladem jsou permokarbonátové horniny Českého masivu, podcelek Boskovická Brázda, sníženina Malá Haná a půdotvorným substrátem jsou nivní sedimenty Úsobrnského potoka (Menšík a Nerušil, 2019). Odběr vzorků byl realizován v roce 2022 a 2023 na podzim, z Ap horizontu (0-15 cm).
Botanické složení: luční travní porost s dominancí ovsíku vyvýšeného (*Arrhenatherum elatius /L./*). Dále je zde srha laločnatá (*Dactylis glomerata /L./*) a lipnice luční (*Poa pratensis/L./*) viz (Menšík a Nerušil (2019).

Varianty: (1) kontrola bez hnojení /Kontrola/; (2) minerální hnojení /NPK/; (3) hnůj + močůvka /Hnůj/; (4) kejda skotu /Kejda/; (5) digestát /Digestát/. Varianta Digestát byla založena až v roce 2012 při vzniku zemědělské bioplynové stanice v Jevíčku (Hanácká zemědělská společnost Jevíčko, a.s., Jurka et al. 2014). Dávky minerálních, statkových a organických hnojiv jsou při modelovém zatížení TTP skotem 2,0 DJ.ha^{-1} (120 kg N) viz Tab. 1.

Tab. 1. Dávkovaní minerálních, statkových a organických hnojiv

Varianty	Minerální hnojení						Chlévský hnůj + Močůvka*		Hovězí kejda/Digestát*	
	N				P	K				
	kg.ha^{-1} č.ž.						t.ha^{-1}			
	Jaro	po I. seči	po II. seči	po III. seči	Jaro	Jaro	Podzim	po I. seči	Jaro	po I. seči
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NPK	40	30	30	20	30	60	-	-	-	-
Hnůj	-	-	-	50			21,9	8,2	-	-
Kejda	-	-	-	-	-	-	-	-	14,5	14,5
Digestát	-	-	-	-	-	-	-	-	14,5	14,5

pozn.: skutečné dávky statkových hnojiv byly stanoveny na základě obsahu živin v hnojivu v daném roce. Modelové zatížení TTP bylo navženo dle společné metodiky HBLFA Raumberg-Gumpenstein a VÚRV, v.v.i. (Komárek et al. 2005).*

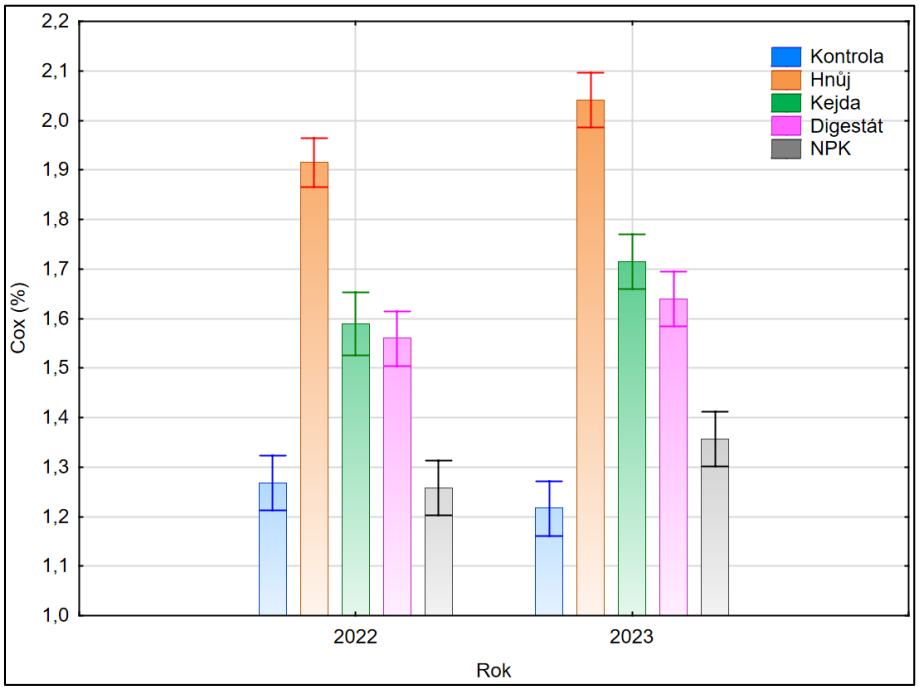
Metody stanovení: vzorky půdy byly odebrány z hloubky 0-15 cm, vysušeny a přesáty přes síto o velikosti 2 mm. Obsah uhlíku byl stanoven oxidimetrickou titrací dle Walkley – Blacka

(1934, In: Nelson & Sommers, 1996). Frakční složení bylo zjištěno krátkou frakcionací dle Kononové a Bělčikové (1963). Podrobné stanovení a výpočet poměru HK/FK a kvocientu $Q_{4/6}$ uvádí Pospíšilová a Tesařová (2009). Barevný index ($Q_{4/6}$) byl vypočítán jako poměr absorbance při 465 nm a 665 nm v UV-VIS oblasti spektra. K měření byl využit UV-VIS spektrofotometr Varian Carry 50 Probe s optickým vláknem (Varian Mulgrave, Victoria, Australia). Výsledky byly hodnoceny v programu Statistica verze 14.0 (ANOVA, Tuckey test).

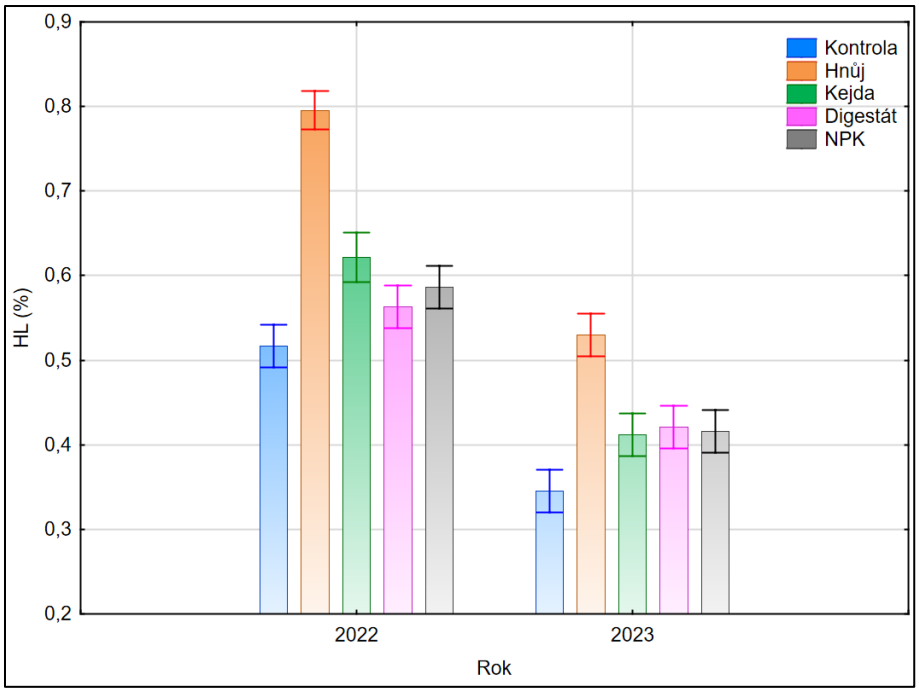
Výsledky

Obsah uhlíku a humusových látek: obsah Cox na variantách Kontrola a NPK se pohybuje na spodní hranici střední hodnoty (1,2%) . Varianty Digestát a Kejda dosahují 1,56 - 1,71 % Cox, což jsou střední hodnoty dle hodnotící tabulky (Zbíral a kol, 2011). Variatna Hnůj vykazuje vysoký obsah Cox (2,00 %). Rozdíly mezi variantou Hnůj (1,95 %) a NPK a kontrolou jsou průkazně odlišné – viz obr. 1. Obsah humusových látek byl nejvyšší u varianty Hnůj (0,83 %), tato varianta byla statisticky významně odlišná od všech ostatních variant. Rovněž byl zjištěn nejvyšší obsah huminových a fulvokyselin se na této variantě statisticky významně lišil od ostatních variant – viz obr. 2.

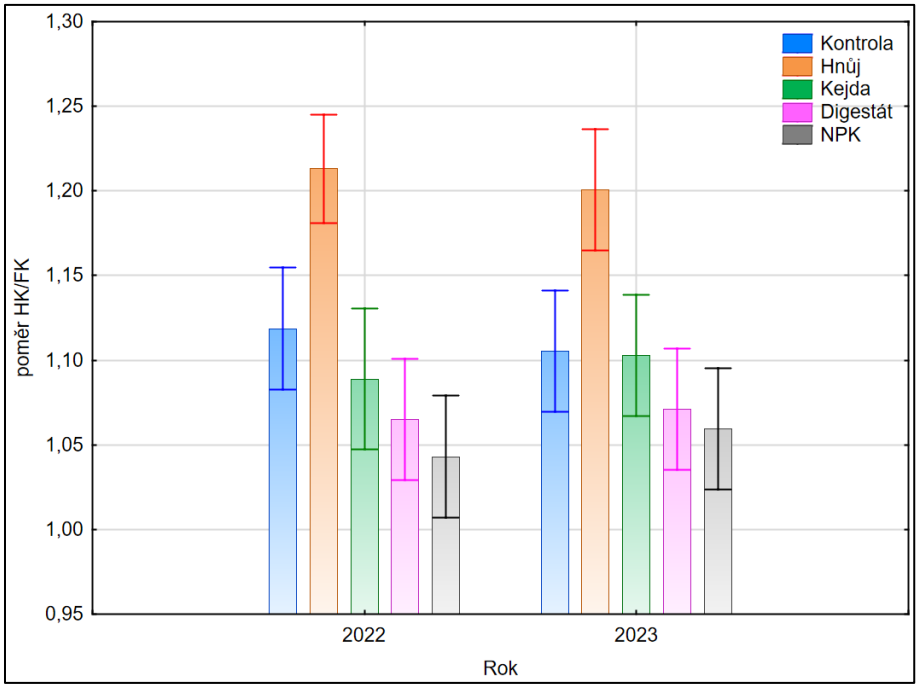
Kvalita humusových látek: vyšší hodnoty poměru HK/FK (> 1,2) na variantě Hnůj značí vyšší kvalitu a stabilitu humusových látek na této variantě. NPK varianta má nízké hodnoty poměru HK/FK, což je dáno jednak nižším obsahem HL, ale i rychlejším rozkladem organických látek po aplikaci NPK. Lze konstatovat, že vanianta Hnůj, byla statisticky významně odlišná od ostatních variant – viz obr. 3. Barevný index (kvocient) nevykazuje statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami, ale nižší hodnoty (< 6) a tím vyšší kvalita HL na variantě Hnůj je patrná – viz obr. 2. Hodnoty Q4/6 vyšší než 6 jsou typické pro ostatní varianty a ukazují na niží kvalitu HL – viz obr. 2.



Obr. 1. Průměrný obsah uhlíku (Cox, %) na sledovaných variantách pokusu



Obr. 2. Průměrný obsah humusových látek (HL, %) na sledovaných variantách pokusu



Obr. 3. Průměrná hodnota poměru huminových a fulvokyselin (HK/FK) na sledovaných variantách pokusu

Diskuze

Hospodaření na zemědelské půdě je čím dál častěji negativně ovlivněno minerální i organickou formou hnojení, které nezabezpečuje dostatek živin a dochází ke stagnaci až degradaci půdních vlastností (Menšík et al, 2023). Výzkum potvrdil, že způsoby hnojení mají významný vliv na půdní organickou hmotu, její kvalitu. Způsob hospodaření a hnojení jsou faktory ovlivňující i další vlastnosti trvale zatravněných půd, jako například retence pro vodu, zlepšení půdní struktury a biologické aktivity půdy (Shi et al., 2024). Bylo prokázáno, že hnojení TTP

organickým materiálem má nejvyšší efekt na kvalitu POH. Zvýšení biologické aktivity a zlepšení chemických a fyzikálních poměrů v půdě dokumentují Wang et al., (2024), Shi et al., (2024), Du et al., 2020, Gautam et al., (2020) a další. Shi et al., (2024) dále uvádí potřebu rozložení organických a statkových hnojiv před aplikací, z důvodu dostupnosti živin pro rostlinu na rozdíl od anorganických hnojiv, která jsou dobře dostupná s pozvolným uvolňováním. U hnojení statkovými hnojivy je známo, že zvyšuje obsah hlavních přístupných živin (Cai et al., 2019; Choudhary et al., 2018; Šimanský et al., 2019) a zlepšuje strukturu a kvalitu půdy v kombinaci s minerálními hnojivy (Du et al., 2020; Lal, 2015). Je prokázáno, že dlouhodobá aplikace hnoje zvyšuje obsah půdní organickou hmotu v půdě. Vyšší účinky POH jsou připisováný reaplikaci organické hmoty do půdy (Gautam et al., 2020; Xie et al., 2014).
Výsledky naší studie prokázali, že hnojení chlévským hnojem značně přispívá ke zkvalitnění půdní organické hmoty. Obsah uhlíku i HL je v obou letech (2022 a 2023) významně rozdílný od ostatních hnojených variant /Digestát, NPK, Kejda/ – viz kapitola Výsledky. Dle výsledků si na dlouhodobém pokusu nejhůře vede varianta s minerálním hnojením /NPK/, která má průměrný obsah uhlíku nejnižší, ze všech hnojených variant, v roce 2022 je obsah srovnatelný s nehnojenou kontrolou (1,2% - střední hodnoty). Menšík et al (2023), uvádí, že obsah uhlíku u varianty NPK v letech 1994-2023 a 2014-2016 klesl o 0,1% (Menšík et al., 2018, 2023). V letech 2019–2021 byl zjištěn obsah SOC u varianty NPK 2,20% a varianty Hnůj 2,80%, to by znamenalo, že v případě minerální varianty by došlo k poklesu C o 0,85% a u Hnoje o 0,75% (srovnání s rokem 2023). Takto vysoký pokles může být dán srovnáním jiného období odběru (2019–2021 – odběr jaro, 2023 – odběr podzim) či delší časová řada v roce 2019–2021 ve srovnání s daty v roce 2023 (pouze 1 rok) (Plisková, 2022).
V pokusu organického a anorganického hnojiva pod TTP bylo jasně prokázáno, že se v obou případech zvyšuje obsah C. Shi et al, (2024) dále uvádí, že organické hnojivo zvyšuje nejen obsah C, ale i druhoutnou bohatost TTP. Rozdílem mezi hnojivy je zvyšování obsahu C, organická hnojiva zvyšují obsah uhlíku 7x více, než anorganická hnojiva, dále autor uvádí, že účinky se liší dle klimatických podmínek, vlastností půdy a množství hnojiva (Shi et al., 2024). Panwar et al., (2010) ve své práci uvádí, že hnojení hnojem zvyšuje akumulaci SOC, díky obsahu organického uhlíku v hnoji. Je prokázáno, že nepřetržité používání minerálních hnojiv může vést ke snížení zásob SOC, která je potvrzena i v našem případě – viz obr. 1 Průměrný obsah uhlíku (Cox, %) na sledovaných variantách pokusu (Du et al., 2020; Lal, 2015). Díky reaplikace hnoje se v půdě akumuluje OH a zvyšuje zásobu C. Tato zásobárna uhlíku působí jako substrát pro zvýšení mikrobiální aktivity a biomasy v půdě (Gautam et al., 2020; Tong et al., 2014; Xu et al., 2018). Huang et al., (2024) uvádí, že při hnojení organickými hnojivy (přidáním uhlíku do půdy) se zvyšuje obsah dusíku, jeho fixace a mirkobiální spolupráce v půdě. Tong et al., (2014) ve své práci prokázal, že nevyšší nárust celkového uhlíku je u varianty hnojené kejdou. Obsah C při hnojení NPK se zvýšil o 58 % ku kontrolní (nehnojené) variantě (Šimanský et al., 2019).
V procesu humufikace jsou organická a statková hnojiva nenahraditelná. U minerálních hnojiv nelze dosáhnout stejné intenzity humufikace jako při aplikaci orgamnických a statkových hnojiv (Šimanský et al., 2019; Yang et al., 2016). Šimanský et al., (2019) uvádí, že aplikace hnoje s minerálnimi hnojivy zvýšila obsah uhlíku, ale také snížila stabilitu a kvalitu humusu. Je vědecky podloženo, že minerální hnojiva zvyšují hodnoty uhlíku, humusových látek a huminových kyselin avšak toto hnojení není z hlediska udržitelného zemědelství spolehlivé a pouze minerální hnojiva mohou v budoucnu degradovat půdu, proto je vhodné kombinovat se statkovými hnojivy, konktrétně hnojem (Šimanský et al., 2019; Tripolskaja et al., 2024). Ke kombinaci hnojiv se přiklání i Plisková (2022), která uvádí, že v letech 2019–2021 dosahovala varianta Hnůj obsahu 0,76 % HL v porovnání s rokem 2022 se obsah HL zvýšil o 0,4 %. V roce 2023 obsah HL opět klesá. Minerální hnojivo statisticky významně ovlivňuj kvalitu humusu (dochází k poklesu HL), toto potvrzuje i naše studie, kde varianta Hnůj má ve srovnání

s variantou NPK o 0,22 % vyšší obsah HL (Šimanský et al., 2019). Sledované pokusy Menšík et al. (2018) dokumentují výsledky v letech 1994-2016. Sledovaný objekt se nachází ve stejném státě, avšak při jiných klimatických podmínkách a jiném systému obdělávání (orná půda). Menšík et al. (2018) dokumentuje snižující se trend obsahu HL během let. V naší práci se tento snižující se trend projevil též. Při využití chlévského hnoje na ornou půdu autor uvádí obsah humusu mezi 3,5 až 5,0 %, dle Obr. 2, je patrné, že naše výsledky byli vyšší v obou letech (2022 i 2023). I u varianty NPK jsou hodnoty HL vyšší v naše případě. Tento rozdíl lze vysvětlit samotným systémem hospodaření na půdě, kdy v našem případě sledujeme TTP a Menšík et al. (2018) ornou půdu. Při srovnání poměru HK/FK u minerálního hnojení autor uvádí hodnoty pod 1 (0,8-1,0), hodnoty poměru HK/FK pod TTP jsou nad 1 (1,04-1,06). Varianta hnojená hnojem u orné půdy dosahuje od 1,0 do 1,1 v případě TTP přesahuje hodnotu 1,20. Rozdíl je opět dán systémem hospodaření s půdou, autor sledoval i obsah C, který nepřesahuje 1,5 % zatím co u TTP je nejnižší zaznamenaná hodnota 1,9 (což je o 0,4% více). Lze tedy konstatovat, že přes intenzivní sečnost (využívání) TTP zadržuje v půdě více C, ale také zlepšuje a zkvalitňuje půdní organickou hmotu.

Závěr

Na základě výsledků dlouhodobého experimentu na trvale zatravněných půdách s různým režimem hnojení (organická, statková a minerální) lze konstatovat, že ke zkvalitnění POH a zvýšení jejího obsahu přispívaji více statková (hnůj, kejda) a méně organická hnojiva (digestát). Varianta Hnůj byla statisticky průkazně odlišná od všech dalších variant hnojení. Nejnižší množství a kvalita POH byly při minerálním hnojení. Toto tvrzení je podloženo i v diskuzi. Lze tedy učinit závěr, že samostatná aplikace minerálních hnojiv degraduje a snižuje kvalitu POH, která má vliv nejen na půdní vlastnosti, ale výnos a biodiverzitu. Naopak zlepšení a zkvalitnění půdy lze dosáhnmou hnojením statkovými hnojivy, popřípadě zvolit kombinaci statkových, organických a minerálních hnojiv. Pomocí diskuze bylo prokázáno, že management využití je též podstatný a nelze docílit stejných výsledků na orné půdě a v trvalém travním porostu.

Literatura

Cai, A., Xu, M., Wang, B., Zhang, W., Liang, G., Hou, E., & Luo, Y. (2019). Manure acts as a better fertilizer for increasing crop yields than synthetic fertilizer does by improving soil fertility. *Soil and Tillage Research*, *189*(February 2018), 168–175. https://doi.org/10.1016/j.still.2018.12.022

Choudhary, M., Panday, S. C., Meena, V. S., Singh, S., Yadav, R. P., Mahanta, D., Mondal, T., Mishra, P. K., Bisht, J. K., & Pattanayak, A. (2018). Long-term effects of organic manure and inorganic fertilization on sustainability and chemical soil quality indicators of soybean-wheat cropping system in the Indian mid-Himalayas. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *257*(February), 38–46. https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.029

Du, Y., Cui, B., zhang, Q., Wang, Z., Sun, J., & Niu, W. (2020). Effects of manure fertilizer on crop yield and soil properties in China: A meta-analysis. *Catena*, *193*(April). https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104617

Gautam, A., Sekaran, U., Guzman, J., Kovács, P., Hernandez, J. L. G., & Kumar, S. (2020). Responses of soil microbial community structure and enzymatic activities to long-term application of mineral fertilizer and beef manure. *Environmental and Sustainability Indicators*, *8*(May). https://doi.org/10.1016/j.indic.2020.100073

Hoover D., Knapp A., Smith M. (2014). Resistance and resilience of a grassland ecosystem to

climate extremes. Ecology, 95(9): 2646–2656.

Hu, Q., B. W. Thomas, D. Powlson, Y. Hu, Y. Zhang, X. Jun, X. Shi, and Y. Zhang. 2023. Soil organic carbon fractions in response to soil, environmental and agronomic factors under cover cropping systems: A global meta-analysis. Agriculture, Ecosystems and Environment 355(April):108591.

Huang, W., Ma, T., Liu, X., Xu, Y., Gu, J., Gu, Y., Yuan, J., Wen, T., Xue, C., & Shen, Q. (2024). Degradation of Complex Carbon Sources in Organic Fertilizers Facilitates Nitrogen Fixation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *72*(23), 12988–13000. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01727

Komárek P., Kohoutek A., Fiala J, Nerušil P., Odstrčilová V. (2005). Produkce a kvalita travních pícnin ve vztahu k míře obsádky a frekvenci sečení. In: Lillak, R., Viiralt, R., Linke, A., Geherman, V. (Ed.) Grassland Science In Europe. Integrace efektivního hospodaření na pastvinách a biologické rozmanitosti. Kreutzwaldi 56, Tartu, 51014, Estonsko: Estonian Grassland Soc-Egs, 573–576

Kononová, M. M. & Bělčiková, N. P. (1963). Uskorennyj Metod Opredelenija Sostava Gumusa Mineralny Ch Počv. In: Organičeskoje Veščestvo Počvy. Moskva. 228-234.
Lal, R. (2015). Sequestering carbon and increasing productivity by conservation agriculture. *Journal of Soil and Water Conservation*, *70*(3), 55A-62A. https://doi.org/10.2489/jswc.70.3.55A

Lei T., Feng J., Zheng C., Li S., Wang Y., Wu Z., Lu J., Kan G., Shao C., Jia J., Cheng H. (2020). Review of drought impacts on carbon cycling in grassland ecosystems. Frontiers of Earth Science, 17.

Menšík, L., L. Hlisnikovský, L. Pospíšilová, and E. Kunzová.(2018). The effect of application of organic manures and mineral fertilizers on the state of soil organic matter and nutrients in the long-term field experiment. Journal of Soils and Sediments 18(8):2813–2822.

Menšík, L., Kunzová, E., Hlisnikovský, L., Nerušil, P., Pospíšilová, L., Plisková, J., Voltr, V., Šimon, T., Madaras, M. (2023). The importance of livestock manure application for the sustainable management of agricultural land in the context of climate change (soil quality and health): Crop Research Institute in Prague, SBN 978-80-7427-428-2
Menšík L. Nerušil P. (2019). Produkční, kvalitativní a porostové změny trvalého lučního společenstva ve vztahu k intenzitě využívání a úrovni hnojení v oblasti Malé Hané. Pořadí vydání: první. [Praha]: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 100 s. ISBN 978-80-7427-319-3.

Panwar, N. R., Ramesh, P.,Singh, A. B., & Ramana, S. (2010). Influence of Organic, Chemical, and Integrated Management Practices on Soil Organic Carbon and Soil Nutrient Status under Semi-arid Tropical Conditions in Central India. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 41(9), 1073-1083. https://doi.org/10.1080/00103621003687166

Plisková, J. (2022). Vliv intenzity využívání a úrovně hnojení TTP na obsah a kvalitu humusu: Agromanual, Dostupné z:https://www.agromanual.cz/cz/clanky/vyziva-a-stimulace/vliv-intenzity-vyuzivani-a-urovne-hnojeni-ttp-na-obsah-a-kvalitu-humusu
Pospíšilová L., Tesařová M., 2009: Organický uhlík obhospodařovaných půd. Mendelova

zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 42 s. ISNB 978-80-7375- 282-8.
Shi, T. S., Collins, S. L., Yu, K., Peñuelas, J., Sardans, J., Li, H., & Ye, J. S. (2024). A global meta-analysis on the effects of organic and inorganic fertilization on grasslands and croplands. *Nature Communications*, *15*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41467-024-47829-w

Šimanský, V., Juriga, M., Jonczak, J., Uzarowicz, Ł., & Stępień, W. (2019). How relationships between soil organic matter parameters and soil structure characteristics are affected by the long-term fertilization of a sandy soil. *Geoderma*, *342*(August 2018), 75–84. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.02.020

Tong, X., Xu, M., Wang, X., Bhattacharyya, R., Zhang, W., & Cong, R. (2014). Long-term fertilization effects on organic carbon fractions in a red soil of China. *Catena*, *113*, 251–259. https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.08.005

Tripolskaja, L., Amaleviciute-Volunge, K., Kazlauskaite-Jadzevice, A., Slepetiene, A., & Baksiene, E. (2024). Exploring the Influence of Natural and Agricultural Land Use Systems on the Different Lability Organic Carbon Compounds in Eutric Endocalcaric Arenosol. *Sustainability (Switzerland)* , *16*(13), 1–15. https://doi.org/10.3390/su16135403
Voltr V., Menšík L., Hlisnikovský L., Hruška M., Pokorný E., Pospíšilová L. 2021. The Soil Organic Matter in Connection with Soil Properties and Soil Inputs. Agronomy 11(4):779. https://doi.org/10.3390/agronomy11040779

Xie, H., Li, J., Zhu, P., Peng, C., Wang, J., He, H., & Zhang, X. (2014). Long-term manure amendments enhance neutral sugar accumulation in bulk soil and particulate organic matter in a mollisol. *Soil Biology and Biochemistry*, *78*, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.009

Xu, Y., Tang, H., Xiao, X., Li, W., Li, C., Sun, G., & Cheng, K. (2018). Effects of long-term fertilization management practices on soil microbial carbon and microbial biomass in paddy soil at various stages of rice growth. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, *42*, 1–12. https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20170111

Yang, R., Su, Y. Z., Wang, T., & Yang, Q. (2016). Effect of chemical and organic fertilization on soil carbon and nitrogen accumulation in a newly cultivated farmland. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(3), 658–666. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61107-8

Dedikace
Tato práce byla podpořena projekty MZe ČR NAZV QK21010124 - "Půdní organická hmota – hodnocení parametrů kvality", NAZV QK 23020056 „Vytvoření a ověření modelových systémů dlouhodobé sekvestrace uhlíku v ČR" a MZe ČR RO-0423 (institucionální podpora). Dále byl podpořen projektem TAČR FW06010006 „Semiautonomní systém optimalizace degradovaných půd hloubkovou injektáží".

Kontakt:
Ing. Jana Plisková
Mendelova univerzita v Brně
Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno
xplisko2@mendelu.cz

Komplexní pohled na digestát v kontextu udržitelného zemědělství

A comprehensive view of digestate in the context of sustainable agriculture

Prudil J.[1,2], Badalíková B.[1]

[1]*Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko*

[2]*Mendelova univerzita v Brně*

Abstrakt

Publikace poskytuje komplexní přehled o využití digestátu v rámci udržitelného zemědělství. Studie potvrzuje jeho příznivý vliv na zlepšení chemických a fyzikálních vlastností půdy, současně však upozorňuje na potenciální rizika spojená s přítomností kontaminantů a nízkým obsahem stabilní organické hmoty. Tento článek hodnotí potenciál digestátu jakožto případné alternativy syntetických hnojiv a zdůrazňuje nezbytnost pravidelného monitorování jeho kvality a optimalizace dávkování.

Klíčová slova: digestát, udržitelné zemědělství, půdní úrodnost, cirkulární ekonomika, aplikace hnojiv

Abstract

The publication provides a comprehensive overview of the use of digestate within the framework of sustainable agriculture. The study confirms its beneficial impact on improving the chemical and physical properties of soil, while also highlighting potential risks associated with contaminants and the low content of stable organic matter. This article evaluates the potential of digestate as a substitute for mineral fertilizers and emphasizes the necessity of regular monitoring of its quality and the optimization of application rates.

Keywords: digestate, sustainable agriculture, soil fertility, circular economy, fertiliser application

Úvod

V současné době se problematika udržitelnosti v zemědělství stává klíčovým tématem, které si žádá pozornost v souvislosti s globálními ekologickými výzvami, jako jsou změna klimatu, degradace půdy a znečištění vodních zdrojů. V rámci hledání efektivních a ekologicky šetrných řešení se stále více zaměřuje na využívání digestátu, organického produktu vznikajícího anaerobní digescí. Tento proces, jenž zpracovává různé organické odpady, nejenže produkuje bioplyn jako alternativní zdroj energie, ale také generuje cenný materiál, který lze aplikovat na zemědělské půdy a hraje klíčovou roli při zvyšování úrodnosti půdy a snižování emisí skleníkových plynů.

V České republice se každoročně vyprodukuje více než 7,5 milionu tun digestátu. Očekává se, že do roku 2030 tento objem vzroste na přibližně 11 milionů tun, což klade zvýšené nároky na efektivní a udržitelné nakládání s tímto materiálem.

Cílem tohoto článku je poskytnout komplexní analýzu digestátu, jeho vlastností, aplikace a přínosů v kontextu udržitelného zemědělství. V článku jsou podrobně prozkoumány procesy vedoucí k tvorbě digestátu, jeho chemické a biologické vlastnosti, jakož i legislativní rámec, který ovlivňuje jeho využití v praxi. Zvláštní pozornost je věnována přínosům digestátu pro zlepšení půdní kvality a jeho roli v podpoře cirkulární ekonomiky. Tento příspěvek si klade za cíl přispět k lepšímu porozumění významu digestátu jakožto klíčového prvku pro udržitelné zemědělské systémy.

Nezastupitelná role půdy v podpoře ekologické rovnováhy

Půda představuje klíčový prvek ekosystémů a má zásadní vliv na kvalitu lidského života a celkovou udržitelnost životního prostředí. Je to komplexní a dynamický systém, který zahrnuje minerální část, organickou hmotu, vzduch, vodu a živé organismy, které spolu interagují a ovlivňují řadu ekologických procesů. Půda je nezbytná pro produkci potravin, regulaci vody, ochranu biodiverzity a ukládání uhlíku, což ji činí kritickým zdrojem pro udržitelnost a zdraví planetárního ekosystému.

Pro zachování fyzikální, chemické a biologické integrity půdy je nezbytné aplikovat cílené agrotechnické praktiky a řízené intervence. Udržitelné zemědělství a správné hospodaření s půdou zahrnuje techniky, jako je rotace plodin, zadržování vody v půdě, a využívání pokrytí půdy, které pomáhají udržovat její úrodnost a strukturu. V současnosti však čelíme prudkému růstu cen minerálních hnojiv, což vytváří tlak na hledání alternativních zdrojů živin, které by mohly částečně nahradit funkce minerálních hnojiv.

I přesto, že živiny lze získávat z různých zdrojů, organických hnojiv je trvalý nedostatek, zejména v důsledku poklesu chovu hospodářských zvířat. Minerální hnojiva, která poskytují rychle dostupné živiny pro rostliny, se dnes používají mnohem častěji. Avšak z ekonomického hlediska představují značnou zátěž, neboť jejich ceny se za poslední rok téměř ztrojnásobily. Kromě toho mohou negativně ovlivnit dlouhodobé zdraví půdy, což vede k degradaci půdních vlastností, erozi a ztrátě biodiverzity.

V tomto kontextu je zcela zásadní zaměřit se na alternativní zdroje živin a začlenit principy cirkulární ekonomiky do zemědělské praxe. Využití digestátu, který je bohatým zdrojem snadno dostupných živin, jako jsou dusík, draslík a fosfor, se ukazuje jako perspektivní řešení. Tyto živiny jsou nezbytné pro zdravý růst rostlin a zajišťují výnosy v rámci udržitelného zemědělství. Moderní úpravy digestátu navíc umožňují efektivní recyklaci makroprvků, což z něj činí vhodný doplněk k minerálnímu hnojení.

Digestát také obsahuje prekursory huminových látek, které podporují půdní úrodnost a zlepšují její schopnost zadržovat vodu a živiny. Tyto vlastnosti přispívají k obnovení biologické aktivity v půdě a mohou pomoci mitigovat některé negativní efekty způsobené intenzivním zemědělstvím. Efektivní správa půdy a využívání inovativních přístupů, jako je aplikace digestátu, jsou klíčovými faktory pro zajištění dlouhodobé udržitelnosti zemědělství a pro ochranu našich přírodních zdrojů.

Definice digestátu

Digestát je podle platné legislativy (EU) č. 2019/1009 klasifikován jako typové organické hnojivo, které vzniká procesem anaerobní digesce vstupních surovin při výrobě bioplynu v bioplynových stanicích. Tento proces je obecně považován za jeden z nejefektivnějších výrobních postupů pro produkci bioenergie, neboť minimalizuje negativní dopady na životní prostředí a přispívá k produkci obnovitelného zdroje energie v podobě bioplynu, který se skládá převážně z metanu a oxidu uhličitého. Tento proces je zásadní pro snižování emisí skleníkových plynů a jako příspěvek k oběhové ekonomice.

Anaerobní digesce zahrnuje mikrobiologickou přeměnu organického materiálu za nepřístupu kyslíku, což vede k tvorbě bioplynu a zbytkové frakce – digestátu. Během tohoto procesu dochází k odstranění 20–95 % organické hmoty původního materiálu. Tento aspekt často způsobuje, že je digestát veřejností vnímán spíše jako hnojivo minerální.

Kvalita a složení digestátu jsou určovány několika faktory:

1. **Surovinové vstupy:** Typ a poměr surovin použitých při anaerobní digesci hraje klíčovou roli v konečné kvalitě digestátu. Různé suroviny, jako jsou posklizňové zbytky či kalové zbytky, mají odlišný obsah živin, což se odráží v nutrientním profilu výsledného digestátu (Deublein & Schwartz, 2011).
2. **Fermentační proces:** Faktory, jako je teplota, pH, fermentační doba či mikrobiální společenstva, hrají klíčovou roli v efektivitě procesu. Optimální teplota pro mesofilní procesy se pohybuje mezi 30 a 40 °C, zatímco termofilní procesy vyžadují vyšší teploty (50–60 °C), což zvyšuje rychlost produkce bioplynu a zlepšuje hygienizaci digestátu (Khanal et al., 2007).

3. **Post-fermentační úpravy:** Po fermentaci může být digestát dále upravován, což zvyšuje jeho stabilitu a kvalitu. Procesy jako dehydratace, sušení a fermentační stabilizace přispívají k eliminaci patogenů a zlepšují využitelnost živin (Zhang et al., 2013).

Klasifikace digestátu

Digestát můžeme klasifikovat podle formy, ve které je aplikován na půdu. Hlavními složkami digestátu jsou separát, což je oddělená tuhá část, a fugát, což je oddělená kapalná část. Poměr těchto složek se obvykle pohybuje kolem 4-5:1, přičemž fugát tvoří 80–84 % a separát 16–20 % celkového objemu digestátu. Tyto složky mají odlišný vliv na zdraví půdy a růst rostlin. Obvykle se využívají jako zdroje pro organické hnojení. Fugát se v některých případech opětovně zařazuje do systému bioplynové stanice pro další využití. Jeho aplikace má potenciál dosahovat výsledků srovnatelných s tradičními minerálními hnojivy. Separát obohacuje půdu organickým materiálem, který má široké možnosti využití jako základ pro výrobu různých typů hnojiv (komposty či sušené formy), substrát nebo alternativní palivo (ÚKZÚZ, 2016).

1. **Fugát**

Fugát je kapalná frakce digestátu, která se vyznačuje vysokou dostupností živin, zejména dusíku, což činí jeho aplikaci na zemědělské plodiny vysoce efektivní. Vzhledem k tomu, že fugát obsahuje až 60 % využitelného dusíku, dosahuje srovnatelných výnosů s minerálními hnojivy. Díky svému nízkému poměru C:N < 10 je fugát rychle uvolnitelným zdrojem živin, což přispívá k okamžitému zlepšení výživy rostlin.

2. **Separát**

Separát je naopak tuhou frakcí digestátu a liší se svými vlastnostmi a účinky na půdu. Tento materiál dodává do půdy organické látky, které jsou podobné účinkům hnoje. V porovnání s fugátem obsahuje separát dvojnásobné množství fosforu a hořčíku, což jej činí cenným zdrojem živin pro rostliny. Vzhledem k jeho pomalu uvolnitelnému dusíku (s využitelností kolem 30 %) a poměrem C:N > 10 se separát postupně rozkládá a poskytuje živiny po delší časové období.

Podmínky aplikace digestátu

Aplikace digestátu na zemědělskou půdu nevyžaduje žádné speciální oznámení ani registraci, což zjednodušuje jeho integraci do běžných zemědělských praktik. Je důležité dodržovat stanovené normy a doporučení pro optimalizaci jeho využití jako hnojiva. Před aplikací je třeba provést analýzu složení digestátu, aby se zajistilo, že neobsahuje těžké kovy či jiné škodlivé látky, které by mohly negativně ovlivnit kvalitu půdy a plodin (Weiland, 2010; Fravolini et al., 2016). Při aplikaci digestátu na půdu by se také měly zohlednit místní klimatické a půdní podmínky, stejně jako typ pěstovaných plodin. Tím se maximalizuje efektivita hnojení a minimalizují potenciální negativní dopady na životní prostředí, například vyplavování živin do podzemních vod. Aplikace digestátu tak přispívá k udržitelnosti zemědělských praktik a celkovému zlepšení zdraví půdního ekosystému.

Digestát jako alternativní zdroj živin

Využití digestátu jako alternativního zdroje živin se ukazuje jako významná strategie pro zajištění udržitelného zemědělství. Podle výzkumů vedených Lošákem (2012), Kouřimskou (2012) a Alburquerque (2012) aplikace digestátu může přispět k dosažení vyšších výnosů pěstovaných plodin, které se vyrovnají nebo překonají výnosy dosažené pomocí komerčních minerálních hnojiv. Makádi (2012) dokumentuje pozitivní vliv digestátu na výnos nadzemní biomasy, což naznačuje, že digestát může sloužit jako efektivní alternativní zdroj živin, který podporuje prosperitu rostlin. Studie Insama (2015) poukazují na to, že aplikace digestátu má potenciál zvyšovat mikrobiální aktivitu v půdním prostředí, což urychluje procesy mineralizace

a humifikace organických látek. Tyto biologické procesy jsou klíčové pro regeneraci půdy a podporu její úrodnosti, neboť přispívají k stabilizaci živin a jejich dostupnosti pro rostliny. Nicméně, je třeba poznamenat, že digestát vykazuje nižší stabilitu organické hmoty ve srovnání s tradičními statkovými hnojivy, jako jsou hnůj či kompost. Tento fakt může mít důsledky pro dlouhodobou kvalitu a strukturu půdy.

Důležitým aspektem recyklace digestátu je jeho potenciál snižovat závislost na minerálních hnojivech, což může vést k redukci ekologického zatížení spojeného s výrobou a aplikací těchto hnojiv. Snížení potřeby minerálních hnojiv přispívá k menší spotřebě fosilních paliv a nerostných surovin, což je klíčové pro zachování zdravého a kvalitního půdního prostředí. Tyto ekologické přínosy mají dalekosáhlý význam pro dlouhodobou udržitelnost zemědělských praktik a ochranu životního prostředí.

Jak digestát ovlivňuje fyzikální vlastnosti půdy

Aplikace digestátu na půdu může mít významný potenciál pro zlepšení jejích fyzikálních vlastností, což je podloženo řadou vědeckých studií. Mezi klíčové aspekty řadíme především tyto:

1. **Půdní vlhkost**: Podle výzkumů může digestát napomoci zadržování vody v půdním profilu. To je důsledkem přítomnosti organických látek, které zvyšují poréznost a schopnost půdy akumulovat vodu. Studie prokázaly, že aplikace digestátu zlepšuje infiltrační kapacitu a retenční schopnosti půdy, což je zvlášť důležité během období sucha (Khanal et al., 2007).
2. **Vodní režim**: Digestát má potenciál zlepšit vodní režim půdy, což zahrnuje jak infiltraci, tak i distribuci vody. Zlepšení vodního režimu je klíčové v oblastech náchylných k erozi, kde může digestát přispět k udržení struktury půdy a snížení rizika eroze (Zhang et al., 2013).
3. **Biologická aktivita**: Organické látky obsažené v digestátu podporují rozvoj mikrobiální populace a aktivitu v půdě. Tím dochází ke zlepšení biologické stability půdy, což je zásadní pro rozvoj zdravého ekosystému. Podle studií se ukazuje, že mikrobiální aktivita a biodiverzita vzrůstá s aplikací digestátu, což pozitivně ovlivňuje celkovou úrodnost půdy (Deublein & Schwartz, 2011).
4. **Struktura půdy**: Digestát může přispět k agregaci částic půdy, což zlepšuje její strukturu. Kvalitní struktura půdy je nezbytná pro udržení živin a vody a podporuje zdravý růst kořenového systému. Zlepšení struktury také pomáhá proti zhutnění půdy, což je běžný problém v intenzivně obhospodařovaných oblastech (Khanal et al., 2007).
5. **Dopad na erozní procesy**: Aplikace digestátu může pomoci stabilizovat půdu a snížit její náchylnost k erozi. Díky zvýšení obsahu organické hmoty a zlepšení struktury půdy dochází k redukci či úplné eliminaci erozních procesů, což je klíčové pro ochranu zemědělského půdního fondu a zachování úrodnosti půdy (Zhang et al., 2013).

Jak digestát proměňuje chemismus půdy

Digestát může pozitivně ovlivnit i půdní chemismus, což může být zcela zásadní pro úrodnost a celkovou kvalitu půdního ekosystému. Mezi klíčové aspekty patří:

1. **Obsah živin**: Digestát je bohatým zdrojem živin, zejména dusíku (N), fosforu (P) a draslíku (K). Jeho aplikace může vést k výraznému zvýšení dostupnosti těchto živin v půdě, což zlepšuje nutriční hodnotu pro rostliny. Výzkumy naznačují, že až 60 % dusíku v digestátu je biologicky dostupného, což efektivně podporuje růst a vývoj rostlin (Khanal et al., 2007).

2. **Vliv na pH půdy**: Pravidelná aplikace digestátu může vést k nárůstu hodnot pH v půdě. Tento posun je důležitý, neboť zvyšování pH může zlepšit dostupnost některých živin, jako je vápník a hořčík, a zároveň může snížit toxicitu některých prvků, například hliníku, který může negativně ovlivnit růst rostlin. Taková úprava chemického prostředí půdy je zásadní, zejména v oblastech, kde jsou půdy silně kyselé (Deublein & Schwartz, 2011).
3. **Obsah organického uhlíku a humusu**: Aplikace digestátu přispívá k nárůstu obsahu organického uhlíku v půdě, což je klíčové pro zlepšení půdní struktury a schopnosti zadržovat vodu. Jak ukázaly studie, pravidelné používání digestátu může rovněž zlepšit kvalitu humusu, což má pozitivní vliv na biologickou aktivitu a úrodnost půdy (Prudil et al., 2022).
4. **Chemická stabilita a biodiverzita půdy**: Aplikace digestátu přispívá k rozvoji stabilnějších huminových látek, které mají dlouhodobý pozitivní vliv na chemismus půdy. Stabilizace organických látek v půdě může podporovat biologickou aktivitu a zvýšit biodiverzitu mikrobiálního společenstva, což dále posiluje úrodnost a zdraví půdy (Zhang et al., 2013).

Jak půdní organismy reagují na digestát

Aplikace digestátu na půdu ovlivňuje půdní mikroorganismy a jejich aktivitu, což má důsledky na zdraví a dynamiku půdního ekosystému. Klíčové aspekty tohoto procesu zahrnují:

1. **Zdroj energie a živin**: I když digestát obsahuje méně kvalitní organické hmoty než tradiční statková hnojiva, je stále významným zdrojem energie pro půdní mikroorganismy. Obsahuje živiny, jako je dusík, fosfor a draslík, které podporují růst a reprodukci mikrobiálních populací. Studie prokázaly, že aplikace digestátu může vést k nárůstu mikrobiální biomasy a aktivity, což pozitivně ovlivňuje celkovou úrodnost půdy (Deublein & Schwartz, 2011).
2. **Podpora mineralizace a humifikace**: Přítomnost organických látek v digestátu stimuluje procesy mineralizace a humifikace, které jsou klíčové pro udržení dlouhodobé úrodnosti půdy. Mikroorganismy se podílejí na rozkladu organických látek a transformaci živin do formy, která je biologicky dostupná pro rostliny. Tímto způsobem se zvyšuje obsah stabilního humusu v půdě, což má dlouhodobé pozitivní důsledky pro chemické a fyzikální vlastnosti půdy (Prudil et al., 2022).
3. **Diverzita mikrobiálních společenstev**: Aplikace digestátu může zvýšit biologickou rozmanitost v půdních ekosystémech. Studie ukazují, že mikrobiální komunity, které se vyvíjejí po aplikaci digestátu, jsou obvykle bohatší a rozmanitější, což přispívá k celkové ekologické stabilitě. Tato diverzita mikroorganismů může zlepšit odolnost půdy vůči stresovým faktorům, jako jsou změny klimatu nebo patogeny (Zhang et al., 2013).
4. **Dopad na fyziologii půdních organismů**: Aplikace digestátu ovlivňuje nejen mikrobiální biomasy, ale také jejich fyziologii. Například zvýšené množství živin a organických látek může vést k rychlejší reprodukci mikroorganismů, což se projevuje zvýšenou enzymatickou aktivitou a efektivnějšími procesy rozkladu. Tyto enzymy hrají klíčovou roli při mineralizaci živin a celkové půdní úrodnosti.

Jak na udržitelné využívání digestátu? Přínosy, rizika a výzvy

Využití digestátu jako hnojiva představuje významný krok směrem k udržitelnému zemědělství a má několik environmentálních přínosů.

Přínosy

1. **Snížení závislosti na minerálních hnojivech**: Aplikace digestátu může výrazně snížit potřebu minerálních hnojiv, jejichž výroba a aplikace často vede k negativním ekologickým dopadům. Snížené využívání syntetických hnojiv může přispět k poklesu emisí skleníkových plynů a zlepšení kvality vody prostřednictvím redukce vyplavování nitrátů do povrchových a podzemních vod (Lijó et al., 2015).
2. **Recyklace organických materiálů**: Digestát slouží jako účinný prostředek pro recyklaci organických materiálů, což podporuje oběhové hospodářství a přispívá Sk udržitelnému zemědělství. Použitím digestátu se uzavírá cyklus mezi produkcí odpadu a jeho opětovným využitím jako živinového zdroje pro rostliny (Riva et al., 2016).
3. **Zvýšení úrodnosti půdy**: Aplikace digestátu zvyšuje biologickou aktivitu v půdě a může přispět ke zlepšení jejích chemických vlastností, jako je pH, obsah organického uhlíku a nutriční hodnota. To vše napomáhá celkovému zdraví a úrodnosti půdního ekosystému (Prudil et al., 2022).

Rizika

1. **Kontaminace těžkými kovy a dalšími látkami**: Jedním z hlavních rizik spojených s využíváním digestátu je potenciální přítomnost těžkých kovů a dalších kontaminantů, které mohou pocházet z použitých surovin pro bioplynové procesy. Pravidelná analýza složení digestátu je nezbytná k zajištění bezpečnosti a kvality aplikovaných hnojiv. Je důležité monitorovat obsah škodlivých látek, které by mohly negativně ovlivnit kvalitu plodin (Badalíková, 2019).
2. **Nízký obsah kvalitní organické hmoty**: Jedním z hlavních nedostatků digestátu je jeho nízký obsah kvalitní organické hmoty, což může mít negativní důsledky pro stabilitu struktury půdy a biologickou aktivitu. Tento nedostatek může v extrémních případech vést k degradaci půdy, a proto se doporučuje kombinovat aplikaci digestátu s dalším zdrojem organické hmoty, jako je hnůj, sláma nebo kompost (Prudil et al., 2022).
3. **Riziko eroze na svažitých pozemcích**: Aplikace digestátu na širokořádkové plodiny na svažitých pozemcích bez podsevu meziplodin může zvýšit riziko vodní eroze. To vede k vyplavování živin a snižování bonity půdy. Implementace půdoochranných technologií, jako je pokrytí půdy vegetací a pěstování meziplodin, může tato rizika minimalizovat (Svoboda et al., 2015).

Výzvy

Aby bylo možné dosáhnout udržitelného využívání digestátu, je nezbytné překonat několik výzev:

1. **Optimalizace aplikačních technik**: Je nutné vyvinout a implementovat techniky, které maximalizují přínosy a minimalizují rizika spojená s aplikací digestátu. To zahrnuje určení optimální doby a způsobu aplikace v závislosti na konkrétních podmínkách (Khanal et al., 2007).
2. **Vzdělávání a osvěta zemědělců**: Je důležité vzdělávat zemědělce o správném využívání digestátu, aby se zajistilo jeho efektivní a bezpečné uplatnění. Osvěta může přispět k lepší informovanosti o potenciálních přínosech a rizicích spojených s tímto hnojivem.
3. **Výzkum a inovace**: Podpora výzkumu a inovací v oblasti využívání digestátu může přispět k jeho efektivnějšímu a bezpečnějšímu použití v zemědělství. Nové technologie a přístupy mohou zlepšit kvalitu digestátu a optimalizovat jeho aplikační strategie.

Celkově lze říci, že udržitelné využívání digestátu přináší významné environmentální přínosy, ale vyžaduje pečlivé řízení a monitorování, aby se minimalizovala rizika a maximalizovaly výhody pro půdní ekosystémy a zemědělskou produkci.

Jaké je optimální dávkování digestátu pro nejlepší výsledky

Stanovení optimální dávky digestátu je klíčovým faktorem pro dosažení maximálních agronomických přínosů a minimalizaci negativních dopadů na půdní ekosystémy a životní prostředí. Výzkumy naznačují, že doporučená dávka se pohybuje kolem 20 t/ha, což se ukazuje jako efektivní pro zajištění vyváženého přísunu živin (Prudil et al., 2022).

Význam správného dávkování

1. **Maximalizace agronomických přínosů**: Správné dávkování digestátu je nezbytné pro dosažení optimálních výnosů a zlepšení kvality pěstovaných plodin. Aplikace v doporučených dávkách zajišťuje přísun živin, které jsou klíčové pro růst rostlin a jejich zdraví a současně zamezuje jejich vyplavování do podzemních či povrchových vod.
2. **Ochrana půdních vlastností**: Výzkumy naznačují, že dodržení doporučené dávky (okolo 20 t/ha) nevede k negativním změnám fyzikálních vlastností půdy, jako je zhutnění. Naopak přispívá k udržení dobré struktury půdy, což je klíčové pro efektivní zadržování vody v půdním profilu (Prudil et al., 2022).
3. **Zlepšení chemických a biologických vlastností**: Aplikace digestátu v doporučených dávkách zlepšuje chemické vlastnosti půdy, jako je pH a obsah organického uhlíku. Biologické aktivity, včetně mikrobiálního společenstva, jsou rovněž podporovány, což přispívá k celkové úrodnosti půdy (Lijó et al., 2015).

Rizika spojená s nadměrným dávkováním

Na druhé straně vysoké dávky digestátu mohou mít negativní dopady, jako například:

1. **Vyplavování živin**: Aplikace nad doporučené množství může vést k nadbytečnému přísunu živin a jejich vyplavování do podzemních vod, což zvyšuje riziko eutrofizace vodních zdrojů a znečištění životního prostředí (Badalíková, 2019).
2. **Zhoršení kvality půdy**: Nadměrné dávkování může vést k úbytku stabilní organické hmoty a degradaci biologické aktivity v půdě, což může mít dlouhodobé negativní důsledky pro zemědělskou produkci (Zhang et al., 2013).

Závěr

Využití digestátu jako hnojiva se ukazuje jako zajímavý doplněk minerálního hnojení. Digestát je často levnější než minerální hnojiva, a tím snižuje celkové náklady na hnojení. Zároveň podporuje recyklaci organických materiálů a snižuje závislost na neobnovitelných zdrojích používaných při výrobě syntetických hnojiv. Aplikace digestátu má prokazatelně pozitivní vliv na fyzikální, chemické a biologické vlastnosti půdy, což může přispět ke zvýšení úrodnosti a zlepšení vodního režimu. Výzkumy ukazují, že digestát zvyšuje obsah živin, zejména fosforu a draslíku, a podporuje rozvoj mikrobiální aktivity v půdě, což má pozitivní dopad na celkové zdraví půdního ekosystému.

Avšak, s těmito výhodami jsou spojena také určitá rizika, včetně obsahu těžkých kovů a sníženého podílu kvalitní organické hmoty. Aby se minimalizovaly negativní dopady na půdní ekosystém, je nezbytné provádět pravidelnou analýzu složení digestátu a optimalizovat aplikační dávky, které by měly být stanoveny na úrovni okolo 20 t/ha. Tím se zajišťuje maximální přínos pro zemědělské plodiny bez narušení fyzikálních vlastností půdy, jako je zhutnění, a zároveň se zlepšují chemické a biologické parametry půdy.

Kromě toho je důležité kombinovat aplikaci digestátu s dalšími zdroji organické hmoty, jako jsou hnůj, sláma nebo kompost, a implementovat půdoochranné technologie, které zahrnují pokryv půdy vegetací a pěstování meziplodin. Tím se zvyšuje stabilita půdní struktury a snižuje riziko eroze, což je klíčové pro zajištění dlouhodobé úrodnosti půdy. Celkově lze konstatovat, že digestát představuje zajímavý a cenný zdroj živin a organické hmoty. Nicméně jeho efektivní využívání vyžaduje systematický a vědecky podložený přístup.

Dedikace
Výsledek vznikl z institucionální podpory MZE-RO1724.

Literatura
Seznam použité literatury je k dispozici u autorů.

Kontaktní údaje
Ing. Jakub Prudil
prudil@vupt.cz
Zemědělský výzkum, spol. s r.o.
Zahradní 1, 664 41 Troubsko

Proč systém BPEJ neodpovídá současnému podnebí

Why the BPEJ system does not fit the current climate

Rožnovský, J.[1,2], Zahradníček P.[1,3]

[1]*Český hydrometeorologický ústav, pobočka Brno, Kroftova 43, 616 67 Brno*

[2]*Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, Valtická 337, 691 44 Lednice*

[3] *Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i., Brno, Česká republika*

Abstrakt

Součástí bonitace zemědělských půd je klimatický region, který vyjadřuje klimatické poměry na našem území, hlavně teplotu vzduchu a srážky a z nich vypočtenou vláhovou jistotu a pravděpodobnost suchých období. Pro charakteristiku klimatických regionů byly použity údaje za období 1901 až 1950 a v mnoha pracích bylo konstatováno, že díky změnám klimatu hodnoty současnému podnebí neodpovídají. Provedli jsme srovnání teploty vzduchu a srážek formou srovnání dvou normálových období, tedy posledního, čtvrtého normálového období 1991 až 2020 ke třetímu 1961 až 1990. Naše analýzy potvrdily trvající postupné zvyšování teploty vzduchu, tím i hodnot teplotních sum. U srážek dochází jen k velmi malému zvýšení úhrnů. Dosažené výsledky potvrzují, že původní hodnoty klimatických regionů již současnému klimatu neodpovídají. Z uvedených důvodů je potřebné provést aktualizaci hodnocení klimatických regionů.

Klíčová slova: normálové období, změna klimatu, teplota vzduchu, srážky

Abstract

Part of the assessment of agricultural land is the climatic region, which expresses the climatic conditions in our territory mainly by air temperature and precipitation and indicators calculated from them. Data for the period 1901 to 1950 were used to characterize the climatic regions, and in many works it was stated that due to climate changes, the values do not correspond to the current climate. We performed a comparison of air temperature and precipitation in the form of a comparison of two normal periods, i.e. the last, fourth normal period from 1991 to 2020 to the third from 1961 to 1990. Our analyzes confirmed the ongoing gradual increase in air temperature, and thus the values of temperature sums. There is only a very small increase in precipitation totals. The achieved results confirm that the original values of the climatic regions no longer correspond to the current climate. For the stated reasons, it is necessary to update the assessment of climatic regions.

Keywords: normal season, climate change, air temperature**,** precipitation

Úvod

Vývoj půd je významně ovlivněn klimatickými podmínkami, zvláště teplotou vzduchu a půdy, dále srážkami v obou formách, tedy kapalnými a pevnými. Jistě, že význam mají všechny klimatické prvky, ovšem jejich hodnocení vzhledem ke klimatu půd není časté. Vliv jednotlivých klimatických prvků či vypočtených charakteristik je součástí různých systémů hodnocení půd. Pro zajištění výnosů zemědělských plodin je nutná znalost zemědělských půd (Rožnovský et al., 2009, 2010). V šedesátých letech minulého století byl proveden komplexní průzkum půd. Šlo o komplexní geneticko-agronomickou klasifikaci zemědělských půd, ze které se vycházelo při sestavení nového bonitačního systému pro hodnocení zemědělských půd. Průzkum se prováděl u zemědělských podniků, Podrobná bonitace (ekonomické ocenění) zemědělských půd, která představuje zjišťování půdní bonity, tj. jednotlivých faktorů, jež půdní bonitu podmiňují, byla zahájena na základě usnesení vlády ČSSR ze dne 12. května 1971 č. 101 (Mašát et al., 1974; Mašát et al. 2002) K vymezení klimatických regionů byla použita data z období 1901 až 1950 (Podnebí ČSSR – Tabulky,1960). Terénní půdoznalecký průzkum

navázal na provedený komplexní průzkum půd a společně s mapováním byl ukončen v roce 1978 (Rožnovský et al. 2023).
V tomto pohledu je nutné posoudit, zda stanovená bonitace hlavně v části klimatického regionu odpovídá současnému klimatu, jehož vývoj je označován jako změna klimatu. Problematika vývoje podnebí na Zemi je předmětem studia mnoha klimatologů a dalších odborníků (Brázdil et al., 2021, 2022). Jejich výsledky jsou však určitými skupinami jiných odborníků zpochybňovány. Jak vyplývá z různých studií, tyto změny jsou příčinou zvyšující se četnosti výskytů extrémních stavů počasí. Probíhající změna klimatu je nejčastěji dokládána zvyšováním teploty vzduchu, hovoříme o tzv. globálním oteplování (Rožnovský, 2019). Možné dopady změn našeho podnebí jsou studovány v širokých souvislostech již od devadesátých let minulého století, jak dokládají mnohé rozsáhlé studie (Brázdil a Rožnovský et al., 1995).
Proměnlivost našeho podnebí je dána geografickou polohou a reliéfem našeho území. Jsme součástí mírného klimatického pásu, ovšem v oblasti přechodného klimatu středoevropského (Kolektiv autorů 1958). Významnou roli sehrávají cirkulační a geografické poměry. V Atlasu podnebí Československa (1958) a Podnebí ČSSR - Tabulky (1960) jsou uvedeny výstupy zpracování za období 1901 až 1950. Agroklimatologická rajonizace pro území Československa vychází z dat druhého normálového období 1931 až 1960 (Kurpelová et al. 1975). Mapy klimatických prvků v Atlasu podnebí Česka (Tolasz et al., 2007) byly vypracovány z meteorologických údajů za období 1961 až 2000. Vidíme, že desetiletí 1951 až 1960 zpracováno není.
Od 80. let 20. století je pozorován významný nárůst teplot vzduchu a to ve všech sezónách s výjimkou podzimu (Střeštík et al., 2014). Jak vyplývá z různých studií, tyto změny jsou příčinou zvyšující se četnosti výskytů extrémních stavů počasí. Z analýz srážkových úhrnů za období od roku 1961 vyplývá, že je jejich roční úhrny nemají statisticky významnou změnu
V podstatě základem klimatologického hodnocení je klimatologický normál, jehož hlavním využitím je eliminovat krátkodobé výkyvy klimatu (Zahradníček et al., 2017). Jednosměrné změny působení klimatických faktorů vedou ke změnám klimatu (Zahradníček et al., 2020, 2022). Pro studium klimatu různých míst je třeba, aby se klimatologické normály vztahovaly ke stejnému období. Podle doporučení Světové meteorologické organizace (WMO) jsou standardní klimatologické normály počítány z třicetiletí 1901–1930, 1931–1960, 1961–1990, atd. (Rožnovský, 2021).

Materiál a metody
Základem hodnocení byla základní mapovací a oceňovací jednotka, tzv. bonitovaná půdně ekologická jednotka (dále jen "BPEJ"). Bonitační mapování bylo dokumentováno jako účelový obsah na Státní mapě odvozené 1:5000. Byla tak vytvořena "Mapa BPEJ 1:5000", na které byly jednotlivé BPEJ zobrazeny jako volné, v přírodě neohraničené isolinie a očíslovány pětimístným číselný kódem, vyjadřujícím hlavní půdní a klimatické podmínky, které mají vliv na produkční schopnost zemědělské půdy a její ekonomické ohodnocení. První číslice kódu značí příslušnost k jednomu z deseti klimatických regionů s označením 0 až 9 (Mašát et al., 1974). Pro naše hodnocení byly dále využity hodnoty teploty vzduchu a úhrnů srážek z klimatologických stanic Českého hydrometeorologického ústavu zpracované do tzv. technické řady zahrnující 268 stanic na území ČR (Štěpánek et al., 2011, 2020. Pro tuto studii našeho podnebí jsme statisticky zpracovali teplotní a srážkovou řadu za období 1961 až 2020 pro třetí normálové období 1961 až 1990 a čtvrté normálové období 1991 až 2020 pro průměry roční a roční období.

Výsledky
Vymezení klimatických regionů v rámci BPEJ bylo provedeno podle těchto hodnot:
- suma průměrných denních teplot rovných nebo vyšších 10°C

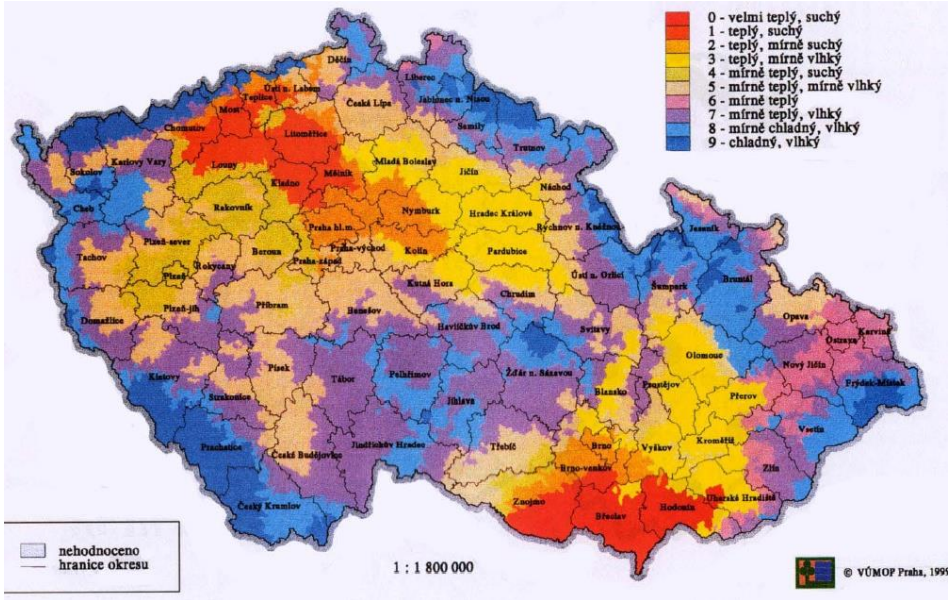
- průměrné roční teploty a průměrné teploty ve vegetačním období (IV. – IX.)
- průměrný úhrn ročních srážek a srážek ve vegetačním období (IV. – IX.)
- pravděpodobnost výskytu suchých vegetačních období v % (IV. – IX.)
- výpočet vláhové jistoty
- výpočet hranice sucha ve vegetačním období a další faktory, nadmořská výška, údaje o známých klimatických singularitách, v neposlední řadě i faktor mezoreliéfu

Vymezení klimatických regionů s příslušnými hodnotami stanovených charakteristik klimatologických regionů uvádí Tab 1, s rozsahy hodnot pro jednotlivé regiony.

Tab. 1 Charakteristika klimatologických regionů

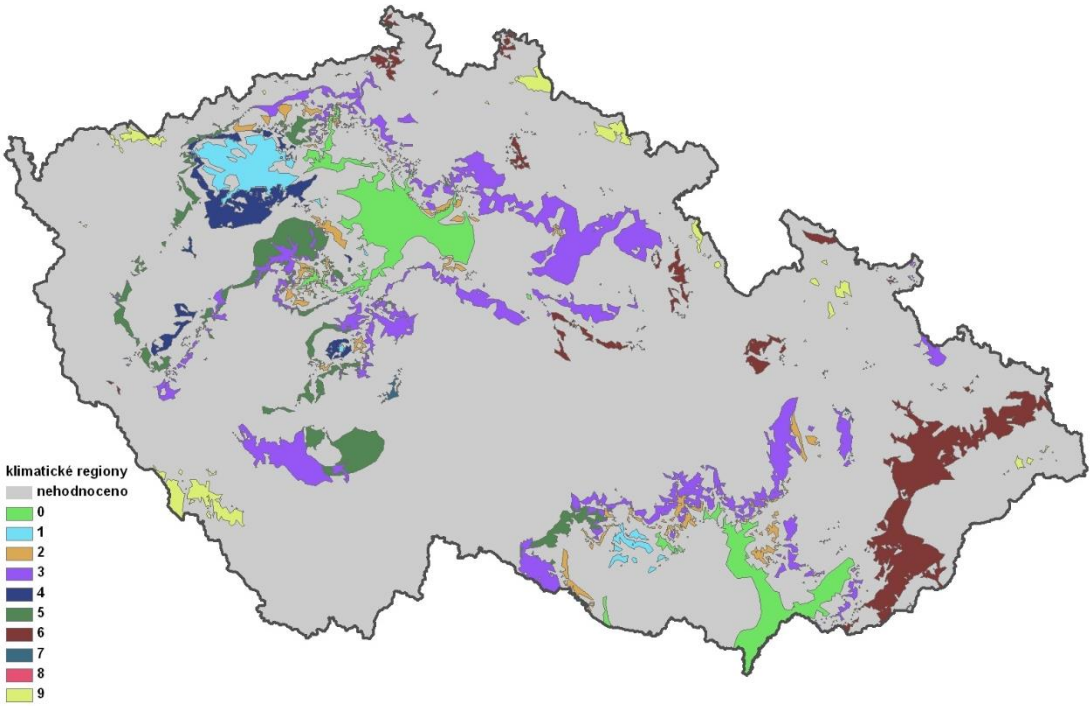
Kód regionu	Symbol regionu	Charakteristika regionu	Suma teplot nad 10 °C	Průměrná roční teplota °C	Průměrný roční úhrn srážek v mm	Pravděpodobnost suchých vegetačních období	Vláhová jistota
0	VT	velmi teplý, suchý	2800 - 3100	9 - 10	500 - 600	30 - 50	0 - 3
1	T 1	teplý, suchý	2600 -2800	8 - 9	< 500	40 - 60	0 - 2
2	T 2	teplý, mírně suchý	2600 - 2800	8 - 9	500 - 600	20 - 30	2 - 4
3	T 3	teplý, mírně vlhký	2500 - 2800	(7) 8 - 9	550 - 650 (700)	10 - 20	4 - 7
4	MT 1	mírně teplý, suchý	2400 - 2600	7 - 8,5	450 - 550	30 - 40	0 - 4
5	MT 2	mírně teplý, mírně vlhký	2200 - 2500	7 - 8	550 - 650 (700)	15 - 30	4 - 10
6	MT 3	mírně teplý (až teplý), vlhký	2500 - 2700	7,5 - 8,5	700 - 900	0 - 10	> 10
7	MT 4	mírně teplý, vlhký	2200 - 2400	6 - 7	650 - 750	5 - 15	> 10
8	MCH	mírně chladný, vlhký	2000 - 2200	5 - 6	700 - 800	0 - 5	> 10
9	CH	chladný, vlhký	< 2000	< 5	> 800	0	> 10

Plošné vyjádření klimatických regionů je na Obr. 1.



Obr, 1 Mapa klimatických regionů (Mašát et al., 1974).

Z analýzy za období 1961 až 2010 (Rožnovský et al. 2011) vyplynulo, že pro hodnocené období nelze zařadit podle původního stanovení klimatických regionů 83 % zemědělských půd, jak vidíme na Obr. 2.



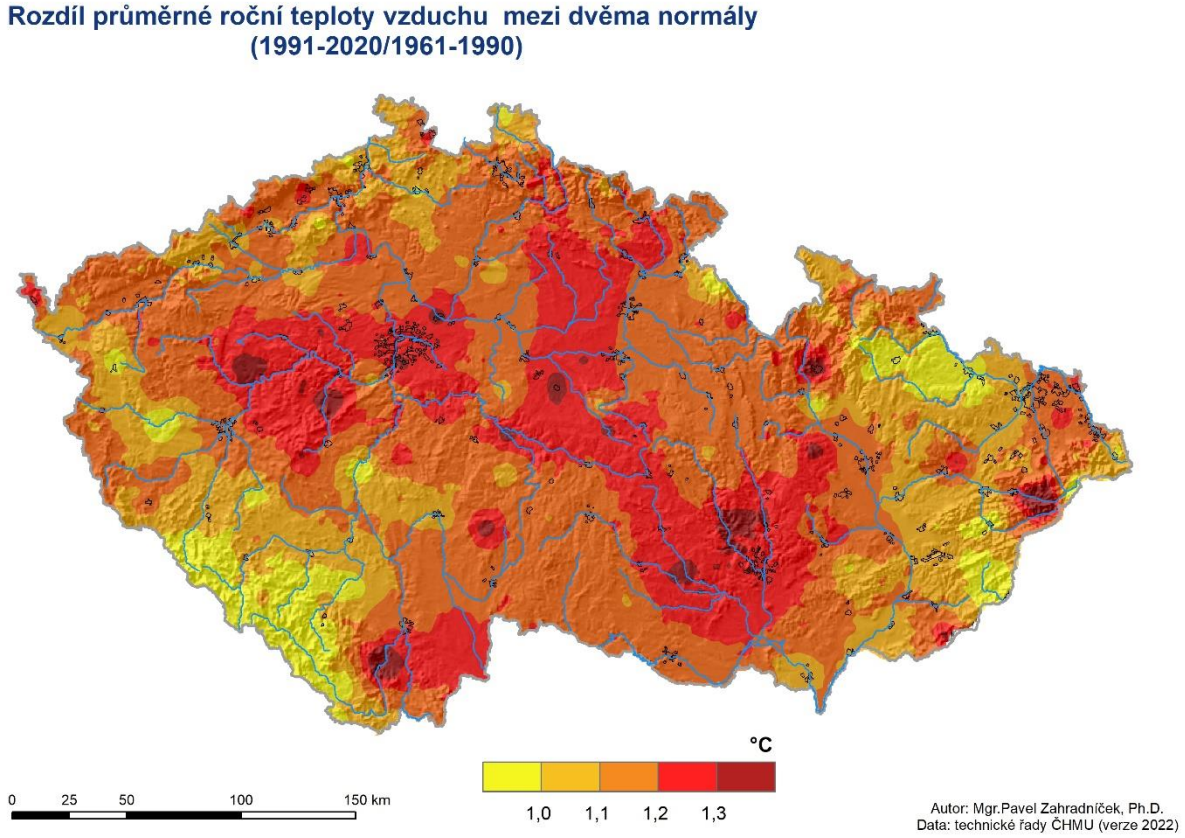
Obr. 2 Mapa klimatických regionů dle metodiky Mašát a kol. (1974, 2002) pro období 1961-2010 (Rožnovský, J. et al., 2011)

Proto jsme provedli hodnocení vývoje podnebí, zvláště teploty vzduchu a srážek na území České republice ve vztahu k bonitaci půdy za posledních 60 let, a to formou porovnání dvou klimatologických normálů. Ten starší je reprezentován roky 1961-1990 a nový obdobím 1991-2020. Jako vstupní data byly použity vybrané časové řady, které prošly kontrolou kvality dat, homogenizací a doplněním všech chybějících hodnot. Takové řady jsou nejvhodnější pro zkoumání dlouhodobých trendů a změn. První verze takových zpracovaných časových řad vznikla na Českém hydrometeorologickém ústavu již v roce 2008 (Štěpánek a kol. 2011a; 2013). V letech 2020-2022 došlo k vytvoření druhé verze, jelikož proces homogenizace je nutné po delším období zopakovat a také jsou použity nové metody (Squinto a kol. 2020). K dispozici je 188 časových řad s teplotou vzduchu a 804 s měřením srážek. Pro tyto časové řady meteorologických stanic byly spočítány dlouhodobé charakteristiky pro obě zkoumané období. Následně byly tyto hodnoty pomocí interpolačních metod (regresní krigging s parametry nadmořské výšky, sklonitosti, drsnosti terénu atd.) převedeny do mapy v rozlišení 500×500 m. Z takto získaných map byly odečteny statistické charakteristiky za celou republiku a také podle nadmořských výšek (po 200 metrech).

Průměrná teplota vzduchu byla 7,2 °C v letech 1961-1990. V posledním třicetiletí stoupla o 1,1 °C na 8,3 °C. Trend teploty vzduchu od roku 1961 je 0,36 °C/10 let (Zahradníček a kol. 2020). Nejrychleji nám teploty rostou v letních měsících a to o 0,47 °C/10 let. Naopak nejmenší změna je na podzim (0,20 °C/10 let). Všechny trendy pro sezóny a roční hodnoty jsou statisticky významné (p=0,05). Vyšší růst je zaznamenán u maximálních teplot vzduchu než u minimálních, ale v obou případech jsou i zde trendy a změny statisticky významné (Brázdil a kol 2022).

Jak lze vidět na Obr. 3, tak prostorové rozdíly změny teploty vzduchu mezi dvěma normály je pouze v řádu několika desetin. Nejmenší změna je v oblasti Šumavy. Naopak největší nárůst teploty vzduchu je na Brněnsku, v Praze a okolí, ve východních Čechách a další lokální místa. V nadmořských výškách do 600 m je změna prakticky stejná a to okolo +1,15 °C (Tab. 2). Nad

touto hranicí se rozdíl zmenšuje a nad 800 m je nárůst teplot vzduchu mezi oběma normály nejmenší (+1,03 °C).



Obr. 3 Rozdíl průměrné teploty vzduchu mezi novějším (1991-2020) a starším (1961-1990) klimatickým normálem.

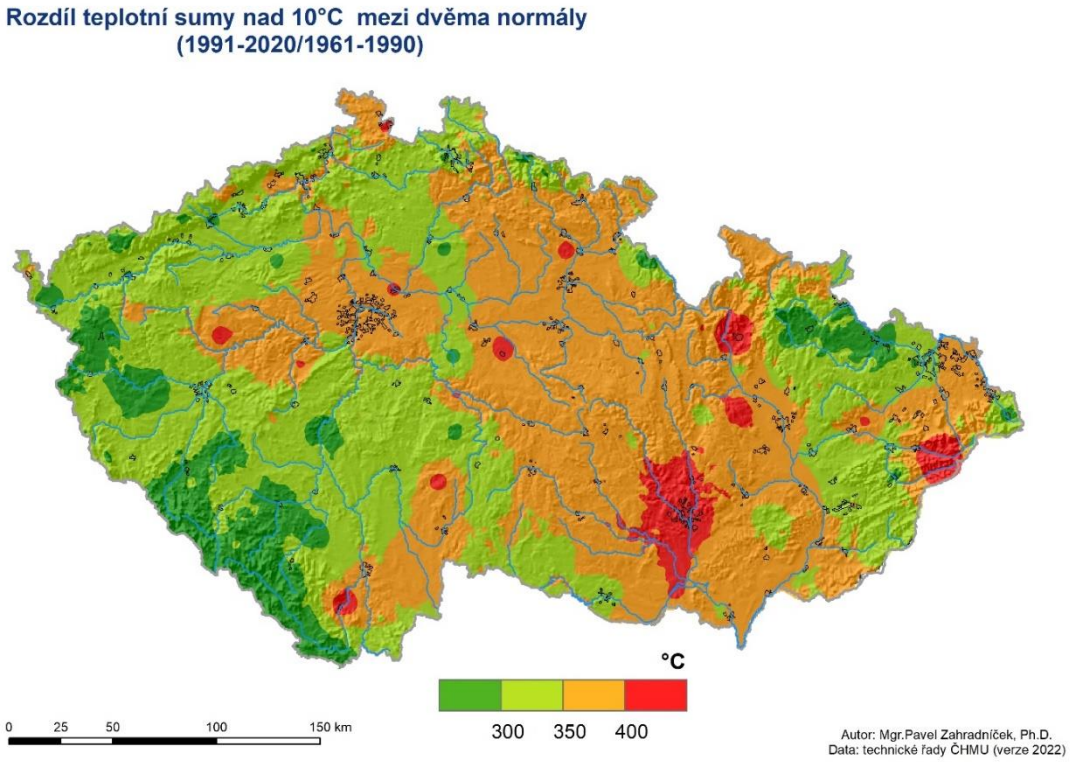
V případě tohoto hodnocení je důležitá suma průměrných denních teplot vzduchu nad 10 °C. Ty většinou nastávají ve vegetačním období. V letech 1961-1990 byla průměrná suma za celou republiku 2270,1 °C. V letech 1991-2020 došlo k nárůstu o 346,6 °C, což činí změnu +15,3 %. K nejvyššímu nárůstu této sumy teplot nad 10 °C došlo na Brněnsku (Obr. 4). Dále také se tyto sumy navýšily více v západní polovině Moravy a ve východních Čechách. Naopak na většině území Čech, s výjimkou Prahy a okolí, je nárůst teplotních sum menší. Opět na Šumavě rostly tyto sumy nejpomaleji. S růstem nadmořské výšky logicky velikost změny teplotní sumy klesá. Nejvyšší kladná změna teplotní sumy je v nadmořských výškách do 200 m n. m. a je o 20 % vyšší než na horách (nad 800 m).

Srážky ve střední Evropě jsou velmi proměnlivé a to jak časově, tak i prostorově. Převažuje velká variabilita střídání sušších a vlhčích epizod, které potlačují dlouhodobé trendy. Statisticky nevýznamně rostou roční sumy srážek a z jednotlivých sezón pak v zimě, létě a na podzim. Naopak mírný pokles je zaznamenán na jaře. Pokud jsou tyto změny analyzovány mimo standardní sezóny, ale jen ve vegetačním období, tak změny začínají být významné.

V období duben až červen dochází ke statisticky významnému poklesu srážek. Naopak v období červen až září dochází k jejímu nárůstu a to hlavně skrz intenzivní srážky nad 10 mm za den (Brázdil et al. 2022).

V letech 1961-1990 byl průměrný roční úhrn srážek 668,1 mm. V posledním třicetiletí byl tento průměr o skoro 14 mm vyšší (+2,1 %; 682,0 mm). I když jde o velmi malou změnu, tak je nutné brát v potaz, že v posledním třicetiletí byla značná variabilita úhrnů a i extrémních situací. Střídaly se zde období sucha (např. 1992-1994, 2003, 2011-2012, 2015-2020) a povodní (např.

1997, 2002, 2013). To se projevilo i v dekádních průměrech, kdy období 2001-2010 bylo srážkově výrazně nadprůměrné a naopak v období 2011-2020 převládal srážkový deficit.

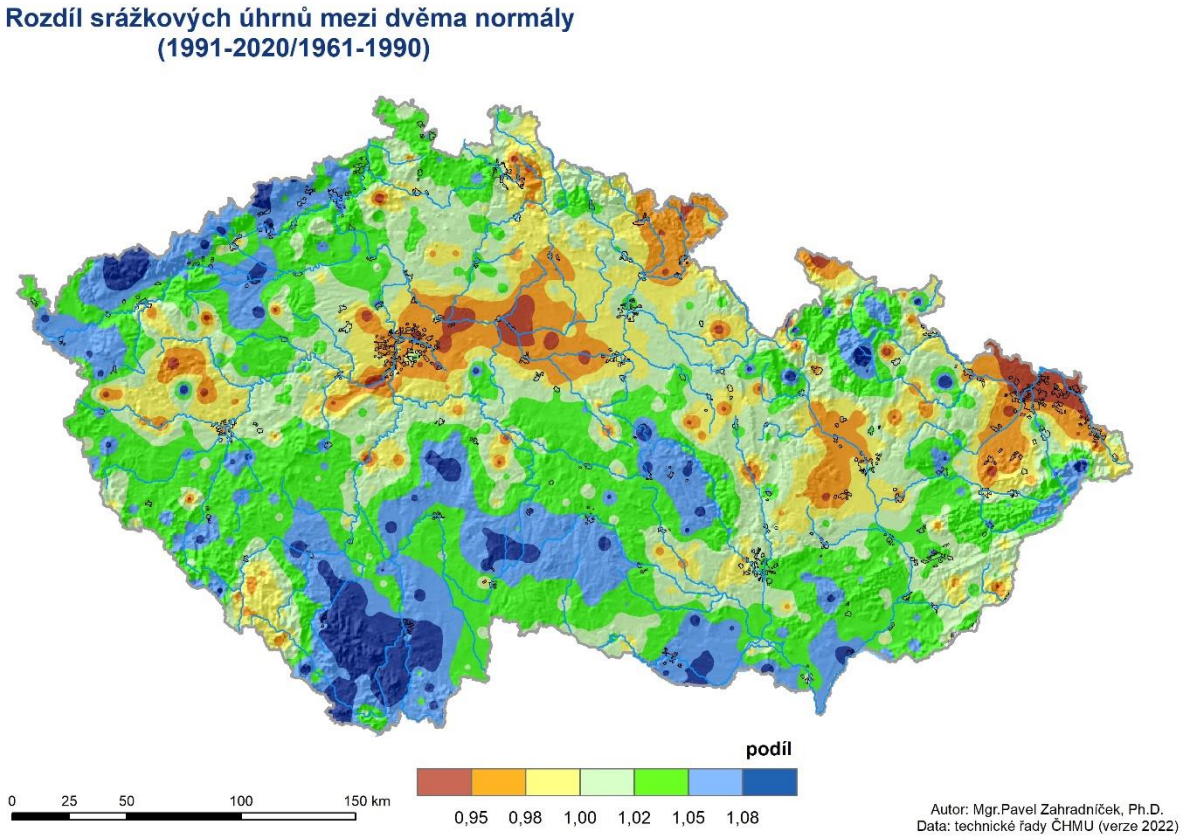


Obr. 4 Rozdíl teplotní sumy mezi novějším (1991-2020) a starším (1961-1990) klimatickým normálem.

Jak lze vidět na Obr. 5, tak většina území má zanedbatelnou změnu v množství srážek (+/- 2 %). Celkově ale spíše převládá území s dílčím nárůstem srážkových úhrnů. Nejpatrnější je to na území jižních Čech, konkrétně v okolí Českého Krumlova, Českých Budějovic, Strakonic a Prachatic. Naopak na horním a středním toku Labe převažují místa s poklesem ročních úhrnů srážek. Nejmenší změna v množství srážek je v nadmořských výškách mezi 201-400 m n. m. Naopak v středních a vyšších polohách (nad 600 m) je nárůst o 3,9 %.

Tabulka 2 Rozdíl průměrné teploty vzduchu (TAVG), ročního srážkového úhrnu (SRA) a sumy průměrné teploty vzduchu nad 10 °C (TSUM10) mezi normály 1991-2020 a 1961-1990 v České republice podle kategorií nadmořských výšek

nad. výška	TAVG	SRA	TSUM10
do 200 m	1,15	101,5	363,4
201-400	1,16	100,7	357
401-600	1,15	102,7	343,2
601-800	1,12	103,9	335,8
nad 800 m	1,03	103,9	302,1



Obr. 5. Rozdíl (podíl) průměrných ročních úhrnů srážek mezi novějším (1991-2020) a starším (1961-1990) klimatickým normálem.

Závěr

Z našich výsledků jednoznačně vyplývá, že pokračuje zvyšování teploty vzduchu a poslední normálové období 1991 až 2020 má vyšší teploty vzduchu v rozmezí 1 až 1,4 °C vyšší než třetí normálové období 1961 až 1990. Tím je logicky dáno, že se zvyšují hodnoty teplotní sumy TSUM 10, a to od 250 do 450 °C. Úhrny srážek rostou až na výjimky do 5 %. I když v našem zpracování nebyly hodnoceny použité charakteristiky vláhových poměrů, je možné uvést, že se jejich hodnoty budou měnit ve smyslu nárůstů období s výskytem sucha.

Jestliže za období 1961 až 2010 bylo jednoznačně klasifikováno 7 procent území s klimatickými regiony v původních hodnotách, potom je naprosto logické konstatování, že i toto malé procento v období do roku 2020 pokleslo. Současné podnebí na našem území je od období 1901 až 1950 tak odlišné, že je nutné aktualizovat hodnocení klimatických regionů v rámci BPEJ. Možná aktualizace může být vedena změnou hodnot v rámci současných regionů, ale také celkovou změnou jejich vymezení.

Poděkování

Článek je součástí výstupů z řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, QK1920280 „Inovace bonitačního systému zemědělských půd (BPEJ) pro potřeby státní správy“.

Literatura

BRÁZDIL, R.; ZAHRADNÍČEK, P.; DOBROVOLNÝ, P.; ŘEHOŘ, J.; TRNKA, M.; LHOTKA, O.; ŠTĚPÁNEK, P. Circulation and Climate Variability in the Czech Republic between 1961 and 2020: A Comparison of Changes for Two Normal Periods. . Atmosphere 13(1): Article number 137, 2022

KOLEKTIV AUTORŮ (1958): Atlas podnebí Československé republiky. Ústřední správa geodézie a kartografie, Praha.

KOLEKTIV: Podnebí ČSSR - Tabulky. HMÚ Praha 1961, 379 s.

KURPELOVÁ M., COUFAL L., ČULÍK, J. (1975): Agroklimatické podmienky ČSSR. Bratislava, Príroda, 270 s.

MAŠÁT A KOL. (1974): Metodika vymezování a mapování bonitovaných půdně ekologických jednotek, 2. vydání, ČAZ – Ústav pro zemědělský průzkum půd Praha,).

MAŠÁT, K. A KOL. (2002): Metodika vymezování a mapování bonitovaných půdně ekologických jednotek. 3. přepracované vydání. VÚMOP Praha,. 113 s. ISBN 80-238-9095-6.

ROŽNOVSKÝ, J. ET AL. 2011 Hodnocení půd z hlediska jejich produkčních a mimoprodukčních funkcí
s dopady na plošnou a kvalitativní ochranu půd České republiky. Český hydrometeorologický ústav, Brno. 36 s.

ROŽNOVSKÝ, J., FUKALOVÁ, P., CHUCHMA, F., STŘEDA T.: Dynamika podnebí jižní Moravy ve vztahu k vymezení klimatických regionů. In *Rožnovský, J., Litschmann, T. (ed): „Voda v krajině", Lednice 31.5. – 1.6.2010,* CD- ROM, 2010. ISBN 978-80-86690-79-7

ROŽNOVSKÝ, J., FUKALOVÁ, P., CHUCHMA, F., STŘEDA T., (2010), Dynamika podnebí jižní Moravy ve vztahu k vymezení klimatických regionů. In *Rožnovský, J., Litschmann, T. (ed): „Voda v krajině", Lednice 31.5. – 1.6.2010.* s. 55-64. ISBN 978-80-86690-79-7

SQUINTU, A. A.; VAN DER SCHRIER, G.; ŠTĚPÁNEK, P.; ZAHRADNÍČEK, P. Comparison of homogenizationmethods for daily temperature series against an observation-based benchmark dataset. Theoretical and Applied Climatology 2020(140): 285-301, 2020

STŘEDOVÁ, H., STŘEDA, T., ROŽNOVSKÝ, J., (2011), Dlouhodobá teplotní charakteristika půdy na lokalitě Kroměříž. [CD-ROM]. In Půda v 21. století: hodnocení a oceňování zemědělského půdního fondu v podmínkách užití a ochrany přírodních zdrojů. s. 207--214. ISBN 978-80-86671-85-7.

ŠTĚPÁNEK, P., ZAHRADNÍČEK, P, BRÁZDIL, R, TOLASZ, R. (2011) Metodologie kontroly a homogenizace časových řad v klimatologii (Methodology of Data Quality Control and Homogenization of Time Series in Climatology). Český hydrometeorologický ústav, Praha

TOLASZ et al. (2007): Atlas podnebí Česka. Český hydrometeorologický ústav, Univerzita Palackého v Olomouci, 255 s. ISBN 978-80-86690-26-1 (CHMI), 978-80-244-1626-7 (UP).

ZAHRADNÍČEK, P., J. ROŽNOVSKÝ, P. ŠTĚPÁNEK a F. CHUCHMA, 2017. Výskyt silných mrazů koncem měsíce dubna 2016 s ohledem na škody způsobené v ovocnářství. In: *Mrazy a jejich dopady – sborník abstraktů z mezinárodní konference, Hrubá Voda 26.–27. 4. 2017.* Praha: Český hydrometeorologický ústav, 2017. ISBN 978-80-87577-69-1.

ZAHRADNÍČEK, P.; BRÁZDIL, R.; ŘEHOŘ, J.; LHOTKA, O.; DOBROVOLNÝ, P.; ŠTĚPÁNEK, P.; TRNKA, M. Temperature extremes and circulation types in the Czech Republic, 1961–2020 . International Journal of Climatology 42(1): 1-22, Article number 1, 2022

ZAHRADNÍČEK, P.; BRÁZDIL, R.; ŠTĚPÁNEK, P.; TRNKA, M. Reflections of global warming in trends of temperature characteristics in the Czech Republic, 1961–2019. International Journal of Climatology 2020: 1-19, 2020

Kontakt:

RNDr. Ing. Jaroslav Rožnovský, CSc.
Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin, zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně, Valtická 337, 691 44 Lednice
mobil: 724 185 617
roznov@mendelu.cz

Posouzení vlivu modifikované agrotechniky na pěstování jarní a ozimé formy máku

Assessment of the influence of modified agricultural techniques on the cultivation of spring and winter forms of poppy

Rychlá A.[2], Plachká E.[1], Šafář J.[3]

[1]OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.; [2]OSEVA PRO s.r.o., Agritec Plant Research s.r.o.

Abstrakt

Moderní zemědělství musí reagovat na změny klimatu revizí pěstitelských postupů. Práce se zabývá srovnáním rizikovosti pěstování jarních a ozimých forem máku a hledáním nových agrotechnických postupů, které by stabilizovaly produkci této citlivé plodiny. Bylo testováno celkem 176 genotypů a související polní testy byly zaměřeny na termíny a hustotu setí ozimého máku.

Klíčová slova: technologie, termín výsevu, výnos

Abstract

Modern agriculture must respond to climate change by revising cultivation practices. The thesis deals with the comparison of the riskiness of growing spring and winter forms of poppy and the search for new agrotechnical procedures that would stabilize the production of this sensitive crop. A total of 176 genotypes were tested and the related field tests focused on the sowing dates and density of winter poppy.

Keywords: technology, sowing date, yield

Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je maloobjemovou plodinou, jejíž potravinářské využití je silně vázáno na slovanskou kulturu střední Evropy. K tomuto účelu se pěstuje tzv. mák semenný (olejný), který poskytuje kvalitní modrá (ale i bílá, okrová) semena s olejnatostí kolem 40 % a u něhož je obsah alkaloidů v makovině nižší než 1 % (Vašák, 2010). Mák jako potravina dominuje především u nás v České republice, kde se průměrná roční spotřeba na obyvatele pohybuje kolem 0,4 kg. Současně je ČR největším exportérem v EU, vyváží až 25 000 t, což odpovídá 38 % vývozu celé Unie. Každoročně je oseto přes 40 000 ha ploch a podaří se sklidit kolem 30 000 t semen (ČSU, Eurostat, on line).

Mák je ale také pěstebně velmi náročnou plodinou, citlivou na stres, což se odráží především ve výnosu. Ani cíleným šlechtěním, které u nás započalo již kolem roku 1928 (odrůda Azur) (Holubec, 2017), nebylo u moderních odrůd dosaženo tak vysokého nárůstu výnosu, jaký je zřejmý u jiných olejnin (řepka olejka). Mák citlivě reaguje na řadu abiotických i biotických faktorů, z nichž nejdůležitějším je sucho, případně nadměrné mokro, v raných etapách vývoje, dále pak riziko polehnutí porostů, napadení houbovými patogeny, či poškození škůdci.

Změna klimatu, reprezentovaná v našich podmínkách zejména častějším výskytem extrémních projevů počasí, výrazně zvyšuje rizika s pěstováním máku spojená. V posledních letech převažují teplé, na srážky chudé zimy, které nárazovitě přecházejí do velmi teplého a většinou také suchého jara. Zakládat v tomto období klasické porosty jarních odrůd máku začíná být velmi riskantní. Maková semena jsou velmi drobná (HTS okolo 0,5 g) a klíčí relativně pomalu. Připravit a udržet v tomto období optimální podmínky pro vzejití je nadmíru důležité (Havel, 2018). V případě neúspěchu nemá pěstitel možnost žádného dalšího opravného kroku, protože mák setý výrazně reaguje na délku dne a pozdější termín výsevu se rapidně podepíše na poklesu výnosu. Nabízejí se však dvě možnosti řešení. První z nich je použití ozimých forem máku, které jsou standardně vysévány na podzim (první dekáda září). Tato možnost však není mezi pěstiteli příliš rozšířená, v ČR se ročně ozimou formou oseje pouze kolem 2 000 až 3 000 ha

(Zehnálek, 2023).
Negativní zkušenosti pěstitelů vycházejí především z faktu, že i ozimý mák může být mrazem poškozen, odrůdy špatně reagují na velmi silné holomrazy a rychlé střídání teplot v předjaří. S ohledem na nadprůměrné teploty během zimního období se však toto riziko výrazně snížilo, a to především pro určité zemědělské výrobní oblasti.
Druhou alternativou řešení problému je výběr a použití genotypů jarních odrůd, které ale budou pěstovány technologií pro ozimé formy, tedy s výsevem na podzim. Existuje předpoklad, že v kolekci geneticky rozdílných materiálů bude možné vytipovat genotypy s dobrou reakcí na prodloužení vegetační doby, materiály odolné ke stresu v zimním období a s pomalejším startem vegetace v brzkém jaře. Takové odrůdy by mohly úspěšně doplnit portfolium ozimých materiálů a v důsledku přinést pěstiteli vyšší výnos.

Materiál a metody
Na pracovišti firem OSEVA PRO s.r.o., Výzkumný ústav olejnin Opava a OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. souběžně probíhaly testy vybraných genotypů jarních a ozimých máků s cílem porovnat reakci na rozdílné technologické postupy pěstování. Sledovaná pokusná lokalita leží jižně od Opavy. Jedná se o řepařskou výrobní oblast s nadmořskou výškou 267 m n.m. Dlouhodobá roční hodnota průměrné denní teploty je 8,94 °C a suma ročních srážek 568,4 mm (1991-2020). Pokusy byly rozděleny do dvou aktivit. Vliv termínu setí a výsevku byl v ročníku 2023/2024 založen v chladné oblasti na lokalitě Šumperk. Jedná se o bramborářskou výrobní oblast s nadmořskou výškou 330 m n.m. Dlouhodobá roční hodnota průměrné denní teploty činí 7,27 °C a suma ročních srážek 702,2 mm.
První se týkala studia reakce genotypů (jarních i ozimých forem) na zvolený termín výsevu (podzim a jaro) v kontextu s dosaženým výnosem semen a makoviny. Do pokusu bylo zařazeno celkem 176 materiálů z řádné a pracovní kolekce Národního programu konzervace. Pokus byl realizován v letech 2022 až 2024. Testované položky byly vysévány maloparcelním secím strojem Haldrup do parcel o konečné výměře 3,38 m² (1,125 m x 3 m), šířka řádků 12,5 cm. V rámci stejného honu byly genotypy vysety v termínu podzimním (první dekáda září) a termínu jarním (konec března). Pokusy byly standardně ošetřovány herbicidy a insekticidy, fungicidní ošetření bylo vyloučeno. Během vegetace byla realizována hodnocení odolnosti k vybraným biotickým a abiotickým stresům (poléhání, napadení původci plísně máku a helmintosporiózy (*Grivellia papaververacea*) a to za použití platných klasifikátorů NP (Holubec, on line). V plné technické zralosti bylo ručně odebráno 30 primárních makovic z genotypu. Ty byly odsemeněny a byl hmotnostně stanoven výnos semen z makovic a hmotnost makoviny. Byl vyjádřen poměr mezi dosaženým výnosem technologií podzimního a jarního výsevu.
Aktivita 2 byla zaměřena na optimalizaci termínu a hustoty setí pro ozimé formy máku setého. Jednalo se se o standardní maloparcelní polní test, sklizňová velikost parcel 10 m^2. Pracovali jsme s odrůdou OLAF. V prvním roce hodnocení bylo založeno 6 variant ve třech opakováních. V časném termínu setí S00 (31. 8. 2022) byly hodnoceny dvě úrovně výsevku - 1,0 a 1,2 kg/ha, v pozdním termínu setí S23 (23. 9. 2022) čtyři výsevky - 0,8; 0,9; 1,0 a 1,2 kg/ha. Na základě výsledků v prvním roce a diskusi s pěstiteli byl test nastaven v následujícím ročníku 2023/2024 nově. V Opavě bylo založeno celkem 9 variant ve 4 opakováních. Jednalo se o tři termíny setí (2.9.2023, 12.9.2023 a 21. 9.2023) a tři úrovně výsevku 1,2; 1,4 a 1,8 kg/ha. Pro termíny setí byly zvoleny kódy, kdy S00 byl první termín setí a termíny S10, S13, S19, S23 vyjadřovaly odstup od termínu setí S00 ve dnech. V obou letech byl pokus na jaře ve fázi prodlužovacího růstu plošně přihnojen dusíkem v dávce 30 kg N č.ž./ha. V období setí a vzcházení (v srpnu až říjnu) byl sledován průběh počasí: teploty a srážky. V ročníku 2023/2024 byly pokusy rozšířeny o lokalitu Šumperku. Jedná se o chladnou oblast, nadmořská výška 322 m. Lokalita spadá do bramborářské výrobní oblasti, průměrná roční teplota činí 7,27 °C a průměrný roční úhrn srážek

702,2 mm. Termíny setí byly dva S00 7.9.2023 a S13 20.9.2023.
Ošetření herbicidy a insekticidy byla prováděna plošně dle výskytu škodlivých organismů včetně plevelů. Bylo pracováno s registrovanými přípravky v povolených dávkách. Termíny sklizně jsou uvedeny v tabulkách 4, 5 a 7. Pokusy byly sklizeny pomocí maloparcelního sklízecího stroje Haldrup (OP) a Wintersteiger (ŠU). Výnos byl přepočten na standardní vlhkost 8 %. Zdrojem meteorologických dat byl ČHMÚ, meteorologické stanice Opava a Šumperk. Pro statistické vyhodnocení byl použit výpočet ANOVA.

Výsledky
V letech 2022 až 2024 bylo testováno 176 genotypů jarních a ozimých forem máku setého. Byl stanoven výnos semen a makoviny 30 primárních makovic při použití dvou odlišných technologií – setí na podzim a na jaře. V následující tabulce jsou uvedena meteodata pro lokalitu Opava v letech 2022-2024. Je patrné, že zimní období byla nadprůměrně teplá a srážkově podprůměrná, vyjma roku 2024, kdy vláhový deficit sanoval především měsíc listopad.

Tabulka 1: Porovnání průměrných měsíčních hodnot (teplota, srážky) s dlouhodobým normálem (lokalita Opava)

Průměrná měsíční teplota – odchylka od dlouhodobého normálu [°C]			
	2021-2022	**2022-2023**	**2023-2024**
listopad	0,94	0,62	0,47
prosinec	0,65	0,53	2,53
leden	2,59	4,72	0,73
únor	3,90	2,51	6,68
březen	-0,50	2,06	4,47

Měsíční srážky – podíl k dlouhodobému normálu [%]			
	2021-2022	**2022-2023**	**2023-2024**
listopad	117,5	47,5	177,4
prosinec	77,1	156,5	136,1
leden	68,7	146,2	95,8
únor	59,7	52,2	133,9
březen	125,5	49,0	88,5

V kolekci 176 genových zdrojů byly v převaze zastoupeny jarní materiály. Pouze 5 genotypů bylo ozimé formy. Tento nepoměr byl dán dlouhodobým zaměřením šlechtění na dominantní odrůdy jarního charakteru. Historicky se na ozimé formy více zaměřilo pouze rakouské šlechtění (odrůdy Titan, Zeno, Oz atd.). V rámci ČR však již byla registrována první domácí odrůda ozimého máku Olaf. Na Slovensku již byla registrována první česká odrůda ozimého máku Olaf (2023).
Díky příznivým podmínkám během zimního období a rychlému nástupu jara bez silnějších mrazů přezimovaly testované materiály máků velmi uspokojivě. V celé kolekci byl hodnocen pouze jeden genotyp, který i přes zkracující se den pokračoval ve vegetaci a přešel již na podzim do generativní fáze (Skorý sivý). V důsledku toho došlo k jeho vymrznutí a nebyl hodnocen. U ostatních genotypů bylo pozorováno pouze ojedinělé, slabší poškození mrazem, a to u jednotlivých rostlin. Genotypy ozimé i jarní formy ukončily vegetaci na podzim spolu s ochlazením a zimu přečkaly ve fázi plně vyvinuté listové růžice. Jarní odrůdy však měly růžici vzpřímenou, listy světle zelené, na rozdíl od ozimých odrůd se sytě modrofialovou barvou a rozloženou růžicí. Setí materiálů jarních na podzim zvýšilo jejich poškození plísní máku, a to již ve fázi listové růžice. Jarní odrůdy, seté na podzim, dosáhly robustnější stavby těla, byly vyšší, stonky silnější, rostliny dříve nakvétaly a dozrávaly v porovnání s materiály vysetými na jaře. Výnos makoviny díky tomu byl vyšší, stejně tak i výnos semen z makovice. Pouze u malého podílu genotypů byla pozorována výnosová deprese související se změnou termínu setí. Míra zvýšení produkce byla silně vázána na genotypy. Byly pozorovány materiály, které zvýšily výnos 3 až 5 x. Zde však hrála významnou roli i korelace s poškozením rostlin

houbovými chorobami. Zatímco u materiálů setých na podzim byl nástup jarních chorob (*Gr. papaververacea*) pozorován v pozdějších vývojových fázích, a tedy s menším dopadem na produkci, jarně seté genotypy byly poškozovány dříve a někdy až zásadně (rok 2024). V Tabulce 2 jsou uvedeny počty genotypů s pozitivní i negativní odezvou na změnu termínu setí a nejvyšší dosažené navýšení výnosu.

Tabulka 2: Porovnání dosažených výnosů semen a makoviny v souvislosti s termínem setí

	2021–2022	2022–2023	2023–2024
Počet GZ s poklesem výnosu semen při použití podzimním výsevu	38	62	5
Počet GZ se zvýšeným výnosem semen při použití podzimním výnosu	138	114	171
Počet GZ s poklesem výnosu makoviny při použití podzimním výsevu	2	22	33
Počet GZ se zvýšeným výnosem makoviny při použití podzimním výnosu	174	154	143
Nejvyšší dosažené navýšení výnosu semen v %	346,29	318,50	563,00
Nejvyšší dosažené navýšení výnosu makoviny v %	645,45	344,91	257,87

Z testovaných materiálů byla vytvořena core kolekce praxí využívaných odrůd. V Tabulce 3 je uveden podíl výnosu semen z podzimního a jarního zásevu pro tento výběr. Barevně označené materiály reprezentují odrůdy ozimé formy. Z výsledků je patrné, že tyto položky stabilně poskytovaly vyšší výnos semen při podzimním zásevu, ve srovnání s výsevem na jaře.

Tabulka 3: Podíl výnosu semen při podzimním a jarním termínu setí [%]

ECN	název	2021–2022	2022–2023	2023–2024
15O08	Leila	285,37	202,99	177,70
15O08	Mieszko	89,35	122,62	459,93
15O08	Josef	184,97	157,96	405,05
15O08	MS Harlekýn	151,21	73,78	295,43
15O08	MS Diamant	99,03	143,23	203,60
15O0800148	Gerlach	157,37	83,14	397,41
15O0800169	Opal	159,40	148,80	121,36
15O0800171	Florian	124,03	150,27	109,20
15O0800173	Kosmosz	198,47	305,43	153,25
15O0800174	Zeno	215,60	300,93	237,34
15O0800179	Sokol	260,02	142,57	199,38
15O0800181	Maraton	200,05	140,24	204,92
15O0800182	Major	232,10	156,42	191,04
15O0800187	Orel	108,95	77,99	194,32
15O0800188	Racek	171,36	221,71	164,49

ECN	název	2021–2022	2022–2023	2023–2024
15O0800198	Ametiszt	211,73	318,50	371,69
15O0800199	Aristo	238,83	51,29	251,97
15O0800200	Agat	175,26	139,13	220,03
15O0800201	Rubin	197,87	180,04	237,65
15O0800204	Orbis	134,19	169,81	259,87
15O0800205	Aplaus	125,41	212,79	125,93

Vliv termínu setí a výsevku na výnos

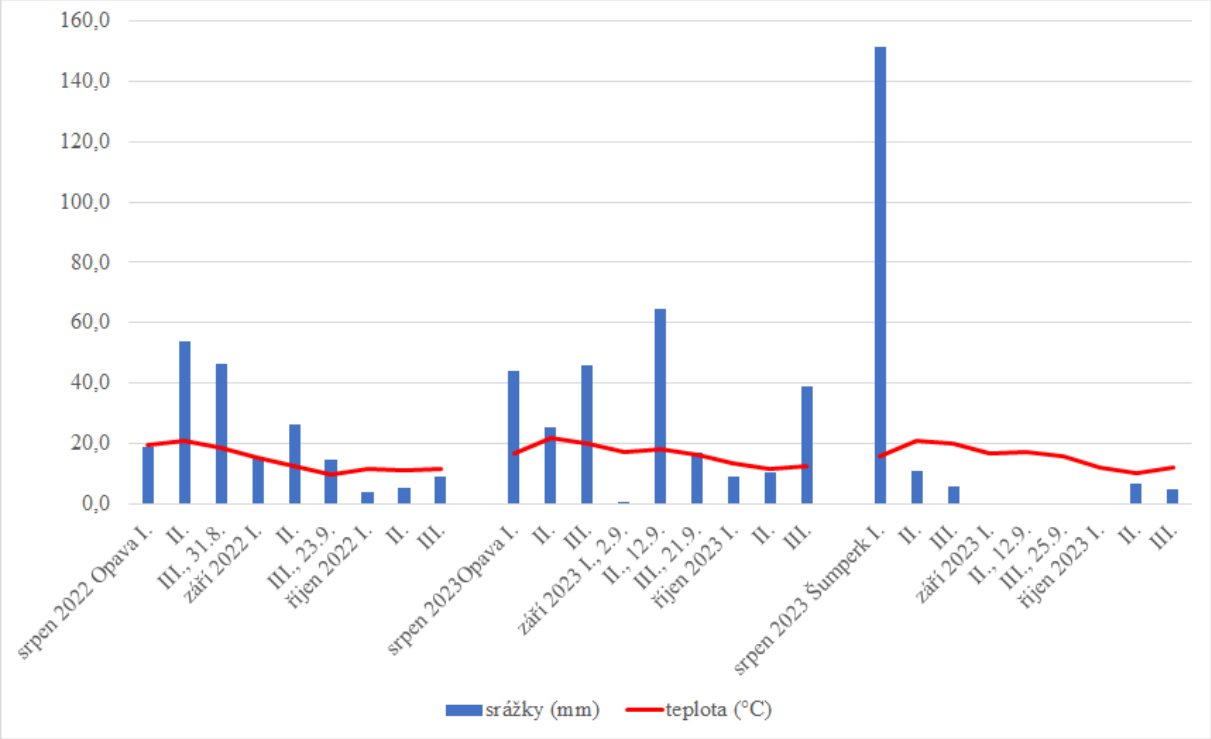
V ročníku 2022/2023 byly sledovány 2 termíny setí (S00, S23). Po zasetí v S00 (31.8.) bylo rozložení srážek v září rovnoměrné. V teplotách nedocházelo k výrazným výkyvům, v říjnu byly stabilní a pohybovaly se mezi 11,52 až 13,52 °C (Graf 1). Půda měla jemně hrudkovitou strukturu a byla na povrchu i pod povrchem vlhká. Porost setý v tomto termínu vzešel do 10 dní bez ztrát rostlin, byl vyrovnaný a hustý, a to bez ohledu na výsevek 1,0 či 1,2 kg osiva na hektar. V S23 (23.9.) byla půda pod povrchem vlhká, na povrchu suchá, hrudovitá. Porost začal vzcházet do 15 dní, v hustotě porostu se odrážela výše výsevku. V listopadu byly rostliny seté v S00 i S23 vitální, bez projevů deprese. V únoru 2023 bylo u termínu setí S00 pozorováno vytahování a žloutnutí rostlin. Porost byl přehoustlý a rostliny si navzájem konkurovaly. V S23 nebyly tyto příznaky pozorovány. Nižší vitalita rostlin setých v S00 byla pozorována až do sklizně a projevila se snížením výšky porostu a výnosů. Průměrný výnos v S00 byl 0,61 t/ha a v S23 1,13 t/ha. V hodnocení vlivu výsevku bylo dosaženo vyšších výnosů u termínu setí S23 a výsevků 1,2; 0,8; 0,9 a 1,0 kg/ha (řazeno vzestupně). Byly zaznamenány signifikantní rozdíly. Výsledky včetně termínů setí a sklizně jsou uvedeny v Tabulce 4.

V ročníku 2023/2024 byly sledovány tři termíny setí (S00, S10, S19) a to na počátku jednotlivých dekád září. Po prvním zásevu 2.9. (S00) přišlo období beze srážek, mák pomalu vzcházel. Po zásevu S12 (12.9.) a S19 (21.9.) byly zaznamenány vysoké úhrny jednodenních srážek, a to 47,6 mm 13.9., 14,6 mm 18.9. a 12,4 mm 22.9. (Graf 1). Nedostatek půdní vláhy po zasetí v S00 byly příčinou opožděného vzcházení. Konečná velikost rostlin před zimou bez ohledu na termín setí byla téměř vyrovnaná. Uvedené mělo dopad i do výnosů. Nebyly zaznamenány takové rozdíly jako v předchozí sezóně. Byly zjištěny vyšší výnosy u pozdnějších termínů setí S10 a S19 a výsevku 1,2 kg/ha. Pozorované rozdíly mezi variantami ale nebyly signifikantní. Výsledky včetně termínů setí a sklizně jsou uvedeny v Tabulce 4.

Výsledky pro každý vegetační rok byly vyhodnoceny zvlášť (Tabulka 4 a 5) a to s ohledem na rozdíly v termínech setí a výsevcích. Dvouletý průměr výnosů bylo možné posoudit pouze u termínů setí na přelomu srpna a září (S00) a termínů setí o cca 20 dní později (S19, S23) a výsevku 1,2 kg/ha. I v tomto dvouletém průměru byla potvrzena tendence dosahování vyšších výnosů u termínů setí okolo 20. září (Tabulka 6). Rozdíly byly signifikantní. Je nutné zdůraznit, že listopad až březen byly v obou sledovaných ročnících 2022/2023 a 2023/2024 teplotně nad dlouhodobými průměry (Tabulka 1) a rostliny máku vytvořily před nástupem zimy listové růžice o 8 a více pravých listech.

V ročníku 2023/2024 byl založen maloparcelní pokus o 4 variantách ve 4 opakováních také na lokalitě Šumperk. Byly sledovány dva termíny setí a dva výsevky (1,5 a 2,0 kg/ha). První termín (S00) byl zaset 12. září, druhý termín (S13) o 13 dní později 25.9. Nedostatek srážek v září a říjnu (Graf 1) byly příčinou pozdního vzcházení u termínu S00. Oba termíny setí začaly vzcházet na konci října. Mák dobře přezimoval. Vyšší výnosy byly zaznamenány v termínu setí S13 a výsevku 2 kg/ha v S00 i S13. Rozdíly nebyly signifikantní. Výsledky včetně termínů setí a sklizně jsou uvedeny v tabulce 7.

Graf 1: Dekádní hodnoty průměrné denní teploty (°C) a sum srážek v období setí a vzcházení máku ozimého včetně termínu setí, srpen až říjen 2022 a 2023, ČHMU, Opava, Šumperk



Tabulka 4: Výnosy ozimého máku odrůda OLAF, sklizeň 20.7.2023, výsevky (kg/ha) a termíny setí S00 (31.8.2022) a S23 (23.9.2022), Opava

Var. č.	Termín setí	Výsevek (kg/ha)	Výnos (t/ha)	Tukey 95 %: 0,733 (min. rozdíl)	Relace výnosu (%) k	
					termínu setí S00, výsevku 1,0 kg/ha	průměru výsevků termínu setí S00
1	S00	1,0	0,53	b	100,00	
2	S00	1,2	0,69	ab	129,65	100,00
3	S23	0,8	0,98	ab	183,92	
4	S23	0,9	1,18	a	215,13	
5	S23	1,0	1,23	a	222,61	
6	S23	1,2	1,14	a	231,66	185,66

Tabulka 5: Výnosy ozimého máku, odrůda OLAF, sklizeň 18.7.2024, výsevky a termíny setí S00 (2.9.2023), S10 (12.9.2023) a S20 (21.9.2023), Opava

Var. č.	Termín setí	Výsevek (kg/ha)	Výnos (t/ha)	Tukey 95 %: 0,274 (min. rozdíl)	Relace výnosu (%) k	
					termínu setí S00, výsevku 1,2 kg/ha	průměru výsevků termínu setí S00
1	S00	1,2	0,75	a	100,00	
2	S00	1,4	0,79	a	105,39	
3	S00	1,8	0,80	a	106,86	100,00
4	S10	1,2	0,84	a	112,25	
5	S10	1,4	0,83	a	110,05	
6	S10	1,8	0,75	a	99,30	103,41
7	S19	1,2	0,93	a	124,09	
8	S19	1,4	0,86	a	114,28	
9	S19	1,8	0,85	a	113,58	112,82

Tabulka 6: Dvouleté průměry výnosů máku ozimého odrůda OLAF z let 2023, 2024, termín setí S00 (přelom srpna a září) a S20 (2023), S23 (2022), výsevek 1,2 kg/ha, Opava

Termín setí	Výnos (t/ha)	Tukey 95 %: 0,207 (min. rozdíl)	Relace výnosu (%)	Termín setí	Výnos (t/ha)	Tukey 95 %: 0,041 (min. rozdíl)	Relace výnosu (%)
S00 2022	0,86	b	100,00	-	-	-	-
S19 2022	1,52	a	176,45	-	-	-	-
S00 2023	0,75	b	87,21	S00	0,81	a	100,00
S23 2023	0,93	b	108,43	S19/S23	1,23	b	151,85

Tabulka 7: Výnosy ozimého máku, odrůda OLAF, sklizeň 17.7.2024, výsevky a termíny setí S00 (12.9.2023), S13 (25.9.2023), Šumperk

Var. č.	Termín setí	Výsevek (kg/ha)	Výnos 8 % (t/ha)	Tukey 95 %: 0,492 (min. rozdíl)	Relace výnosu (%) k	
					termínu setí S00, výsevku 1,2 kg/ha	průměru výsevků termínu setí S00
1	S00	1,5	0,37	a	100,00	
2	S00	2,0	0,41	a	111,64	100,00
3	S13	1,5	0,50	a	135,62	
4	S13	2,0	0,58	a	159,59	138,47

Diskuze

Klimatické změny zvyšují rizika pro pěstování klasických odrůd jarního máku, a to především v období vzcházení. Z meteorologických pozorování na Opavsku jasně vyplývá, že zima bývá v posledních letech častěji teplejší a spíše sušší. To ve své práci potvrzuje i Muška (2022), který zdůrazňuje, že dlouhodobé průměrné teploty a množství srážek zůstává stejné, mění se však četnost výskytu extrémních projevů počasí a s tím spojený výskyt sušších období. Zároveň uvádí, že díky tomu již v současném podnebí neplatí uváděná rajonizace máku. Potvrzuje to hypotézu, že z důvodu snížení pěstitelského rizika je potřebné modifikovat používané technologie.

Setí máku v podzimním termínu má řadu výhod. Rostliny mají více prostoru pro tvorbu biomasy, jsou větší a silnější. Dříve nakvétají i zrají, čímž snižují riziko citelného napadení

houbovými patogeny. Totéž potvrzuje Vrbovský (2023) ve své práci o ozimých odrůdách máku. Z realizovaných testů vyplývá, že i typicky jarní odrůdy jsou schopny úspěšně přečkat zimní období a díky prodloužené vegetační době zvýšit produkci semen i makoviny. Nutno ale zdůraznit, že riziko jejich poškození v zimním období, ve srovnání s formou ozimou, je vyšší. V hodnocení termínů setí ozimé formy máku setého a dopadu do výnosů se jako vhodnější ukazují termíny okolo 20. září než na počátku září. Vyšších výnosů bylo dosaženo u výsevků 1,2 až 1,4 kg/ha na lokalitě Opava a výsevku 2,0 kg/ha v chladnější oblasti Šumperk. Kosek, Vlk (2008) uvádí: optimální termín pro setí ozimého máku je 10. až 20. září.

Závěr

Využití podzimních výsevů máku setého je vhodným způsobem, jak snížit pěstitelské riziko. Z pohledu bezpečnosti je bezpečnější použít ozimé odrůdy, které jsou selektovány ve šlechtitelském procesu na vyšší odolnost ke stresu mrazem. Zároveň ale lze vysévat vybrané odrůdy jarních máků, i když riziko poškození je větší. Pokud přestanou náročné období bez poškození, poskytnou s vysokou pravděpodobností lepší výnos. Pokud dojde k jejich vymrznutí, stále existuje možnost přeset plochy znovu na jaře. Bylo potvrzeno, že z pohledu výnosů je optimálním termínem setí máku ozimého období mezi 10. až 20. zářím a vyšší výsevek. Při volbě termínu setí a výsevku je vždy nutné zohlednit oblast pěstování.

Literatura (předsazení 0,5 cm)

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚSTAV. Eurostat. [online]. (Cit.24.10.2024). Mák. Dostupné z https://statistikaamy.csu.gov.cz/mak

HAVEL J., BÁRNET M., CIHLÁŘ P., HORÁČEK J., KOLAŘÍK P., MRÁZ J., ONDRÁČKOVÁ E., PLACHKÁ E., POSLUŠNÁ J., VACULÍK A., VĚTROVCOVÁ M., VRBOVSKÝ V. 2018: Pěstitelská technologie máku pro snížení rizikovosti pěstování. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., 1. vydání 2018. s. 94.

HOLUBEC, V. et al. [online]. (Cit.24.10.2024). Rámcová metodika Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Dostupné z: https://www.gzr.cz/narodni-program-genetickych-zdroju-rostlin/

HOLUBEC, V. et al. 2017: Přehled a popis odrůd zemědělských plodin od počátku československého a českého šlechtění do roku 2000. I. Polní a zahradní plodiny. VÚRV v.v.i., s.195

KOSEK Z., VLK R. 2008: Termín setí ozimého máku je tu. Dostupné z: https://uroda.cz/termin-seti-ozimeho-maku-je-tu/. 30. 10. 2024

MUŠKA, F. et al. 2022: Vliv klimatických podmínek na rajonizaci pěstování máku setého v České republice v podmínkách klimatické změny. 21.Makový občasník. ČZU Praha, s.51-54

VAŠÁK, J. et al. 2010: Mák. Český mák – sdružení právnických a fyzických osob. Powerprint. 352 s.

VRBOVSKÝ V., PLACHKÁ E., HAVEL J., RYCHLÁ A. 2022. Nebojme se ozimého máku. 22. Makový občasník. ČZU Praha, s. 50-54

ZEHNÁLEK, P. 2023. Seznam doporučených odrůd, přehled odrůd: ÚKZÚZ Brno, s. 63-72

Poděkování

Tento příspěvek vznikl díky řešení Národního programu konzervace 51834/2017-MZE-17253/6.2.7 a institucionálních podpor MZe-RO1823, MZe-RO10/23.

Kontakt:

Ing. Andrea Rychlá
OSEVA PRO s.r.o., pracoviště Opava, Purkyňova 1653/10, 746 01 Opava,
Telefon 553 624 160; e-mail rychla@oseva.cz

Hodnocení a porovnání vybraných znaků v kolekci genetických zdrojů cizrny beraní

Evaluation and comparison of selected characteristics in the germplasm collection of chickpea

Sedláková V.[1], Dostálová R.[2]

[1]*AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.*

[2]*Agritec Plant Research, s.r.o.*

Abstrakt

Z kolekce genetických zdrojů luskovin společnosti AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. byla na základě dostupných dat z databáze GRIN Czech a dalších parametrů hodnocena a porovnána cizrna beraní (*Cicer arietinum* L.). Dle barvy květu došlo k rozdělení do dvou kulturních typů – kabuli a desi. Mezi oběma typy byly zjištěny rozdíly v habitu rostliny, výšce, velikosti lusků, barvě semen a HTS. Hmotnost semen se mezi oběma typy průkazně lišila ($p<0,05$) a pohybovala se u kabuli cizrny mezi 126–528 mg (průměrně 350,67 mg) a u desi cizrny mezi 180–306 mg (průměrně 225,85 mg). Získané výsledky porovnání budou dále doplněny o hodnocení dalších hospodářsky významných znaků.

Klíčová slova: luskoviny, *Cicer arietinum*, desi, kabuli, GRIN

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions in the collection of legumes genetic resources of the AGRITEC, research, breeding and services, s.r.o. were evaluated and compared based on available data from the GRIN Czech database and other parameters. Based on the colour of the flower, it was divided into two cultural types – kabuli and desi. Differences in plant habit, height, pod size, seed colour and TSW were found between both types. Seed weight differed significantly between both types ($p<0.05$) and ranged between 126–528 mg (average 350.67 mg) for kabuli chickpea and 180–306 mg (average 225.85 mg) for desi chickpea. The obtained results of the comparison will be further supplemented by the assessment of other economically significant features.

Keywords: legumes, *Cicer arietinum*, desi, kabuli, GRIN

Úvod

Genetické zdroje rostlin jsou materiály se současným nebo potenciálním významem pro lidstvo a jsou přímo nebo nepřímo využitelné v zemědělství a výživě. Genetické zdroje rostlin jsou velmi rozmanité a patří mezi ně nejrůznější materiály, od původních krajových odrůd, přes šlechtitelské linie, moderní odrůdy až po plané příbuzné druhy našich pěstovaných plodin (Zedek et al. 2023). Společně představují genetické bohatství. Genetické zdroje a biodiverzita spolu úzce souvisí. Zachování biodiverzity a ochrana genetické rozmanitosti rostlin patří mezi základní složky udržitelného zemědělství, které přispívá nejen k zajištění potravinové bezpečnosti, ale také k odolnosti ekosystémů (Janovská et al. 2023). Genetické zdroje rostlin významné pro výživu a zemědělství jsou uchovávány v genových bankách v různých formách. V národní genové bance České republiky v Praze-Ruzyni se nachází přes 56 000 položek generativně i vegetativně množených, z toho pouze 68 položek cizrny, která se řadí mezi teplomilné luskoviny a je uchovávána ve formě semen. Pro porovnání genová banka Slovenské republiky uchovává přes 300 položek cizrny. Na základě tohoto počtu je zde patrný drobný rozdíl v klimatických podmínkách a trendech v pěstování cizrny v jednotlivých zemích.

Cizrna beraní patří mezi jednu z nejpěstovanějších luskovin na světě, zejména v aridnějších a semiaridnějších oblastech. Jde o jednoletou rostlinu dlouhého dne, a proto se řadí k teplomilným luskovinám, i přesto ji lze úspěšně pěstovat v mírnějších klimatech a

chladnějších oblastech. Ačkoliv je cizrna považována za poměrně odolnou k suchu, v době vzcházení dostatek vláhy vyžaduje. Cizrna je charakteristická svým indeterminantním růstem, a proto na jejich poměrně pevných a vzpřímených lodyhách často nacházíme současný vývin listů, tvorbu nových větví, vývin květních pupenů, květů i lusků, častá je i přítomnost pseudokvětů a nepravých poupat. Cizrna tvoří keříčkové porosty, které někdy dosahují výšky až jednoho metru. Celá rostlina cizrny (kromě květů) je hustě poseta jemnými trichomy, které jsou ve většině případů žláznaté a vylučují kyseliny, jde zejména o kyselinu jablečnou a šťavelovou. Tyto žláznaté trichomy poskytují do určité míry ochranu proti hmyzu.
Semena cizrny jsou bohatým zdrojem proteinů se značným množstvím esenciálních aminokyselin (tj. lyzin, tyrozin, glutamová kyselina, histidin), sacharidů (oligosacharidy – stachyóza a ciceritol, polysacharidy – škrob a vláknina), minerálů (tj. fosfor, vápník, hořčík, železo, zinek), vitaminů skupiny B a β-karotenu (Kudapa et al. 2018, Juárez-Chairez et al. 2020). Cizrna obsahuje i širokou škálu potencionálně zdraví prospěšných fytochemikálií a dalších bioaktivních sloučenin (Tor-Roca et al. 2020).
Převážná většina pěstování a spotřeby cizrny je soustředěna na indický subkontinent, Blízký a Střední východ a středomořské země. Na trhu existují dva hlavní typy cizrny označované jako kabuli a desi. Převládající typ, který dominuje Indické (i světové) produkci je typ desi, který je růžově nebo fialově kvetoucí. Semena jsou menší, poněkud hranatá, vrásčitá a mají silnější osemení s výrazným „zobáčkem.“ Semena jsou zbarvena od světle hnědé po tmavě hnědou, červenou, černou nebo zelenou barvou, často jsou pigmentovaná ve formě teček a skvrn. Hmotnost semen se běžně pohybuje v rozmezí 100–300 mg (Wood et al. 2011, Wang et al. 2019). Existuje i typ desi cizrny s hladkým osemením a nazývá se gulabi (Wood & Knights 2003). Rostliny cizrny typu desi jsou tolerantní k teplu a suchu a vyznačují se vyšší rezistencí k houbám rodu *Fusarium*. Druhým typem je kabuli. Tato cizrna je bíle kvetoucí a má typicky vzpřímenější růst. Semena jsou větší, kulatější, mají hladší povrch a tenčí osemení. Hmotnost semen se pohybuje v rozmezí 200–600 mg. Semena jsou bíle, krémově nebo žlutě zbarvená, ale existují odrůdy kabuli s černými semeny (Wood et al. 2011, Wang et al. 2019). Tento typ je převládající na Středním a Blízkém východě. Rostliny cizrny typu kabuli jsou tolerantní k chladu a vyznačují se vyšší rezistencí k napadení houbovým patogenem *Ascochyta rabiei*. Kromě tradičního dělení cizrny na desi a kabuli, ke kterému se někdy přidává ještě typ gulabi, rozlišují někteří autoři zvlášť černosemenné a zelenosemenné odrůdy cizrny mimo zařazení do typu desi a kabuli (Singh et al. 2015).
Cílem této práce bylo vyhodnotit a porovnat vybrané znaky položek genetických zdrojů cizrny hodnocených na pozemcích společnosti AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. jako jednoho z pracovišť, resp. účastníků Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Vyhodnocení a porovnání genetických zdrojů je základním předpokladem pro praktické využití ve šlechtění a výzkumu.

Materiál a metody

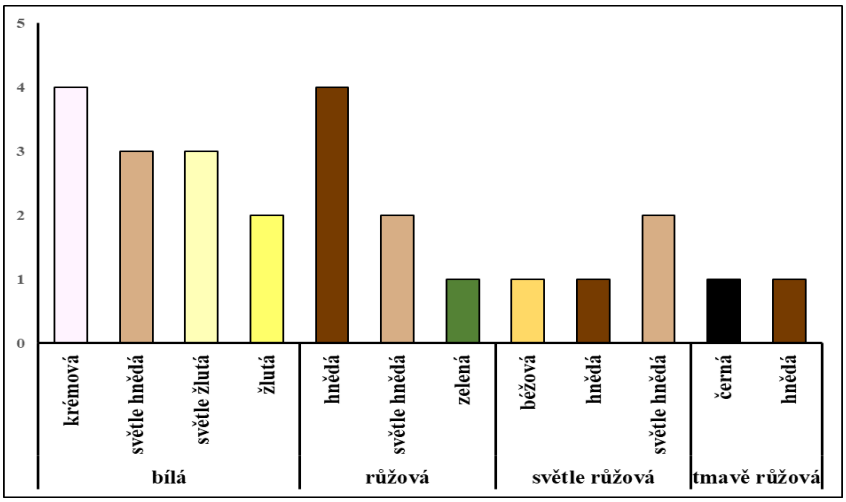
V letech 2021–2024 bylo prováděno polní hodnocení genetických zdrojů cizrny beraní (*Cicer arietinum* L.) na pozemcích společnosti AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. a data byla vkládána do databáze GRIN Czech. Do porovnávání a zhodnocení byly zahrnuty i položky, které byly hodnoceny v minulosti před rokem 2021 a jejichž data jsou v databázi rovněž dostupná. V databázi GRIN Czech se nachází 68 položek cizrny beraní a 44 položek z nich obsahuje popisná data. Veškerá data z databáze posloužila pro zhodnocení a analýzu jednotlivých položek cizrny beraní. Jednotlivé položky jsou opatřeny evidenčním národním číslem (ECN). Všechna popisná data z hodnocení jsou tříletá, neboť databáze umožňuje zveřejňovat pouze tříletá data. K položkám, které doposud nemají zveřejněná popisná data, existuje hodnocení, které je méně než tříleté a na hodnocení se stále pracuje, tato data nebyla použita.

Pro zhodnocení genetických zdrojů cizrny se práce nejprve zaměřila na rozdělení jednotlivých položek cizrny do dvou typů, a to na základě barvy květů. Dále byly vyhodnoceny znaky jako výška rostlin, výška prvního produktivního nodu, rozměry lusku, barva semen a hmotnost tisíce semen. Tyto znaky vyplývají z dostupného hodnotícího klasifikátoru pro *Cicer arietinum* L. (Hýbl a kol. 1998). Navíc bylo provedeno hodnocení semen genetických zdrojů cizrny nad rámec dostupného klasifikátoru, který je běžně využíván. Byly vyhodnoceny rozměry a hmotnost jednotlivých semen. Bylo hodnoceno 10 semen ze sklizně 2022 a 10 semen ze sklizně 2023.

Výsledky a diskuze

Na základě analýzy dostupných dat v databázi GRIN Czech bylo zjištěno, že databáze obsahuje 68 položek genetických zdrojů cizrny, z nichž 44 položek obsahuje popisná data. Vzhledem k povaze a cíli práce bylo hodnocení nejprve zaměřeno na samotné rozdělení položek cizrny na dva kulturní typy – kabuli a desi. To bylo možné provést u 41 položek, které obsahovaly informaci o barvě květu. Bylo zjištěno, že 19 položek genetických zdrojů cizrny lze považovat za typ kabuli, díky bílé barvě květů. Dalších 22 položek mělo barvu květu poměrně variabilní (světle až tmavě růžová), a proto bylo zařazeno k typu desi.

Na základě dostupného klasifikátoru pro cizrnu bylo nejpodrobněji popsáno 25 položek. Mezi bělokvětý typ kabuli patřilo 12 položek, typ desi byl zastoupen 13 položkami. Pro kabuli cizrnu jsou typická světlá semena, což bylo pozorováno a potvrzeno i v takto omezeném souboru položek (obr. 1) a semena měla krémovou, světle hnědou a žlutou barvu. Typ desi je naopak typický barvenými květy, od růžové, přes fialovou až k modré a rovněž semena mají širokou škálu barev, od světle hnědé až po zelenou či černou (obr. 1). I v takto nízkém počtu vzorků se kromě očekávaných nejtypičtějších hnědých semen vyskytovala jedna položka se zelenými semeny a jedna položka s černými semeny.



Obr. 1 – Grafické znázornění rozdělení porovnávaných položek cizrny dle barvy květu a barvy semen. (Kabuli – bílá barva květu. Desi – růžová barva květu.)

Kulturní typy cizrny se od sebe částečně liší i svým habitem a výškou rostlin, resp. výškou porostu. U typu kabuli mírně převažoval polovzpřímený habitus rostlin a výška 51–80 cm. U typu desi převažoval polorozprostřený habitus a výška rostlin od 20–50 cm (tab. 1). Rozdíly mezi oběma kulturními typy byly tedy patrné. Toto potvrzuje i obsáhlá publikace o pěstování cizrny, kterou vydává jeden z největších pěstitelů cizrny na světě – Austrálie. Odrůdy kabuli cizrny jsou obecně vyšší a vzpřímenější než desi, který má více rozprostřený habitus (Pulse Australia 2013). U znaku velikosti lusků se dal pozorovat jen mírný rozdíl. Lusky u typu kabuli

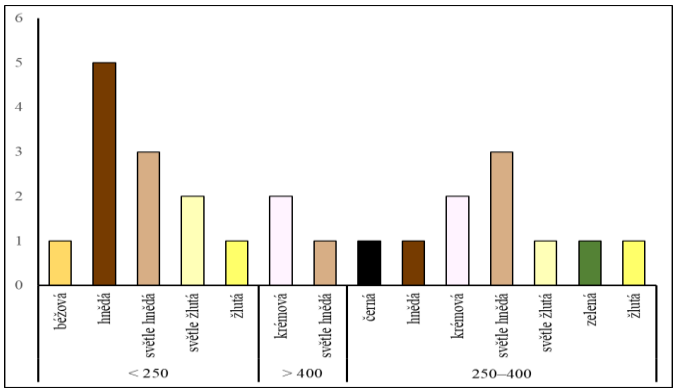
byly ve většině případů větší než u typu desi. Větší velikost lusků ale nepodmiňuje větší velikost nebo počet semen v jednom lusku. Počet semen se u všech pohyboval mezi 1–2 semeny. Jak bylo pozorováno v práci Kivrak et al. (2020), velikosti lusků a počet semen v lusku hodně závisí na podmínkách vnějšího prostředí a velmi častý je také výskyt prázdných lusků.

Tab. 1 – Seznam hodnocených položek a znaků.

	ECN	Barva květu	Habitus	Výška [cm]	Výška 1. prod. nodu [cm]	Lusk délka [mm]	Lusk šířka [mm]	Barva semen	HTS [g]	Semeno šířka [mm]	Semeno délka [mm]	Semeno hmotnost [mg]
KABULI	05L1100002	bílá	polorozprostřený	20–50	< 20	15–20	7–12	žlutá	< 250	5,71	6,78	126
	05L1100005	bílá	polovzpřímený	51–80	20–30	> 20	> 12	žlutá	250–400	7,84	8,98	328
	05L1100006	bílá	polorozprostřený	20–50	< 20	> 20	> 12	světle žlutá	250–400	7,93	10,23	420
	05L1100007	bílá	polorozprostřený	51–80	< 20	> 20	> 12	světle žlutá	< 250	7,12	8,21	250
	05L1100023	bílá	polovzpřímený	20–50	< 20	> 20	> 12	světle žlutá	< 250	6,43	7,33	148
	05L1110057	bílá	polovzpřímený	51–80	20–30	> 20	> 12	krémová	> 400	8,52	10,40	410
	05L1110064	bílá	rozprostřený	51–80	< 20	> 20	> 12	krémová	250–400	8,47	9,81	400
	05L1100010	bílá	polovzpřímený	51–80	< 20	> 20	> 12	krémová	250–400	8,23	8,94	354
	05L1100017	bílá	polorozprostřený	51–80	< 20	> 20	> 12	krémová	> 400	7,90	9,70	366
	05L1110063	bílá	polovzpřímený	51–80	20–30	> 20	> 12	světle hnědá	> 400	8,89	10,97	528
	05L1110065	bílá	rozprostřený	51–80	20–30	> 20	> 12	světle hnědá	250–400	8,69	10,77	522
	05L1110059	bílá	polovzpřímený	20–50	< 20	> 20	> 12	světle hnědá	250–400	8,93	10,74	356
DESI	05L1100001	sv. růžová	polorozprostřený	20–50	< 20	> 20	> 12	hnědá	< 250	6,28	8,60	180
	05L1100033	sv. růžová	polorozprostřený	20–50	20–30	15–20	7–12	světle hnědá	< 250	6,50	8,32	186
	05L1100055	sv. růžová	polovzpřímený	51–80	20–30	> 20	> 12	světle hnědá	< 250	6,89	9,23	244
	05L1100047	sv. růžová	polorozprostřený	20–50	< 20	15–20	7–12	béžová	< 250	6,80	8,41	212
	05L1100052	tm. růžová	rozprostřený	20–50	20–30	> 20	> 12	hnědá	< 250	7,12	9,04	216
	05L1100003	růžová	polorozprostřený	20–50	< 20	15–20	7–12	hnědá	< 250	6,36	9,09	242
	05L1100004	růžová	polorozprostřený	20–50	< 20	> 20	> 12	hnědá	250–400	7,21	9,31	274
	05L1100035	růžová	polovzpřímený	20–50	< 20	> 20	7–12	hnědá	< 250	6,63	8,03	192
	05L1100040	růžová	polovzpřímený	20–50	20–30	> 20	> 12	hnědá	< 250	6,54	8,70	196
	05L1100037	růžová	polorozprostřený	20–50	20–30	> 20	> 12	světle hnědá	< 250	6,68	8,96	236
	05L1100051	růžová	polovzpřímený	20–50	20–30	15–20	7–12	světle hnědá	250–400	7,10	9,82	272
	05L1100059	růžová	polorozprostřený	20–50	< 20	> 20	> 12	zelená	250–400	6,06	7,75	180
	05L1110060	tm. růžová	polorozprostřený	20–50	< 20	> 20	> 12	černá	250–400	7,23	8,87	306

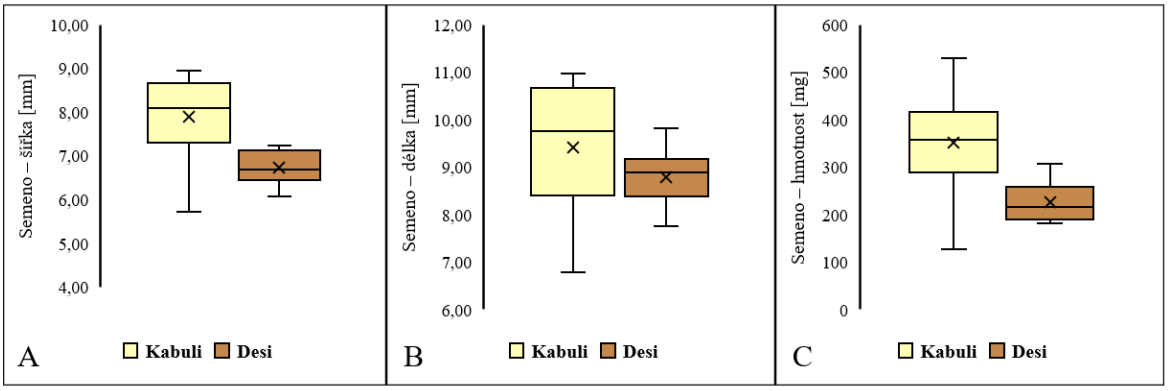
*ECN (evidenční národní číslo)

Na základě hodnot hmotnosti tisíce semen (HTS), které jsou dle klasifikátoru pro cizrnu rozděleny do 3 kategorií (<250, 250–400 a >400 g; tab. 1) bylo provedeno srovnání mezi barvou semen a HTS. Z obrázku 2 vyplývá, že pro typ desi jsou typická malá hnědá semena s HTS do 250 g. Pro světlesemenný typ kabuli jsou zastoupeny všechny kategorie HTS. Největší HTS mají semena kabuli krémové a světle hnědé barvy. HTS žádného z desi položek nedosahuje přes 400 g.



Obr. 2 – Grafické znázornění rozdělení porovnávaných položek cizrny dle kategorie HTS a barvy semen.

Bylo provedeno i měření jednotlivých semen (šířka, délka a hmotnost) vybraných 25 položek genetických zdrojů cizrny (tab. 1) a u tohoto hodnocení byly zjištěny rozdíly. Průměrné hodnoty šířky semen (obr. 3A) se mezi typem kabuli (7,89 mm) a desi (6,72 mm) průkazně lišily na hladině významnosti 0,05; u tohoto parametru lze pozorovat signifikantní rozdíl. Průměrné hodnoty délky semen (obr. 3B) se mezi typem kabuli (9,40 mm) a desi (8,78) sice lišily, rozdíly však nebyly signifikantní na hladině významnosti 0,05. Průměrné hodnoty hmotnosti jednotlivých semen (obr. 3C) se mezi typem kabuli (350,67 mg) a desi (225,85 mg) průkazně lišily na hladině významnosti 0,05; tento parametr lze považovat za signifikantně rozdílný.
Mezi průměrnými hmotnosti semen se mezi položkami kabuli nachází i 2 položky, které mají hmotnost menší než 150 mg. I jejich průměrné rozměry semen jsou menší oproti ostatním kabuli položkám. Semena typu kabuli lze totiž dále rozdělit do podkategorií kabuli s velmi velkými semeny, s velkými semeny, středními semeny a malými semeny, a to jak na základě hmotnosti, tak velikosti. Nejedná se tedy o důsledek špatného ročníku a nepříznivých environmentálních podmínek, ale je to dáno geneticky (Pulse Australia 2013).



Obr. 3 – Parametry semen vybraných položek genetických zdrojů cizrny. A – Průměrné hodnoty šířky semen (*p=0,002*). B – Průměrné hodnoty délky semen (*p=0,166*). C – Průměrné hodnoty hmotnosti semen (*p=0,006*).

Závěr

U hodnocených položek cizrny beraní bylo provedeno rozdělení do dvou kategorií dle kulturního typu cizrny – kabuli a desi, na základě dostupných dat barvy květu. Dle dostupných popisných dat byly zhodnoceny rozdíly mezi oběma typy kulturní cizrny. Bylo zjištěno, že existují rozdíly v habitu a výšce rostlin mezi oběma typy. Bylo potvrzeno, že kabuli cizrna má světlejší semena a desi cizrna má semena spíše tmavší s větší barevnou škálou. Na základě vlastního hodnocení jednotlivých semen byly zjištěny průkazné rozdíly mezi šířkou semen a hmotností semen. Průměrná hmotnost semen kabuli cizrny byla 350,67 mg a u desi to bylo 225,85 mg.
Při zhodnocování rozdílů mezi dvěma typy kulturní cizrny bude v budoucnu nutné vyhodnotit další znaky z klasifikátoru pro *Cicer arietinum* a pro získání dalších šlechtitelsky cenných údajů i další hospodářsky významné znaky nad rámec klasifikátoru.

Literatura

HÝBL, Miroslav et al. 1998. Klasifikátor *Cicer arietinum* L., VÚRV Praha, AGRITEC s.r.o. Šumperk.

JANOVSKÁ, Dagmar et al. 2023. *30 let Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ve spolupráci s Ministerstvem zemědělství ČR.

JUÁREZ-CHAIREZ, Faridy et al. 2020. Biological Activities of Chickpea in Human Health (*Cicer arietinum* L.). A Review. Dordrecht, The Netherlands: *Plant foods for human nutrition*, **75**(2), 142–153.

KIVRAK, Gul Kamile et al. 2020. Integration of Extra-Large-Seeded and Double-Podded Traits in Chickpea (Cicer arietinum L.). Agronomy, 10, 901.

KUDAPA, Himabindu et al. 2018. The RNA-Seq-based high resolution gene expression atlas of chickpea (*Cicer arietinum* L.) reveals dynamic spatio-temporal changes associated with growth and development: RNA-Seq based chickpea gene expression atlas. *Plant, Cell and Environment*. **41**, 2209–2225.

Pulse Australia (2013) Northern chickpea best management practices training course manual – 2013. Pulse Australia Limited.

SINGH, P. Kumar et al. 2015. Effect of Domestic Processes on Chickpea Seeds for Antinutritional Contents and Their Divergence. *American Journal of Food Science and Technology*, Vol. 3, No. 4, 111-117.

TOR-ROCA, Alba et al. 2020. Phytochemicals in Legumes: A Qualitative Reviewed Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **68**(47), 13486-13496.

WANG, Runfeng et al. 2019. Co-localization of genomic regions associated with seed morphology and composition in a desi chickpea (Cicer arietinum L.) population varying in seed protein concentration. *Theoretical and Applied Genetics*. **132**, 1263–1281.

WOOD, A. Jennifer & KNIGHTS, E.J. 2003 Chickpea report on the CICILS/IPTIC convention.

WOOD, A. Jennifer; KNIGHTS, E.J.; CHOCT, Mingan. 2011. Morphology of Chickpea Seeds (Cicer arietinum L.): Comparison of desi and kabuli Types. *International Journal of Plant Sciences*. **172**(5), 632–643.

ZEDEK, Vlastimil et al. 2023. Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství na období 2023–2027. Ministerstvo zemědělství, Praha, Česká republika. 49 s.

Poděkování

Práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství v rámci řešení Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity č. 8/2024 MZE-43202/2024-13113 a institucionální podpory na dlouhodobý rozvoj výzkumné organizace MZE-RO1023.

Kontakt:

Ing. Veronika Sedláková, Ph.D.
AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.
Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk
+420 770 104 371
sedlakova@agritec.cz

Vliv půdní aplikace bentonitu na výnos kukuřice seté (*Zea mays* L.)

Effect of bentonite application on selected soil physical properties

Vašinka M.[1], Badalíková B.[2]

[1]*Agrovýzkum Rapotín s.r.o.*

[2] *Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Troubsko*

Abstrakt

Na hlinitopísčitém půdním typu kambizemě mesobazické proběhlo ověření půdní aplikace tuzemských bentonitových typů – Rokle a Černý vrch s cílem dosažení lepšího výnosu kukuřice seté (*Zea mays* L.), odrůdy Donremi. U obou typů bentonitu byly testovány aplikační dávky 26 kg, 52 kg a 78 kg. Variabilní výška a výnos kukuřice během 2 let byla velmi pravděpodobně kromě aplikace bentonitu také ovlivněna srážkovým úhrnem. V prvním roce testování (2019) dosahovala kukuřice výšky v rozmezí 1,88–2,65 m, nejvyšší průměrný výnos hmoty v sušině byl stanoven u 78 kg bentonitu typu Černý vrch (var. IVB, 18,33 t.ha^{-1}) a zelené hmoty u 78 kg bentonitu typu Rokle (var. IVA, 36,9 t.ha^{-1}). V druhém roce (2020), s vyšším srážkovým úhrnem v době vegetace, dosahovala kukuřice výšky 2,83–3,18 m. Nejvyšší průměrný výnos hmoty v sušině byl zjištěn u 52 kg bentonitu typu Rokle (var. IIIA, 22,84 t.ha^{-1}) a zelené hmoty u 26 kg bentonitu typu Černý vrch (var. IIB, 62,2 t.ha^{-1}).

Klíčová slova: bentonit, půda, kukuřice setá, výnos, zemědělství

Abstract

The soil application of Czech bentonite types – Rokle and Černý vrch was verified on the loamy-sandy soil type of mesobasic cambize soil with the aim of achieving a better yield of seed corn (*Zea mays* L.), variety Donremi. Application doses of 26 kg, 52 kg and 78 kg were tested for both types of bentonite. The variable height and yield of maize during the 2 years was very probably affected by total rainfall. In the first year of testing (2019), maize reached a height in range of 1.88–2.65 m, the highest average dry matter yield was determined for 78 kg of bentonite of the Černý vrch type (var. IVB, 18.33 t.ha^{-1}) and green matter for 78 kg of Rokle bentonite type (var. IVA, 36.9 t.ha^{-1}). In the second year (2020) with a higher precipitation amount during the growing season, the corn reached a height of 2.83–3.18 m. The highest average dry matter yield was detected for 52 kg of bentonite of the Rokle type (var. IIIA, 22.84 t.ha^{-1}) and green matter for 26 kg of bentonite of the Černý vrch type (var. IIB, 62.2 t.ha^{-1}).

Keywords: bentonite, soil, maize, yield, agriculture

Úvod

V zemědělství se hojně využívá různých typů půdních doplňků, zejména ke zlepšení půdních vlastností obděláváných půd a k dosažení lepších výnosů plodin. Zároveň je v poslední době, kdy se více řeší environmentální aspekty, kladen důraz na přírodní povahu použitých materiálů. Mezi přírodní půdní doplňky řadíme organické (např. kompost, hnůj, biouhel, mikrořasy, extrahované huminové látky), minerální doplňky (např. vápenec, sádrovec, bentonit) a jejich kombinace (organo-minerální) (Garbowski et al., 2023). Bentonit je hornina tvořená směsí jílových minerálů patřících do skupiny fylosilikátů a její využití je optimální zejména v případě lehkých půd (max. 20 % jílovitých částic) s vysokou propustností. Dominantním jílový minerál bentonitu (montmorillonit, 65–80 hm. %) má vysokou kapacitu pro zadržování vody a vzhledem ke svému zpravidla záporně nabitému povrchu je v půdním komplexu potenciálním adsorbentem živin a umožňuje vytvářet kvalitní zásobárnu pro kořenové systémy pěstovaných plodin (Croker et al., 2004). Při aplikaci bentonitu bylo v případě propustných půd prokázáno mnoha autory zlepšení objemové hmotnosti redukované (OHr), půdní struktury a nárůstu kationtové výměnné kapacity (KVK) půdy vlivem přídavku jílové frakce ve formě bentonitu (Abdelfattah et al., 2020, Croker et al., 2004, Czaban a Siebielec, 2013, Satje a Nelson, 2009, Zhou et al., 2019). KVK je dobrým měřítkem schopnosti půdy k udržení a dodání živin plodinám a obecně platí, že v půdě narůstá s obsahem jílové frakce a organické hmoty (Czaban

a Siebielec, 2013). Jak již bylo zmíněno, bentonit má vysokou schopnost zadržovat vodu a po jeho aplikaci narůstá vodní retenční kapacita (Hall et al., 2010, Mi et al., 2017), přičemž počáteční pokles půdní vlhkosti je tlumen vzhledem k jeho bobtnacím schopnostem (Li et al., 2012). Bentonity bohaté na vápník jsou také populární pro své fyzikální a chemické vlastnosti z pohledu adsorpce těžkých kovů a mimo zemědělství jsou například hojně využívány při přečišťování odpadní vody (Chandra et al., 2012; Wang et al., 2016).

Materiál a metody

Složení bentonitových typů je popsáno v Tab. 2. Oba typy bentonitu byly poskytnuty firmou Keramost, a.s. Aplikace bentonitu probíhala vždy na začátku vegetačního období v letech 2019–2020 v bramborářské výrobní oblasti na pokusné ploše 100 x 52 m (GPS souřadnice: 49.2862300N, 15.9784139E), poblíž obce Hodov. K rozmetání bentonitu bylo použito rozmetadlo RMS 8 a bentonit byl následně zapraven do půdy podmítačem Lemken. Pokusná plocha byla rozdělena do následujících 8 variant s rozměrem 6,5 x 100 m (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

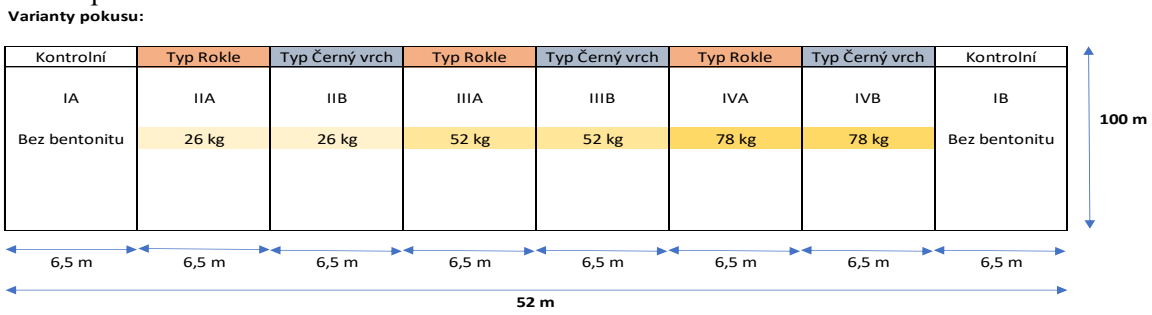
Tab. 2: Chemické složení testovaných bentonitů

hm. %	Typ bentonitu	
	Rokle	Černý vrch
SiO_2	46,12	48,78
Al_2O_3	15,75	15,96
Fe_2O_3	14,98	11,24
TiO_2	1,00	0,65
MgO	2,87	5,67
CaO	2,35	2,52
Na_2O	0,49	2,30
K_2O	0,70	1,77

<u>Varianty pokusu a aplikační dávky bentonitů Rokle a Černý vrch, přepočteno na ha</u>

IA, IB kontrola – bez přídavku bentonitu
IIA – aplikace 26 kg bentonitu, typ Rokle (400 kg.ha^{-1})
IIB – aplikace 26 kg bentonitu, typ Černý vrch (400 kg.ha^{-1})
IIIA – aplikace 52 kg bentonitu, typ Rokle (800 kg.ha^{-1})
IIIB – aplikace 52 kg bentonitu, typ Černý vrch (800 kg.ha^{-1})
IVA – aplikace 78 kg bentonitu, typ Rokle (1200 kg.ha^{-1})
IVB – aplikace 78 kg bentonitu, typ Černý vrch (1200 kg.ha^{-1})

Plánek pokusu s variantami



Měření výšky a stanovení výnosu kukuřice seté (*Zea mays* L.)

Ke stanovení výšky kukuřic byl v každé variantě experimentální pokus rozdělen na 3 části: Z (začátek pokusu), S (střed pokusu) a K (konec pokusu). V těchto částech byla od povrchu měřena výška pěti za sebou jdoucích rostlin kukuřice seté ve čtyřech řádcích bližších středové

části varianty, aby bylo zamezeno možné okrajové chybě mezi variantami.Výnos silážních kukuřic (v sušině a zelené hmotě v t.ha^{-1}) byl stanoven metodou ruční sklizně 15 za sebou jdoucích rostlin vždy na konci vegetačního období. Byla zjištěna vlhkost a hmotnost zelené hmoty a po vypočítání sušiny byl přepočten výnos na ha v sušině. Kukuřice na siláž byla setá 26. dubna, výsevek byl 95 tis.zrn/ha, rozteč řádků 75 cm. K setí byla zvolena silážní kukuřice setá (*Zea mays* L.), odrůda Donremi.

Stanovení půdní vlhkosti

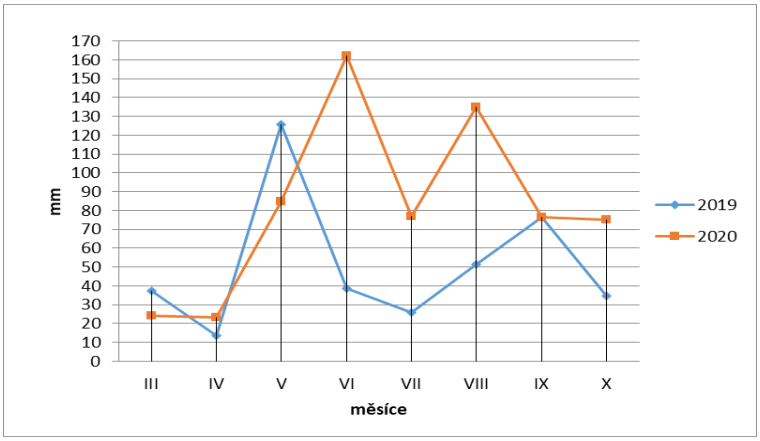
Vlhkost půdy (% hm.) v půdě byla zjišťována gravimetrickou metodou z hloubek 0–0,05; 0,05–0,10; 0,10–0,20 a 0,20–0,30 m. Obsah vody ve vzorku byl vypočítán z úbytku hmotnosti vzorku po jeho vysušení při 105°C do konstantní hmotnosti. Pro porovnání vlhkosti s výnosem kukuřice byla použita průměrná hodnota 0–0,30 m. Na jaře 2019 byly odebrány vstupní vzorky půdní vlhkosti pouze z kontrolních variant (IA, IB).

Výsledky

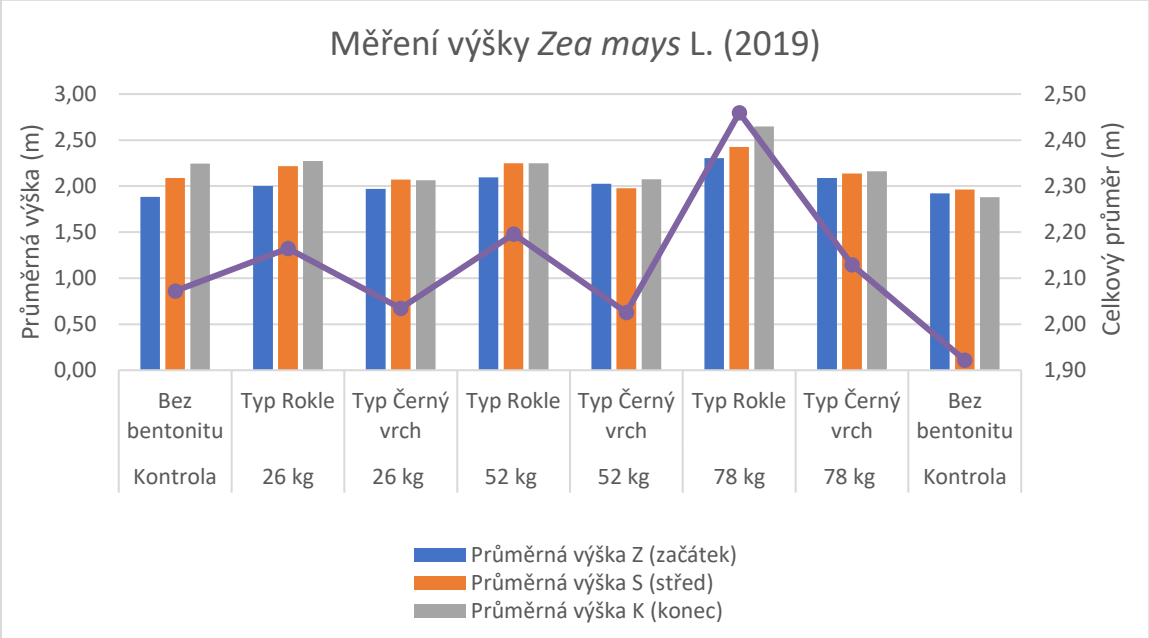
Výška kukuřice seté (*Zea mays* L.), odrůdy Donremi byla během dvou let variabilní a velmi pravděpodobně ovlivněna srážkovým úhrnem (Graf 1). Srážkový úhrn měl vliv na celkovou výšku kukuřice a zároveň na samotnou účinnost užitných vlastností bentonitů Rokle a Černý vrch v půdě. Průměrné množství srážek bylo v roce 2019 nižší, než je dlouhodobý průměrný roční srážkový úhrn v tomto klimatickém regionu M7 (500 mm/rok) (Quitt, 1975).

Na Graf 2, 3 jsou znázorněny průměrné výšky kukuřic v začátku (Z), středu (S) a konci (K) každé testované varianty včetně celkového průměru u těchto variant. V roce 2019 dosahovala celková průměrná výška rostlin rozmezí 1,8–2,6 m. Naopak v roce 2020 s vyšším srážkovým úhrnem v období růstu celková průměrná výška rostlin přesahovala 3 m, respektive byla rozmezí 2,83–3,18 m. Oba bentonitové typy (Rokle i Černý vrch) měly rozdílný vliv na výšku kukuřice seté. Se zvyšující se aplikační dávkou bentonitu se zvyšovala i celková průměrná velikost kukuřic ve všech třech částech pokusu. Nejvyšší velikosti dosahovala v roce 2019 kukuřice při přídavku nejvyšší aplikované dávky bentonitu typu Rokle (var. IVA, 78 kg) a v roce 2020 při přídavku nejnižší dávky bentonitu typu Černý vrch (var. IB, 26 kg).

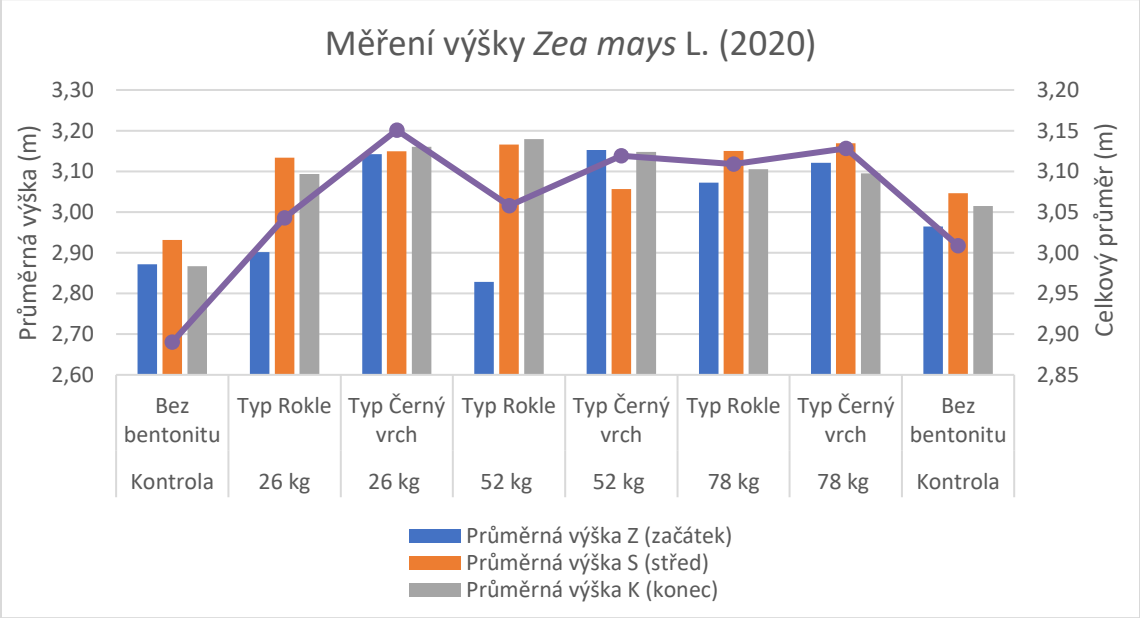
GRAF 1: SRÁŽKOVÝ ÚHRN ZA ROK 2019–2020, HODOV



Graf 2: Průměrná výška kukuřice seté v jednotlivých variantách za rok 2019



Graf 3: Průměrná výška kukuřice seté v jednotlivých variantách za rok 2020



Diskuze

Hodnoty vlhkosti půdy (%hmot.) se odvíjely od průměrného srážového úhrnu, který byl v roce 2020 celkově vyšší, zejména pak v letním a podzimním období. Srážkový úhrn přímo ovlivňuje půdní vlhkost, kterou je schopen bentonit pojmout a následně zprostředkovat pro rostliny (např. El-Nagar a Sary, 2021, Mi et al., 2020), a tedy i funkčnost jeho aplikace ve vztahu k růstu dané plodiny. Podobně jako výška kukuřice seté, byl srážkovým úhrnem ovlivněn i samotný výnos hmoty v sušině a zelené hmoty.

Porovnání výnosu hmoty v sušině a zelené hmoty ve vztahu k průměrné půdní vlhkosti v orniční horizontu (0–0,3 m) je zobrazeno v Grafu 4, 5. Bentonit Černý vrch se více podílel na zadržení vody v půdě, jelikož při konkrétní aplikační dávce byla u variant s jeho aplikací vyšší

vlhkost půdy oproti variantám s bentonitem Rokle. V celkovém měřítku však nebyla půdní vlhkost výrazně vyšší u variant s testovanými aplikačními dávkami bentonitů. To mohlo být také způsobeno efektivnějším využitím vody rostlinami, což dokládá i vyšší celkový výnos u těchto variant. Výnosy hmoty v sušině a zelené hmoty byly podobně jako výška kukuřice seté během sledovaných let variabilní.

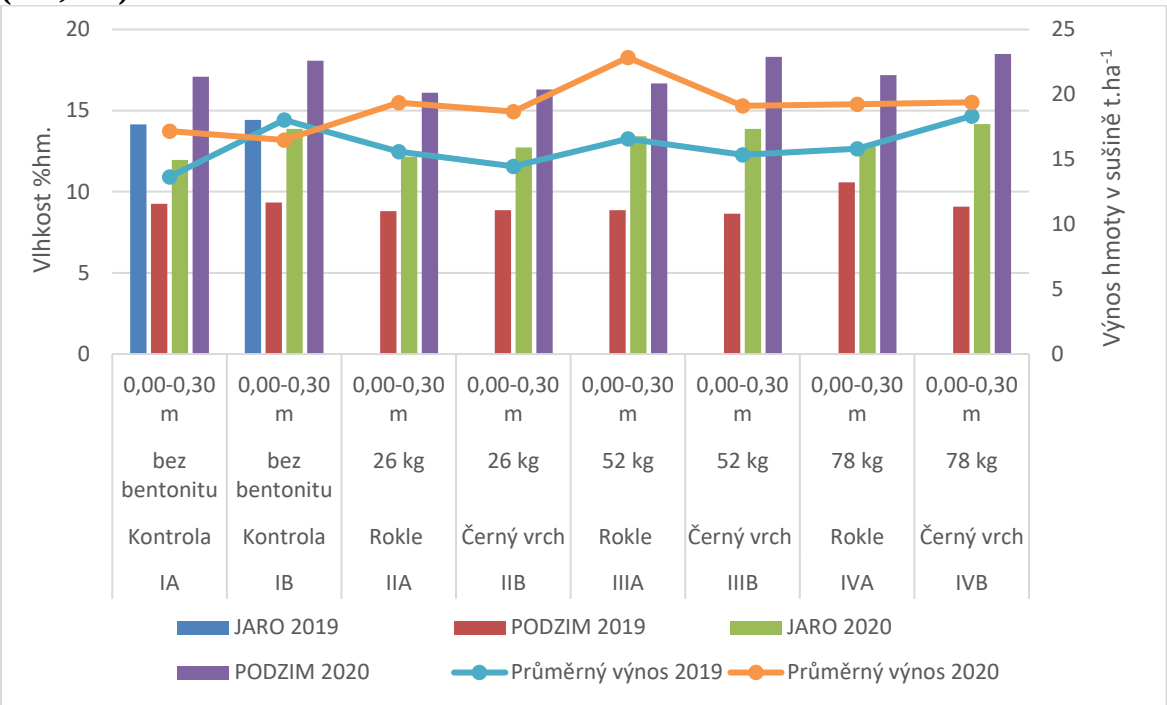
V roce 2019 (po první aplikaci bentonitů) byl nejvyšší průměrný výnos hmoty v suš. dosažen u varianty IVB (18,33 t.ha^{-1}) s nejvyšší aplikovanou dávkou bentonitu Černý vrch (78 kg). Nejvyšší průměrný výnos zelené hmoty byl zjištěn u varianty IVA, bentonitový typ Rokle (36,9 t.ha^{-1}). U variant s aplikovaným bentonitem byl stanoven vždy vyšší výnos zelené hmoty ve srovnání s kontrolními variantami (IA, IB) a v tomto roce se projevila aplikační dávka 78 kg jako nejlepší. Výnos hmoty v sušině byl sice u kontrolní varianty IB velmi vysoký (18,02 t.ha^{-1}), naopak ve srovnání s druhou kontrolní variantou (IA) nepřevyšoval žádnou variantu s aplikovaným bentonitem.

V roce 2020 (po druhé aplikaci bentonitů) byly také stanoveny nejvyšší výnosy u variant s aplikovaným bentonitem, respektive nejvyšší průměrný výnos hmoty v sušině byl stanoven u varianty IIIA (22,84 t.ha^{-1}) s 52 kg bentonitu typu Rokle.

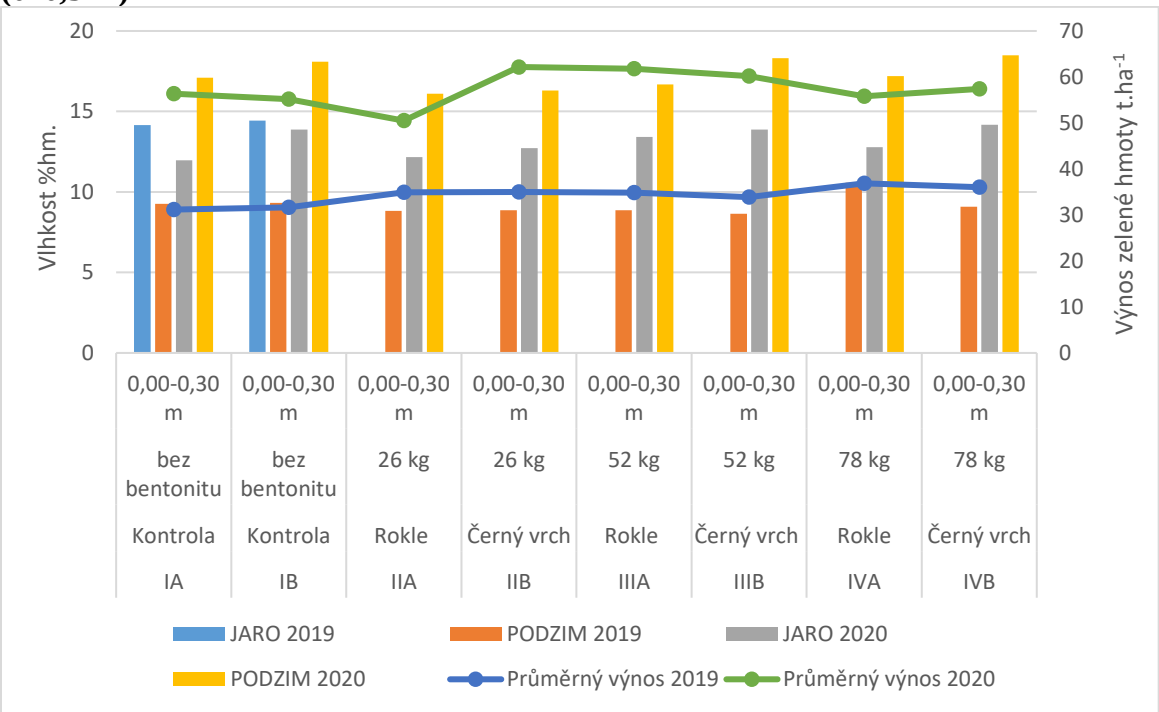
V případě studie Zhang et al. (2020) byla u aplikace bentonitu na písčitých půdách také prokázána vyšší produktivita kukuřice, ale také změny v mikrobiálním půdním složení včetně potenciálního nárůstu houbových patogenů, vyžadujících ověření v dalších výzkumech. Lepšího výnosu po aplikaci bentonitu bylo například dosaženo i u jiných zemědělský plodin. U béru italského (*Setaria italic* (L.) Beauv.) se nejlépe projevila aplikační dávka bentonitu 24 t.ha^{-1} pro optimální růst, rychlost transpirace a parametry fotosyntézy. Pro kvalitu zrna včetně navýšení obsahu bílkovin, tuku a obsahu vlákniny byla optimální dávka 18 t.ha^{-1} (Mi et al., 2020). Ve stejné oblasti a za použitý stejných aplikačních dávek bentonitu (0, 6, 12, 18, 24 a 30 t.ha^{-1}) autoři Mi et al. (2017) zkoumali dříve také výnos prosa setého (*Panicum miliaceum* L.). Po aplikaci bentonitu docházelo ke zvýšení nadzemní biomasy v rozmezí od 2 % do 39 % a zvýšení výnosu zrna od 3 % do 20 %. Nejlépe se zde projevila dávka 24 t.ha^{-1} a nejlepší ekonomickou návratnost měla dávka 18 t.ha^{-1}. Přídavek jílové frakce do písčité půdy ve východní Austrálii zlepšil také výnos řepky olejky (*Brassica napus*; cv. Hyola 501 a Tornado), ječmene setého (*Hordeum vulgare*; cv. Gardiner) a lupiny bílé (*Lupinus albus*; cv. Tanjil) o 0,3–0,6 t.ha^{-1} (Hall et al., 2010).

V našem polním pokusu jsme použili aplikační dávku v přepočtu 400–1200 kg ha^{-1}, abychom se vyhnuli „přejílování“ orničního půdního horizontu. Spousta dalších autorů ve svých pokusech použila dávky podstatně vyšší v řádech 5–120 t.ha^{-1} (Croker et al., 2004, Czaban a Siebielec, 2013, Mi et al., 2017, Mi et al. 2020), které však při dlouhodobé aplikaci mohou negativně ovlivnit podíl jílové frakce a způsobit přechod na těžký půdní typ. Obecně využitelná aplikační dávka není stanovena vzhledem k testování na různých půdních typech, rozdílným klimatickým poměrům a druhům pěstovaných plodin. Samotné bentonitové typy se také liší ve svém chemickém složení viz. Tab. 2, které ovlivňuje jejich užitné vlastnosti.

Graf 4: Průměrný výnos hmoty v sušině u kukuřice seté (t.ha^{-1}) u jednotlivých variant během let 2019-2020 ve vztahu k průměrné půdní vlhkosti v orničním horizontu (0–0,3 m)



Graf 5: Průměrný výnos hmoty v sušině u kukuřice seté (t.ha^{-1}) u jednotlivých variant během let 2019-2020 ve vztahu k průměrné půdní vlhkosti v orničním horizontu (0–0,3 m)



Závěr

Aplikací tuzemských bentonitů typu Rokle a Černý vrch do půdy v našem dvouletém experimentu byl prokázán pozitivní vliv na výnos kukuřice seté. V obou letech při variabilním

srážkovém úhrnu byly stanoveny vyšší výnosy u variant s aplikovaným bentonitem. Bentonit umožňuje zadržovat vodu, a tím pádem je optimálním přírodním půdním stimulantem pro lehké půdy s vysokou propustností a rychlým prosycháním v období klimatické změny.

Literatura

Abdelfattah, M., Kocserha, I., Géber, R., Tihtih, M., Móricz, F. (2020): Evaluating the properties and mineral phases of the expanded clay aggregates with the bentonite additive material. Journal of Physics Conference Series. 1527, 12030. 10.1088/1742-6596/1527/1/012030.

Croker, J., Hartmann, C., Bhuthorndharaj, S. (2004): Effects of recycled bentonite addition on soil properties, plant growth and nutrient uptake in a tropical sandy soil. Plant and Soil, 267, 155–163. 10.1007/s11104-005-4641-x.

Czaban, J., Siebielec, G. (2013): Effects of Bentonite on Sandy Soil Chemistry in a Long-Term Plot Experiment (II); Effect on pH, CEC, and Macro- and Micronutrients. Polish Journal of Environmental Studies, 22(6), 1669–1676.

El-Nagar, D. A., Sary, D. H. (2021): Synthesis and characterization of nano bentonite and its effect on some properties of sandy soils. Soil and Tillage Research. 208, 104872. 10.1016/j.still.2020.104872.

Garbowski, T., Bar-Michalczyk, D., Charazińska, S., Grabowska-Polanowska, B., Kowalczyk, A., Lochyński, P. (2023): An overview of natural soil amendments in agriculture. Soil and Tillage Research, 225, 105462. 10.1016/j.still.2022.105462.

Hall, D., Jones, H., Crabtree, W., Daniels, T. (2010): Claying and deep ripping can increase crop yields and profits on water repellent sands with marginal fertility in southern Western Australia. Australian Journal of Soil Research, 48(2), 178–187. 10.1071/SR09078.

Chandra, I. K., Ju, Y.-H, Ayucitra, A., Ismadji, S. (2012): Evans blue removal from wastewater by rarasaponin–bentonite. International Journal of Environmental Science and Technology, 10, 359–370. 10.1007/s13762-012-0114-y.

Li, R., Wang, J. J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, G., Qin, R., Li, X., Xiao, R. (2012): Nutrient transformations during composting of pig manure with bentonite. Bioresource Technology, 121, 362–368. 10.1016/j.biortech.2012.06.065.

Mi, J., Gregorich, E., Xu, S., Mclaughlin, N. B., Ma, B., Liu, J. (2017): Effect of bentonite amendment on soil hydraulic parameters and millet crop performance in a semi-arid region. Field Crops Research, 212, 107–114. 10.1016/j.fcr.2017.07.009.

Mi, J., Gregorich, E., Xu, S., Mclaughlin, N. B., Ma, B., Liu, J. (2020): Effect of bentonite as a soil amendment on field water-holding capacity, and millet photosynthesis and grain quality. Scientific Reports, 10, 18282. 10.1038/s41598-020-75350-9.

Quitt, E. (1975): Mapa klimatických oblastí ČSR: 1 : 500 000. Brno: Geografický ústav ČSAV.

Satje, A., Nelson, P. (2009): Bentonite treatments can improve the nutrient and water holding capacity of sugarcane soils in the wet tropics. Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists. 31, 166.

Wang, Q., Li, R., Cai, H., Awasthi, M. K., Zhang, Z., Wang, J. J., Ali, A., Amanullah. M. (2016): Improving pig manure composting efficiency employing Ca-bentonite. Ecological Engineering, 87, 157–161. 10.1016/j.ecoleng.2015.11.032.

Zhang, H., Chen, W., Zhao, B., Phillips, L. A., Zhou, Y., Lapen, D. R., Liu, J. (2020): Sandy soils amended with bentonite induced changes in soil microbiota and fungistasis in maize fields. Applied Soil Ecology, 146, 103378. 10.1016/j.apsoil.2019.103378.

Zhou, L., Monreal, C., Xu, S., Mclaughlin, N., Zhang, H., Hao, G., Liu, J. (2019): Effect of bentonite-humic acid application on the improvement of soil structure and maize yield in a sandy soil of a semi-arid region. Geoderma. 338, 269–280. 10.1016/j.geoderma.2018.12.014.

Poděkování
Výsledek vznikl za podpory projektem Technologické agentury ČR (TA ČR), projekt TJ02000068 „Využití bentonitu v lehkých půdách postižených suchem za účelem zvýšení výnosů a zúrodnění půd“ v programu ZÉTA a Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1224.

Kontaktní adresa:
Mgr. Martin Vašinka, Ph.D.
Agrovýzkum Rapotín s.r.o.
Výzkumníků 863, 788 13 Rapotín
+420 731 659 896, martin.vasinka@vuchs.cz

Hodnocení vybraných mechanicko-fyzikálních vlastností peletizovaného kompostu určeného pro oblast zahradnictví

Evaluation of selected mechanical-physical properties of pelletized compost intended for horticulture

Zemánek Pavel[1], Burg Patrik[1], Mašán Vladimír[1], Čížková Alice[1]

[1]*Ústav zahradnické techniky, Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Valtická 337, 691 44 Lednice na Moravě, ČR*

Abstrakt

Výroba kompostu a jeho využití na zemědělské půdě je dnes obecně rozšířená a známá. S ohledem na podmínky měnícího se klimatu (teplotní výkyvy, nevyrovnané srážky aj.) a s ohledem na antropogenní činnost spojenou s degradací půdy i devastací životního prostředí, jsou řešeny v rámci evropského výzkumného prostoru otázky spojené s širším využitím kompostu. Zvláštní pozornost je věnována inovativním úpravám kompostů na hnojiva se zlepšenými vlastnostmi. Z hlediska udržitelného zahradnictví se zaměřením na oblast výživy rostlin a zajištění půdní úrodnosti představuje perspektivní řešení zpracování zahradnických kompostů společně s dalšími druhy biomasy či pomocných půdních látek procesem peletizace. Pro peletizaci a potřeby experimentálních měření byly zvoleny 3 varianty vstupních surovin. Jedná se o samotný kompost, kompost v kombinaci s biouhlem a kompost v kombinaci s matolinou. U vzorků pelet byly následně hodnoceny vybrané mechanicko-fyzikální vlastnosti jako např. sypná hmotnost (845–1056 kg.m^{-3}), mechanická odolnost (85,1–97,3 %), pevnost v tlaku (16,3–18,4 MPa).

Klíčová slova: zahradnické odpady, kompost, tvarované hnojivo, udržitelná technologie, sypná hmotnost

Abstract

The production of compost and its use on agricultural land is generally widespread and known today. With regard to the conditions of the changing climate (temperature fluctuations, uneven precipitation, etc.) and with regard to anthropogenic activity associated with soil degradation and environmental devastation, issues related to the wider use of compost are being addressed within the European research area. Special attention is paid to innovative modifications of composts into fertilizers with improved properties. From the point of view of sustainable horticulture with a focus on the area of plant nutrition and ensuring soil fertility, a promising solution is the processing of horticultural compost together with other types of biomass or auxiliary soil substances through the pelletization process. For pelletization and the needs of experimental measurements, 3 variants of input raw materials were chosen. These are pure compost, compost in combination with biochar and compost in combination with grape marc. Selected mechanical-physical properties of the pellet samples were subsequently evaluated, such as bulk density (845–1056 kg/m^3), mechanical durability (85.1–97.3 %), compressive strength (16.3–18.4 MPa).

Keywords: horticultural waste, compost, shaped fertilizer, sustainable technology, bulk density

Úvod

Proces peletizace surovin je v současnosti běžně využíván při výrobě biopaliv z odpadní biomasy (Werther et al. 2000). Uplatnění však nachází také při zpracování plastů, kovů a dalších surovin, včetně organických hnojiv a kompostů (Holmes et al. 2014; Poggio-Fraccari at al. 2020). Celková účinnost peletizace závisí zejména na zvoleném způsobu a technologii, kdy důsledkem působících fyzikálně-mechanických a fyzikálně-chemických procesů dochází ke zvýšení hustoty peletizovaného materiálu, pojivých vlastností, odolnosti vůči otěru, snížení vlhkosti atd. Samotný proces peletizace je kontinuální a závisí na zrnitosti vstupních surovin i jejich fyzikálně-mechanických vlastnostech (vlhkost, tvrdost, teplota, pH aj.). Výroba tvarovaných hnojiv procesem peletizace představuje z hlediska udržitelného zemědělství perspektivní způsob jejich úpravy. Peletizovaná forma hnojiv a kompostů může výrazným

způsobem ovlivnit přesnost dávkování, rychlost uvolňování živin i zvolený způsob aplikaci s využitím dostupných konstrukčních variant rozmetadel. Peletizovaný kompost může ovlivnit logistické problémy spojené s přepravou volně loženého kompostu a tak snížit výši nákladů na skladování, manipulaci a dopravu (Brunerová et al. 2020). Výhodou peletizovaného kompostu je také možnost přidání dalších pomocných látek během procesu peletizace pro zvýšení jeho kvality (Takahashi, Ihara, Karasawa 2016). Technologický postup výroby tvarovaného hnojiva z kompostu sestává z několika vzájemně navazujících fází. Jedná se o výrobu kompostu, jeho předúpravu a homogenizaci (prosévání nebo drcení kompostu, mísení), sušení a následnou peletizaci (Lawong et al., 2011, Mieldazys et al., 2014). Z hlediska využití pelet v mechanických distribučních systémech sehrává významnou roli zejména pevnost v tlaku a mechanická odolnost. Pevnost v tlaku, označovaná také jako odolnost proti drcení či tvrdost, představuje maximální drtící zatížení, které může peletka vydržet před prasknutím nebo zlomením. Mechanická odolnost peletek, vyjadřuje jejich odolnost vůči otěru a nárazům především při manipulaci a přepravě (Brunerová et al., 2020).

Cílem příspěvku je ověřit hlavní mechanicko-fyzikální vlastnosti tvarovaného hnojiva - peletek vyrobených ze zahradnického kompostu s vazbou na jejich odolnost při manipulaci, přepravě i skladování.

Materiál a metody

Metodika popisuje základní charakteristiku vstupních surovin, způsobu výroby peletek a charakteristiku peletovacího lisu včetně provedených měření a testů za účelem stanovení vybraných mechanicko-fyzikálních vlastností pelet.

Základní charakteristika vstupních surovin

Hlavní surovinou pro výrobu peletek byl kompost vyrobený ze směsi zahradnických odpadů se zastoupením travní hmoty, dřevní štěpky a posklizňových zbytků z ovoce a zeleniny. Kompost byl vyroben technologií pásových hromad na experimentální kompostárně Zahradnické fakulty v Lednici. V rámci experimentálních měření byly vyrobeny 3 varianty peletek (Obr. 1) v kombinaci s různými objemovými činidly:

Var. 1: čistý kompost (ρ = 650 kg.m^{-3})

Var. 2: kompost s přídavkem 20 % biouhlu (ρ = 350 kg.m^{-3})

Var. 3: kompost s přídavkem 20 % matolin (ρ = 205 kg.m^{-3})

Obr. 1: Varianty kompostových peletek

Charakteristika peletovacího zařízení

Výroba peletek byla prováděna pomocí peletovacího zařízení BONSAI 100 (Kovo Novák, ČR). K protláčení vstupujícího materiálu využívá lis protlačovací válce s deskovou matricí s otvory o průměru 6 mm. Materiál je tlačen do peletizační matrice, kde dochází k formování výsledného

produktu, který opouští lis vytvarovaný do podoby válcovitých peletek. Vzdálenost mezi plochou matrice a válcem byla 0,10 mm; rychlost otáčení matrice 2800 otáček za min. Pohon lisu zajišťuje elektromotor s příkonem 6 kW, při nastaveném tlaku 3,5 MPa se výkonnost lisu pohybovala na úrovni 70 $kg.h^{-1}$.

Hodnocené parametry peletek

Po vychladnutí byly u pelet stanoveny jejich základní fyzikální parametry (průměr, délka, hmotnost, vlhkost a sypná hmotnost). Měření probíhala vždy u 50 peletek odebraných náhodným výběrem. Rozměrové parametry peletek byly stanoveny pomocí digitálního posuvného měřidla (Dasqua IP67, Itálie) s přesností na 0,01 mm.
Hmotnost peletek byla stanovena pomocí laboratorních vah (Ohaus PX224, Švýcarsko) s přesností 0,001 g. Vlhkost peletek (%) byla stanovena podle technické normy ČSN EN ISO 18134-2 (2017): Tuhá biopaliva - Stanovení obsahu vody - Metoda sušení v sušárně - Část 2: Celková voda - Zjednodušená metoda. Vzorky byly zváženy v čerstvém stavu a po usušení v laboratorní sušárně po dobu 24 hodin při teplotě 105 °C. Sypná hmotnost peletek byla určena podle technické normy EN ISO 18847 (2016): Tuhá biopaliva - Stanovení sypné hmotnosti pelet a briket.

Významným parametrem vyjadřujícím vlastnosti pelet je pevnost v tlaku (σ). Pevnost v tlaku vyjadřuje odolnost vzorků peletek vůči tlakovým účinkům. Tlakový stres vzniká působením hmotnosti peletek, uložených na sobě během manipulace, skladování nebo přepravě. Tento parametr proto v praxi vyjadřuje jejich případné poškození a má své opodstatnění při logistice. Princip stanovení vychází ze záznamu maximálního zatížení, působícího na vzorek peletky před tím, než se rozpadne. Pevnost peletek v tlaku byla stanovena laboratorně pomocí UTN 5000 (VÚZT v.v.i. Praha, ČR). Vzorky peletek byly stlačovány univerzálním testovacím strojem vybaveným měřičem síly s rozsahem 0-5000 N. Peletky byly upraveny na dvojnásobnou délku průměru tj. 12 mm. Testy byly provedeny při působení tlakové síly, působící ve svislém směru, dokud nedošlo k rozdrcení peletky. Tyto testy byly u každého vzorku peletek provedeny v 5 opakováních. Pro výpočet pevnosti v tlaku byla použita rovnice:

$$\delta = \frac{Fmax}{S}$$

kde:
σ – pevnost v tlaku (MPa)
F_{max} – maximální zatížení (síla) (N)
S – plocha průřezu (m^2).

Dalším hodnoceným parametrem byla mechanická odolnost peletek, vyjadřující jejich odolnost vůči nárazům nebo oděru v důsledku manipulace a přepravy. Zkušební vzorek pelet se podrobí řízeným nárazům vzájemným naražením pelet na stěny komory v otáčejícím se definovaném zkušebním bubnu. Z hmotností vzorku zbývajícího po oddělení odřených a jemně nadrcených částic se vypočítá mechanická odolnost. Mechanická odolnost vyrobených vzorků peletek byla provedena podle technické normy ISO 17831-1 (2015): Tuhá biopaliva - Stanovení mechanické odolnosti pelet a briket - Část 1: Pelety. Měření byla provedena pomocí zařízení na testování mechanické odolnosti pelet, typ PT 500 (VÚZT v.v.i. Praha, ČR). Mechanická odolnost peletek je vyjádřena následující rovnicí:

$$D_U = \frac{\mathrm{m_A}}{\mathrm{m_E}} \cdot 100$$

kde:
D_U – mechanická odolnost (%)
m_A – hmotnost prosátých peletek po otáčení v bubnu (g)
m_E – hmotnost prosátých peletek před otáčením v bubnu (g)

Statistická analýza
Výsledky byly uvedeny jako průměry a standardní odchylka. Analýza rozptylu (ANOVA) a Tukeyho HSD test byly provedeny k určení rozdílů mezi průměry pomocí softwaru „Statistica 12.0“ (ver. 12.0, 2017). Byla provedena analýza rozptylu a výsledky byly porovnány s použitím Tukeyho testu s více rozsahy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky a diskuze
V Tab. 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty průměru, délky, hmotnosti a sypné hmotnosti hodnocených vzorků peletek. U všech hodnocených vzorků byl průměr vyrobených vzorků peletek větší než 6 mm, což odpovídá velikosti použité matrice. Výsledné hodnoty naznačují, že u všech vzorků peletek došlo ke stresové relaxaci materiálu po procesu peletizace. Pocius et al. (2014) uvádí, že lze účinky relaxačního procesu při peletizaci kompostu snížit výběrem vhodné délky kanálů v lisovací matrici i rychlostí průchodu materiálu kanálem. Pokud tyto parametry nejsou vhodně zvoleny, vznikají na povrchu peletek trhliny v důsledku příčných pružných deformací. Důsledkem je rozpadavost peletek a omezená možnost jejich použití.

Tab. 1: Porovnání vybraných parametrů peletizovaného hnojiva

Varianta	Průměrná hodnota sledovaného znaku peletek				
	Průměr (mm)	Délka (mm)	Hmotnost (g)	Vlhkost (%)	Sypná hmotnost ($kg.m^{-3}$)
Var. 1	6,01±0,11[a]	19,49±4,63[a]	0,98±0,26[b]	18,6±0,16[a]	1056,94±21,7[c]
Var. 2	6,02±0,12[a]	18,24±3,10[a]	0,81±0,16[a]	17,2±0,07[a]	981,02±15,3[b]
Var. 3	6,05±1,10[a]	14,83±5,65[b]	0,68±0,34[a]	15,3±0,11[b]	845,34±19,5[a]

Poznámka: Průměrné hodnoty v jednom sloupci následované stejným písmenem se podle Tukeyova HSD testu při $P < 0,05$ významně nelišily.

Průměrná délka peletek se u hodnocených vzorků pohybovala v rozmezí 14,83–19,49 mm, průměrná hmotnost peletek se pohybovala v rozmezí 0,68–0,98 g. Stanovené hodnoty vlhkosti 15,3–18,6 % a sypné hmotnosti se pohybovaly v rozmezí 845,34–1056,94 $kg.m^{-3}$. Zafari a Kianmehr (2013) uvádí, že pro produkci tvarovaného hnojiva je optimální využití peletizačního lisu, který umožňuje dosáhnout vyrovnanou délku peletek, která má velký význam z pohledu přesného dávkování a aplikace na hnojené pozemky. Romano *et al.* (2014) se zabývali hodnocením stejných parametrů u pelet vyrobených z kompostované pevné frakce vepřového hnoje a pevné frakce vepřového hnoje kompostované s dalšími organickými přísadami (piliny, dřevní štěpka, pšeničná sláma). Z výsledků jejich hodnocení vyplývá, že se v závislosti na složení pohyboval průměr od 5,35–5,91 mm, délka od 13,1–30,2 mm, vlhkost 4,18–12,5% a sypná hmotnost 312,2–701,1 $kg.m^{-3}$ v závislosti na zastoupení vstupních surovin a jejich vlhkosti. Brunerová et al. (2020) uvádí u peletizovaného hnojiva z drůbeží podestýlky průměr 5,86 mm, délku 33,03 mm, hmotnost 1,15 g a sypnou hmotnost 1289,7 $kg.m^{-3}$.

V Tab. 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty pevnosti v tlaku, které se u hodnocených vzorků pohybují mezi 16,3–18,4 MPa a mechanické odolnosti, které se pohybují mezi 85,1–97,3 %. Z výsledků je zřejmé že výrazně horší vlastnosti vykazují peletky vyrobené z kompostu s podílem matolin (Var. 3).

Tab. 2: Výsledky pevnosti v tlaku a mechanické odolnosti peletek z kompostu

Varianta	Průměrná hodnota sledovaného znaku peletek	
	Pevnost v tlaku σ (MPa)	Mechanická odolnost (%)
Var. 1	18,4±2,4[a]	97,3[a]
Var. 2	18,0±3,5[a]	96,7[a]
Var. 3	16,3±2,2[b]	85,1[b]

Poznámka: Průměrné hodnoty v jednom sloupci následované stejným písmenem se podle Tukeyova HSD testu při $P < 0,05$ významně nelišily.

Hodnoty mechanické odolnosti neodpovídají úrovni $D_U \geq 97,5$ %, stanovené závaznou technickou normou ISO 17831-1 (2015): Tuhá biopaliva - Stanovení mechanické odolnosti pelet a briket - Část 1: Pelety. V tomto případě jsou uvedené standardy zaměřeny na pelety určené pro energetické účely, nikoliv na tvarovaná organická hnojiva. Pawłowska et al. (2019) uvádí, že mechanická odolnost představuje hlavní indikátor kvality jak pro peletizované tuhé biopalivo tak i pro hnojivo. Tento parametr popisuje pevnost a odolnost pelet vůči mechanickým nárazům, které způsobují otěr a poškození pelet. Tato poškození mohou vznikat skladováním, přepravou a manipulací s peletkami. Pocius et al. (2016) uvádí, že peletizovaná hnojiva mohou být poškozena při aplikaci na půdní povrch působením odstředivé síly rozmetacího ústrojí.

Závěr

Z výsledných hodnot sledovaných mechanicko-fyzikálních vlastností lze kompost ze zahradnických odpadů považovat za perspektivní surovinu vhodnou pro výrobu tvarovaných hnojiv. Kompost lze pro peletizaci využívat jako samotný nebo v kombinaci s vhodnými objemovými činidly. Provedená měření dokládají, že vstupní vlastnosti směsi určené pro výrobu pelet výrazně ovlivňují výsledné fyzikální a mechanické vlastnosti vyrobených pelet. Hodnoty sypné hmotnosti se u hodnocených vzorků pohybovaly v rozmezí 845,34–1056,94 $kg.m^{-3}$, pevnost v tlaku v rozmezí 16,3–18,4 MPa a mechanické odolnosti 85,1–97,3 %. Výsledky realizovaných experimentů naznačují, že z hlediska zajištění rozměrové uniformity pelet bude vhodné využít peletizační lisy umožňující nastavit požadovanou délku pelet. V provozní praxi bude s ohledem na velkou variabilitu kompostových směsí, nutné řešit vedle samotné peletizace rovněž i úpravu vlhkosti a zrnitosti kompostu, případně použitých objemových činidel.

Literatura

BRUNEROVÁ A., MÜLLER M., GÜRDIL G. A. K., ŠLEGR V., BROŽEK M. (2020): Analysis of the physical-mechanical properties of a pelleted chicken litter organic fertiliser. Res. Agr. Eng., 66: 131–139.

EN ISO 18847 (2016): Solid biofuels – Determination of particle density of pellets and briquettes.

HOLMES L. A., TURNER A., THOMPSON R. C. (2014): Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. Marine Chemistry, 167: 25–32.

ISO 17831-1 (2015): Tuhá biopaliva - Stanovení mechanické odolnosti pelet a briket - Část 1: Pelety.

ISO 18134-2 (2017): Tuhá biopaliva - Stanovení obsahu vody - Metoda sušení v sušárně - Část 2: Celková voda - Zjednodušená metoda.

LAWONG W., HWANGDEE P., THUMMA S., LAWONGA CH. (2011): Development of two pellet die organic fertilizer compression machine. Procedia Engineering, 8: 266–269.

MIELDAZYS, R., STULGINSKIS, A., JOTAUTIENE, E., JASINSKAS, A., ABOLTINS, A., (2014): Evaluation of physical mechanical properties of experimental granulated cattle manure compost fertilizer. 16th International Scientific Conference "Engineering for Rural Development", Jelgava, Latvia, 24 - 26 May 2017 2017 pp. 575-580 ref.8

PAWŁOWSKA M., BIELIŃSKA J. E., KASPRZYCKA A. (2019): Influence of storage conditions on a quality of pelletized waste-derived fertilizer. Journal of Ecological Engineering, 20: 226–233.

POCIUS A., JOTAUTIENĖ E., JASINSKAS A., KUČINSKAS V. Investigation of granulation process parameters influence on granulated fertilizer compost properties // Engineering for rural development : 13th international scientific conference : proceedings, May 29-30, 2014. Jelgava, 2014. ISSN 1691-3043. Vol. 13, pp. 407-412.

POCIUS A., JOTAUTIENE E., PEKARSKAS J., PALSAUSKAS M. (2016): Investigation of physical-mechanical properties of experimental organic granular fertilizers. In: Engineering for Rural Development. Jelgava, May 25–27, 2016: 1116–1119.

POGGIO-FRACCARI E., BADER G., ALEMANY L., MARIÑO F. (2020): Pelletized Cu-Ni/CePr5 catalysts for H2 purification via water gas shift reaction. Fuel, 271: 117653.

ROMANO E., BRAMBILLA M., BISAGLIA C., PAMPURO N., PEDRETTI E. F., CAVALLO E. (2014): Pelletization of composted swine manure solid fraction with different organic co-formulates: effect of pellet physical properties on rotating spreader distribution patterns. International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture, 3: 101–111.

TAKAHASHI, S., IHARA, H., KARASAWA, T. (2016): Compost in pellet form and compost moisture content affect phosphorus fractions of soil and compost. Soil Science and Plant Nutrition, 62(4), 399-404.

WERTHER J., SAENGER M., HARTGE E. U., OGADA T., SIAGI Z. (2000): Combustion of agricultural residues. Progress in Energy and Combustion Science, 26: 1–27.

ZAFARI, A., KIANMEHR M. H. (2014): Factors affecting mechanical properties of biomass pellet from compost, Environmental Technology, 35:4, 478-486, DOI: 10.1080/09593330.2013.833639

Poděkování

Příspěvek vychází z řešení projektu OPVVV CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002334 Výzkumná infrastruktura pro mladé vědce a projektu NAZV QK22020032 Analýza a úpravy aplikačních schémat kompostů směřujících k posílení systému ochrany půdy v rámci stabilizace produkční schopnosti.

Kontakt:

prof. Ing. Patrik Burg, Ph.D.
Ústav zahradnické techniky, Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně
Valtická 337, 691 44 Lednice, ČR
+420 519 367 373, patrik.burg@mendelu.cz

4. Kvalita a zpracování produktů

Vybrané parametry pšenice tvrdé pěstované v klimatických podmínkách ČR

Selected parameters of durum wheat grown in the conditions of the Czech Republic

Dvořáček V., Jelínek M., Jágr M. Hermuth J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Abstrakt

Pšenice tvrdá je suchomilný druh pšenice s původem ve Středomoří. V současnosti dochází k introdukci této plodiny do klimatických podmínek Střední Evropy, v ČR se však zatím v podstatě nepěstuje. Proto také není k dispozici příliš relevantních dat z pěstování pš. tvrdé v ČR.

Na základě výše zmíněného byly v pokusné stanici VURV Čáslav v letech 2022 a 2023 pěstovány čtyři jarní odrůdy pšenice tvrdé: Tamadur, Duragold, Ruzydur a Videodur se třemi úrovněmi ošetření: intenzivní, základní a low-input.

Průměrné hodnoty výnosu byly 6,5 t.ha^{-1}, objemové hmotnosti (OH) 80,2 kg.hl^{-1} a obsah bílkovin (NL) 13,96 %. Nejstabilnější hodnoty vykazovala OH (vk 3,2%), NL (vk 13,3 %) a obsah žlutého pigmentu (TYP, vk 10,2 %). Celkově nejkvalitnější odrůdou byla slovenská odrůda IS Duragold. Rozdíl ve výnosu mezi intenzivním a low-input ošetřením činil 1,55 t.ha^{-1}. Z reologického hlediska byl silnější a kvalitnější lepek v ročníku 2022 a současně vyšší amylolytická aktivita škrobu v roce 2023.

Můžeme tedy shrnout, že pokud provedeme vhodný výběr odrůdy, typ ošetření a nedojde k velkým výkyvům z dlouhodobého trendu v počasí, tak může být pšenice tvrdá perspektivní plodinou pro pěstování v řadě lokalit ČR odpovídajícím kukuřičné a řepařské výrobní oblasti.

Klíčová slova:

pšenice tvrdá, kvalita zrna, agrotechnika, reologické parametry

Abstract

Durum wheat is xerophytic wheat species with origin in the Mediterranean. Nowadays, this variety is introduced into the climatic conditions of the Central Europe. However, it is nearly not grown in the Czech Republic. Therefore, there is not too much relevant data from growing of durum wheat in the CZ. Thus, in VURV experimental station in Čáslav, four spring durum wheat varieties: Tamadur, Duragold, Ruzydur a Videodur with three levels of agricultural treatment: intensive, basic and low-input were grown in 2022 and 2023.

Average values of yield were 6.5 t.ha^{-1}, specific weight 80.2 kg.hl^{-1} and contain of proteins 13.96 %. Most stabile values showed specific weight (variation coefficient 3.2%), contain of proteins (variation coefficient 13.3 %) and total yellow pigment (variation coefficient 10.2 %). The variety with the best quality was Slovakian variety IS Duragold. The difference between yield of the intensive and low-input was 1.55 t.ha^{-1}. From the rheological point of view the stronger and better gluten was observed in 2022 and concurrently the higher amylolytic activity of starch in 2023.

We can conclude, that if we make appropriate variety selection, the level of treatment, and there are not a great fluctuation of long-time trend of the weather, so the durum wheat can be considered to be perspective crop for growing in many locations in the Czech Republic responding to the corn and beet regions.

Keywords:

durum wheat, grain quality, agrotechnology, rheological parameters

Úvod

Pšenice tvrdá (*Triticum turgidum* L. *subsp. durum*) se řadí mezi deset nejvýznamnějších obilovin, přičemž její roční produkce dosahuje přibližně 40 milionů tun. To představuje 5 % veškeré celosvětové produkce pšenice. Zrno pšenice tvrdé se zpracovává na speciální hrubou mouku zvanou semolina. Semolina se používá při výrobě tradičních středomořských těstovin, kuskusu a dalších pekárenských produktů (Beres et al., 2020, Wiwart et al. 2024). Mezi nejdůležitější producenty pšenice tvrdé patří země Evropské unie, Kanada, Turecko, Alžírsko, Maroko, USA, Mexiko, Čína a Indie. Evropská unie je v současné době největším producentem pšenice tvrdé na světě s více než 8,0 miliony tun zrna, přičemž nejvíce zrna je produkováno v Itálii. Nejdůležitějším světovým exportérem pšenice tvrdé je však Kanada (Blanco 2024). Středoevropská oblast pěstování pšenice tvrdé zahrnuje především rakouské či německé pěstební oblasti ozimých a v menší míře i jarních forem pšenice tvrdé. Vysokou dynamiku rozvoje domácího šlechtění, a s tím souvisejícím nárůstem produkčních ploch zaznamenalo ale i Slovensko, a to od několika tisíců hektarů v roce 2007 k téměř 70 tis. ha osetých v roce 2023 (Babincová et al. 2023). Obdobný trend bohužel zatím v ČR zaznamenán nebyl, přestože jsou klimatické podmínky v řadě oblastí ČR srovnatelné s klimatickými podmínkami na Slovensku či v Rakousku. Příčinou takřka zanedbatelného pěstování pš. tvrdé v severněji položených zemích střední Evropy jsou méně příznivé povětrnostní podmínky v porovnání s jižní Evropou, která je původní oblastí pěstování pš. tvrdé. Pěstitelé ve střední Evropě totiž čelí vyššímu riziku nízkých zimních teplot s možností vyzimování ozimých odrůd pšenice tvrdé, či vyšší frekvenci výskytu deštivého počasí, především v období finálního dozrávání zrna, které může významně snížit úroveň výnosu, technologické i hygienické kvality zrna. Hygienická kvalita zrna souvisí např. s obecně vyšší citlivostí zrna pšenice tvrdé k fuzariózám (Wyzińska a Różewicz 2021). V České republice až do letošního roku také chyběl specializovaný výrobce semoliny, a tak se případná produkce zrna pšenice tvrdé tuzemské provenience dala uplatnit jen v zahraničí. Tato skutečnost by se ale mohla výrazně zlepšit v důsledku zahájení provozu nového tuzemského mlýna, který bude specializován pouze na výrobu semoliny, jímž je mlýn Faulhammer na Litomyšlsku (otevřen 2024). Na druhé straně by změna středoevropských podmínek, kdy se prodlužují suché periody v kombinaci s vysokými teplotami, mohla svědčit mnohem více pšenici tvrdé než pšenici seté. Technologické požadavky na kvalitu zrna pšenice tvrdé určené pro výrobu těstovin zahrnují tradiční i některé specifické ukazatele. Úroveň požadovaných tradičních parametrů je však především v oblasti bílkovin specifičtější ve srovnání s požadavky na kvalitu zrna pšenice seté. Zpracovatelé semoliny a producenti těstovin vyžadují vysokou objemovou hmotnost (≥ 800 $g.l^{-1}$) a vysoký obsah bílkovin (≥ 13,5%). Mouka musí mít optimální vývoj a pevnost těsta danou velmi silným lepkem, a to i za nízkých hydratačních podmínek (32 %). Ze specifických požadavků lze dále zdůraznit vysokou tvrdost zrna danou nízkou hodnotou tzv. indexu PSI (Particle size index) ≤ 5 % umožňující získání velké výtěžnosti kvalitní semoliny. Významným parametrem je rovněž sklovitost zrna s min. požadavky nad 75 % a optimální jantarová barva zrna spojená s přítomností karotenoidního žlutého pigmentu, způsobujícího charakteristické zlatavé (jantarové) zbarvení semoliny i finálních produktů (Menga et al 2023; Torbica et al. 2016; Cecchini et al. 2021).

Hlavním cílem naší práce bylo posoudit technologickou kvalitu 4 jarních komerčních odrůd pšenice tvrdé pěstované ve středoevropských podmínkách České republiky při tradičním intenzivním, základním a low-input ošetřením.

Materiál a metody

Na lokalitě pokusné stanice VÚRV Čáslav byly na pokusných parcelách s rozsahem 10 m^2 pěstovány čtyři jarní odrůdy pšenice tvrdé (*Triticum turgidum* L. *subsp. Durum*). Pokusy byly provedeny ve standardních čtyřech opakováních ve dvou ročnících 2022 a 2023. Testované materiály zahrnovaly dvě rakouské odrůdy Tamadur a Videodur, slovenskou odrůdu IS

Duragold a tuzemské novošlechtění Ruzydur, které bylo v letošním roce 2024 registrováno v České republice. Předplodinou byla v obou letech řepka olejka. Průběh teplot a srážek v obou ročnících je zobrazen v tabulce č. 1.

Tab. 1 Průběh povětrnostních podmínek na lokalitě Pokusná stanice VÚRV Čáslav

Měsíc / rok	Průměrná teplota ve 2 m (°C)	Dlouhodobý průměr (1961-1990) (°C)	Suma srážek (mm)	Dlouhodobý průměr (1961-1990) (mm)
Únor 2022	4,77	0,4	23,5	22
Březen 2022	4,73	4,3	14,5	33
Duben 2022	8,11	8,6	22,9	36
Květen 2022	16,49	14	44,5	66
Červen 2022	20,74	16,6	76	73
Červenec 2022	20,55	18,4	15,5	83
Únor 2023	2,91	0,4	16,3	22
Březen 2023	6,47	4,3	37,6	33
Duben 2023	8,22	8,6	54,9	36
Květen 2023	14,07	14	32,5	66
Červen 2023	19,15	16,6	31,3	73
Červenec 2023	21,99	18,4	12,4	83

Odrůdy byly ošetřeny ve 3 úrovních: základní, intenzivní a low-input s nízkými vstupy. Základní ošetření (ZO) zahrnovalo jarní hnojení NPK 15:15:15 v dávce 250 kg.ha^{-1} a následné produkční hnojení ledkem amonným s vápencem (LAV 27) v dávce 30 kg N.ha^{-1} na začátku května. Opatření na ochranu rostlin zahrnovala aplikaci přípravků Biathlon a Axial Plus na začátku května spolu s insekticidním přípravkem Rafan Max aplikovaným na začátku června.
Intenzivní ošetření (IO) zachovalo srovnatelnou dávku dusíku, fosforu a draslíku jako základní ošetření (ZO). Produkční hnojení však bylo oproti původní dávce zvýšeno na dvojnásobek, a to s využitím hnojiva LAV 27 v dávce 60 kg N.ha^{-1}. Dále byla zintenzivněna opatření na ochranu rostlin, včetně aplikace herbicidních přípravků Biathlon a Axial na začátku května, následovaná aplikací morforegulátoru Moddus. Dále byl koncem května aplikován insekticid Rafan Max a v červnu fungicid Kantik.
U low-input ošetření (LI) byla rovněž aplikována jarní základní dávka NPK ve stejné úrovni jako u ZO, ale bez dalšího produkčního hnojení. Ochrana plodin byla zajištěna aplikací herbicidních přípravků Biathlon a Axial Plus na začátku května. Dále byl na konci května aplikován přírodní biostimulátor ExelGrow (ADAMA s.r.o.) v dávce 0,6 ml v 0,56 l vody na pokusnou parcelu.
Po sklizni byl hodnocen výnos zrna a objemová hmotnost (OH). Zrno bylo pro návazné analýzy dále zpracováno na celozrnný šrot pomocí laboratorního mlýnku Perten se sítem 0,8 mm. Pro laboratorní stanovení tvrdosti zrna byl využit lab. mlýnek Perten 3300. V případě reologických analýz byl využit domácí šrotový mlýn KOMO vybavený mlecími kameny s návazným prosevem celozrnné mouky na sítě s okem 1 mm.
Z technologických požadavků byl sledován obsah hrubých bílkovin dle Kjeldahla - EN ISO 20483, tvrdosti zrna (particle size index – PSI) dle metody AACC 55-30, obsah mokrého lepku a gluten index laboratorně dle metody ICC Standard N°155 a stanovení obsahu celkových karotenoidů s využitím upraveného postupu stanovení tzv. žlutého pigmentu (TYP) dle metody Digesù et al. (2009).
Reologické vyhodnocení u dvou kontrastních ošetření (IO a LI) bylo provedeno na přístroji Mixolab I (Chopin, Francie) dle metody ICC N°173 a zpracováno příslušným softwarem

Mixolab v 4.05. Přístroj umožňuje měření reologických vlastností těsta, které je současně vystaveno mechanickému hnětení a zahřívání s teplotním gradientem až do 90°C. Tento přístroj je tak schopen poskytnout informace o reologických vlastnostech bílkovin i škrobu. Reologická křivka má pět fází C1 - C5. Fáze C1 je počáteční fází míchání, udává maximální konzistenci těsta a dobu jeho vývoje před dalším kontinuálním zahříváním. Bod C2 měří min. zeslabení bílkovin během období zahřívání. Bod C3 měří maximální odpor (viskozitu) těsta při jeho max. zahřátí. Bod C4 měří stabilitu těsta (škrobového gelu) během max. zahřívání a bod C5 souvisí s retrogradací škrobu ve fázi postupného zchlazování (Dubat 2010).
Software Statistica 7.1 CZ byl použit pro základní statistické analýzy (průměr, standardní směrodatná odchylka – St. Dev., variační koeficient), pro statistickou analýzu vlivu hlavních faktorů (ANOVA) a na ní navázaný porovnávací post-hoc Tukey HSD test.

Výsledky a diskuze

Průměry a vyhodnocené statistické parametry variability sledovaných technologických parametrů zrna čtyř zvolených odrůd a tří úrovní ošetření jsou zachyceny v tabulce 2. Průměrné hodnoty výnosu (6,5 t.ha^{-1}), objemové hmotnosti (OH = 80,2 kg.hl^{-1}) i obsahu bílkovin (NL = 13,96 %) byly vysoké, vyhovující standardním požadavkům zpracovatelů (Cecchini et al. 2021). Na druhé straně obsah mokrého lepku (ML = 26,3 %) i hodnota gluten indexu (GI = 56,7 %) byla spíše podprůměrná. Zjištěná průměrná tvrdost zrna (PSI = 4,8%) potvrzovala nízké procento prosevu, tedy vysokou tvrdost zrna typickou pro pšenici tvrdou (Božek et al 2022). Průměrná úroveň celkového žlutého pigmentu (TYP = 8,7 µg.g^{-1}) patřila při srovnání s italskými odrůdami ve studii Menga et al. (2023) k velmi vysokým hodnotám.
Nejvyšší variabilitu vykazovaly charakteristiky lepku zahrnující gluten index (GI) s úrovní variačního koeficientu (vk = 59,2 %) a obsah mokrého lepku (ML) s vk = 31,4 %. Naopak odrůdově i v rámci vlivu ročníku a ošetření byla nejstabilnějším parametrem OH s vk = 3,2 %. Nižší variability byly rovněž zjištěny u obsahu TYP (vk = 10,2 %) a NL (vk = 13,3 %), a to především ve srovnání s PSI (vk = 20,0 %), který je uváděn dle Morris et al. 2002 jako genotypově silně vázaný parametr.

Tab. 2 Dvouletá variabilita parametrů zrna pšenice tvrdé pěstované na lokalitě Čáslav ve třech odlišných úrovních ošetření (2022 – 2023)

Parametry	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef (%)
Výnos (t.ha^{-1})	6,48	3,42	9,21	1,40	21,56
OH (kg.hl^{-1})	80,20	71,10	85,30	2,53	3,15
NL (%)	13,96	9,73	17,48	1,86	13,34
ML (%)	26,27	0,00	40,10	8,26	31,44
GI (%)	56,71	0,00	93,80	33,59	59,23
PSI (%)	4,84	3,55	8,45	0,97	20,02
TYP (µg.g^{-1})	8,70	6,59	9,98	0,89	10,19

OH - objemová hmotnost, NL - obsah proteinů, ML - mokrý lepek, GI - gluten index, PSI - particle size index, TYP - total yellow pigment - obsah žlutého pigmentu

Statistické vyhodnocení vlivu 3 hlavních sledovaných faktorů (odrůda, ročník a úroveň ošetření) na hodnocené parametry je uvedeno v tabulce 3. S výjimkou faktoru ošetření v případě parametru GI byl vliv všech tří sledovaných faktorů na ostatní parametry statisticky signifikantní. Za odrůdově vysoce specifický parametr lze na základě našeho souboru považovat především obsah celkového žlutého pigmentu (TYP), a dále také obsah proteinů (NL). Vysokou odrůdovou diferenci pak také ukázal parametr Gluten index (GI). V případě odrůdy Ruzydur byla jeho průměrná hodnota v porovnání s hodnotami ostatních odrůd (GI =

72 – 74 %) jen 6,2 %. To bude, i přes jednoznačně nejvyšší průměrný obsah NL (15,4 %) a ML (mokrého lepku), (32,3 %) u této odrůdy, limitovat její těstárenské využití, kde je požadována vysoká síla lepku (Cecchini et al. 2021).

Za technologicky nejkvalitnější odrůdu lze v průměru označit IS Duragold. Ten, společně s odrůdou Videodur, vykazoval nejvyšší výnos zrna (7,0, resp. 7,1 $t.ha^{-1}$) a pevnost lepku (74,6 %, resp. 73,6 %). V porovnání s odrůdou Videodur měl ovšem IS Duragold dále signifikantně vyšší OH (objemovou hmotnost), (81,7 $kg.hl^{-1}$) i vyšší obsah NL (14,0 %). Odrůda Videodur pak vykazovala průměru signifikantně vyšší obsahy celkového žlutého pigmentu (TYP = 9,58 $\mu g.g^{-1}$).

Nízká úroveň ošetření v low-input variantě signifikantně nejvíce snižovala výnos zrna (5,5 $t.ha^{-1}$), obsah hrubých bílkovin (NL = 12,8 %) a mokrého lepku (ML = 23,8 %). Je tak zřejmé, že aplikace pouze jarní základní dávky hnojení 37,5 kg $N.ha^{-1}$ vedla ke snížení produkčních i bílkovinných parametrů zrna. Současně ani aplikace biostimulačního přípravku ExcelGrow tento nedostatek dusíku v půdě nedokázala zkompenzovat. Na druhou stranu vyšší dávka N-hnojení při intenzivním ošetření v porovnání se základním ošetřením výraznější signifikantní diference v testovaných parametrech nepotvrdila. Oproti základnímu ošetření totiž vedlo intenzivní ošetření k signifikantně vyššímu výnosu o necelé 0,2 $t.ha^{-1}$ a pouze mírně vyššímu parametru GI. Za nejstabilnější parametry v různých podmínkách ošetření pak lze považovat především OH a TYP, které jsou obecně považovány za geneticky silně fixované (Gasparis et al. 2023; Digesù et al. 2009).

Dále je nutné zmínit, že rozdílný průběh povětrnostních podmínek v ročnících 2022 a 2023, popsaný v metodické části, zcela zásadně a signifikantně ovlivnil většinu sledovaných parametrů. Zatímco chladnější a vlhčí podmínky ročníku 2023 přispěly k lepšímu odnožení a vývoji klasů, což se signifikantně odrazilo ve vyšším výnosu zrna, úroveň technologických parametrů, především NL a ML, byla výrazně horší. Hodnota GI pak sice byla o něco vyšší, to je ale způsobeno vyšším podílem ML v ročníku 2022 a předpokládaným růstem gliadinové frakce odpovědné za větší tažnost lepku (Xu et al. 2007). Propad technologické kvality v ročníku 2023 pak lze pravděpodobně také vysvětlit nižší N-výživou v rámci základního a low-input ošetření, která pravděpodobně nekorespondovala s vytvářeným výnosovým potenciálem porostů.

Tab. 3 Statistické vyhodnocení vlivu tří hlavních faktorů (odrůda, ošetření, ročník) na vybrané technologické parametry zrna pšenice tvrdé

Faktory		Výnos ($t.ha^{-1}$)	OH ($kg.hl^{-1}$)	NL (%)	ML (%)	GI (%)	PSI (%)	TYP ($\mu g.g^{-1}$)
Odrůda	IS Duragold	$7{,}01^{a}$	$81{,}68^{a}$	$14{,}04^{c}$	$25{,}13^{ab}$	$74{,}55^{a}$	$4{,}85^{ab}$	$9{,}21^{c}$
	Ruzydur	$5{,}44^{b}$	$76{,}87^{b}$	$15{,}41^{d}$	$32{,}26^{c}$	$6{,}23^{b}$	$4{,}57^{a}$	$7{,}54^{a}$
	Tamadur	$6{,}39^{c}$	$81{,}77^{a}$	$12{,}96^{a}$	$22{,}29^{a}$	$72{,}45^{a}$	$5{,}20^{b}$	$8{,}45^{b}$
	Videodur	$7{,}08^{a}$	$80{,}47^{c}$	$13{,}43^{b}$	$25{,}38^{b}$	$73{,}60^{a}$	$4{,}72^{a}$	$9{,}58^{d}$
Ošetření	Základní	$6{,}89^{a}$	$80{,}03^{a}$	$14{,}56^{a}$	$27{,}73^{a}$	$53{,}60^{a}$	$4{,}51^{a}$	$8{,}55^{a}$
	Intenzivní	$7{,}06^{a}$	$80{,}80^{b}$	$14{,}49^{a}$	$27{,}24^{a}$	$58{,}69^{a}$	$4{,}53^{a}$	$8{,}80^{b}$
	Low-input	$5{,}49^{b}$	$79{,}77^{a}$	$12{,}83^{b}$	$23{,}82^{b}$	$57{,}83^{a}$	$5{,}47^{b}$	$8{,}74^{ab}$
Ročník	2022	$5{,}69^{a}$	$79{,}91^{a}$	$15{,}23^{b}$	$32{,}02^{b}$	$53{,}35^{a}$	$4{,}27^{a}$	$8{,}90^{b}$
	2023	$7{,}28^{b}$	$80{,}49^{b}$	$12{,}69^{a}$	$20{,}52^{a}$	$60{,}07^{b}$	$5{,}40^{b}$	$8{,}49^{a}$

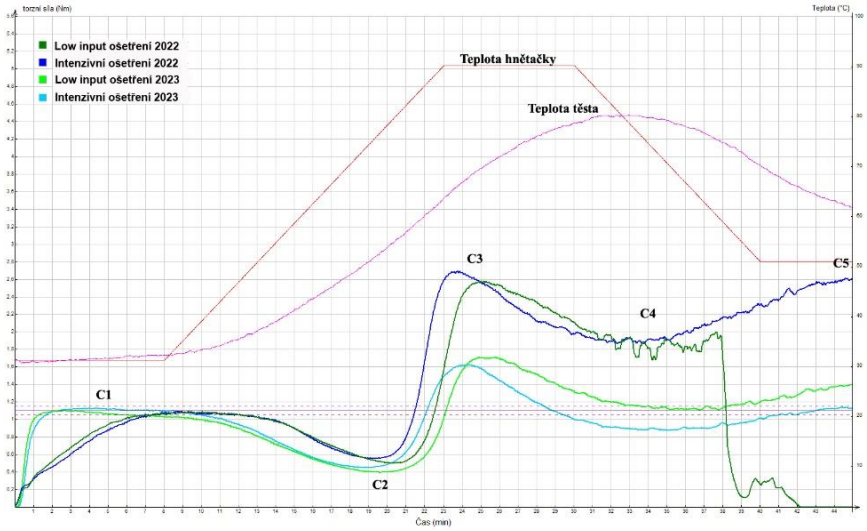
OH - objemová hmotnost, NL - obsah proteinů, ML - mokrý lepek, GI - gluten index, PSI - particle size index, TYP - total yellow pigment - obsah žlutého pigmentu hodnoty s odlišnými písmennými indexy jsou statisticky signifikantní pro $p < 0{,}05$ (ANOVA s návazným Tukey HSD testem)

Potvrzení technologického propadu v ročníku 2023 i vliv dvou výrazně odlišných ošetření (intenzivní vs. low-input) pak popisují reologické záznamy zpracované celozrnné mouky na obrázku 1A – 1D. Z ročníkového srovnání testovaných odrůd vyplývá významný rozdíl v době vývinu těsta (C1), který byl u všech odrůd z ročníku 2022 významně pomalejší ve srovnání s ročníkem 2023. To naznačuje mnohem silnější a kvalitnější lepek v ročníku 2022. Současně byla v ročníku 2023 zřejmá i výrazně nižší viskozita škrobu (C3) a vyšší poklesy křivky v bodě C4 charakterizující vyšší amylolytickou aktivitu škrobu. To mohlo souviset s vlhčím průběhem ročníku 2023.

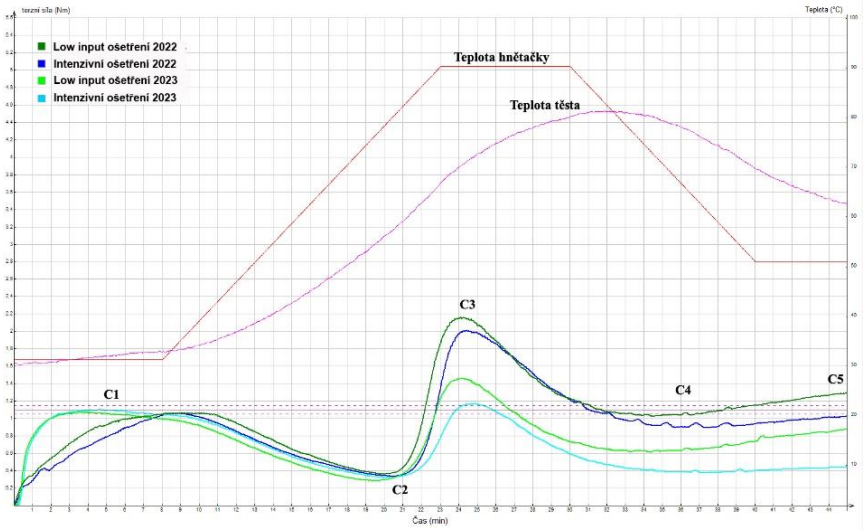
V případě low-input ošetření pak v ročníku 2022 došlo, s výjimkou odrůdy Ruzydur, ke ztrátě rezistence odporu těsta v teplotně namáhané škrobové části křivky (C3 – C5). Obdobný efekt low-input ošetření na ztrátu rezistence těsta byl opětovně pozorován i v ročníku 2023 u odrůdy Tamadur a rovněž téměř na konci hnětení i u odrůdy Videodur. Domníváme se, že tento efekt mohl být způsoben kombinací nízké pevnosti lepku (v důsledku suboptimální N-výživy při tomto ošetření), ale také mechanickým poškozením škrobu při celozrnném vymílání těchto tvrdosemenných obilných druhů. Je zřejmé, že tato vlastnost by se mohla negativně odrazit ve finálním zpracování těstovin, nebo v jejich návazné kulinářské úpravě.

Z našeho zjištění nám nejsou známy obdobné reologické studie celozrnných mouk na bázi pšenice tvrdé s využitím Mixolabu. Reologické vlastnosti deklarované kvalitní semolinové mouky, které charakterizovali Cecchini et al. 2021, jsou ve srovnání s naším zjištěním významně odlišné, a to především ve škrobové části křivky. Zde totiž nedocházelo k poklesu křivky v bodě C4 (amylolytická aktivita) a tato křivka významně stoupala až do bodu C5 (retrogradace škrobu). V proteinové části křivky (C1 – C2) vykazovala v této studii kvalitní semolinová mouka ve srovnání s naší celozrnnou moukou z ročníku 2022 o něco kratší vývoj těsta (C1), ale zároveň i jeho delší stabilitu.

1A: Odrůda IS Duragold

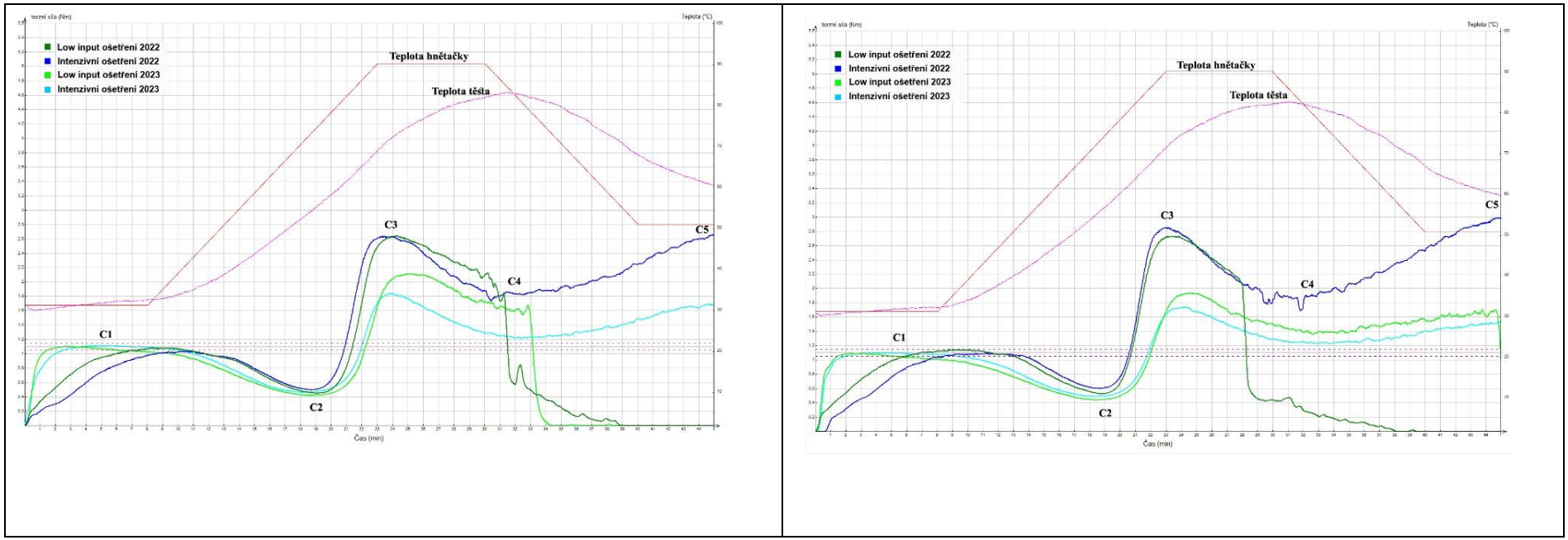


1B: Odrůda Ruzydur



1C: Odrůda Tamadur

1D: Odrůda Videodur



Obr. 1A - 1D Srovnání reologických vlastností 4 jarních odrůd pšenice tvrdé pěstované ve dvou úrovních ošetření (low-input a intenzivní)

Závěr

Kvalita zrna pšenice tvrdé pěstované v ČR závisí na zvolené odrůdě, způsobu ošetření, zejména aplikaci dusíku, a v neposlední řadě také na povětrnostních podmínkách v daném roce. Z testovaných odrůd se ukázala jako nejkvalitnější odrůda IS Duragold. Nejvyšší výnos a další technologické a nutriční parametry vykazovalo intenzivní ošetření, nicméně rozdíly mezi intenzivním a základním ošetřením nebyly příliš velké. Naopak reologická studie ukázala, že má low-input ošetření poněkud záporný vliv na dobu vývoje těsta a další reologické parametry. Můžeme tedy shrnout, že pokud provedeme vhodný výběr odrůdy, typ ošetření a nedojde k velkým výkyvům z dlouhodobého trendu v počasí, tak může být pšenice tvrdá perspektivní plodinou pro pěstování v řadě lokalit ČR odpovídajícím kukuřičné a řepařské výrobní oblasti.

Literatura

1. Beres, B. L.; Rahmani, E.; Clarke, J. M.; Grassini, P.; Pozniak, C. J.; Geddes, C. M.; ... & Ransom, J. K. A systematic review of durum wheat: Enhancing production systems by exploring genotype, environment, and management (G× E× M) synergies. Frontiers in Plant Science 2020, 11, 568657.
2. Wiwart, M.; Suchowilska, E.; Stuper-Szablewska, K.; Przybylska, A.; Wachowska, U. & Gontarz, D. Variation in the concentrations of phenolic compounds and carotenoids in the grain of a large collection of Triticum durum Desf. accessions. Journal of Cereal Science 2024, 116, 103842
3. Blanco, A. Structure and trends of worldwide research on durum wheat by bibliographic mapping. International Journal of Plant Biology 2024, 15, 132-160.
4. Babincová, Z. Súpis Plôch Osiatych Poľnohospodárskymi Plodinami k 20. 5. 2023. Statistical Office of the Slovak Republic. 2023. (In Slovak). Dostupné online: https://slovak.statistics.sk/wps/portal/ext/products/publikacie/ (accessed on 15 October 2023).
5. Wyzińska, M. & Różewicz, M. Durum wheat–crop cultivation strategies, importance and possible uses of grain. Polish Journal of Agronomy 2021, 44, 30-38.
6. Menga, V.; Giovanniello, V.; Savino, M.; Gallo, A.; Colecchia, S.A.; De Simone, V.; Zingale, S.; Ficco, D.B.M. Comparative analysis of qualitative and bioactive compounds of whole and refined flours in durum wheat grains with different year of release and yield potential. Plants 2023, 12, 1350.
7. Torbica, A.; Draskovic, M.; Tomic, J.; Dodig, D.; Boskovic, J.; Zecevic, V. Utilization of Mixolab for assessment of durum wheat quality dependent on climatic factors. Journal of Cereal Science 2016, 69, 344-350.
8. Cecchini, C., Bresciani, A., Menesatti, P., Pagani, M. A., & Marti, A. (2021). Assessing the rheological properties of durum wheat semolina: A review. Foods, 10(12), 2947.
9. Digesù, A.; Platani, C.; Cattivelli, L.; Mangini, G.; Blanco, A. Genetic variability in yellow pigment components in cultivated and wild tetraploid wheats. J. Cereal Sci. 2009, 50, 210–218.
10. Dubat A, Rosell CM, Gallagher E. Mixolab: a new approach to rheology: AACC International (2016)
11. Bożek, K. S., Żuk-Gołaszewska, K., Bojarczuk, J., & Gołaszewski, J. (2022). The effect of different nitrogen fertilizer rates, sowing density, and plant growth regulator application on the quality and milling value of Triticum durum Desf. grain. Agronomy, 12(7), 1622.
12. Morris, C. F. 2002. Puroindolines: The molecular genetic basis of wheat grain hardness. Plant Mol. Biol. 48:633-647.
13. Gasparis, S., & Miłoszewski, M. M. (2023). Genetic basis of grain size and weight in rice, wheat, and barley. International Journal of Molecular Sciences, 24(23), 16921.
14. Xu, J., Bietz, J. A., & Carriere, C. J. (2007). Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. Food Chemistry, 101(3), 1025-1030.

Poděkování

Tato výzkumná studie byla financována Ministerstvem zemědělství České republiky prostřednictvím projektu číslo QK22010029 a institucionální podporou v rámci projektu číslo MZE-RO0423.

Kontakt:

Mgr. Michael Jelínek, Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i
Drnovská 507/73, Praha 6 - Ruzyně, 161 00
732 987 997, michael.jelinek@vurv.cz

Vliv odrůdy a agroekologických podmínek na obsah volného asparaginu v zrnu různých druhů obilovin

The influence of variety and agroecological conditions on the content of free asparagine in the grain of different types of cereals

Dvořák P.[1], Hradecká B.[2], Pírová H.[2], Satranský M.[1], Král M.[1], Vršťala J.[1], Kouřimský T.[2], Stará L.[2], Capouchová I.[1], Hajšlová J.[2]

[1]*Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra agroekologie a rostlinné produkce, Kamýcká 129, Praha 6 Suchdol*

[2]*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 3, Praha 6 Dejvice*

Abstrakt
Příspěvek přináší informace o obsahu volného asparaginu (Asn) v zrnu obilovin vypěstovaných v ČR na 11 lokalitách. Zhodnocuje vliv druhu a odrůdy, dále způsobu pěstování (KON a EKO), intenzity produkce v KON a také vliv lokality. Obsah Asn byl průkazně ovlivněn druhem obiloviny. Vliv odrůdy či technologie pěstování měl efekt slabší. Oves nahý (995 mg/kg Asn) a žito seté (922 mg/kg Asn) vykazovaly nejvyšší množství Asn, následovala je pšenice špalda (328 mg/kg Asn). Nejnižší obsah Asn byl u pšenice seté (u pšenice jarní 256 mg/kg Asn a u pšenice ozimé 239 mg/kg Asn). Avšak odrůdy pšenice seté a špaldy se v obsahu Asn lišily až o 276 %. Odrůdy pšenice jakostní skupiny E („elitní“) a také vzorky vypěstované konvenčním způsobem měly tendenčně nižší hodnoty Asn. Závěrem lze říci, že hladina volného Asn může být ovlivněna správným výběrem druhu a odrůd obilovin.
Klíčová slova:
akrylamid, kultivar, konvenční zemědělství, ekologické zemědělství, výběr lokality

Abstract
The paper provides information on the content of free asparagine (Asn) in cereal grains grown in the Czechia at 11 locations. It evaluates the influence of the species and variety, as well as the method of cultivation (CON and ECO), the intensity of production in the KON and also the influence of the location. The content of Asn was significantly influenced by the type of cereal. The influence of variety or cultivation technology had a weaker effect. Naked oats (995 mg/kg Asn) and rye (922 mg/kg Asn) showed the highest amount of Asn, followed by spelled wheat (328 mg/kg Asn). The lowest Asn content was in sown wheat (256 mg/kg Asn in spring wheat and 239 mg/kg Asn in winter wheat). However, common wheat and spelled varieties differed in Asn content by up to 82%. Wheat varieties of quality group E ("elite") as well as conventionally grown samples tended to have lower Asn values. In conclusion, the level of free Asn can be highly influenced by the correct selection of species and varieties.
Keywords:
acrylamide, cultivar, conventional farming, organic farming, site selection

Úvod

Vzhledem k tomu, že výrobky na bázi obilovin jsou jedním z hlavních dietetických přispěvatelů k akrylamidu ve všech kategoriích spotřebitelů (EFSA, 2015), je nutné identifikovat faktory, které mohou vést k vysokým hladinám asparaginu (klíčového prekurzoru tvorby akrylamidu v obilovinách). Koncentrace volného asparaginu byla u pšenice a dalších obilovin identifikována jako hlavní determinant potenciálu tvorby akrylamidu (Mottram et al., 2002; Raffan and Halford, 2019). Akrylamid je klasifikován jako pravděpodobný lidský karcinogen skupiny 2A (IARC, 1994). Snížení obsahu asparaginu v obilovinách pak může významně přispět ke snížení akrylamidu (Tafuri et al., 2023).

Materiál a metody

Cílem této studie bylo zmapovat v ČR obsah volného asparaginu v pěstovaných obilovinách a prozkoumat vliv několika faktorů, včetně ekologického a konvenčního pěstování, úrovně ošetření (dusíkem a fungicidů) a především místa a podmínek pěstování. V této rozsáhlé studii bylo shromážděno více než 400 vzorků obilovin (pšenice – ozimé a jarní, žita, ovsa nahého a špaldy) z 11 různých lokalit (pokusné stanice ÚKZÚZ a lokality SDO s ekologicky certifikovanou plochou) a analyzovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (U-HPLC) spojené s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. Založení a vedení pokusů probíhalo dle plodinových metodik ÚKZÚZ a u ekologických lokalit pěstování odpovídalo zásadám ekologického zemědělství (tj. bez použití průmyslových hnojiv a pesticidů a regulace plevelů probíhala pouze mechanickou cestou). V konvenčním zemědělství byla zhodnocena i intenzita pěstování (standartní „neošetření varianta“, tj. základní dávka dusíku bez ošetření morforegulátorem a bez fungicidu a intenzivní „ošetřená varianta“ základní dávka dusíku zvýšena o 40 kg/ha s morforegulátorem a s dvěma fungicidy).

Výsledky

Výsledky ukázaly, že obsah asparaginu významně závisel na typu obiloviny (Tab. 1). Nejvyšší hladiny volného asparaginu byly zjištěny u ovsa nahého (995,1 mg/kg) a žita (922,2 mg/kg), které jsou často vyhledávanou alternativou k pšeničné mouce. Oves se využívá nejčastěji k výrobě ovesných vloček a ty následně pro výrobu ovesné mouky. Vločky se však nejčastěji používají do müsli a ovesná mouka stejně jako žitná k výrobě pečiva. Vyšší hladina volného asparaginu byla zjištěna také u pšenice špaldy (328,2 mg/kg). I tento obsah u špaldy byl statisticky průkazně vyšší než u pšenice ozimé (239,8 mg/kg).

Tabulka 1. Vliv druhu obilovin na obsah volného asparaginu v zrnu (mg/kg)

Druh	Asparagin
Pšenice ozimá	**239,8c**
Pšenice jarní	**256,2bc**
Pšenice špalda	**328,2b**
Žito	**922,2a**
Oves nahý	**995,1a**
$HSD_{0.05}$	*86,9*
Průměr	*547,2*

Obsahy volného asparaginu u pšenice seté byly dále ovlivněny i jejich pěstitelskou formou (ozim a jařina) a zatříděním do jakostních skupin (E, A, B). To je patrné z tabulky 1 a 2.

Tabulka 2. Vliv odrůdy na obsah volného asparaginu v zrnu (mg/kg)

Druh	Odrůdy	Asparagin
Pšenice ozimá	**E**	**236,2**
	A	**242,3**
Pšenice jarní	**E**	**233,5**
	A	**251,9**
	B	**271,6**
Žito	**Hybridní**	**912,5**
	Populační	**920,5**

U odrůd pšenice seté zatříděných do elitní skupiny odrůd (E) měly, jak jarní (243,3 mg/kg) tak ozimé formy (236,2 mg/kg), nejnižší obsah volného asparaginu v zrnu v porovnání s ostatními jakostními skupinami (A a B). To naznačuje, že jak v případě kvalitativních parametrů, bude i

obsah volného asparaginu z hlediska volby odrůdy možným opatřením pro zlepšení kvality, resp. ke snížení této aminokyseliny jako prekursoru akrylamidu.
Tento příspěvek přináší vůbec první komplexní zhodnocení elitních (E) a kvalitních (A) odrůd pšenic pěstovaných běžně v ČR. Význam odrůd a jejich reakcí na agrotechnické postupy budou dále ověřovány v polních pokusech. Tato studie představuje výchozí bod a bude dále zpřesňována. U žita setého byl z pohledu odrůd zjištěn trend nižšího obsahu volného asparaginu u hybridních odrůd (Tab. 2).

Diskuze

Druh obilniny měl obou systémech pěstování zásadní vliv na obsah volného asparaginu a výběr konkrétní obilniny tak bude mít vliv i na výsledný obsah akrylamidu ve výsledných výrobcích. Naše výsledky korespondují se závěry studie Rapp et al. (2018), kde průměrný obsah asparaginu se u různých kultivarů pšenice pohyboval od 143 do 393 mg/kg. Malunga et al. (2019) zjistili, že obsah asparaginu v kanadské pšenici se pohyboval od 302 do 965 mg/kg. To jsou relativně vyšší hodnoty, než ty které byly zjištěny u odrůd pšenice v podmínkách ČR (od 95 do 353 mg/kg). Podobně i studie Stockmann et al. (2018)) uvádí, že nejvyšší množství volného asparaginu vykazovalo žito (686 mg/kg), průměrná hladina asparaginu se zde u pšenice seté pohybovala na úrovni 132 mg/kg a u špaldy jen na 105 mg/kg.
Jsme přesvědčeni, že hledání a testování dalších genotypů a zavedení inovativních opatření, může vysoký obsah volného asparaginu především u ovsa nahého a žita setého ještě snížit. Neboť potravinářský průmysl bude vyžadovat odrůdy, na které se lze spolehnout, tj. na odrůdy s nízkým obsahem asparaginu vypěstovaných v různých prostředích a letech sklizně (Curtis et al., 2018; Žilić et al., 2020).

Tabulka 3. Vliv lokality na obsah asparaginu (mg/kg) u pšenice ozimé

Lokalita	Nadmořská výška (m)	Dlouhodobá průměrná teplota (°C)	Dlouhodobý průměrný úhrn srážek (mm)	Výrobní oblast	asparagin
Soběkury	390	8,3	570	OVO	**323,2**
Žabčice	187	10,2	491	KVO	**302,1**
Branišovice	190	10,1	482	KVO	**265,6**
Čáslav	260	9,6	580	ŘVO	**256,0**
Uhříněves	295	8,3	575	ŘVO	**248,9**
Stupice	287	9,7	537	ŘVO	**229,6**
Domanínek	572	7,7	604	BVO	**184,9**
Zvíkov	490	7,2	634	OVO	**163,6**
Chrastava	345	8,7	791	BVO	**136,2**

Ročníkové rozdíly a změna i základních klimatických podmínek může mít vliv na akumulaci asparaginu (Tafuri et al. 2023). To je patrné i z výsledků 11 lokalit, které spadaly do všech hlavních pěstitelských oblastí (Tab. 3 a 4) a obsah asparaginu byl v průměru zde pěstovaných odrůd pšenice ozimé tendenčně vyšší na lokalitách s nižší nadmořskou výškou (kromě lokality Soběkury) a u jarních forem pšenice byla vyšší hladina volného asparaginu v zrnu zjištěna spíše na lokalitách s vyšší nadmořskou výškou (Tab. 4).

Tabulka 4. Vliv lokality na obsah asparaginu (mg/kg) u pšenice jarní

Lokalita	Nadmořská výška (m)	Dlouhodobá průměrná teplota (°C)	Dlouhodobý průměrný úhrn srážek (mm)	Výrobní oblast	asparagin
Domanínek	572	7,7	604	BVO	**325,3**
Chrastava	345	8,7	791	BVO	**296,4**
Uhříněves	295	8,3	575	ŘVO	**284,3**
Chrlice	190	9,4	456	ŘVO	**279,9**
Stupice	287	9,7	537	ŘVO	**247,1**
Zvíkov	490	7,2	634	OVO	**219,0**
Čáslav	260	9,6	580	ŘVO	**214,1**
Kujavy	260	8,8	655	BVO	**199,9**

Autoři z italské studie (Tafuri et al. 2023), kde testování pšenice seté probíhalo na třech italských lokalitách po dobu dvou let, se obsahy volného asparaginu v prvním roce pohybovaly od 99 do 282 mg/kg sušiny a ve druhém roce od 55 do 284 mg/kg sušiny (u 18 genotypů) a hodnotili možné vlivy prostředí a genetické vlivy na tento znak.
A proto v následujících letech budou dále i v podmínkách ČR podrobněji sledovány i role dalších prvků životního prostředí pro akumulaci asparaginu, tak abychom mohli identifikovat odrůdy pšenice, které vykazují nízkou hodnotu a dobrou stabilitu v obsahu asparaginu mezi roky a lokalitami.
Základní zhodnocení obsahu asparaginu v zrnu proběhlo i z pohledu úrovně a intenzity pěstování obilnin. Výsledky u konvenčně pěstovaných obilovin jsou vesměs dostupné, ale u obilnin z ekologického systému pěstování téměř zcela chybí. A proto výsledky o vlivu pěstitelského systému (konvenčního a ekologického) na obsah volného asparaginu uvádí tabulka 5. Tato studie přináší kromě ekologicky pěstované pšenice seté, i první informace o vlivu ekologického systému na obsah asparaginu v zrnu u pšenice špaldy, žita a ovsa nahého.

Tabulka 5. Vliv způsobu pěstování na obsah volného asparaginu v zrnu (mg/kg) u jednotlivých druhů obilovin

Druh	EKO	KON	$HSD_{0.05}$
Pšenice ozimá	**270,0a**	**240,9a**	*60,49*
Pšenice jarní	**268,8a**	**259,3a**	*54,99*
Pšenice špalda	**328,2**	--	--
Žito	**910,6a**	**916,7a**	*105,9*
Oves nahý	**879,0a**	**1088,7a**	*298,9*
průměr	*531,3*	*626,4*	--

Je zajímavé, že výsledek není jednoznačný ani pro jeden systém pěstování, neboť ekologický systém (EKO) tendenčně zvyšoval hladiny asparaginu u pšenice a naopak neprůkazně snižoval vysoké hodnoty u žita a ovsa v porovnání s konvenční technologií (KON).
V rámci sledovaných druhů a jejich odrůd se obsahy volného asparaginu lišily až o 276 % u pšenice ozimé, o 116 % u pšenice jarní, u špaldy o 458 %, u žita pouze o 39 % a o 116 % u ovsa nahého.
Významný vliv měla také intenzita pěstování v rámci konvenčního systému (Tab. 6). Tendenčně nižší hladina volného asparaginu byla zjištěna u odrůd, které byly pěstovány na nižší pěstitelské úrovni (Standard) s pouze základní dávkou dusíku, namořeným osivem bez ošetření morforegulátory či bez ošetření fungicidy. Naopak u „Intenzity“ tj. při zvýšené základní dávce dusíku o 40 kg/ha, s aplikací morforegulátoru a fungicidu (v případě potřeby či silného tlaku choroby) byly u všech hodnocených druhů tendenčně vyšší hodnoty asparaginu (Tab. 6).

Minimální rozdíly mezi standartní a intenzivní variantou byly u pšenice ozimé a nejvyšší rozdíly byly u žita.

Tabulka 6. Vliv intenzity pěstování v konvenčním zemědělství na obsah asparaginu v zrnu (mg/kg)

Druh	Standard	Intenzita	$HSD_{0.05}$
Pšenice ozimá	**210,4a**	**213,1a**	*30,53*
Pšenice jarní	**246,9a**	**258,8a**	*21,81*
Žito	**915,8a**	**935,2a**	*73,29*
průměr	*457,7*	*469,0*	--

Závěr

Závěrem lze říci, že tyto výsledky naznačují, které genetické materiály a postupy mohou být užitečné pro další práci z pohledu šlechtění, jeho nasměrování a rozhodování pro další snížení volného asparaginu v zrnu obilovin. Nejvyšší obsahy volného asparaginu byly zjištěny u ovsa nahého a žita setého.

Přestože uvedené údaje jsou předběžné, bude třeba je potvrdit dalšími výsledky. Naše analýzy naznačují, že jak genetika, tak prostředí mohou ovlivnit akumulaci volného asparaginu v zrnu obilovin. Z pohledu volby odrůdy či jakostních skupin výsledky naznačují, že volba elitních potravinářských odrůd (E) podporuje záměr eliminovat obsah asparaginu v zrnu a následně i tvorbu akrylamidu v pekařských výrobcích.

Literatura

Curtis, T.Y.; Powers, S.J.; Wang, R.; Halford, N.G. Effects of variety, year of cultivation and sulphur supply on the accumulation of free asparagine in the grain of commercial wheat varieties. *Food Chem.* 2018, 239, 304–313

Malunga, L. N., Ames, N. P., Masatcioglu, M. T., Khorshidi, A. S., Thandapilly, S. J., Cuthbert, R. D., ... & Scanlon, M. G. (2019). Free asparagine concentrations in Canadian hard red spring wheat cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, *99*(3), 338-347.

Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., & Dodson, A. T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, *419*(6906), 448-449.Stockmann, F.; Weber, E.A.; Mast, B.; Schreiter, P.; Merkt, N.; Claupein, W.; Graeff-Hönninger, S. Evaluation of Asparagine Concentration as an Indicator of the Acrylamide Formation in Cereals Grown under Organic Farming Conditions. *Agronomy* 2018, 8, 294.

Raffan, S., & Halford, N. G. (2019). Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions. *Annals of Applied Biology*, *175*(3), 259-281.

Rapp, M., Schwadorf, K., Leiser, W. L., Würschum, T., & Longin, C. F. H. (2018). Assessing the variation and genetic architecture of asparagine content in wheat: What can plant breeding contribute to a reduction in the acrylamide precursor? *Theoretical and Applied Genetics*, *131*, 2427-2437.

Stockmann, F., Weber, E. A., Mast, B., Schreiter, P., Merkt, N., Claupein, W., & Graeff-Hönninger, S. (2018). Evaluation of asparagine concentration as an indicator of the acrylamide formation in cereals grown under organic farming conditions. *Agronomy*, *8*(12), 294.

Tafuri, A., Zuccaro, M., Ravaglia, S., Pirona, R., Masci, S., Sestili, F. & Baldoni, E. (2023). Exploring variability of free asparagine content in the grain of bread wheat (Triticum aestivum L.) varieties cultivated in Italy to reduce acrylamide-forming potential. *Plants*, *12*(6), 1349.

Žilić, S.; Aktağ, I.G.; Dodig, D.; Filipović, M.; Gökmen, V. Acrylamide formation in biscuits made of different wholegrain flours depending on their free asparagine content and baking

conditions. *Food Res. Int.* 2020, 132, 109109

Poděkování
Pracovníkům pokusných stanic ÚKZÚZ za přípravu a poskytnutí vzorků jednotlivých odrůd obilovin. Studie byla podpořena projektem MSMT2213005 „Bezpečné, senzoricky atraktivní tepelně zpracované potraviny z cereálií s nízkým obsahem asparaginu“ (ev. č. LUC23140).

Kontakt:
Ing. Petr Dvořák, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita Praha
Kamýcká 129, 165 00 Praha Suchdol
+420 605 967 290, dvorakp@af.czu.cz

Monitoring změn teploty konzervovaných krmiv a jejich aerobní stabilita

Monitoring changes temperature of foods and their aerobic stability

Jambor V. [1], Malá S. [1], Synková H. [1]Vosynková B. [1],

[1] *NutriVet s.r.o., Vídeňská 1023, 691 23 Pohořelice*

Abstract

Aerobní stabilita fermentovaného krmiva je jeho vlastnost udržet si stejnou kvalitu za přístupu vzduchu, tedy po otevření žlabu, co nejdelší dobu s co možná nejmenšími ztrátami organické hmoty. Podstatou sekundární fermentace, aerobní nestability je zvýšená aktivita kvasinek a plísní po otevření žlabu. Výsledkem sekundární fermentace, působení kvasinek a plísní, dochází nejen k zahřátí krmiva, ale také ke vzniku jedovatých sekundárních metabolitů. Jedovaté látky zatěžují organismus zvířete a zhoršují jejich zdravotní stav. Pro sledování změn teploty krmiv jsme vypracovali systém sledování teplot pod obchodním názvem NUTRISTABIL. Vytvořený systém naměřené hodnoty teplot krmiv a prostředí přenáší systémem on-line do osobního počítače (PC), tabletu nebo mobilu dle přání zákazníka. Zjištěné teploty v požadovaných intervalech ukazují trendy změn teplot zaznamenaných do grafu.

Klíčová slova: aerobní stabilita, příjem sušiny, siláž, kukuřice

Abstract

Aerobic stability of fermented feed is property of maintaining the same quality with access to air, i.e. after opening the trough, for as long as possible with the smallest possible loss of organic matter. The essence of secondary fermentation, aerobic instability, is the increased activity of yeast and mold after opening of silo. As a result of secondary fermentation, the action of yeast and mold, not only the feed heats up, but also the formation of toxic secondary metabolites. Toxic substances burden the animal's organism and worsen their health. To monitor changes in feed temperature, we have developed a temperature monitoring system under the trade name NUTRISTABIL. The created system transfers the measured values of feed and environmental temperatures online to a personal computer (PC), tablet or mobile phone according to the customer's wishes. The detected temperatures at the required intervals show trends in temperature changes recorded in a graph.

Keywords: aerobic stability, intake of DM, silage, maize

Úvod

Kvalitní krmiva je nezbytnou součástí každého moderního zemědělského podniku. Společně s mírou kvality krmiva se mění také ekonomické výsledky zemědělské produkce. Po otevření siláže dochází k aeraci krmiva, které se díky přístupu vzduchu obnoví mikrobiální činnost, která způsobí zahřátí krmiva. Obnovení mikrobiální činnosti způsobuje zvýšení teploty siláže což indikuje rozkladné procesy konzervovaného krmiva. Rozkladné procesy krmiva způsobují také produkci jedovatých sekundárních látek. Zvýšená teplota krmiva způsobuje snížený příjem sušiny krmiva u zvířat, ale i příjem jedovatých látek, které zvíře musí detoxikovat. Aerobní stabilita a měření změn teploty vlivem aerace se proto stává důležitým ukazatelem kvality vyrobeného krmiva. Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli vytvořit zařízení, které bude nejen sledovat změny teploty v krmivu, ale díky programu vytvářet příslušné grafické zobrazení, které demonstrují míru znehodnocení krmiva.

Materiál a metody

Kvalitní, hygienicky nezávadné konzervované krmivo je nezbytnou součástí každého moderního zemědělského podniku. Společně s mírou kvality krmiva se mění také ekonomické výsledky zemědělské produkce. Aerobní stabilita se proto stává důležitým ukazatelem zmiňované kvality vyrobeného krmiva. Zde si můžeme položit otázku co je stabilita krmiva,

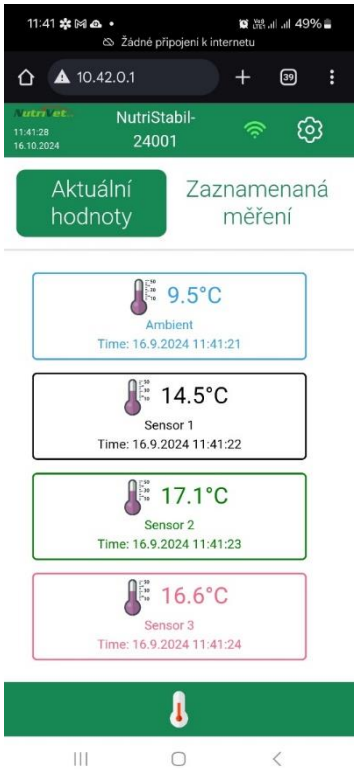
jak ji stanovit a hodnotit.
Aerobní stabilita fermentovaného krmiva je jeho vlastnost udržet si stejnou kvalitu za přístupu vzduchu, tedy po otevření žlabu, co nejdelší dobu s co možná nejmenšími ztrátami organických živin. V odborných kruzích se o tomto fenoménu ví již řadu let. Bohužel v běžných laboratořích se tento problém stále neřeší, protože stabilita krmiv není zahrnuta do hodnocení fermentovaných krmiv. Podstatou sekundární fermentace, potažmo aerobní nestability je zvýšená aktivita kvasinek a plísní po otevření žlabu (aeraci krmiva) při různé teplotě okolí (v závislosti na ročním období). Mikroorganismy v silážích v důsledku aerace, rozkládají organickou hmotu na teplo, H_2O a CO_2. Dochází nejen ke zvýšení ztrát organických živin, ale také dochází k tvorbě jedovatých látek jako sekundárních metabolitů.
Důvodů, proč k nestabilitě konzervovaných krmiv dochází je hned několik. V prvé řadě je to zvýšená sklizňová sušina, dlouhá řezanka, nedostatečné zakrývání silážního materiálu a následná aerace, ale i nedostatečný odběr, kdy ve žlabu je odkryta zbytečně velká plocha a ta je vystavena vzduchu delší dobu. Významnou roli při řešení tohoto problému musíme věnovat správnému výběru konzervačních přípravků, které zvyšují stabilitu fermentovaného krmiva. Na obr. 1 a 2 vidíme možnost použití nejen v místnosti, ale i ve stáji, kde je krmivo konzumováno zvířaty a výsledky odpovídají podmínkám použití krmiv. V VZOD Zašová jsme vybrali dva vzorky kukuřičné siláže a jeden vzorek celkové směsné krmné dávky pro dojnice (TMR). Získané krmiva jsme umístili ve stáji do igelitových tašek v množství 5 kg vedle sebe. Do jednotlivých vzorků jsme umístili teplotní čidla (1 a 2 čidlo kukuřčná siláž, 3 TMR a 4 teplota prostředí - ambient). Po umístění teplotních čidel jsme přístroj Nutristabil zapli a pomocí WIFI napojili na mobilní telefon viz obr. 2. Po kontrole funkčnosti zařízení jsme přístroj sledovali po dobu 7 dní. Výsledky zjištěných teplot u 4 čidel jsou vidět na obrázku č. 3

Obr. 1 Měření teploty kukuřičné siláže a TMR pomocí přístroje NUTRISTABIL a) v kanceláři případně b) ve stáji.

a) v kanceláři

b) ve stáji

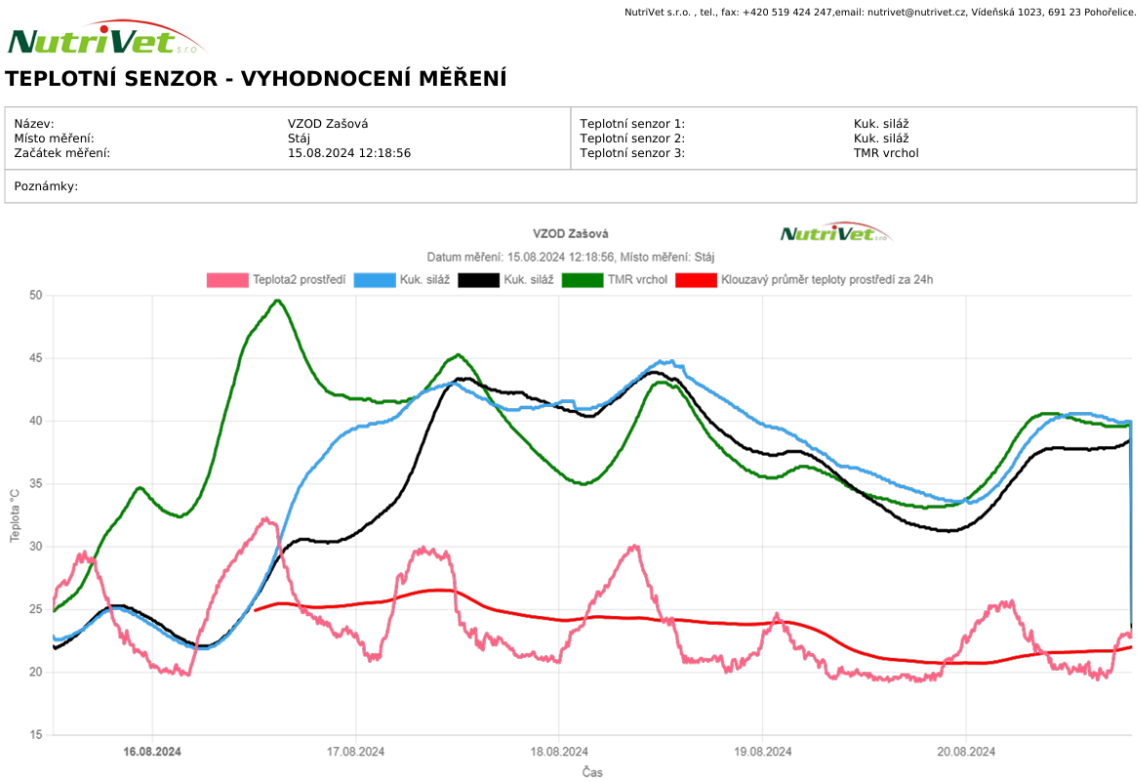
Obr. 2 Aplikace přístroje NUTRISTABIL v mobilním telefonu.



Výsledky

Na následujícím obr. 3 vidíte zaznamenané změny teplot u 2 vzorků s kukuřičnou siláží a třetí vzorek s TMR. Teplotní čidlo 4 zaznamenává změny teplot prostředí (ambient), pro zpřesnění průběhu změn teplot prostředí je průběžně vypočítáván klouzavý průměr ambientu. Teplota prostředí během celého sledování (5 dnů) se pohybovala v rozmezí od 19 C do 33 C. Kromě výsledků fermentačního procesu a nutriční hodnotě vyrobených kukuřičných siláží jsme naměřili teplotu v místě odběru, tedy v místě, kde tato krmiva zvířata konzumují. Výsledky měření u obou kukuřičných siláží (modrá a černá křivka v grafu) signalizují zvýšení teploty z teploty 22 C (od začátku měření) na 43 C za 48 hod. Teplota TMR však ukazuje zvýšení teploty ihned po podání krmiva dojnicím viz zelená křivka v grafu. Pokud si uvědomíme, že uskladnění biomasy ve stejných podmínkách signalizuje rozdíl ve fermentačních ztrátách. Zvýšení teploty u 1 gramu krmiva o 1 °C znamená ztrátu energie v množství 4,18 J. Původní kalorii definoval francouzský chemik Henri Victor Regnault jako množství tepla potřebného k ohřátí 1 g vody z 0 °C na 1 °C. U krmiv se ale energetická hodnota udává právě v Joulech resp. KiloJoulech.

Obr. 3 Výsledný graf naměřených teplot přístrojem NUTRISTABIL.



Diskuze

Aerobní stabilita fermentovaného krmiva je jeho vlastnost udržet si stejnou kvalitu za přístupu vzduchu, tedy po otevření žlabu, co nejdelší dobu s co možná nejmenšími ztrátami organických živin. V odborných kruzích se o tomto fenoménu ví již řadu let. Bohužel v běžných laboratořích se tento problém stále neřeší, protože stabilita krmiv není zahrnuta do standardů hodnocení fermentovaných krmiv v ČR. Nutno konstatovat, že uznávaná metodika hodnocení

konzervovaný krmiv v Německu toto hodnocení uvádí. Podstatou sekundární fermentace, potažmo aerobní nestability je zvýšená aktivita kvasinek a plísní po otevření žlabu (aeraci krmiva) při různé teplotě okolí (v závislosti na ročním období). Mikroorganismy v silážích v důsledku aerace, rozkládají organickou hmotu na teplo, H_2O a CO_2. Dochází nejen ke zvýšení ztrát organických živin, ale také dochází k tvorbě jedovatých látek jako sekundárních metabolitů.

Důvodů, proč k nestabilitě konzervovaných krmiv dochází je hned několik. V prvé řadě je to zvýšená sklizňová sušina, dlouhá řezanka, nedostatečné zakrývání silážního materiálu a následná aerace, ale i nedostatečný odběr, kdy ve žlabu je odkryta zbytečně velká plocha a ta je vystavena vzduchu delší dobu. Významnou roli při řešení tohoto problému musíme věnovat správnému výběru konzervačních přípravků, které zvyšují stabilitu fermentovaného krmiva.

Aerobní stabilitu siláže lze sledovat různými způsoby. Z pohledu výsledků a důkazů je nejlepší stanovení změny počtu mikroorganismů, které způsobují sekundární fermentaci. Toto stanovení je však drahé a zdlouhavé, tudíž v praxi nepoužitelné. My jsme se zaměřili na sledování ukazatele, jenž je doprovodným jevem zvýšené aktivity kvasinek a plísní a lze ho v běžné praxi používat podle metody Honiga a kol. 1987. Tímto ukazatelem je zvyšující se teplota daného krmiva resp. siláže, sena, zrna. Právě teplota krmiva je ukazatelem, který rozhoduje o tom, zda je siláž stabilní a teplota konstantní, nebo se teplota zvyšuje.

Závěr

Závěrem bychom chtěli dodat, že na měření aerobní stability se v laboratořích zapomíná a standardně ho v nabídkách laboratoří nenajdeme. I když použijeme konzervační přípravek, u kterého výrobce deklaruje zvýšení aerobní stability, neznamená to, že siláž má lepší stabilitu, rozhodující bude technologická kázeň a dodržení dávky konzervačního přípravku dle doporučení výrobce. Výsledky aerobní stability by pro nás mohly ale být ponaučením do dalších sezon, zda deklarovaná vlastnost je skutečností, nebo jsme někde udělali chybu v aplikaci. Proto se v naší laboratoři budeme měření stability naplno věnovat a porovnáním siláží z různých farem s různými přípravky správnost použití konzervačního přípravku deklarovat. Je totiž známo, že zvýšená teplota siláže způsobuje nižší příjem u dojnic. Zejména pokud je dobytek krmen jen jednou dávkou denně a pak se krmivo jen přihrnuje, dochází k dalšímu provzdušnění TMR a rychlejšímu zahřívání. V našem případě se prokázalo, že i když kukuřičná siláž prokázala stabilitu, tak vytvořením TMR díky smícháním s jadrnými krmivy o vyšší sušině došlo k výraznému zvýšení mikrobiální aktivity a zvýšení teploty TMR. Taková krmná dávka je již k večeru na dotek výrazně zahřátá. Výsledkem sekundární fermentace, tedy působení kvasinek a plísní, dochází nejen k zahřátí krmiva, ale také ke vzniku sekundárních metabolitů, které jsou jedovaté, zatěžují organizmus zvířete a zhoršují jejich zdravotní stav. Vznikají tak kromě ztrát samotné krmné hodnoty, také ztráty vznikající při nákladech na léčbu stáda a snížení hygienické nezávadnosti konzervovaných krmiv. Tyto ztráty se však těžko kvantifikují.

Literatura

Adler J (1956): Cornell Vet. 46, 446-451.

Broberg A, Jacobsson K, Ström K, Schnürer J (2007): Appl. Environ. Microbiol. 73, 5547-5552. 18. Cato EP, George WL, Finegold SM (1986): Genus Clostridium. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore, USA, s 1141-1200. 19.

Cornwell T, Cohick W, Raskin I (2004): Phytochemistry 65, 995-1016. 22. DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Schingoethe DJ (2004): J. Dairy Sci. 87, 2486-2494. 23.

Driehuis F, Elferink SJWH (2000): Wet. Quart 22, 212-217. 27. Driehuis F, Te Giffel MC (2005): Proc. 14th Silage Conference, Belfast, UK, s. 271. 28.

Dutkiewicz J, Olenchock SA, Sorenson WG, Gerencser VF, May JJ, Pratt DS, Robinson VA (1989): Appl. Environ. Microbiol. 55, 1093-1099. 29.

Illek J (2004): Sborník semináře firmy Nutratech, 23. listopad 2003, Brno, s. 12 20. 46. Jagoš a kolektiv (1985): Diagnostika, terapie a prevence nemocí skotu. SZN Praha, 472 s. 47.
Jay JM (1997) Modern Food Microbiology, Chapman and Hall, New York, 661s. 48.
Kaprálek F (1986): Fyziologie bakterií, SPN Praha. 53. Keady TWJ, Steen WJ (1994): Grass Forage Sci. 49, 438-446. 54.
Kudva IT, Hunt CW, Williams CJ, Nance UM, Hovde CJ (1997): Appl. Environ. Microbiol. 63, 3878. 62. Kung L, Schmidt RJ, Ebling TE, Hu W (2007): J. Dairy Sci. 90, 2309-2314. 63.
McDonald P, Henderson AR, Heron SJE (1991): The Biochemistry of Silage, Second Edition, Chalcombe Publication, Lincoln, UK. 66. Meronuck R, Cincibido V (1996): Feedingstuff. 68, 139. 67.
Merry RJ, Mawdsley JL, Brooks AE, Davies DR (1997): J. Appl. Microbiol. 82, 115-120 68. Meyer-Broseta S, Bastian SN, Arne PD, Cerf O, Sanaa M (2001): Int. J. Hyg. Environ. Health. 203, 347. 69.
Mitrík T (2006): Silážování, FedLab s.r.o., Creative-Studio-Slovakia, s.r.o., 88 s. 72. Mounchili A, Wichtel JJ, Dohoo IR, Keefe GP, Halliday LJ (2004): Prev. Vet. Med. 16, 133-145. 73.
O´Kiely P, Byrne C, Bolton D (1999): Proc. 12th Int. Silage Conf., Uppsala, Sweden, s. 311-312. 77.
Spoelstra SF, Courtin MG, Beers JAC (1988): J. Agric. Sci. 111, 127-132. 96. Spoelstra SF (1991): Chemical and biological additives in forage conservation. IN: Forage Conservation Towards 2000 (Eds. G. Pahlow and H. Honig). Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft 123, Brauchweig, Germany, s. 48 70. 97.
Vissers MMM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P, Lankveld JMG (2007b): J. Dairy Sci. 90, 850-858. 107. Vissers MMM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P, Lankveld JMG (2007): J. Dairy Sci. 90, 928-936. 108.
Weinberg ZG, Muck RE, Weimer PJ (2003): J Appl. Microbiol. 94, 1066-1071. 112.
Weissbach F (1996): Proc. XIth Int. Silage Conf, Aberystwych, UK, s. 11-25. 113.
Wilkinson JM, Wadephul F, Hill J (1996):, Chalcombe Publication, Lincoln, UK. 116.
Wilkinson JM (1999): Nat. Toxins 7, 221-232. 117. Wilkinson JM (2005): Silage. Chalcombe Publication, Lincol, UK. 118.

Kontaktní informace:

Ing. Václav Jambor, CSc.
NutriVet, s.r.o.
Vídeňská 1023
691 23 Pohořelice
nutrivet@nutrivet.cz
www.nutrivet.cz

Vliv silážních přípravků na kvalitu siláže vojtěšky

The influence of silage additives on the quality of alfalfa silage

Loučka R., Homolka P., Jančík F., Kubelková P.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhříněves

Abstrakt

Cílem studie bylo u siláží vojtěšky, ošetřených různými silážními přípravky, porovnání výsledků fermentace a aerobní stability. Řezanka vojtěšky byla silážována do speciálních perforovaných pytlů, vložených přímo do siláže v silážním žlabu. Před vložením řezanky do pytlů byl sprejováním řezanky aplikován silážní přípravek. Negativní kontrolou byla siláž bez použití jakéhokoliv silážního přípravku, pozitivní kontrolou pak byl jednak inokulant bakteriálního charakteru (*Lactobacillus plantarum*) a jednak přípravky chemické. Průběh fermentace i aerobní degradace po vystavení siláže vzduchu byl sledován teplotním čidlem thermochron, ztráty sušiny byly stanoveny vážením vzorků, chemické analýzy vzorků byly stanoveny v akreditované laboratoři standardními metodami. Potvrdily se hypotézy, že aplikace silážních přípravků, ať již biologických inokulantů či chemických konzervantů, může významně snížit ztráty sušiny a riziko nevyhovujícího výsledku fermentace. Aerobní stabilita byla u všech siláží natolik vysoká, že není třeba jí řešit přidáním bakteriálního inokulantu, ani chemického konzervantu.

Klíčová slova: kyselina mravenčí; dusitan sodný; benzoát sodný; fermentace; proteolýza

Abstract

The aim of the study was to compare the results of fermentation and aerobic stability in alfalfa silages treated with different silage additives. Alfalfa cuttings were ensiled in special perforated bags, inserted directly into the silage in the silage trough. Before placing the cuttings in the bags, a silage additive was applied by spraying the cuttings. The negative control was silage without the use of any silage additive, the positive control was an additive of a bacterial nature (with an inoculant containing *Lactobacillus plantarum*) and chemical additives. The course of fermentation and aerobic degradation after silage exposure to air was monitored with a thermochron temperature sensor, dry matter losses were determined by weighing samples, chemical analyses of samples were determined in an accredited laboratory using standard methods. The hypotheses were confirmed that the application of silage additives, whether biological inoculants or chemical preservatives, can significantly reduce dry matter losses and the risk of unsatisfactory fermentation results. Aerobic stability was so high for all silages that there is no need to solve it by adding a bacterial inoculant or a chemical preservative.

Keywords: formic acid; sodium nitrite; sodium benzoate; fermentation; proteolysis

Úvod

V naší české, a především pak v zahraniční vědecké literatuře, např. Borreani et al. (2018), Muck et al. (2018), Soundharrajan et al. (2021), Torres et al. (2021), Menezes et al. (2023), Okoye et al. (2023), lze najít nepřeberné množství příspěvků, které porovnávají různé silážní přípravky a jejich aplikaci při silážování pícnin. Jsou mezi nimi i významné práce, které se specializují přímo na silážování vojtěšky s využitím silážních přípravků (Blajman et al. (2020), Li et al. (2021), Seven et al. (2021), Ling et al. (2022), Jiang et al. (2023), Wang et al. (2024) a další). Cílem jejich výzkumu je vhodnými metodami konzervace a skladování krmiv v maximální míře uchovat jejich výživnou hodnotu a stabilitu. Shodují se na tom, že hledáním nových silážních přísad, jejich kombinací a upřesněním jejich dávkování lze zlepšit fermentační proces a po otevření skladovacích prostor co nejdéle omezit kažení siláží. Zvýšení teplot v letním období významně ovlivňuje kažení siláží po otevření silážních prostor, proto je nutné navrhnout způsoby, které povedou k vyšší ochraně siláží před znehodnocováním.

Autoři výše citovaných příspěvků se většinou shodují na tom, že použije-li se při silážování vhodný silážní přípravek, většinou dojde k rychlejšímu navození správného

fermentačního procesu nebo posílení aerobní stability. Proces pak probíhá "kultivovaněji", rychleji a s nižšími ztrátami hmoty i energie. Silážní přípravky tak mohou významně zvýšit kvalitu siláže, její aerobní stabilitu, případně zvýšit příjem siláže zvířaty a jejich užitkovost. Ne každý přípravek je pro danou pícninu a technologii vhodný, nebo v danou chvíli v daných podmínkách dostatečně účinný. Předem se to velmi těžko odhaduje, proto se velmi často silážní přípravky používají pro snížení rizika, že siláž dobře nezfermentuje nebo se bude rychle kazit po otevření sila. Bez aplikace silážního přípravku se mohou v siláži více uplatňovat nekulturní bakterie (epifytní, půdní), kvasinky a plísně. Silážní přípravky se v siláži uplatňují především při zhoršených podmínkách, např. při nižší, nebo naopak vyšší sušině silážované píce, než je z hlediska průběhu fermentace optimální. Silážní přípravky sice mohou přispět k lepší kvalitě siláže a ke snížení ztrát fermentací nebo aerobní degradací, ale většinou nejsou natolik účinné, aby zakryly vážné nedostatky ve faremní praxi při zakládání siláže, jejím skladování a následné manipulaci při zkrmování směsné krmné dávky (TMR) zvířatům. Právě proto je při silážování extrémně důležité dodržovat technologické požadavky dané správnou faremní praxí. Funkčnost silážního přípravku nabývá s postupem doby stále na větší důležitosti. Rozdělení podle druhu totiž často nevypovídá o tom, jaké má silážní přípravek vlastnosti a účinky. Je to patrné především u chemických přípravků, jeden může fermentaci stimulovat, jiný potlačovat, jiný bude účinkovat pouze na aerobní stabilitu (Wilkinson a Davies, 2012). V rámci experimentů je třeba také vyvinout metody, jak vylepšit technologii silážování, jak průběžně sledovat teplotu a změny kvality, a jak kvalitu siláží nově hodnotit.

V ČR je prodáváno každoročně více než 100 silážních přípravků. Některé přípravky jsou na českém trhu nové, některé jsou jen obdobou již používaného, ale s jiným názvem. Účinnost přípravků je třeba znovu a znovu ověřovat, protože záleží i na dalších podmínkách, při kterých jsou v praxi využívány. V poslední době se začínají používat i různé kombinace přípravků. Bývají sice dražší, ale některé jejich vlastnosti se doplňují. O kombinované silážní přípravky je pro jejich vlastnosti v praxi zájem.

Jaké jsou typické hodnoty výsledku fermentace vojtěškových siláží? Na to dává odpověď především práce Kung a kol. (2018). Navíc jejich studie vojtěškové siláže porovnává i se silážemi kukuřičnými, travními a vlhkého kukuřičného zrna (tab. 1). Vojtěškové siláže mívají horší (vyšší) stupeň proteolýzy (poměr mezi amoniakálním a celkovým dusíkem) než ostatní siláže. U vojtěškových siláží jsou nejlepší výsledky dosahovány při obsahu sušiny 35 až 40 %. Lze to zjistit podle toho, že při tomto obsahu sušiny je v siláži nejnižší pH a zároveň nejvyšší obsah kyseliny mléčné. Vojtěškové siláže s vyšším obsahem sušiny (45–55 %) mívají nižší obsah metabolitů než vojtěškové siláže s obsahem sušiny nižším (30–35 %). Vojtěšku je obtížné silážovat kvůli její vysoké pufrační kapacitě a nízkému obsahu vodorozpustných sacharidů (Jiang et al., 2023).

Tab. 1: Typické hodnoty výsledku fermentace siláží (Kung a kol., 2018)

Ukazatel	Vojtěšková siláž		Travní siláž	Kukuřičná siláž	Vlhké zrno
	30–35 %	45–55 %	25–35 %	30–45 %	70–75 %
pH	4,3–4,5	4,7–5,0	4,3–4,7	3,7–4,0	4,0–4,5
K. mléčná %	6–8	2–4	6–10	3–6	0,5–2,0
K. octová %	2–3	0,5–2,0	1–3	1–3	<0,5
K. propionová %	<0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
K. máselná %	0	0	<0,5–1,0	0	0
Etanol %	0,5–1,0	0,5	0,5–1,0	1–3	0,2–2,0
Proteolýza %	10–15	<12	8–12	5–7	<10

Pracovníci Oddělení výživy a krmení hospodářských zvířat Výzkumného ústavu živočišné výroby v.v.i. v Praze Uhříněvsi (VÚŽV) organizují každým rokem srovnávací pokusy se silážováním vojtěšky ošetřených různými silážními přípravky, a tak získávají dobrý

přehled o jejich účinnosti. Navíc každoročně sestavují podrobný přehled o silážních přípravcích dostupných na českém trhu. Cílem studie bylo v pokusech na účelovém hospodářství VÚŽV u siláží vojtěšky porovnat ošetření řezanky vojtěšky vybranými silážními přípravky.

Metodika

Každý rok jsou na účelovém hospodářství VÚŽV organizovány srovnávací pokusy se silážováním vojtěšky ošetřené různými silážními přípravky. Základní metodika je vždy stejná. To znamená, že řezanka je silážována do speciálních perforovaných pytlů, vložených přímo do siláže v silážním žlabu. Před vložením řezanky do pytle je sprejováním aplikován silážní přípravek do řezanky. Negativní kontrolou je vždy siláž bez použití jakéhokoliv silážního přípravku, pozitivní kontrolou pak jednak přípravek bakteriálního charakteru (s inokulantem, obsahujícím *Lactobacillus plantarum*, případně i *Lentilactobacillus buchneri*) a jednak přípravek s chemickým konzervantem. Ověřována byla i kombinace biologického inokulantu s chemickým konzervantem, samozřejmě také při aplikaci každého přípravku odděleně.

Uvnitř každého pytle, obsahujícího 10 kg řezanky, bylo teplotní čidlo thermochron (iButton Device DS 1921G-FS) s nastaveným měřením každých 2,5 hodiny s přesností 0,065 °C. Pytle byly zváženy před vložením do silážního žlabu a po jejich vyjmutí. Odečtením hmotnosti po vyjmutí ze žlabu a před vložením a násobením obsahem sušiny jednotlivých vzorků byly stanoveny ztráty sušiny. Aerobní stabilita byla stanovena podle doby, za jakou se teplota vzorku, vystaveného působení vzduchu, zvýší o 2 °C. Každý vzorek byl izolován v polystyrénovém boxu podle metodiky Honig (1990). Měření probíhalo po dobu 7 dnů v laboratoři o průměrné teplotě 20 °C teplotními čidly, nastavenými k měření po 15 minutách. Chemické analýzy dle ověřených metod AOAC (2005).

Vojtěška v pokuse na účelovém hospodářství VÚŽV byla silážována o sušině 36,5 %. Kontrolní varianta byla bez silážního přípravku (označení K), bylo k ní přidáno 20 ml vody na 10 kg řezanky (K20), resp. 40 ml vody na 10 kg řezanky (K40), aby množství aplikovaného roztoku bylo u všech variant stejné. Jako pozitivní bakteriální kontrola byl použit biologický inokulant Ecosyl 100, obsahující monokulturu bakterií *Lactobacillus plantarum* MTD/1 v množství 1,54 x 10^{11} CFU/g ve dvou dávkách, tj. v dávce 4 g/t (ES4) a v dávce 8 g/t (ES8). Kromě toho jsme testovali přípravek Safesil, obsahující dusitan sodný, benzoát sodný, sorbát draselný a propionát sodný. Byl použit v dávce 2, resp. 4 litry/t (S2, resp. S4) a přípravek Thorsil, obsahující jen dusitan sodný a benzoát sodný, v dávkách 2 l/t (T2) a 4 l/t řezanky (T4).

Pro hodnocení výsledků byl použit program Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), analýzy ANOVA s použitím Tukey testu HSD na hladině významnosti $p < 0,05$.

Výsledky a diskuze

Využitím termočidel thermochron je možné vysvětlit některé jevy, které dříve v literatuře popsány nebyly, především kontinuální změny teplot v průběhu celého měření. Čidla jsou velikosti hodinkové baterie a vydrží například celý rok zaznamenávat teplotu každou hodinu, záleží na nastavení, které má velmi mnoho variant. Teploty siláží v průběhu fermentace byly u negativní kontroly bez inokulantu či konzervantu vždy vyšší než u ostatních variant. Z toho lze odvodit, že ztráty fermentací byly u negativní kontroly vyšší. Rozdíly v teplotách však byly velmi nízké, většinou nepřesáhly 1 °C. U změřených ztrát sušiny (rozdílem mezi vstupním a výstupním měřením hmotnosti) byly ztráty sušiny fermentací u negativní kontroly bez silážního přípravku ve srovnání s pozitivní kontrolou vyšší o 1 až 3 %, i když většinou ne statisticky významně. V průměru se ztráty sušiny fermentací pohybovaly mezi 5 až 9 %. Ztráty sušiny aerobní degradací byly nižší než ztráty fermentací (v průměru byly mezi 1 až 4 %). Doba k dosažení stanoveného zvýšení 2 °C byla v průměru 4 dny, ale i delší než 7 dnů, což je ve srovnání se stabilitou siláží kukuřice podstatně déle. Rozdíly v aerobní stabilitě mezi kontrolou bez přípravku a pozitivní kontrolou nebyly většinou významné. Ve výživných hodnotách

rozdíly mezi negativní kontrolou a testovanými variantami siláží ošetřených silážními přípravky nebyly většinou statisticky průkazné. Průkazné rozdíly však byly v některých ukazatelích kvality fermentace. U vojtěškových siláží byl rozhodujícím kritériem pro hodnocení kvality výsledku fermentačního procesu obsah amoniakálního dusíku, který je ukazatelem proběhlé proteolýzy, tedy rozkladu bílkovin. Významný vliv na kvalitu výsledku fermentace měl obsah popelovin, který značnou měrou tlumí (pufruje) rychlost snížení pH, a tím dává prostor pro množení nežádoucích bakterií, kvasinek a plísní.

Jako konkrétní příklad uvádíme pokus se silážováním vojtěšky o sušině 36,5 %. Výsledky fermentace a aerobní stability jsou v tab. 2. Siláže s vyšší dávkou inokulantu měly významně nižší pH a nižší ukazatel proteolýzy ($N\text{-}NH_3$). U silážních přípravků chemických na bázi solí kyselin byly výsledky fermentace podle hodnot pH srovnatelné s kontrolou bez přípravku, siláže s přípravkem T, ať již s nižší, či vyšší aplikační dávkou, měly vyšší obsah amoniakálního dusíku. Siláž kontrolní s vyšší dávkou destilované vody vykázala nižší produkci kyseliny mléčné a tím i nižší její poměr k TMK. Aerobní stabilitu lepší, než kontrolní siláže měly varianty S20 i S40. Ztráty siláží s inokulantem i s oběma konzervanty byly po 7 dnech vystavení vzduchu srovnatelné s kontrolou.

Tab. 2: Ukazatele výsledků fermentace a aerobní stability siláží vojtěšky, ošetřené vybranými silážními přípravky

Skupina A	K40	K20	ES4	ES8	S2	S4	T2	T4	SEM
pH	4,79	4,76	4,78	4,74	4,75	4,78	4,77	4,77	0,008
po 3 dnech	4,77	4,78	4,77	4,78	4,77	4,77	4,78	4,78	0,005
po 7 dnech	$4,82^{ab}$	$4,81^{a}$	$4,82^{b}$	$4,81^{ab}$	$4,82^{ab}$	$4,82^{ab}$	$4,82^{ab}$	$4,83^{b}$	0,003
K. mléčná (%)	$3,59^{ab}$	$3,82^{b}$	$3,68^{bc}$	$3,54^{ab}$	3,73ab	$3,50^{a}$	$3,73^{ab}$	$3,61^{ab}$	0,052
po 3 dnech	3,53	3,55	3,56	3,54	3,54	3,52	3,50	3,47	0,019
po 7 dnech	$3,39^{ab}$	$3,37^{a}$	$3,37^{a}$	$3,36^{a}$	$3,43^{c}$	$3,42^{c}$	$3,40^{abc}$	$3,40^{abc}$	0,007
KM/TMK	$2,62^{a}$	$2,90^{b}$	$2,83^{ab}$	$2,77^{ab}$	$2,73^{ab}$	$2,71^{ab}$	$2,67^{a}$	$2,65^{a}$	0,041
po 3 dnech	$2,78^{ab}$	$2,73^{ab}$	$2,76^{bc}$	$2,73^{bc}$	$2,75^{ab}$	$2,71^{a}$	$2,71^{a}$	$2,70^{a}$	0,018
po 7 dnech	$2,82^{bc}$	$2,75^{b}$	$2,80^{bc}$	$2,81^{bc}$	$2,67^{a}$	$2,79^{b}$	$2,86^{bc}$	$2,89^{c}$	0,016
$N\text{-}NH_3$ (mg N/100 g)	$23,9^{a}$	$24,1^{ab}$	$24,6^{c}$	$24,4^{bc}$	$24,2^{bc}$	$24,3^{bc}$	$24,4^{c}$	$24,4^{c}$	0,057
po 3 dnech	$25,4^{b}$	$25,4^{b}$	$25,3^{ab}$	$25,1^{ab}$	$25,3^{b}$	$25,3^{b}$	$25,3^{b}$	$25,2^{a}$	0,022
po 7 dnech	27,4	27,4	$27,2^{a}$	$27,3^{ab}$	27,4	27,4	27,4	27,4	0,036
Ztráty suš. (%)									
po 3 dnech	$1,86^{bc}$	$1,46^{abc}$	$1,66^{cd}$	$0,91^{ab}$	$1,39^{abc}$	$1,21^{ab}$	$1,21^{ab}$	$1,87^{c}$	0,134
po 7 dnech	2,73	2,27	2,49	3,16	2,32	2,95	2,81	2,22	0,164

[a-d] Průměrné hodnoty v řádku s různými písmeny se statisticky průkazně liší ($p < 0,05$); SEM = střední chyba průměru; Zkratky přípravků a jejich dávek (K40, K20, ES4, ES8, S2, S4, T2 a T4) jsou podrobně vysvětleny v metodice.

Významným přínosem dalších pokusů s využitím silážních přípravků je vysvětlení a ověření účinnosti kombinovaných přípravků. U siláže s přípravkem, obsahujícím kromě *Lactobacillus plantarum* i *Lentilactobacillus buchneri* se ve srovnání s kontrolou bez silážního přípravku snížil poměr kyseliny mléčné ku těkavým mastným kyselinám (KM/TMK) na 0,56 z 0,6. Díky nižším ztrátám sušiny siláže aerobní degradací (5,4 %) byly celkové ztráty nižší (11,6 %), než u kontroly (13 %). Potvrdila se hypotéza, že siláže s přípravkem, složeným z *L. plantarum*, mají vyšší poměr KM/TMK než siláže s přípravkem, složeným z *L. plantarum* a *Lentilactobacillus buchneri* (EC), přičemž siláže EC měly sice vyšší aerobní stabilitu, ale také vyšší ztráty sušiny.

Nejnižší celkové ztráty (mezi 9 a 10 %) byly zjištěny u siláží, u nichž k inokulantu *L.*

plantarum byl přidán benzoát sodný nebo sorbát draselný. Podstatou účinnosti přípravku (UPV 32 354 U1), kombinovaného z dusitanu sodného a inokulantu, který obsahoval jediný kmen bakterií *Lactobacillus plantarum* MTD1, známý svou vysokou tolerancí k teplotě, kyselosti prostředí i k vyšší sušině (je osmotolerantní), je přeměna dusitanu sodného v silážované hmotě v plyn, který utlumí růst aerobních a fakultativně aerobních mikroorganizmů a zároveň i nežádoucích klostridií. Anaerobní mikroorganizmy jsou vůči jeho působení podstatně odolnější. Proto pro zvýšení jeho účinnosti ho doporučují prodejci použít v kombinaci se známým bakteriálním přípravkem MTD1 s obchodním názvem Ecosyl 100. Obě složky jako konzervanty působí nezávisle, ale také synergicky. Podobné účinky má jiná kombinace, kterou jsme ověřovali, a to použití kyseliny citronové a inokulantu *Lactobacillus plantarum* MTD1.

Naše výsledky se většinou shodují s výsledky jiných autorů. Např. v pokusech Wang et al. (2024) naočkování vojtěšky bakteriemi mléčného kvašení snížilo pH, obsah N-NH_3 a zvýšilo hladinu kyseliny mléčné a stravitelnost sušiny v siláži (vše $p < 0{,}05$). Přídavek organických kyselin snížil pH siláže a zvýšil obsah kyseliny mléčné, hrubého proteinu a škrobu a stravitelnost sušiny (vše $p < 0{,}05$). Studie Ling et al. (2022) zkoumala účinky různých přísad na kvalitu fermentace, složení živin, mikrobiální komunity a degradaci bachoru silážované vojtěšky. Posuzován byl přídavek šesti aditiv, kyseliny mravenčí (MK) a několik variant inokulantu s *Lentilactobacillus buchneri*. Po 60 dnech silážování všechna ošetření změnila bakteriální komunity, zlepšila kvalitu fermentace, snížila ztráty sušiny a hrubého proteinu a zvýšila degradaci živin v bachoru. Ošetření 6% kyselinou mravenčí snížilo ($p < 0{,}05$) oproti kontrole pH, NDF, ADF a hlavně snížilo množství *Enterobacterií.* V pokusech Li et al. (2024) byla vojtěšková siláž bez přípravku porovnávána se siláží ošetřenou benzoanem sodným, sorbanem draselným a dusitanem sodným **(SFE),** mikrobiálním inokulantem *Lactobacillus plantarum* MTD1 (**LP)** a *Lentilactobacillus buchneri* s *Pediococcus pentocaseus* (**LBPP**). Aplikace LP vedla jen k malému zlepšení aerobní stability, naproti tomu aplikace SFE a LBPP aerobní stabilitu vojtěškové siláže výrazně zlepšila.

Průběh fermentace siláží vojtěšky studovali i např. Guo a kol. (2018). Zvolili ale jinou metodiku. Pomocí hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií a technologií sekvenování v reálném čase (PacBio SMRT) analyzovali metabolomické profily a dynamiku mikrobiální komunity zapojené do průběhu fermentace vojtěšky, naočkované homofermentativními bakteriemi *Lactobacillus plantarum* (LP) nebo heterofermentativními *Lentilactobacillus buchneri* (LB). Vojtěškovou siláž analyzovali po 14, 30, 60 a 90 dnech po založení. U kontrolní skupiny bez konzervantu (KO) ve srovnání variantou LP i LB byly pozorovány zcela odlišné druhy mikrobiální flóry, jejich procentické zastoupení i jejich posloupnosti v průběhu fermentace. Např. u KO ve 14 dnech bylo LP zastoupeno v 19 %, ve 30 dnech již v 80 %. Pak se počet LP pomalu snižoval až na 70 % na úkor některých dalších druhů bakterií, především enterokoků a streptokoků. U siláží, ošetřených LP, bylo po 14 dnech fermentace 93 %, ale po 90 dnech již pouze 53 %, a to především jiných druhů laktobacilů, dokonce i LB (15 %). Velmi zajímavé bylo zastoupení mikrobiální flóry siláží naočkovaných LB. Těch bylo po 14 dnech fermentace 44 %, po 30 dnech fermentace 38 %, ale po 60 dnech fermentace se už v siláži nevyskytovaly. Po 90 dnech fermentace převládaly bakterie LP (78 %). Zajímavé byly v průběhu fermentace i poměrně výrazné změny v zastoupení druhů bakterií uvnitř rodu *Lactobacillus.* Tato práce, a jí podobné s využitím sekvenování, poskytují nové a velmi významné informace, týkající se mikrobiálních procesů, které jsou základem tvorby siláže. Studium tohoto druhu může významně přispět k lepšímu poznání procesů silážování a metodám, které v budoucnu povedou k dosažení vysoce kvalitních siláží.

Závěr

Cílem studie bylo u siláží vojtěšky ošetřených různými silážními přípravky porovnání výsledků fermentace a aerobní stability siláží v pokusech na účelovém hospodářství VÚŽV.

Teploty siláží v průběhu fermentace byly u negativní kontroly bez přípravku vždy vyšší než u ostatních variant. Z toho lze odvodit, že ztráty sušiny fermentací byly u negativní kontroly vyšší, i když exaktním měřením ztrát sušiny vážením vzorků před vložením do silážního žlabu a po jejich vyjmutí rozdíly nebyly statisticky významné. Ve výživných hodnotách rozdíly mezi negativní kontrolou a testovanými variantami siláží ošetřených silážními přípravky statisticky průkazné také nebyly. Průkazné rozdíly však byly v některých ukazatelích kvality fermentace. U vojtěškových siláží byl rozhodujícím kritériem pro hodnocení kvality výsledku fermentačního procesu obsah amoniakálního dusíku ($N\text{-}NH_3$), který je ukazatelem proběhlé proteolýzy, tedy rozkladu bílkovin. Významný vliv na kvalitu výsledku fermentace měl obsah popelovin, který značnou měrou tlumí (pufruje) rychlost snížení pH, a tím dává prostor pro množení nežádoucích bakterií, kvasinek a plísní. Siláže s nižší dávkou inokulantu měly významně vyšší pH a ukazatel proteolýzy než siláže s dávkou vyšší, doporučenou prodejcem. U aplikace chemického konzervantu nebyl efekt vyšší dávky významný.

Významným výsledkem pokusů je zjištění, že použitím vybraných silážních přípravků lze snížit ztráty sušiny a zlepšit ukazatele kvality fermentace vojtěškových siláží. Aerobní stabilita byla u všech siláží natolik vysoká, že není třeba jí řešit přidáním bakteriálního inokulantu, ani chemického konzervantu.

Literatura

AOAC (2005) Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 18th ed. Washington, DC: AOAC International.

BLAJMAN, J. E., VINDEROLA, G., PAEZ, R. B., & SIGNORINI, M. L. (2020) The role of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for alfalfa silage: a meta-analysis. The Journal of Agricultural Science, 158(1-2), 107-118.

BORREANI G., TABACCO E., SCHMIDT R.J., HOLMES B.J., MUCK R.E. (2018) Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. J. Dairy Sci. 101, 3952–3979.

GUO X.S., DING W.R., HAN J.G., ZHOU H. (2008) Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. Anim. Feed Sci. Techn., 142 (1-2), 89-98.

HONIG, H. (1990) Evaluation of aerobic stability. In: Proc. Eurobac Conference. Grass Forage Report, Spec. Issue 3, 76–82.

JIANG, H., WANG, H., BAO, B., QU, H., WANG, J., SUN, L., ... & GAO, F. (2023) Effect of compound additives on nutritional composition, fermentation quality, and bacterial community of high-moisture alfalfa silage. Fermentation, 9(5), 453.

KUNG, JR L.; SHAVER, R.D.; GRANT, R.J.; SCHMIDT, R.J. (2018) Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. J. Dairy Sci., 101, 4020-4033.

LI, Y., DA SILVA, E. B., NOVINSKI, C. O., & KUNG Jr, L. (2021) Effect of microbial and chemical additives on the fermentation and aerobic stability of alfalfa silage ensiled at 2 dry matters and subjected to air stress during storage. Journal of Animal Science, 99(7), 174.

LING, W., ZHANG, L., FENG, Q., DEGEN, A. A., LI, J., QI, Y., ... & ZHOU, J. (2022) Effects of different additives on fermentation quality, microbial communities, and rumen degradation of alfalfa silage. Fermentation, 8(11), 660.

MENEZES, G. L., DE OLIVEIRA, A. F., DE ASSIS PIRES, F. P. A., GONCALVES, L. C., DE MENEZES, R. A., DE SOUSA, P. G., ... & JAYME, D. G. (2023) Efficacy of adding chemical and microbial additives to silage on beef cattle performance: Systematic review and meta-analysis. Grass and Forage Science, 78(1), 1-22.

MUCK R.E., NADEAU E.M.G., McALLISTER T.A., CONTRERAS-GOVEA F.E., SANTOS M.C., KUNG L. (2018) Silage review: Recent advances and future uses of silage additives, Journal of Dairy Science, 101, 5, 3980-4000

OKOYE, C. O., WANG, Y., GAO, L., WU, Y., LI, X., SUN, J., & JIANG, J. (2023) The performance of lactic acid bacteria in silage production: A review of modern biotechnology for silage improvement. Microbiological Research, 266, 127212.

PAULY, T. a WYSS, U. (2019) Efficacy testing of silage additives—Methodology and existing schemes. Grass and Forage Sci. 74, 201–210.

SEVEN, P. T., SEVEN, I., MUTLU, S. I., & YILDIRIM, E. N. (2021) Silage Additives Usage in Improving Fermentation Quality of Alfalfa Silage: A Review. Animal and Veterinary Sciences. 9, 6, 175-180.

SOUNDHARRAJAN, I., PARK, H. S., RENGASAMY, S., SIVANESAN, R., & CHOI, K. C. (2021) Application

and future prospective of lactic acid bacteria as natural additives for silage production—a review. Applied Sciences, 11(17), 8127.

TORRES, R. N. S., GHEDINI, C. P., COELHO, L. M., EZEQUIEL, J. M. B., JÚNIOR, G. A., & ALMEIDA, M. T. C. (2021) Meta-analysis of the effects of silage additives on high-moisture grain silage quality and performance of dairy cows. Livestock Science, 251, 104618.

WANG, X., LI, F., CAI, X., HUANG, Y., & SHI, H. (2024) Exploring the combination of wilting and different types of additives to improve silage quality of highland alfalfa: fermentation quality, nutritional values, molecular structural features, and ruminal degradability. Animal Feed Science and Technology, 116123.

WILKINSON J.M., DAVIES D.R. (2012) The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. Grass Forage Sci. 68, 1–19.

Poděkování: Výsledek vznikl za podpory MZe na řešení projektu MZE-RO0724

Kontakt:
Ing. Radko Loučka, CSc.
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhříněves
Telefon 731650836, e-mail: loucka.radko@vuzv.cz

Obsah vybraných minoritních látek v jedlých květech planých rostlin

Content of selected minor substances in edible flowers of wild plants

Rysová J.

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

Abstrakt

V moderním technicky rozvinutém světě se lidé vracejí k využívání tradičních zdrojů potravin. Jedlé květy se staly základem pro dobře prosperující obchod, ale v přírodě se vyskytuje řada planých druhů, které mohou být využity stejně jako pěstované komerční květy. Vedle základních živin obsahují jedlé květy řadu minoritních látek s účinkem na lidský organismus včetně složek s antioxidačními vlastnostmi. Bylo vybráno 10 druhů květů planých rostlin a dřevin, ve kterých byl stanoven obsah kyseliny askorbové, kyseliny fytové a celkový obsah fenolických látek. Obsah kyseliny askorbové (vitaminu C) kolísal mezi 1-156 mg/100 g, nejbohatším zdrojem byla barborka obecná. Obsah kyseliny fytové dosahoval 34-116 mg/100g, nejvíce v barborce obecné. Celkové fenolické látky byly obsaženy v rozmezí 35-2411 mg/100 g, nejvíce v kakostu lučním. Naměřené hodnoty jsou dokladem, že jedlé květy nemají v pokrmech jen funkci estetickou, ale jsou i zdrojem nutričně důležitých látek

Klíčová slova: květy, kyselina askorbová, fenolické látky, kyselina fytová

Abstract

In the modern technologically developed world, people are returning to the use of traditional sources of food. Edible flowers have become the basis for a prosperous trade, but there are many wild species that can be used just as well as cultivated commercial products. In addition to basic nutrients, edible flowers contain a number of minor substances with an effect on the human organism, including components with antioxidant properties. 10 species of flowers of wild plants and woody plants were selected and the content of ascorbic acid, phytic acid and the total content of phenolic substances were determined. The content of ascorbic acid was between 1-156 mg/100 g. The content of phytic acid reached 34-116 mg/100 g, the most phytic acid was in Geranium sylvestre. Total phenolic substances were contained in the range of 35-2411 mg/100 g, the most in *Barbarea vulgaris*. The measured values prove that edible flowers not only have an aesthetic function in dishes, but are also a source of nutritionally important substances

Keywords: flowers, ascorbic acid, phenolic compounds, phytic acid

Úvod

Konzumace květů rostlin doprovází lidstvo celou jeho historii. V moderní industriální společnosti však ztratila většina obyvatel těsný kontakt s přírodou a také postupně mizí tradiční znalosti o využití různých druhů rostlin. Přesto se znovu objevil trend návratu k přírodě a k využívání méně obvyklých přírodních surovin, kam patří i jedlé květy. Jejich užití plní několik funkcí:

Zeleniny (brokolice, květák, artyčok, pupava bezlodyžná)
Funkce ochucení a aromatizace (levandule, hřebíček kapary)
Léčivé rostliny (květy černého bezu, lipový květ, heřmánek, mateřídouška, měsíček lékařský)
Zdroje přírodních barviv (světlice barvířská, ibišek, šafrán, clitorea)
Zdroj fytoncidů (hřebíček, šalvěj, levandule)
Sušené květy do čajů (chrpa, slunečnice, jasmín, růže, brutnák)

Jedlé květy se konzumují převážně syrové, když slouží jako dekorace dezertů a lahůdkářského zboží, ale mohou být využity do ovocných i zeleninových salátů, pomazánek a nápojů. Některé květy je možno tepelně upravovat, například dusit nebo po obalení smažit. Oblíbené je zpracování do sirupů, proslazování nebo potahování cukernou krustou.

Pokud se týká základních živin, jsou květy (kromě zeleniny) především zdrojem vlákniny a minerálních látek. Květy však obsahují i pestrou směs minoritních látek od aromat a barviv po

antioxidanty (Kandylis 2022). Cílem této práce bylo zjištění, jak vysoký je obsah látek ovlivňujících antioxidační chování jedlých květů převážně všeobecně známých planých druhů rostlin. Pouze pažitka byla sbírána z původně pěstovaného zplanělého trsu. Řada těchto druhů už našla své využití. Květy černého bezu, slézu lesního a příbuzného slézu maurského jsou využívány jako léčivky (flos sambuci, flos malvae), pažitka a popenec jako zdroj jarní zelené natě, jetel luční má využití v doplňcích stravy jako zdroj fytoestrogenů (flos trifolii rubri).
Pro stanovení byla vybrána kyselina askorbová (vitamin C),která působí v rostlinách mimo jiné jako ochrana proti reaktivním kyslíkovým radikálům a kterou si lidský organismus není schopen vytvořit. Dále pak byl zvolen celkový obsah fenolických látek (TPC). Fenolické látky jsou rozsáhlá skupina sloučenin, do které patří kromě fenolických kyselin flavonoidy včetně výrazných rostlinných barviv. Fenolické látky chrání rostliny před patogeny, jako například před bakteriemi, houbami, viry a také před abiotickým stresem vyvolaným suchem, obsahem solí v substrátu a UV zářením. Antioxidační vlastnosti fenolických látek chrání rostlinu před účinky reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Další látky z této skupiny, jako kumarin a tanin, chrání rostliny před býložravci. Některé fenolické látky mají chelatační schopnost, tj. mohou vázat ionty těžkých kovů. Při vysoké koncentraci, za přítomnosti měďnatých nebo železitých iontů nebo při vyšším pH však mohou působit prooxidačně a poškozovat zdravé buňky v organismu. Toto nebezpečí však nehrozí při konzumaci běžné stravy, ale pouze při předávkování doplňky stravy (Kumar a kol. 2020, Rajashekar 2023). Kyseliny fytová se vyskytuje především v semenech rostlin, kde je přirozenou zásobou fosforu pro klíčící rostlinu. Je považována za antinutriční látku, protože je schopná vázat vápenaté, zinečnaté, hořečnaté a jiné dvojmocné ionty a tak snižovat jejich biologickou využitelnost. Na druhé straně je v organismu schopna plnit funkci antioxidantu, když váže železo a brání tak jeho uplatnění v tvorbě ROS. Vazbou vápníku snižují možnost vaskulární kalcifikace a známo je i protizánětlivé působení kyseliny fytové (Frýbortová a kol.2023, Pujol a kol. 2023).
Stanovení těchto vybraných látek v jedlých květech by mohlo podpořit využívání květů v gastronomii nejen z hlediska estetického a senzorického, ale i z pohledu nutričního.

Materiál a metody

Rostliny na analýzy byly získány sběrem v okolí VÚPP v Praze Hostivaři a v suchém poldru Rokytky v Praze 14. V laboratoři byly vzorky přebrány a co nejdříve zamraženy na -80 °C. Homogenizovány byly v zmrzlém stavu před stanovením kyseliny askorbové. V tabulce 1 je uveden přehled vzorků. V tabulce je také uvedeno, zda je rostlina v tzv, on hold seznamu dosud neschválených (ale současně nezakázaných zdravotních tvrzení).

Tab.1 Seznam analyzovaných květů

	Název	Latinsky	Poznámka	On hold
1	jetel luční	*Trifolium pratense*	květenství	ano
2	bez černý - květ	*Sambucus nigra*	květenství	ano
3	barborka obecná	*Barbarea vulgaris*	květenství	ano
4	smetánka lékařská	*Taraxacum officinale*	květenství	ano
5	pažitka pobřežní	*Allium schoenoprasum*	květenství	ne
6	růže šípková	*Rosa canina*	květy	ano
7	popenec břečťanolistý	*Glechoma hederaceae*	kvetoucí nať	ne
8	sléz lesní	*Malva sylvestris*	květy	ano
9	čekanka obecná	*Cichorium intybus*	květenství	ano
10	kakost luční	*Geranium pratense*	květy	ano

Kyselina akorbová (vitamin C, AK) byla extrahována ze vzorků roztokem kyseliny metafosforečné a stanovena RP-HPLC na koloně Lichrosphere 100 RP C 18 s UV detekcí při

□=251 nm. Celkový obsah fenolických látek (TPC) byl stanoven spektrofotometricky po reakci s Folinovým činidlem a obsah kyseliny fytové s využitím enzymatického kitu PHYTIC ACID/TOTAL PHOSPHORUS KIT (kat. označení MEGK-PHYT) firmy Megazyme. Výsledky analýz jednotlivých látek v tabulkách 2-4 jsou průměrem dvou paralelních stanovení a jsou vztaženy na čerstvý rostlinný materiál.

Výsledky a diskuse

Kyselina askorbová (AK) je v rostlinách syntetizována jako látka se schopností vychytávat reaktivní kyslíkové radikály (ROS). Kromě funkce antioxidantu se podílí jako kofaktor enzymů na mnoha procesech v rostlinách v normálních i ve stresových podmínkách, například na regulaci klíčení semen, fotosyntéze, tvorbě květů a plodů i na regulaci procesu stárnutí rostliny (Akram a kol. 2017). Výsledky stanovení AK jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2 Obsah kyseliny askorbové v čerstvých květech rostlin.

	Název	Latinsky	Průměr (mg/100 g)	Prům. odchylka (mg/100 g)	c.v. (%)
1	jetel luční	*Trifolium pratense*	0,94	0,05	5,20
2	bez černý - květ	*Sambucus nigra*	13,84	1,00	7,21
3	barborka obecná	*Barbarea vulgaris*	155,77	1,46	0,95
4	smetánka lékařská	*Taraxacum officinale*	1,22	0,07	6,00
5	pažitka pobřežní	*Allium schoenoprasum*	59,80	2,63	4,40
6	růže šípková	*Rosa canina*	6,80	0,26	3,75
7	popenec břečťanolistý	*Glechoma hederaceae*	2,08	0,03	1,58
8	sléz lesní	*Malva sylvestris*	25,04	2,15	8,60
9	čekanka obecná	*Cichorium intybus*	1,12	0,06	5,29
10	kakost luční	*Trifolium pratense*	13,03	1,69	12,99

Z tabulky 2 je zřejmé, že obsah AK byl v květech sledovaných rostlin velmi rozdílný. Vysoký obsah byl zachycen v květech barborky obecné a pažitky, vyšší hodnota byla zaznamenána u slézu lesního. Obsah AK v květech barborky odpovídá údajům Zennie (1977), kde je uveden obsah 130 mg AK/100 g AK v listech. Agroatlas vysloveně zařazuje barborku mezi rostliny s antiskorbutickým účinkem. Literárních údajů o obsahu AK v květech je velmi málo, uváděné obsahy AK se řádově shodují s výše uvedenými. Více se studuje obsah AK v listech, když například obsah AK v listech pažitky byl tak 12 mg/100 g (Štajner 2004) nebo 18,4 mg/100 g (Viňa 2009). V květech stanovený obsah byl tedy vyšší. Demasi a kol. (2021) stanovili v květech v čekance 4 mgAK/100 g, v kakostu 7,9 mg/100 g, v květech růže šípkové 4 mg /100 g, u smetánky lékařské 3,5 mg/100 g a v květech bezu černého 11 mg/100 g. Zennie (1977) našel vyšší obsah AK v nati popence – 44 mg/100 g.

Ve většině zde analyzovaných druhů byl obsah AK poměrně nízký. Nevýhodou AK je totiž její malá stabilita v rostlinném materiálu. Prakticky od okamžiku sběru se obsah AK snižuje v závislosti na přístupu kyslíku a dalších podmínkách skladování (Feszterová a kol. 2023). Proto je vhodné sklizené květy co nejdříve spotřebovat.

Fenolické látky mají vedle antioxidačních schopností v rostlině ještě řadu fyziologických funkcí. Do této skupiny spadají mimo jiné i rostlinná barviva, která ke květům lákají opylující hmyz. Obsah celkových fenolických látek (TPC) jedlých květech v čerstvém stavu je v tabulce 3.

Tab. 3 Obsah celkových fenolických látek v čerstvých květech rostlin.

	Název	Latinsky	TPC (mg GAE/100g)	prům. odch. (mg GAE/100g)	c.v. (%)
1	jetel luční	*Trifolium pratense*	34,7	1,5	4,27
2	bez černý - květ	*Sambucus nigra*	700,3	5,6	0,81
3	barborka obecná	*Barbarea vulgaris*	334,7	4,2	1,24
4	smetánka lékařská	*Taraxacum officinale*	149,4	3,4	2,24
5	pažitka pobřežní	*Allium schoenoprasum*	485,8	1,6	0,34
6	růže šípková	*Rosa canina*	1 030,8	7,8	0,75
7	popenec břečťanolistý	*Glechoma hederaceae*	151,1	3,5	2,17
8	sléz lesní	*Malva sylvestris*	171,1	5,8	3,39
9	čekanka obecná	*Cichorium intybus*	755,9	29,5	3,91
10	kakost luční	*Trifolium pratense*	2 410,7	77,3	3,91

Obsah fenolických látek byl nejvyšší v květech kakostu a růže šípkové a naopak minimální ve vzorku jetele. Stanovené hodnoty je obtížné porovnávat s literárními údaji, jsou údajem o okamžitém zdravotním a fyziologickém stavu rostliny, protože každá rostlina rostla v jiných půdních a světelných podmínkách. Například u popence je možno nalézt obsah TPC 40-55 mg GAE/g sušiny (Varga a kol. 2016) i 2,25-3,68 mg GAE/ g sušiny (Ciavoi a kol. 2019), v čekance 1468,5-1531,2 mg GAE/100 g sušiny (Stanciu a kol. 2019) nebo 10,6 mg GAE /g čerstých květů (Derakhshani a kol. 2012) nebo 6,2 mg GAE/ g čerstvého vzorku. Květ růže šípkové je bohatým zdrojem TPC s 52-180 mg GAE/g sušiny (Jariani a kol. 2024, Shameh a kol. 2018), dosti vysokého obsahu TPC dosahují i květy pažitky nebo slézu lesního (Socha kol. 2021, Beghad a kol. 2014, Mousavi a kol. 2021, Grzeszczuk a kol. 2011).

Kyselina fytová je považována na významný antinutriční faktor v rostlinném materiálu, proto byly provedeny analýzy i ve vzorcích jedlých květů (viz tab.4). Výsledky obsahu kyseliny fytové jsou velmi nízké a většinou se pohybují blízko limitu kvantifikace metody stanovení (0,040 g/100 g vzorku).

Tab. 4 Obsah kyseliny fytové v čerstvých jedlých květech

Název	Latinsky	Průměr (g/100 g)	Prům. odchylka (g/100 g)	c.v. (%)
jetel luční	*Trifolium pratense*	<0,0400	0,0003	0,95
bez černý - květ	*Sambucus nigra*	0,0767	0,0028	3,61
barborka obecná	*Barbarea vulgaris*	0,1161	0,0012	0,99
smetánka lékařská	*Taraxacum officinale*	0,0512	0,0004	0,82
pažitka pobřežní	*Allium schoenoprasum*	0,0710	0,0022	3,04
růže šípková	*Rosa canina*	0,0684	0,0052	7,61
popenec břečťanolistý	*Glechoma hederaceae*	0,0709	0,0072	10,17
sléz lesní	*Malva sylvestris*	0,0553	0,0013	2,40
čekanka obecná	*Cichorium intybus*	0,0500	0,0021	4,11
kakost luční	*Trifolium pratense*	0,0604	0,0048	7,92

V případě kyseliny fytové tedy jedlé květy nepředstavují vzhledem k nízkému obsahu a pouze příležitostné konzumaci zdravotní riziko. Podobné závěry publikovali u vzorků korunních plátků růží Mallick a kol. (2024) a Mahadkar a kol. (2012) u planých květů indických rostlin. Tito autoři také sledovali obsah dalších antinutričních látek, například kyseliny šťavelové, saponinů a taninu, nalezené hladiny však byly minimální. Zdá se tedy, že větším rizikem než

vlastní přirozeně obsažené látky mohou být látky pocházející ze znečištěného životního prostředí.

Závěr

V květech a květenstvích deseti druhů planých rostlin byl stanoven obsah kyseliny askorbové, celkových fenolických látek a kyseliny fytové jako látek, které významně ovlivňují antioxidační vlastnosti vybraných rostlin. Obsah kyseliny askorbové byl velmi rozdílný a dosahoval až téměř 156 mg/100 g. Většina květů by ale nebyla významným zdrojem AK (vitaminu C). Také obsah fenolických látek se pohybuje v širokém rozmezí, od cca 35 do 2411 mg TPC/ 100 g čerstvých květů. Nejvíce TPC bylo nalezeno v květech kakostu lučního. Obsah kyselin fytové byl velmi nízký a neměl by mít negativní vliv na konzumenta. Jedlé květy obsahují i jiné minoritních látky prospěšné zdraví, látky aromatické a chuťové, které opravňují zařazení jedlých květů jako součást pestrého jídelníčku lidí.

Literatura

Agroatlas: Interactive Agricultral Ecological Atlas of Russia and Neihgboring Countries https://agroatlas.ru/en/content/weeds/*Barbarea_vulgaris*/index.html (přístup říjen 2024)

Akram, N. A., Shafiq, F., Ashraf, M.: Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. Front. Plant Sci. 8, 2017,613.

Beghad, M.Ch., Benammar, Ch., Bensalah, F., Sabri, F.Z., Belarbi, M., Chemat, F.: Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content in leaves, flowers, stems and seeds of mallow (*Malva sylvestris* L.) from North Western of Algeria
Afr. J. Biotechnol., 13(3), 2014, 486-491.

Ciavoi, G., Jurca, T., Pasca, B., Bechir, E.S., Mraz, C., Jurca, C., Kiss, R., Marc, F., Pallag, A.: Evaluation of Phenolic Compounds Content and Antioxidant Capacity of Some Medicinal Plants, Potentially Used for Their Preventive Role Against Various Oral Diseases.
Rev. Chim. (Bucharest), 70(6), 2019, 2150-2154.

Demasi, S., Caser, M., Donno, DD., Enri, S.R., Lonati,M., Scariot, V.: Exploring wild edible flowers as a source of bioactive compounds: New perspectives in horticulture
Folia Hort., 33(1), 2021, 27–48.

Derakhshani, Z., Hassani, A., Pirzad, A., Iahi, R.A., Dalkani, M.:Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity in some medicinal herbs cultivated in Iran
Botanica Serbica 36 (2),2012, 117-122.

Feszterová, M.; Kowalska, M.; Mišiaková, M. Stability of Vitamin C Content in Plant and Vegetable Juices under Different Storing Conditions. Appl. Sci. 2023, 13, 10640.

Frýbortová, V., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P.: Kyselina fytová – škodí či pomáhá? Klin Farmakol Farm, 37(4), 2023,149-151.

Grzeszczuk, M., Wesolowska A., Jadczak, D., Jakubowska, B.: Nutritional value of chive edible flowers
Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus,10(2), 2011, 85-94.

Kumar, S., Abedin, M., Singh, A.K., Das, S.: Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms in R. Lone et al. (eds.), Plant Phenolics in Sustainable Agriculture, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020.

Jariani, P.; Shahnejat-Bushehri, A.-A.; Naderi, R.; Zargar,M.; Naghavi, M.R. Molecular and Phytochemical Characteristics of Flower Color and Scent Compounds in Dog Rose (Rosa canina L.). Molecules, 29, 2024, 3145.

Kandylis, P. Phytochemicals and Antioxidant Properties of Edible Flowers. Appl. Sci. 2022, 12, 9937.

Mahadkar, S., Valvi, S., Rathod, V.: Screening of anti-nutritional factors from some wild

edible plants.
J. Nat. Prod. Plant Resour.,2 (2), 2012, 251-255.
Mallick, S.R., Hassan, J., Hoque, K.A., Sultana, H., Kayesk, E., Ahmed, M., Ozki, Y., Al-Hashimi, A., Siddiqui, M.H.: Color, proximate composition, bioactive compounds and antinutrient profiling of rose.
Scientific Reports, 14, 2024,21690
Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Behbudi, G., Mazraedoost, S., Omidifar, N., Gholami, A., Chiang, W.H., Babapoor, A., Rumjit, N.P.: A Review on Health Benefits of *Malva sylvestris* L. Nutritional Compounds for Metabolites, Antioxidants, and Anti-Inflammatory, Anticancer, and Antimicrobial Applications
Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 5548404.
On hold seznam: Vodítka k problematice zdravotních a výživových tvrzení https://www.szpi.gov.cz/clanek/voditka-k-problematice-zdravotnich-a-vyzivovych-tvrzeni.aspx (přístup říjen 2024)
Pujol, A.; Sanchis, P.; Grases, F.; Masmiquel, L. Phytate Intake, Health and Disease: "Let Thy Food Be Thy Medicine and Medicine Be Thy Food". Antioxidants 2023, 12, 146.
Rajashekar, C.B.:Dual Role of Plant Phenolic Compounds as Antioxidants and Prooxidants.
American Journal of Plant Sciences ,14, 2023,15-28.
Shameh, S., Hosseini, B., Alirezalu, A.: Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Petals of Six *Rosa* Species from Iran.
J. AOAC Int., 101(6), 2018, 1788-1793.
Socha, R., Kalwik, J., Juszczak, L.: Phenolic Profile And Antioxidant Activity Of The Selected Edible Flowers Grown In Poland.
Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, 25(2), 2021, 185.
Stanciu, G., Rotariu, R., Popescu, A., Tomescu, A.: Phenolic and Mineral Composition of Wild Chicory Grown in Romania
Rev.CHim.(Bucharest), 70(4), 2019, 1173-1176.
Štainer, D., Canadanovič, J., Canadanovič-Brunet, J., Pavlovič, A.: Allium schoenoprasum L., as a Natural Antioxidant
Phytother. Res. 18, 2004,522–524.
Varga, L, Engel R., Szabó K., Abrankó L., Gosztola B., Zámboriné Németh É., Sárosi Sz.: Seasonal variation in phenolic content and antioxidant activity of *Glechoma hederacea* L. harvested from six Hungarian populations. Acta Alimentaria, 45 (2), 2016, 268-276.
Viňa, S.Z., Cerimele, E.L.: Quality chances in fresh chives *(Allium schoenoprasum* l.) during refrigerated storage
J. Food Qual., 32, 2009,747-759.
Zennie, T.M., Ogzewalla, C.D.: Ascorbic Acid and Vitamin A Content of Edible Wild Plants of Ohio and Kentucky
Economic Botany, 31(1-2), 1977, 76-79.

Poděkování: Práce byla připravena v rámci projektu výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ, grant MŠMT: LM2023064 a za podpory NAZV projektu QL24010019.

Ing. Jana Rysová
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.
Radiová 7
102 00 Praha 10, Hostivař
j.rysova@vupp.cz
tel. 296 792 389

Metody charakterizace energetických travin

Methods of characterizing energy grasses

Sýkorová V.[1,2], Jezerská L.[1], Gelnar D.[1], Prokeš R.[1], Žídek M.[1], Frydrych J.[3]

[1]*VŠB-TUO, CEET, ENET, Laboratoř sypkých hmot, 17. listopadu 15, 708 00 Ostrava-Poruba, ČR*

[2]*VŠB-TUO, Fakulta strojní, Katedra energetiky, 17. listopadu 15, 708 00 Ostrava-Poruba, ČR*

[3]*OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Hamerská 698, 756 54 Zubří, ČR*

Abstrakt

Existuje velké množství travin, které se pěstují pro energetické účely a běžně rostou na území ČR. Charakterizace je důležitá z hlediska dalšího zpracování materiálů. Bylo vybráno šest druhů energetických travin: srha laločnatá, kostřava červená, kostřava rákosovitá, jílek vytrvalý, jílek mnohokvětý a festulolium. Distribuce velikosti částic potvrdila, že rozložení velikostních frakcí částic všech travin je vhodné pro peletizaci, protože traviny neobsahovaly velké množství velmi malých ani velmi velkých částic, které by mohly mít špatný vliv na funkční části peletovacího lisu a na samotnou matrici. Nejvíce materiálu u všech tří vzorků bylo zachyceno na sítu o velikosti ok 500 µm. Sypný úhel byl měřen pro určení tokovosti materiálů. Všechny zkoumané traviny byly dle sypného úhlu vyhodnoceny jako velmi kohezivní, špatně tekoucí materiály. Pro zlepšení tokových vlastností je možno využít různá pojiva a aditiva.

Klíčová slova: biomasa, distribuce velikosti částic, sypný úhel, tokovost

Abstract

There are a large number of grasses that are grown for energy purposes and commonly grow in the territory of the Czech Republic. Characterization is important from the point of view of further processing of materials. Six types of energy grasses were selected: cock's-foot grass, red fescue, tall fescue, perennial ryegrass, Italian ryegrass, and festulolium. The particle size distribution confirmed that the distribution of the particle size fractions of all grasses was suitable for pelletizing, as the grasses did not contain a large amount of very small or very large particles that could have a bad effect on the functional parts of the palletizing press. The most material for all samples was captured on a sieve with a mesh size of 500 µm. The angle of repose was measured to determine the flowability of the materials. All grasses were evaluated as very cohesive, poorly flowing materials according to their angle of repose. Different binders and additives can be used to improve flow properties.

Keywords: biomass, particle size distribution, angle of repose, flowability

Úvod

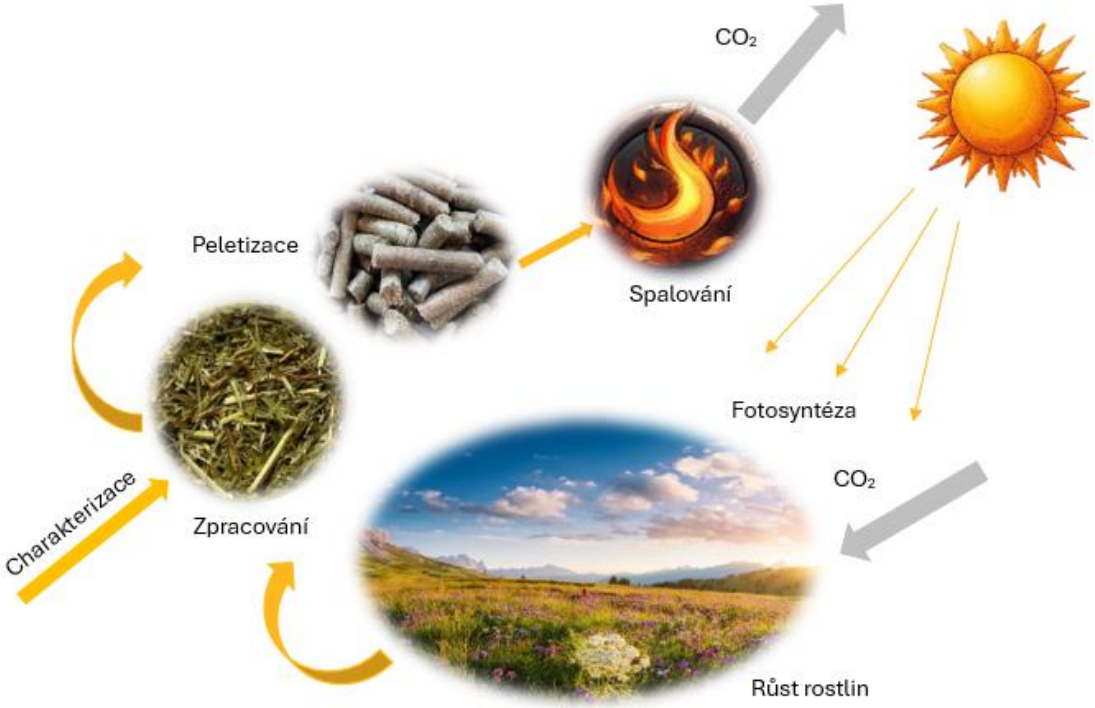
Biomasa představuje významný obnovitelný zdroj energie (Obrázek 1), který má potenciál z části nahradit fosilní paliva a přispět ke snížení emisí skleníkových plynů (Thengane a kol., 2022). Nedřevní biomasa, jako jsou energetické traviny, má značné výhody díky své široké dostupnosti, rychlému růstu a schopnosti se přizpůsobit různým klimatickým podmínkám (Scordia a Cosentino, 2019).

Pro efektivní využití biomasy je nutné provést její charakterizaci. Pro charakterizaci je důležitá velikost částic (Harun a Afzal, 2016) a také tokovost materiálu, která je charakterizována pomocí sypného úhlu (Guo a kol., 2014). Velikost částic má vliv na spalovací procesy, skladovatelnost a manipulaci s materiálem (Harun a Afzal, 2016). Tokovost materiálu je velmi důležitým parametrem pro navrhování a optimalizaci zařízení, jako jsou zásobníky, dopravníky a jiné systémy pro manipulaci s biomasou. Nedostatečná tokovost může vést k nežádoucím přerušováním procesů, což způsobuje ztráty v efektivitě a zvyšuje provozní náklady (Ganesan

a kol., 2009). Tyto vlastnosti jsou také důležité při peletizaci, která zlepšuje vlastnosti biomasy pro spalování (nedřevní biomasa má nízkou energetickou hustotu, proto je vhodné ji peletizovat) a usnadňuje její dopravu a skladování (Prins, 2015, Garcia a kol., 2019). Před samotnou peletizací je však nutné biomasu důkladně zpracovat, zejména je třeba snížit velikost částic na vhodnou úroveň, která usnadní homogenizaci materiálu a zlepší jeho tokové vlastnosti. Velikost částic biomasy hraje klíčovou roli nejen v samotném procesu peletizace, ale také v konečné kvalitě pelet, přičemž menší částice obvykle přispívají k lepší soudržnosti pelet a vyšší výhřevnosti (Labbé a kol., 2020).

Pro tento výzkum bylo vybráno šest druhů energetických travin: srha laločnatá, kostřava červená, kostřava rákosovitá, jílek vytrvalý, jílek mnohokvětý a festulolium. Tyto traviny byly vybrány z důvodu jejich potenciálu jako energetických plodin (Seed Service, 2021).

Výsledky této studie mohou přispět k lepšímu porozumění tomu, jak tyto vlastnosti ovlivňují manipulaci, skladování a energetické využití biomasy, a zároveň poskytnout důležité údaje pro optimalizaci technologických procesů, které jsou nezbytné pro efektivní využití nedřevní biomasy.



Obrázek 2: Princip zpracování nedřevní biomasy.

Materiály a metody

Pro výzkum bylo zvoleno celkem šest druhů energetických travin. Jednalo se o srhu laločnatou (Obrázek 2a), kostřavu červenou (Obrázek 2b), kostřavu rákosovitou (Obrázek 2c), jílek vytrvalý (Obrázek 2d), jílek mnohokvětý (Obrázek 2e) a festulolium (Obrázek 2f) ze společnosti OSEVA vývoj a výzkum, s.r.o., Zubří. Srha laločnatá (*Dactylis glomerata*) se vyskytuje od nížin po hory na loukách, pastvinách a okrajích lesů, dobře snáší sušší podmínky a polostín. Výška rostliny dosahuje 50-100 cm a jedná se o vytrvalý a hustě trsnatý porost. Srha laločnatá patří k velmi výnosným travám, má vysokou konkurenční schopnost a na jaře velmi rychle roste (Agrostis, 2024). Kostřava červená (*Festuca rubra*) roste jak na suchých nížinných loukách, tak na vlhkých horských loukách a pastvinách. Výška rostliny dosahuje 20-60 cm jedná se o vytrvalý trsnatý porost. Využívá se především pro trávníkové a doplňkově pro pícninářské využití. Poměrně dobře snáší sucho a horko (Agrostis, 2024). Kostřava rákosovitá

(*Festuca arundinacea*) se vyskytuje na vlhkých loukách, okrajích cest a vyhovují ji vlhké, výživné a těžké půdy. Nevyhovují ji kyselé půdy. Roste především v nížinách a v podhůří, na horách se vyskytuje pouze výjimečně. Výška rostliny dosahuje 60-150 cm a jedná se o vytrvalý trsnatý druh. Je možné ji využívat jako porost na pastvinách. Je možné ji využít i při šlechtění trav jako významný zdroj genetického materiálu pro hybridizaci mezi různými rody travin (Agrostis, 2024). Jílek vytrvalý (*Lolium perenne*) roste na loukách a pastvinách, okrajích cest na vlhkých a výživných půdách v nížinách a v podhůří. Výška rostliny dosahuje 10-60 cm a rostliny vytváří vytrvalý trsnatý porost. Jílek vytrvalý je krátkostébelný porost, který je ovlivňován především pastvou. Špatně snáší dlouhodobější zastínění. Má dobrou regeneraci (Agrostis, 2024). Jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum*) je ČR nepůvodním druhem, který se vyskytuje na výživných půdách na mezích a rumištích a roste v nížinách a v podhůřích. Výška rostliny dosahuje 30-100 cm a jedná se o jednoletý až dvouletý volně trsnatý druh. Jedná se o významný pícní druh, který se využívá na orné půdě. Je náročný na živiny, vláhu a teplo. Je možné ji využít i při šlechtění trav jako významný zdroj genetického materiálu pro hybridizaci mezi různými rody travin (Agrostis, 2024). Festulolium (*Festulolium*) je mezirodový hybrid jílků a kostřav. Jeho vlastnosti jsou kombinací vlastností jílků a kostřav, kdy předností kostřav jsou vytrvalost, zlepšená odolnost proti suchu a zimě; a předností jílků jsou velký výnos, rychlost růstu a kvalita píce (Seed Service, 2021).

Distribuce velikosti částic byla měřena pomocí sítové analýzy na vibračním separátoru Fritsch Analysette 3S (Fritsch, Německo). Byla zvolena síta o velikosti ok 63, 200, 500, 1000, 1400, 2000, 2500 μm).

Sypný úhel byl měřen pomocí vibračního dopravníku, do kterého byl vsypán materiál a vibracemi byl posouván na konec dopravníku, kde se sypal na misku a tvořil rovnoměrný kónický tvar. Tento tvar byl následně vyfotografován z osmi stran a pomocí programu eScope byl změřen sypný úhel. Výsledný úhel byl vypočítán jako průměr sypných úhlu všech osmi stran. Tokovost byla určena dle Tabulky 1.

Obrázek 3: Srha laločnatá (a), kostřava červená (b), kostřava rákosovitá (c), jílek vytrvalý (d), jílek mnohokvětý (e), festulolium (f).

Tabulka 4: Režim tokovosti sypkých hmot podle sypného úhlu (AOR)

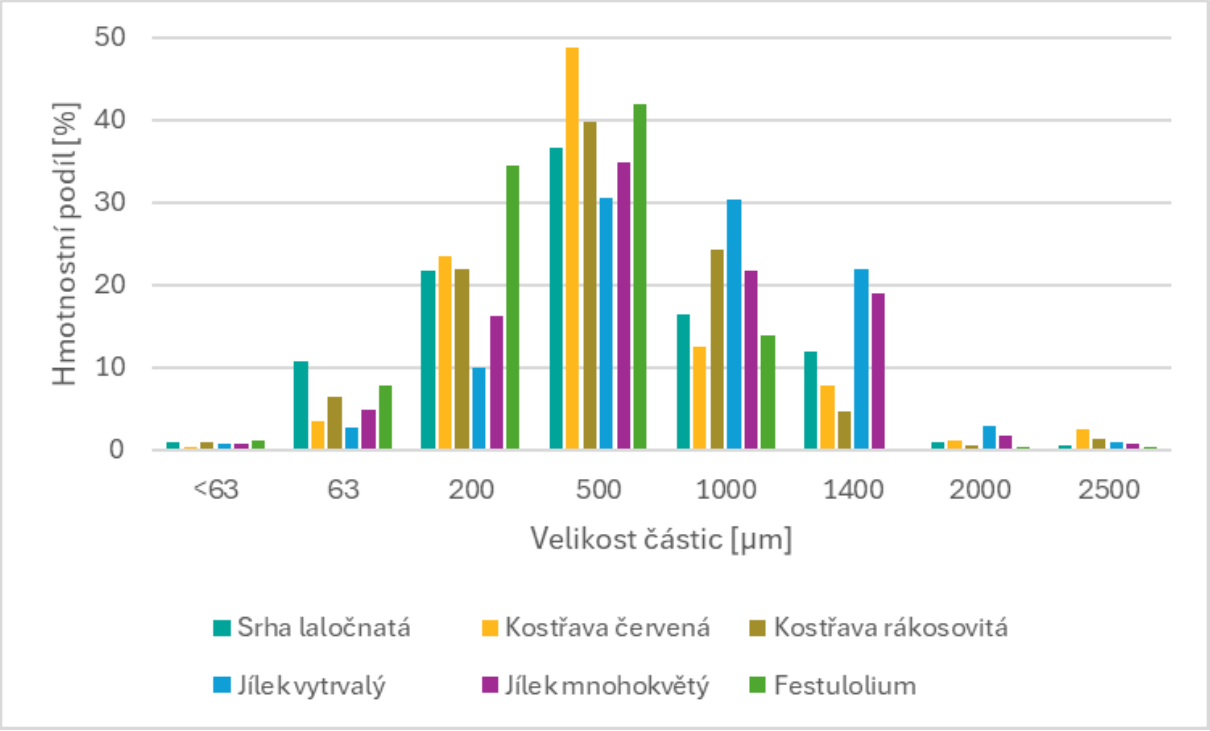
Režim tokovosti	AOR (°)
Volně tekoucí	25-30
Lehce tekoucí	31-35
Vyhovující	34-40
Sjízdný	41-45
Kohezivní	46-55
Velmi kohezivní	56-65
Extrémně kohezivní	>66

Výsledky

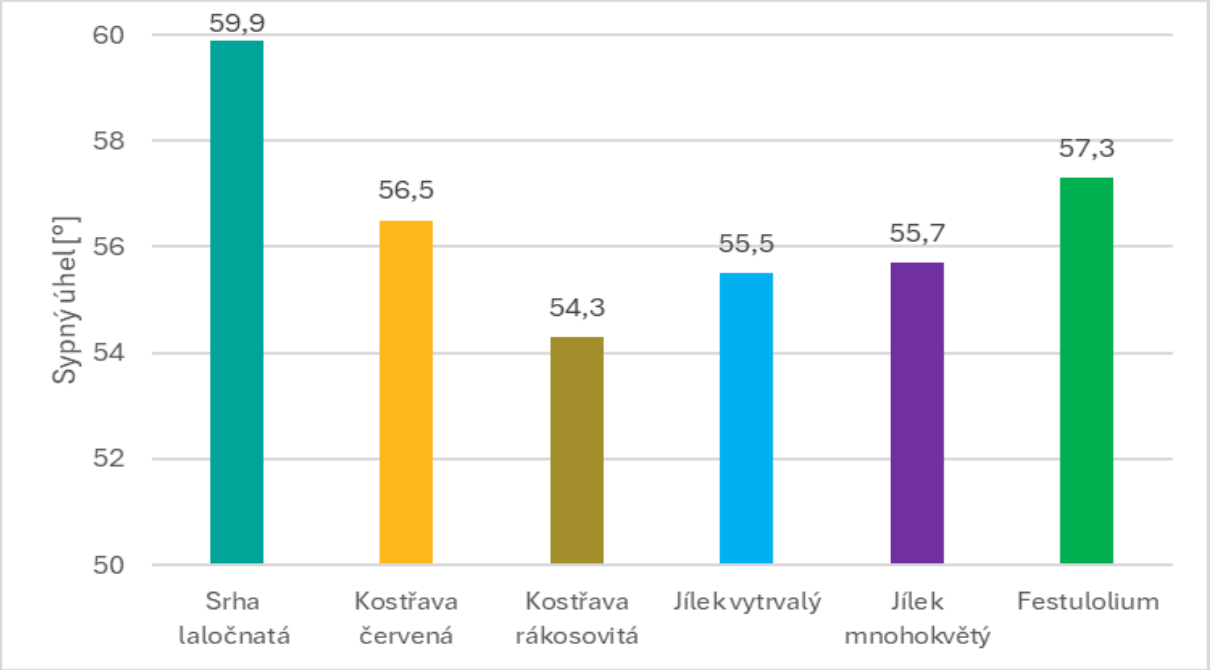
Výsledky distribuce velikosti částic jsou znázorněny na Grafu 1. Z výsledků je zřejmé, že pro všech šest vzorků energetických travin platí, že největší množství materiálu se zachytilo na sítě o velikosti ok 500 µm a dále na sítě o velikosti ok 200 µm a 1000 µm. Poměrně velké množství materiálu se zachytilo na sítě o velikosti ok 1400 µm u jílku vytrvalého, jílku mnohokvětého a srhy laločnaté. Částice menší než 63 µm, 2000 µm a 2500 µm a větší se vyskytovaly ve velmi malém množství nebo téměř vůbec.

Výsledky sypného úhlu jsou znázorněny na Grafu 2. Nejvyšší sypný úhel byl naměřen pro srhu laločnatou (59,99°), dále pro festulolium (57,29°) a kostřavu červenou (56,59°). Tyto tři vzorky jsou klasifikovány jako velmi kohezivní materiály. Jílek mnohokvětý (55,65°), jílek vytrvalý (55,51°) a kostřava rákosovitá (54,32°) mají nižší sypné úhly a jsou klasifikovány jako kohezivní materiály. Podle výsledků je tedy patrné, že tokovost u všech zkoumaných travin není příliš vyhovující a pro její zlepšení se nabízí možnost využití různých pojiv a aditiv.

Graf 3: Porovnání DVČ pro všechny vzorky energetických travin.



Graf 4: Porovnání sypného úhlu pro všechny vzorky energetických travin.



Diskuze

Výsledky distribuce velikosti částic ukázaly, že největší zastoupení v každém materiálu měly částice o velikosti 500 µm. Vysoké zastoupení měly také částice o velikosti 200 µm a 1000 µm a u většiny vzorků (kromě kostřavy luční) byl poměrně vysoký podíl také pro částice o velikosti 1400 µm. Srha laločnatá také obsahovala vyšší množství částic o velikosti 63 µm. Částice menší než 63 µm a větší než 1400 µm byly zastoupeny v zanedbatelném poměru. Podle jedné ze studií, byla naměřena distribuce velikosti částic pro luční seno obdobně jako pro uvedené vzorky, tedy největší podíl částic byl naměřen pro velikosti 200, 500 a 1000 µm (Sykorova a kol., 2024). Lze tedy konstatovat, že zastoupení jednotlivých velikostí částic je vhodné pro další zpracování biomasy, jako je peletizace. Jelikož všechny vzorky obsahují jen málo částic menších než 63 µm, nebude docházet ve velké míře k ucpávání funkčních částí peletizačního lisu prašnými částicemi. Naopak velké částice (větší než 1400 µm) by mohly ucpávat přímo peletizační matrici, a tudíž by nedocházelo k rovnoměrné výrobě pelet. Podle dostupných výzkumů bylo zjištěno, že distribuce velikosti částic biomasy je ve shodě pro různé typy a kumulativní hmotnostní podíl má dobrý lineární vztah s velikostí částic v širokém rozmezí velikostí (Guo a kol., 2012). Podle studie zaměřené na peletizaci biomasy na peletizačním lisu byly právě pro peletizaci na peletizačním lisu využity pouze frakce biomasy o velikosti částic 0,25 až 1 mm kvůli homogenitě vzorku (Puig Arnavat a kol., 2016.) Dle studie zaměřené na vliv velikosti částic na procesy zpracování biomasy je patrné, že materiály ze smíšených velikostí částic mají lepší vliv na spotřebu energie, pevnost v tlaku a hustotu než materiály o jedné velikosti částic (Wang a kol., 2018).

Sypný úhel byl naměřen jako parametr pro určení tokovosti zkoumaných energetických travin. Srha laločnatá, kostřava červená a festulolium měly sypný úhel vyšší než 55° a byly v režimu tokovosti klasifikovány jako velmi kohezivní materiály. Kostřava rákosovitá, jílek vytrvalý a jílek mnohokvětý měly sypný úhel nižší než 55° a byly v režimu tokovosti klasifikovány jako kohezivní materiály. Kohezivní a velmi kohezivní materiály jsou materiály soudržné, které mají silný účinek přitažlivých sil mezi molekulami (van der Waals, elektrostatické vazby, mechanické zaklesnutí) a nemají tedy dobrou tokovost, což ovlivňuje manipulaci a dopravu těchto materiálů a také různá konstrukční řešení pro jejich skladování (např. zásobníky). Podle dostupných studií obecně platí, že zvyšující se obsah vlhkosti a velikost částic zvyšují sypný

úhel (Ileleji a Zhou, 2008). Výsledky již provedených výzkumů potvrzují, že sypný úhel je při charakterizaci tokových vlastností materiálů poměrně přesný v porovnání s jinými způsoby měření tokovosti (Xu a kol., 2019). Tokovost je možné zlepšit pomocí různých pojiv a aditiv. Může se jednat jak o organické, tak anorganické materiály, jako jsou například lignosulfonát, škrob, karboxymetylcelulóza, oxid vápenatý a další (Butler a kol., 2023).

Závěr

Cílem výzkumu bylo představit základní metody charakterizace travin vhodných pro energetické využití. Energetické traviny byly charakterizovány pomocí distribuce velikosti částic a tokovosti, která byla charakterizována sypným úhlem. Bylo využito šest vzorků energetických travin – srha laločnatá, kostřava červená, kostřava rákosovitá, jílek vytrvalý, jílek mnohokvětý a festulolium.

Bylo zjištěno, že rozložení distribuce velikosti částic zhruba odpovídá Gaussově křivce. Všechny materiály obsahovaly nejvíce částic o velikosti 500 µm a dále částice o velikosti 200 µm a 1000 µm. Charakterizace z hlediska velikosti částic je důležitá především kvůli jejímu vlivu na spalovací procesy, skladovatelnost a manipulaci s materiálem.

Pomocí sypného úhlu byla zjištěna tokovost zkoumaných materiálů. Nejvyšší sypný úhel měla srha laločnatá (59,99°) a naopak nejnižší sypný úhel měla kostřava rákosovitá (54,32°). Ostatní vzorky měly sypný úhel mezi těmito hodnotami. Srha laločnatá, festulolium a kostřava červená jsou klasifikovány jako velmi kohezivní materiály. Jílek mnohokvětý, jílek vytrvalý a kostřava rákosovitá jsou klasifikovány jako kohezivní materiály. Výsledky ukázaly, že traviny nemají dobrou tokovost a vyvstává zde tedy možnost pro využití různých organických a anorganických pojiv a aditiv.

Literatura

Agrostis, Kapesní atlas trav, Jílek mnohokvětý (Lolium multiflorum Lamk.), https://www.agrostis.cz/produkt/jilek-mnohokvety-lolium-multiflorum-lamk#text-more.

Agrostis, Kapesní atlas trav, Jílek vytrvalý (Lolium perenne L.), https://www.agrostis.cz/produkt/jilek-vytrvaly-lolium-perenne-l#text-more.

Agrostis, Kapesní atlas trav, Kostřava červená (Festuca rubra L.), https://www.agrostis.cz/produkt/kostrava-cervena-festuca-rubra-l#text-more.

Agrostis, Kapesní atlas trav, Kostřava rákosovitá (Festuca arundinacea Schreber.), https://www.agrostis.cz/produkt/kostrava-rakosovita-festuca-arundinacea-schreber#text-more.

Agrostis, Kapesní atlas trav, Srha laločnatá (Dactylis aglomerata L.), https://www.agrostis.cz/produkt/srha-lalocnata-dactylis-glomerata-l#text-more.

Ganesan, V., Rosentrater, K.A., Muthukumarappan, K., Flowability and handling characteristics of bulk solids and powders – a review with implications for DDGS. Biosyst. Eng. 101 (2008), 425-435. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.09.008.

Garcia, R., Gil, M.V., Rubiera, F., Pevida, C., Pelletization of wood and alternative residual biomass blends for producing industrial quality pellets. Fuel 251 (2019), 739-753. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.03.141.

Guo, Z., Chen, X., Liu, H., Guo, Q., Guo, X., Lu, H., Theoretical and experimental Investigation on angle of repose of biomass – coal blends. Fuel 116 (2014), 131-139. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.07.098.

Harun, N.Y., Afzal, M.T., Effect of Particle Size on Mechanical Properties of Pellets Made from Biomass Blends. Procedia Eng. 148 (2016), 93-99. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.445.

Labbé, R., Paczkowski, S., Knappe, V., Russ, M., Wöhler, M., Pelz, S., Effect of feedstock particle size distribution and feedstock moisture content on pellet production efficiency,

pellet quality, transport and combustion emissions, Fuel 263 (2020), 1-12. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116662.
Prins, M.J., Thermodynamic analysis of biomass gasification and torrefaction. Technische Universiteit Eindhoven, 2015. https://doi.org/10.6100/IR583729.
Scordia, D., Cosentino, S.L., Perennial Energy Grasses: Resilient Crops in a Changing European Agriculture. Agriculture 9 (2019), 1-19. https://doi.org/10.3390/agriculture9080169.
Seed Service, Charakteristika druhů a odrůd trav. https://seedservice.cz/clanky/charakteristika-druhu-a-odrud-trav.
Thengane, S.K., Kung, K.S., Gomez-Barea, A., Ghoniem, A.F., Advances in biomass torrefaction: Parameters, models, reactors, applications, deployment and market. Prog in Energy and Combust Sci 93 (2022), 1-46. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2022.101040.
Sykorova, V., Jezerska, L., Sassmanova, V., Honus, S., Peikertova, P., Kielar, J., Zidek, M., Biomass pellets with organic binders – before and after torrefaction. Renew. Energy 221 (2024), 1-10. 10.1016/j.renene.2023.119771.
Guo, Q., Chen, X., Liu, H., Experimental research on shape and size distribution of biomass particle. Fuel 94 (2012), 551-555. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.041.
Wang, Y., Wu, K., Sun, Y., Effects of raw material particle size on the briquetting process of rice straw. J. Energy Inst. 91 (2018), 153-162. https://doi.org/10.1016/j.joei.2016.09.002.
Ileleji, K.E., Zhou, B., The angle of repose of bulk corn stover particles. Powder Technol. 187 (2008), 110-118. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2008.01.029.
Xu, G., Li, M., Lu, P., Experimental investigation on flow properties of different biomass and torrefied biomass powders. Biomass Bioenergy 122 (2019), 63-75. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.016.
Butler, J.W., Skrivan, W., Lotfi, S., Identification of Optimal Binders for Torrefied Biomass Pellets. Energies 16 (2023), 1-23. https://doi.org/10.3390/en16083390.
Puig Arnavat, M., Shang, L., Sárossy, Z., Ahrenfeldt, J., Henriksen, U.B., From a single pellet press to a bench scale pellet mill — Pelletizing six different biomass feedstocks. Fuel Process. Technol. 142 (2016), 27-33. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.09.022.

Poděkování
Projekt č. SS07020061 „Výzkum procesů zahrnujících výrobu biopelet“ je spolufinancován se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci programu Prostředí pro Život. Tento projekt je financován v rámci Národního plánu obnovy z evropského Nástroje pro oživení a odolnost. Projekt REFRESH – Research Excellence for Region Sustainability and High-tech Industries, CZ.10.03.01/00/22_003/0000048.

Kontakt:
Ing. Veronika Sýkorová, Ing. Lucie Jezerská, Ph.D.
VŠB-TUO, CEET, ENET
17. listopadu 2172/15, 708 00 Ostrava-Poruba
596 999 361, veronika.sykorova@vsb.cz
596 999 430, lucie.jezerska@vsb.cz

Název publikace:	**Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů**
Druh publikace:	**Vědecká příloha časopisu Úroda 12/2024**
Autoři publikace:	**Kolektiv autorů dle obsahu**
Editoři:	**Ing. Jakub Prudil** **Mgr. Helena Hutyrová**
Forma:	**QR kod**
Vydal:	**Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko** **Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko** **a Úroda 12/2024**

ISSN 0139-6013