

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 12/2022, vědecká příloha časopisu

 **ČAZV** | ČESKÁ AKADEMIE  
ZEMĚĚLSKÝCH VĚD

 **ČTPRB**

Hlavní mediální partneři konference

 **úroda**

 **PP**  
ROFI PRESS...

**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 12/2022, vědecká příloha časopisu**

**Editor:**

**Ing. Barbora Badalíková**

**Ing. Jakub Prudil**

**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. LXIX, 2022, vědecká příloha, s. od – do

ISSN 0139-6013

## OBSAH

<b>Nedělník Jan: Úvodní slovo</b> .....	7
---	---

### *Sekce „Šlechtění“*

<b>Bilavčík A., Bobrová O., Faltus M., Zámečnick J.:</b> Charakterizace mrazového poškození u generativních pupenů ovocných dřevin.....	9
<b>Čurn V., Jozová E., Rost M., Rychlá A., Stehlíková D.:</b> Analýza genetické struktury odrůd hořčice bílé pomocí Bayesovských metod modelování .....	17
<b>Endlová L., Vrbovský V., Horáček J., Červeň J.:</b> Analýza spektra alkaloidů u TILLING populace máku setého .....	25
<b>Faltus M., Hammond S.D.H., Domkářová J., Bilavčík A., Zámečnick J.:</b> Vliv dehydratace a termických charakteristik pylu a explantátů bramboru na jejich vitalitu .....	31
<b>Horáček J.:</b> Predikce obsahu inhibitorů trypsinu u hrachu ( <i>Pisum sativum</i> L.) s využitím metody FT-NIRS .....	39
<b>Jozová E., Vrbovský V., Horáček J., Čurn V.:</b> Analýza polymorfismu mikrosatelitových markerů v TILLING populaci .....	45
<b>Jungová M., Petrželová I., Ovesná J.:</b> Validace molekulárních markerů pro identifikaci plísně <i>Hyaloperenospora parasitica</i> u hospodářsky využívaných plodin druhu <i>Brassica oleracea</i> .....	51
<b>Koláriková L., Svoboda P., Chrpová J., Ovesná J.:</b> Molekulární markery odolnosti vůči fusariovému vadnutí klasu .....	61
<b>Kosová K., Klíma M., Vítámvás P., Prášil I. T.:</b> Hodnocení odolnosti vybraných kultivarů řepky ( <i>Brassica napus</i> ) k suchu a následné regeneraci .....	67
<b>Ludvíková M., Dostálová R., Hýbl M., Trněný O., Griga M.:</b> Vývoj CAPS markerů pro genomickou selekci hospodářsky významných znaků u hrachu setého ( <i>Pisum sativum</i> L.) ...	73
<b>Ludvíková M., Smýkalová, I.:</b> Transformace hrachu s využitím CRISPR/Cas9 za účelem vytvoření nízkofytátových linií .....	83
<b>Rožnovský J.:</b> G. J. Mendel a jeho meteorologické aktivity .....	91
<b>Stehlíková D., Jozová E., Čurn V.:</b> Stanovení diverzity genetických zdrojů hořčice na základě analýzy mikrosatelitů .....	99
<b>Zámečnick J., Bobrová O., Faltus M., Bilavčík A.:</b> Heterogenita citlivosti vybraných klonů česneků k nízkým teplotám .....	107

### *Sekce „Rostlinolékařství“*

<b>Drápalová I., Raab S.:</b> Porovnání citlivosti dvou sad primerů ve srovnání s mikroskopickou metodou při detekci hub rodu <i>Neotyphodium</i> spp. ....	111
<b>Gališová V., Seidenglanz M., Arbeláez M. M., Kolařík P.:</b> Ochrana řepky proti stonkovým krytonoscům v roce 2022 .....	119
<b>Golosna L., Holubec V., Chrpová J.:</b> Monitoring patogenů ve směsích pro zatravňování tramvajových tratí .....	127

<b>Jílková B., Víchová J., Pokorný R., Holková L., Kmoch M.:</b> Laboratorní účinnost komponent silic na bakterie <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> a <i>Dickeya solani</i> .....	135
<b>Kmoch M., Doležalová M., Jílková B., Víchová J.:</b> Účinnost vybraných esenciálních olejů na <i>Helminthosporium solani</i> způsobující stříbřitost slupky bramboru .....	141
<b>Kolařík P., Kolaříková K.:</b> Citlivosti nosatčků rodu <i>Apion</i> k účinným látkám insekticidů v letech 2018 – 2022 .....	149
<b>Kubíková Z., Smejkalová H., Hutýrová H.:</b> Fytotoxicita vybraných herbicidních účinných látek ke katránu etiopskému .....	157
<b>Navrátil M., Šafářová D.:</b> Virus mozaiky vodnice ( <i>Turnip mosaic virus</i> ): riziko pro pěstování košťálové zeleniny – Ano nebo Ne? .....	163
<b>Novák M., Pavela R.:</b> Esenciální olej z fenyklu obecného a jeho potenciální využití v ochraně rostlin .....	171
<b>Plachká E., Rychlá A., Gališová V., Kořínek J.:</b> Posouzení vypovídací schopnosti polních testů o odolnosti k chorobám .....	179
<b>Smejkalová H., Kubíková Z., Langová M.:</b> Výsledky herbicidních pokusů s lesknicí kanárskou .....	185
<b>Šafář J., Seidenglanz M., Gališová V., Plachká E.:</b> Biodiverzita škůdců a jejich přirozených nepřátel v luskovinoobilných směsích s podsevem jetele a vojtěšky .....	193
<b>Šafář J., Seidenglanz M., Gališová V., Plachká E.:</b> Efektivní ochrana porostu hrachu proti kyjatce hrachové – <i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris, 1776) .....	201
<b>Wohlmuth J., Hakalová E., Klapcová G., Tekielska D. A., Bytešnicková Z., Richtera L., Baránek M.:</b> Výsledky účinku vybraných nanočástic a oligopeptidů proti patogenu <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> způsobujícímu bakteriální spálu mrkve .....	209
<b>Žabka M.:</b> Inhibiční účinek anetholu, významné složky silice fenyklu a anýzu, na <i>Phytophthora infestans</i> .....	217

#### **Sekce „Technologie pěstování plodin a ekologie“**

<b>Baránek M., Hakalová E., Pečenka J., Tekielska D., Eichmeier A., Richtera L., Bytešnicková Z., Čechová J.:</b> Vliv ošetření osiva řepky olejné nanočásticemi na parametry související s jejich klíčením .....	221
<b>Bjelková M., Wagner J., Skopal J., Ondráčková E.:</b> Semena lnu po ošetření laserem.....	229
<b>Dryšlová T., Smutný V., Křen J., Procházková B., Rábek M.:</b> Výnos zrna obilnin v dlouhodobém polním pokusu v žabčicích .....	237
<b>Dvořák P., Capouchová I., Král M., Konvalina P., Janovská D.:</b> Využití intercroppingu leguminóz a pšenice ke zvýšení výnosu a kvality zrna .....	241
<b>Dybová M., Hofbauer J., Trněný O., Staveníková J., Vejražka K.:</b> Variabilita fixace dusíku u vojtěšky seté ( <i>Medicago sativa</i> L.) a symbiotických bakterií z čeledi Rhizobiaceae .....	249
<b>Frei I., Hutýrová H., Pelikán J.:</b> Udržitelnost pěstování minoritních druhů jetelovin v suchých podmínkách okrajových oblastí s využitím hnojení.....	257
<b>Frydrych J., Hermuth J., Bradáčová L.:</b> Výzkum pěstitelské technologie zrnového čiroku s ohledem na klimatickou změnu v oblasti beskyd .....	265



<b>Frydrych J., Bradáčová L.:</b> Využití vybraných travních druhů a jejich směsí jako meziplodin.....	273
<b>Hammerschmiedt T., Holátko J., Kintl A., Sedláčková I., Látal, O., Brtnický M.:</b> Vliv aplikace síry kombinované s kompostem na výnos řepky a půdní parametry .....	279
<b>Holátko J., Látal O., Hammerschmiedt T., Kintl A., Sedláčková I., Brtnický M.:</b> Vliv aplikace digestátu do porostu vojtěšky na její výnos a půdní parametry .....	287
<b>Kobes, M., Jarošová, M., Hýbl, M., Mráz, M.:</b> Botanická skladba a produktivita pastevního porostu při různém zatížení a systému pastvy.....	295
<b>Kováříková E.:</b> Fermentovaná zelenina ošetřená vysokým tlakem.....	303
<b>Král M., Dvořák P.:</b> Aspekty použití kompostu jako mulče při pěstování brambor .....	309
<b>Loučka R., Jančík F., Homolka P., Jambor V., Dostálová R.:</b> Technologický postup sklizně vybraných odrůd luskovin pěstovaných na dvou lokalitách .....	315
<b>Macháč R., Petřeková H.:</b> Vliv výše výsevu na výnos semen jílku mnohokvětého jednoletého .....	323
<b>Mühlbachová G., Růžek P., Kusá H.:</b> Vliv různých technologií zpracování půdy na emise CO <sub>2</sub> .....	329
<b>Mühlbachová G., Janovská D., Hlásná Čepková P., Vavera R., Káš M.:</b> Výnos pšenice jarní pěstované společně s různými leguminózami v systému intercropping .....	337
<b>Pečenka J., Hakalová E., Tekielska D., Čechová J., Eichmeier A., Aust R., Bytešnicková Z., Richtera L., Baránek M.:</b> Využití nanočástic v primingu osiva zelí hlávkového .....	343
<b>Plisková, J., Boturová, K., Pospíšilová, L., Menšík, L.:</b> Vliv vodní eroze na půdní respiraci a obsah mikrobiální biomasy.....	351
<b>Porčová L., Rábek M., Řiháček M., Frantová N., Elzner P., Smutný V.:</b> Porovnání kvantitativních a kvalitativních ukazatelů vybraných odrůd čiroku pro silážní účely pěstovaných na dvou půdně odlišných stanovištích.....	357
<b>Pospíšilová L., Dryšlová T., Plisková, J., Prudil, J., Ryant, P., Smutný V., Rábek, M.:</b> Změny vybraných vlastností fluvizemě glejové v monokultuře ječmene jarního ( <i>hordeum vulgare L.</i> ) .....	365
<b>Prudil J., Badalíková B., Pospíšilová L., Sedlák L., Šedová L.:</b> Výnos plodin po aplikaci digestátu .....	371
<b>Rost M., Beneš K., Hoštičková I., Žáková H., Javůrková P., Zahradník V., Čurn V.:</b> Obohacování krmiv pro včely o induktory imunitní reakce.....	379
<b>Růžek P., Kusá H., Vavera R., Dvořáček V.:</b> Výnosy zrna ozimé pšenice a obsah bílkovin v zrna při různých .....	387
<b>Sedlák L., Prudil J., Pospíšilová L., Vlček V., Šedová L.:</b> Aluviální půdy a změny jejich vlastností jako důsledek klimatické změny .....	393
<b>Smutný V., Rábek M., Dryšlová T., Neudert L., Elzner P.:</b> Výnos a rentabilita pěstování kukuřice na siláž s podsevovými plodinami.....	399
<b>Svobodová A.; Kasal P.; Rusín J.; Bouchalová M., Wojnarová P.:</b> Slunečnice topinambur jako netradiční plodina do bioplynových stanic.....	405
<b>Vargová V., Kováčiková Z., Pangyová E., Baxa S., Dimitrov F.:</b> Porovnanie obsahu éterického oleja v plodoch a ihličí borievky obyčajnej.....	413

<b>Vargová V., Kováčiková Z.:</b> Biodiverzita travního spoločenstva .....	421
<b>Vlček V., Lukas V., Dvořáčková H., Sedlák L., Badalíková B.:</b> Unifikace půdního pokryvu vlivem plošné vodní eroze.....	427
<b>Votavová A.:</b> Testování atraktivity rozebíratelných hnízdišť pro samotářské včely rodu <i>Osmia</i> .....	433

#### ***Sekce „Kvalita a zpracování produktů“***

<b>Jarošová M., Bárta J., Bártová V., Lorenc F., Bjelková M., Kyselka J., Filip V., Stupková A., Smetana P., Kadlec J.:</b> Hodnocení obsahu dusíkatých látek a bílkovin v semenech vybraných odrůd olejného lnu a konopí setého .....	437
<b>Loučka R., Jančík F., Koukolová V., Kubelková P., Tyrolová Y., Výborná A., Jambor V., Synková H., Malá S., Nedělník J., Lang J., Homolka P.:</b> Kvalita vybraných hybridů kukuřic.....	445
<b>Pluháčková H., Sedlaříková E., Kudláčková B., Bradáčová M.:</b> Možnosti stanovení sekundárních metabolitů .....	451
<b>Rychlá A., Endlová L.:</b> Stanovení obsahu glukosinolátů v zelené hmotě hořčic .....	457
<b>Rysová J., Laknerová I.:</b> Reformulace bezlepkového sýrového pečiva .....	465
<b>Stupková A., Bárta J., Jarošová M., Bártová V., Švajner J.:</b> Aktivita inhibitorů trypsinu u vybraných odrůd sóji.....	471

#### ***Kapitola „Sdělení“***

<b>Kučera J., Podhrázká J., Papaj V.:</b> Stanovení ztráty půdy větrnou erozí pro podporu návrhů optimálních opatření k ochraně půdy před větrnou erozí.....	477
--	-----

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

příspěvky v této vědecké příloze časopisu Úroda byly prezentovány na 26. ročníku mezinárodní konference Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů, která se uskutečnila ve dnech 15.–16. 11. 2022 v Brně. Pořadatelem konference byly Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., Troubsko a jeho dceřiná společnost Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Troubsko. Významnými spoluorganizáteli a partnery této akce jsou Česká akademie zemědělských věd, Agrární komora ČR, Česká technologická platforma rostlinných biotechnologií – Rostliny pro budoucnost a mediálním partnerem je vydavatelství Profi Press. Již více než deset let se vždy v prosincovém čísle časopisu Úroda čtenáři tohoto časopisu setkali s vědeckou přílohou ve formě CD. Letos poprvé není tato příloha vkládána na CD disku, ale celý sborník bude možné načíst přes QR kód. I toto je malý příklad postupující digitalizace v našem životě. Nicméně základ zůstává pořád stejný. Na konferenci vystoupili v úvodní sekci kromě zástupce hlavního pořadatele také reprezentanti Agrární komory ČR a Ministerstva zemědělství. Konference byla dedikována k 200. výročí narození Gregora Johana Mendela. Tomuto výročí byly věnovány úvodní dvě přednášky. Všechny příspěvky této vědecké přílohy byly recenzovány členy vědeckého výboru konference, za což jim patří velké poděkování.

Konference se koná v atmosféře, kterou jsme si ještě před rokem nedovedli ani představit. V loňském roce jedním z hlavních témat konference byl Green Deal a navazující evropské strategie, to vše pod dojmem pandemie Covidu 19. Letos se zcela nutně v diskuzích objeví aktuální témata spojená s energetickou a válečnou krizí. Doufejme, že stejně jako v době Covidu i nyní bude zemědělství stabilizujícím faktorem a bude schopné fungovat i v ekonomicky nejisté době. Ve sborníku je publikována celá řada příspěvků, které mohou rychlou aplikací výsledků přispět k zefektivnění zemědělské produkce. Jsou to především nové přístupy ve šlechtění rostlin, škála nových poznatků o možnostech rychlejších selekcí materiálů s novými vlastnostmi pomocí markerů. Stejně tak jsou zde příspěvky zaměřené do oblasti nových technologií spojených s již uvedenou digitalizací a modernizací zemědělské produkce. Věřím, že každý čtenář si najde v širokém spektru témat to, které ho nejvíce zajímá. Autory jednotlivých příspěvků jsou přední čeští odborníci což je již samo o sobě garancí kvality. Osobně se domnívám, že bez nových inovativních vstupů do všech oblastí našeho života včetně zemědělské a potravinářské produkce se neobejdeme a jsou nezbytným předpokladem udržitelnosti produkce. A v současné době nejen udržitelnosti, ale i zabezpečení potravinové bezpečnosti České republiky. Není pochyb o tom, že produkce českých potravin a surovin je na vysoké kvalitativní úrovni a nyní je třeba hledat postupy, které ji stabilizují a u některých komodit zvýší.

Vážení čtenáři, autoři příspěvků i editoři tohoto sborníku budou vděční za zpětnou vazbu, napište prosím svůj názor nejen na kvalitu výsledků, ale i na tuto formu jejich transferu. To, že se tato příloha dostane k tisícům čtenářů časopisu Úroda je jednou z možností efektivního transferu výsledků do praxe. Ale je to náš názor a byli bychom rádi za zpětnou vazbu. Na závěr si dovoluji poděkovat všem autorům, kteří přispěli svými příspěvky do tohoto sborníku, všem členům vědeckého výboru za recenzování. Děkuji všem za aktivní účast na konferenci.

Jan Nedělník



**VUPT** | Výzkumný ústav pícninářský,  
spol. s r.o. Troubsko

## Charakterizace mrazového poškození u generativních pupenů ovocných dřevin

Characterization of frost damage in generative buds of fruit trees

Bilavčík A.<sup>1</sup>, Bobrová O.<sup>2</sup>, Faltus M.<sup>1</sup>, Zámečník J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine

### Abstrakt

V současných podmínkách probíhající změny klimatu dochází při pěstování ovocných dřevin ke zvyšujícím se nárokům na odolnost jejich generativních orgánů k jarním mrazíkům. V ČR jsou šlechtěny nové odrůdy ovocných dřevin, u kterých je potřeba stanovit odolnost jejich generativních pupenů v raných fenofázích k mrazu. Pomocí termických metod diferenční skenovací kalorimetrie a infračervené termografie byly charakterizovány termické události v generativních orgánech ve fenofázi rašení u vybraných odrůd a perspektivních genotypů meruňky a třešně v průběhu jejich vystavení mrazovým teplotám.

**Klíčová slova:** ovocné stromy, termická analýza, ledová krystalizace, poškození mrazem, květní pupeny

### Abstract

In the current conditions of ongoing climate changes, when growing fruit trees, the demands on the resistance of their generative organs to spring frosts are increasing. In the Czech Republic, new varieties of fruit trees are bred. Thus, it is necessary to determine their frost resistance in the early phenophases. Using the thermal methods of differential scanning calorimetry and infrared thermography, the thermal processes in the generative organs during the early stage of sprouting phenophase of selected varieties and perspective genotypes of apricots and cherries were characterized during their exposure to frost.

**Key words:** fruit trees, thermal analysis, ice crystallisation, frost damage, floral buds

### Úvod

Nízké teploty patří mezi hlavní faktory limitující rozšíření a produktivitu rostlin. O přežití rostlin rozhoduje schopnost snášet extrémní podmínky prostředí bez poškození či po nich regenerovat. Především mrazové poškození je značným ekonomickým problémem nejen v oblastech mírného pásu, ale zasahuje až do subtropů. Působením nízkých teplot dochází u rostlin k ledové krystalizaci v jejich pletivech a orgánech. Pokud jsou rostlinná pletiva ve vegetačním stavu, může být jejich vystavení teplotám pod bod mrazu letální. Díky ledové krystalizaci v rostlinném pletivu může dojít k jeho letálnímu poškození. Krystalizaci ledu je v rostlinných orgánech a pletivech možné pozorovat přímo, např. pomocí magnetické rezonance (Ishikawa a kol., 1997, Price a kol., 1997), či nepřímo, nízkoteplotní elektronovou mikroskopií (Ashworth 1990, Endoh a kol., 2014). V souvislosti s nově se rozvíjejícím oborem infračervené (IR) termografie je tato technika používána i při sledování mrazového poškození u rostlin (Wisniewski a kol., 1997, Fuller a Wisniewski, 1998, Hacker a Neuner, 2007, Wisniewski a kol., 2008, Livingston a kol., 2018). IR termografie je obor, který využívá bezkontaktní sledování teploty povrchu těles k vizualizaci teplotních změn vzorku v reálném čase. V záporných teplotních hodnotách přibližně od -40 °C výše. Díky vhodnému software lze naměřené termogramy vyhodnotit v časové ose. Při vystavení sledovaného materiálu teplotní

změně je u něj možné v čase vizualizovat teplotní odezvu v rámci změny teploty prostředí. Tím je možné sledovat krystalizaci ledu a tání protože v těchto případech dochází k tvorbě zaznamatelného teplotního rozdílu mezi objektem a okolím, které termokamera zobrazí a SW zaznamená. Diferenční skenovací kalorimetrie je termická metoda, která se využívá pro kvantitativní a kvalitativní stanovení tepelně zabarvených dějů ve vzorcích. Především teplot (onsetu) krystalizace a tání a celkového obsahu krystalizované vody ve vzorku. Cílem práce bylo pomocí termických metod diferenční skenovací kalorimetrie a infračervené termografie charakterizovat termické události v generativních orgánech ve fenofázi rašení pupenů vybraných odrůd a perspektivních genotypů meruňky a třešně v průběhu jejich vystavení mrazovým teplotám.

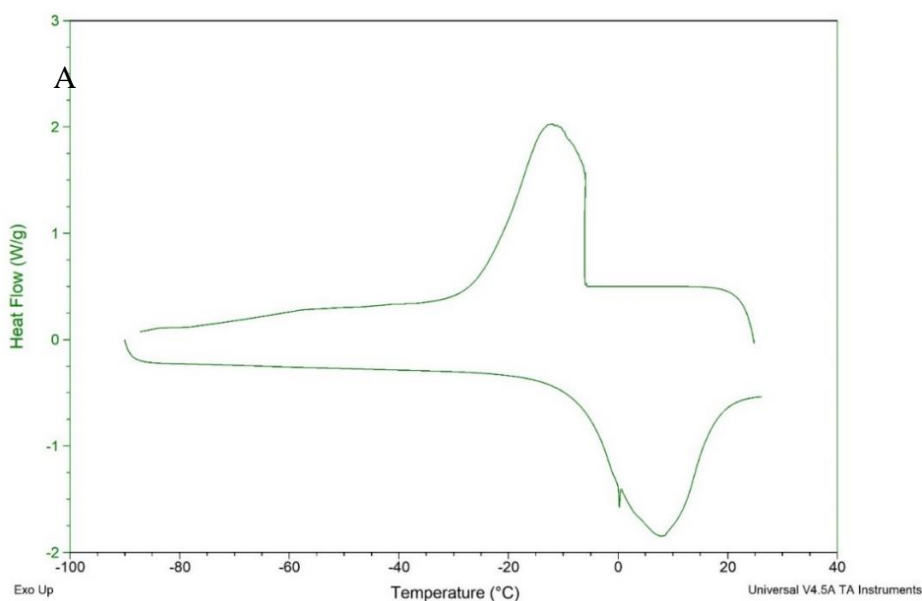
## Materiál a metody

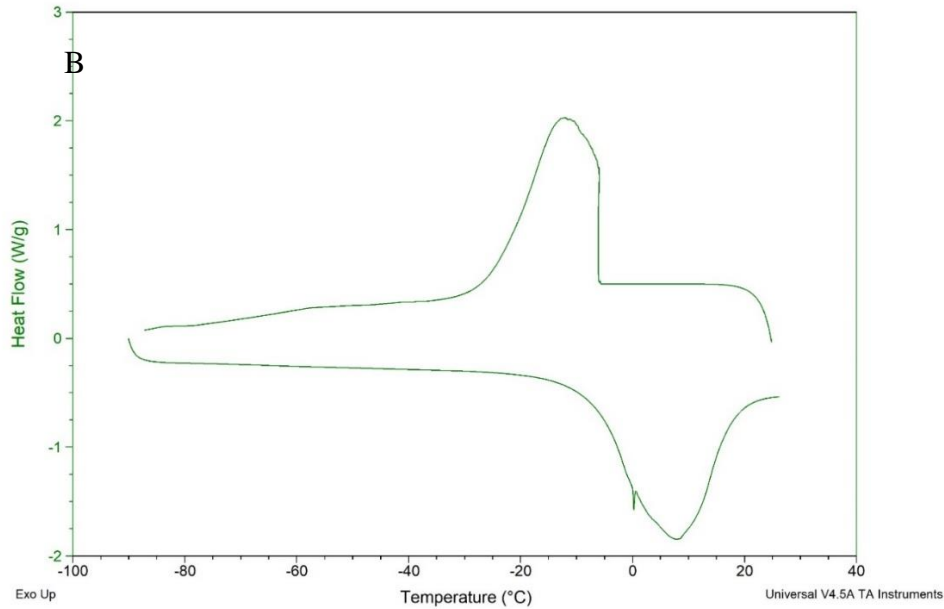
Rostlinný materiál byl odebírán v průběhu předjarního a jarního období ze sadů VŠÚO Holovousy. Byly použity pupeny z generativních orgánů z jednoletých dormantních výhonů třešně (*Prunus avium* (L.) L.) následujících odrůd: 'Amid', 'Early Korvik', 'Jacinta', 'Justýna', 'Regina' a 'Kordia'. Dále byly použity pupeny z generativních orgánů z jednoletých dormantních výhonů meruňky (*Prunus armeniaca* L. var. *armeniaca*) těchto odrůd: 'Betinka', 'Candela', 'Harcot', 'Harogem', 'Leskora' a 'Sophinka'. Výběr byl proveden tak, aby byly zastoupeny produkční odrůdy v ČR ('Kordia', 'Leskora'), odolné Kanadské odrůdy meruňky ('Harcot', 'Harogem') a perspektivní šlechtění meruněk ('Betinka', 'Candela' a 'Sophinka') a třešní ('Amid', 'Jacinta', 'Justýna', 'Early Korvik') z ČR. Z předchozích zkušeností a experimentů, byla pro pokusy charakterizace mrazového poškození vybrána fenofáze vývoje generativního pupene počátku rašení pupene. Pro kalorimetrické měření stanovení ledové krystalizace a celkového množství krystalické vody byly pupeny temperovány při 20 °C. Měření bylo prováděno v diferenčním skenovacím kalorimetru Q2000 (TA Instruments). Celé dormantní pupeny byly umístěny do hliníkové pánvičky a vloženy do DSC cely (20 °C). Termické vlastnosti byly měřeny v průběhu chlazení či ohřevu (10 °C min<sup>-1</sup>, vzorkovací frekvence 0,2 s bod<sup>-1</sup>, promývání průtokem 33 ml min<sup>-1</sup> dusíkem) a analyzovány pomocí software TA Instruments Universal Analysis 2000. Obsah vody ve vzorcích byl stanoven gravimetricky a vyjádřen jako procentní podíl z celkové hmotnosti vzorku. Pro vizualizaci průběhu ledové krystalizace byly použity průměrně 20 cm dlouhé jednoleté výhony s generativními pupeny v celkovém počtu průměrně 20 jedinců. Materiál byl umístěn na filtrační papír položený na měděné podložce umístěné v pultovém mrazicím boxu s počítačem řízeným regulátorem s poklesem teploty přibližně 0,5 °C min<sup>-1</sup>. Přesná teplota na měděné podložce byla kontrolně zaznamenávána pomocí digitálního teploměru. Po umístění rostlinného materiálu do mrazicího boxu bylo spuštěno infračervené snímání pomocí stacionární LWIR termovizní kamery Workswell WIC 640 (rozlišení 640x512px, vzorkovací frekvence 30 fps). Pomocí SW Workswell CorePlayer Beta byl poté vyhodnocen záznam termokamery. Naměřená data, teploty krystalizace, byla pomocí SW vizuálně odečtena a zpracována pomocí statistického software Statistica 7.0 (StatSoft).

## Výsledky

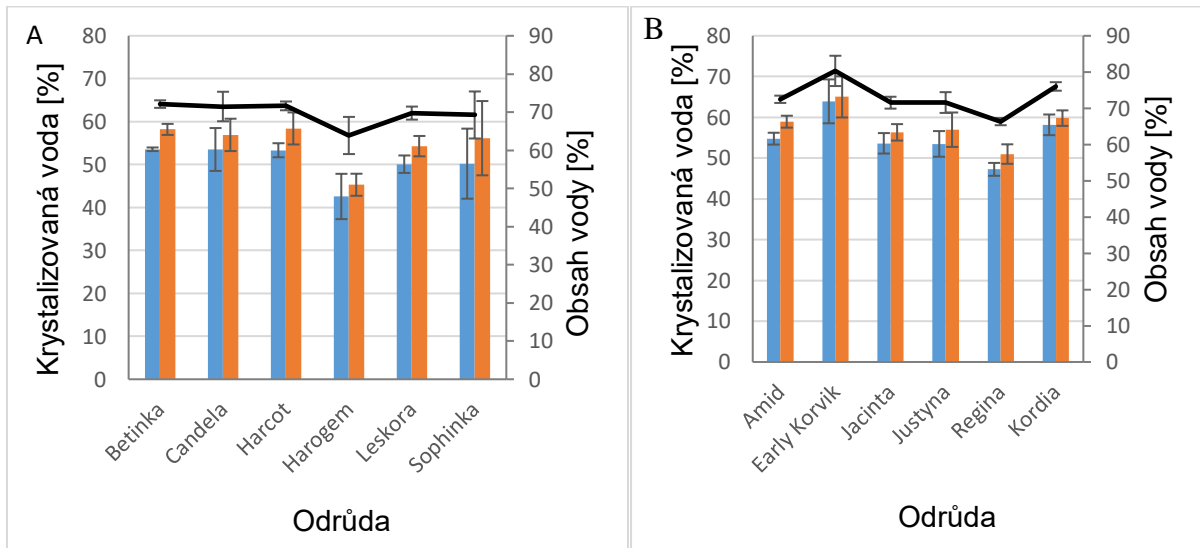
U generativních pupenů sledovaných odrůd meruňky a třešně byly zaznamenány v průběhu chlazení exotermické píky odpovídající krystalizaci vody v pletivech. V průběhu ohřevu tato krystalická voda přecházela do kapalného skupenství, což bylo na křivce ohřevu detekováno jako endotermní pík. Plocha píky odpovídala podílu krystalické vody v měřených vzorcích. Ukázka termogramů generativních pupenů v průběhu chlazení a ohřevu je u obou druhů, meruňky 'Sophinka' a třešně 'Kordia', na obr 1. Na obr 2. A je znázorněn obsah krystalizované vody v generativních pupenech testovaných odrůd meruňky během chlazení a ohřevu a obsah

celkového množství vody v pupenech. V průběhu chlazení vykazovala nejvyšší obsah krystalizované vody 53,6 % 'Betinka' a nejnižší 42,6 % 'Harogem'. V průběhu ohřevu vykazovala nejvyšší obsah krystalizované vody 58,4 % 'Harcot' a nejnižší 45,3 % 'Harogem'. Průměrný obsah krystalizované vody byl u testovaných odrůd meruňky v průběhu chlazení 50,6 % a v průběhu ohřevu 54,9 %. Na obr. 2. B je znázorněn obsah krystalizované vody v generativních pupenech testovaných odrůd třešně během chlazení a ohřevu a obsah celkového množství vody v pupenech. V průběhu chlazení vykazovala nejvyšší obsah krystalizované vody 63,9 % 'Early Korvik' a nejnižší 47,2 % 'Regina'. V průběhu ohřevu vykazovala nejvyšší obsah krystalizované vody 65,0 % 'Early Korvik' a nejnižší 51,0 % 'Regina'. Průměrný obsah krystalizované vody byl u testovaných odrůd meruňky v průběhu chlazení 55,2 % a v průběhu ohřevu 58,0 %. Na obr 3 A je fotografie testovaného výhonu třešně 'Kordia', pro který je na obr 3 B. termografický snímek s teplotními údaji onsetu krystalizace jednotlivých pupenů a v dolní části, obr 3 C, je znázorněn časový teplotní průběh jednotlivých pupenů označených na obr 3 B. Černá čára znázorňuje průběh změny teploty pozadí. Čísla na obrázku ukazují teploty v různých částech výhonu v době začátku krystalizace. Nejvyšší teplota krystalizace pupene byla naměřena  $-2,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nejnižší  $-3,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Průměrná teplota krystalizace u sledovaných pěti pupenů na tomto výhonu byla  $-3,2 \pm 0,38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Během krystalizace se teplota jednotlivých pupenů zvýšila o  $0,5 - 1,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na teplotu bodu mrznutí.



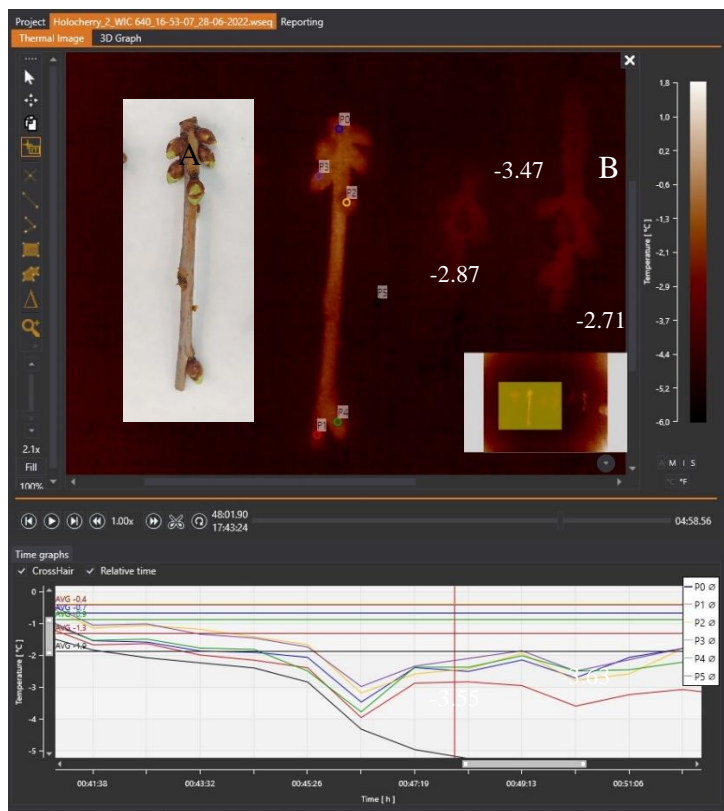


Obr. 1. DSC termogram generativních pupenů meruňky 'Sophinka' (A) a třešně 'Kordia' (B). V horní části křivky je výrazný pík krystalizace během chlazení a v dolní části křivky je pík tání. Velikost plochy píku odpovídá krystalizované vodě v pupenu. Rychlost chlazení a ohřevu byla 10 °C min<sup>-1</sup>.



Obr. 2. Obsah krystalizované vody v generativních pupenech odrůd meruňky (A) a třešně (B) během chlazení (■) a ohřevu (■) a obsah celkového množství vody v pupenech (—).





Obr. 3. Charakterizace teplotních změn u generativních pupenů třešně 'Kordia' (A), infračervený snímek krystalizačních procesů výhonu (B) a teplotní změny různých bodů zájmu (C, barevné linie). Černá čára znázorňuje průběh změny teploty pozadí. Čísla na obrázku ukazují teploty v různých částech výhonu v době začátku krystalizace (°C), během krystalizace se teplota zvýšila o 0,5 - 1,7 °C.

### Diskuze

Termická charakterizace rostlinných pletiv a orgánů je pro posouzení mrazové odolnosti generativních orgánů u širšího spektra různých genotypů ovocných dřevin nezbytným předpokladem. Především teploty ledové krystalizace jsou znakem, který koresponduje s poškozením dané struktury (Proebsting a Mills, 1978, Meng a kol., 2007). V příspěvku jsou porovnány možnosti využití diferenční skenovací kalorimetrie a infračervené termografie k posouzení termických charakteristik pro využití posouzení mrazového poškození generativních orgánů různých odrůd meruňky a třešně. Ze záznamů diferenčního skenovacího kalorimetru byla vyhodnocena teplota onsetu endotermního píku při ohřevu a procentický obsah krystalizované vody v průběhu chlazení a ohřevu. U všech odrůd obou druhů bylo dosaženo vyšších hodnot obsahu krystalizované vody při ohřevu oproti chlazení. V průměru jsou hodnoty obsahu krystalizované vody během ohřevu u meruňky a třešně o  $4,3 \pm 1,05$  °C a  $2,1 \pm 1,12$  °C vyšší než hodnoty získané při chlazení. Vyšší hodnoty obsahu krystalizované vody v průběhu ohřevu jsou dány tím, že v pupenech dochází ke krystalizaci vody během dalšího postupu mrazení vzorku, případně v průběhu ohřevu z ultranízkých teplot, do kterých jsou z důvodů postupu měření v diferenčním skenovacím kalorimetru pupeny zmrazovány. U meruňky vykazovala nejnižší hodnoty obsahu krystalizované vody odrůda 'Harogem' (42,6 %), což byl oproti odrůdě 'Betinka' o více než o 10 % menší obsah krystalizované vody. Toto snížení odpovídalo předpokladu, protože odrůda 'Harogem' je považována za mrazově odolnější odrůdu díky svému Kanadskému původu. Naproti tomu u třešně byl dosažen nejnižší obsah krystalizované vody u odrůdy 'Regina', která je obecně považována za mrazově odolnou a překvapivě nejvyšší u odrůdy 'Early Korvik' (o 14 % vyšší obsah krystalizované vody), která je také považována za relativně mrazuvzdornou. Tento výrazně vyšší obsah krystalizované

vody u mrazuodolnější hodnocené odrůdy 'Early Korvik' by mohl být vysvětlen celkově vyšším obsahem vody v generativních pupenech u této odrůdy, byl ze všech odrůd třešní nejvyšší a měl hodnotu 80,3 %. Hodnoty ledové krystalizace u generativních pupenů třešně 'Kordia' byly průměrně o 3,5 °C nižší než hodnoty změřené pomocí diferenčního kalorimetru. Tento rozdíl je způsoben rychlostmi měření, kdy při vyšší rychlosti mrznutí dochází snadněji k podchlazení. Přesto, že k podchlazení u měření pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru dochází, lze provést relativní porovnání odrůd a hodnoty obsahu krystalizované vody změřené při ohřevu jsou termodynamicky odpovídající termická charakteristika. Získané výsledky napovídají možnosti využití výše uvedených metod pro detekci termických vlastností generativních orgánů meruněk a třešní pro stanovení jejich aktuální mrazové odolnosti. V dalším postupu prací se autoři zaměří na porovnání rozsáhlejšího spektra odrůd v širší oblasti jejich fenologického vývoje.

### **Závěr**

Pro efektivní posouzení potenciálního mrazového poškození konkrétních genotypů ovocných dřevin, posouzení jejich mrazuvzdornosti, je zapotřebí vyvinout a otestovat nové, či optimalizovat stávající postupy, které budou charakterizovat teplotní události v rostlinných pletivech a korelovat je s životností. Využití diferenční skenovací kalorimetrie s pomocí infračervené termografie se jeví jako vhodný přístup, který výše uvedené pomůže splnit. V dalším období budou otestované postupy ve spolupráci s VŠÚO Holovousy využity v ověření této metody pro širší testování mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin.

### **Literatura**

- Ashworth EN., 1990 The formation and distribution of ice within forsythia flower buds. *Plant physiology*, 92(3):718-725.
- Endoh K., Kuwabara C., Arakawa, K., Fujikawa, S., 2014 Consideration of the reasons why dormant buds of trees have evolved extraorgan freezing as an adaptation for winter survival. *Environmental and experimental botany*, 106, pp.52-59.
- Fuller MP., Wisniewski M., 1998 The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol* 23:81–89.
- Hacker J., Neuner G., 2007 Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared differential thermal analysis (IDTA). *Tree Physiol* 27:1661–1670.
- Ishikawa M., Price, WS., Ide H., Arata Y, 1997 Visualization of freezing behaviors in leaf and flower buds of full-moon maple by nuclear magnetic resonance microscopy. *Plant Physiology*, 115(4):1515-1524.
- Livingston DP., Tuong TD., Murphy JP., Gusta LV., Willick I., Wisniewski ME., 2018 High-definition infrared thermography of ice nucleation and propagation in wheat under natural frost conditions and controlled freezing. *Planta*, 247(4):791-806.
- Meng QR., Liang YQ., Wang WF., Du SH., Li YH., Yang JM., 2007 Study on supercooling point and freezing point in floral organs of apricot. *Agricultural Sciences in China*, 6(11):1330-1335.
- ProebstingELJr., Mills HH., 1978 Low temperature resistance of developing flower buds of six deciduous fruit species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103:192–198.

Wisniewski M., Lindow SE., Ashworth E., 1997 Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiol* 113:327–334.  
Wisniewski M., Glenn DM., Gusta L., Fuller M., 2008 Using infrared thermography to study freezing in plants. *Hortscience* 43:1648–1651.

### **Poděkování**

Děkuji kolegům Ing. Luboru Zelenému a Ing. Pavlu Suranovi z VŠÚO Holovousy za poskytnutí rostlinného materiálu.

Tato práce vznikla za podpory MZe, projektu QK21010200 a Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. RO0418.

### **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



## **Analýza genetické struktury odrůd hořčice bílé pomocí Bayesovských metod modelování**

Analysis of genetic structure of white mustard varieties using Bayesian modelling methods

Čurn V.,<sup>1</sup>Jozová E.<sup>1</sup>, Rost M.<sup>1</sup>, Rychlá A.<sup>2</sup>, Stehlíková D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

<sup>2</sup>OSEVA Pro, Výzkumný ústav olejnin Opava

### **Abstrakt**

Pro hodnocení genetické struktury kolekce 187 genetických zdrojů hořčice bílé, *Sinapis alba* L. byla použita analýza mikrosatelitů. V 15 lokusech bylo detekováno celkem 44 polymorfních SSR alel. Jedenáct z nich bylo středně až vysoce polymorfních a také vysoká úroveň pozorované heterozygotity (0,12-0,83) a indexu genové diverzity (0,11-0,68) ukazovaly na vysokou úroveň polymorfismu vysvětlitelnou cizosprašností tohoto druhu a také rozsáhlým a variabilním souborem analyzovaných genetických zdrojů. Bayesovská statistika odhalila jasné bariéry a reprodukční izolaci mezi odrůdami z důvodu omezené výměny genetických zdrojů mezi jednotlivými šlechtiteli. U většiny genetických zdrojů byly také patrné změny genetické struktury v závislosti na době šlechtění a registraci odrůd, kdy byl patrný rozdíl v genetické struktuře moderních a dřívějších/krajových odrůd.

**Klíčová slova:** molekulární markery, SSR, genetické zdroje, šlechtění rostlin

### **Abstract**

Microsatellite markers were used for assessment of genetic structure in a collection of 187 genetic resources of yellow mustard, *Sinapis alba* L. Microsatellites generated 44 polymorphic alleles in 15 loci. Eleven of them were medium to highly polymorphic, and also the high level of observed heterozygosity (0.12-0.83) and the Nei's gene diversity index (0.11-0.68) indicated a high level of polymorphism explained by cross-pollination as well as an extensive and variable collection of genetic resources. Bayesian statistics revealed clear barriers and reproductive isolation between varieties due to the limited exchange of genetic resources between individual breeders. For most genetic sources, changes in the genetic structure were also visible, depending on the time of breeding and variety registration, when a difference in the genetic structure of modern and earlier varieties was evident.

**Keywords:** molecular markers, SSR, plant genetic resources, plant breeding

### **Úvod**

Hořčice bílá (*Sinapis alba* L.) je naší významnou plodinou, kdy Česká republika je spolu s Kanadou a Ukrajinou jedním z největších světových producentů a vývozců této plodiny. Hořčice bílá pochází z oblasti Blízkého východu a Středomoří, ale tato plodina je po tisíciletí pěstována po celém světě s rozličným uplatněním (Hemingway 1995; Hanelt 2001; Ruan et al. 2019). Hořčice bílá je odolná vůči suchu (Kumari et al. 2020) a je odolná vůči závažným chorobám a hmyzím škůdcům (Bodnaryk a Lamb 1991), vykazuje fyto-sanitární biofumigační vlastnosti (Valdes et al. 2011) a je také důležitou nektarodárnou a pylodárnou rostlinou pro včely (Masierowska a Pietka 2014).

Ačkoli je hořčice bílá významnou plodinou, doposud nebyla věnována větší pozornost studiu genetické diverzity a hodnocení polymorfismu genetických zdrojů této plodiny (Katepa-Mupondwa et al. 2006). Obecně ale panuje názor, že u šlechtěných plodin klesá rozsah genetické variability a morfologické znaky již nestačí k identifikaci nově vznikajících odrůd a k definování jejich fenotypové variability kvůli vlivům mnoha faktorů prostředí. To se odráží i

v často problematickém používání testů DUS pro popis a právní ochranu odrůd (Fu et al. 2006; Yu a Chung 2021). I to je důvod proč narůstá význam molekulárních markerů pro účely identifikace a popisu genetických zdrojů a jako selekčních markerů ve šlechtění (Javidfar a Cheng 2013; Fu et al. 2013; Karp a Edwards 1997). Nejkomplexnější markerový systém používaný pro tyto účely jsou mikrosatelity (SSR markery), protože mají mnoho žádoucích vlastností, jako je hojná distribuce genomu (Kalia et al. 2011), schopnost tvořit multiplexy a kodominance, tj. schopnost rozlišovat mezi homozygoty a heterozygoty (Guichoux et al. 2011). Kombinace morfologických a molekulárních markerů je navíc vynikající technikou pro výběr optimálních genotypů pro šlechtění při zachování adekvátní genetické diverzity (Heffner et al. 2009; Varshney 2021).

Cílem této studie bylo vyhodnotit genetickou strukturu genetických zdrojů hořčice bílé, zaznamenat možné změny v genetické struktuře a ověřit vhodnost mikrosatelitů pro tyto účely.

### **Materiál a metody**

*Rostlinný materiál:* Pro analýzy genetické struktury byl vybrán pilotní soubor 187 významných genetických zdrojů z kolekce hořčice bílé uchovávané na pracovišti OSEVA Pro v Opavě. Analyzovaný soubor zahrnoval moderní i starší registrované odrůdy, krajové odrůdy a šlechtitelské materiály z různých zemí, tak aby představoval reprezentativní vzorek genotypů jarního typu hořčice bílé.

*Izolace DNA:* Semena byla vyseta do zahradnického rašelinového substrátu a pěstována v laboratorních podmínkách při teplotě 21°C a fotoperiodě 16/8 hodin po dobu pěti dnů. Z každého genotypu byly odebrány děložní lístky 36 rostlin a šetrně usušeny v silikagelu. Sušený materiál byl homogenizován pomocí skleněných kuliček v Retsch® Mixer Mill MM400 po dobu 30 sekund při maximální frekvenci (30 Hz). DNA byla extrahována modifikovanou CTAB PVP metodou (Doyle 1991), která je časově náročnější, ale získaná DNA je velmi čistá a vysoce koncentrovaná.

*Analýza mikrosatelitů:* Bylo použito celkem 15 mikrosatelitních markerů: BoREM1b\_A, BoREM1b\_B, BoREM1b\_C, BolAB19TF, BoPC34 (Louarn et al. 2007), P381, D3\_A, D3\_B, D11, D12, P17, P7, P9\_B, P9\_C, P30\_B, P30\_C, P35\_A, P35\_B (Cui et al. 2008). V každé PCR reakci byly použity tři primery, jeden univerzální primer značený FAM (Ba08 6-FAM nebo Ba03 6-FAM), forward primer rozšířený o sekvenci značeného primeru a reverzní primer (Enkerli et al. 2001; Jozová a Čurn 2014). PCR reakce byla provedena v 10 µl, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris – HCl, pH = 8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs), 10 pmol každého primeru, 0,5 U Taq Purple DNA polymerázy PPP Master Mix (Top-Bio, CZ) nebo 2x Master Mix se standardním pufrům (NEB, USA), 2x BSA a 50 ng templátové DNA. Amplifikace byla provedena na termocykleru Biometra TProfessional v následujícím teplotním profilu: počáteční denaturace 5 min při 94°C, 31 cyklů 60 s při 95°C, 60 s při 52-59°C (v závislosti na použitém primeru) a 60 s při 72/68°C, finální elongace 15 min při 72/68°C v závislosti na použitém master mixu. PCR produkty byly separovány na genetickém analyzátoru ABI 3500 (Applied Biosystems).

*Analýza dat:* Primární molekulární data byla analyzována pomocí softwaru GeneMapper a byla zaznamenána velikost SSR alel. Pro další zpracování dat a výpočet parametrů Ho, He, Fis, PIC a indexů genetické diverzity byl využit softwarový balík *adegenet* pro R software (R Core Team 2020; Jombart a Ahmed 2011). Bayesovské metody a software STRUCTURE byly použity pro odhady počtu klastrů a vyhodnocení genetické struktury analyzovaného souboru genetických zdrojů (Evanno et al. 2005; Pritchard et al. 2000).

## Výsledky

*Polymorfismus mikrosatelitových markerů:* V souboru 187 genotypů hořčice bílé bylo po fragmentační analýze zaznamenáno celkem 113 mikrosatelitových alel. Z tohoto počtu bylo 44 alel polymorfních a detekovaných v 15 lokusech s průměrem 2,93 alely na lokus.

Tabulka 1: Detailní výsledky analýzy mikrosatelitů u souboru genetických zdrojů *Sinapis alba*.

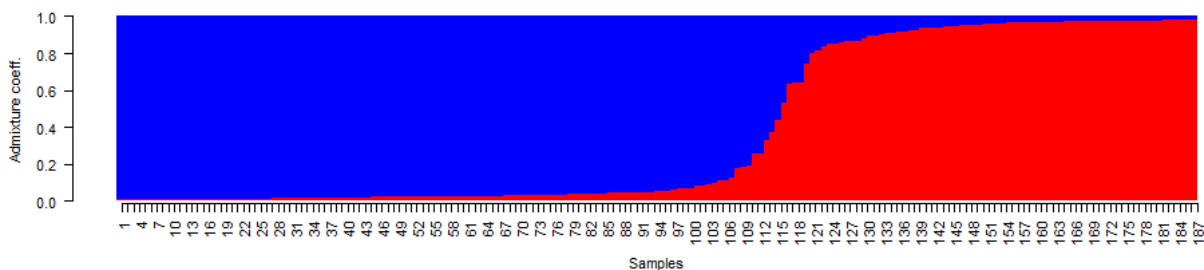
Mikrosatelitový marker	PIC	Na (počet alel)	celkem alel v analyzovaném souboru	velikost alel	medián a max. frekvence alel	Ho (observed heterozygosity)	He (Nei's 1973; expected heterozygosity)	Fis (inbreeding coefficient)	1-D (Simpson index)	Hexp (Nei 1978 gene diversity)	Evenness
BoREM1b_A	0,19	2	209	173-175	104,5; 187	0,12	0,11	-0,06	0,11	0,11	0,50
BoREM1b_B	0,00	1	3	181	3; 3	0	0	-	-	-	-
BoREM1b_C	0,00	1	3	187	3; 3	0	0	-	-	-	-
BolAB19TR	0,00	1	1	314	1; 1	0	0	-	-	-	-
BoPC34	0,51	3	323	149-151	148; 172	0,73	0,50	-0,45	0,50	0,50	0,94
P381	0,50	2	21	213-229	105; 11	0,05	0,50	0,90	0,50	0,51	1,00
D3_A	0,65	6	342	155-163	33,5; 149	0,83	0,67	-0,24	0,67	0,67	0,85
D3_B	0,44	5	101	167-171	10; 73	0,20	0,39	0,50	0,38	0,68	0,54
P7	0,27	6	119	141-156	3,5; 101	0,11	0,21	0,49	0,21	0,21	0,39
P9_B	0,38	3	184	125-138	32; 141	0,28	0,29	0,05	0,27	0,27	0,54
P9_C	0,35	4	231	145-160	23; 184	0,25	0,23	-0,06	0,23	0,24	0,49
P30_B	0,32	2	5	166-174	2,5; 4	0	0,32	1,00	0,32	0,36	0,72
P30_C	0,00	1	2	192	2; 2	0	0	-	-	-	-
P35_A	0,52	6	109	149-161	3,5; 68	0,53	0,47	-0,12	0,46	0,47	0,63
P35_B	0,00	1	1	173	1; 1	0	0	-	-	-	-

Tři lokusy (D3\_A, P7 a P35\_A) pak obsahovaly po 6 alelách. Naopak pět lokusů (BoREM1b\_B, BoREM1b\_C, BolAB19TR, P30\_C a P35\_B) bylo klasifikováno jako neinformativní lokusy s  $MAF < 0,01$ . V těchto lokusech byla detekována pouze jedna alela a to jen u 1 až 3 genotypů. Velikost amplifikovaných alel byla v rozmezí 125 – 314 bp. Jedenáct lokusů bylo středně až vysoce polymorfních, s hodnotami PIC kolísajícími od 0,19 do 0,65. Nejvyšší hodnoty PIC byly pozorovány v lokusech D3\_A (0,65), P35\_A (0,52), ale také ve dvou lokusech s nízkým počtem alel - BoPC34 (0,51) a P381 (0,50). Hladina pozorované heterozygosity byla v rozmezí 0,12 až 0,83 s průměrem 0,21. Nejvyšší pozorovaná heterozygosity byla také zaznamenána v lokusech s vysokým hodnotou indexu PIC, konkrétně D3\_A (0,83), BoPC34 (0,73) a P35\_A (0,53). Neiův index genové diverzity se pohyboval mezi 0,11 a 0,68 s průměrem 0,25. Podrobné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1. Všechny tyto parametry ukazují na velmi vysokou míru genetické variability a poměrně vysokou genetickou diverzitu v rámci sledovaného souboru genetických zdrojů.

*Analýza genetické struktury:* Software STRUCTURE byl použit pro odhad počtu shluků pomocí bayesovských algoritmů, které lépe popisují genetickou strukturu a vysvětlují výsledky molekulárních analýz. Výsledky a výstupy softwaru STRUCTURE (hodnoty Q1/Q2) jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2. Prostřednictvím softwaru STRUCTURE jsme provedli simulační analýzy pro  $K = 1-7$ , během těchto analýz byl nastaven parametr burnin period = 100 tis, MCMC = 150 tis a byl používán „admixture“ model. Parametr lambda byl nastaven na hodnotu 1 a odvozená hodnota byla použita v sekvenčních analýzách (kvantifikace nezávislosti mezi markery z hlediska distribuce alelické frekvence). Ostatní hyperparametry byly ponechány na

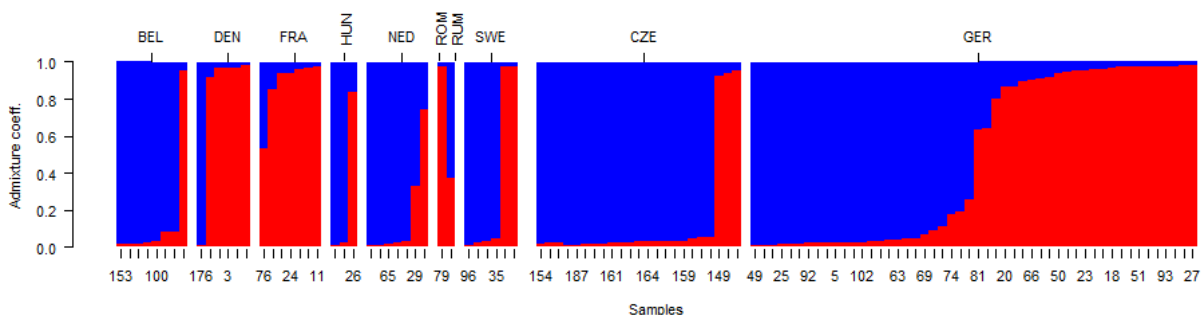
své výchozí hodnotě. Parametr LOCPRIOR jsme v našich simulacích nepoužili. Na základě hodnoty DeltaK byl parametr K stanoven na K=2 a analyzovaný soubor genotypů byl podle hodnot Q1/Q2 rozdělen do dvou klastrů. Stabilní hodnoty byly rovněž dosaženy pro parametr  $\ln(\alpha)$  (kvantifikace relativních úrovní příměsí mezi populacemi).

Jednotlivé genotypy byly rozděleny do dvou skupin podle hodnot Q1/Q2. Celkem 115 genotypů (61,5%) s hodnotami Q1 v rozmezí od 0,008 do 0,437 bylo přiřazeno do skupiny 1. Sedmdesát dva (38,5%) genotypů s hodnotami Q1 vyššími než 0,533 bylo přiřazeno do skupiny číslo 2 (Obr. 1). Průměrná hodnota alfa byla odhadnuta na 0,0595, což ukazuje na značné bariéry mezi odrůdami a reprodukční izolaci v důsledku omezené výměny genetických zdrojů mezi jednotlivými šlechtiteli. Průměrné hodnoty Fst\_1 a Fst\_2 byly 0,3449 resp. 0,1770. Tyto hodnoty také naznačovaly značnou genetickou diferenciaci (ve skupině 2) a velmi velkou genetickou diferenciaci (ve skupině 1) mezi jednotlivými genetickými zdroji.



Obr. 1: Klasifikace genetických zdrojů hořčice na základě parametrů Q1/Q2.

Podrobná analýza prvotních dat a výstupů ze softwaru STRUCTURE naznačila přítomnost přechodové zóny mezi dvěma hlavními skupinami. Proto byla provedena podrobná klasifikace genotypů podle hodnot Q1/Q2 a jejich rozdělení do tří bloků: a/ první blok zahrnoval genotypy s hodnotami Q1 v rozmezí 0,008-0,092; b/ druhý blok tvořil přechodovou zónu s hodnotami Q1 v rozmezí 0,101-0,894; c/ ve třetím bloku byly genotypy s hodnotami Q1 v rozmezí 0,904-0,984. Většina genotypů (103) byla přiřazena k prvnímu bloku; třetí blok obsahoval 55 genotypů a 29 genotypů tvořilo přechodovou skupinu. Ve všech třech skupinách se vyskytovaly jak starší odrůdy a krajové odrůdy, tak i moderní odrůdy a šlechtitelské materiály.



Obr. 2: Změny v genetické struktuře odrůd v závislosti na zemi původu a roku registrace.

Z výsledků bylo také patrné, že odrůdy pocházející z některých zemí nebo šlechtitelských programů mají podobnou nebo stejnou genetickou strukturu. Častějším případem ale je rozdělení odrůd/genotypů do dvou skupin podle doby vyšlechtění resp. registrace dané odrůdy. Hlavním faktorem, který vede k přiřazení odrůd do jednotlivých skupin je právě parametr „rok původu/registrace“. Tento parametr často také odráží změny šlechtitelského programu, využití



různých genetických zdrojů nebo zaměření šlechtění na nové znaky (Obr. 2). Toto rozložení odrůd je patrné například u maďarských odrůd, kde se nejnovější a starší odrůdy výrazně liší genetickou strukturou. Podobný charakter lze pozorovat u odrůd z Nizozemska, Belgie, Dánska, Francie, Švédska a Rumunska. Rozdílný charakter shlukování je patrný u německých a českých odrůd. Čtyři německé odrůdy ('Seco', 'Semper', 'Setoria' a 'Sigri') patřily do stejné skupiny s velmi podobnými hodnotami Q1. Tento výsledek může být ovlivněn tím, že tyto odrůdy byly vyšlechtěny v jedné šlechtitelské stanici a jejich genetická struktura tak odráží významnou podobnost genetických zdrojů používaných v šlechtitelských programech. V případě českých odrůd patří obě krajové odrůdy ('Přerovská bílá', 'Česká krajová'), starší odrůda 'Zlata' a moderní odrůdy z šlechtitelské stanice Opava a Krukanice do skupiny s hodnotami Q1 v rozmezí 0,016-0,053. Druhý klastr zahrnuje současné moderní odrůdy z šlechtitelských programů v Seltonu a BOR („Agent“ a „Veronika“). V těchto případech je patrný silný vliv omezeného souboru genetických zdrojů dostupný na jednotlivých šlechtitelských pracovištích.

### Diskuze

V souboru hodnocených genetických zdrojů hořčice bílé byl ve srovnání s jinými brukvovitými olejninami (Havlickova et al. 2014) zaznamenán velmi vysoký stupeň polymorfismu. To lze vysvětlit jak přítomností cizosprášení u této plodiny (Downey et al. 1970; Lombard et al. 2000), tak i velkým rozsahem analyzovaných genotypů. Obdobné studie u hořčice bílé byly provedené na souboru materiálů udržovaných v Plant Gene Resources of Canada (Katepa-Mupondwa et al. 2006; Fu et al. 2006), ale tento soubor byl početně menší a nižší byla i jeho „geografická“ variabilita. Soubor analyzovaný v této studii zahrnoval materiály různého stáří, země původu, materiály morfologicky variabilní, právě aby byl postižen co nejvyšší rozsah genetické variability. Mikrosatelity použité v této studii byly původně navrženy pro genetické zdroje *Brassica oleracea* (Louarn et al. 2007) a *Brassica rapa* ssp. *chinensis* (Cui et al. 2008). Velikosti alel vypočtené z CE elektroforeogramů byly pro vnitřní kontroly shodné a stabilní ve všech opakováních. Tato jednotnost a reprodukovatelnost u všech mikrosatelitů byla indikátorem správně nastavených protokolů molekulárních analýz. Naše výsledky tak ukázaly velmi dobrou přenositelnost a možné využití těchto markerů u hořčice bílé. Thakur et al. (2020) a Xu et al. (2021) uvedli podobné výsledky a křížovou přenositelnost mikrosatelitů mezi jednotlivými brukvovitými plodinami. Také Plieske a Struss (2001) uvedli úspěšnou amplifikaci specifických fragmentů ze vzdáleněji příbuzných druhů rodu *Brassica*, včetně *S. alba* pomocí primerů určených pro *B. napus*.

Analýza genetické struktury populací rostlin je poměrně běžnou metodou používanou v ekologických a evolučních studiích (Kolář et al. 2012), ale není využívána pro hodnocení genetických zdrojů kulturních rostlin. Použití tohoto přístupu může poskytnout ale zajímavé interpretace molekulárních dat a poskytnout další informace nad rámec standardního hodnocení pomocí shlukové a ordinační analýzy. Dále může vést také k objasnění shlukování jednotlivých genetických zdrojů a doporučení pro správný management genetických zdrojů a výběr genetických zdrojů do šlechtitelských programů (Mondini et al. 2009; Dar et al. 2019; Pascual et al. 2020; Varshney et al. 2021).

### Závěr

Pro hodnocení genetické struktury v souboru genetických zdrojů hořčice bílé byl využit softwarový nástroj Bayesian Structure pro analýzu molekulárních dat. Výsledky tohoto přístupu přináší možnosti detailnější interpretace dat. Rovněž zjištěný rozsah genetického polymorfismu byl mnohem vyšší, než uváděly jiné studie týkající této plodiny. Tyto výsledky ukázaly na význam analýzy a hodnocení rozsáhlých souborů genetických zdrojů a na význam správného managementu genetických zdrojů pro zachování vysoké míry genetické diverzity.

## Literatura

- Bodnaryk R.P., R.J. Lamb, Mechanisms of resistance to the flea beetle, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze), in mustard seedlings, *Sinapis alba* L., Can. J. Plant Sci. 71 (1991) 13–20. <https://doi.org/10.4141/cjps91-002>.
- Cui X., Y. Dong, X. Hou, Y. Cheng, J. Zhang, M. Jin, Development and characterization of microsatellite markers in *Brassica rapa* ssp. *chinensis* and transferability among related species, Agric. Sci. China. 7(1) (2008) 19–31. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60018-8](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60018-8)
- Dar A.A., R. Mahajan, S. Sharma, Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources, Indian J. Agric. Sci. 89 (2019) 1755–1763.
- Downey R.K., S.H. Pawlowski, J. McAnsh J., "Rapeseed, Canada's Cinderella Crop." Publication No. 8. (1970) Rapeseed Association of Canada. Winnipeg, Manitoba.
- Doyle J., DNA Protocols for Plants. In: G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston, J.P.W. Young, Eds., Molecular Techniques in Taxonomy, Springer, Berlin, Heidelberg. (1991) 283–293. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18).
- Enkerli J., F. Widmer, C. Gessler, S. Keller, Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*, Mycol. Res. 105 (2001) 1079–1087. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61970-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61970-X).
- Evanno G., S. Regnaut, J. Goudet, Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, Mol. Ecol. 14 (2005) 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- Fu Y.B., B. Cheng, G.W. Peterson, Genetic diversity analysis of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) germplasm based on genotyping by sequencing, Genet. Resour. Crop Evol. 61(2013) 579–594. <https://doi.org/10.1007/s10722-013-0058-1>.
- Fu Y.B., R.K. Gugel, F. Katepa-Mupondwa, Genetic diversity of *Sinapis alba* germplasm as revealed by AFLP markers, Plant Genet. Resour. 4 (2006) 87–95. <https://doi.org/10.1079/PGR2005100>.
- Guichoux E., L. Lagashe, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoitteiven, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin, R. Patit, Current trends in microsatellite genotyping, Mol. Ecol. Resour. 11 (2011) 591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>.
- Hanelt P. (ed.), Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops. 6 vols. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Vol. 3 (2001), pp. 1465–1469.
- Havlickova L., E. Jozova, A. Rychla, M. Klama, V. Kucera, V. Curn, Genetic diversity assessment in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers, Czech J Genet Plant Breed. 50 (2014) 216–225. <https://doi.org/10.17221/220/2013-CJGPB>.
- Heffner E.L., M.E. Sorrells, J.L. Jannink, Genomic selection for crop improvement, Crop Sci. 49 (2009) 1–12. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.08.0512>.
- Hemingway J.S., The mustard species: condiment and food ingredient use and potential as oilseed crops. In: Kimber, D., McGregor, D.I. (Eds.) *Brassica* Oilseeds Production and Utilization, CAB International, Wallingford, UK (1995), pp. 373–383.
- Javidfar F., B. Cheng, Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of erucic acid content and glucosinolate components in yellow mustard (*Sinapis alba* L.), BMC Plant Biol. 13 (2013) 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-142>.
- Jombart T., I. Ahmed, Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. Bioinformatics, 27, (2011). 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>

- Jozová E., V. Čurn, Multiplexová analýza mikrosatelitů u řepky pomocí modifikovaných fluorescenčně značených primerů, *Úroda* 12 (2014) vědecká příloha, s. 191–194. ISSN 0139-6013.
- Kalia R., M. Rai, S. Kalia, R. Singh, A. Dhawan, Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants, *Euphytica*. 177 (2011) 309–334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>.
- Karp A., K.J. Edwards, Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, (1997) pp. 11–38.
- Katepa F. -Mupondwa, R.K. Gugel, J.P. Raney, Genetic diversity for agronomic, morphological and seed quality traits in *Sinapis alba* L. (yellow mustard), *Can. J. Plant Sci.* 86 (2006) 1015–1025. <https://doi.org/10.4141/P05-185>.
- Kolář F., T. Fér, M. Štěch, P. Trávníček, E. Dušková, P. Schönswetter, J. Suda, 2012. Bringing together evolution on serpentine and polyploidy: spatiotemporal history of the diploid-tetraploid complex of *Knautia arvensis* (*Dipsacaceae*), *PLoS One*, 7, e39988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039988>.
- Kumari P., K.P. Singh, P.K. Rai, Draft genome of multiple resistance donor plant *Sinapis alba*: An insight into SSRs, annotations and phylogenetics, *PLoS One*, 15, (2020) e0231002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231002>.
- Lombard V., C.P. Barilb, P. Dubreuilb, F. Blouetb, D. Zhanga, Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration, *Crop Sci.* 40 (2000) 1417–1425. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051417x>.
- Louarn S., A. Torp, I. Holme, S.B. Andersen, B. Jensen, Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*, *Genet. Resour. Crop Evol.* 54 (2007) 1717–1725. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9181-6>.
- Masierowska M., T. Pietka, Variability in nectar and pollen production in flowers of double–low lines of white mustard and their attractiveness to honey bees, *Acta Sci. Pol. Hortorum.* 13 (2014) 197–209.
- Mondini L., A. Noorani, M. Pagnotta, Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools, *Diversity*. 1 (2009) 19–35. <https://doi.org/10.3390/d1010019>.
- Pascual L., M. Fernández, N. Aparicio, M. López-Fernández, R. Fité, P. Giraldi, M. Ruiz, Development of a multipurpose core collection of bread wheat based on high-throughput genotyping data, *Agronomy*. 10 (2020) 534. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040534>
- Plieske J., D. Struss, Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. Development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theor. Appl. Genet*, 102 (2001) 689–694. <https://doi.org/10.1007/s001220051698>.
- Pritchard J.K., M. Stehens, P. Donnelly, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*. 155 (2000) 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2020) URL <https://www.R-project.org/>.
- Ruan S.F., Z.X. Wang, S.J. Xiang, H.J. Chen, Q. Shen, L. Liu, W.F. Wu, S.W. Cao, Z.W. Wang, Z.J. Yang, L.D. Weng, H.X. Zhu, Q. Liu, Mechanisms of white mustard seed (*Sinapis alba* L.) volatile oils as transdermal penetration enhancers, *Fitoterapia*. 138 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104195>.
- Thakur A., K. Singh, S. Kumar, N. Parmar, J. Nanjundan, Genetic diversity in leafy mustard (*Brassica juncea* var. *rugosa*) as revealed by agro-morphological traits and SSR markers, *Physiol Mol Biol Plants*. 26 (2020) 2005–2018. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00883-2>.
- Valdes Y., N. Viaene, R. Perry, M. Moens, Effect of the green manures *Sinapis alba*, *Brassica napus* and *Raphanus sativus* on hatching of *Globodera rostochiensis*, *Nematology*. 13 (2011) 965–975. <https://doi.org/10.1163/138855411X571803>.

- Varshney R.K., Designing Future Crops: Genomics-Assisted Breeding Comes of Age, Trends Plant. Sci. 26 (2021) 6, 631–649. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.03.010>.
- Xu Y., M. Xing, L. Song, J. Yan, W. Lu, A. Zeng, Genome-Wide Analysis of Simple Sequence Repeats in Cabbage (*Brassica oleracea* L.). Front Plant Sci. 12 (2021) 726084. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.726084>.
- Yu J.K., Y.S. Chung, Plant Variety Protection: Current Practices and Insights. Genes, 12, (2021) 1127. <https://doi.org/10.3390/genes12081127>.

### **Poděkování**

Tuto studii podpořilo Ministerstvo zemědělství ČR (projekt QK1910225) a Grantová agentura Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 080/2022/Z).

### **Kontakt adresa:**

Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Katedra genetiky a biotechnologií, Fakulta zemědělská a technologické, JU v ČB

Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice

[jozovae@fzt.jcu.cz](mailto:jozovae@fzt.jcu.cz), 387772937

## **Analýza spektra alkaloidů u TILLING populace máku setého**

Analysis of alkaloid spectrum in TILLING poppy population

**Endlová L.<sup>1</sup>, Vrbovský V.<sup>1</sup>, Horáček J.<sup>2</sup>, Červený J.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Oseva vývoj a výzkum s.r.o.*

<sup>2</sup>*Agritec Plant Research s.r.o.*

<sup>3</sup>*Ostravská univerzita*

### **Abstrakt**

Za účelem tvorby genotypů máku setého (*Papaver somniferum* L.) se specifickým obsahem alkaloidů v makovině byl optimalizován postup indukce mutací pro tuto plodinu. Použitým chemomutagenem byl ethylmethansulfonát (EMS), jako optimální se ukázala koncentrace EMS 0,5 % a 1,0 % působící na naklíčené osivo po dobu jedné hodiny. Pomocí tohoto postupu byly vytvořeny TILLIG (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) populace dvou vybraných genotypů máku setého. Molekulárními metodami byly vytipovány linie rostlin M2 generace vykazující změny v genech biosyntetické dráhy alkaloidů. Tyto linie byly dopěstovány do plné zralosti a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byl stanoven obsah alkaloidů v makovině. Všechny vybrané mutačně ovlivněné linie vykázaly nižší obsah morfinu oproti výchozímu genotypu.

**Klíčová slova:** mutační šlechtění, makovina, morfin, tebain, kodein

### **Abstract**

In order to create seed poppy (*Papaver somniferum* L.) genotypes with a specific content of alkaloids in capsules, the mutation induction procedure for this crop was optimized. The chemomutagen used was ethyl methanesulfonate (EMS). The concentration of 0.5% and 1.0% EMS acting on the germinated seeds for one hour proved to be optimal. Using this procedure, TILLIG (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) populations of two selected poppy genotypes were created. Using molecular methods, M2 generation plant lines showing changes in the genes of the alkaloid biosynthetic pathway were selected. These lines were grown to maturity and the content of alkaloids in capsules was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). All selected mutation-affected lines showed a lower morphine content compared to the original genotype.

**Keywords:** mutation breeding, poppy capsules, morphine, thebaine, codeine

### **Úvod**

Perspektivním směrem šlechtění máku setého je tvorba odrůd s minimálním obsahem alkaloidů, především dominantního morfinu, v makovině. Jde především o prevenci možného zneužití máku k nelegální produkci narkotik. Jednou ze šlechtitelských metod, jak efektivně změnit kvalitativní parametry, je využití indukované mutagenese s následnou identifikací změn v zájmových genech metodami molekulární biologie (TILLING). Zavedením TILLING metod se významně zefektivnil následný selekční proces, který byl dříve pro své nároky na obrovské množství vedených mutačně ovlivněných linií hlavní slabinou tohoto typu šlechtění (van Nimwegen *et al.* 2016).

Předložený příspěvek má za cíl zhodnotit použitelnost indukované mutagenese u máku setého pro tvorbu genotypů se specifickým obsahem alkaloidů v makovině. Soustředíme se v něm na

vliv mutačního zásahu na změnu fenotypu v následných generacích. S využitím molekulárních metod byla v TILLING populacích realizována rozsáhlá analýza detekující změny v genech zapojených do syntézy alkaloidů. Detekce a využívání genetických variant byly vždy podstatnou součástí šlechtění rostlin. Vzhledem k tomu, že se sekvenování DNA stalo cenově dostupné a postoupil vývoj různých vysoce výkonných sekvenačních metod, jako jsou PacBio a Ion Torrent, došlo k urychlení integrace těchto metod do TILLING technologie. Tuto problematiku však z hlediska její obsáhlosti nebudeme v tomto příspěvku podrobně rozebírat, bude tématem příspěvků dalších.

## **Materiál a metody**

Za účelem vytvoření mutačně ovlivněných linií vybraných genotypů máku setého vykazující dostatečný výskyt mutací bylo nejprve nutné stanovit optimální postup vlastní mutagenese, tedy stanovit typ mutagenu, jeho koncentraci, dobu působení a další parametry. Cílem bylo vytvořit mutačně ovlivněné osivo s 75% klíčivostí oproti výchozímu (mutagenem neovlivněnému) osivu. Po stanovení optimálního postupu pak došlo k vlastní mutagenesi u vybraných dvou genotypů máku. Mutačně ovlivněná semena byla vyseta a dopěstována do rostlin plné zralosti (M1 generace), přičemž během kvetení byly všichni takto získaní jedinci individuálně zaizolováni proti cizosprašení technickými izolátory. Sklizené osivo (respektive z něj naklíčené rostlinky) bylo využito k molekulární analýze změn v genech zapojených do biosyntézy alkaloidů. Osivo linií, u kterých byla změna detekována, bylo následně použito k založení populace M2 ve šlechtitelských školkách. Zde opět proběhlo přeizolování proti cizosprašení a současně byly odebrány vzorky makoviny pro analýzu obsahu alkaloidů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

## **Výsledky**

### **Optimalizace postupu chemomutagenese**

Na základě dostupných údajů (Tejklová 2002) byl jako nejvhodnější mutagen vybrán ethylmethansulfonát (EMS). Z pracoviště OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. byl na pracoviště Agritec Plant Research s.r.o. zaslán vzorek osiva vybraného genotypu (20 g, odrůda Opex). Semena máku se před vlastní mutagenesí nechala nabobtnat 18 hodin ve vodě při pokojové teplotě. Po této době se přebytečná voda slila přes sítko a k osivu se přidal roztok EMS o různých koncentracích (0,5 %; 1 % a 1,5 % EMS). Baňky se zabalily do alobalu (zamezení přístupu světla – EMS se na světle rozkládá) a umístily na třepačku. EMS se nechal působit po dobu 1 respektive 2 hodin při laboratorní teplotě. Roztok EMS se slil a nádoba s osivem se umístila pod proud tekoucí vody po dobu 30 minut, aby došlo k důkladnému vymytí mutagenu. U máku (či jiného rostlinného materiálu s malými semeny) je nutné zabezpečit osivo před vypláchnutím z nádoby – například přetažením silonové sítky zabezpečené gumičkou. Vše stačí provádět nesterilně. Takto ošetřené osivo je připravené k výsevu do půdy (Macková 2021). Ošetřené osivo bylo přeneseno na navlhčený filtrační papír a hodnotila se klíčivost. Jako ideální množství je vyklíčení 75 % ovlivněného osiva oproti neovlivněnému (kontrolnímu) vzorku (veškerý pracovní postup s kontrolním vzorkem byl shodný, s výjimkou aplikace mutagenu). Po zhodnocení byly vybrány 2 varianty nejvíce se blížící požadované hodnotě. Jednalo se o tyto varianty: kombinace působení 0,5% roztoku EMS po dobu 1 hodiny a 1% roztoku EMS také po dobu 1 hodiny.

### **Vlastní chemomutagenese**

Byly vybrány dva genotypy máku pro mutační zásah, především na základě obsahu alkaloidů v makovině s předpokladem změn tohoto parametru po ovlivnění. Jednalo se o genotyp OP-P-

19, vytvořený šlechtitelskou činností OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. a vyznačující se středním až vysokým obsahem morfinu (1,11 %) a relativně vysokým obsahem tebainu (0,32 %). Druhým genotypem byla odrůda Ametiszt, který vykazuje velmi nízký obsah alkaloidů v makovině (0,04 % morfin, 0,02 % kodein, tebain ve stopovém množství). Osivo z obou materiálů pocházelo z izolovaných, tj. samosprašených rostlin. Vlastní ošetření osiva se provádělo v uvedených dvou variantách koncentrace EMS.

#### Dopěstování ovlivněného materiálu

Ovlivněné osivo bylo dodáno zpět na pracoviště OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. ve zkumavkách s vodou. Zde bylo vyseto do zahradnického substrátu v truhlících (2 od každé varianty), po vzejití byly rostlinky přesazeny do záhonů. Materiál OP-P-19 vykazoval ve variantě s nižší koncentrací EMS (0,5 %) relativně dobrou klíčivost a vitalitu vzcházejících rostlin, u 1% roztoku EMS byly rostlinky slabší a klíčivost byla nižší o 10 %. U odrůdy Ametiszt byla vitalita o trochu nižší oproti OP-P-19, u 1% roztoku EMS byly rostliny slabší a klíčivost byla nižší o 15 % oproti 0,5% EMS. Všechny dorostlé rostliny byly zaizolovány proti cizosprašení technickými izolátory a po dozrání byly individuálně sklizeny tobolky z jednotlivých rostlin.

Bylo získáno osivo z následujícího počtu rostlin:

Ametiszt - 0,5 % EMS – 159 rostlin

Ametiszt - 1,0 % EMS – 195 rostlin

OP-P-19 - 0,5 % EMS – 279 rostlin

OP-P-19 - 1,0 % EMS – 232 rostlin

Následně byla provedena molekulární analýza genů biosyntetické dráhy alkaloidů realizovaná na pracovišti Ostravská univerzita (OSU). Na základě výsledků byly vytipovány a následně vysety pouze ty linie, u kterých byly detekovány požadované změny v syntetické dráze alkaloidů. S těmi byla založena školka M3 generace. Bylo vyseto 33 mutačně ovlivněných linií, jejichž rostliny byly během kvetení zaizolovány proti cizosprašení. Po dozrání byly odebrány vzorky makoviny pro analýzu obsahu alkaloidů metodou HPLC. Část linií vykazovala velmi špatnou vitalitu, proto se je nepodařilo dopěstovat do plné zralosti (všechny mutační linie odrůdy Ametiszt). Výsledky stanovení obsahu alkaloidů jsou uvedeny v tabulce 1. Souběžně byl analyzován také kontrolní vzorek makoviny (K) získaný z výchozího genotypu OP-P-19.

**Tab. 1: obsah alkaloidů v makovině mutačně ovlivněných linií máku setého stanovený metodou HPLC**

VÝSLEDKOVÝ LIST ALKALOIDY – HPLC					
Číslo vzorku	Koncentrace alkaloidu ve vzorku [%]				
	Morfin	Kodein	Tebain	Papaverin	Narkotin
Kontrola (K)	1,453	0,110	0,296	<LOQ	<LOQ
9038	0,434	0,114	0,206	<LOQ	<LOQ
9039	0,551	0,070	0,210	<LOQ	<LOQ
9040	0,507	0,079	0,380	<LOQ	<LOQ
9041	0,636	0,094	0,304	<LOQ	<LOQ
9042	0,100	0,064	0,525	<LOQ	<LOQ
9043	0,635	0,096	0,235	<LOQ	<LOQ
9044	0,972	0,077	0,300	<LOQ	<LOQ

9045	0,369	0,055	0,212	<LOQ	<LOQ
9046	0,452	0,059	0,222	<LOQ	<LOQ
9047	0,868	0,085	0,278	<LOQ	<LOQ
9048	0,527	0,104	0,304	<LOQ	<LOQ
9049	0,471	0,101	0,210	<LOQ	<LOQ
9050	0,485	0,076	0,324	<LOQ	<LOQ
9051	0,763	0,088	0,336	<LOQ	<LOQ
9052	0,513	0,064	0,224	<LOQ	<LOQ
9053	0,892	0,091	0,338	<LOQ	<LOQ
9054	0,561	0,056	0,204	<LOQ	<LOQ
9055	0,743	0,095	0,153	<LOQ	<LOQ
9056	0,673	0,073	0,224	<LOQ	<LOQ
9057	0,750	0,067	0,224	<LOQ	<LOQ
9058	0,200	0,117	0,145	<LOQ	<LOQ
9059	0,762	0,063	0,287	<LOQ	<LOQ
9060	0,922	0,073	0,284	<LOQ	<LOQ
9061	0,629	0,067	0,256	<LOQ	<LOQ
9062	0,983	0,075	0,337	<LOQ	<LOQ
9063	0,571	0,055	0,199	<LOQ	<LOQ
9064	0,709	0,070	0,306	<LOQ	<LOQ
9065	0,857	0,080	0,301	<LOQ	<LOQ
9066	1,062	0,084	0,390	<LOQ	<LOQ
9067	0,378	0,094	0,166	<LOQ	<LOQ
9068	0,856	0,061	0,219	<LOQ	<LOQ
9069	0,615	0,044	0,202	<LOQ	<LOQ
9070	0,420	0,095	0,219	<LOQ	<LOQ

<LOQ = mez stanovitelnosti

## Diskuse

Podařilo se získat mutační linie M3 generace pouze z genotypu OP-P-19. Odrůda Ametiszt vykazala v následných generacích po mutagenезi sníženou vitalitu rostlin. Už v M2 generaci byl získán menší počet linií oproti genotypu OP-P-19 a M3 generace vůbec nevzešla a nepodařilo se tak získat vzorky osiva ani makoviny pro analýzu obsahu alkaloidů. Je patrné, že různé genotypy máku reagují na mutační zásah rozdílně a bylo by vhodné toto zohlednit při mutačním zásahu (u citlivějších genotypů použít nižší koncentrace EMS nebo kratší dobu působení).

Získané výsledky obsahu alkaloidů se tak týkají výhradně genotypu OP-P-19. Bylo získáno 33 vzorků makoviny mutačních linií. Jako kontrolní vzorek byla použita makovina z výchozího genotypu OP-P-19, který byl pěstován současně s TILLING populací. U všech mutačních linií byl identifikován nižší obsah **morfinu** oproti kontrolnímu vzorku. Obsahy se pohybovaly od 0,10 do 1,06 % obsahu morfinu, přičemž žádný vzorek TILLING populace nepřekonal vzorek kontrolní (1,45 %). Průměrný obsah morfinu u mutačních linií (n=33) byl 0,63 %. Průměrný obsah **kodeinu** u TILLING populace byl 0,078 %, tedy opět nižší oproti kontrolnímu vzorku (0,11 %). U dvou vzorků mutantních linií byl zjištěn obsah nepatrně vyšší. Relativně velký



rozptyl vykázal u TILLING populace obsah **tebainu** (0,145-0,525 %). U 12 vzorků byl identifikován vyšší obsah tohoto alkaloidu než ve vzorku kontrolním, a to v některých případech výrazně. Průměrná hodnota u TILLING populace (0,264 %) byla opět nižší než u neovlivněného genotypu (0,296 %), ze sledovaných alkaloidů to však byl rozdíl nejmenší. Pro názornější posouzení změn v obsahu alkaloidů v TILLING populaci udává Tabulka 2 relativní hodnoty obsahu sledovaných alkaloidů vůči výchozímu (mutačně neovlivněnému) genotypu.

**Tab. 2: Relativní obsah alkaloidů v TILLING populaci (n=33) ve srovnání s kontrolním vzorkem K (výchozí genotyp; K = 100 %)**

Alkaloid	Relativní obsah vzhledem ke K [%]			Podíl vzorků s vyšším obsahem alkaloidu než K [%]
	Průměr	Max.	Min.	
Morfin	44	73	7	0
Kodein	71	106	40	6
Tebain	89	177	49	36

Zjištěné obsahy papaverinu a narkotinu nepřekonalý mez stanovitelnosti (LOQ) ani u kontrolního, ani u testovaných vzorků.

Posuny v obsahu morfinu, kodeinu i tebainu v TILLING populaci oproti výchozímu genotypu nejsou překvapivé, neboť byly molekulárními metodami sledovány změny právě v genech zapojených do biosyntetické dráhy alkaloidů.

### Závěr

Aplikace metody indukované mutagenese pomocí EMS se jeví jako perspektivní šlechtitelský postup pro tvorbu genotypů máku setého se specifickým obsahem alkaloidů v makovině. Využití metody TILLING detekující změny v zájmových genech v následných generacích značně zefektivňuje proces selekce linií s předpokládanou změnou fenotypu (obsah alkaloidů). Tyto změny byly potvrzeny analýzou obsahu alkaloidů metodou HPLC. Podle výsledků analýz došlo ke snížení obsahu morfinu u všech 33 linií s detekovanou změnou v genech pro syntézu alkaloidů.

Tvorba odrůd s nízkým obsahem morfinu je aktuálně ceněným šlechtitelským směrem, především z hlediska možného zneužití máku k nelegální výrobě narkotik. Plánujeme proto uvedený postup uplatnit také u dalších šlechtitelských materiálů. Již vytvořené mutačně ovlivněné linie využijeme k tvorbě nových odrůd a jako donorů kvality v dalším šlechtitelském procesu.

### Literatura

- Macková H.: Indukce mutací u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ethylmetansulfonátem, Uplatněná certifikovaná metodika, 2021, ISBN: 978-80-87360-67-5
- Tejcklová E: Curly Stem – an Induced Mutation in Flax (*Linum usitatissimum* L.), Czech J. Genet. Plant Breed., 38, 2002 (3–4): 125–128
- Van Nimwegen K. J. M., van Soest R. A., Veltman J. A., Nelen M.R., van der Wilt G. J., Vissers L. E. L. M., Grutters J. P. C.: Is the \$1000 Genome as Near as We Think? A Cost

Analysis of Next-Generation Sequencing. *Clinical Chemistry*. 2016, 62(11), 1458-1464.  
ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2016.258632

### **Poděkování**

Výsledky byly dosaženy s podporou projektu MZe NAZV QK1810391 „Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi“

### **Kontaktní adresa:**

Mgr. Lenka Endlová, Ph.D.  
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.  
Výzkumný ústav olejin Opava  
Purkyňova 10, 746 01 Opava  
Telefon: 553 624 160, e-mail: endlova@oseva.cz

## Vliv dehydratace a termických charakteristik pylu a explantátů bramboru na jejich vitalitu

Effect of dehydration and thermal characteristics of potato pollen and explants on their vitality

Faltus M.<sup>1</sup>, Hammond S.D.H.<sup>1</sup>, Domkářová J.<sup>2</sup>, Bilavčík A.<sup>1</sup>, Zámečník J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

<sup>2</sup>Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

### Abstrakt

Cílem této práce bylo zjistit vliv dehydratace na termické vlastnosti pylu a explantátů bramboru a jejich vitalitu. Termická analýza byla použita pro stanovení teploty tání (T<sub>m</sub>), podílu (%) krystalické vody v čerstvé hmotě vzorků a teploty skleného přechodu (T<sub>g</sub>). U vzorků pylu bylo zjištěno, že vysoká dehydratace vedla k absenci exotermických i endotermických efektů, posunu teploty skelného přechodu do vysokých teplot (39 – 45 °C) a k silnému poklesu vitality pylu. U explantátů byla jejich životnost a regenerační schopnost po kryoprezervaci ovlivněna genotypem, významně zvýšena při otužování rostlin osmotickým stresem a závisela na době dehydratace pomocí modifikovaného kryoprotektivního roztoku PVS3. Optimální doba dehydratace (60 minut) vedla k významnému poklesu obsahu volné vody na 0,3 – 5 %, přičemž další dehydratace, která eliminovala přítomnost volné vody, vedla k poklesu vitality explantátů.

**Klíčová slova:** Diferenční skenovací kalorimetrie, kryoprezervace, skelný přechod, *Solanum tuberosum* L., termická analýza

### Abstract

The aim of this work was to determine the effect of dehydration on the pollen and potato explant thermal properties and their vitality. Thermal analysis was used to determine the melting temperature (T<sub>m</sub>), the proportion (%) of crystalline water in the fresh mass of the samples and the glass transition temperature (T<sub>g</sub>). High dehydration led to the absence of exothermic and endothermic effects, a shift of the glass transition temperature to high temperatures (39 – 45 °C) and a strong decrease in pollen vitality. Explant survival and regeneration ability after cryopreservation was affected by genotype, significantly increased by osmotic stress, and depended on dehydration using the modified cryoprotective solution PVS3. The optimal dehydration time (60 minutes) led to a significant decrease in free water content to 0.3 – 5%, while further dehydration led to a decrease in their vitality.

**Key words:** Cryopreservation, differential scanning calorimetry, glass transition, *Solanum tuberosum* L., thermal analysis

### Úvod

Obsah vody, respektive jeho pokles je základním faktorem, ovlivňujícím úspěšnou kryoprezervaci pletiv a orgánů rostlin (Day *et al.* 2008). Proto jsou vyvíjeny postupy kultivace explantátů, které zahrnují různé způsoby dehydratace pletiv, související s vystavením rostlin působení osmotickému stresu nebo stresu nízké teploty (Pegg 2007). Takové otužení vede primárně ke zvýšení odolnosti vůči následné silné dehydrataci suchým vzduchem nad silikagelem, mrazové dehydrataci v mrazáku nebo pomocí osmoticky aktivních roztoků. Dostatečná dehydratace explantátů, která nezpůsobí jejich poškození, je předpokladem pro uchování jejich regenerační schopnosti při kryoprezervaci (Engelmann 2004). Vitalita pylu je ovlivněna jeho fyziologickým stavem, který závisí na genotypu rostliny, jeho vývojovém stadiu, stáří a na fyzikálních parametrech, zejména na jeho vlhkosti a teplotě prostředí. Pro účely krátkodobého uchování pylu při šlechtění se obvykle využívají teploty skladování nad

bodem mrazu (v chladničce), a pokud je to možné, vždy při sníženém obsahu vody. Kontrola těchto fyzikálních parametrů je klíčová pro udržení životnosti pylu po celou dobu jeho skladování, počínaje jeho sklizní až po jeho využití při opylování. Obdobná je i situace při dlouhodobém skladování v podmínkách kryoprezervace. V tomto případě musí být obsah vody co nejnižší, aby nedocházelo k tvorbě ledových krystalů při působení teploty bodu varu kapalného dusíku,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cílem této práce bylo stanovit vliv dehydratace a termických charakteristik pylu a explantátů bramboru na jejich vitalitu.

### **Materiál a Metody**

Vzorky pylu byly odebrány z rostlin na pracovištích Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, s.r.o. (VÚBHB) a Vesa Velhartice, a.s. Byly vybrány odrůdy s různou dobou kvetení a s různou výtěžností pylu. Ve Výzkumném ústavu bramborářském Havlíčkův Brod byly odebrány vzorky pylu u odrůd Jasmína, Jindra a Magda a dále bylo vybráno novošlechtění R13.534/12 z pracoviště Vesa Velhartice, a.s. pro testování termických vlastností pylu a jeho životnosti. Květenství byla odebrána z mateřských rostlin po dozrání prašníků a umístěna v laboratorních podmínkách. Pyl byl uvolňován poklepem jehlou na jednotlivé prašníky a následně sesypán do plastových zkumavek a uložen v chladu ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Metoda diferenční skenovací kalorimetrie byla využita ke stanovení teploty fázových přechodů a hodnoty entalpie tání. Byl použit diferenční skenovací kalorimetr Q2000 s RCS (TA Instruments, USA) v rozsahu  $-90$  až  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , při rychlosti chlazení i ohřevu  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , s využitím hliníkových, hermeticky uzavřených, pánviček. Při ohřevu byla stanovena teplota skelného přechodu, teplota tání vyjádřená jako tzv. onset píku, množství skupenského tepla tání a vypočítáno množství zmrzlé vody ve vzorku, které bylo vyjádřeno jako procentní podíl z celkové hmotnosti vzorku. Celkový obsah vody ve vzorku byl stanoven gravimetricky z rozdílu čerstvé hmotnosti a hmotnosti sušiny po vysušení vzorku do konstantní hmotnosti v horkovzdušné sušárně při teplotě  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Čerstvé vzorky pylu byly barveny pomocí tří postupů vitálního barvení s využitím neutrální červeně (Roth), methylenové modři (P-lab) a Lugolova roztoku (Sigma Aldrich), mikroskopické snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Carl Zeiss Amplital při použití objektivů 16x a 40x, digitální kamery CMOS 570 a programu TCapture a z pořízených snímků byl stanoven podíl plně vitálních rostlin.

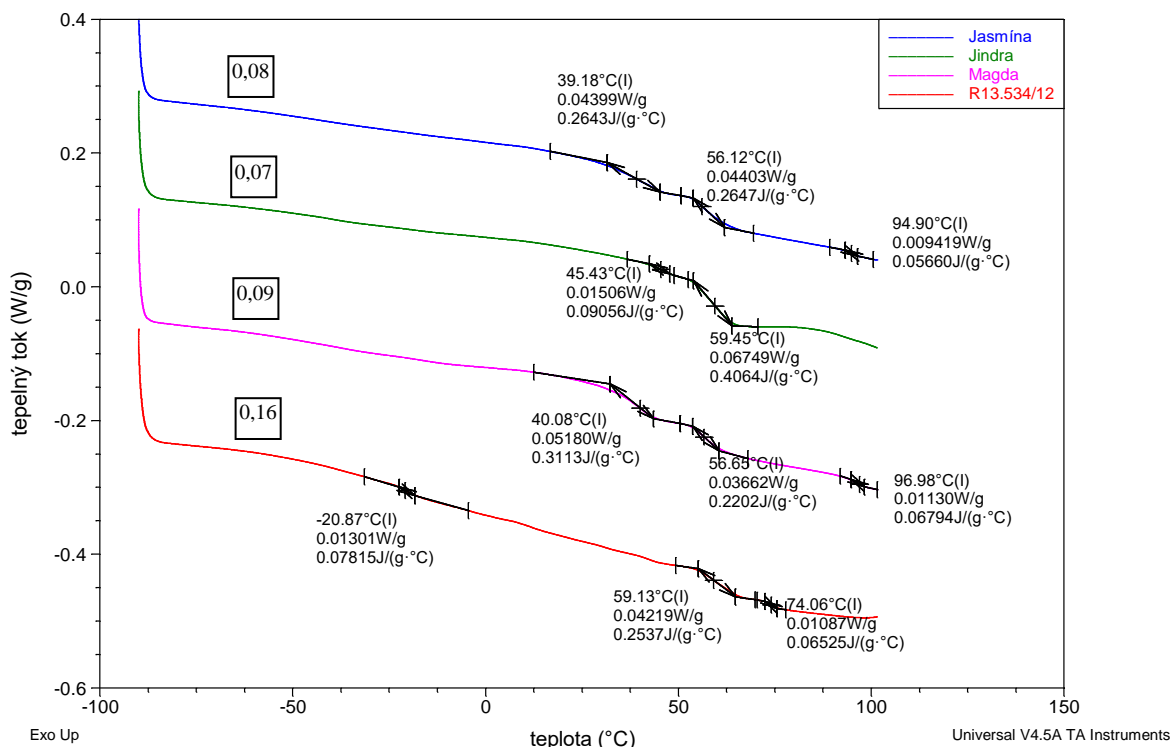
Explantáty bramboru odrůd Désirée a Judika (z genové banky VÚBHB) byly použity pro testy otužování a dehydratace při působení kryogenních teplot. Kultivace a otužování *in vitro* rostlin bramboru probíhaly na modifikovaném kultivačním mediu podle Grospietsche *et al.* (1999) bez kaseinu a myoinositolu a se sníženým obsahem dusíku,  $30\text{ g l}^{-1}$  sacharózy a  $7\text{ g l}^{-1}$  agaru. Jednodálňní segmenty otužované varianty byly po pěti dnech kultivace zality roztokem 2 M sacharózy a po dalších 5 až 6 dnech kultivace byly vyizolovány vzrostné vrcholy o velikosti přibližně 2 mm a umístěny do Petriho misky na filtrační papír nasycený 0,7 M roztokem sacharózy s fytohormony ( $0,5\text{ mg l}^{-1}$  kyseliny indolyl octové,  $0,5\text{ mg l}^{-1}$  kinetinu,  $0,2\text{ mg l}^{-1}$  kyseliny gibberelové) po dobu 20 hodin při  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Otužování explantátů vůči dehydrataci probíhalo po dobu 5 dní působením 2 M roztoku sacharózy, který byl přidán do nádobek s explantáty v poměru 1:2 vzhledem ke kultivačnímu mediu. Kultivace kontrolních rostlin probíhala za stejných podmínek kultivace, ale bez aplikace roztoku 2 M sacharózy. Následně byly z narostlých výhonů izolovány vzrostné vrcholy bramboru, které byly umístěny na sterilní filtrační papír nasycený roztokem 0,7 M sacharózy ve sterilní Petriho misce po dobu 20 hodin. Izolované vzrostné vrcholy byly dehydratovány nejprve pomocí sytícího roztoku (LS) obsahujícím 2 M glycerol a 0,4 M sacharózu po dobu 30 minut. Pak byl sytící roztok odsát pomocí Pasteurovy pipety a nahrazen kryoprotektivním modifikovaným roztokem PVS3 obsahujícím 40 % (w/v) glycerol a 40 % (w/v) sacharózu po dobu 30, 60 a 90 minut. Poté byly vzrostné vrcholy umístěny na hliníkové plíšky a vloženy do kryozkumavek (1,8 ml) s kapalným

dusíkem po dobu 60 minut. Odtání vzorků z kapalného dusíku proběhlo rychlým ponořením hliníkových plíšků s explantáty do roztoku 0,7 M sacharózy o teplotě 40 °C po dobu 1 min. a poté následovalo jejich vysazení na regenerační medium, které mělo shodné složení jako medium multiplikační, ale bylo obohaceno o směs fytohormonů (0,02 mg l<sup>-1</sup> kyseliny gibberelové, 0,1 mg l<sup>-1</sup> kyseliny indolyl máselné, 0,01 mg l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu). Životnost explantátů byla hodnocena po 2 týdnech a regenerace po 8 týdnech kultivace. Metoda diferenční skenovací kalorimetrie byla využita ke stanovení teploty fázových přechodů a hodnoty entalpie tání u explantátů obdobně jako při hodnocení pylu.

## Výsledky a diskuze

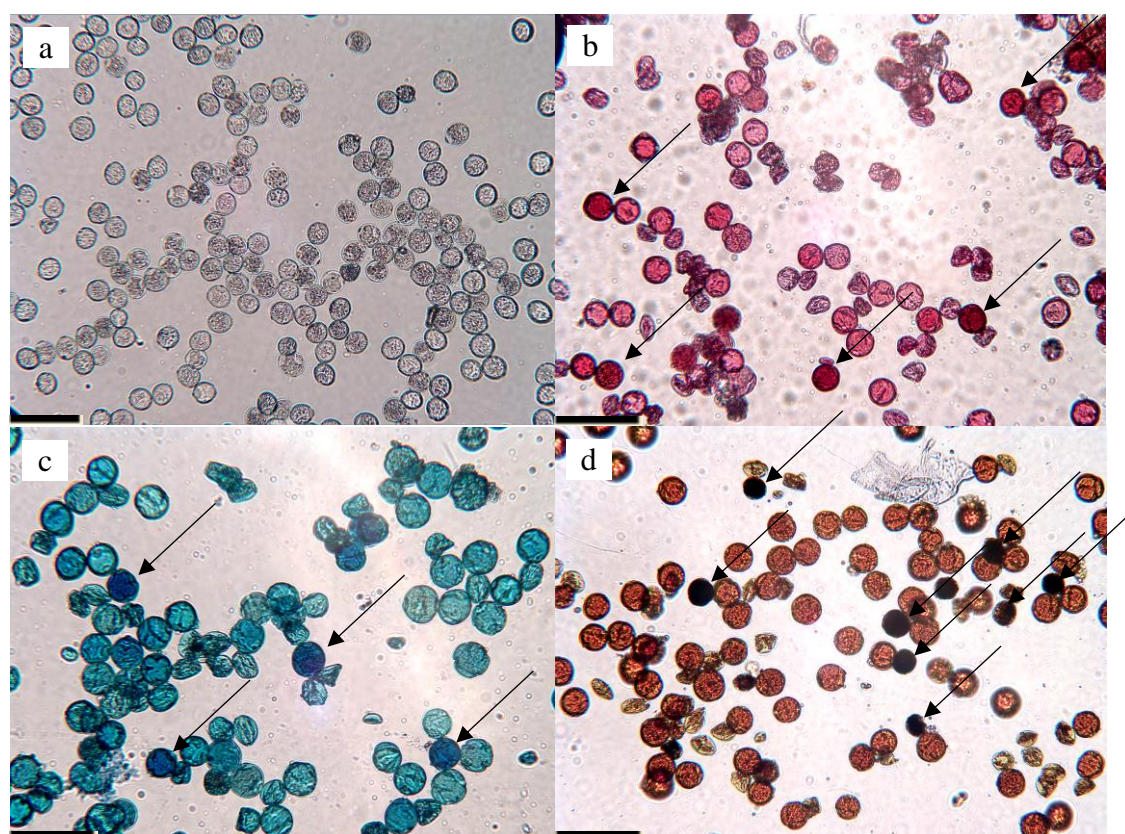
### Dehydratace a životnost pylu

Vzorky pylu u odrůd Jasmína, Jindra a Magda a novošlechtění R13.534/12 byly hodnoceny s využitím termické analýzy a následně byl stanoven obsah vody (Obr. 1), který se pohyboval v rozmezí 0,07 (odrůda Jindra) až 0,16 (nšl. R13.534/12) g vody g<sup>-1</sup> sušiny. Pouze vzorek pylu novošlechtění se z hlediska obsahu vody a také hodnoty teploty skelného přechodu (39,18 – 45,43 °C) pohyboval v hodnotách zjištěných u pylu bramboru při předchozím výzkumu (Faltus *et al.* 2020).



**Obrázek 1.** Termogram z termické analýzy vzorků pylu u odrůd bramboru Jasmína, Jindra, Magda a novošlechtění R13.534/12. Měření bylo provedeno pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru TA Q2000 (TA Instruments, USA) s chlazením pomocí elektrického chladiče. Vzorky byly chlazeny z laboratorní teploty do teploty -90 °C a následně ohřáty až na 100 °C. Rychlost chlazení i ohřevu bylo 10 °C min<sup>-1</sup>, byly použity hliníkové, hermeticky uzavřené pánvičky. Na křivkách jsou vyznačeny termické efekty, které mají charakter skelného přechodu, a jsou charakterizovány teplotou skelného přechodu, množství uvolněné energie termického jevu na jednotku hmotnosti vzorku a měrná tepelná kapacita termického jevu vzorku. Hodnoty uvedené v rámečku u jednotlivých křivek představují hodnotu obsahu vody vzorku vyjádřenou v gramech vody na 1 gram sušiny.

U ostatních odrůd byly hodnoty obsahu vody i teploty skelných přechodů ( $-20,87\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mimo rozsah dřívějších zjištění, což ukazuje na extrémní dehydrataci vzorků pylu. Vzhledem k tomu, že se hodnoty teploty skelného přechodu nacházely při poměrně vysoké teplotě, bylo provedeno měření až do teploty  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Přitom byly zjištěny další dva efekty s charakterem skelného přechodu. První v rozmezí teplot  $56,12$  až  $59,45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , který souvisí pravděpodobně s denaturací bílkovin a druhý v rozmezí teplot  $74,06$  až  $96,98\text{ }^{\circ}\text{C}$ , který pravděpodobně souvisí s celkovou dezintegrací vzorku. Tyto zjištěné efekty však přímo nesouvisí s procesem dehydratace pylu. U čerstvých vzorků byla následně hodnocena vitalita pylu s využitím barvení pomocí neutrální červeně, methylenové modře a Lugolova roztoku (Obr. 2). Všechny tři metody potvrdily poměrně značný pokles vitality všech vzorků, kdy podíl plně vitálních vzorků pylu byl u všech genotypů nižší než  $10\%$ . Tyto výsledky potvrdily předchozí poznatky týkající se extrémně nízkého obsahu vody ve vzorcích pylu a vysoké hodnoty teploty skelného přechodu. Protože odebraný pyl nebyl vystaven podmínkám řízené dehydratace, lze předpokládat, že snížený obsah vody ve vzorcích pylu byl způsoben ročníkem a průběhem počasí při sklizni a podmínkami při izolaci pylu.



**Obrázek 2.** Mikroskopické snímky pylu bramboru a) před obarvením, po obarvení pomocí b) neutrální červeně, c) methylenové modře, d) Lugolova roztoku. Černé úsečky reprezentují  $50\text{ }\mu\text{m}$ , černé šipky značí plně životaschopná pylová zrna, světleji obarvená zrna značí snížení životaschopnosti, neobarvená a deformovaná zrna poškození pylu a ztrátu životaschopnosti.

### Dehydratace a životnost explantátů

U modelových odrůd Désirée a Judika byl hodnocen vliv otužování explantátů, doby dehydratace a její intenzity pomocí kryoprotektivního roztoku PVS3 na životnost a regeneraci vzrostných vrcholů po kryoprezervaci. Termická analýza prokázala postupný pokles obsahu volné vody (Tab. 1), odpovídající podílu krystalické fáze (ledu) ve vzorcích. Po 30 minutách

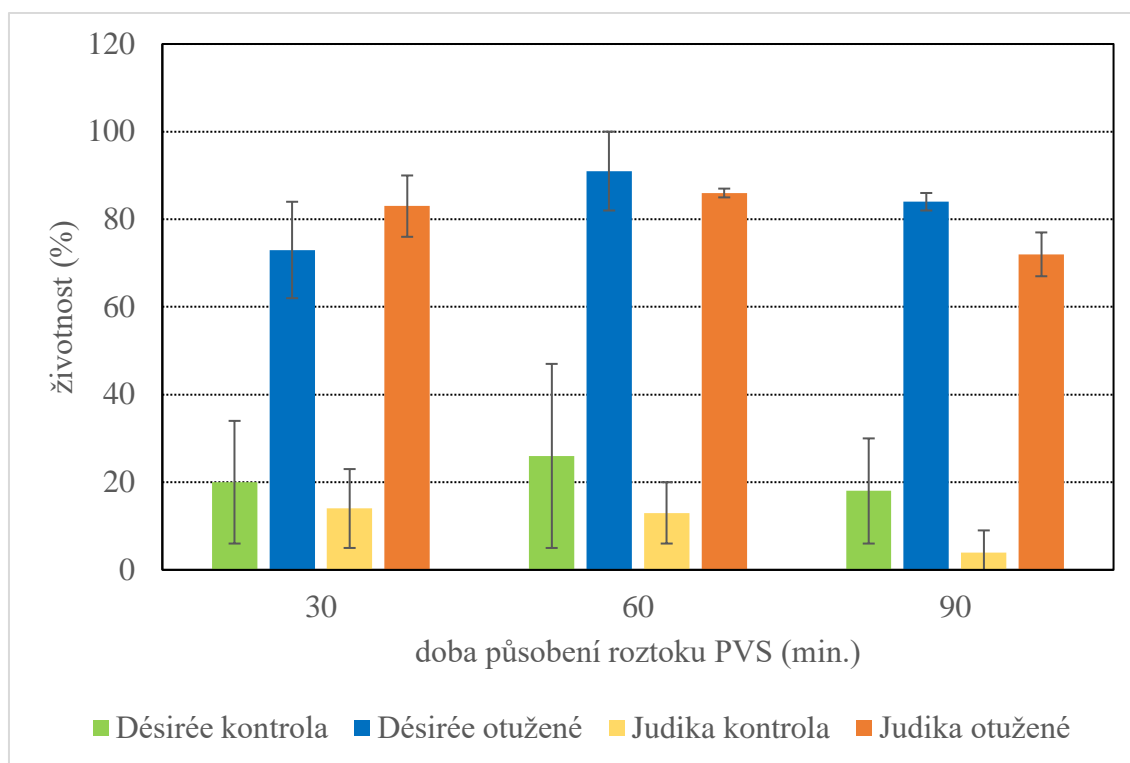


působení sytícího roztoku (LS) se podíl krystalické fáze v explantátech pohyboval v rozmezí 34 – 42 %, po 30 minutách působení roztoku PVS3 poklesl na 6 – 10 % a po 60 minutách v PVS3 poklesl na 0,3 – 5 %. Další dehydratace pomocí roztoku PVS3 (90 minut) vedla k úplnému omezení krystalické fáze, značíci absenci volné vody v explantátech. V průběhu dehydratace došlo k poklesu teploty tání u všech variant u obou odrůd. Po působení sytícího roztoku se teplota bodu tání pohybovala v rozmezí -15 až -19 °C. Při následné dehydrataci, po 30 minutách působení roztoku PVS3, teplota tání klesla na -40 až -43 °C. Další dehydratace (60 minut) již nevedla k dalšímu poklesu teploty tání (-35 až -42 °C). Na základě dosažených výsledků nebyl prokázán statisticky významný vliv odrůdy a otužování osmotickým působením roztoku 2 M sacharózy na změny teploty tání a podílu krystalické vody. Na druhou stranu odrůda Désirée vykazovala v průměru vyšší živostnost a regeneraci explantátů po kryoprezervaci ve srovnání s odrůdou Judika (Obr. 3 a 4).

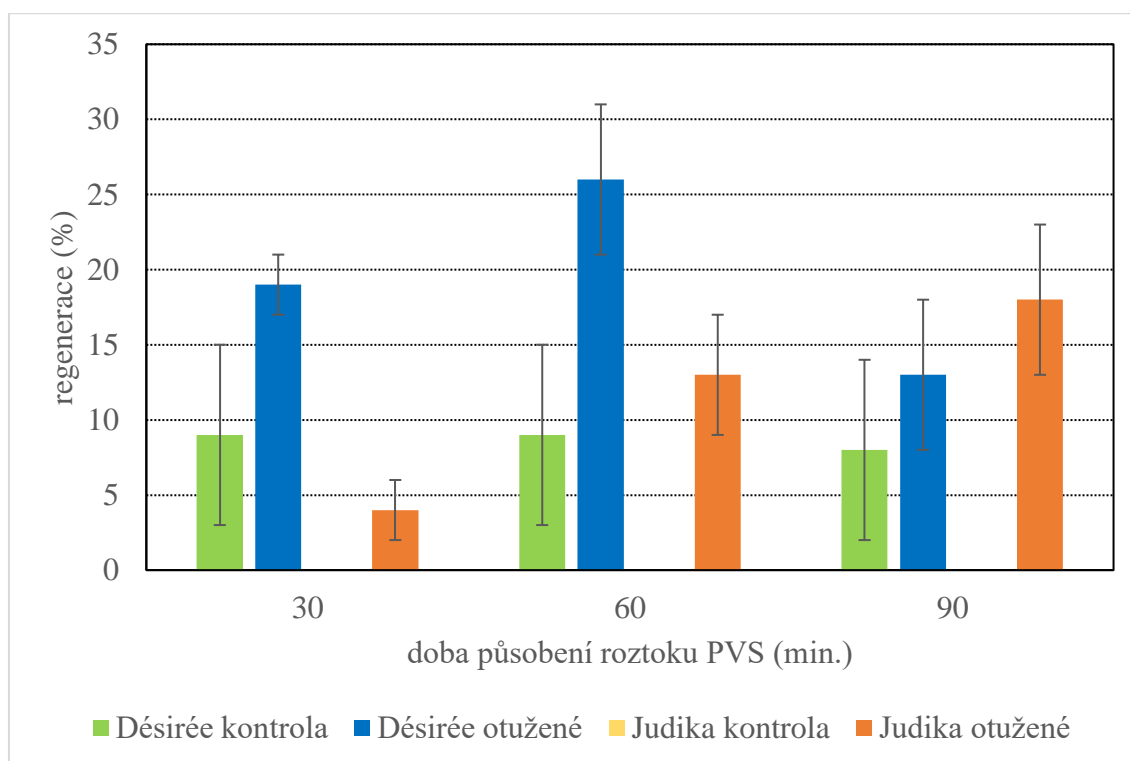
**Tabulka 1.** Výsledky termické analýzy explantátů bramboru, odrůd Désirée a Judika, v průběhu kryoprezervace po působení sytícího roztoku (LS) a působení kryoprotektantu PVS3 po dobu 30, 60 a 90 minut u rostlin po osmotickém otužení (+) pomocí 2 M roztoku sacharózy po dobu 5 dní a rostlin v kontrolních podmínkách bez otužení (-). T<sub>m</sub> představuje teplotu tání; procento krystalizace (kryst.) je vyjádřen jako podíl krystalické vody vztažený na čerstvou hmotu vzorku; v posledních dvou sloupcích tabulky (po 90 minutách působení PVS3) nejsou uvedena žádná data z důvodu absence krystalizace vody a odpovídajícího píku tání.

Genotyp	osmot. otužení	dehydratace							
		LS		působení PVS3 (min.)					
		T <sub>m</sub> (°C)	krystal. (%)	30 T <sub>m</sub> (°C)	30 krystal. (%)	60 T <sub>m</sub> (°C)	60 krystal. (%)	90 T <sub>m</sub> (°C)	90 krystal. (%)
Désirée	-	-19	40	-43	10	-42	5	-	-
	+	-17	38	-40	4	-39	2	-	-
Judika	-	-16	34	-42	6	-39	4	-	-
	+	-15	42	-43	8	-35	0,3	-	-

Bylo prokázáno, že otužování explantátů osmotickým působením roztoku sacharózy vedlo u obou odrůd k významnému zvýšení živostnosti a regenerační schopnosti po kryoprezervaci u všech pokusných variant působení kryoprotektivního roztoku PVS3 (Obr. 3 a 4). Dále byl u obou odrůd zjištěn statisticky významný nárůst živostnosti a regenerace po kryoprezervaci u varianty po 60 minutách dehydratace pomocí roztoku PVS3 ve srovnání s 30 minutami působení roztoku. Další dehydratace pomocí roztoku PVS3 (90 minut) vedla k poklesu živostnosti a regenerační schopnosti explantátů po kryoprezervaci. Nejvyšší živostnost explantátů po kryoprezervaci byla 91 % u odrůdy Désirée a 86 % u odrůdy Judika po 60 minutách dehydratace pomocí roztoku PVS3 u rostlin, které byly otužované pomocí 2 M roztoku sacharózy. Nejvyšší regenerační schopnost u odrůdy Désirée byla 26 % po 60 minutách dehydratace roztokem PVS3 u rostlin otužených roztokem sacharózy. U odrůdy Judika byla nejvyšší regenerační schopnost 18 % po 90 minutách působení roztoku PVS3 u rostlin otužovaných roztokem sacharózy, ale nebyla statisticky významně odlišná od regenerační schopnosti po 60 minutách dehydratace (13 %).



**Obrázek 3.** Životnost explantátů bramboru, odrůd Désirée a Judika, po kryoprezervaci v kontrolních podmínkách a po otužování při působení 2 M roztoku sacharózy po dobu 5 dní. Vertikální úsečky reprezentují standardní chybu průměru.



**Obrázek 4.** Regenerace explantátů bramboru, odrůd Désirée a Judika, po kryoprezervaci v kontrolních podmínkách a po otužování při působení 2 M roztoku sacharózy po dobu 5 dní. Chybějící hodnoty v grafu u kontrolní varianty odrůdy Judika představují nulovou regeneraci explantátů. Vertikální úsečky reprezentují standardní chybu průměru.



Z výsledků vyplývá, že nejvyšší životnost explantátů a regenerační schopnost po kryoprezervaci byla dosažena v průměru po 60 minutách působení roztoku PVS3 u varianty, kde byly rostliny otužované roztokem 2 M sacharózy, při obsahu krystalické fáze 0,3 až 5 % (Tab.1). Z výsledků vyplývá, že dosažení maximální životnosti a regenerační schopnosti po kryoprezervaci záviselo, kromě genotypu, především na otužování rostlin pomocí osmotického stresu a na následné dehydrataci pomocí kryoprotektivního roztoku PVS3. Optimální doba této dehydratace byla v průměru 60 minut, kdy zůstal zachován velmi nízký podíl volné vody, která však nezpůsobila fatální poškození explantátů.

### **Závěr**

Termická analýza testovaných vzorků pylu prokázala jejich vysokou dehydrataci, která se projevovala extrémně vysokými hodnotami teplot skelného přechodu. Vitální barvení zároveň prokázalo vysokou míru poškození pylových zrn v důsledku vysoké dehydratace, ke které došlo pravděpodobně díky podmínkám při sklizni nebo izolaci pylu. Tento poznatek ukazuje na nezbytnost kontroly podmínek sběru, izolace a transportu pylu bramboru před jeho kryoprezervací. U explantátů bramboru byl prokázán významný vliv otužování rostlin pomocí osmotického stresu a testovaného genotypu na životnost a regeneraci explantátů po kryoprezervaci. Optimální doba dehydratace pomocí modifikovaného kryoprotektivního roztoku PVS3 byla zjištěna po 60 minutách jeho působení. Termická analýza prokázala, že maximální vitalita explantátů souvisela s přítomností nízkého obsahu volné vody (0,3 – 5 %), která může krystalovat při poklesu teploty během kryoprezervace, ale zřejmě nepůsobí fatální poškození uchovávaných vzorků.

### **Dedikace**

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství ČR QK1910277 a institucionálního projektu MZE – RO0418.

### **Použitá literatura**

- Day, J.G.; Harding, K.C.; Nadarajan, J.; Benson, E.E., 2008: Cryopreservation. In *Molecular Biomethods Handbook*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 917–947.
- Pegg, D.E., 2007: Principles of cryopreservation. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, pp. 39–57.
- Engelmann, F., 2004: Plant cryopreservation: Progress and prospects. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40, 427–433.
- Grospietsch M., Stodůlková, E., Zámečník, J., 1999: Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20, s. 339-346.
- Faltus, M., Svoboda, P., Domkářová, J., Bilavčík, A., Zámečník, J. Vliv dehydratace na obsah vody a termické vlastnosti pylu chmele a bramboru. *Úroda*, 2020, (12), 41-48. ISSN 0139-6013.

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.  
Drnovská 507  
161 06 Praha 6  
e-mail: [faltus@vurv.cz](mailto:faltus@vurv.cz)



## **Predikce obsahu inhibitorů trypsinu u hrachu (*Pisum sativum* L.) s využitím metody FT-NIRS**

Prediction of trypsin inhibitor content in pea (*Pisum sativum* L.)  
using the FT-NIRS method

**Horáček J.**

*Agritec Plant Research, s.r.o., Šumperk*

### **Abstrakt**

Cílem práce bylo vytvoření kalibračního modelu pro zařízení FT-NIRS Antaris II. Vzorky zralých semen hrachu byly odebírány z maloparcelkových pokusů s genovými zdroji hrachu. Ve vzorcích byl stanoven obsah inhibitorů trypsinu (TIA). Vzorky byly proměřeny na analyzátoru FT-NIRS Antaris II a pomocí příslušného chemometrického softwaru byla vytvořena kalibrační rovnice v rozsahu 4,63 až 17,52 TIU. Na základě provedených diagnostik je kalibrační model vhodný zejména pro skrínigová měření.

**Klíčová slova:** TIA, hrách

### **Abstract**

The aim of the work was to create a calibration model for the FT-NIRS Antaris II analyzer. Samples of pea seed were collected from small-plot experiments with pea genetic resources. The content of trypsin inhibitors (TIA) was determined in the samples. Samples were then measured on an FT-NIRS Antaris II analyzer and a calibration equation in range 4,63 – 17,52 TIU was created using the appropriate chemometric software. Based on the performed diagnostics, the calibration model is particularly suitable for screening measurements.

**Key words:** TIA, pea

### **Úvod**

Inhibitory trypsinu (TI) jsou hlavním antinutričním faktorem semen hrachu (Page *et al.* 2000). Stanovení TIA (z anglického „Trypsin inhibitor activity“) je využíváno při šlechtění nových odrůd hrachu s důrazem na nízký obsah TI. Z toho vyplývají i požadavky na analytickou metodu, která by měla být rychlá, levná a měla by umožňovat analýzu větších sérií vzorků. Metoda FT-NIRS se řadí mezi metody molekulové spektroskopie. Principem metody je absorpce energie záření molekulami analyzovaného vzorku, způsobující zvýšení rotačních a vibračních stavů molekul. Měření probíhá v blízké infračervené oblasti, odtud je odvozen název metody (Near Infrared Spectroscopy – NIRS). Její výhodou je nedestruktivnost, časová nenáročnost, nízké náklady na analýzy, a přitom je zachována dostatečná přesnost a správnost analýzy. Metoda často nevyžaduje žádnou úpravu vzorku, případně pouze mletí najemno. Metoda FT-NIRS je vhodná zejména pro rutinní analýzu velkého počtu vzorků a umožňuje stanovení více parametrů nejednou (Endlová *et al.* 2017). Cílem práce bylo vytvoření kalibračního modelu FT-NIRS pro analyzátor Antaris II (Thermo Scientific, USA). Kalibrační model pro určitý parametr vyjadřuje míru korelace mezi výsledky získanými metodou NIRS a laboratorní referenční metodou a pro jeho spolehlivé vyjádření je potřeba shromáždit dostatečně obsáhlý soubor vzorků (Endlová *et al.* 2017).

### **Materiál a Metody**

Pro účely tvorby kalibračního modelu byl vytvořen soubor vzorků hrachu setého s vysokou variabilitou stanovovaného parametru. Vzorky zralých semen hrachu byly odebírány

z maloparcelkových pokusů s genovými zdroji hrachu. Obsah TI byl stanoven laboratorní analytickou metodou (Horáček 2008), která byla již dříve vyvinuta na našem pracovišti na základě starších metod (Bacon *et al.* 1995, Page *et al.* 2000). Vzorky semen hrachu byly nejprve namlety na laboratorním šrotovníku Cyclotec 1093 (Foss Tecator, Švédsko). Inhibitory trypsinu ze vzorku byly extrahovány do alkalického extrakčního pufru. K extraktu byl přidán trypsin a po inkubaci také umělý substrát, který byl trypsinem hydrolyzován za vzniku barevného produktu. Absorbance produktu byla měřena spektrofotometricky a z naměřených hodnot absorbancí byla vypočítána aktivita inhibitorů trypsinu, vyjádřená v jednotkách TIU (Horáček 2008).

Pomleté vzorky byly současně změřeny na analyzátoru FT-NIRS Antaris II (Thermo Scientific, USA) vybaveným softwarem Omnic (Thermo Scientific, USA). Měření bylo provedeno v rotační kruhové kyvetě s křemenným dnem, propustným pro NIR záření. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních a pro výpočet bylo použito průměrné spektrum. FT-NIRS spektra vzorků hrachu jsou znázorněna na obrázku (Obr. 1). Pro zpracování naměřených spekter a vytvoření kalibračního modelu byl využit chemometrický software TQ Analyst (Thermo Scientific, USA). Software je uživatelsky přívětivý a pro tvorbu kalibrace umožňuje využití průvodce. Na vytvoření kalibračního modelu pro stanovení obsahu TI u hrachu byl aplikován algoritmus PLS (Partial Least Squares). Byly vypočítány hodnoty standardní chyby kalibrace (RMSEC) a korelační koeficient kalibrace (R) (Obr. 2). Byly vyjádřeny odchylky predikovaných a laboratorních hodnot (Obr. 3).

Diagnostický nástroj „Statistical Spektra Tool“ byl použit pro výběr spektrálních oblastí, ve kterých nejlépe koreluje změna v obsahu TI se změnou absorbance ve spektru. Pomocí diagnostik „Spectrum Outlier“, „Leverage“ (Obr. 5) a „Principal Component Scores“ byly ze souboru vyloučeny kalibrační vzorky, které vykazovaly velkou odchylku mezi laboratorními a vypočítanými hodnotami a dále pak spektra, která byla vyhodnocena na základě Chauvenetova testu jako odlehlá. Pro ověření spolehlivosti a robustnosti kalibrace byla provedena křížová validace. Byly vypočítány hodnoty standardní chyby cross-validace (RMSECV) a korelační koeficient cross-validace ( $R_{cv}$ ) (Obr. 4).

### Výsledky a diskuse

V rámci kolekce genových zdrojů hrachu bylo odebráno a analyzováno 270 vzorků semen hrachu setého. Průměrný obsah inhibitorů trypsinu se pohyboval na úrovni 7,45 TIU (Trypsin Inhibitor Unit), přičemž nejnižší stanovený obsah TI u hrachu byl 4,63 TIU, nejvyšší obsah 17,52 TIU. Kalibrační model pokryl celou šíři obsahu inhibitorů trypsinu u polního hrachu, více jsou v kalibraci zastoupeny vzorky s hodnotou obsahu TI do 10 TIU.

Hodnota korelačního koeficientu kalibrace byla 0,96, hodnota standardní chyby kalibrace byla 0,755. Kalibrační model byl otestován pomocí série diagnostik, které jsou součástí chemometrického software TQ Analyst, spolehlivost kalibrace byla ověřena křížovou validací. Byla vyjádřena hodnota korelačního koeficientu křížové validace ( $R_{cv}$ ) a chyba křížové validace (RMSECV).

Hodnota korelačního koeficientu křížové validace byla 0,66, hodnota standardní chyby křížové validace byla 2,04. Chyba křížové validace je vyšší než chyba kalibrační, větší odchylku vykazují hlavně vzorky v oblasti nad 10 TIU. Tato oblast bude muset být v budoucnu ještě doplněna dalšími kalibračními vzorky.

Pro výpočet kalibračního modelu bylo použito 17 faktorů (Principal Components, PC). Do těchto proměnných jsou přeneseny algoritmem PLS důležité spektrální informace zvolených kalibračních oblastí. Toto bylo potvrzeno diagnostikou PRESS (Obr. 6).

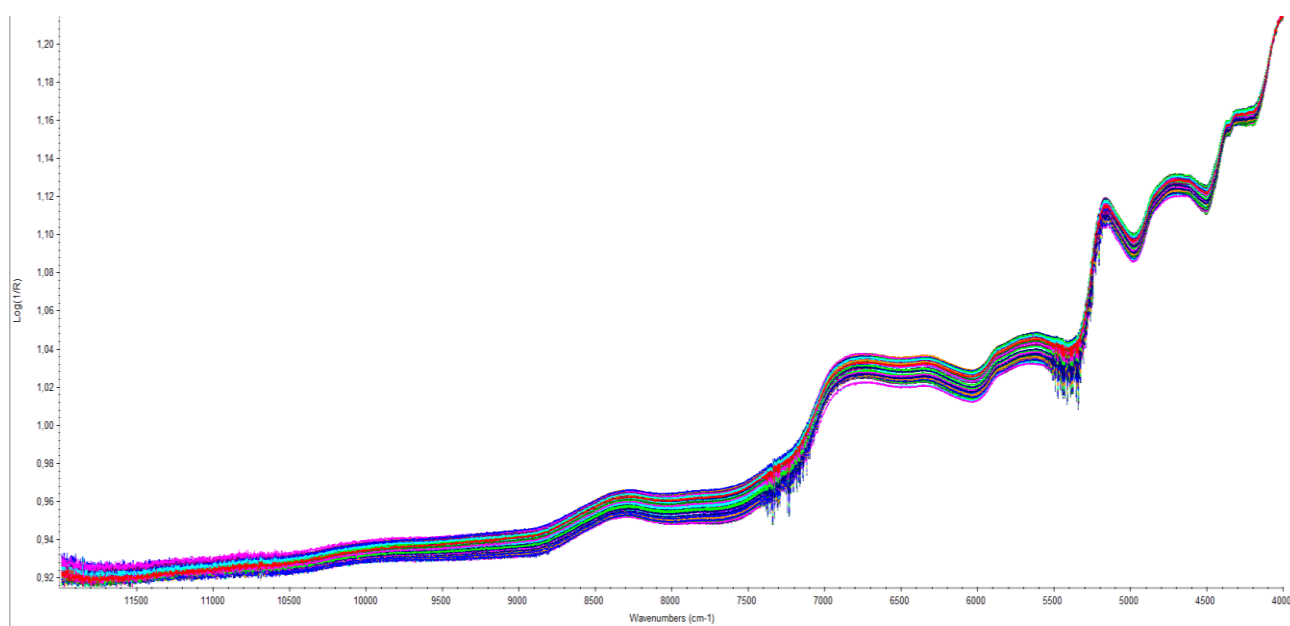
Použité diagnostiky a validace metody ukázaly, že vytvořený kalibrační model je dostatečný pro screeningovou predikci obsahu TI metodou NIRS. Vyšší obsahy TI v hrachu nejsou v kalibraci zastoupeny v takové míře jako obsahy do 10 TIU a tyto vzorky zatěžují křížovou

validaci vyšší chybou. Je však nutné mít na paměti, že přesnost metody NIRS je vždy závislá na použité primární analytické metodě a její chyba nemůže být z principu nikdy nižší, než je chyba analytické metody, použité pro kalibraci.

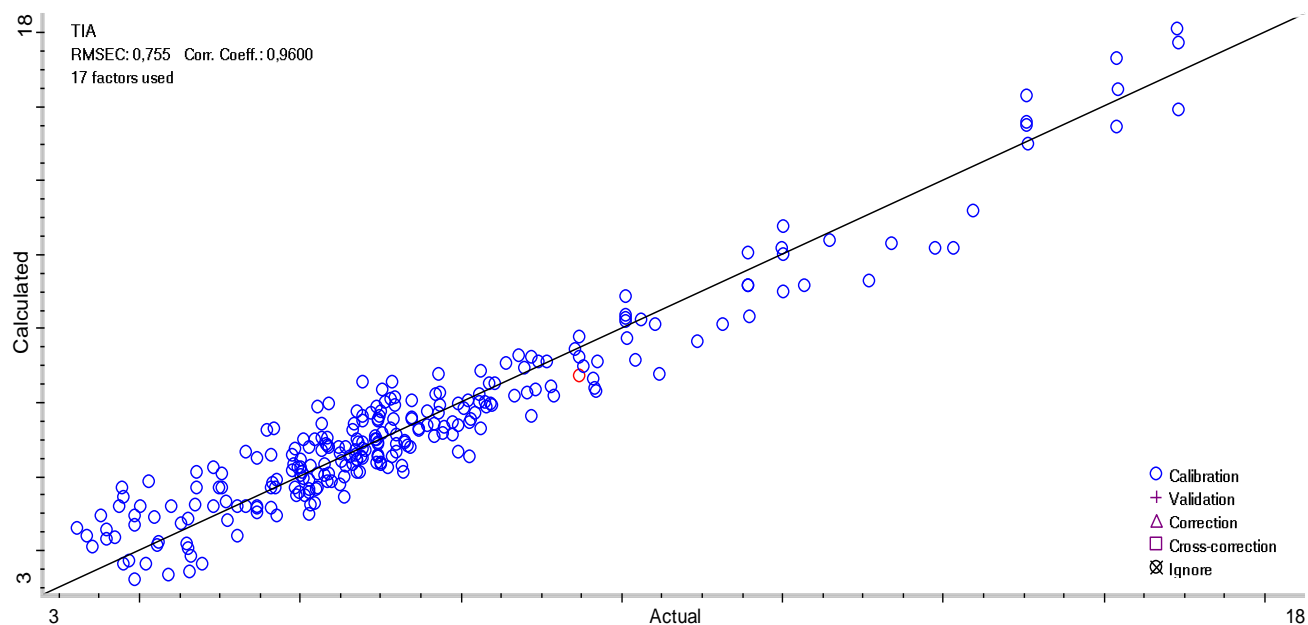
Hlavní výhodou metody NIRS, oproti primární analytické metodě, je snadná a rychlá příprava vzorku, která spočívá pouze v jeho dokonalé homogenizaci pomocí mlýnku. Vlastní měření je pak velmi rychlé, tři opakovaná měření jednoho vzorku lze pohodlně provést do pěti minut, metoda je tak velmi vhodná pro rychlá screeningová měření.

### Závěr

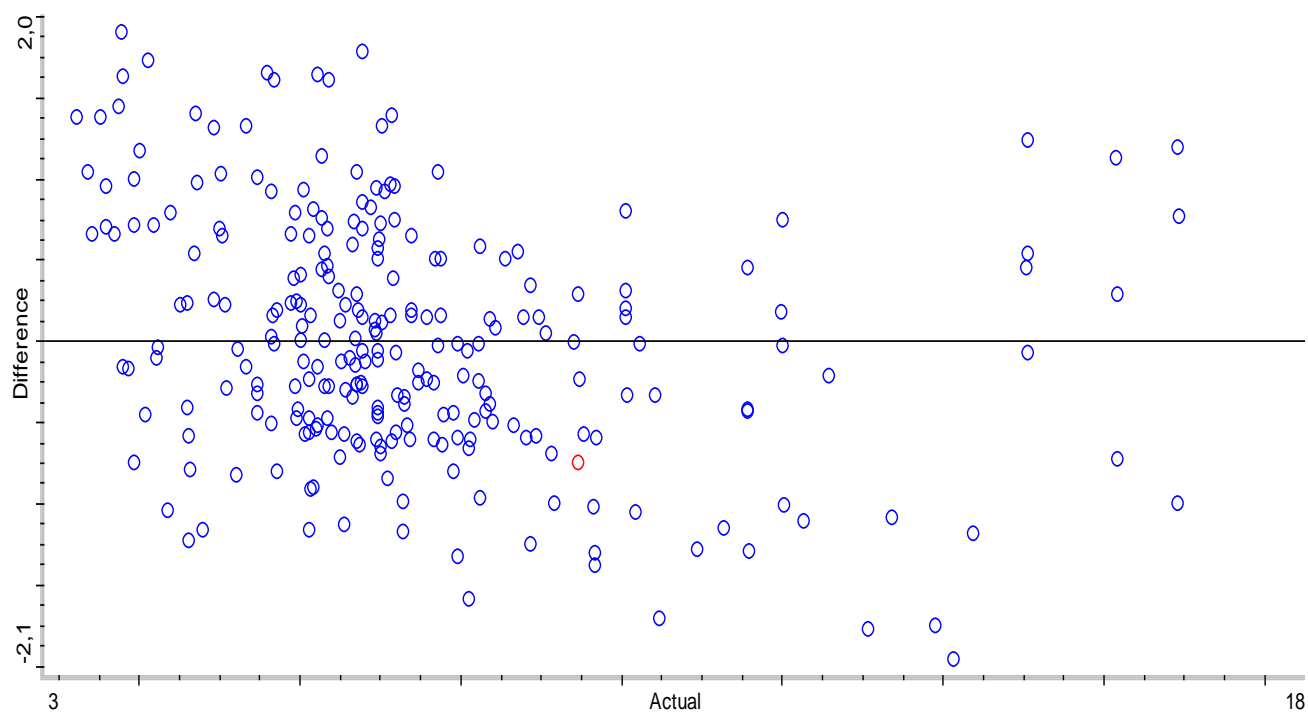
Byl vytvořen kalibrační model pro predikci obsahu inhibitorů trypsinu u polního hrachu metodou FT-NIRS. Metoda bude využitelná při popisu genových zdrojů hrachu, ale zejména při šlechtění, kdy je potřeba provádět screeningové vyhodnocení velkého množství vzorků. Kalibrační model bude každoročně doplňován o další naměřené hodnoty, aby byly pokryty vlivy ročníku a aby byl doplněn o standardy s vyšším obsahem TI.



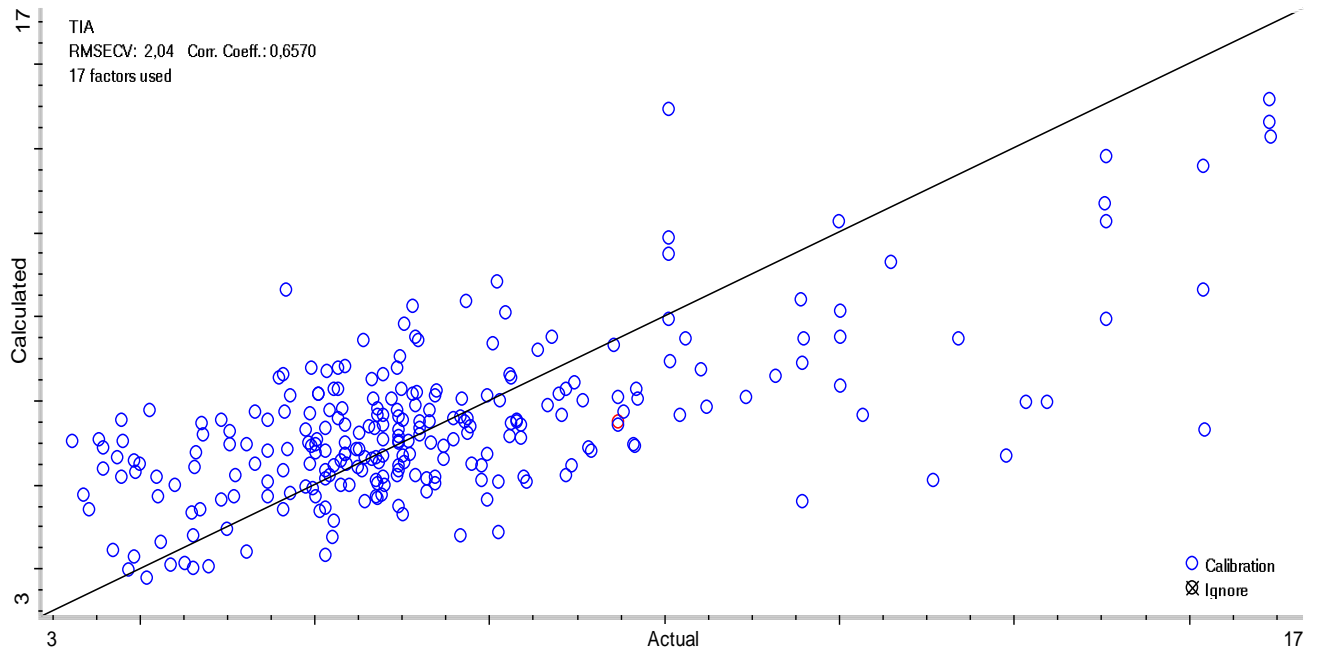
Obr. 1: FT-NIRS spektra vzorků hrachu



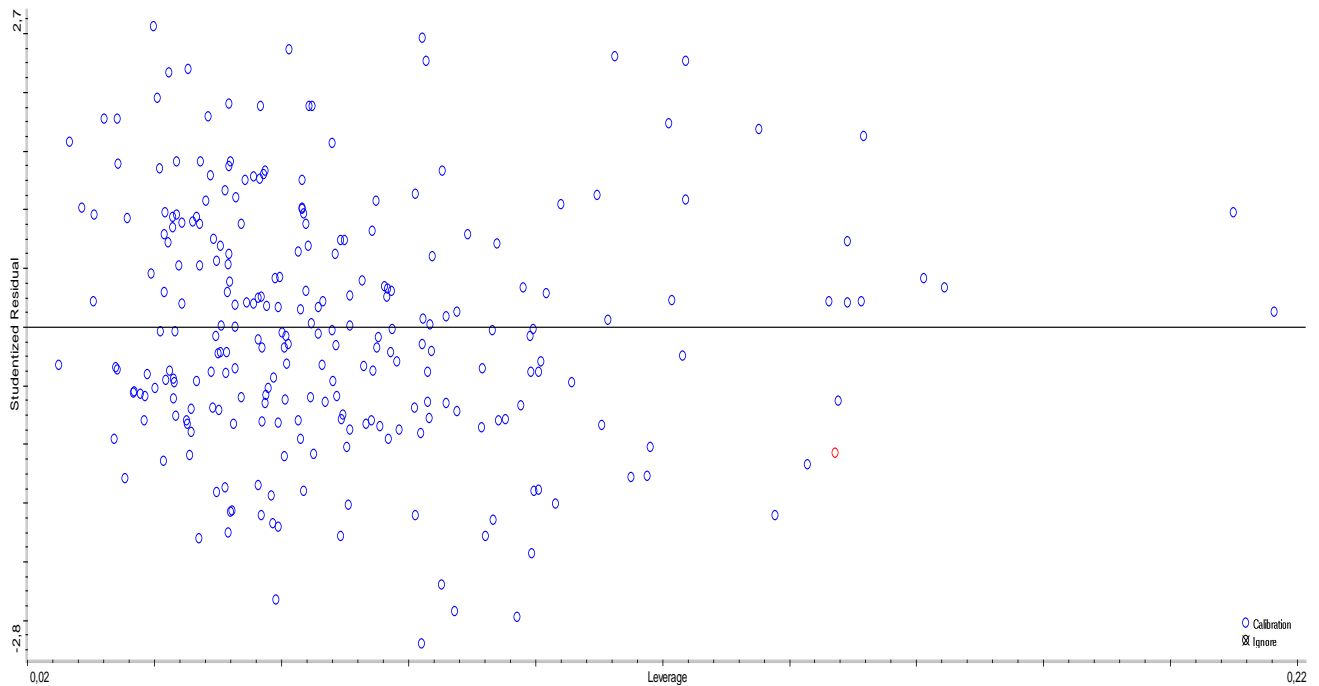
Obr. 2: Korelace predikovaných (NIRS) a laboratorních hodnot obsahu TIA u polního hrachu, korelační koeficient  $R = 0,96$ , RMSEC = 0,755



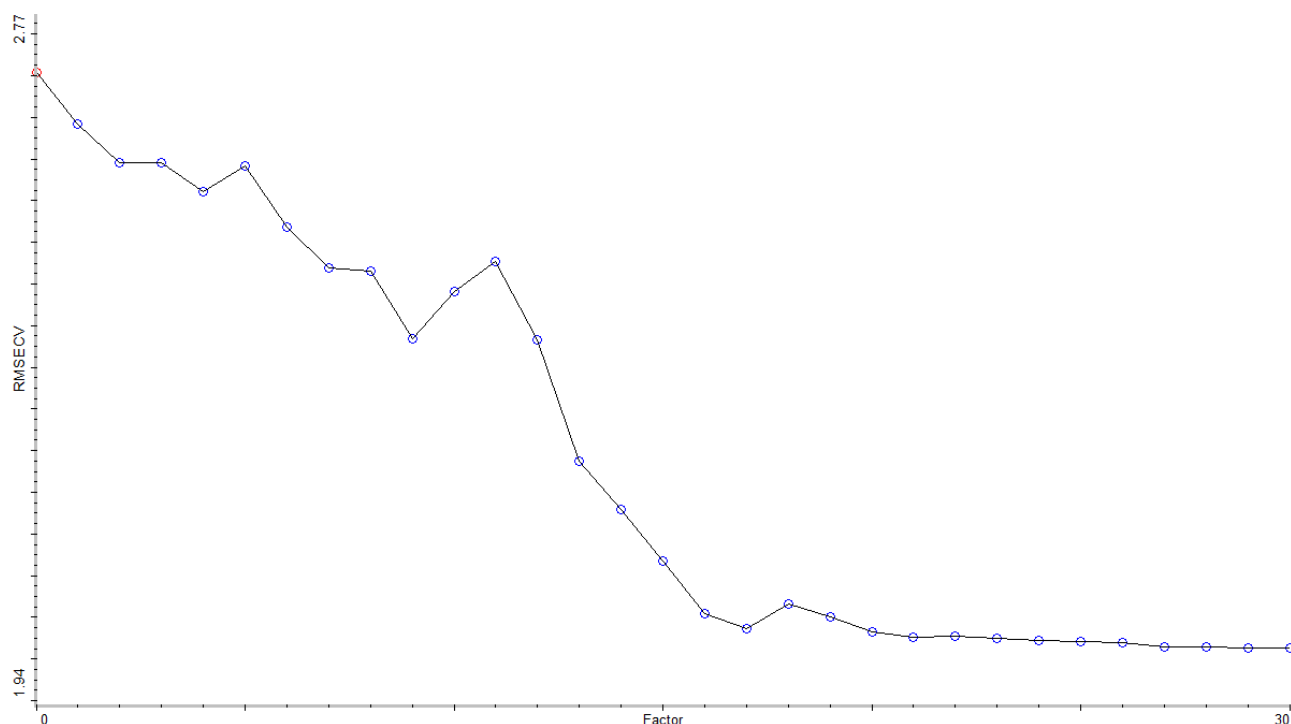
Obr. 3: Odchyly predikovaných (NIRS) a laboratorních hodnot obsahu TIA u polního hrachu



Obr. 4: Křížová validace modelu pro predikci TIA, korelační koeficient  $R_{CV} = 0,657$ ,  $RMSECV = 2,04$



Obr. 5: Validace Leverage



Obr. 6: Diagnostika PRESS

### Použitá literatura

- Bacon J.R., Wanigatunga S.C.D.R., An J., Fenwick G.R. (1995): A microassay for the analysis of trypsin inhibitor activity in peas, *Food chemistry*, 52: 77-80
- Endlová L., Vrbovský V., Navrátilová Z., Tenkl L. (2017): Využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti ve šlechtění řepky olejky. *Chemické listy č. 111*, s. 524-530
- Horáček J. (2008): Optimalizovaná metodika pro stanovení inhibitorů trypsinu u hrachu (*Pisum sativum L.*), Uplatněná metodika, schváleno 2.12.2008, ISBN 978-80-903868-3-9
- Page D., Quillien L., Duc G. (2000): Trypsin inhibitory activity measurement: simplifications of the standard procedure used for pea seed, *Crop Sci.* 40: 1482-1485

### Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory MZe ČR, číslo projektu MZE-RO1018.

### Kontaktní adresa:

Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.  
Agritec Plant Research, s.r.o.  
Zemědělská 2520/16  
78701 Šumperk  
[horacek@agritec.cz](mailto:horacek@agritec.cz)



## **Analýza polymorfismu mikrosatelitových markerů v TILLING populaci**

Analysis of microsatellite marker polymorphism in the TILLING population

Jozová E.<sup>1</sup>, Vrbovský V.<sup>2</sup>, Horáček J.<sup>3</sup>, Čurn V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakulta zemědělská a technologická JU, České Budějovice

<sup>2</sup>OSEVA PRO s.r.o,

<sup>3</sup>AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.

### **Abstrakt**

Šlechtění hospodářských plodin je dlouhodobý proces, který je velmi náročný na čas, prostor, pracovní sílu a zejména finance. Záměrem šlechtitelů je tento proces zkrátit. Jednou z možností je využití mutagenů. Pro testování účinnosti chemomutagenu byly použity dvě odrůdy druhu *Papaver somniferum* a 6 odrůd nebo šlechtitelských materiálů *Sinapis alba*. Osivo bylo ošetřeno běžným mutagenem EMS v různých koncentracích. Celkem bylo hodnoceno 262 vzorků včetně neošetřených kontrol. Pro hodnocení možných změn v genotypu bylo použito 17 mikrosatelitových markerů, které jsou ověřené předchozími výzkumy. Na základě analýz bylo identifikováno 52 vzorků s odlišnými velikostmi alel oproti vzorkům kontrolním. Účinky mutagenese mají na změny v genomu větší vliv u druhu *S. alba* než u druhu *P. somniferum*.

**Klíčová slova:** mák, mutagenese, molekulární markery

### **Abstract**

Breeding of agricultural crops is a long-term process that is very demanding in terms of time, space, manpower and especially finances. The intention of the breeders is to shorten this process. One possibility is the use of mutagens. Two varieties of *Papaver somniferum* and six varieties of *Sinapis alba* were treated with EMS mutagen to test the effectiveness of this mutagen. A total of 262 samples including untreated controls were evaluated. To evaluate possible changes in the genotype 17 microsatellite markers verified by previous research were used. Based on the molecular analyses 52 samples (offsprings) with different allele sizes were identified compared to the control sample. The mutagen had a greater effect on the genemone changes in *Sinapis alba*. The molecular data will be compared with the phenotypic characteristics in further research.

**Keywords:** Poppy seed, mutagenesis, molecular markers

### **Úvod**

Pěstování olejnin má v České republice dlouhodobou tradici. Mezi nejpěstovanější olejninu u nás můžeme zařadit řepku olejku, mák setý, slunečnici, hořčice, len olejný a sóju luštinatou. Zejména mák setý (*Papaver somniferum* L.) má dlouho tradici pěstování ve střední Evropě. Jeho pěstování bylo a stále je rozšířeno zejména mezi slovanskými národy (Fejér, 2015). Největším pěstitelem a vývozcem potravinářského máku je dlouhodobě Česká republika. Tradičně jsou v našich podmínkách pěstovány zejména české a slovenské nízkomorfinové modrosemenné odrůdy (ÚKZUZ, 2021). V posledních pár letech si ovšem začínají díky šlechtění hledat své místo na trhu i odrůdy s jinou barvou semen, např. okrová (Redy), červená, šedá, či bílá. Právě bělosemenné odrůdy (Orel, Racek) jsou vyhledávané pro svou specifickou chuť, v roce 2020 byly tyto odrůdy vysety přibližně na 1500 ha. Tuzemské produkce je exportováno až 90 %, zejména do slovanských zemí, pro jejichž kuchyni je mák tradiční surovinou (Zukalová, 2009).

Další z významných olejnin pěstovaných v ČR jsou hořčice. Nejběžněji pěstovaným druhem je hořčice bílá (*Sinapis alba* L.). Dalšími druhy pak mohou být hořčice černá (*Brassica nigra*) a

hořčice sarepská (*Brassica juncea*). Hořčice jsou pěstovány zejména pro potravinářské účely, jako pícnina a v poslední době také jako oblíbená plodina pro zelené hnojení. V poslední dekádě se osevní plochy hořčice pohybují kolem 15 tis. ha (Šindelková, 2020).

Díky velkému množství odrůd a intenzivnímu šlechtění jen na některé parametry dochází k efektu tzv. bottlenecku, tzn. ke zúžení genetické diverzity. Proto se hledají jiné způsoby produkce nových odrůd, než jen pomocí klasického křížení. Jednou z možností je chemická mutagenese. Mezi nejčastější chemické mutageny patří EMS (etylmetansulfát) a DES (dietylsulfát). Působení mutagenů bývá náhodný proces s nejistým výsledkem, ale tímto způsobem mohou vznikat velmi zajímavé varianty odrůd. Použití mutagenů musí být bezpečné s ohledem na lidské zdraví. Při selekci mutantních rostlin je nutné ve stejných podmínkách pěstování držet i kontrolní odrůdy nevystavené účinkům mutagenů, aby byl možný cílený výběr na žádoucí mutaci změněné znaky. Fenotypové vlastnosti mutantů lze často odhalit až v generaci M1, tedy po samoopylení, kdy jsou rostliny homozygotní (Ehrenbergerová, 2014). Další možností je využití molekulárních markerů, díky jejichž pomoci lze změny v genomu odhalit i v počátečních fázích růstu rostliny nedestruktivní metodou.

Cílem této práce bylo zhodnotit, zda došlo v průběhu vystavení odrůd mutagenním účinkům ke změně ve struktuře genomu několika odrůd u máku setého a hořčice bílé. Tyto změny byly hodnoceny pomocí mikrosatelitových markerů.

### **Materiál a metodika**

Semena máku byla vystaveno účinkům mutagenní látky 1% EMS (etylmethansulfonát). Jedná se o mutagenní sloučeninu produkující náhodné mutace v genetickém materiálu substitucí nukleotidů (Sega, 1984). Pro identifikaci případných změn v genetické struktuře semen máku setého ošetřených mutagenem byla vybrána potomstva dvou odrůd: OP-P-19 (80 vzorků) a AMETISZT (61 vzorků). Od každé odrůdy byl vždy jeden kontrolní vzorek, který nebyl vystaven účinkům mutagenů. U hořčic bylo testováno 6 různých genotypů druhu *Sinapis alba*: odrůdy Warta, Salsa a Silenda a šlechtitelské materiály 6823, 6824 a 6825. Semena hořčice byla vystavena různým koncentracím EMS, od 0,6% do 4%. U hořčic bylo hodnoceno celkem 121 potomstev.

Před samotným ošetřením byla semena nemočena 18 hodin ve vodě. Poté byla přebytečná voda slita a k osivu byl přidán roztok EMS o různé koncentraci. Baňky s osivem byly zabaleny do alobalu, aby bylo zamezeno přístupu světla a umístily se na třepačku. EMS se nechal působit po dobu 1 – 2 hodin při laboratorní teplotě. Po této době byl roztok EMS slit a osivo se umístilo pod proud tekoucí vody po dobu 30 minut, tak aby došlo k důkladnému vymytí mutagenů.

Pro hodnocení změn v genomu byl veškerý materiál dodán ve formě semen generace M2 v množství od 10-20 ks u máku, v případě hořčice to bylo 1-5 semen, dle možností šlechtitelů. Tento materiál byl umístěn do výsevniho substrátu. Rostliny se nechaly vyrůst do velikosti děložních lístků, přičemž tento proces trval přibližně 14 dní.

Po této době, byly odebrány lístky jednotlivě dle variant do papírových sáčků a vzorky byly uloženy cca 7 dní v silicagelu. Díky tomu došlo k pomalému a šetrnému vysušení materiálu. Po jednom týdnu byly vysušené rostlinky umístěny do 2 ml mikrozkušavky, byly přidány skleněné kuličky a materiál byl homogenizován v automatické homogenizátoru Beat Ruptor 96 (Omni International Inc., USA) po dobu 30 sec při maximální frekvenci.

Z takto připraveného materiálu byla izolována DNA pomocí modifikované metodiky pro izolaci DNA z rostlinného materiálu (Doyle, 1991). Tento typ izolace je pro analýzu ověřený a vhodný, díky vysoké koncentraci a čistotě DNA (Jozová, 2020).

Jako marker pro identifikaci mutantního osiva byly použity mikrosatelitové markery. Celkem bylo použito 10 specifických mikrosatelitových markerů pro mák: Psom4, Psom17\_B, OPEST026\_B, OPEST081c, OPEST053, OPEST106, SSR001, SSR57\_A, SSR57\_B, psSSR69 (Ondreičková 2017, Vašek 2019), a 7 specifických mikrosatelitových markerů pro hořčice:

BoREM1b, BoIAB19TF, BoPC34, P381, D3, P7 a P35 (Louarn , 2007, Cui 2008). Při analýze pro mák bylo postupováno podle metodiky Jozová a kol. (2020). U hořčic byl postup následující. Celkový objem reakce 10  $\mu$ l. Složení roztoku: 1x reakční pufr (75 mM Tris–HCl, pH=8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs), 10 pmol každého primeru, 0,5 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ), 2x BSA a 50 ng templátové DNA. Amplifikace proběhla na termocycleru Biometra TProfessional při následujícím teplotním profilu: počáteční denaturace 5 min při 94 °C, 31 cyklů v profilu 1 min 95 °C, 1 min 52-59 °C (dle použitého primeru), 1 min 72 °C a konečná elongace 5 min 72 °C. Výsledky PCR amplifikace byly vizualizovány pomocí fragmentační analýzy s využitím fluorescenčně značených forward primerů. Vyhodnocení probíhalo v programu GeneMapper™ (ThermoFisher Scientific, USA).

## Výsledky

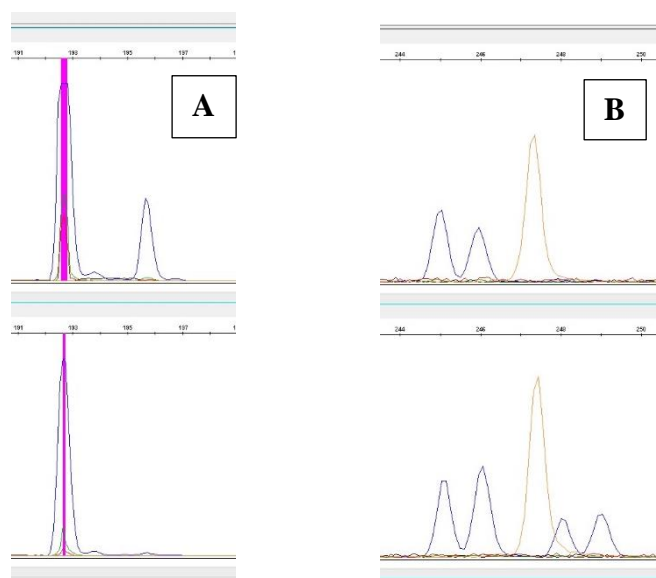
Při odebírání vzorků bylo pozorováno, že některé odrůdy výrazně hůře klíčí, tento jev byl pozorován zejména u odrůd druhu *S. alba*. Výsledky klíčení jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Charakteristika klíčivosti odrůd po ošetření chemomutagenem

druh	genotyp	% EMS	počet potomstev	vzešlo potomstev	% vzcházení
<i>Papaver somniferum</i>	OP-P-19	1	81	79	97,5
	Ametizst	1	60	60	100
<i>Sinapis alba</i>	Warta	0,6	85	76	89,4
	Salsa	0,6	9	8	88,9
	Silenda	1,5	35	20	57,1
	6823	4	1	1	100
	6824	2	32	11	34,4
	6825	2	10	7	70
<b>celkem</b>			<b>313</b>	<b>262</b>	<b>83,7</b>

Podle výsledků bylo klíčení různých variant velmi odlišné, od 34,4% u genotypu 6824 druhu *S. alba* až po 100% vzcházivost u genotypu Ametizst druhu *P. somniferum* a genotypu 6823 druhu *S. alba*. Průměrná vzcházivost byla 83,7 %, přičemž jako ideální klíčivost u materiálů ošetřených chemomutagenem je 75 %. Této hodnoty dosáhlo 5 variant, oba genotypy druhu *P. somniferum* (OP-P-19 a Ametizst) a 3 genotypy *S. alba* (Warta, Salsa a 6823).

Po odběru materiálu a extrakci DNA byla provedena PCR analýza pro mikrosatelitové markery dle výše uvedené metodiky. Amplifikace proběhla standardním způsobem u všech variant obou druhů. U druhu *P. somniferum* bylo celkově amplifikováno 31 alel u deseti mikrosatelitových markerů, u druhu *S. alba* to bylo 23 alel pro sedm mikrosatelitových markerů. Obrázky 1A a 1B zobrazují ukázkou amplifikací u kontrolního a mutovaného vzorku.



Obrázek 1 Ukázka amplifikace mikrosatelitových markerů

Obrázek 1A zobrazuje velikost alel pro mikrosatelitový primer OPEST106. Na spodní části obrázku je zobrazena alela u kontrolní vzorku odrůdy OP-P-19 o velikosti 192 bp. V horní části je vzorek č. 1/137, u kterého jsou jasně patrné dvě alely o velikosti 192 a 195 bp. Obrázek 1B zobrazuje velikost alel pro mikrosatelitový primer BoREM1b. Na horní části obrázku je kontrolní vzorek odrůdy Warta s velikostí alel 245 bp, v dolní části je ošetřený vzorek, u kterého se amplifikovaly alely o velikostech 245 a 249 bp.

Alely všech variant byly vždy porovnány s kontrolním vzorkem, který nebyl ošetřen. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Charakteristika genetické odlišnosti

druh	genotyp	% EMS	počet analyzovaných potomstev	geneticky odlišných	% odlišnosti	variabilních markerů
<i>Papaver somniferum</i>	OP-P-19	1	79	8	10,1	7 z 11 *
	Ametizst	1	60	4	6,7	5 z 12 *
<i>Sinapis alba</i>	Warta	0,6	76	19	25	4 z 8
	Salsa	0,6	8	5	62,5	4 z 8
	Silenda	1,5	20	9	45	4 z 8
	6823	4	1	0	0	0 z 8
	6824	2	11	6	54,5	6 z 8
	6825	2	7	1	14,3	1 z 8
<b>celkem</b>			<b>262</b>	<b>52</b>	<b>19,8</b>	

\* U máku nedochází vždy k amplifikaci všech markerů u jednotlivých odrůd, proto je celkový počet markerů odlišný.

U amplifikace alel byly výrazné rozdíly jak mezi druhy, tak i mezi jednotlivými opakováními u všech variant. U druhu *P. somniferum* bylo rozdílných 6,7 respektive 10,1 %, pro druh *S. alba* se procento odlišností v opakování pohybovalo od 0 do 62,5 %. Tyto rozdíly mohou být způsobeny koncentrací chemomutagenu, vyrovnaností odrůdy, ale také počtem opakování ve variantě, žádná z těchto hypotéz ovšem není jednoznačně prokazatelná. Co je ovšem prokazatelné, že u druhu *P. somniferum* nedochází po ošetření chemomutagenem k tak výrazné

změně v genomu jako je to u druhu *S. alba*. Z celkového počtu 262 opakování bylo 52 geneticky odlišných, což je 19,8 %.

### Diskuze

Mutagenézi se ve své studii zabýval také Sikora (2011), který porovnával několik chemických mutagenů a jejich působení na různé hospodářské plodiny. Vlivy mutagenů zkoušel několika screeningovými metodami. Podobný výzkum prováděli i Walkowiak a Ogrodowczyk (2013), kteří zjišťovali ovšem pouze změny v obsahu morfinu v makovině u odrůdy Lazur, nikoliv však změny ve struktuře celého genomu. Metoda hodnocení pomocí mikrosatelitových markerů ovšem v jejich pokusech zahrnuta nebyla. Využití mikrosatelitů ve svých pokusech ale používali např. Kostova a kol. (2008), kteří hodnotili genetickou diverzitu u 12 mutantních linií druhu *Zea mays*. Pro identifikaci použili 18 mikrosatelitových markerů. Huang a kol. (2016) u 270 mutantů druhu *Glycine max* použili chemomutagenu EMS i metodu ozařování gama zářením. Kromě genotypových změn hodnocených 82 páry SSR markerů, byla v této studii provedena i analýza fenotypová. Ve všech výše uvedených pokusech došlo prokazatelně ke změnám nejen na úrovni fenotypu, ale také na úrovni genotypu.

### Závěr

Pro identifikaci změn v genomu u semen ošetřených 0,6 - 4% roztokem EMS mutagenu bylo použito celkem 17 mikrosatelitových markerů, které jsou běžně využívány pro hodnocení genetické variability u odrůd máku setého a hořčice bílé. Celkově bylo porovnáváno 262 potomstev včetně kontrolních neošetřených vzorků. Na základě výsledků z fragmentační analýzy bylo zjištěno, že v případě druhu *P. somniferum* bylo od kontrolních vzorků odlišných 12 potomstev z celkového počtu 139 potomstev. U druhu *S. alba* byly tyto hodnoty velmi rozdílné. Z celkové počtu 123 potomstev bylo odlišných 40 vzorků, tzn. téměř třetina všech hodnocených vzorků. Vliv mutagenéze má tedy na druh *S. alba* jednoznačně větší vliv, než na druh *P. somniferum*. Mikrosatelitové markery se ukázaly jako vhodný nástroj nejen při identifikaci odrůd, ale i při identifikaci možných změn v genomu odrůd vystavených mutagenním účinkům. V kombinaci s hodnocením dalších parametrů jako jsou například fenotypové vlastnosti, nebo nutriční hodnoty mohou díky tomu vzniknout nové unikátní odrůdy.

### Použitá literatura

- Doyle, J., 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ehrenbergerová, J., 2014. Odrůdy, osivo a sadba. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta. 106 s. ISBN 978-80-7509-003-4
- Fejér, J. 2015. Morfologicko-biologická diverzita druhu mak siaty (*Papaver somniferum* L.) a jej hodnotenie. Grafotlač, Prešov. ISBN 978-80-555-1334-8
- Huang, Y., Deng, X., Wan, H. 2016. Mutagenesis and SSR markers of soybean cultivar Huaxia, *Chines Journal of Oil Crop Sciences*, 2016, 38 2: 159-166. doi: 10.7505/j.issn.1007-9084.2016.02.004
- Jozová, E., Stará, M., Horáček, J., Ludvíková, M., Čurn, V., 2020. Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů. Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice.
- Kostova, A., Todorovska, E., Christov, N., Hristov, K., Atanassov, A. 2006. Assessment of Genetic Variability Induced by Chemical Mutagenesis in Elite Maize Germplasm via SSR Markers, *Journal of Crop Improvement*, 16:1-2, 37-48, doi: 10.1300/J411v16n01\_03

- Ondreičková, K., Mičianová, V., Muchová, D., Klčová, L., Hudcovicová, M., Havrentová, M., Mihalik, D., Krai, J., 2017. Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia*. 72(6): 587-594.
- Sega, G.A. 1984. "A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate". *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. Elsevier BV. 134 (2-3): 113-142. doi:10.1016/0165-1110(84)90007-1
- Sikora, P. Chawade, A., Larsson, M, Olsson, J., Olsson, O. 2011. Mutagenesis as a Tool in Plant Genetics, Functional, and Breeding. *International Journal of Plant Genomics*. doi:10.1155/2011/314829
- Šindelková, T. 2020. Situační a výhledová zpráva. Olejniny. Ministerstvo zemědělství. Praha. ISBN: 978-80-7434-614-9
- Vašek, J., Číhalová, D., Melounová, M., Svoboda, P., Vejl, P., Štikarová, R., Vostrý, L., Kuchtová, P., Ovesná, J., 2019. New EST-SSR Markers for Individual Genotyping of Opium Poppy Cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants*. 9(1):10.
- Walkowiak, M., Ogrodowczyk, M., 2013. Optimalizace podmínek mutagenese k získání nové variability máku (*Papaver somniferu* L.). Sborník konference Prosperující olejniny. 12.-13. 12. 2013, ČZU v Praze
- Zukalová H. a kol. (2009): Perspektiva odbytu semen máku a jeho rizika, *Úroda* 2/2009, str. 24 - 26.

## Dedikace

Tato studie byla vytvořena díky podpoře projektu NAZV QK1810391, NAZV QK1910225 a Grantová agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 080/2022/Z).

## Kontaktní adresa:

Ing. Eva Jozová, Ph.D.  
Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií  
Fakulta zemědělská a technologická  
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice  
[jozovae@fzt.jcu.cz](mailto:jozovae@fzt.jcu.cz), 387772937

## Validace molekulárních markerů pro identifikaci plísně *Hyaloperenospora parasitica* u hospodářsky využívaných plodin druhu *Brassica oleracea*

Validation of molecular markers for the identification of *Hyaloperenospora parasitica* in commercial crops of *Brassica oleracea*

Jungová M.<sup>1</sup>, Petrželová I.<sup>2</sup>, Ovesná J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

<sup>2</sup>Crop research Institute, Olomouc

### Abstrakt

Technologie molekulárních markerů je integrována do stávajících programů šlechtění rostlin a vybrané rezistentní genotypy podle molekulárních markerů mohou být použity pro hybridizaci. Tato studie hodnotila asociaci molekulárního markeru *BODMI* s odolností vůči plísni *Hyaloperenospora parasitica* u 24 genotypů *Brassica oleracea*. Marker nevykazuje délkový polymorfismus mezi rezistentními a náchylnými varietami. Avšak sekvenace uvedených vzorků poukázala na 96% variabilitu tandemové sekvence ATC, nacházející se ve 3. intronu glukosinolátové dráhy druhů *Brassica*, která by mohla být v dalších studiích použita jako molekulární marker.

**Klíčová slova:** Brukvovité, sekvenování, houbové choroby, mikrosatelity, šlechtitelství

### Abstract

Molecular marker technology is integrated into existing plant breeding programmes, and selected resistant genotypes based on molecular markers can be used for hybridisation. This study evaluated the association of *BODMI* molecular marker with resistance to *Hyaloperenospora parasitica* for set of 24 *Brassica oleracea* genotypes. The marker does not show length polymorphism between resistant and susceptible varieties. However, sequencing of these samples indicated a 96% variability in the tandem ATC sequence located in the 3rd intron of the glucosinolate pathway of *Brassica* species, which could be used as a molecular marker in future studies.

**Key words:** Brassicaceae, sequencing; fungal diseases; microsatellites; plant breeding

### Úvod

Rod *Brassica* zahrnuje tři hlavní pěstované druhy, *B. nigra*, n = 8; *B. oleracea*, n = 9; a *B. rapa*, n = 10, z nichž všechny jsou diploidní. Tyto druhy zahrnují velmi rozmanité plodiny, označované jako morfotypy, které vznikly v důsledku umělého výběru během domestikace a šlechtění a navzájem se odlišují svou morfologií (Kim et al. 2018). *Brassica oleracea* L. (*B. oleracea*) je pak jedním z nejdůležitějších druhů čeledi Brassicaceae, protože zahrnuje mnohé z hospodářsky významných druhů zeleniny na světě (Bayer et al. 2019). Variety *B. oleracea* zahrnují mnoho oblíbených a výživných zeleninových plodin včetně zelí, květáku, brokolice, růžičkové kapusty, kedlubny a kapusty. Tyto variety jsou však náchylné k řadě patogenů, *Plasmiodiophora brassicae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erysiphe cruciferarum*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* a také *Hyaloperenospora parasitica* (Lv et al. 2020). Plíseň, způsobená obligátním houbovým parazitem *Hyaloperenospora parasitica* (*H. parasitica*) Pers.: Fr., jejíž taxonomicky správný název u *Brassica* spp. je *Hyaloperonospora brassicae*, patří mezi nejničivější choroby plodin *B. oleracea*. Tato choroba je rozšířena po celém světě a lze ji nalézt u mnoha hospodářsky významných druhů u čeledi Brassicaceae. Například brokolice může být náchylná k infekci během všech růstových stádií, ale infekce rostlin ve stádiu děložních lístků je nejškodlivější. Pokud jsou infikovány děložní listy a mladé tkáně, sazenice

často zakrní nebo uhyne a sníží se významně výnos plodin (Giovannelli et al. 2002). Choroba také způsobuje defoliaci u dospělých rostlin na poli, což snižuje nejen výnos, ale i kvalitu hlávek (Jensen et al. 1999) a za příznivých klimatických podmínek se pak může stát epidemií (Coelho a Monteiro 2003). Infekce sazenic je velmi častá hlavně ve školkách, zejména ve sklenících, kde se rostliny sázejí nahusto. Za příznivých podmínek může *Hyaloperonospora parasitica* (*H. parasitica*) infikovat až 50–60 % semen zelí a snížit tak sklizeň o 16–20 % (Saharan et al. 2017). V Číně je tato plíseň zodpovědná až za 90% ztrátu výnosu čínského zelí (*B. rapa*) (Yu et al. 2009).

Aplikace fungicidů může poskytnout určitou kontrolu nad touto plísní, ale šlechtění nových rezistentních kultivarů nabízí praktičtější a dlouhodobé řešení. Několik zdrojů rezistence k této plísní bylo identifikováno u druhu *B. oleracea*, a to jak u semenáčků (Natti et al. 1967; Hoser Krauze et al. 1995; Jensen et al. 1999; Farnham et al. 2002; Giovannelli et al. 2002), tak i ve fázi dospělých rostlin (Mahajan et al. 1995; Coelho 1998; Farinhó et al. 2007; Coelho and Monteiro 2018).

Technologie molekulárních markerů je integrována do stávajících programů šlechtění rostlin (molekulární šlechtění), což umožňuje výzkumníkům rychleji a přesněji přistupovat ke genům odolnosti vůči chorobám, přenášet je a kombinovat. Přístup molekulárního šlechtění pomáhá při včasné generační detekci alel rezistence v jakémkoli prostředí dlouho předtím, než je znak fenotypově vyjádřen, což dodává vysokou důvěru v selekci. Vybrané genotypy mohou být použity pro hybridizaci ve stejné sezóně, čímž se urychlí vývoj odrůd pro odolnost vůči chorobám (Shaw et al. 2021). Většina genů rezistence je přítomna ve větších nebo menších shlučích místo náhodné distribuce na chromozomech. V současnosti, je nejefektivnější metodou identifikace rezistentních rostlin ve šlechtitelství, selekce za pomoci molekulárních markerů. SSR (Short Sequence Repeat) markery, jsou sekvence repetitivní DNA složené z opakujícího se motivu o daném počtu nukleotidů (obvykle 2 až 5). Tento opakující se motiv je v sekvenci přítomen mnohokrát, přičemž počet jeho opakování je unikátní pro každého jedince (Powell et al. 1996). Vzhledem ke konzervované povaze lemujících sekvencí, mohou být použity k rozlišení délkového polymorfismu mezi příbuznými druhy. Bylo popsáno velké množství SSR markerů (Lowe et al. 2004; Piquemal et al. 2005; Gao et al. 2007; Carlier et al. 2012; Sigh et al. 2015; Saha et al. 2020). Jeden z těchto markerů, *BODMI* (Gao et al. 2007), který souvisí s rezistencí vůči *H. parasitica* u juvenilních rostlin *B. oleracea*, byl vybrán a testován v této studii. Cílem studie bylo zjistit, zda testovaný *BODMI* marker (Gao et al. 2007) dokáže rozlišit náchylné a rezistentní genotypy variet *B. oleracea* testovaných ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci.

## **Materiál a metody**

### ***Rostlinný materiál a standardy***

Na analýzy DNA, byly použity listy variet *B. oleracea* (květák, brokolice, zelí, růžičková kapusta, kedlubna a kapusta), které byly testovány na rezistenci vůči *Hyaloperonospora parasitica* podle metody Coelho a Monteiro 2003, ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci.

Genotypy standardů *B. oleracea* convar. *Italica*: rezistentní HRIGRUOL87125 a náchylný HRIGRUOL87098 (Farinhó et al. 2007; Carlier et al. 2012), byly laskavě poskytnuty genovou bankou z Warwicku (Warwick Genetic Resources Unit - <https://warwick.ac.uk>). Dalším standardem byla: rezistentní Couve Algarvia a náchylná Couve de Corte (*B. oleracea* convar. *Acefala*). Laskavě poskytnuté Dr. Paulou Santhos Coelho (University of Catania, Portugalsko).

### ***Hodnocení fenotypu interakce***

Testované rostliny, kultivované za kontrolovaných podmínek, byly naočkovány ve stádiu děložních lístků pěti rasami izolátu *H. parasitica*. Následně bylo provedeno symptomatické hodnocení na základě jejich rezistentní a náchylné odpovědi. Fenotyp interakce byl hodnocen



podle modifikované metody popsané Coelho and Monteiro 2003. Následně byl fenotyp interakce rozdělen dle stupnice zvyšující se citlivosti, s ohledem na sporulaci patogenu a reakci hostitele. Rostliny v 1. třídě byly zcela rezistentní, ve 2. třídě byly rezistentní, ve 3. třídě byly neúplně rezistentní a rostliny ve 4. třídě byly náchylné.

**Tabulka 1** Sekvenované vzorky 14 rezistentních a 9 náchylných vzorků odrůd *B. oleracea*

Rezistentní vzorky		sekvence	motiv
HRIGRUOL87125	brokolice standard Warwick	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
Couve Algarve	kapusta standard Portugalsko	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800028	květák Delta	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800006	květák Bolero	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800035	květák Stupický obrovský	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800279	brokolice Cavolo Cavolinaizza	ATCATCATCATCAATTCATCATC	4x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800253	kedlubna Cavolo	ATCATCATCAATTCATCATC	3x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800254	kedlubna Cavulu Augusto	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800084	zelí - Savoy <i>B.O. sabauda</i>	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800088	kapusta <i>B.O. acephala</i>	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800285	kapusta <i>B.O. tronchuda</i> Rabicu	ATCATCATCAATTCATCATC	3x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800226	růžičková kap. C.d Bruxelles MN	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800067	<i>Brassica dreanensis</i>	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800076	<i>Brassica villosa</i>	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
<b>Náchylné vzorky</b>			
HRIGRU00OL87098	brokolice standard Warwick	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
Couve de Corte	kapusta standard Portugalsko	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800089	květák z Itálie	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800105	brokolice z Itálie	ATCATCATCAATTCATC	3x(ATC) AATTC 1x(ATC)
B1800080	kedlubna z Itálie	ATCATCATCAATTCATC	3x(ATC) AATTC 1x(ATC)
B1800049	zelí Landrace (Parnica)	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800126	kapusta Dwarf green curled	ATCATCATCAATTCATCATC	3x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800204	růžičková kapusta Ama	ATCATCATCAATTCATCATC	3x(ATC) AATTC 2x(ATC)
B1800113	<i>Brassica macrocarpa</i>	ATCATCAATTCATCATC	2x(ATC) AATTC 2x(ATC)

### Molekulární analýzy

Rostlinná genomická DNA byla extrahována a 50 ng/μl roztoku DNA bylo použito pro následnou PCR analýzu. Forward primer (Gao et al. 2007) byl fluorescenčně označen (5'PET). Amplifikace (PCR reakce) proběhla pomocí zařízení Applied Biosystem Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Při následujícím teplotním profilu: 15 minut denaturace a aktivace HotStarTaq DNA polymerázy při 95 °C, následováno 35 cykly (30 sekund denaturace při 94

°C, 90 sekund annealing při 60 °C, 60 sekund elongace při 72 °C a nakonec 15 minut závěrečného prodlužování ampliconu při 72 °C. Poté byla provedena fragmentační analýza pomocí ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, USA). Amplifikovaná produktová data byla analyzována a vyhodnocena pomocí GeneMarker ver. 1.8 (SoftGenetics, USA).

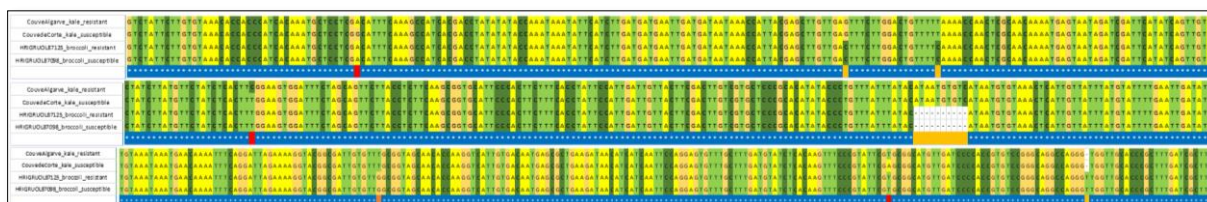
Purifikované amplicony DNA byly klonovány do kompetentních buněk JM109 High Efficiency (*E. coli*) a testovány PCR na přítomnost očekávaného inzertu pomocí *BODMI* primerů. Amplifikované produkty byly následně sekvenovány pomocí ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Údaje o amplifikovaných produktech byly analyzovány a vyhodnoceny pomocí softwaru Sequencing Analysis Software 7 (Applied Biosystems, USA).

### Statistické a sekvenační analýzy

Sekvence *B. oleracea* byly blastovány v NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Evoluční historie byla odvozena pomocí metody Maximum Likelihood a Tamura 3-parametrového modelu (Tamura 1992). Výsledný dendrogram vznikl automaticky aplikací algoritmů Neighbor-Join a BioNJ na matici párových vzdáleností odhadnutých pomocí modelu parametrů Tamura 3 a poté výběrem topologie s vyšší logaritmicou hodnotou pravděpodobnosti. Evoluční analýzy byly provedeny v MEGA X (Kumar et al. 2018).

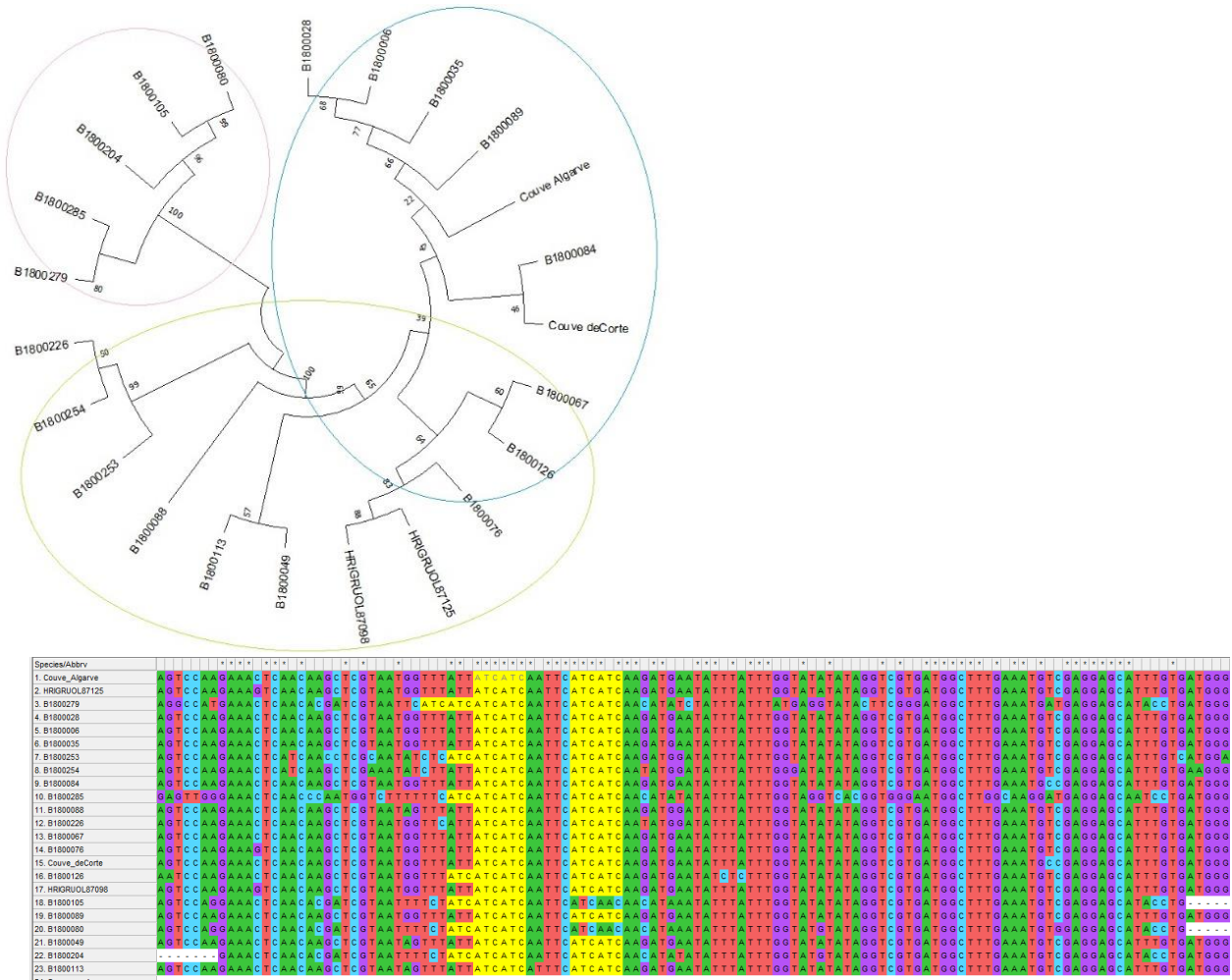
### Výsledky

Z výsledků vyplynulo, že předpokládaný SSR marker *BoDMI* produkuje amplicon o délce cca 800 bp a nelze jej multiplexovat ve fragmentační analýze ABI PRISM 3500 s dalšími běžně testovanými SSR markery o délce 150 – 450 bp. Z tohoto důvodu byly výsledné produkty 14 rezistentních a 9 náchylných variet (tab. 1) zaklonovány a osekvenovány. Sekvence standardů z univerzity ve Warwicku, byly 100% identické a nevykazovaly žádné nukleotidové změny. Naproti tomu mezi standardy z Portugalska, byla zaznamenána mírná 98% nukleotidová variabilita (obr. 1). Mezi vzorky náchylných a rezistentních variet byla zaznamenána 95 – 98% nukleotidová variabilita a zároveň zde byla objevena opakovaná tandemová sekvence ATC, která mezi varietami *B. oleracea* vykazovala 96% nukleotidovou identitu: sekvence B1800279, B1800253, B1800285; B1800105, B1800080, B1800126, B1800204 (tab.1, obr. 2). Naproti tomu, tandemová sekvence všech 4 standardů vykazovala shodu 100 % (obr. 2).



**Obrázek 1** Alignment sekvencí standardů z Warwicku a Portugalska + náchylný genotyp HRIGRU03592 (podle Petrželové) a rezistentní UNICT4448 (Coelho et al. 2018).

Výsledné sekvence byly blastovány a byla zaznamenána 98% shoda se sekvencí GSL Elong (AF399834), která je součástí genu glukosinolátové dráhy. Opakovaná mikrosatelitní tandemová sekvence ATC byla identifikována ve 3. intronu tohoto genu.

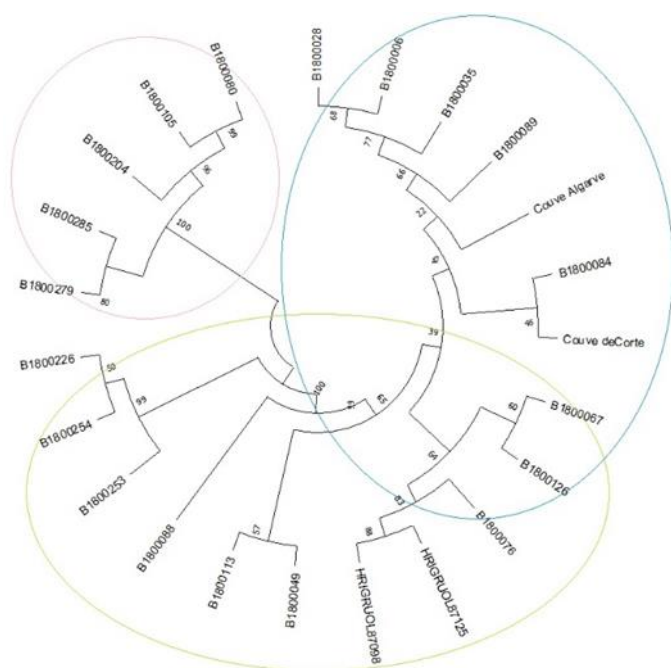


**Obrázek 2** Aligment sekvencí 14 rezistentních a 9 citlivých odrůd *Brassica oleracea* shodných se sekvencí *GSL Elong (AF399834\_2)*.

Na základě celých cca 800 bp dlouhých sekvencí byl sestaven fylogendrogram, jehož výsledky jsou patrné z obrázku č. 3. Byly vytvořeny 2 hlavní větve, přičemž do 1. skupiny patřili dva zřetelné klastry 3 náchylných a 2 rezistentních variet *B. oleracea*. Druhá skupina se rozdělila na 2 podskupiny; 1. obsahovala 4 rezistentní a 2 náchylné variety, které tvořily samostatný klastr. Třetí skupina navázala na tuto a obsahovala mix rezistentních a náchylných variet. Následovalo další klastrové propojení s 5 podshluky, které obsahovaly kombinaci 5 rezistentních a 2 náchylných variet (obr. 3).

Vzledem k tomu, že dlouhé sekvence nevykazovaly jasný patern, byly navrženy dva páry primerů:

forward\_GAAAACACTAGCTCCTCGACA a reverse\_CCAACTCGCAACAAAATGAGT, obklopující motiv ATC, které měly produkt zkrátit na 200 – 250 bp a zpřístupnit ho pro fragmentační analýzu. Primery byly testovány na výše uvedených genotypech *B. oleracea* (tab. 1), výsledky však nezaznamenaly délkový polymorfismus. Naopak výsledné produkty testovaných variet byly monomorfní a vykazovaly stejnou délku 238 bp.



**Obrázek 3.** Dendrogram sestavený na základě sekvencí (cca 800bp) variet *B. oleracea*

### Diskuze a závěr

Cílem této studie bylo otestovat SSR marker *BODM1*, odhalující rezistenci proti plísni *H. parasitica* u 23 variet *B. oleracea*. Ukázalo se, že výsledný produkt je ve skutečnosti dlouhý 800 bp a nevhodný do multiplexu používaného ve fragmentačních analýzách s ostatními markery (Carlier et al. 2012, Saha et al. 2020). Bylo rozhodnuto osekvenovat výše uvedené variety a navrhnout nový pár primerů, který produkty zkrátí na požadovanou délku. Kompletní kódující sekvence všech testovaných variet měla průměrnou délku 800bp a kódovala 46 aminokyselin. Přeložením sekvencí do proteinu, byla v NCBI blas zjištěna 100% shoda s proteinem: AAR36908.1\_*Brassica oleracea* isopropylmalate synthase, který patří do skupiny zahrnující proteiny IPMS1 a IPMS2 *Arabidopsis thaliana*, protein Glycine max GmN56 a protein *Brassica insularis* BatIMS. Výsledný alignment všech sekvenovaných sekvencí vykazoval mezi sebou menší nukleotidové změny u všech testovaných variet a v blastu byla zjištěna 98% shoda s genem glukosinolátové dráhy AF399834 *GSL\_ELONG*. Tyto změny nebyly však dostačující na to, aby dokázaly rozlišit fenotypovou interakci variet, jak je patrné z dendrogramu, který rozdělil sekvence do 2 hlavních větví a následně do několika vzájemně propojených klastrů. Nebyl zde tedy zaznamenán jednoznačný pattern, naopak spolu klastrovaly rezistentní a i náchylné variety *B. oleracea*, s výjimkou jedné z větví. Podobné výsledky zaznamenal i Singh et al. (2015). Ve výsledných sekvencích se však v rámci všech variet vyskytoval variabilní opakovaný motiv ATC. Po navržení a testování nových primerů v okolí tohoto motivu, se však nepotvrdila variabilita délkového polymorfismu testovaných variet. Změny se neprojevovaly ani při elektroforetickém zobrazení produktů původně dlouhých 800 bp a posléze ani při nové délce sekvence, která byla u všech testovaných variet 238 bp. Neprokázaný délkový polymorfismus nastal zřejmě proto, že všechny markery byly navrženy v intronu genu glukosinolátové dráhy, kde došlo pravděpodobně k náhodným změnám motivu ATC jinými nukleotidy a délka produktů tak zůstala zachována (Giovanelli et al. 2002; Yu et al. 2009). *GSL-ELONG* je homologní k At5 g23400 a je zřejmě vysoce konzervovaný v chromozomálním segmentu a nemusí být skutečným genem pro *BODM1* (Gao et al. 2005, 2006, 2007).

Otázkou pořád zůstává, zda marker, který byl navržen na dihaploidních liniích, může být použit i v případě F1 hybridů. Rostliny testované v Olomouci na rezistenci vůči rasám *H. parasitica*, mohly být genotypově variabilní, protože v experimentu nebyly použity dihaploidní linie (Giovannelli et al. 2002, Farinhó et al. 2007, Vincente et al. 2012, Carlier et al. 2012; Sigh et al. 2015; Saha et al. 2020), ale semena rostlin získaná z genových bank. Je možné, že rostliny, které měly fenotypovou interakci náchylnou, mohly být ve skutečnosti rezistentní (Coelho et al. 2012). Bylo by proto vhodné molekulárně otestovat větší množství vzorků dané variety, neboť určitá variabilita v opakovaném motivu ATC nalezena byla. Nelze tedy vyloučit *BODMI* jako marker na odhalení rezistence vůči *H. parasitica*, mohl by být využíván při sekvenování, kde skutečně vykazoval variabilitu v počtu opakování motivu ATC mezi testovanými vzorky. Důležité je, že variabilita nebyla spojena s varietami *B. oleracea*, jak by se dalo očekávat (El-Esawi et al. 2016), na druhou stranu nebyla spojena, ani s fenotypovou interakcí standardů (Coelho and Monteiro 2003). Výsledky též mohou být zkresleny faktem, že kvůli časté cizosprašnosti jsou genomy *B. oleracea* silně variabilní a polymorfní (Lv et al. 2020). To způsobuje vysokou míru heterozygotnosti a genetické variability, což znesnadňuje posléze genetické analýzy (Li et al. 2003). Dále lez říci, že ačkoli některé rezistence ve stadiu děložních listů přetrvávají až do zralosti, nelze rezistenci juvenilních rostlin použít k predikci rezistence dospělých rostlin, protože mezi těmito dvěma typy rezistence neexistuje žádná korelace (Coelho et al. 1998).

Výsledky částečně korelovaly s dříve publikovanými zprávami (Saha et al. 2008, Watson-Jones et al. 2010) a ukázaly, že *BODMI* spojený s genem *GSL-ELONG* by mohl být použit pro odvození odolnosti vůči houbovým chorobám (Wang et al. 2011). V této studii jsme identifikovali mikrosatelitní tandemový motiv ATC nacházející se ve 3. intronu genu glukosinolátové dráhy. Glukosinoláty jsou totiž jednou z možností obrany rostlin proti patogenům (Kanzaki et al. 2002), a proto je marker *BODMI* jednou z možností k rozpoznání rezistence vůči *H. parasitica* u variet *B. oleracea*, ale pouze při testování dihaploidních linií.

## Použitá literatura

- Bayer PE (2019) Variation in abundance of predicted resistance genes in the *Brassica oleracea* pangenome. *Plant Biotechnol. J.* 17, 789–800.
- Carlier JD, Alabaça CA, Coelho PS, Monteiro AA & 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, Leckie DV, Bahcevandziev K (1998) The relationship between cotyledon and adult plant resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in *Brassica oleracea*. *Acta Horticulturae*, 459, 335–342. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.459.39>
- 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, Vicente JG, Monteiro, AA & Holub EB (2012) Pathotypic diversity of *Hyaloperonospora brassicae* collected from *Brassica oleracea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 763–771.
- Coelho PS, Monteiro AA, Lope VR, Branca (2018) New sources of resistance to downy mildew in a collection of wild and cultivated brassicas. *Acta Hort.* 1202. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1202.14>
- Gao M, Li G, McCombie WR, Quiros CF (2005) Comparative analysis of a transposon-rich *Brassica oleracea* BAC clone with its corresponding sequence in *A. thaliana*. *Theor Appl Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0029-9>
- Gao M, Li G, Potter D, McCombie R, Quiros CF (2006) Comparative analysis of methylthioalkylmalate synthase (MAM) gene family and flanking DNA sequences in



- Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep 25: 592–598. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0078-1>
- 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.
- 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. 120.
- Farnham MW, Wang M, Thomas CE (2002) A single dominant gene for downy mildew resistance in broccoli. Euphytica 128:405–407
- 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.
- Hoser-Krauze J, Lakowska-Ryk E, and Antosik J (1987) The inheritance of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) leaf resistance to downy mildew-*Peronospora parasitica* (pers.) ex. Fr. Genetica Polonica 28:377–380.
- 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
- Kim C, Seol Y, Perumal S, Lee J, Waminal N, Jayakodi M, Lee S, Jin S, Choi B, Yu Y, Ko H, Choi J, Ryu K, Sohn S, Parkin I, Yang T (2018) Re-exploration of U's Triangle *Brassica* Species Based on Chloroplast Genomes and 45S nrDNA Sequences. Sci:7353. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25585-4>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- Li CX and Cowling WA (2003) Identification of a single dominant allele for resistance to black leg in *Brassica napus* 'Surpass400. Plant Breed. 122, 485–488. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2003.00863.x>
- Lv H, Fang Z, Yang L, Zhang Y and Wang Y (2020) An update on the arsenal: mining resistance genes for disease management of *Brassica* crops in the genomic era. Horticulture Research 7:34
- Mahajan V, Gill HS and More TA (1995) Inheritance of downy mildew resistance in Indian cauliflower (group III). Euphytica 86: 1–3.
- Natti JJ, Dickson MK & Atkin D (1967) Resistance of *Brassica oleracea* varieties to downy mildew. Phytopathology 51, 144-147.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2(3): 225 – 238
- Saha P (2007) Genetic analysis of downy mildew resistance and identification of molecular markers linked to resistance gene *Ppa*<sup>207</sup> on chromosome 2 in cauliflower. Theor. Appl. Genet. 115, 277–287
- 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](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7500-1_4eBook)
- Vicente 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

Wang H, Wu J, Sun S, Liu b, Chemg F, Sun R, Wang X (2011) Glucosinolate biosynthetic genes in *Brasica rapa*. Gene 487:135-142. <https://doi.org/10.1016/j.gene2011.07.021>

**Dedikace**

Práce byla uskutečněna za podpory projektu Evropské unie Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No. 774244. INFO: <https://bresov.eu>

**Kontaktní adresa:**

Ing. et Ing. Michaela Jungová, DiS.  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.,  
Drnovská 507  
161 06 Praha 6 – Ruzyně  
e-mail: [michaela.jungova@vurv.cz](mailto:michaela.jungova@vurv.cz)





## Molekulární markery odolnosti vůči fusariovému vadnutí klasu

Molecular markers linked to fusarium head blight resistance

Koláriková L., Svoboda P., Chrpová J., Ovesná J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně

### Abstrakt

Fusariové vadnutí je významné onemocnění obilovin včetně ječmene. Toto onemocnění má za následek redukci výnosu zrn a v nich akumulovány mykotoxiny jsou škodlivé jak lidem, tak zvířatům. Bylo zjištěno, že odolnost vůči tomuto patogenu je mimo jiné asociována s morfologickými znaky, jakými jsou výška rostliny nebo vlastnosti klasu. Navzdory mnohým studiím, efektivní markery pro selekci odolnějších genotypů nebyly dosud vyvinuty. V předkládané studii jsme otestovali 277 genotypů ječmene, které byly uměle infikovány suspenzí konidií *Fusarium culmorum*. Infikované rostliny byly symptomaticky hodnoceny a zkoumány z hlediska obsahu deoxynivalenolu. Jednotlivé genotypy byly rovněž testovány na přítomnost mikrosatelitních markerů. Následná korelace fenotypových a genotypových dat odhalila mikrosatelitní markery o konkrétních délkách potenciálně asociovaných s mírou odolnosti/náchylnosti k fusariovému onemocnění.

**Klíčová slova:** mikrosatelity, ječmen, fusarium, rezistence

### Abstract

Fusarium head blight (FHB) is an important disease of cereals, including barley. The disease results in the reduction of grain yield, and accumulated mycotoxins are harmful to both humans and animals. It is known that resistance to this pathogen is associated with morphological features such as plant height or spike characteristics. Despite many studies, effective markers for the selection of more resistant genotypes have not yet been developed. In the present study, we tested 277 barley genotypes that were artificially infected with *Fusarium culmorum* conidia suspension. Infected plants were symptomatically evaluated and investigated for deoxynivalenol content. Individual genotypes were also tested for the presence of microsatellites. Subsequent correlation of phenotypic and genotypic data revealed microsatellite markers of specific lengths potentially associated with the degree of resistance/susceptibility to FHB.

**Keywords:** microsatellites, barley, fusarium, resistance

### Úvod

Fusarium, patogen způsobující fusariové vadnutí klasu, má každoročně na svědomí značné ztráty jak na úrodě, tak na kvalitě obilovin včetně ječmene. Jako produkt svého metabolismu vylučují fusária mykotoxiny, které zůstávají v zrnech a z nich vyrobených potravinách a krmivech. Sekretované mykotoxiny typu DON (deoxynivalenol) pak mají negativní dopad na zdraví člověka a zvířat (Edwards, 2004). Míra odolnosti daná genetickými faktory je na rozdíl od pšenice u ječmene méně známa, resp. nejsou k dispozici genetické zdroje, které by byly zdrojem genů velkého účinku a snadno se přenášely do dalších generací. Studie odhalily, že rezistence vůči fusariu, stejně jako akumulace mykotoxinů produkovaných patogenem, je u ječmene podmíněna geny malého účinku (Zhu *et al.*, 1999), které jsou vysoce ovlivněny morfologickými znaky rostlin (Steffenson, 2003) a podmínkami prostředí. Geny malého účinku, označované jako QTL (z anglického Quantitative Trait Loci) jsou mapovány skrze identifikaci molekulárních markerů, které korelují se sledovanými kvantitativními znaky. Molekulární markery představují úseky DNA, které jsou ve vazbě z předpokládanými geny. V

minulosti byly hojně používané markery typu RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – polymorfismus délky restrikčních fragmentů a AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů, v současnosti se spíše jedná o SSR (Simple Sequence Repeats) a SNP (Single Nucleotide Polymorphism). SSR markery, označované rovněž mikrosatelity, jsou sekvence repetitivní DNA složené z opakujícího se motivu daného počtu nukleotidů (obvykle 2 až 5). Tento opakující se motiv je v sekvenci přítomen mnohokrát, přičemž počet jeho opakování (typicky 5 až 50 krát) je unikátní pro každého jedince (Powell *et al.*, 1996). Tuto skutečnost je možné využít při identifikaci rezistentních odrůd, kdy lze délkový polymorfismus jedinců asociovat s mírou odolnosti daného genotypu. Dostupná literatura nabízí hned několik mikrosatelitních markerů, které jsou v menší nebo větší míře asociované s odolností k fusáriu. V předkládané práci jsme se soustředili na osm z nich, konkrétně na *HVRCABG* (Jia *et al.*, 2008), *Bmag0807* (Wingermuehle *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2008), *EBmac0415* (Mesfin *et al.*, 2003; Wingermuehle *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2008) a *HVM54* (Mesfin *et al.*, 2003; Wingermuehle *et al.*, 2004), *EBmac0679* (Jia *et al.*, 2008), *HVBKASI* (Mesfin *et al.*, 2003), *EBmac0602* (Wingermuehle *et al.*, 2004), *Bmag0125* (Mesfin *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2008). Uvedené markery jsme sestavili do dvou tetraplexových sad a určili jejich délkový polymorfismus u 275 českých odrůd ječmene s charakterizovanou odolností k fusariiovému vadnutí klasu. Na souboru 277 ječmenů byl proveden skrining výše uvedených mikrosatelitů. Ten samý soubor byl v tříletém opakování vystaven umělé infekci a posléze podroben hodnocení napadení pro stanovení rozdílu odolnosti zkoušeného materiálu.

## **Materiál a metody**

### **Izolace DNA, multiplex PCR a fragmentační analýza**

DNA byla izolována z čerstvých listů ječmene pomocí CTAB (cetyl trimethylamonium bromid) (Murray a Thompson, 1980). Kvalita a koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoPhotometer, Implen, Německo\*). Na základě měření byla pak DNA zředěna na pracovní koncentraci 100 ng/μl. Pro amplifikaci cílových sekvencí byla použita sada Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Německo kat. č. 206145). Reakční směs o celkovém objemu 10 μl/vzorek sestává z 5 μl 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix Qiagen, Hilden, Německo kat. č. 206145) 4 μl směsi specifických primérů (tabulka č. 1) a 1 μl roztoku DNA (100 ng/μl). Amplifikace (PCR reakce) probíhá v termocykleru Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) při následujícím teplotním profilu: 15 minut denaturace a aktivace HotStarTaq DNA polymerázy při 95°C, následována 35 cyklů sestávajících ze tří kroků (30 sekund denaturace při 94°C, 90 sekund annealing (nasedání primerů) při 55°C nebo 60°C (Tabulka 1), 60 sekund elongace (prodlužování řetězce) při 72°C) a nakonec 30 minut závěrečného prodlužování amplikonu (PCR produktu) při 60°C. Délky amplifikačních produktů – alel - byly nejprve separovány na 2% agarosovém gelu a pro kontrolu jejich délky byl použit délkový standard 100 bp Ladder (Fermentas, Kanada) a dle svítivosti na gelu byly pak produkty naředěny pro následující přesnější analýzu jejich délky v kapilární elektroforéze. Přesnější délka produktů byla stanovena separací v kapilární elektroforéze metodou fragmentační analýzy porovnáním s délkovým standardem. Vzorky pro tuto analýzu byly připraveny smícháním 10μl Hi-Di formamidu (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4311320), 1 μl naředěného PCR produktu a 0,5 μl délkového standardu GeneScan LIZ 500 Size Standard (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4322682). Takto připravené vzorky byly denaturovány 10 minut při teplotě 94°C a následně zchlazeny na teplotu 4°C. Fragmentační analýza probíhá v přístroji ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA) dle postupu uvedeného výrobcem. Délky produktů se vyhodnocují srovnáním s pozicemi délkového standardu LIZ500 pomocí programu GeneMapper™ Software 6 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA).

**Symptomatické hodnocení**

Odolnost k fuzarióze klasu může být stanovena v polních podmínkách při přirozené infekci. Pracnější, ale přesnější a spolehlivější je použití umělé infekce. Pro stanovení rozdílů v odolnosti zkoušených materiálů byla použita přímá infekce suspenzí konidií *F. culmorum* ve fázi 65 (střed kvetení). Infekce byla aplikována na vybraných 10 klasů ve stejné fázi vývoje. Infikované klasy byly po infekci na 24 hodin překryty polyetylenovým sáčkem pro vytvoření vhodných podmínek pro patogena (vlhko, teplo). Toto opatření mělo současně ochranný charakter proti případnému dešti. Pro další rozvoj infekce byla používána závlaha, díky které zůstává porost vlhký. Po infekci proběhlo hodnocení napadení klasů (symptomatické hodnocení) v několika termínech (14., 21. a 28. den po infekci). Pro hodnocení byla použita 9 bodová stupnice (9 - nenapadeno). Symptomatické hodnocení bylo provedeno v tříletém opakování.

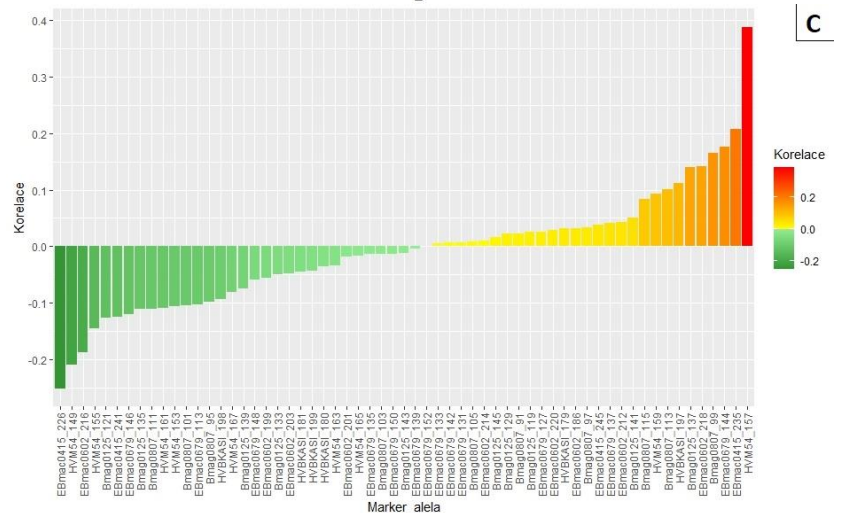
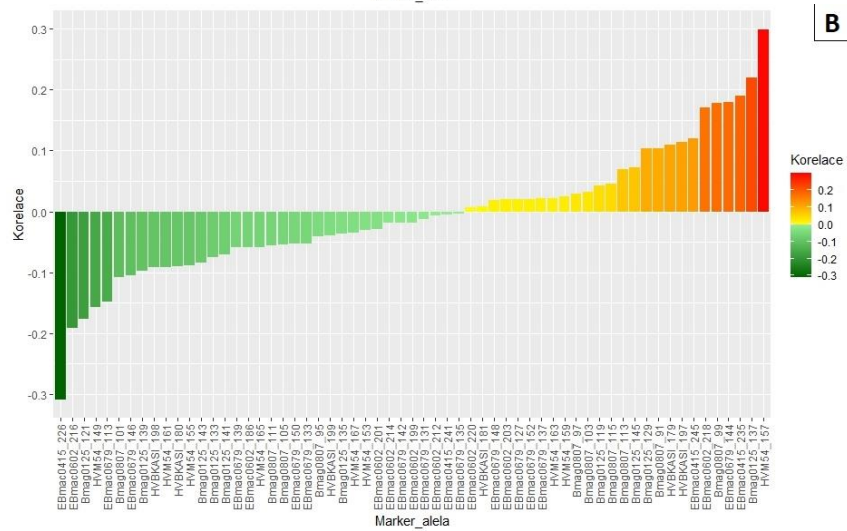
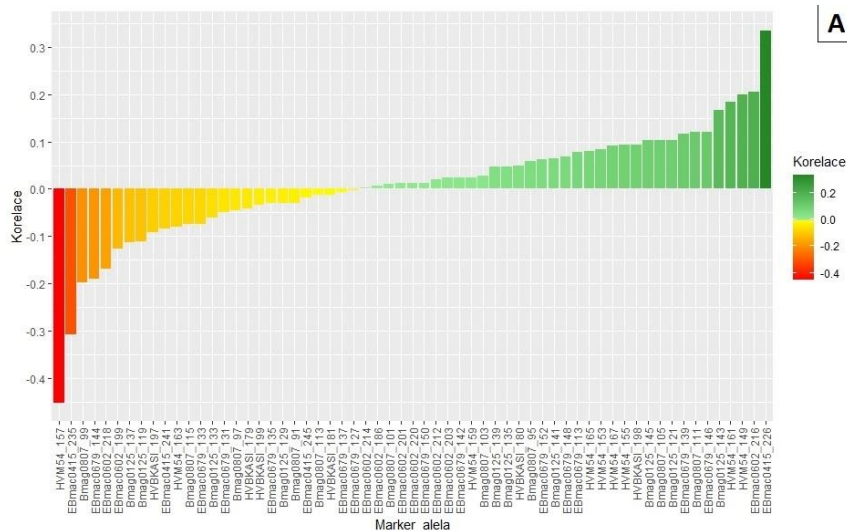
**Tabulka 1:** Seznam použitých mikrosatelitů spolu s odpovídajícími primery s anelační teplotou. Forward primery jsou fluorescenčně značeny pro možnost multiplexování.

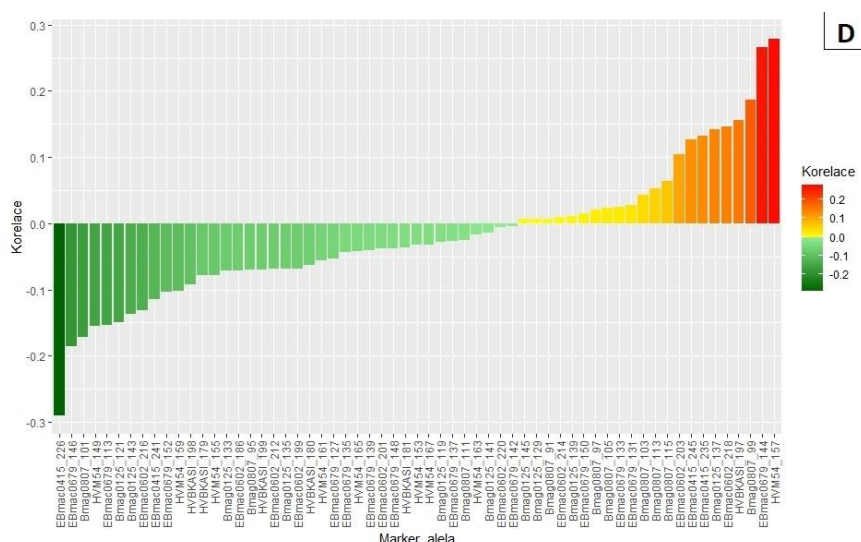
Název mikrosatelitu	Sekvence primerů	Anelační teplota	Reference
HVR CABG	F: 5' 6-FAM-TTTAAAAGAAAAGTGAATGGC 3'	60°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' TAATGAAGAATGAGGAGAAGC 3'		
Bmag0807	F: 5' VIC-GGATATAAGGGTCCATAGCA 3'	60°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' AATTACATCAAATAGGCTCCA 3'		
EBmac0415	F: 5' NED-GAAACCCATCATAGCAGC 3'	60°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' AAACAGCAGCAAGAGGAG 3'		
HVM54	F: 5' PET-AACCCAGTAACACCTGTCCTG 3'	60°C	Liu <i>et al.</i> , 1996
	R: 5' AGTTCCCTGACCCGATGTC 3'		
EBmac0679	F: 5' 6-FAM-ATTGGAGCGGATTAGGAT 3'	55°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' CCCTATGTCATGTAGGAGATG 3'		
HVBKASI	F: 5' VIC-ATTGGCGTGACCGATATTTATGTTCA 3'	55°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' CAAAAGTGCAGCTAAGCAGGGGAACA 3'		
EBmac0602	F: 5' NED-GATTGGAGCTTCGGATCAC 3'	55°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' CCGTCTAGGGAGAGGTTCTC 3'		
Bmag0125	F: 5' PET-AATTAGCGAGAACAAAATCAC 3'	55°C	Ramsay <i>et al.</i> , 2000
	R: 5' AGATAACGATGCACCACC 3'		

**Výsledky**

Prostřednictvím analýzy délkového polymorfismu osmi mikrosatelitních markerů asociovaných s rezistencí vůči fuzarióze klasu ječmene bylo celkově detekováno 62 alel, což činí v průměru téměř 8 alel na lokus. Nejvíce délkových polymorfizmů bylo zaznamenáno v případě markeru *Ebmac0679* (13) a naopak nejméně (1) v případě monomorfního markeru *HVR CABG*. Výskyt všech alel byl korelován se symptomatickým hodnocením (SH) souboru 277 ječmenů (Obrázek 1A). Kromě symptomatického hodnocení byly délkové polymorfizmy korelovány rovněž s obsahem deoxynivalenolu (DONu) (Obrázek 1B), redukcí hmotnosti tisíce zrn (HTZ) (Obrázek 1C) a redukcí hmotnosti zrn v klase (HZK) (Obrázek 1D). V případě všech čtyř pozorovaných parametrů byl s odolností k fuzáriu nejvíce korelován délkový

polymorfismus *Ebmac0415* o velikosti 226 bp. Míra korelace byla u této alely na úrovni 0.34 vzhledem k symptomatickému hodnocení, -0.31 vzhledem k obsahu DONu, -0.25 vzhledem k redukci HTZ a -0.29 vzhledem k redukci HZK. Délkový polymorfismus *HVM54\_157* (157 bp) byl naopak nejvíce korelován s náchylností k fuzariozovému vadnutí klasu. U symptomatického hodnocení dosáhla míra korelace hodnotu -0.45, u obsahu DONu 0.30. Redukce HTZ a HZK byly s touto alelou korelovány na úrovni 0.39 a 0.28.





**Obrázek 1**

Korelace výskytu délkových polymorfizmů s mírou odolnosti/náchylnosti k fusariovému vadnutí klasu. Celkově bylo hodnoceno 277 genotypů ječmene. Přítomnost jednotlivých alel byla korelována se symptomatickým hodnocením (1A), s obsahem deoxynivalenolu v mg/kg (1B), v redukci HTZ (1C) a v redukci HZK (1D).

### Diskuze

Odolnost ječmene vůči fusariovému onemocnění závisí do značné míry na několika morfologických znacích jakými jsou například výška rostliny, pluchatost obilky nebo charakteristika klasu. Vzhledem k charakteru patogena jsou odolnější, byť z agronomického hlediska neatraktivní vyšší dvouřadé ječmeny s pluchatou obilkou. Nicméně mezi odolnými odrůdami najdeme také šestiřadou švýcarskou odrůdu Chevron a další odrůdy pocházející z Kanady, Číny, Etiopie, Rumunska nebo Spojených států (Bai a Shaner, 2004). Nejvyšší míra korelace, konkrétně negativní korelace, byla pozorována v případě alely *HVM54\_157* a symptomatického hodnocení, kdy dosahovala hodnoty -0.45. Tato alela byla přítomna u 40 odrůd s průměrným napadením na úrovni 3.6, přičemž průměrná hodnota napadení celého souboru se pohybovala na úrovni 4.8. Na opačné straně korelačního spektra byl stupeň napadení pozitivně korelován s přítomností alely *Ebmac0415\_226*, ačkoli korelace dosáhla hodnoty nižší, konkrétně 0.34. Pozitivně korelována alela byla přítomna u 90 odrůd u nichž byl průměrná hodnota napadení 5.2. Zajímavé je, že z celkově 130 odrůd, u kterých se vyskytovala alespoň jedna z dvou výše zmiňovaných alel, byly přítomné obě alely najednou v pouze jediné odrůdě, konkrétně se jednalo o čínskou odrůdu Bai Liu Leng. Není překvapivé, že ty samé alely měly nejvyšší zaznamenané korelace i u zbylých tří pozorovaných parametrů. Jelikož fusarium produkuje DON, má v návaznosti na jeho zvýšený obsah na svědomí také redukci hmotnosti tisíce zrn (HTZ) i hmotnosti zrn v klasu (HZK). Podobně koncipovanou studii zabývající se vlivem délkového polymorfizmu na míru odolnosti vůči fusariu publikoval v roce 2007 Gosman a kol. V této studii byl pomocí mikrosatelitních markerů proveden skrining 78 kultivarů pšenice. U sedmi kultivarů, které prokázaly zvýšenou míru rezistence byl rovněž pozorován výskyt haplotypu *Xgwm088\_134*, *Wmc105\_350* a *Barc198\_127* (Gosman *et al.*, 2007), což poukazuje na skutečnost, že délkové polymorfizmy mikrosatelitů mohou mít vliv na odolnost k fusariovému onemocnění.

### Závěr

Analýza délkového polymorfizmu mikrosatelitních markerů u souboru 277 genotypů ječmene doplněna o symptomatické hodnocení po umělé infekci suspenzí konidii *Fusarium culmorum* odhalila dva mikrosatelitní markery definované délkou potenciálně asociované s mírou

odolnosti/náchylnosti ječmene vůči fuzáriózám klasu.

### Literatura

- Bai G., Shaner G. (2004): Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. *Annu Rev Phytopathol*, 42: 135 – 161.
- Edwards S.G. (2004): Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxickol. Lett.*, 153(1): 29 – 35.
- Gosman N., Bayles R., Jennings P., Kirby J., Nicholson P. (2007): Evaluation and characterization of resistance to fusarium head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathology*, 56: 264 – 276.
- Jia Q.J., Zhu J.H., Wang J.M., Yang J.M. (2008): Fusarium head blight evaluation and genetic diversity assessment by simple sequence repeat in 88 barley cultivars and landraces. *Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium*.
- Liu Z.W., Biyashev R.M., Saghai Maroof M.A. (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet*, 93: 869 - 873.
- Mesfin A., Smith K. P., Dill-Macky R., Evans C. K., Waugh R., Gustus C. D., Muehlbauer G. J. (2003): Quantitative Trait Loci for Fusarium Head Blight Resistance in Barley Detected in a Two-Rowed by Six-Rowed Population. *Crop Science*, 43(1): 307 - 318.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3): 225 – 238.
- Ramsay L., Macaulay M., Ivanissevich S., MacLean K., Cardle L., Fuller J., Edwards K.J., Tuveson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmiroli N., Sjakste T., Ganal M., Powell W., Waugh R. (2000): A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*, 156: 1997 - 2005.
- Steffenson B. J. (2003): Fusarium head blight of barley: impact, epidemics, management, and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*, eds Leonard K. J., Bushnell W. R., Saint Paul, MN: The American Phytopathological Society, 241 – 295.
- Wingbermuehle W. J., Gustus C., Smith K. P. (2004): Exploiting selective genotyping to study genetic diversity of resistance to Fusarium head blight in barley. *Theor Appl Genet.*, 109(6): 1160 - 1168.
- Zhu H., Gilchrist L., Hayes P., Kleinhofs A., Kudrna D., Liu Z. et al. (1999): Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium Head Blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in double-haploid population of barley. *Theor Appl Genet*, 99: 1221 – 1232.

### Dedikace

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu zemědělství České republiky (č. RO0418).

### Kontaktní adresa:

Mgr. Lucia Koláriková  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 – Ruzyně  
771 136 095, lucia.kolarikova@vurv.cz

## Hodnocení odolnosti vybraných kultivarů řepky (*Brassica napus*) k suchu a následné regeneraci

Assessment of drought tolerance related characteristics in a set of oilseed rape  
(*Brassica napus*) cultivars exposed to drought and recovery

Kosová K., Klíma M., Vítámvás P., Prášil I. T.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně

### Abstrakt

Sucho představuje globálně nejvýznamnější environmentální stresový faktor limitující zemědělskou produkci. V příspěvku byla hodnocena odezva na suchu a následné znovuzalutí (regeneraci) u vybraných kultivarů řepky Goya, Chagall a Temptation na základě souboru fyziologických charakteristik souvisejících s růstem rostlin (hmotnost čerstvé nadzemní biomasy), obsahem vody v listových pletivech (vodní sytostní deficit, osmotický potenciál), a fotosyntézou a transpirací (fluorescence chlorofylu Fv/Fm, rychlost čisté fotosyntézy, rychlost transpirace, stomatální vodivost,  $c_i/c_a$ , účinnost využití vody WUE a tzv. vnitřní účinnost využití vody WUE<sub>i</sub>), které byly hodnoceny samostatně pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) i jako celek pomocí klastrové analýzy. Klastrová analýza rozdělila vzorky na dvě základní skupiny, a to na suché varianty a ostatní, což ukazuje, že regenerace byla úspěšná. V suchých variantách vykazovaly kultivary Goya a Chagall oproti kultivaru Temptation významně vyšší hodnoty WUE a WUE<sub>i</sub>, což ukazuje na jejich vysokou odolnost vůči suchu.

**Klíčová slova:** obsah vody; fotosyntéza; transpirace; účinnost využití vody; klastrová analýza

### Abstract

Drought represents the major environmental factor limiting agricultural production globally. The response to drought and subsequent rewatering, i.e., recovery, was assessed in the oilseed rape cultivars Goya, Chagall and Temptation based on the determination of morphophysiological characteristics related to plant growth (fresh weight of aboveground biomass), water content in leaf tissues (water saturation deficit, osmotic potential), photosynthesis and transpiration (chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm, net photosynthesis rate, transpiration rate, stomatal conductance, intercellular to ambient CO<sub>2</sub> ratio  $c_i/c_a$ , water use efficiency WUE, and intrinsic water use efficiency WUE<sub>i</sub>). These characteristics were assessed individually using analysis of variance (ANOVA) as well as a whole using cluster analysis. Two basic clusters were differentiated by cluster analysis indicating successful plant regeneration. Cultivars drought-treated Goya and Chagall revealed significantly higher WUE and WUE<sub>i</sub> values with respect to cultivar Temptation which indicates their superior drought tolerance.

**Keywords:** water content; photosynthesis; transpiration; water use efficiency; cluster analysis

### Úvod

Sucho představuje globálně nejvýznamnější environmentální stresový faktor snižující zemědělskou produkci (Cattivelli et al. 2008). Existují různé definice sucha. Z hlediska růstu a vývoje rostlin je nejdůležitější tzv. fyziologické sucho, tj. nerovnováha mezi příjmem vody kořeny a výdejem vody prýtem, hlavně průduchy, vedoucí ke snížení obsahu vody v buňkách. Vyšší rostliny jsou homoiohydriční organismy, tj. vyžadují určitý stálý obsah vody v buňkách. Musí proto příjem a hlavně výdej vody regulovat.

Rostliny během evoluce vyvinuly mechanismy regulace obsahu vody ve svém těle (Kosová et al. 2014). Regulován je především výdej vody na úrovni průduchů. V případě rostlin s tzv. C3

typem fotosyntézy, mezi něž patří i řepka, je otevřenost průduchů klíčová jak pro výdej vody tzv. stomatální transpirací, tak pro příjem CO<sub>2</sub> nutný pro asimilační aktivitu enzymu RubisCO. Z hlediska šetření vodou jsou klíčové parametry tzv. účinnost využití vody (WUE) a tzv. vnitřní účinnost využití vody (WUEi), které charakterizují množství vody potřebné pro vytvoření jednoho gramu sušiny, a které lze vyjádřit jako poměr A/E, resp. A/Gs, tj. rychlost čisté fotosyntézy (A) vydělená rychlostí transpirace (E) či vodivostí průduchů (Gs).

Cílem příspěvku je porovnat odezvu na sucho a následné znovuzalutí vedoucí k regeneraci u tří kultivarů řepky Chagall, Goya a Temptation. K hodnocení jsme použili fyziologické charakteristiky hmotnost čerstvé nadzemní biomasy (g), vodní sytostní deficit (VSD), osmotický potenciál (OP), fluorescence chlorofylu – maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm, rychlost čisté fotosyntézy A, rychlost transpirace E, stomatální vodivost Gs, poměr intercelulární a ambientní koncentrace CO<sub>2</sub> ci/ca, účinnost využití vody WUE a tzv. vnitřní účinnost využití vody (intrinsic water use efficiency, WUEi). Všechna data byla vyhodnocena jednak samostatně pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), jednak byla Z-skóre transformována a použita jako vstupy do klastrové analýzy, která ukázala zásadní rozdíl mezi suchými variantami a ostatními (kontrolní a regenerované varianty). Uspořádání experimentu vycházelo z naší předchozí práce (Kosová et al. 2018), pro vyhodnocení dat jsme ovšem kromě jednorozměrné analýzy rozptylu (ANOVA) umožňující identifikovat významné rozdíly mezi vzorky pouze u jedné hodnocené charakteristiky použili ještě mnohorozměrnou klastrovou analýzu umožňující vzájemně porovnat odezvu na sucho u všech sledovaných morfofyziologických charakteristik. Mnohorozměrná klastrová analýza tak umožňuje komplexní pohled na odezvu jednotlivých genotypů na sucho a usnadňuje identifikaci genotypů vykazujících vhodnou kombinaci fenotypových znaků z hlediska suchovzdornosti.

### **Materiál a metodika**

Kultivary řepky Goya (G), Chagall (CH) a Temptation (T) byly získány od společnosti OSEVA PRO, s.r.o. Semena byla naklíčena v termostatech při 100% vzdušné vlhkosti a při teplotě 20 °C po dobu 3 dnů. Do květináčů s cca 1400 g zahradní zeminy bylo vyseto 5 semen. Květináče byly umístěny do klimaboxu Tyler T-64 (Budapešť, Maďarsko). Rostliny byly pěstovány při regulované teplotě 18 °C a dlouhodobě fotoperiodě (16 h světlo/ 8 h tma). Zálivka byla prováděna gravimetricky na základě vypočteného obsahu vody v půdě; nejprve byly 20 dnů všechny rostliny zalévány jako kontrolní na 75% půdní vodní kapacity (PVK), poté byly odebrány vzorky kontrolních variant (K). Poté byla u variant určených k suchu a k následné regeneraci snížena zálivka na 35% PVK a 3 dny před odběrem nebyly rostliny zalévány vůbec, čímž došlo k poklesu obsahu vody až na cca 20% PVK. Poté byly po 7 dnech snížené zálivky odebrány suché varianty (S). Následně byly zbylé rostliny znovuzaluty až na úroveň plné saturace půdy vodou, tj. 100% PVK, a po 3 dnech byly odebrány regenerované varianty (R). U všech experimentálních variant byly v době odběru stanoveny následující charakteristiky: hmotnost čerstvé nadzemní biomasy byla stanovena gravimetricky, vodní sytostní deficit byl stanoven gravimetricky na základě stanovení čerstvé hmotnosti listů, syčení listů ve vlhkostní komůrce a na základě stanovení hmotnosti sušiny dle Slavíka (1963), osmotický potenciál vymačkané šťávy ze zamražených listů byla stanovena jako osmolarita na základě stanovení rosného bodu pomocí osmometru VAPRO (WESCOR Inc, Tulsa, Utah, USA) a byl vypočten pomocí van't Hoffovy rovnice  $OP = n_i \cdot c_i \cdot R \cdot T$ , kde  $n_i$  je disociační koeficient,  $c_i$  je koncentrace osmoticky aktivní látky (osmolytu),  $R$  je univerzální plynová konstanta 8,314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> a  $T$  je termodynamická teplota (K). Osmotický potenciál vztažený na 100% nasycení listu (VSD 0%) byl vypočten dle Bluma (1989). Fluorescenční parametr maximální fotochemická účinnost fotosystému II Fv/Fm byl stanoven u rostlin po min. 30 min. temnotní



adaptace pomocí FluorPen FP100 (PSI, Drásov, ČR). Charakteristiky spojené s fotosyntézou a transpirací, tj. rychlost čisté fotosyntézy A, rychlost transpirace TR, stomatální vodivost SC a poměr intercelulární a ambientní koncentrace CO<sub>2</sub> ci/ca byly stanoveny pomocí přenosného přístroje LC PRO+ (ADC Bioscientific, Velká Británie). Charakteristiky WUE a WUEi byly vypočteny jako A/E, resp. AGs.

**Statistická analýza dat:** Jednotlivé stanovené charakteristiky byly hodnoceny v min. třech biologických opakováních (n = 3) pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) následované Duncanovým testem rozpětí (DMRT) na hladině významnosti 0,05 pomocí programu STATISTICA verze 14 (TIBCO Inc., Velká Británie). Klastrová analýza byla provedena u Z-skóre transformovaných dat pomocí programu PermutMatrix (Caraux a Pinloche 2005) za použití Euklidovských vzdáleností a Wardových minimálních kritérií.

### Výsledky

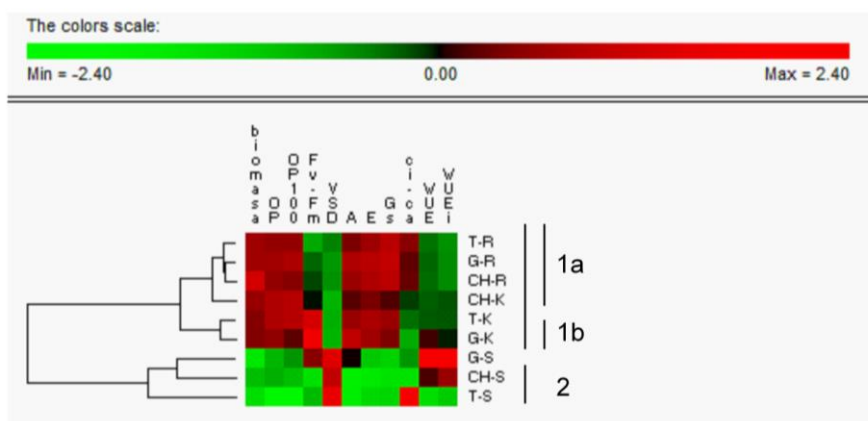
Jednotlivé stanovené charakteristiky společně s výsledky ANOVA, DMRT 0,05 testu jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

**Tabulka 1.** Přehled hodnot týkajících se hmotnosti čerstvé nadzemní biomasy, vodního sytostního deficitu (VSD), osmotického potenciálu (OP), osmotického potenciálu přepočteného na plné nasycení listu vodou OP100 a fluorescenčního parametru Fv/Fm u kontrolních (K), suchých (S) a regenerovaných (R) variant kultivarů řepky Goya (G), Chagall (CH) a Temptation (T). Data ukazují průměrné hodnoty z min. 3 biologických opakování (n=3), odlišná písmena značí signifikantní rozdíl na hladině významnosti  $P \leq 0,05$  stanovený pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), Duncanova testu rozpětí.

Varianta	Charakteristika				
	Vzorek	Biomasa (g)	VSD (%)	OP (MPa)	OP100 (MPa)
G-K	14,283 b	6,647 a	-1,099 c	-1,01 ab	0,839 a
CH-K	14,838 b	6,623 a	-0,897 a	-0,824 a	0,826 abc
T-K	14,356 b	7,457 a	-0,911 a	-0,828 a	0,836 ab
G-S	6,807 d	42,783 d	-2,185 e	-1,045 b	0,829 abc
CH-S	9,201 c	35,963 c	-2,127 d	-1,194 b	0,815 c
T-S	7,557 cd	46,466 d	-3,192 f	-1,383 c	0,819 bc
G-R	15,113 b	10,854 ab	-0,982 b	-0,852 ab	0,824 abc
CH-R	17,215 a	11,458 ab	-1,081 c	-0,93 ab	0,825 abc
T-R	15,113 b	13,297 b	-1,072 c	-0,898 ab	0,82 bc

**Tabulka 2.** Přehled hodnot týkajících se rychlosti čisté fotosyntézy A, rychlosti transpirace E, stomatální vodivosti Gs, poměru intercelulární a ambientní koncentrace CO<sub>2</sub> ci/ca, účinnosti využití vody WUE a tzv. vnitřní účinnosti využití vody WUEi u kontrolních (K), suchých (S) a regenerovaných (R) variant kultivarů řepky Goya (G), Chagall (CH) a Temptation (T). Data ukazují průměrné hodnoty z min. 3 biologických opakování (n=3), odlišná písmena značí signifikantní rozdíl na hladině významnosti P≤0,05 stanovený pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), Duncanova testu rozpětí.

Varianta	Charakteristika					
	A (μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	E (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Gs (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	ci/ca	WUE	WUEi
G-K	106,587 a	22,317 a	1,785 a	0,642 a	5,125 ab	73,147 ab
CH-K	83,947 a	20,315 a	1,597 a	0,702 ab	4,325 ab	64,31 ab
T-K	96,024 a	23,178 a	1,957 a	0,683 ab	4,37 ab	62,792 ab
G-S	78,072 a	8,86 b	0,442 b	0,659 ab	10,696 b	215,597 b
CH-S	24,29 b	4,557 b	0,217 b	0,575 a	5,205 ab	108,817 ab
T-S	25,427 b	7,012 b	0,402 b	0,916 b	1,532 a	9,63 a
G-R	101,867 a	24,34 a	2,29 a	0,734 ab	4,22 ab	46,344 a
CH-R	96,182 a	23,387 a	2,205 a	0,737 ab	4,15 ab	46,377 a
T-R	89,902 a	22,427 a	2,192 a	0,756 ab	4,055 ab	43,354 a



**Obrázek 1.** Klusterová analýza vybraných parametrů řepky – hmotnost čerstvé biomasy, osmotický potenciál (OP), osmotický potenciál přepočtený na 100% nasycení vodou (OP100),

fluorescenční parametr  $F_v/F_m$ , vodní sytostní deficit (VSD), rychlost čisté fotosyntézy (A), rychlost transpirace (E), průduchová vodivost (Gs), poměr intercelulární a ambientní koncentrace  $CO_2$  ( $c_i/c_a$ ), účinnost využití vody (WUE) a tzv. vnitřní účinnost využití vody ( $WUE_i$ ) – u vzorků kultivarů řepky Chagall (CH), Goya (G) a Temptation (T) pěstovaných za kontrolních podmínek (K), za podmínek sucha (S) a regenerace (R). Všechna data byla Z-skóre transformována a následně použita pro klastrovou analýzu. Klasterogram byl sestaven programem PermutMatrix (Caraux a Pinloche 2005) za použití Euklidovských vzdáleností a Wardových minimálních kritérií.

Z výsledků klastrové analýzy uvedených v obrázku 1 je patrné, že došlo k rozdělení na dva klastry: klastr 1 zahrnující kontrolní a regenerované varianty, který se dále dělí na subklastr 1a zahrnující regenerované varianty a kontrolní variantu odrůdy Chagall, a subklastr 1b zahrnující kontrolní varianty odrůd Goya a Temptation, a dále klastr 2 zahrnující suché varianty všech odrůd. Sucho vedlo k významnému poklesu hmotnosti čerstvé biomasy, nárůstu VSD, poklesu OP a OP100, poklesu rychlosti čisté fotosyntézy (A), transpirace (E), stomatální vodivosti (Gs) a mírnému poklesu fluorescenčního parametru  $F_v/F_m$ . U suchých variant v klastru 2 byly rovněž zjištěny rozdíly mezi genotypy, kdy genotypy Goya a Chagall ve srovnání s genotypem Temptation vykazovaly významně nižší hodnoty VSD, vyšší hodnoty OP a OP100, a významně vyšší hodnoty WUE a  $WUE_i$ .

### Diskuse

Klastrová analýza rozdělila devět sledovaných vzorků do dvou hlavních klastrů, přičemž jeden zahrnoval vzorky kontrolní a regenerované a druhý zahrnoval vzorky vystavené suchu, což ukazuje na dominantní vliv sucha. Sucho vedlo k významnému poklesu hmotnosti čerstvé biomasy, osmotického potenciálu, a naopak nárůstu vodního sytostního deficitu (VSD). V případě osmotického potenciálu přepočteného na 100% nasycení rostlin vodou (OP100) lze vidět rozdíly v míře akumulace osmolytů vedoucí k tzv. osmotickému přizpůsobení (Serraj a Sinclair 2002). V hodnotách OP100 u suchých variant se projeví významné rozdíly mezi genotypy, kdy Goya a Chagall vykazovaly významně vyšší hodnoty OP100 oproti Temptation, který měl nejvyšší hodnotu VSD, tj. největší dehydrataci listových pletiv. Z hlediska fotosyntetických charakteristik sucho vedlo u kultivarů Goya a Chagall k významnému poklesu řady sledovaných charakteristik: fluorescenční parametr maximální fotochemická účinnost fotosystému II  $F_v/F_m$ , rychlost čisté fotosyntézy A, rychlost transpirace TR, stomatální vodivost SC. Naopak sucho vede k významnému nárůstu účinnosti využití vody (WUE) a tzv. vnitřní účinnosti využití vody ( $WUE_i$ ) u kultivarů Goya a Chagall, nikoliv však u kultivaru Temptation. Účinnost využití vody WUE, definovaná jako hmotnost vody spotřebované rostlinou pro vytvoření jednoho gramu sušiny představuje významný polygenně založený znak, který lze považovat za ukazatel suchovzdornosti rostlin (Richards et al. 2002) a který lze využít při šlechtění zemědělských plodin na zvýšenou suchovzdornost (Cattivelli et al. 2008; Rebetzke et al. 2002). Z hlediska WUE a  $WUE_i$  lze jako suchovzdorné popsat kultivary Goya a Chagall, zatímco kultivar Temptation má významně nižší suchovzdornost. Hodnoty WUE a  $WUE_i$  mohou, ale nemusejí korelovat s výnosem plodiny za sucha, přičemž se ukazuje, že čím je sucho delší a intenzivnější, tím je korelace mezi WUE a výnosem plodiny významnější, a WUE lze použít jako významný indikátor výnosu (Condon et al. 2004).

## Závěr

Srovnání jednotlivých variant pomocí klastrové analýzy významně rozlišilo dvě hlavní skupiny vzorků, vzorky vystavené suchu a ostatní, tj. kontrolní a regenerované varianty, což ukazuje na významný vliv sucha a na úspěšnou regeneraci studovaných kultivarů řepky. U suchých variant byly rovněž zjištěny významné rozdíly mezi kultivary, kdy kultivary Goya a Chagall měly významně nižší VSD, významně vyšší OP a OP100 a především významně vyšší hodnoty WUE a WUEi oproti kultivaru Temptation, což ukazuje na jejich vyšší suchovzdornost. Hodnocení souboru morfofyziologických charakteristik tak představuje relativně jednoduchý, rychlý a levný nástroj využitelný pro screening rostlinných materiálů vyznačujících se zvýšenou odolností vůči suchu.

## Literatura

- Blum, A., 1989: Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci.* 29(1): 230–233.
- Caraux, G., Pinloche, S., 2005: Permutmatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 21: 1280–1281.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Maré, C., Tondelli, A., Stanca A.M., 2008: Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 105: 1–14.
- Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Farquhar, G.D., 2004: Breeding for high water-use efficiency. *J. Exp. Bot.* 55: 2447–2460.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Kholová, J., Prášil, I.T., 2014: Breeding for enhanced drought resistance in barley and wheat – drought-associated traits, genetic resources and their potential utilization in breeding programmes. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 50(4): 247–261.
- Kosová, K., Klíma, M., Vítámvás, P., Prášil, I.T., 2018: Odezva vybraných odrůd řepky na suchu a následná regenerace. *Úroda* 12: 19–25.
- Rebetzke, G.J., Condon, A.G., Richards, R.A., Farquhar, G.D., 2002: Selection for reduced carbon isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Sci.* 42: 739–745.
- Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Condon, A.G., van Herwaarden, A.F., 2002: Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Sci.* 42: 111–121.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., 2002: Osmolyte accumulation: can it really increase crop yield under drought condition? *Plant Cell Environ.* 25: 333–341.
- Slavík, B., 1963: Relationship between the osmotic potential of cell sap and the water saturation deficit during the wilting of leaf tissue. *Biol. Plant.* 5: 258–264.

## Poděkování

Práce byla podpořena institucionálním projektem Ministerstva zemědělství ČR MZeRO0418.

## Kontaktní adresa:

RNDr. Klára Kosová, Ph.D.,  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507/73  
161 06 Praha 6 - Ruzyně, Česká republika  
tel.: +420 233022447; email: kosova@vurv.cz

## Vývoj CAPS markerů pro genomickou selekci hospodářsky významných znaků u hrachu setého (*Pisum sativum* L.)

Development of CAPS markers for genomic selection of economically important traits in pea

Ludvíková M.<sup>1</sup>, Dostálová R.<sup>1</sup>, Hýbl M.<sup>2</sup>, Trněný O.<sup>3</sup>, Griga M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Agritec Plant Research, s. r. o., Šumperk*

<sup>2</sup>*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha 6 – Ruzyně*

<sup>3</sup>*Zemědělský výzkum, s.r.o., Troubsko*

### Abstrakt

V letech 2019 a 2020 byl hodnocen soubor 564 genotypů polního a dřeňového hrachu. Na základě asociační analýzy (GWAS) a DArTseq analýzy sekvenování knihoven DNA s redukovanou komplexitou byly identifikovány SNP (Single-Nucleotide Polymorfisms; jednonukleotidový polymorfismus) markery spojené s agronomickými znaky.

Cílem této práce bylo převést identifikované SNP markery spojené s odolností vůči PEMV (virus enační mozaiky hrachu) a padlí (*Erysiphe pisi*) na markery ve formátu CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; štěpené amplifikované polymorfní sekvence) vhodné pro selekci a šlechtění. Ty mohou být následně využity jako účinný nástroj pro zpřesnění, zrychlení a finanční zefektivnění procesu selekce a tvorbu kvalitativně nových a konkurenceschopných odrůd hrachu.

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

### Abstract

In 2019 and 2020, a set of 564 genotypes of field and canning pea was evaluated. SNP (Single-Nucleotide Polymorphisms) markers associated with agronomic traits were identified based on association analysis (GWAS) and DArTseq sequencing analysis of DNA libraries with reduced complexity. The aim of this work was to convert the identified SNP markers associated with resistance to PEMV (pea enation mosaic virus) and powdery mildew (*Erysiphe pisi*) into CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markers suitable for selection and breeding. These can subsequently be used 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.

**Keywords:** pea, *Pisum sativum*, agronomic traits, 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, která 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.

Virus výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV – *Pea enation mosaic virus*) je celosvětově označován za nejnebezpečnější a ekonomicky nejzávažnější chorobu hrachu. Je přenosný mšicemi a k přenosu dochází již po krátké době sání. 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). 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).

Padlí hrachu (*Erysiphe pisi* DC., *Ascomycetes*) je specializovaná forma *E.pisi f. sp. pisi* (Hammarl) Boerema, schopná patogeneze pouze na hrachu. V teplejších a sušších pěstitelských oblastech způsobuje každoročně výnosové ztráty v rozmezí 10–60 % (Nagaraju a Pal, 1990; Heringa et al., 1969; Tivari et al., 1997).

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 restrikcí 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).

## 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.). Soubor 564 genotypů polního a dřeňového hrachu byl hodnocen v letech 2019 a 2020 na třech lokalitách (Šumperk, Olomouc, Smržice). Vybrané genotypy hrachu pochází z registrovaných komerčních odrůd rodu *Pisum*, zdrojů rezistence k houbovým a virovým patogenům využívaných ve šlechtění, odrůd/linií z kolekce z Ruska (získaných v projektu KONTAKT), planých druhů/forem rodu *Pisum*, vlastního novošlechtění polního a dřeňového hrachu společností Agritec a SEMO a mutantních

linií s nízkým obsahem kyseliny fytové. Výběr 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. K redukci komplexity je využíván systém kombinace dvou restričních enzymů, z nichž jeden je metylačně sensitivní. V porovnání s jinými metodami redukce komplexity genomu se DArTseq zaměřuje na unikátní oblasti v genomu, které jsou často typické pro genové oblasti s vysokou informativní hodnotou. 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. Vybrané SNP použité pro další práci 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 restriční enzymy umožňující snadné testování přítomnosti referenční/alternativní alely.

Test primerů a test následné restrikce byly provedeny se souborem 49 vzorků se známými fenotypy (32 šlechtitelských linií z Agritecu, 8 registrovaných odrůd rezistentních k padlí, 8 linií s deklarovanou rezistencí k padlí a virózám z kolekce genových zdrojů a 1 planá forma hrachu). 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.

Vyizolovaná DNA byla použita pro PCR amplifikaci a restriční reakci s použitím odpovídajícího restričního 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. Zbýlých 5 µl bylo štěpeno pomocí příslušného restričního enzymu a rovněž naneseno na gel. Délky fragmentů po restrikci spolu s odpovídajícím genotypem (S-senzitivní, R-rezistentní) jsou uvedeny rovněž v tabulce 3.

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

Pořadí SNP	SNP ID	Chromozom	Alely (referenční/alternativní)	Pozice SNP	Přilehlá sekvence
74.	4661881 F 0-12:T>C-12:T>C	5	T/C	12	TGCAGAGGGGATTGGTATCTCCGATTTATGATGATGA TGTTGTCGTCATGCCCAATTATGACGATGAATCA A
76.	5934728 F 0-24:A>G-24:A>G	2	A/G	24	TGCAGTATGTCTATGACCATTTTGATCAAAAATT GAACCTCCAACCTTAGTCCCATAAACATGATCAT A

Tab. 2: 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	TGCAGGATTGTATACTGATCCTTTCCTTGTATAA TTTACAGATCGGAAGAGCGGTTTACAGGAATGC C
81.	3549708 F 0-34:T>C-34:T>C	1	T/C	34	TGCAGCACCGACACCTATGAAAAATGTGTGTCGG TGTAATGTCTGAAAGTGACACCGAAGTTTGTGA T
83.	19221983 F 0-23:C>T-23:C>T	1	C/T	23	TGCAGATACATGCTTCAATGCACGCGTACTTA TTTATTTTGGCTTCAAATTTTTTGGCCCTTGCATTC T

Tab. 3: 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
74.	F: CTCCTTCCACTCCACCTTCA R: ATATGGTCTCGCGTATGGGG	555	<i>MboI</i>	196, 297 a 62	R
				359 a 196	S
76.	F: TCCAGAAGATCAGCTGCAGT R: GTTGGGATGGAAAGCTGGTG	223	<i>MboI</i>	147 a 76	S
				223	R
78.	F: CCTCTGCTCACACTTTCAACA R: CAGAACTGGTGTAGGTAGATCA	422	<i>MboI</i>	206 a 216	R
				422	S
81.	F: AGTGGTTGAGCTAAGGTTTTGA R: ATCTCTGAAGCACGGACACT	409	<i>BstUI (Bsh1236I)</i>	114 a 296	R
				409	S
83.	F: GGATAATCTTCCGCAACCCA R: GACAGCACTGAACCTCAACA	483	<i>Hin1II (NlaIII)</i>	158, 222 a 103	R
				158 a 325	S

### Výsledky a diskuze

Na základě hodnocení souboru 564 genotypů polního a dřeňového hrachu prostřednictvím asociační analýzy (GWAS) a DArTseq analýzy byly identifikovány SNP markery spojené s agronomickými znaky (mimo jiné odolnost vůči padlí a PEMV) a kvalitativními znaky semen. Pro detekci SNP byla v užitém 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. Vybrány byly SNP markery, u kterých je možné detekovat přítomnost referenční/alternativní alely na základě použití restrikčního enzymu (jsou využitelné pro metodu CAPS). Na základě vhodnosti využití pro metodu CAPS byly vybrány 2 markery spojené s odolností k padlí a 3 spojené s odolností k PEMV.

S navrženými primery byla provedena PCR, v případě potřeby byla provedena optimalizace teplot (u markeru 83 bylo pro dosažení specifického produktu potřeba výrazně zvýšit teplotu pro nasedání primerů, což je uvedeno v metodice). Výsledky amplifikace a restrikce pro jednotlivé markery jsou uvedeny na obrázcích 1 až 10. U všech markerů se podařilo pomocí PCR naamplifikovat fragment o očekávané délce. Při následných restrikcích byla u všech

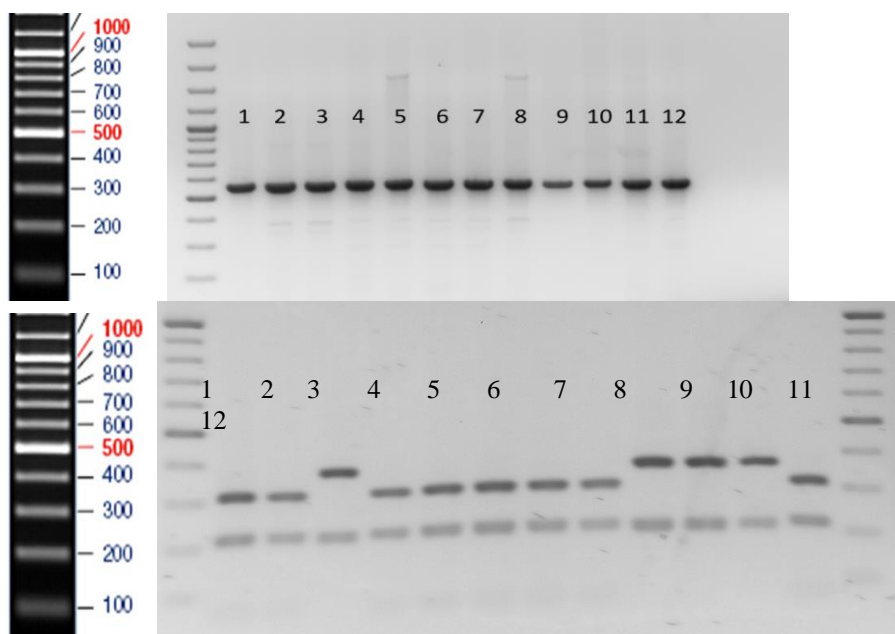


markerů v souboru patrná variabilita ve výskytu alel. Výjimkou byl pouze marker 76, kde došlo ve všech vzorcích (s kontrastními fenotypy) ke štěpení alely.

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.

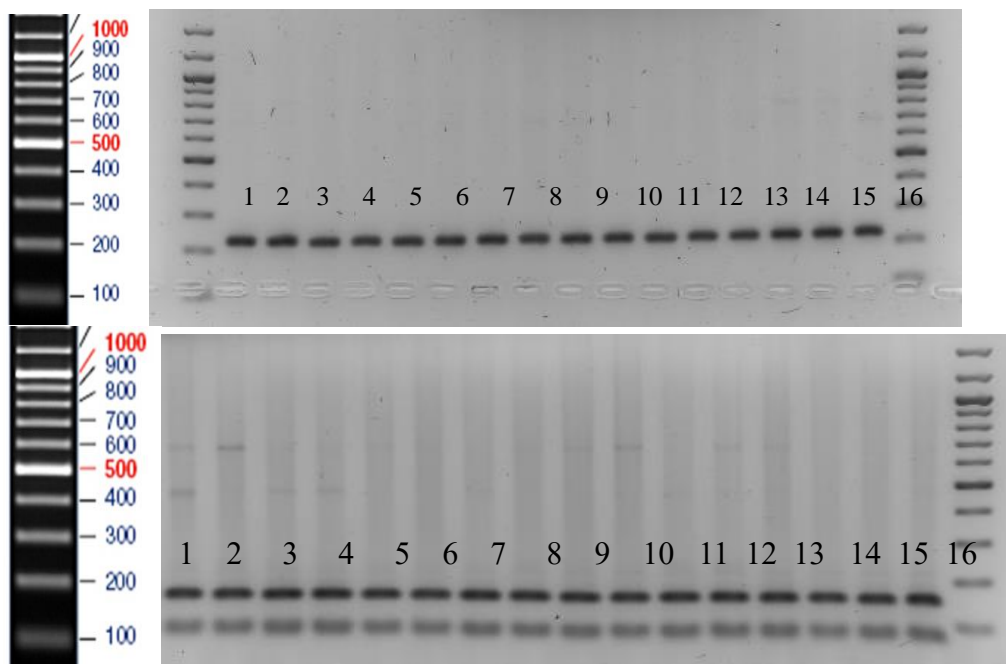
Padlí hrachu (*Erysiphe pisi* DC., *Ascomycetes*) je specializovaná forma *E.pisi* f. sp. *pisi*, schopná patogeneze pouze na hrachu. Genetické zdroje rezistence hrachu proti padlí byly objeveny jednak v peruánských populacích hrachu (Harland, 1948), a jednak v komerční odrůdě dřevňového hrachu Stratagem, odvozené z mexické populace Mexique 4 (Pierce, 1948; Cousin, 1965). Dosud byly u hrachu identifikovány tři geny rezistence k padlí, jmenovitě *er1* (Janila et al., 2004), *er2* (Tiwari et al., 1999) a *Er3* (Cobos et al., 2018), umístěné na vazebných skupinách LGVI, III a IV. Studie prokázaly, že gen *er1* je homologem lokusu „O“(MLO) (Pavan et al., 2011). Následné analýzy identifikovaly celkem jedenáct alel (*er1-1* až *er1-11*; Devi et al., 2022), z nichž *er1-1* a *er1-2* jsou využívány šlechtiteli.

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.



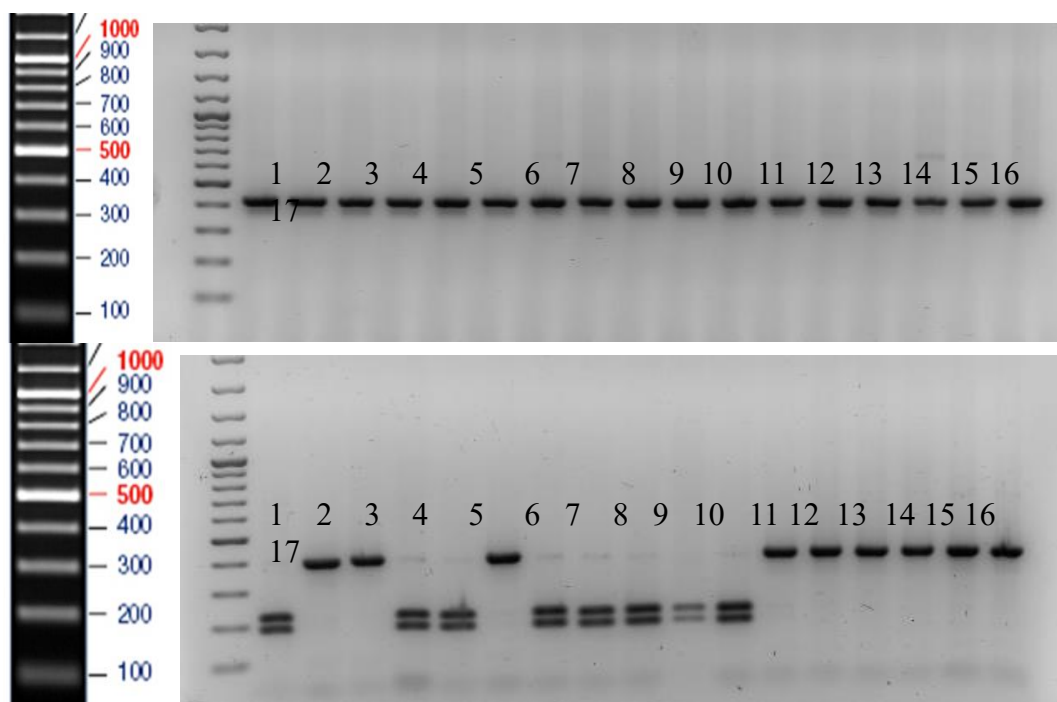
Nahoře Obr. 1: Výsledek PCR amplifikace pro marker 74 (odolnost k padlí). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. amplifikované vzorky (555 bp)

Dole Obr. 2: Výsledek restrikční analýzy pro marker 74. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. vzorky po restrikci (297,196 a 62/ 359 a 196 bp)



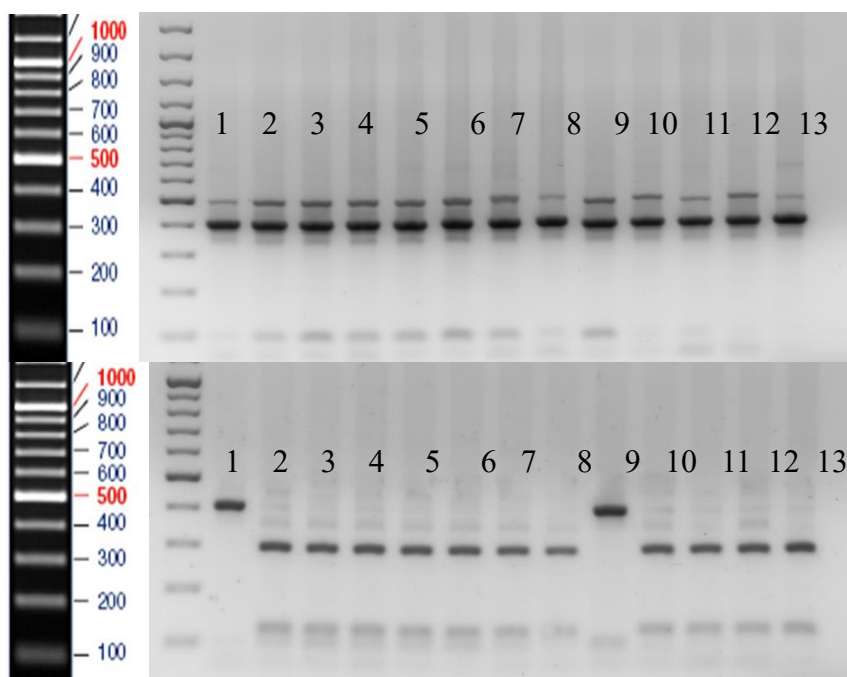
Nahoře Obr. 3: Výsledek PCR amplifikace pro marker 76 (odolnost k padlí). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 16. amplifikované vzorky (223 bp)

Dole Obr. 4: Výsledek restrikční analýzy pro marker 76. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 16. vzorky po restrikci (147 a 76 bp)



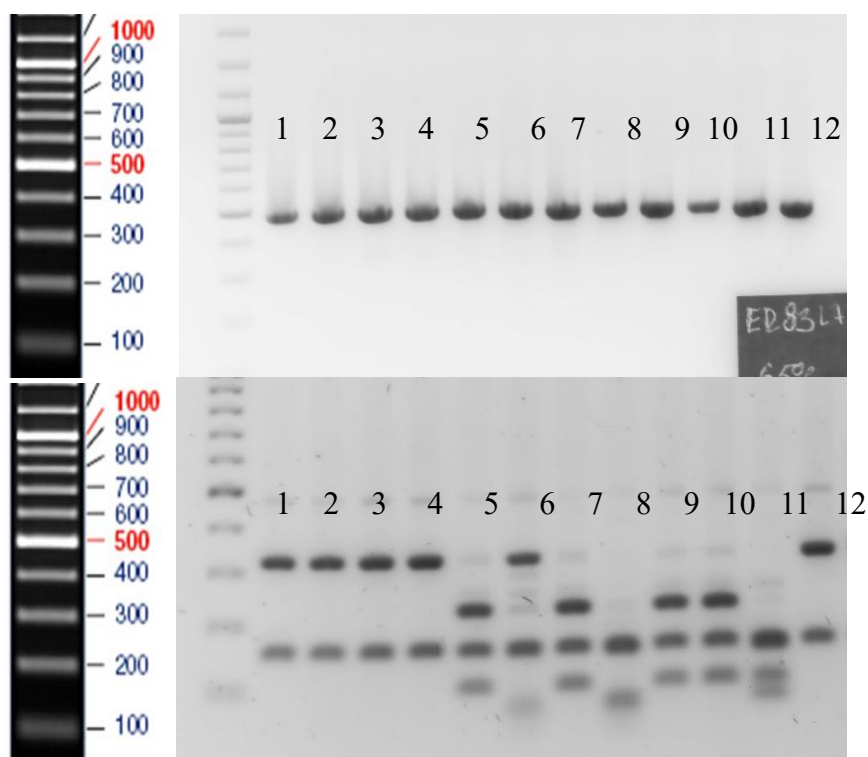
Nahoře Obr. 5: Výsledek PCR amplifikace pro marker 78 (odolnost k PEMV). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 17. amplifikované vzorky (422 bp)

Dole Obr. 6: 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)



Nahoře Obr. 7: Výsledek PCR amplifikace pro marker 81 (odolnost k PEMV). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 13. amplifikované vzorky (409 bp)

Dole Obr. 8: 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. 9: 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. 10: 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)

## Závěr

Cílem této práce bylo převést SNP markery identifikované na základě celogenomové bioinformatické analýzy na markery ve formátu CAPS využitelné pro selekci a šlechtění hrachu. Vybrány byly SNP markery spojené s odolností vůči PEMV a padlí.

Na základě referenční sekvence a přilehlých sekvencí byly navrženy CAPS markery pro snadnou a rychlou molekulární identifikaci referenční/alternativní alely ve vzorku. PCR fragmenty byly na základě navržených primerů úspěšně naamplifikovány, během následné restriční analýzy byly detekovány štěpené i neštěpené alely v odpovídajících délkách. Dalším krokem testování bude ověření účinnosti těchto molekulárních markerů a potvrzení asociace jednotlivých alel s konkrétním fenotypem na širším souboru vzorků. Identifikované markery mohou být využity pro efektivní šlechtění hrachu – selekci s využitím markerů (MAS = Marker-Assisted Selection).

## Literatura

- Blixt S. (1972): Mutation genetics in *Pisum*. *Agr. Hort. Genet.* 30: 1 – 293.
- Cobos M.J., Satovic Z., Rubiales D., Fondevilla S. (2018): Er3 gene, conferring resistance to powdery mildew in pea, is located in pea LGIV. *Euphytica* 214, 203.
- Cousin R. (1965): Resistance to powdery mildew in pea. *Annals Amélior Plantes* 15: 93 – 97.
- Devi J., Mishra G.P., Sagar V., Kaswan V., Dubey R.K., Singh P.M., Sharma S.K., Behera T.K. (2022): Gene-Based Resistance to Erysiphe Species Causing Powdery Mildew Disease in Peas (*Pisum sativum* L.). *Genes (Basel)*, 13:316.
- 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 - Badalíková B., Šindelková I. (eds.): Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin, 27-34. ISSN 0139-6013.
- Harland S.C. (1948): Inheritance of immunity to mildew in Peruvian forms of *Pisum sativum*. *Heredity* 2: 263 – 269.
- Heringa R. J., Vannorel A., Tazelaar M. F. (1969): Resistance to powdery mildew in pea. *Euphytica* 18: 163 – 196.
- 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.
- Janila P., Sharma B. (2004): RAPD and SCAR markers for powdery mildew resistance gene er in pea. *Plant Breed.* 123: 271–274.
- Jaranowski J. (1976): Gamma-ray induced mutations in *Pisum arvense* L. s. l. *Genet. Polonica* 17: 479 – 495.
- 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.
- Nagaraju V., Pal A. B. (1990): Character analysis in garden pea lines with variable resistance to powdery mildew and rust diseases. *Mysore J. Agr. Sci* 24 (1): 68 – 71.
- Pavan S., Schiavulli A., Appiano M., Marcotrigiano A.R., Cillo F., Visser R.G.F., Bai Y., Lotti C., Ricciardi L. (2011): Pea powdery mildew er1 resistance is associated to loss-of-function mutations at a MLO homologous locus. *Theor. Appl. Genet.* 123, 1425–1431.
- Pierce W.H. (1948): Resistance to powdery mildew in pea. *Phytopathology* 37: 21.

- 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.
- Tiwari K. R., Panner G. A., Warkentin T. D. (1997): Inheritance of powdery mildew resistance in pea. *Can. J. Plant Sci.* 77: 307 – 310
- Tiwari K.R., Penner G.A., Warkentin T.D. (1999): Identification of AFLP markers for powdery mildew resistance gene er2 in pea. *Pisum Genet.* 31, 27–29.
- 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 Šafař, Miroslav Griga. Česká republika. Užitný vzor CZ 34578.
- 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, institucionální podpora projektu č. MZE-RO1018 a č. MZE-RO0418 a projektu TAČR č. TN01000062/05.

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.,  
Agritec Plant Research s.r.o.,  
Zemědělská 16,  
78701 Šumperk,  
Tel.: 583382127, ludvikova@agritec.cz



## Transformace hrachu s využitím CRISPR/Cas9 za účelem vytvoření nízkofytátových linií

Pea transformation with the use of CRISPR/Cas9 for the creation of low-phytic pea lines

Ludvíková M., Smýkalová, I.

*Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk*

### Abstrakt

Práce popisuje tvorbu a použití vektorových konstruktů obsahujících expresní kazetu pro CRISPR/Cas9 pro transformaci hrachu setého (*Pisum sativum* L.) za účelem získání nízkofytátových linií. Cílem pro transformaci byl gen pro myo-inositol 3 fosfát syntázu (*mips*), který má klíčovou roli v syntéze kyseliny fytové. Byly vytvořeny 3 různé konstrukty s cílem dosáhnout indukované mutace v tomto genu. Konstrukty byly následně použity pro agrobakteriální transformaci nodálních segmentů z naklíčených semen hrachu, zahrnujících axilární meristémy. Z regenerantů rostoucích na selekčních médiích byly odebrány vzorky pro PCR detekci selekčního genu a oblasti *virG* a současně pro detekci indukované mutace prostřednictvím metody PCR a následné restrikce. Podařilo se prokázat vznik transformovaných rostlin obsahujících reportérový gen *uidA*, nicméně doposud nebyl zachycen vzorek s úspěšně indukovanou mutací.

**Klíčová slova:** hrách, transformace, kyselina fytová, CRISPR/Cas9, *Agrobacterium tumefaciens*

### Abstract

This work describes the creation and use of vector constructs containing an expression cassette for CRISPR/Cas9 for the transformation of pea (*Pisum sativum* L.) in order to obtain low-phytate lines. The target for transformation was the gene for myo-inositol 3 phosphate synthase (*mips*), which plays a key role in the synthesis of phytic acid. 3 different constructs were developed and used to induce mutations in the *mips* gene in peas. These constructs were used for agrobacterial transformation of pea nodal explants. Samples were taken from the regenerants growing on the selection media for PCR detection of the selection gene and the *virG* region and at the same time for detection of the induced mutation by the PCR method and subsequent restriction. The emergence of transformed plants containing the *uidA* reporter gene has been demonstrated, however, a sample with a successfully induced mutation has not been captured yet.

**Key words:** pea, transformation, phytic acid, CRISPR/Cas9, *Agrobacterium tumefaciens*

### Úvod

Hrách je považován za jednu z prvních domestikovaných rostlin na světě spolu s čočkou (*Lens culinaris* Medik.), cizrnou (*Cicer arietinum* L.), vikví hořkou (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) a několika druhy obilovin (Zohary a Hopf, 2000). Studie fylogeografie využívající kombinaci plastidových a jaderných markerů naznačila, že se planý hrách rozšířil z místa svého původu, tedy Středního východu, na východ na Kavkaz, do Íránu a Afghánistánu a na západ do Středomoří (Smýkal et al., 2011).

Hrách zůstává jednou z nejdůležitějších luštěnin mírného pásma. Hrách zahradní (*P. sativum* var. *sativum*) se pěstuje především pro lidskou spotřebu, hrách polní (*P. sativum* var. *arvense*

(L.) Poiret) se tradičně používá pro hospodářská zvířata a jako zelené hnojení. Rod *Pisum* je velmi malý, v současné době zahrnuje pouze dva druhy, *P. sativum* L. a *P. fulvum* Sibth. & Sm. Kyselina fytová je antinutriční faktor způsobující sníženou biologickou dostupnost minerálních prvků, neefektivní využití krmiva a zvýšený obsah fosfátů v exkrementech. Je esterem myo-inositolu a kyseliny fosforečné a používá se pro ni také název fytát nebo inositol-hexakisfosfát (IP<sub>6</sub>). Je hlavní formou zásobního fosforu v semenech rostlin: představuje 50–85 % fosforu v semenech obilovin, olejnin a luštěnin (Irvine, 2005). V místech s vysokou intenzitou živočišné výroby je IP<sub>6</sub> hlavní příčinou znečištění povrchových vod fosfáty. U zvířat s jednoduchým žaludkem není většina kyseliny fytové strávena, s výkaly odchází do kejdy a teprve tam podléhá mikrobiálnímu rozkladu za uvolnění fosfátů. Z toho důvodu se do krmiva prasat a drůbeže často přidává fytasa (Vohra a Satyanarayana, 2003).

Agrobakteriální transformace je nejpoužívanější metodou pro přenos genetické informace do hrachu. První úspěšné pokusy o genetickou transformaci u hrachu byly učiněny v roce 1990 (Puonti-Kaerlas et al., 1990; de Kathen a Jacobsen, 1990). O dva roky později byla publikována analýza přenesené DNA v potomstvu těchto rostlin (Puonti-Kaerlas et al., 1992). Na výše uvedené průkopnické práce později navázaly protokoly optimalizující transformaci hrachu a také publikace týkající se modifikace genomu hrachu „užitečnými“ transgeny, umožňujícími toleranci vůči herbicidům nebo odolnost vůči hmyzu a virům (Shade et al., 1994; Schröder et al., 1995; Chowrira et al., 1998 a další).

Navzdory významnému pokroku dosaženému v agrobakteriální transformaci hrachu a mnoha popsaným metodologickým úpravám, dostupné protokoly nepředstavují zcela rutinní technologii. K nejdůležitějším předpokladům úspěšné genetické transformace patří robustní reprodukovatelný a účinný systém regenerace rostlin (Ludvíková a Griga, 2022).

V posledních letech se u rostlin rozšířilo využití technik tzv. cílené modifikace genomu, za pomoci kterých je možné modifikovat genom na specifickém místě a zabránit náhodné inzerci transgenů, což je odlišuje od tradičních metod transgenoz. Tyto přístupy (nejčastěji CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated genes, TALENs - Transcription Activator-Like Effector Nucleases nebo ZFNs - Zinc Finger Nucleases) jsou proto často skloňovány jako alternativa k metodám klasického šlechtění rostlin a dříve užívaným metodám transgenoz a můžeme nadále předpokládat expanzi v jejich využití.

### **Materiál a metody**

Pro práci byly použity dostupné sekvence genu *mips* u hrachu (Shunmugam et al., 2015). Následovalo navržení primerů, amplifikace a osekvenování genu *mips* u odrůd, které by následně měly být použity pro transformaci.

Konstrukty byly vytvořeny formou služby dr. Hudzieczekem na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně. Obsahují v T-DNA CRISPR kazetu, reportérový gen *uidA* a selekční gen *nptII* pod kontrolou 35S promotoru pro selekci transformovaných rostlin za použití kanamycinu.

Byly vytvořeny tři různé konstrukty vhodné pro technologii úpravy genomu CRISPR/Cas9 (konstrukt pVO106, pVO107 pVO108), přičemž každý z nich cílí na jinou oblast genu myo-inositol-3-fosfát syntázy (*mips*) (v tabulce 2 jsou uvedeny primery pro detekci mutací při použití jednotlivých konstruktů).

Vzniklé konstrukty byly elektroporovány do *Agrobacterium tumefaciens* kmenů EHA105 a GV3101 a použity k transformaci hrachu. Při transformaci bylo postupováno dle metodiky agrobakteriální genetické transformace hrachu vytvořené ve firmě Agritec (Švábová, 2008). Původní metodika byla v průběhu práce dle potřeby modifikována.

Screening transformantů byl proveden během čtyř selekčních cyklů na základě selekčního genu *nptII* (rezistence vůči kanamycinu). Rezistentní explantáty byly testovány pomocí histochemického GUS barvení. Vzorčky GUS pozitivní (obr. 3 a 4) byly použity pro izolaci DNA (pomocí kitu ISOLATE II Plant DNA Kit, Bioline, Meridian Bioscience). Následně byly



prostřednictvím PCR testovány na přítomnost genu *uidA*. Za pomoci amplifikace oblasti *virG* byla vyloučena případná agrobakteriální kontaminace. Sekvence primerů pro amplifikaci genu *uidA* a oblasti *virG* jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Primery pro PCR testování vzorků po transformaci hrachu

Název primeru	Sekvence (5'-3')
GUS F	CTGATAGCGCGTGACAAAA
GUS R	GGCACAGCACATCAAAGAGA
Vir-G-F	AGGCGATCTCCTTAATCAATAG
Vir-G-R	GATAAGAAGAACGTGTTTCAAC

Teplotní profil PCR byl pro obě reakce: 94 °C /3 min + 35x (94 °C /30 s, 55 °C /1 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /10 min.

Vyizolovaná DNA byla použita dále pro PCR amplifikaci a restrikční reakci s restrikčním enzymem odpovídajícím použitému konstrukt (tabulka 2).

Tab. 2: Primery a restriktazy pro detekci mutací indukovaných jednotlivými konstrukty

konstrukt	primery	použitá restriktaza
pVO106	F: ACGAAACCACTGAACTTGTTC R: CGTTGCCCATGAAATACCCC	BshTI
pVO107	F: GGAAATTCATGCTCCCTTCA R: AACACAAGCAATGCCAAACA	Sau96I (Cfr13I)
pVO108	F: GGAAATTCATGCTCCCTTCA R: GATAGCGTTGCTGTTGACCA	PstI

Na základě amplifikace příslušné oblasti genu *mips* a následné restrikce byla zjišťována přítomnost mutace navozené metodou CRISPR/Cas9.

Teplotní profil PCR při použití konstrukt pVO106 a pVO107 byl: 94 °C /7 min + 34x (94 °C /30 s, 55 °C /30 min, 72 °C /40 s) se závěrečnou elongací 72 °C /5 min. Teplotní profil PCR při použití konstrukt pVO108 byl: 95 °C /5 min + 35x (95 °C /30 s, 55 °C /30 min, 72 °C /60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /10 min.

## Výsledky

Byly vytvořeny 3 konstrukty: pVO106, pVO107 pVO108 (obr.1) pro indukci mutace v genu *mips* u hrachu. Bylo provedeno celkem 5 sérií transformací, ve kterých byly postupně použity jednotlivé konstrukty a odrůdy Eso, Protecta a Trendy. Konstrukty byly pro transformaci použity jak jednotlivě, tak ve směsích. V každé pokusné sérii se pracovalo s 250 explantáty.

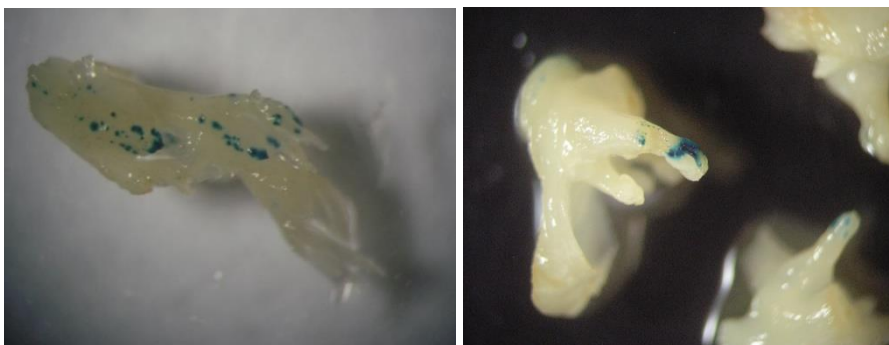
Na základě pozorované transienční exprese reportérového genu *uidA* v transformovaných explantátech testovaných odrůd hrachu byly pro další transformace vybrány odrůda Eso a konstrukt pVO108 (s použitím dvou agrobakteriálních kmenů - EHA105 a GV3101).

Selekce úspěšně transformovaných explantátů probíhala na základě genu *nptII*. Kultura *in vitro* regenerantů byla udržována na médiu s kanamycinem (obr.2) pro vyloučení netransgenních

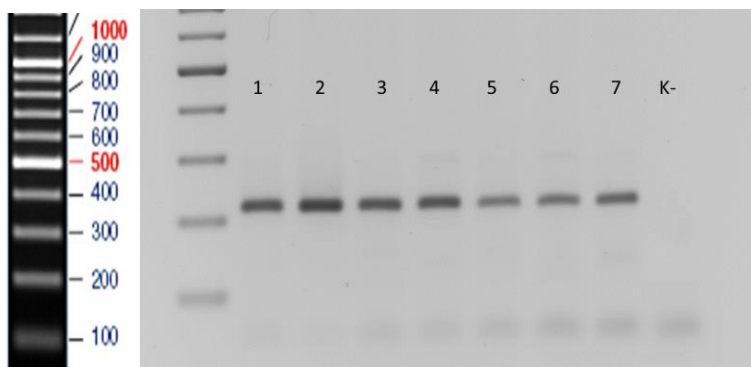




Obr. 2 Explantáty na selekčním médiu



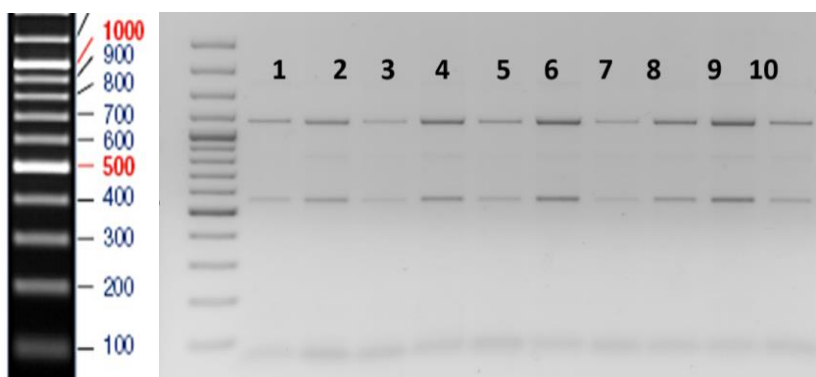
Obr.3 a 4 GUS barvení explantátů rostoucích na selekčních médiích



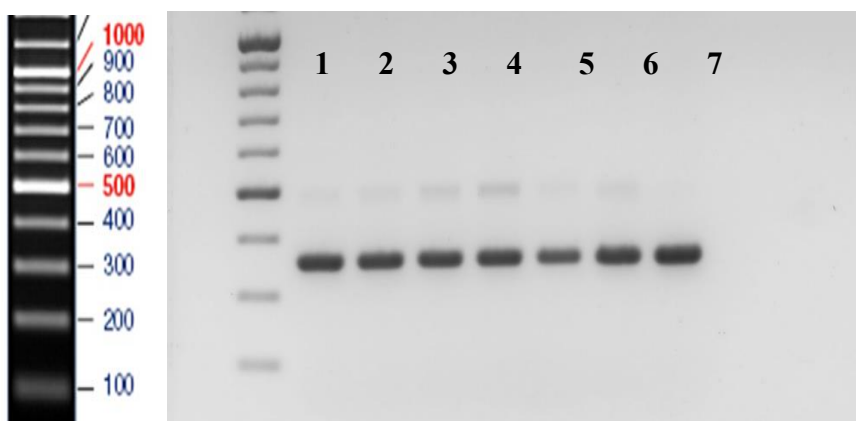
Obr. 5: Výsledek PCR analýzy pro gen uidA. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. - 7. vzorky gus pozitivní na základě PCR, K-negativní kontrola



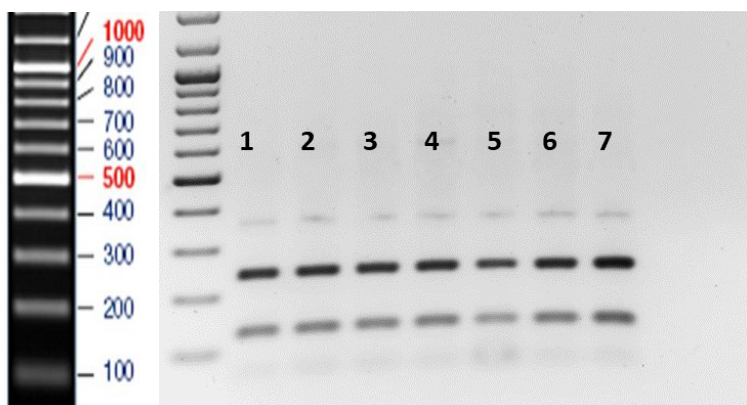
Obr. 6: Detekce mutace indukované konstruktem pVO108: 1. krok: PCR amplifikace genu mips. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1–10 analyzované vzorky



Obr. 7: Detekce mutace indukované konstruktem pVO108: 2. krok – restrikce amplifikovaných fragmentů enzymem PstI. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1–10 analyzované vzorky



Obr. 8: Detekce mutace indukované konstruktem pVO106: 1. krok: PCR amplifikace genu mips. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1–7 analyzované vzorky



Obr. 9: Detekce mutace indukované konstruktem pVO106: 2. krok – restrikce amplifikovaných fragmentů enzymem BshTI. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1–7 analyzované vzorky

## Diskuze

V minulosti bylo popsáno získání nízkofytátových genotypů na základě RNA interference genu *mips* např. u sóji (Nunes et al., 2006) a rýže (Kuwano et al., 2009). V naší práci bylo využito progresivních metod – tzv. „targeted genome editing“ nebo také „New Breeding Technologies – NBT“, pomocí kterých je možné upravit gen zájmu na specifickém místě v genomu. Výhoda metod „targeted genome editing“ oproti klasické transgenozí spočívá v tom, že nedochází k náhodným inzercím transgenů. V práci byla konkrétně použita technika CRISPR/Cas9.

U hrachu bylo doposud její použití popsáno pouze v jediné publikaci (Li et al., 2022). Tento fakt by významně zvyšoval publikovatelnost výsledků, a to i v případě, pokud by byla objevena mutace indukovaná konstruktem, která by neměla vliv na fenotyp. V publikaci Li et al. (2022) autoři popisují dosažení stabilní transformace za použití *Agrobacterium rhizogenes*. Indukovali vznik mutace v genu pro fytoen desaturázu (*PsPDS*) způsobující albinismus. Pro naši práci byl použit kmen *Agrobacterium tumefaciens*.

Na základě sekvence genu *mips* u hrachu byly navrženy vektorové konstrukty obsahující kazetu pro CRISPR/Cas9. U jednotlivých konstruktů byla předpokládána různá míra účinnosti kazety, proto byly pro transformaci použity tři různé varianty konstruktů, které mají různá rozpoznávací místa. Použití většího množství konstruktů může vést k zajímavému srovnání účinnosti jednotlivých konstruktů pro indukci mutací, ale také srovnání efektu těchto indukovaných mutací při fenotypovém projevu.

V případě funkčnosti konstruktů by po úspěšné transformaci hrachu měla vzniknout v genu *mips* mutace, čímž by měla být změněna jeho funkčnost a tudíž i tvorba kyseliny fytové.

Navzdory snaze „zmenšit“ oblast T-DNA (což vede ke snadnějšímu vytvoření „transgene free“ rostlin), byl vedle selekčního genu *nptII* použit i reportérový gen *uidA* (pro GUS). Přítomnost reportérového genu dle našich dosavadních zkušeností zvyšuje pravděpodobnost a rychlost získání transformantů. Možnost získání rostlin s kýženou mutací, nicméně beze stop „cizí“ DNA v genomu, vede k úvahám nad změnou legislativy pro použití technologií programovatelných nukleas.

## Závěr

V rámci této práce byly vytvořeny a pro transformaci hrachu použity konstrukty CRISPR/Cas9. Jedná se o programovatelné nukleasy, účinnou skupinu chimérických enzymů, používaných u celé řady organismů k indukci dvouřetězcových zlomů. Po úspěšné transformaci měla dle předpokladu vzniknout v genu *mips* mutace, přičemž měl být zkoumán její vliv na funkčnost genu.

Pro agrobakteriální transformaci hrachu byly použity tři různé konstrukty, cílící na odlišné oblasti genu *mips* u hrachu. Byly získány transformované explantáty obsahující reportérový gen *uidA*, nicméně dle výsledků restrikce žádný z doposud testovaných vzorků neobsahoval mutaci indukovanou v genu *mips*.

Optimalizací jednotlivých kroků byl získán protokol pro úspěšnou agrobakteriální transformaci hrachu odrůdy Eso. Naším cílem je vytvořit transgenní nízkofytátové (*lpa*) linie hrachu, což však závisí na úspěšné selekci v kultuře *in vitro*.

## Literatura

- DE KATHEN A., JACOBSEN H.-J. (1990): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors. *Plant Cell Reports*, 9: 276–279
- CHOWRIRA G.M., CAVILEER T.D., GUPTA S.K., LURQUIN P.F., BERGER P.H. (1998): Coat protein resistance to pea enation mosaic virus in transgenic *Pisum sativum* L. *Transgenic Research*, 7: 265–271.
- IRVINE R.F. (2005) Inositide evolution - towards turtle domination? *J. Physiol.*, 566: 295–300.
- LI G., LIU R., XU R., VARSHNEY R., DING H., LI M., YAN X., HUANG S., LI J., WANG D., JI Y., WANG C., HE J., LUO Y., GAO S. WEI P., ZONG X., YANG T. (2022): Development of an *Agrobacterium*-mediated CRISPR/Cas9 system in pea (*Pisum sativum* L.), *The Crop Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.04.011>

- LUDVÍKOVÁ M., GRIGA M. (2022): Pea transformation: History, current status and challenges. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 58, (3): 127–161 <https://doi.org/10.17221/24/2022-CJGPB>.
- PUONTI-KAERLAS J., ERIKSSON T., ENGSTROM P. (1990): Production of transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 246–252.
- PUONTI-KAERLAS J., ERIKSSON T., ENGSTROM P. (1992): Inheritance of a bacterial hygromycin phosphotransferase gene in the progeny of primary transgenic pea plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 443–450.
- SHADE R.E., SCHROEDER H.E., PUEYO J.J., TABE L.M., MURDOCK L.L., HIGGINS T.J.V., CHRISPPEELS M.J. (1994): Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology*, 12: 793–795.
- SHUNMUGAM A. S. K., BOCK C., ARGANOSA G.C., GEORGES F., GRAY G.R., WARKENTIN T.D. (2015): Accumulation of phosphorus-containing compounds in developing seeds of low-phytate pea (*Pisum sativum* L.) mutants. *Plants*, 4, 1–26.
- SCHROEDER H.E., GOLLASCH S., MOORE A., TABE L.M., CRAIG S., HARDIE D.C., CHRISPPEELS M.J., SPENCER D., HIGGINS T.J.V. (1995): Bean [alpha]-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*, 107: 1233–1239.
- SMÝKAL P., KENICER G., FLAVELL A., CORANDER J., KOSTERIN O., REDDEN R., ELLIS N. (2011): Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, 9: 4–18.
- ŠVÁBOVÁ L. (2008): Metodika agrobakteriální genetické transformace hrachu (*Pisum sativum* L.). Šumperk: Agritec Plant Research v nakl. Agritec, ISBN 978-80-903868-7-7.
- VOHRA A., SATYANARAYANA T. (2003): Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23: 29–60.
- ZOHARY D., HOPF M. (2000): *Domestication of Plants in the Old World*. 3rd Ed., Oxford, University Press., ISBN: 0198503563.

### Dedikace

Příspěvek byl financován za podpory Ministerstva zemědělství ČR, grant QK1810072 a MZE-RO1018.

### Kontaktní adresa:

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.,  
Agritec Plant Research s.r.o.,  
Zemědělská 16,  
78701 Šumperk,  
Tel.: 583382127, [ludvikova@agritec.cz](mailto:ludvikova@agritec.cz)



## G. J. Mendel a jeho meteorologické aktivity

G. J. Mendel and his meteorological activities

Rožnovský Jaroslav<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně

<sup>2</sup>Český hydrometeorologický ústav, pobočka Brno

### Abstrakt

Gregor Johann Mendel se svým rozsáhlým vědeckým bádáním zapsal do dějin vědy nejen objevem genetických zákonitostí, ale také aktivitami v dalších oborech, zvláště v meteorologii. Meteorologická měření vedl nejdříve jako pomocník dr. Olexíka, v areálu nemocnice u sv. Anny. Svá měření samostatně prováděl v areálu Opatství na Starém Brně. Byl nejen pozorovatelem rakouské meteorologické služby, ale svých znalosti fyziky, které získal během svých studií na vídeňské univerzitě, využil při zpracování meteorologických dat a v hodnocení meteorologických procesů. Zasloužil se také o rozšíření meteorologických stanic na Moravě. Snažil se o předpovědi počasí a jejich specifikaci pro zemědělce. Z jeho uváděných 13 publikací je 9 věnováno meteorologii. Byl také aktivní v odborných spolcích.

**Klíčová slova:** meteorologická pozorování, předpověď počasí, větrná smršť, zpracování dat

### Abstract

With his extensive scientific research, Gregor Johann Mendel made a mark not only with the discovery of genetic laws, but also with his activities in other fields, especially in meteorology. Meteorological measurements were first conducted as an assistant to dr. Olexíka, in the area of the hospital near St. Anne. He carried out his measurements independently in the premises of the Abbey in Staré Brno. He was not only an observer of the Austrian Meteorological Service, but he used the knowledge of physics he acquired during his studies at the University of Vienna in the processing of meteorological data and in the evaluation of meteorological processes. He was also responsible for the expansion of meteorological stations in Moravia. He worked on weather forecasting and its specification for farmers. Of his reported 13 publications, 9 are devoted to meteorology. He was also active in professional associations.

**Keywords:** meteorological observations, weather forecast, wind storm, data processing

### Úvod

Mezi světově uznávané vědce patří jednoznačně Gregor Johann Mendel, kterého se zvláštní pozorností vzpomínáme v letošním roce. Je to dáno tím, že 20. července uběhlo 200 let od jeho narození. G. Mendel se zapsal do dějin vědy jako geniální genetik. Nejen v místě jeho objevů a celoživotní činnosti, tedy v Brně, ale v mnoha místech ve světě se toto výročí vzpomínalo formou přednášek, výstav, konferencí a dalších akcí věnovaných genetice. Ovšem stále velký údiv a překvapení vyvolává konstatování, že se tento brněnský opat augustiniánského kláštera v době svého plodného vědeckého bádání označoval za meteorologa. Tuto skutečnost dokládají záznamy jeho meteorologických pozorování, které vlastnoručně nejen zapisoval, ale také vyhodnocoval a publikoval. S ohledem na rozsah jeho meteorologické činnosti, můžeme zcela odpovědně říci, že meteorologii věnoval významnou část ze všech svých dalších vědeckých aktivit. Cílem tohoto článku je připomenout si činnosti tohoto geniálního vědce v meteorologii, které se v podstatě věnoval krátce po příchodu do Brna.

Současně je nutné zdůraznit, že celá jeho vědecká činnost probíhala v augustiniánském řádu, že byl mnich a opat. Je logické, že se zaměřujeme na vědecké aktivity G. J. Mendela, ale měli bychom vidět celou jeho osobnost. Tedy člověka, který usiloval o vzdělání, byl pracovitý,

cílevědomý, měl organizační schopnosti. Možná bych mohl dnešním slovníkem říci, že byl dobrý manažer, že přes svou vědeckou aktivitu vnímal také oblast finanční, kdy se jako opat velmi důrazně stavěl proti tlaku vídeňského dvora, aby kláštery platily daně.

Stále však musíme mít na paměti, že byl věřící křesťan. Jeho život i dílo tak představuje bezkonfliktní propojení víry a vědy. Připomínám tuto skutečnost proto, abychom při hodnocení odkazu G. J. Mendela dnešní době na ni pamatovali.

### **Vzdělání**

Většinou se do popisu vzdělání návštěva základní školy neuvádí, ale u G. J. Mendela je to vhodné. Jeho učitel Thomas Makitta a farář z Dolního Vražného, Jan Schreiber, ve výuce věnovali zvláštní pozornost přírodopisu, využívali ve výuce školní ovocnou zahradu a včelín, které žáka Johanna Mendela zaujaly. V letech 1833-1834 absolvoval piaristickou školu v Lipníku nad Bečvou, kde prokazoval velké teoretické znalosti. Potom absolvoval šest tříd na gymnáziu v Opavě, a to s vynikajícím prospěchem. Ale jeho otec se v roce 1838 při robotě v lese vážně zranil a rodina neměla dost peněz na platby studií. Ale G. J. Mendel se rozhodl pokračovat ve studiích. Finance na studium si zajišťoval doučováním. Ovšem tuto zátěž jeho zdraví nevydrželo, a tak díky celkovému vyčerpání vážně onemocněl a musel studium přerušit. Přesto v roce 1840 ukončil gymnázium s nejlepším prospěchem a zapsal se ke studiu na Filozofickém ústavu olomoucké univerzity. Ale znovu se připomnělo jeho slabší zdraví a studium pro nemoc přerušil. Ale hned v následujícím roce se opět ke studiu vrátil s tím, že si na něj musel přivydělávat. Pomohla mu též jeho mladší sestra Terezie, která se zřekla části svého věna v jeho prospěch. Ale i tak finanční problémy pokračovaly, takže po poradě s profesorem fyziky, Friedrichem Franzem, vstoupil do Augustiniánského kláštera v Brně. Jako novic přijal jméno Gregor. A od té doby se podepisoval už jen jako Gregor Mendel. Díky podpoře od opata Nappa, který si ho velmi oblíbil, měl v klášteře příznivé podmínky pro své vědecké aktivity a rozvoj svého talentu. V roce 1845 G. J. Mendel zahájil studia na brněnské Teologické fakultě, ale také navštěvoval přednášky o pěstování ovoce a o vinařství. Přednášky vedl profesor Franz Diebl, který psal o šlechtění rostlin. Ve čtvrtém ročníku navštěvoval přednášky o zemědělství. V roce 1847 byl vysvěcen na kněze a v červnu následujícího roku absolvoval fakultu a začátkem srpna se stal duchovním v nemocnici U sv. Anny. Službu u nemocných, často umírajících, G. J. Mendel velmi těžce nesl, takže se opět přihlásily zdravotní problémy. Opat Napp ho zprostil této služby a nabídl mu učitelské místo na gymnáziu ve Znojmě. Zde G. J. Mendel, vyučoval řečtinu, latinu, němčinu a matematiku. Po roce mu ředitel školy doporučil, aby na univerzitě ve Vídni složil učitelskou zkoušku, a mohl tak mít trvalé učitelské místo.

Jako domácí písemná práce z fyziky mu bylo zadáno téma meteorologické s názvem "Ukázat mechanické a chemické vlastnosti atmosférického vzduchu a z nich vysvětlit vznik větrů". Písemnou práci odevzdal v červenci 1850 a byla hodnocena kladně. Ovšem neprospěl u zkoušky z přírodopisu. Navzdory neúspěchu při zkoušce ve Vídni byl na jaře povolán na dva měsíce suplovat přednášky z přírodních věd na brněnském Technickém učilišti za onemocnělého profesora Jana Helceleta. I zde byl jako učitel velmi úspěšný. Opat F. C. Napp nadále podporoval Mendela v úsilí o dosažení dalšího odborného vzdělání, a tak v roce 1851 opět nastoupil na vídeňskou univerzitu, kde se mimo jiné seznámil s kombinatorikou, které potom využil při vyhodnocení svých pokusů s křížením. Studium ukončil v roce 1853. Poté jako suplující učitel přírodopisu a fyziky působil na tehdejší německé vyšší reálce v Brně, kde bylo oceňováno jeho mimořádně dobré pedagogické působení.

### **Meteorologická měření**

Na petici Přírodovědeckého spolku v Brně z r. 1870 při návrhu na zřízení moravské univerzity má Mendel jako odbornost uvedeno meteorolog (Kříženecký, 1965). Zcela reálně můžeme



uvést, že na rozdíl od svých genetických poznání, kde se za života nedočkal uznání, byly jeho meteorologické podklady a studie známy a jeho názory byly vyžadovány.

Na otázku jaké byly Mendelovy aktivity v meteorologii, můžeme odpovédět, že bohaté, odpovídající jeho stylu vědecké práce, tedy od základního pozorování a měření, přes zpracování dat po publikování výsledků (Seiner, 1965). V archivu Českého hydrometeorologického ústavu na brněnském pracovišti jsou jeho rukou psané záznamy z meteorologických měření.

Tyto jsou součástí souvislých meteorologických pozorování a měření brněnské řady (Štěpánek 1998). Na našem území je nejdelší doba meteorologických měření v pražském Klementinu, které má souvislou teplotní řadu od roku 1775. V Brně jsou souvislá meteorologická data od 1. ledna 1848 díky meteorologickým měřením, která vedl dr. Paul Olexík ve všeobecné nemocnici sv. Anny (Vitásek, 1952). G. J. Mendel byl blízkým přítelem dr. Olexíka a s meteorologickými měřeními mu na jeho stanici vypomáhal. Předpokládá se, že G. J. Mendel již během spolupráce s dr. Olexíkem prováděl souběžná měření v klášteře, podle některých názorů již od roku 1857 (Orel, 1965). Mendelova samostatná měření jsou od 1. ledna 1879 do července 1883 (Liznar, 1886). Tento poslední měsíční výkaz je na Obr. 1. Můžeme říci, že G. J. Mendel měřil takřka do konce svého života.

The image shows two pages of a handwritten meteorological observation record. The left page is titled "Meteorologische Beobachtungen" and contains a detailed table of daily measurements from July 1st to July 31st, 1883. The table includes columns for barometric pressure (Barometer), wind direction and force (Windrichtung und Stärke), temperature at various heights (Temperatur der Luft, in Höhe von ...), and humidity (Feuchtigkeit). The right page continues the table and includes a summary of the month's observations, such as the number of observations (Zahl der beobachteten Windrichtungen und Windstärken) and wind directions (Windrichtung). The handwriting is in cursive, and the paper shows signs of age.

Obr. 1 Poslední měsíční výkaz meteorologického pozorování (červenec 1883) psaný G. J. Mendelem

Podle všeho máme také dochovanou plechovou meteorologickou budku a teploměry z období jeho měření. Při úpravách v areálu Opatství byla nalezena z části poničená budka, ve které se zachovaly rtuťové teploměry, které byly navíc nepoškozeny, a sloupec rtuti byl zcela jasný, tedy kapilára nebyla rtuť znečištěna, jak je po delším užívání u meteorologických teploměrů běžné (Obr. 2).



Obr. 2 Meteorologický teploměr od firmy Kappeller

Ve znaleckém posudku odborného pracovníka Technického muzea v Brně, Jaroslava Pipota, se uvádí, že obdobné teploměry, jako byl jeden z hodnocených teploměrů, vídeňská firma Kappeller vyráběla již v roce 1854 a odhaduje se, že tento teploměr pochází z druhé poloviny 19. století. Přitom od firmy Kappeller používal teploměry již dr. Olexík (Kopec, 1970). Tyto měly teplotní stupnici podle Réaumura. Tato již nepoužívaná teplotní stupnice byla sestavena Réaumurem v roce 1730 tak, že bod varu vody byl při hodnotě 80 °R. Takže srovnání se stupnicí Celsiovou platí, že  $t (^{\circ}\text{R}) = 4/5 t (^{\circ}\text{C})$  a naopak  $t (^{\circ}\text{C}) = 5/4 t (^{\circ}\text{R})$ . Opravená plechová budka s uvedenými teploměry je součástí sbírky Mendelova muzea Masarykovy univerzity.

Již bylo uvedeno, že během svého života publikoval Mendel 13 prací, z nichž 9 je věnováno meteorologii. Je doloženo, že G. J. Mendel z měření dr. Olexíka sestavil přehledné měsíční tabulky a grafy teploty a tlaku, které dr. Olexík přikládal ke svým odesílaným výkazům pozorování.

Ve výroční zprávě pro rok 1862 Přírodovědeckého spolku v Brně uvádí publikaci "Bemerkungen zu der graphisch-tabellarischen Uebersicht der meteorologischen Verhältnisse von Brünn" (Poznámky ke graficko-tabelárnímu přehledu meteorologických poměrů Brna). Významná je jeho poznámka, že v centru města jsou vyšší teploty vzduchu než na jeho okrajích. Jde o upozornění na jev, který dnes rozsáhle studujeme a nazýváme ho odborně tepelný ostrov městů. Až po více jak dvaceti letech se tento poznatek stává předmětem zájmu meteorologů a klimatologů (Dobrovolný et al. 2012, Litschmann a Rožnovský, 2012).

Od roku 1863 publikuje výsledky zpracovaných meteorologických měření v jednotlivých letech jako Meteorologická pozorování z Moravy a Slezska postupně pro roky 1863, 1864, 1865, 1866, 1869 (Meteorologische Beobachtungen aus Mähren und Schlesien für das Jahr 1863 atd.). Na Mendelův popud byly již roku 1865 v činnosti meteorologické stanice v Těšíně, Hukvaldech, Hranicích, Bystřici pod Hostýnem, Kroměříži, Šumperku a Dačicích.

Z jeho vydaných 13 publikací je 9 s meteorologickou tematikou, které jsou následně uvedeny:

- 1) Bemerkungen zu der graphisch-tabellarischen Uebersicht der meteorologischen Verhältnisse von Brünn: Verh. naturforsch. Ver. Brünn 1, 1862 (1863) Abh. S. 246-249.
- 2) Meteorologische Beobachtungen aus Mähren und Schlesien für das Jahr 1863: Ebenda 2, 1863 (1864) Abh. S. 99-121.
- 3) Meteorologische Beobachtungen aus Mähren und Schlesien für das Jahr 1864: Ebenda 3, 1864 (1865) Abh. S. 209-220.
- 4) Meteorologische Beobachtungen aus Mähren und Schlesien für das Jahr 1865: Ebenda 4, 1865 (1866) Abh. S. 318-330.

- 5) Meteorologische Beobachtungen aus Mähren und Schlesien für das Jahr 1866: Ebenda 5, 1866 (1867) Abh. S. 160-172.
- 6) Meteorologische Beobachtungen aus Mähren und Schlesien für das Jahr 1869: Ebenda 8, 1869 (1870) Abh. S. 131-143.
- 7) Die Windhose vom 13. October 1870: Ebenda 9, 1870 (1871) Abh. S. 229 bis 246. - Nochmals: Ebenda 49, 1910 (1911) Abh. S. 54-71.
- 8) Regenfall und Gewitter zu Brünn im Juni 1879: Z. österr. Ges. Meteorol. 14 (1879) S. 315-316.
- 9) Gewitter in Brünn und Blansko am 15. August: Ebenda 17 (1882) S. 407 bis 408.

### **Větrná smršť**

Brnem se 13. 10. 1870 přehnal větrná smršť, která poškodila i část kláštera. G. J. Mendel se jejímu výskytu a podstatě podrobně věnoval. O své analýze smršti nejdříve přednášel 9.11. 1870 na zasedání Přírodovědeckého spolku. Následně své poznatky podrobně popsal v práci Die Windhose vom 13. October 1870 (Větrná smršť z 13. 10. 1870). Odborníky je tato práce vysoce hodnocena (Nalivkin, 1969), protože je uváděna velmi kvalifikovaná analýza fyzikální podstaty a projevů smršti, která se vyskytla jednak ve velmi neobvyklou dobu a navíc zanechala velmi rozsáhlé následky. V publikaci je mimo projevů smrště věnována pozornost i elektrickým projevům. Není nadsázkou, že obdobně jsou tyto vlastnosti popisovány i v současných fyzikálních analýzách (Bednář a Zikmunda, 1985). Pro přiblížení je uveden výňatek z článku: „Šířka dráhy, kterou tromba urazila, se dá docela dobře odhadnout podle způsobených škod. Především je zajímavé, že tato šíře (průměr tromby) se postupně zvětšovala. Asi 100 m od mlýnského náhonu v Pisárkách, kde tromba zanechala první stopy, se dá její záběr lehce určit, protože postupovala napříč stromořadím, které lemuje oba břehy řeky Svratky. Její průměr zde nečinil ani 170 m. U starobrněnského kláštera však již dosáhl asi 190 až 200 m a u nádraží dokonce asi 210 až 220 m. Shora zmíněný šestimetrový pruh se nachází přesně uprostřed dráhy. Rychlost jejího postupu nad budovou kláštera se dá přibližně odhadnout. Poněvadž zde její průměr činil asi 190 m a její trvání je odhadnuto na 4 až 5 sekund, vyplývá z toho postup asi 40 až 45 m/s, neboli přibližně 135 až 170 km/h, tedy rychlost téměř třikrát větší než rychlost našich železnic, rovná rychlosti našich nejprudších vichřic.

Pro určení rychlosti rotace tromby mi chybí spolehlivé vodítko. V její viditelné části však rozhodně nebyla příliš velká, poněvadž bylo patrné, že předměty vržené do spodního kužele vystupovaly ve velmi protažených spirálách. To bylo velmi zřetelně vidět na střídavě světle a tmavě zbarvených masách prachu, které byly vytaženy až do špičky. Ve srovnání s okrajem však musela být naopak dosti velká, poněvadž předměty vyzdvižené vírem do výšky byly velkou silou vrženy pryč. Z této okolnosti soudím, že rychlost rotace byla menší než rychlost postupu a pro okrajové části bych ji odhadoval na 20 až 27 m/s“, konec citace. Převzato z publikace Munzar (1998).

Z hlediska společenského je nutné ocenit, že se k výrokům o smršti jako díle d'ábla vyjádřil ve smyslu, že tito lidé neznají fyziku. Což bylo na tehdejší dobu velmi odvážné. V určitém pohledu lze říci, že jako v případě geniálního objevu zákonitosti křížení i popis smrště zůstal bez povšimnutí odborníků.

### **Pokusy s předpovědí počasí**

G. J. Mendel byl aktivním meteorologem, měl fyzikální vzdělání, takže znal podstatu mnohých procesů v atmosféře. Ale také vnímal vliv průběhu počasí na přírodu a vzhledem ke svým zemědělským kořenům si byl vědom významu předpovědi počasí. To, co stále platí i v dnešní době - naše snaha o využití poznatků meteorologie pro různé obory lidské činnosti, včetně vlivů na lidské zdraví. Je tedy logické, že G. J. Mendel to vše vnímal a o možnost předpovědi se nejen zajímal, ale sám se snažil předpovědi vydávat. Byl si vědom významu počasí pro zemědělství

a podporoval vydávání předpovědí počasí pro zemědělce. Proto podpořil vydávání krátkodobých předpovědí počasí tehdejší Ústředním ústavem pro meteorologii a zemský magnetismus ve Vídni. Tyto předpovědi byly rozšiřovány telegrafem předplatitelům, kteří je potom předávali dalším zájemcům. Tehdejší ministerstvo orby zřídilo jakýsi institut místních vykladačů, kteří obecnou předpověď upravovali a rozesílali ve formě telegramů jednotlivým zájemcům. V obcích byla zavedena jednoduchá signalizace, např. vyvěšováním vlajek nebo košů. G. Mendel se snažil sestavit vlastní předpovědi počasí na tři dny, ale v podstatě neúspěšně. Když si představíme, jaké měl k dispozici informace, a srovnáme s dnešními, tak jde o velký nepoměr. Při hodnocení této činnosti si musíme uvědomit, že mu byla jasná fyzikální podstata předpovědi počasí, že si uvědomoval rozsah a význam této nově se rodící části meteorologie, kterou dnes nazýváme synoptikou.

### **Odborné aktivity**

Jak bylo uvedeno, meteorologická činnost G. J. Mendela byla rozsáhlá. Měl také zájem o využití meteorologie v dalších oborech, jak dokládají jeho aktivity v odborných společnostech. Již v roce 1851 vstupuje 23. 7. do přírodovědecké sekce Moravskoslezské společnosti pro zvelebování orby, přírodoznalství a vlastivědy (zkráceně Moravskoslezská hospodářská společnost). O rok později se stává členem ovocnicko-vinařské a zahradnické sekce této společnosti. O jeho váženosti svědčí, že v roce 1871 byl zvolen do výboru Moravskoslezské hospodářské společnosti a v roce 1882 byl navržen na funkci předsedy. Za člena Zoologicko-botanického spolku ve Vídni byl přijat 5. 1. 1853. Je spoluzakladatelem Přírodovědeckého spolku v Brně, který vzniká 21. 12. 1861, v němž se představuje jako meteorolog. Známá je jeho aktivita ve Včelařském spolku v Brně, ve kterém později zastával funkci místostarosty a byl navržen na funkci starosty. Ovšem G. J. Mendel patřil k významným osobnostem tehdejší rakousko-uherské meteorologie. Byl zakládajícím členem Rakouské meteorologické společnosti ve Vídni.

Osobnost G. J. Mendela je uznávána celosvětově, jeho jméno nese antarktická stanice Masarykovy univerzity. Jeho dílo tvoří sice základy genetiky, ale sehrává též významnou roli v meteorologii. Z mnoha jeho odkazů nejen současným vědcům je nutné uvést, že svou vědeckou aktivitu G. J. Mendel spojoval vždy s dalšími odbornostmi, dnes bychom řekli, že spolupracoval s praxí.

### **Závěr**

Meteorologické činnosti Gregora Johanna Mendela významně přispěly k rozvoji meteorologie v několika směrech. Jeho osobní měření se stala součástí dlouhodobé řady meteorologických dat z území města Brna. Zasloužil se o rozvoj meteorologických pozorování na dalších místech na území Moravy. Doložil své znalosti meteorologických procesů odborně uznávanou studií o smršti na území města Brna 13. 10. 1870.

Nejen, že podpořil rozvoj předpovědí počasí, ale sám se pokoušel o jejich sestavení, byť neúspěšně. Uvědomoval si význam předpovědí pro zemědělství, které též studoval. Svě znalosti předával nejen v rámci odborných aktivit, ale také jako středoškolský profesor. Podle dokladů byl uznávaným pedagogem.

Při hodnocení jeho odkazu si musíme vždy uvědomovat, že byl opatem augustiniánského řádu, tedy současně vědcem a křesťanem. Jako představitel řádů a vědec dokázal své nejen řídicí, ale tak finanční schopnosti. Dokladem je, že byl mimo jiné též předsedou bankovní rady.

Odkaz G. J. Mendela však není jen v odborných aktivitách, ale v celkovém přístupu k vědě. Přesto, že neuspěl u zkoušky na vídeňské univerzitě, jsou doložitelné doklady o jeho studijním úsilí jak na střední škole, tak na univerzitě. Pro dnešní vědu, která má k dispozici zcela nesrovnatelně vyspělou techniku, však stále platí Mendelův odkaz vnímání procesů v přírodě jako celku, jako složitému systému propojení mezi jednotlivými poznatky a vědními obory .



Abychom na Mendelovu meteorologickou činnost nezapomínali, byla mimo akcí k jeho významným výročím zajištěna meteorologická měření v areálu Opatství. Doklady o jeho meteorologických měřeních jsou také součástí expozice v Mendelově muzeu. Svým způsobem je stálou připomínkou jeho meteorologických aktivit pojmenování české antarktické stanice jeho jménem.

## Literatura

- Bednář, J. A O. Zikmunda. *Fyzika mezní vrstvy atmosféry*. Praha: Academia, 1985, 248 s.
- Dobrovolný, P., L. Řezníčková, R. Brázdil, L. Krahula, P. Zahradníček, M. Hradil, M. Doležalová, M. Šálek, P. Štěpánek, J. Rožnovský, H. Valášek, K. Kirchner A J. Kolečka. 2012, *Klima Brna. Víceúrovňová analýza městského klimatu*. Brno: Masarykova univerzita, 200 s. ISBN 978-80-210-6029-6.
- Kopec, R. J. 1970: Further observations of the urban heat island in a small city. Bulletin American meteorological Society, Vol. 51, No. 7, s. 602-606
- Kříženecký J, 1965: Gregor Johann Mendel 1822–1884, Texte und Quellen zu seinem Wirken und Leben, Johan Ambrosius Barth Verlag, Leipzig 1965. 198.
- Litschmann, T., Rožnovský, J., 2012. Zhodnocení indexu HUMIDEX na území města Brna. 20<sup>th</sup> International Poster Day Transport of Water, Chemicals and Energy in the Soil-Plant-Atmosphere System, Bratislava, 15. 11. 2012, ISBN 978-80-89139-28-6
- Liznar J, 1886: Ueber das Klima von Brünn. Sonder-Abdruck aus dem XXIV. Bande der Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Brno, 70.
- Mendel G.: *Die Windhose vom 13. October 1870*. *Verh. naturf. Ver.* **9** (1870), Brünn 1871, 229.
- Meteorologický slovník výkladový a terminologický (eMS), ČMeS, dostupný na: <http://slovník.cmes.cz>
- Munzar J, 1998: Gregor Mendel and the Tornado in Brno on 13th October, 1870, p.53-60. Moravian geographical reports, Vol. 6, no. 1.
- Nalivkin D. V.: *Uragany, buri i směrči*. Nauka, Leningrad 1969, 487.
- Orel V, 1965: Gregor Mendel- zakladatel genetiky, populárně vědecký sborník, Blok 1965. 206 s.
- Sainer J, 1965: Gregorii Mendel, Autobiographia Iuvenilis, De Gregorii Mendel vita et doctrina, Universitas Purkyniana Brunensis, Brno 1965
- Štěpánek P, 1998: *Metody analýzy kolísání teploty vzduchu a srážek na příkladu Brna*. Brno, 120. Diplomová práce. Katedra geografie, PřF MU.
- Vitásek F, 1952: Počátky moravské geografie. Spisy vydávané přírodovědeckou fakultou Masarykovy university v Brně.

## 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, e-mail: [roznov@mendelu.cz](mailto:roznov@mendelu.cz)



**ZVT** | Zemědělský výzkum,  
spol. s r.o. Troubsko

## Stanovení diverzity genetických zdrojů hořčice na základě analýzy mikrosatelitů

Assessment of the diversity of mustard genetic resources based on microsatellite analysis

Stehlíková D., Jozová E., Čurn V.

Jihočeská univerzita České Budějovice

### Abstrakt

*Brassica nigra* je zdrojem užitečných vlastností pro šlechtitele plodin rodu *Brassica*. O rozsahu a rozložení genetické variability u *B. nigra* je však známo jen málo a bylo vyvinuto jen málo markerů, které by tuto variabilitu popisovaly. Při počátečním průzkumu variability u *B. nigra* jsme použili 13 markerů amplifikovaných fragmentů DNA založených na SSR. Obsáhlá kolekce genetických zdrojů představovala 28 registrovaných odrůd, krajových odrůd a šlechtitelských materiálů. Mikrosatelity generovaly 51 polymorfních alel. Na základě PCO analýzy byly tři odrůdy vzdálené od hlavního clusteru. Tento výsledek naznačuje, že odrůdy s různými alelami mohou být buď taxonomicky chybně zařazené nebo smíšené odrůdy.

**Klíčová slova:** mikrosatelitové markery, šlechtění rostlin, *Brassica nigra*

### Abstract

*Brassica nigra* is a source of useful traits for breeders of major *Brassica* crops. However, little is known about the extent and distribution of genetic variation in *B. nigra*, and few markers have been developed to describe this variation. In an initial survey of variation in *B. nigra*, we used 13 amplified DNA fragment markers based on SSR. The comprehensive collection of genetic resources represented 28 registered varieties, landraces, and breeding materials. Microsatellites generated 51 polymorphic alleles. Based on PCO analysis three varieties were distant from main cluster. This result suggests that varieties with different alleles may be either misclassified taxonomically or mixed varieties.

**Keywords:** Microsatellite markers, plant breeding, *Brassica nigra*

### Úvod

Hořčice je v současné době celosvětově třetí nejrozšířenější olejninou. Semena hořčice poskytují olej pro průmyslové i kuchyňské účely. Pokrutiny po lisování oleje obsahují vysoký obsah bílkovin (37 %) a dalších nutričně cenných látek, které jsou velmi chutné pro hospodářská zvířata. Hořčice je nejen významnou olejninou, ale patří i mezi nejstarší a nejoblíbenější pochutiny na světě. I vzhledem ke svému významu je hořčice intenzivně šlechtěna. A právě v důsledku zaměření šlechtění na výnos, biomasy, oleje a jeho kvalitativní parametry dochází i u hořčice k zužování genetické variability (Iqbal et al. 2015; Raza, 2020). Aby se předešlo problémům vyplývajícím z nízké úrovně genetické variability a byla zachována genetická rozmanitost genetických zdrojů tohoto druhu je ve šlechtění nutný správný management genetických zdrojů rostlin a je nutný i vhodný výběr genotypů hořčice do šlechtitelských programů. Hodnocení diverzity v markerových lokusech je v současné době nejproveditelnější strategií pro charakteristiku diverzity mezi hořčicemi. Molekulární markery nabízejí nejlepší odhad genetické diverzity, protože jsou nezávislé na vlivu environmentálních faktorů. Pro pochopení původu a evoluce druhu *Brassica nigra* byly použity markery s jednoduchými sekvenčními opakováními (SSR) (Havlíčková et al. 2014).

Cílem této studie bylo provést analýzu molekulárních markerů (SSR) v kolekci genetických zdrojů hořčice černé, *B. nigra*, vyhodnotit míru genetické diverzity mezi vybranými vzorky *B. nigra* a posoudit stabilitu a vyrovnanost analyzovaných genetických zdrojů.

**Materiál a metodika**

Pro hodnocení genetické diverzity bylo celkem analyzováno 28 genetických zdrojů druhu *B. nigra* (hořčice černá). Jednalo o staré krajové odrůdy, ale i odrůdy moderní a novošlechtění, pocházejících z různých oblastí, zejména pak Evropy. Seznam použitých genetických zdrojů je uveden v Tabulce 1.

Z vysušených vzorků děložních listů byla extrahována DNA pomocí modifikované CTAB metody (Doyle 1991), dle metodiky standardně využívané na pracovišti Katedry genetiky a biotechnologií, FZT, JU v Českých Budějovicích. Kvalita a koncentrace DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru BiospecNano (Shimadzu) a dále upravena tak, aby všechny vzorky DNA měly hodnotu 200 ng/μl.

Tabulka 3: Seznam použitých vzorků genetických zdrojů hořčice černé

číslo lab	ECN	název	původ
159	15O0600001	Alsaska	-
160	15O0600002	Balkan 1942:511	-
161	15O0600004	Hneda	DEN
162	15O0600006	Primus	-
163	15O0600007	Rumunská	-
164	15O0600008	Sizaja	SSSR
165	15O0600009	BRSCHW 22531	-
166	15O0600010	BRSCHW 22533	-
167	15O0600011	BRSCHW 22537	GER
168	15O0600012	BRSCHW 22530	-
169	15O0600013	BRSCHW 22538	-
170	15O0600014	BRSCHW 22539	-
171	15O0600016	N 26A95	-
172	15O0600017	N 13A95	-
173	15O0600018	N 28A94	-
174	15O0600019	N 2A94	-
175	15O0600020	N 39A94	-
176	15O0600021	N 2A95	-
177	15O0600022	Junius	GER
178	15O0600023	RCAT 040343	FIN
179	15O0600024	RCAT 040344	GER
180	15O0600025	RCAT 040347	NED
181	15O0600026	RCAT 040348	POL
182	15O0600027	RCAT 069393	GER
183	15O0600028	BGRC 34177	GREECE
184	15O0600030	Lu De No 2	-
185	15O0600031	Dirk	-
186	15O0600032	BGRC 34253	-

Jako molekulární markery použitelné pro odhad míry genetické diverzity byly zvoleny mikrosatelity (SSR), které mají vysokou vypovídací schopnost a výsledky analýz jsou opakovatelné. Analyzované markery byly převzaty dle metodik Louarn a kol. (2007) a Cui a kol. (2008). Tyto markery jsou specifické pro rod *Brassica* a vykazují dostatečnou míru



polymorfismu, pomocí čehož je možné odlišit nejen jednotlivé druhy, ale také jednotlivé odrůdy. Celkem bylo použito 11 mikrosatelitových markerů: BoREM1b, BoIAB19TF, BoPC34, P381, D3, D12, D11, P7, P9, P30 a P35. Do každé PCR reakce byly použity tři primery. Klasický reverse primer, značený univerzální primer a forward primer prodloužený o sekvenci značeného primeru. Reakce probíhala za těchto podmínek: celkový objem reakce byl 10  $\mu$ l; složení reakční směsi: 1x reakční pufr (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% Tween 20, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu$ M dNTPs), 10 pmol každého primeru (Tabulka 2), 0,5 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ), 2x BSA a 50 ng templátové DNA. Amplifikace proběhla na termocycleru Biometra TProfessional při následujícím teplotním profilu: počáteční denaturace 5 min při 94 °C, 31 cyklů 1 min 95 °C, 1 min 52-59 °C (dle použitého primeru), 1 min 72 °C a konečná elongace 5 min 72 °C. Celkový čas reakce byl 2 hod a 15 min. Pro zobrazení výsledků bylo využito fragmentační analýzy, která probíhala v automatickém analyzátoru ABI 3500 (Applied Biosystems). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu GeneMapper™ (Applied Biosystems), přítomnost či nepřítomnost alel byla zaznamenána formou binární matice.

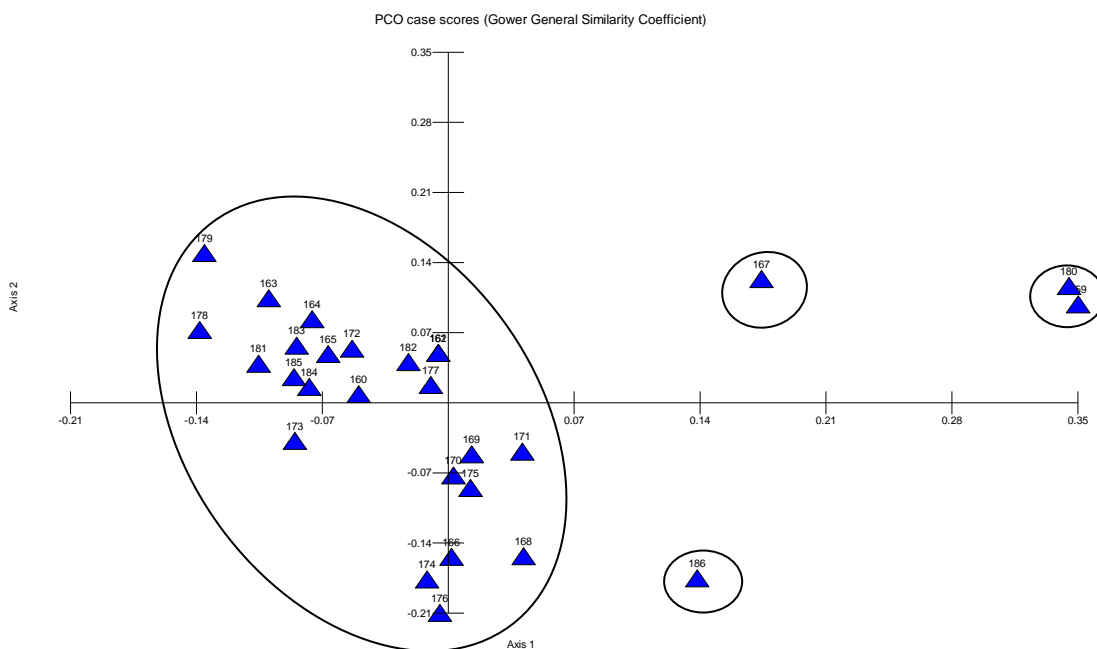
### Výsledky

Z výsledků analýzy bylo zjištěno, že u všech jedenácti použitých markerů došlo k amplifikaci alel, jejich počet se pohyboval od 1 alely (marker P7), až do 7 alel (markery BoIAB19TF a D12). Všechny markery byly polymorfní. Celkový počet všech alel byl 51. V jednom případě (marker D3) došlo k nasedání primerů na několika místech genomu, tyto markery jsou označeny A, B a C. Charakteristiky pro jednotlivé markery jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 4: Vyhodnocení mikrosatelitových markerů

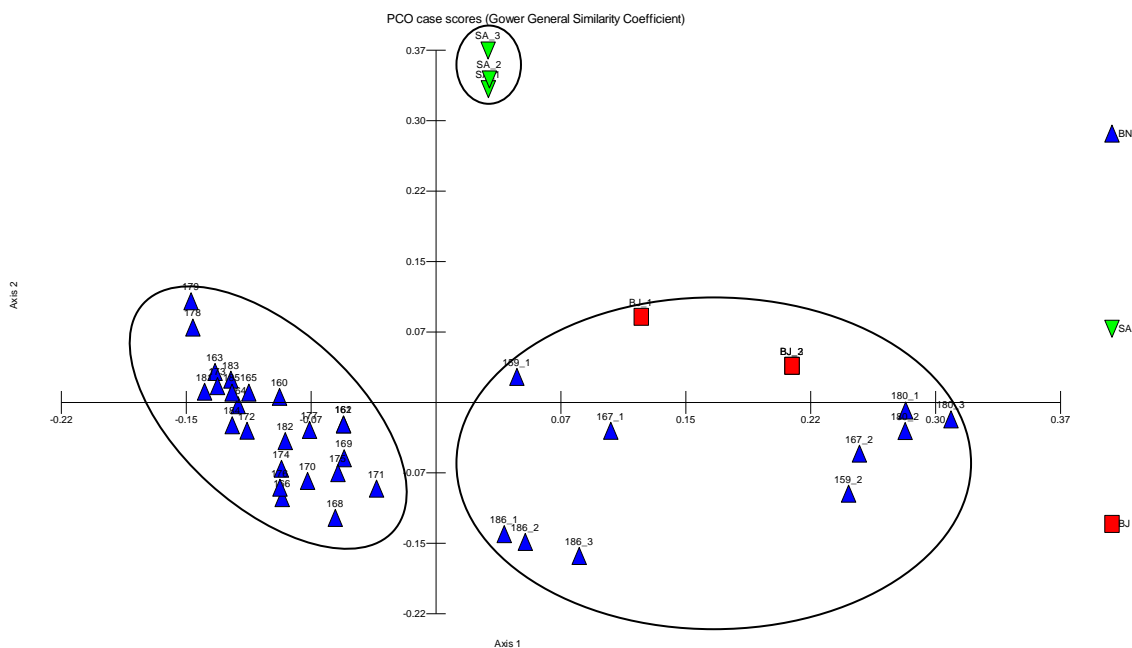
Primer	T <sub>A</sub>	počet alel	velikost (bp)
<b>BoREM1b</b>	59 °C	2	186-190
<b>BoIAB19TF</b>	59 °C	7	311-318
<b>BoPC34</b>	59 °C	3	149-151
<b>P381</b>	52 °C	2	213-229
<b>D3_A</b>	52 °C	6	176-184
<b>D3_B</b>	52 °C	3	185-188
<b>D3_C</b>	52 °C	2	194-198
<b>D12</b>	52 °C	7	342-374
<b>D11</b>	52 °C	4	174-186
<b>P7</b>	52 °C	1	146
<b>P9</b>	52 °C	6	130-138
<b>P30</b>	56 °C	4	166-217
<b>P35</b>	52 °C	4	149-195
<b>celkem</b>		<b>51</b>	

Výsledky fragmentační analýzy byly převedeny do binární matice. Výpočty matice podobnosti a PCO analýzy (Obrázek 1 a 2) byly provedeny v programu MVSP. Pro výpočty koeficientu genetické podobnosti byla použita metoda Gower General Similarity Coefficient, tedy algoritmus běžně používaný u tohoto typu dat.



Obrázek 2: Výsledek PCO analýzy pro analyzované genetické zdroje druhu *Brassica nigra*

Po provedení PCO analýzy byla u čtyř vzorků (Alsaska – č. 159, BRSCHW 22537 – č. 167, RCAT 040347 – č. 180 a BGRC 34253 – č. 186) zaznamenána výrazně vyšší odlišnost od ostatních genetických zdrojů, kdy tyto vzorky byly mimo hlavní cluster. Proto byla u těchto vzorků/genetických zdrojů ještě testována různá ročníková opakování. Pro porovnání byly analyzovány ještě kontrolní vzorky druhu *Sinapis alba* a *Brassica juncea*. Pro tento soubor byla provedena nová PCO analýza, jejíž výsledek je uveden na Obrázku 2.



Obrázek 3: Výsledek PCO analýzy s kontrolními vzorky druhů *Sinapis alba* a *Brassica juncea*

U výše uvedené analýzy, do které byla přidána jak ročníková opakování odlišných vzorků, tak i referenční odrůdy dalších druhů hořčice pěstovaných u nás je patrné, že došlo k oddělení clusteru, který obsahuje pouze odrůdy druhu *B. nigra* a dále cluster, ve kterém jsou pouze tři



Z výsledků je patrný vysoký polymorfismus mikrosatelitů, což rovněž zjistili Mishra et al. (2011), Prajapat et al. (2014) a Baghel (2020) s mírou 50-72 % polymorfismu v rámci druhů *Brassica* spp. Mezidruhová přenositelnost SSR byla zaznamenána již dříve v mnoha studiích, např. z *Pennisetum glaucum* na *P. purpureum*, z *Brassica* spp. na *B. tournefortii*, *B. fruticulosa* a *B. spinescens* (Singh et al. 2012). Přenositelnost SSR markerů mezi genomy A a C rodu *Brassica* druhů hodnotili Saal et al. (2001), což odpovídalo již dříve zjištěným výsledkům evolučních vztahů. Rovněž byl zaznamenán značný rozsah v počtu amplifikovaných alel studovaných mikrosatelitů, např. Parida et al. (2010) zaznamenali u hořčice sarepské analýzou SSR pouze 2 alely na lokus.

Dříve se jako molekulární markery používaly zásobní proteiny, avšak nyní se využívají markery založené na DNA (Čurn 1995). Pro charakterizaci a hodnocení odrůd brukvovitých olejnin byla použita řada metod a markerovacích systémů, jako je RFLP (Diers & Osborn 1994), RAPD (Shiran et al. 2006), AFLP (Yu et al. 2007), SSR (Hasan et al. 2006), cpSSR (Zamani-Nour et al. 2013), RAMP (Wei et al. 2005), SNP (Hayward et al. 2012). Velmi častým markerem jsou právě mikrosatelity a pro genotypy rodu *Brassica* bylo vyvinuto několik stovek SSR markerů (Kumar et al. 2016).

V rámci analyzovaných genetických zdrojů byl zjištěn jak značný polymorfismus a různé počty amplifikovaných alel u jednotlivých mikrosatelitů, tak i poměrně vysoká míra odlišnosti mezi jednotlivými genotypy. Např. u kolekce *B. napus* nebyly mikrosatelity tak polymorfni a míra podobnosti byla rovněž vysoká (Havličková et al. 2014). Tato poměrně vysoká genetická diverzita může být zapříčiněna nižší prošlechtěností tohoto druhu.

## Závěr

Mikrosatelitové markery se jeví jako vhodný nástroj k hodnocení genetické diverzity nejen na úrovni druhové, ale také na úrovni odrůdové vzhledem k jejich specifičnosti. Zároveň bylo pomocí těchto markerů možné zhodnotit čistotu osiva jednotlivých odrůd vzhledem k různým ročníkovým opakováním a správnosti zařazení. Mikrosatelitové markery mohou být dobrým pomocníkem při hodnocení odrůd nejen pro šlechtitele, ale také např. pro kontrolní úřady. Při kombinaci s fenotypovými vlastnostmi mohou odhalit odchylky v odrůdách a pomoci zachovat genetickou rozmanitost odrůd a zachování žádaných znaků ať už z hlediska pěstebního, tak i z hlediska nutričního. Komplexní zkoumání genetické diverzity na molekulární úrovni následně poskytuje nástroje pro řádný management genetických zdrojů a soubor nejrozmanitějších genotypů pro použití v liniových a hybridních šlechtitelských programech.

## Použitá literatura

- Abdelmigid, H. M. (2012). Efficiency of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for genotype fingerprinting and genetic diversity studies in canola. *African Journal of Biotechnology*, 11(24), 6409-6419.
- Baghel, R., Sharma, A. K., Tiwari, S., Tripathi, M. K., & Tripathi, N. (2020). Genetic diversity analysis of Indian mustard (*Brassica* spp.) germplasm lines using SSR molecular markers. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(12), 137-143.
- Cui, X., Dong, Y., Hou, X., Cheng, Y., Zhang, J. & Jin, M. (2008). Development and characterization of microsatellite markers in *Brassica rapa* ssp. *chinensis* and transferability among related species. *Agricultural Sciences in China*, 7(1), 19-31.
- Čurn, V. (1995). Acid phosphatase and leucine aminopeptidase isozymes as biochemical markers of homogeneity in oil seed rape androgenetic lines. *Plant growth regulation*, 16(1), 59-63.

- Diers, B. W., & Osborn, T. C. (1994). Genetic diversity of oilseed Brassica napus germ plasm based on restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(6), 662-668.
- Doyle J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B. & Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg
- Hasan, M., Seyis, F., Badani, A. G., Pons-Kühnemann, J., Friedt, W., Lühs, W., & Snowdon, R. J. (2006). Analysis of genetic diversity in the Brassica napus L. gene pool using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 793-802.
- Havlíčková, L., Jozova, E., Rychla, A., Klima, M., Kučera, V., & Čurn, V. (2014). Genetic diversity assessment in winter oilseed rape (Brassica napus L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(3), 216-225.
- Hayward, A., Morgan, J. D., & Edwards, D. (2012). Reviews; SNP discovery and applications in Brassica napus. *Journal of Plant Biotechnology*, 39(1), 49.
- Iqbal, S., Hamim, I., Haque, S., & Nath, U. K. (2015). Genetic diversity analysis of mustard (Brassica spp.) germplasm using molecular marker for selection of short duration genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 14(17), 1439-1448.
- Kumar Mishra, M., Suresh, N., Bhat, A. M., Suryaprakash, N., Satheesh Kumar, S., & Kumar, A. (2011). Genetic molecular analysis of Coffea arabica (Rubiaceae) hybrids using SRAP markers. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 607-617.
- Kumar, H., Anubha, M. K. V., & Lal, J. P. (2016). Morphological and molecular characterization of Brassica rapa ssp yellow sarson mutants. *Journal of Oilseed Brassica*, 1(1), 1-6.
- Li, L., Wanapu, C., Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y., & Huang, G. (2011). Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of Brassica napus hybrids. *J Agric Sci*, 3(3), 101-110.
- Louarn, S., Torp, A. M., Holme, I. B., Andersen, S. B., & Jensen, B. D. (2007). Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in Brassica oleracea. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(8), 1717-1725.
- Parida, S. K., Yadava, D. K., & Mohapatra, T. (2010). Microsatellites in Brassica unigenes: relative abundance, marker design, and use in comparative physical mapping and genome analysis. *Genome*, 53(1), 55-67.
- Prajapat, P. R. A. V. I. N., Sasidharan, N., Kumar, M. U. K. E. S. H., & Prajapati, V. I. J. A. Y. (2014). Molecular characterization and genetic diversity analysis in four Brassica species using microsatellite markers. *Bioscan*, 9(4), 1521-1527.
- Raza, A. (2021). Eco-physiological and biochemical responses of rapeseed (Brassica napus L.) to abiotic stresses: consequences and mitigation strategies. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(4), 1368-1388.
- Saal, B., Plieske, J., Hu, J., Quiros, C. F., & Struss, D. (2001). Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in Brassica oleracea L. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(5), 695-699.
- Shiran, B., Azimkhani, R., Mohammadi, S., & Ahmadi, M. R. (2006). Potential use of random amplified polymorphic DNA marker in assessment of genetic diversity and identification of rapeseed (Brassica napus L.) cultivars. *Biotechnology*, 5(2), 153-159.
- Singh, B. K., Thakur, A. K., & Rai, P. K. (2012). Genetic diversity and relationships in wild species of Brassica and allied genera as revealed by cross-transferable genomic STMS marker assays. *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), 815-821.

- Sobotka, R., Dolanska, L., Curn, V., & Ovesná, J. (2004). Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *Journal of Applied Genetics*, 45(2), 161-174.
- Wei, W., Li, C., Yuming, W., & Zehong, Y. (2005). Genetic diversity among the germplasm resources of the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAMP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(4), 473-482.
- Yu, C., Leišová, L., Kučera, V., Vyvadilová, M., Ovesná, J., Dotlačil, L., & Hu, S. (2007). Assessment of genetic diversity of yellow-seeded rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by AFLP markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 43(3), 105.
- Zamani-Nour, S., Clemens, R., & Möllers, C. (2013). Cytoplasmic diversity of *Brassica napus* L., *Brassica oleracea* L. and *Brassica rapa* L. as determined by chloroplast microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(3), 953-965.

### **Dedikace**

Tato studie byla vytvořena díky podpoře projektu NAZV QK1910225 a Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 080/2022/Z).

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Eva Jozová, Ph.D.  
Zemědělská fakulta JU,  
Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií,  
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice  
[jozovae@fzt.jcu.cz](mailto:jozovae@fzt.jcu.cz), 387772937

## Heterogenita citlivosti vybraných klonů česneků k nízkým teplotám

Heterogeneity of low temperature sensitivity of selected garlic clones

Zámečník J.<sup>1</sup>, Bobrová O.<sup>1,2</sup>, Faltus M.<sup>1</sup>, Bilavčík A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine

### Abstrakt

Pro studium nukleace ledu v rostlinách a orgánech česneku pěti vybraných klonů byla použita infračervená analýza. Nejvyšší teplotu ledové nukleace měl klon `Morano`, pocházející ze Španělska a nejnižší `Dukát`. Nejvyšší teplota ledové nukleace byla u stroužků, kořenů, pochev listů a nejnižší u nejmladších listů, u kterých se nacházela často nukleace ledu nezávisle na šířící se ledové zóně. Nukleace ledu u stroužků v česnekové cibuli byla nejvyšší u nejdříve založených stroužků a pokračovala po ontogenetické spirále k nejmladším stroužkům. Genotypové rozdíly v nukleaci ledu nebyly nalezeny u stroužků tří klonů ani u jejich pacibulek. Poškození zkoumaných orgánů či pletiv bude sloužit pro určení kritického orgánu při poškození česneku nízkými teplotami.

**Klíčová slova:** česnek kuchyňský, termická analýza, nukleace ledu, poškození mrazem

### Abstract

Infrared analysis was used to study ice nucleation in garlic plants and organs of five selected clones. The `Morano` clone, originating from Spain, had the highest ice nucleation temperature and the `Dukát` the lowest. The highest temperature of ice nucleation was in cloves, then roots, sheath of leaves, and the lowest in the youngest leaves, in which ice nucleation was often found regardless of the spreading ice zone. Ice nucleation in cloves in garlic bulb was highest in the earliest occurred cloves and continued along the ontogenetic spiral. No genotypic differences in ice nucleation were found in cloves or in their bulbs of the three clones. Damage to the examined organs or tissues will indicate a critical organ or tissue of garlic damage caused by low temperatures.

**Key words:** garlic, thermal analysis, ice nucleation, frost damage

### Úvod

Česnek se pěstuje hlavně jako ozimá forma, tj. je vysazován na podzim a během zimy. Může vzejít na podzim, nebo až na jaře. Zimu tedy přečkává v různém ontogenetickém stadiu, v různém stavu narašení stroužků až po rostliny s vyvinutými listy. V polních podmínkách je často poškozován mrazy. Mírná poškození jsou patrná podle nekróz na listech, může dojít až k úhynu celých rostlin vlivem nízké teploty. K totálnímu vymrznutí česneků došlo na některých lokalitách například v zimě 2011/2012. Příčina poškození mrazem je nukleace ledových krystalků, které se většinou tvoří uvnitř buněk, nebo k nim dosahuje ledová fronta a je vždy letální.

Infračervená (IR) termografie je cennou technikou pro pozorování tvorby a šíření ledu v rostlinách a byla k tomuto účelu použita u mnoha druhů (Fuller a Wisniewski, 1998; Livingston et al., 2022). Zejména teplota listů je cenným ukazatelem fyziologického stavu rostlin, reagující na biotické i abiotické stresory.

Když dojde ke krystalizaci ledu, dojde k odpovídajícímu zvýšení teploty, k adiabatickému entalpickému skoku z teploty podchlazení do teploty mrznutí (vlivem uvolnění latentního tepla krystalizace ledu) (Cox a Moore, 1997). Bod, ve kterém dochází k heterogenní nukleaci ledu je iniciován nukleacním jádrem a může být označován jako bod nukleace ledu nebo metastabilní mezní teplota (Cox a Moore, 1997).

Cílem této práce bylo pomocí infračervené analýzy detekce a vizualizace nukleace ledu v rostlinách česneku a jejich částí, označit kritický orgán, nebo pletivo s největší citlivostí k nízkým teplotám.

### **Materiál a metody**

Rostliny česneku byly předpěstovány v semi-sterilních podmínkách v klimatizovaných boxech. Teplota 22 °C, vlhkost 55 %, ozáření, délka dne 12/8 po dobu 4-5 týdnů podle velikosti narostlých rostlin. Rostliny byly předpěstovány v truhlíku, v pařeništní zemině, poté byly rostliny otužovány při nízké teplotě: 2-3 °C a krátkém dni 8/16 hod. Cibule česneku byly z loňské sklizně. Pacibulky byly sbírány v plné zralosti z palic česneků.

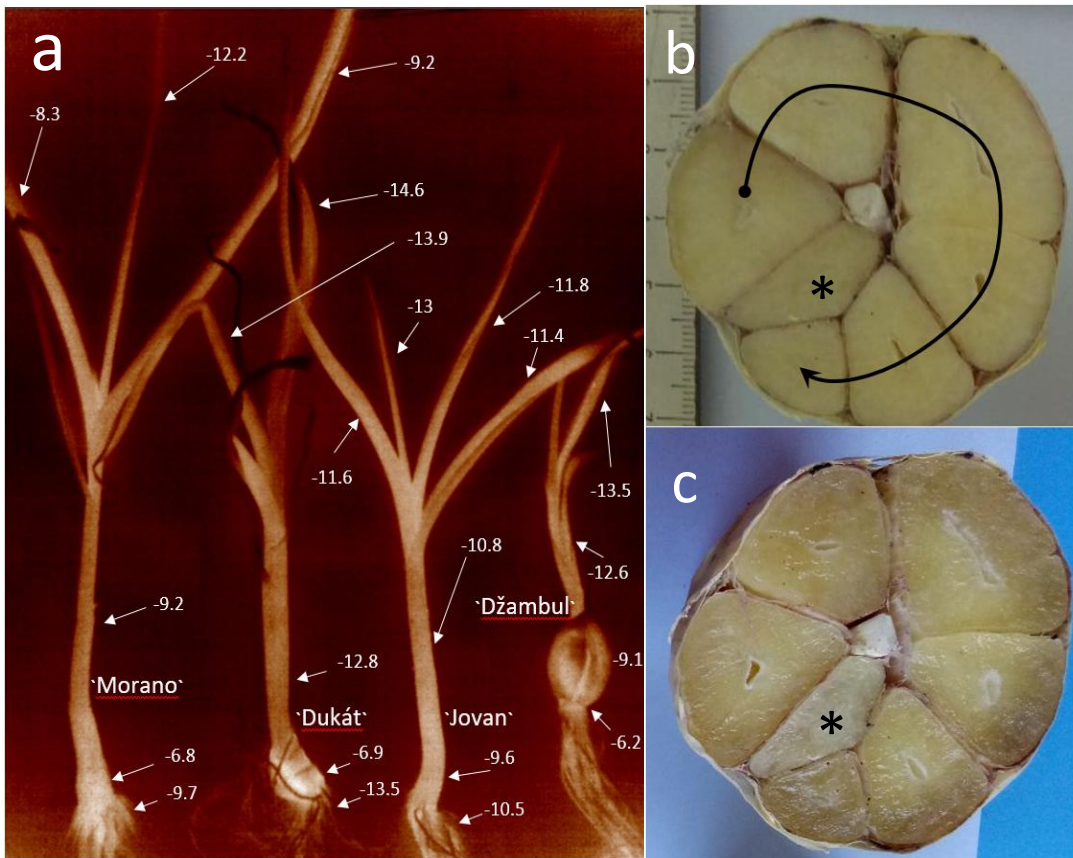
Pro vizualizaci průběhu nukleace ledu byly použity v celkovém počtu průměrně 20 jedinců. Materiál byl umístěn na filtrační papír, položený na měděné podložce umístěné v pultovém mrazicím boxu s počítačem řízeným regulátorem s poklesem teploty přibližně 3 °C min<sup>-1</sup>. Přesná teplota na měděné podložce byla kontrolně zaznamenávána pomocí digitálního teploměru. Po umístění rostlinného materiálu do mrazicího boxu bylo spuštěno infračervené snímání pomocí stacionární LWIR termovizní IR kamery Workswell WIC 640 (rozlišení 640x512px, vzorkovací frekvence 30 fps). Pomocí SW Workswell CorePlayer Beta byl poté vyhodnocen záznam IR kamery. Naměřená data teploty nukleace ledu, byla pomocí SW vizuálně odečtena a zpracována pomocí statistického software Statistica 7.0 (StatSoft).

### **Výsledky a diskuze**

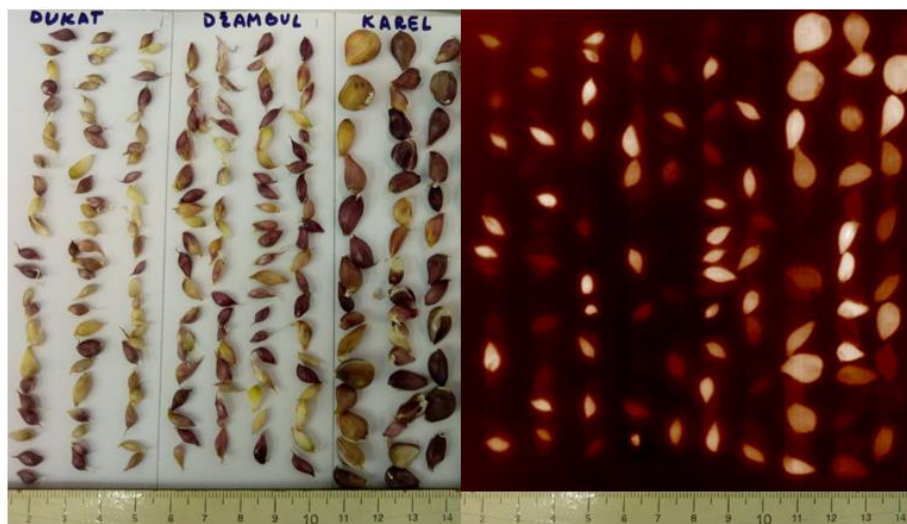
U celých rostlin byla sledovaná nukleace ledu pomocí IR kamery. Na obrázku (Obr. 1a) jsou hodnoty nukleace ledu jednotlivých částí tak, jak postupně nastávaly při poklesu teploty rychlostí 3 °C min<sup>-1</sup>. Nejdříve docházelo k nukleaci ledu ve stroužcích -6,9 až do -9,6 °C, pak s výjimkou klonu `Džambul`, (u kterého byla nukleace ledu nižší u kořenů než u stroužku) docházelo k nukleaci kořenů v oblasti, kde vyrůstají z podpučí od -6,2 °C (`Džambul`) až do -13,5 °C (`Dukát`). Dále se led šířil v nadzemních částech, kdy nejdříve byla pozorovaná nukleace ledu v pochvách listů, až pak docházelo k nukleaci ledu v čepelích nejstarších listů. U nejmladších listů byla nalezena nejvyšší teplota nukleace ledu od -12,2 °C (`Morano`) až do -14,6 °C (`Dukát`). Hodnoty nukleace ledu jsou spíše pro porovnání místa nukleace ledu, než pro jejich absolutní hodnoty, ovlivněné stochastickými vlastnostmi nukleace ledu. Klon `Morano` pochází ze Španělska, a tak se dá předpokládat, že bude náchylnější na teploty klesající pod bod mrazu, než například klon Dukát, který pochází z českých podmínek.

Mrznutí jednotlivých stroužků v cibuli česneku probíhalo podle ontogenetické spirály (Obr. 1b). Nejprve mrzly nejdříve založené stroužky a pak postupně mladší až nejmladší. Po odtátí bylo patrné, že nezmrzlý stroužek, ve stavu podchlazení, nebyl poškozen nízkou teplotou (Obr. 1c). Zhodnocení teploty nukleace ledu jednotlivých stroužků a pacibulek je prezentováno ve sloupcovém grafu (Obr. 3). U tří klonů byly sledovány u stroužků a pacibulek teploty nukleace ledu. Nukleace ledu byla nalezena u stroužků při vyšší teplotě než nukleace ledu u pacibulek. Nebyly nalezeny statistické rozdíly v nukleaci ledu mezi genotypy u stroužků ani u pacibulek. Rozmezí nukleace ledu u stroužků (Obr. 3) bylo ve shodě s publikovanými hodnotami -7,7 až -14,6 °C (James et al. 2009). Hodnoty nukleace ledu u pacibulek nebyly dosud publikovány.

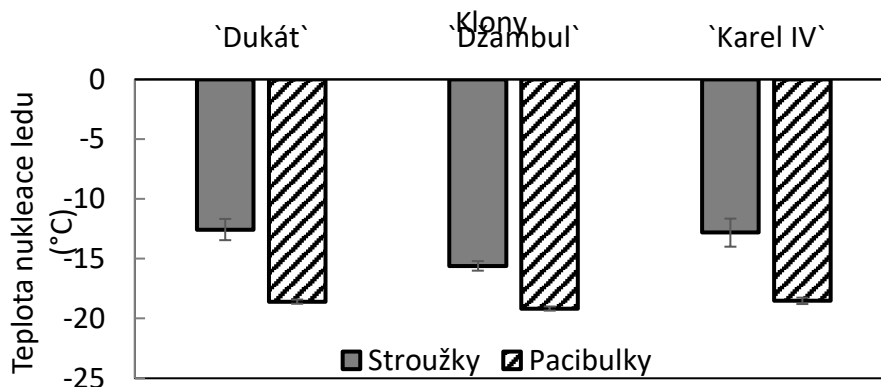




**Obr. 1.** (a) Termografický snímek rostlin česneku čtyř klonů `Morano`, `Dukát`, `Jovan` a `Džambul`. Teploty nukleace ledu, zjištěné IR analýzou jsou uvedeny u jednotlivých částí rostliny ve stupních Celsia. (b) Postup mrznutí v příčném řezu stroužků česneků v ontogenetické spirále v neloupané cibuli česneku. (c) Stejná cibule česneku po odtátí. Poslední stroužek (\*), u kterého neproběhla nukleace ledu, při odtátí nebyl poškozený, což je patrné podle neměnné světlé barvy jako pře mrznutím.



**Obr. 2.** Test nukleace ledu u různě velikých pacibulek klonů `Dukát`, `Džambul` a `Karel IV`. Při nukleaci ledu se v termogramu jednotlivé pacibulky zbarví světle, což odpovídá následně zvýšené teplotě vlivem uvolněného specifického tepla krystalizace.



**Obr. 3.** Nukleace ledu změřená na základě IR spektra. Počty sledovaných stroužků byly  $n=12 \div 28$  a pacibulek  $n=45 \div 82$ . Úsečky vyjadřují standardní chybu průměrných hodnot. Mezi klony nebyly statisticky významné rozdíly ( $p < 0.01$ ).

### Závěr

Obecně lze shrnout, že nejvyšší teplotu nukleace ledu měl klon `Morano` a nejnižší Dukát. Většinou byla nalezena šířící se ledová zóna od podpučí k nejmladším listům. V méně častých případech byla nalezena místa spontánní nukleace ledu v částech rostliny nesouvisející s šířící se ledovou zónou. Nukleace ledu u stroužků v cibuli česneku nastala po ontogenetické spirále vývoje stroužků, při nejvyšších teplotách nastala nukleace ledu u nejdříve založených stroužků až po nejmladší stroužky. Nebyly nalezeny rozdíly v nukleaci ledu u stroužků tří klonů ani u pacibulek, nehledě na jejich velikost. Jako kritický orgán lze označit stroužek s nejvyšší teplotou nukleace, ale stroužek je zpravidla v půdě 4-10 cm což při holomrazech může být kritické. V jarním období může být kritickým orgánem nadzemní část – listy. Poškození částí rostliny, orgánů či pletiva může sloužit jako kritický indikátor poškození česneku nízkými teplotami.

### Literatura

- Cox D.R.G., Moore S.R. (1997). A process for supercooling, Patent WO 97/18879.
- Fuller M.P., Wisniewski M. (1998) The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol* 23:81–89
- James, C., Seignemartin, V., & James, S. J. (2009). The freezing and supercooling of garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Refrigeration*, 32(2), 253-260.
- Livingston, D., Tuong, T., Tisdale, R., & Zobel, R. (2022). Visualising the effect of freezing on the vascular system of wheat in three dimensions by in-block imaging of dye-infiltrated plants. *Journal of Microscopy*

### Poděkování

Tato práce vznikla za podpory MZe, projektu QK1910476 a RO0418.

### Kontaktní adresa:

Ing. Jiří Zámečník, CSc.  
 Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
 Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně  
 Tel.: +420 233022362, e-mail: [zamecnik@vurv.cz](mailto:zamecnik@vurv.cz)

## Porovnání citlivosti dvou sad primerů ve srovnání s mikroskopickou metodou při detekci hub rodu *Neotyphodium* spp.

Comparison of the sensitivity of two primers sets compared to the microscopic method in the detection of fungi *Neotyphodium* spp.

Drápalová I.<sup>1</sup>, Raab S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> OSEVA vývoj a výzkum s.r.o, Zubří

<sup>2</sup> OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská Zubří

### Abstrakt

U odrůd jílku vytrvalého (*Lolium perenne* L.) byla porovnávána v roce 2022 citlivost dvou sad primerů ve srovnání s klasickou mikroskopickou metodou. Bylo vybráno celkem 12 planých populací a 22 odrůd. U všech položek bylo nejprve změřeno procentuální zastoupení hyf v osivu pomocí světelné mikroskopie a poté byla z vyizolované DNA připravena reakční směs pro PCR reakci. Výsledkem je poměrně vysoká citlivost obou sad primerů, která může nahradit zdoluhavý proces detekce pomocí světelné mikroskopie.

**Klíčová slova:** jílek vytrvalý, primery, PCR, *Neotyphodium*

### Abstract

The susceptibility of two sets of primers was in the year 2022 compared for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties in comparison with the classical microscopic method. A total of 12 wild populations and 22 varieties were selected. For all items, the percentage of hyphae in the seed was first measured by light microscopy, and then a reaction mixture for the PCR reaction was prepared from the isolated DNA. The result is a relatively high sensitivity of both primer sets, which can replace the lengthy light microscopy detection process.

**Keywords:** ryegrass, PCR, primers, *Neotyphodium*

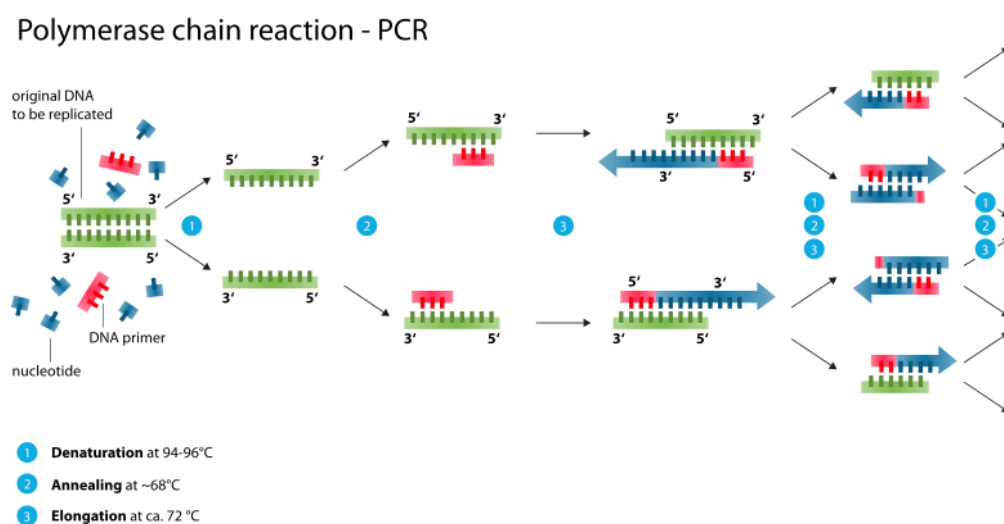
### Úvod

Jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) je jednou z nejvýznamnějších pícních trav. Píce jílku vytrvalého je velmi kvalitní, s vysokým obsahem vodorozpustných cukrů. Jílek vytrvalý je diploidní ( $2n = 2x = 14$ ), jsou však vyšlechtěny i tetraploidní odrůdy ( $2n = 4x = 28$ ). Velikost genomu jílku vytrvalého je 2,623 Gbp. Jílek vytrvalý, stejně jako jiné pícní a travníkové druhy trav často obsahují toxické alkaloidy produkované endofytními houbami rodu *Neotyphodium* (KOPECKÝ et al., 2013). Jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) je považován za ideální travní druh pro použití jako krmivo pro zvířata v zemědělství v mírných klimatických podmínkách. Jílek se rychle zakládá a roste, poskytuje husté porosty, vysoce výživné a lehce stravitelné pícniny, kterou lze proměnit ve zdravé maso a živočišné produkty pro lidskou spotřebu. Jeho použití je však omezeno, protože postrádá perzistenci, zejména v okrajových oblastech a lokalitách, které jsou vystaveny letním a zimním stresům a stresu ze sucha (YAMADA, 2005). Tyto stresy jsou schopné odbourat endofytní houby. Jedná se o endoparazitické houby nalezené u všech rostlinných rodů, kde byly získány z asymptomatické tkáně rostlin, včetně řas, mechů, kapradin, jehličnanů a krytosemenných rostlin pěstovaných v suchozemských a vodních ekosystémech, včetně agroekosystémů a přírodních ekosystémů patřících od tropických, subtropických, pouštních, mírných oblastí až po tundru a arktické biomy. Většina studií ukázala, že hojnost, rozmanitost a druhové složení endofytních hub se liší podle hostitelských druhů, typu a stáří pletiv, charakteru lokality, místních klimatických podmínek a antropogenních faktorů (TORRES et al., 2011). Pro agronomickou a zootechnickou praxi je nejvýznamnější výskyt endofytních hub v pastevních druzích trav, především v kostřavách a jílcích, kde po konzumaci dobyt看em a skotem způsobují ekonomické ztráty (SCHARDL,

MOON, 2003). Identifikace těchto hub není složitá. Lze je identifikovat konzervativní mikroskopickou metodou, nebo pomocí nových molekulárních metod, jako je polymerázová řetězová reakce PCR. Ta je založena na replikaci nukleových kyselin, které jsou základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA ve směru 5'-3' pomocí DNA-polymerázy. Úsek vybrané nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA, kdy jejich 5'-konce směřují proti sobě. Aby reakce fungovala je zapotřebí přidat do reakční směsi DNA-polymerázu a nukleotidy. Poté probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA jsou používány termostabilní polymerázy, které jsou izolovány z termostabilních mikroorganismů. Ve většině případů se používá *Taq* DNA-polymeráza získaná z *Thermus aquaticus*, který odolává vysokým teplotám, při kterých DNA degraduje. Tři kroky – denaturace DNA, připojení primerů a syntéza nových vláken se cyklicky opakují 25-35 krát (pozn. autora: záleží na daném protokolu). Výsledkem je cca  $2^{32}$  syntetizovaných molekul produktu. Celá reakce probíhá ve speciálním přístroji – termocykleru (ŠMARDÁ, 2005) Viz. Obrázek 1.

V souvislosti s měnícím se klimatem a častějším výskytem suchých období je důležité hledat druhy a odrůdy trav, které jsou schopny odolat těmto stresovým podmínkám. OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská v Zubří zodpovídá v rámci dotačního titulu Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity za řešení genofondové kolekce travin. Jednou z důležitých aktivit práce s genetickými zdroji travin je jejich hodnocení jak v polních, tak i laboratorních podmínkách, které je prováděno podle Klasifikátoru pro trávy (Ševčíková et al., 2002). Získaná data jsou předávána do národního dokumentačního systému genetických zdrojů GRIN Czech, ve kterém jsou volně dostupná uživatelům genetických zdrojů a ti mohou dále tyto výsledky využívat ve šlechtění a dalších oborech.

Obrázek 5 Princip polymerázové řetězové reakce



Zdroj: microbiologyinfo.com

Cílem této práce bylo zjistit, nakolik jsou uvedené primery citlivé na přítomnost endofytních hub a zda by mohly nahradit zdlouhavý proces mikroskopování.



## Materiál a metody

Pro výzkum bylo získáno celkem 34 položek jílku vytrvalého (*Lolium perenne* L.), z toho 22 položek byly odrůdy a 12 položek bylo získáno sběry z volné přírody.

Pro detekci endofytních hub světelnou mikroskopií bylo osivo nejprve namočené na 12 hodin v 5% roztoku NaOH. Následně bylo důkladně promýváno vlažnou vodou po dobu přibližně 5 minut. Po propláchnutí bylo osivo v kalíšcích s perforovaným dnem zalito roztokem laktofenolové modři (methylová modř 50 mg, L(+)-kyselina mléčná 25 g, fenol 25 g a glycerol 50 g) a tyto kalíšky byly umístěny do parního hrnce, kde se osivo vařilo na mírném ohni po dobu 20 minut. Tento krok sloužil ke změknutí osiva a současně k obarvení škrobových zrn, případně endofytních hub pro snadnější detekci pod mikroskopem. Po uvaření osiva byly kalíšky důkladně propláchnuty pod slabým proudem tekoucí vody a pro delší uchování zalaty destilovanou vodou. Pro světelnou mikroskopií byl použit mikroskop Motic BA 310.

Obrázek 6 Osivo v roztoku NaOH

Obrázek 7 Osivo namočené ve směsi laktofenolu



Pro detekci endofytních hub metodou PCR byla nejprve z lyofilizovaného, rozemletého osiva vyizolována DNA pomocí Genomic DNA Mini Kit (Plant). Do 1,5 ml mikrozkušavek odváženo přibližně 25 mg sušeného materiálu, do kterého byl přidán pufr a RNasa A, vše bylo zvortexováno a inkubováno při 60 °C. Poté byl lyzát přefiltrován, aby se odstranily zbytky buněk a sraženiny soli. V přítomnosti vazebného pufru spojeného s chaotropní solí se genomová DNA v lyzátu váže v koloně na matici ze skleněných vláken. Kontaminanty se odstranily pomocí promývacího pufru (obsahujícího ethanol) a purifikovaná genomová DNA se eluovala elučním pufrem s nízkým obsahem soli. U vyizolované DNA byla změřena koncentrace DNA na spektrofotometru a následně upravena na koncentraci 10 ng.μl<sup>-1</sup>. Taktéž dodané primery byly naředěny na pracovní roztok 10 μM.

Reakční směs pro PCR byla napipetována do 0,2 ml mikrozkušavek následovně: Ready To Use PCR MasterMix 10 μl, Forward primer 0,4 μl. Reverse primer 0,4 μl, DNA 1 μl a doplněno PCR vodou do objemu 20 ul. Takto rozpipetovaná směs byla vložena do thermocycleru. Teplota annealingu byla optimalizována pro každou sadu primerů zvlášť a byla vybrána nejvhodnější.

Tabulka 1 Přehled použitých primerů

Název primeru	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Velikost výsledného produktu	Zdroj	Ta [°C]
Tub-2 primers	GGTGTGAGC CCCCCTGATT	GTCTCATCTCCG GGGCGGTAT	444 bp	Doss, R 1998	58
IS-RS-5'	GAGCCCCTGA TTTCGTAC				65

IS NS-3'		TTGAAGTAGACA CTCATACGCTC	370 bp	Dombrowski, J.E. et al, 2006
----------	--	-----------------------------	--------	------------------------------------

### Výsledky a diskuse

Mikroskopickou metodou byla zjištěna přítomnost endofytních hub a zapsána jejich četnost v % viz. tab. 2

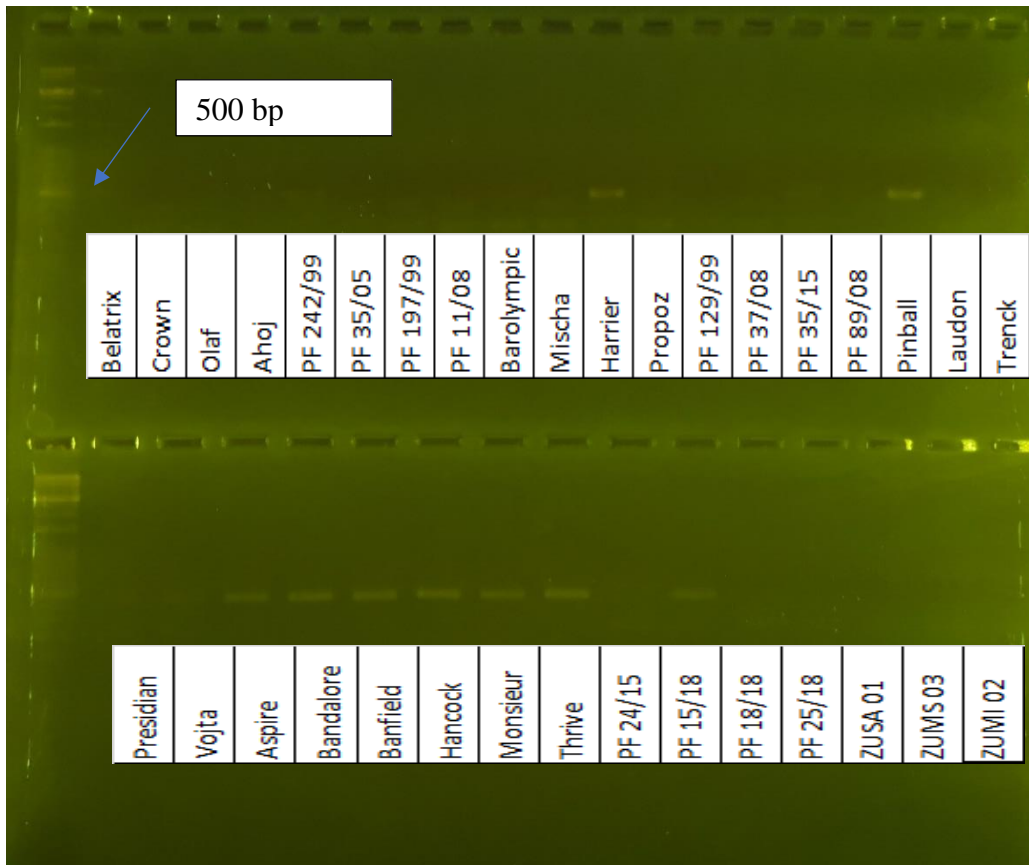
Tabulka 2 Výsledky mikroskopického měření

Druh	Odrůda/PF	Množství	% záchytu
<i>L. perenne</i>	Belatrix	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Crown	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Olaf	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Ahoj	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	PF 242/99	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	PF 35/05	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	PF 197/99	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	PF 11/08	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Barolympic	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Mischa	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Harrier	50 semen	24
<i>L. perenne</i>	Propoz	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	PF 129/99	50 semen	0,5
<i>L. perenne</i>	PF 37/08	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	PF 35/15	50 semen	9
<i>L. perenne</i>	PF 89/08	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Laudon	50 semen	0,5
<i>L. perenne</i>	Pinball	50 semen	80
<i>L. perenne</i>	Trenck	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Presidian	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	Vojta	50 semen	10
<i>L. perenne</i>	Aspire	50 semen	40
<i>L. perenne</i>	Bandalore	50 semen	44
<i>L. perenne</i>	Banfield	50 semen	82
<i>L. perenne</i>	Hancock	50 semen	56
<i>L. perenne</i>	Monsieur	50 semen	34
<i>L. perenne</i>	Thrive	50 semen	82
<i>L. perenne</i>	PF 24/15	50 semen	18
<i>L. perenne</i>	PF 15/18	50 semen	66
<i>L. perenne</i>	PF 18/18	50 semen	18
<i>L. perenne</i>	PF 25/18	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	ZUSA 01	50 semen	0
<i>L. perenne</i>	ZUMS 03	50 semen	6
<i>L. perenne</i>	ZUMI 02	50 semen	6

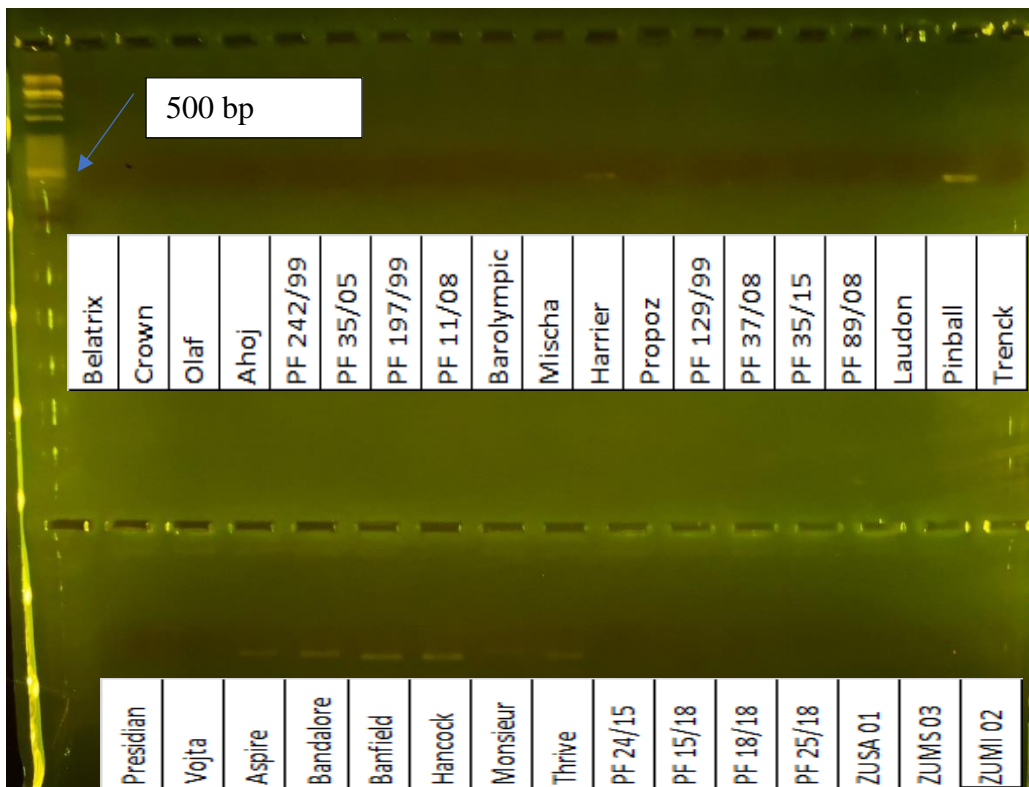
Pozn: PF-planá flora

Z tabulky lze vyčíst, že nejvyšší záchyt endofytních hub konzervativní mikroskopickou metodou byl zaznamenán u položek Banfield a Thrive shodně 82 %, Pinball 80 %, PF 15/18 66 %, Hancock 56 %, Bandalore 44 %, Monsieur 34 %, Harrier 24 % a položky PF 18/18 a PF 24/15 s 18 % napadením.

Obrázek 8 sada primerů I



Obrázek 9 sada primerů II





Obrázek 4 nám ukazuje přítomnost specifických bandů o velikosti 444 bp u položek Harrier, Pinball, Aspire, Bandalore, Banfield, Hancock, Monsieur, Thrive a PF 15/18. Oproti tomu nám obrázek 5 ukazuje přítomnost specifických bandů o velikosti 370 bp u položek Harrier, Pinball, Aspire, Bandalore, Banfield, Hancock, Thrive.

### Závěr

Obě sady primerů vykazují téměř totožnou citlivost na přítomnost DNA endofytních hub. Z obrázku 4 nám vyplývá, že Tub 2 primery jsou citlivější, protože jsou schopny zachytit i nižší koncentraci DNA endofytních hub. Z hodnot vyplývá, že je tato sada primerů schopna nasednout při teplotě 58 ° C na DNA, která je zastoupena ve vyizolované DNA i lehce pod 30 %. Zatímco v případě sady primerů IS-RS-5 a IS NS-3' nasedají za vyšších teplot kolem 65 ° C a to na DNA endofytních hub, která je vyšší než 40 %. Vzhledem k větší přesnosti nasedání sady primerů (Tab 2) za použití komerčně připraveného Ready To Use PCR MasterMixu, lze říci, že při screeningu endofytních hub u odrůd a ekotypů jílku vytrvalého je metoda detekce mikroskopicky plně nahraditelná pomocí PCR. Metoda PCR je rychlejší a naprosto vyhovující, vzhledem k tomu, že za endofytní položky (tzv. E+) lze považovat jen ty, u kterých byla přítomnost endofytních hub detekována ve více než 30 %. Současně díky RTU MM je eliminována lidská chyba při nepřesnosti pipetování Taq polymerázy, nukleotidů a upravování pH reakční směsi. Díky této metodě, lze detekování endofytních hub provozovat i komerčně.

### Literatura

- Dombrowski, J. E., Baldwin J. C., Azevedo M. D., Banowetz G. M., 2006. A Sensitive PCR-Based Assay to Detect *Neotyphodium* Fungi in Seed and Plant Tissue of Tall Fescue and Ryegrass Species. *Crop Science* 46:1064-1070. doi:10.2135/cropsci2005.05-0054.
- Doss, R. P., Clement, S. L., Kuy, S.-R., and Welty, R. E. 1998. A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. *Plant Dis.* 82:738-740
- Kopecký, D. et al. 2013 Establishing Chromosome Genomics in Forage and Turf Grasses. In: Barth and Milbourne (eds.) *Breeding Strategies for Sustainable Forage and Turf Grass Improvement*. Springer. s. 105-113.
- Schardl Ch. L., Moon Ch. D., 2003: Processes of Species Evolution in *Epichloë/Neotyphodium* Endophytes of Grasses in Clavicipitalean Fungi Evolutionary Biology, Chemistry, and Cultural Impacts, 571 p., ISBN: 0-8247-4255-9.
- Ševčíková M., Šrámek P., Faberová I., 2002: Klasifikátor. Trávy (*Poaceae*). Praha: VÚRV, 34 s.
- Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. 2005. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita. Brno, 183 s.
- Torres M., Tadych M., White J., Bills G., 2011: Isolation and identification of fungal endophytes, ISBN 9789529930265.
- Yamada T., Forster J. W., Humphreys M. W., Takamizo T. 2005 Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca* grass species complex. *Grassland Science* 51. s. 89-106. <https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>

### Dedikace

Práce vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství (Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity č. 51834/2017-MZE-17253/6.2.6 a institucionální podpora na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZE-RO1818).

**Kontaktní adresa:**

Ing. Iva Drápalová  
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.  
Hamerská 698  
75654 Zubří  
tel.: 739 208 694, drapalova@oseva.cz

## Ochrana řepky proti stonkovým krytonoscům v roce 2022

### The rapeseed stem weevils control in 2022

Gališová V.<sup>1</sup>, Seidenglanz M.<sup>2</sup>, Arbeláez M. M.<sup>2</sup>, Kolařík P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., provozovna Opava

<sup>2</sup>Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk

<sup>3</sup>Zemědělský výzkum Troubsko s.r.o.

#### Abstrakt

V roce 2022 byl testován vliv kombinace registrovaných insekticidů a různých termínů aplikace na stonkové krytonosce u řepky. Nejlepší bylo ošetření po dosažení vrcholu letové aktivity a začátku kladení vajíček následované dalším ošetřením po dvou týdnech. Účinnost ošetření byla nedostatečná vlivem vysokého počtu dospělců a extrémně protažené letové aktivity.

**Klíčová slova:** ozimá řepka; *Ceutorhynchus pallidactylus*; *Ceutorhynchus napi*; ochrana proti škůdcům

#### Abstract

The combination of registered insecticides and treatment terms were tested to rapeseed stem weevils. The best were treatments after the reaching of fly activity top and the start of egg laying subsequent by the further treatment after two weeks. The pest control was insufficient for the too high imagoes number and too extended fly activity.

**Keywords:** winter oilseed rape; *Ceutorhynchus pallidactylus*; *Ceutorhynchus napi*; pest control

#### Úvod

Důsledky klimatické změny mají v posledních letech nepříznivý dopad i na ochranu řepky proti škůdcům. Výrazným způsobem vzrostl výskyt krytonosce čtyřzubého *Ceutorhynchus pallidactylus*, u kterého navíc došlo k podstatnému roztažení letové aktivity. Severní Morava byla až donedávna oblast s dominancí krytonosce čtyřzubého, krytonosce řepkový *Ceutorhynchus napi* se zde vyskytoval jen ojediněle. V posledních letech však také jeho výskyt v porostech narůstá, dochází k překračování prahů škodlivosti (někdy velmi výrazně) a k tomu se přidaly i zákazy funkčních účinných látek. Cílem práce bylo proto zjistit, jaké jsou možnosti a účinnost ochrany proti těmto škůdcům s použitím registrovaných přípravků, které jsou po restrikcích k dispozici.

#### Materiál a metody

Na třech lokalitách – v Opavě, Troubsku a Šumperku bylo dle jednotné metodiky testováno 12 různých variant ochrany porostů řepky proti stonkovým krytonoscům (Tabulka č. 1). Insekticidy byly aplikovány celkem ve třech různých termínech. První termín – ošetřit co nejdříve, bez ohledu na letovou aktivitu. Druhý termín ošetření nastal po splnění překročení prahu škodlivosti a výskytu prvních samic se zralými vajíčky. Třetí termín ošetření byl datován 14 dní po druhém ošetření. Vzhledem k dominanci krytonosce čtyřzubého na severní Moravě a k několikátýdennímu odstavu začátku kladení vajíček od migrace do porostu (Seidenglanz et al. 2013), bylo cílem provést první insekticidní ošetření v pokusu v době, kdy po dosažení

nadprahové letové aktivity imag (3 dospělci / 1 žlutá miska/ 1 den sledování) byly v miskách poprvé zachyceny samice se zralými vajíčky v ovariolách, tedy ideálně těsně před začátkem kladení. Vzhledem k tomu, že jedno ošetření insekticidem na ochranu řepky proti krytonoscům v současné době kvůli prodloužené letové aktivitě nestačí (Havel et al. 2020), další aplikace měla být provedena se 14-denním odstupem po předchozí aplikaci.

Pokusy byly založeny metodou znáhodněných bloků ve čtyřech opakováních, ošetřená plocha jedné parcely byla 20 m<sup>2</sup>. Tři po sobě jdoucí ošetřené parcely byly mezi sebou odděleny neošetřenou parcelou o ploše 10 m<sup>2</sup>. Termíny ošetření byly stanoveny podle výsledků monitoringu letové aktivity dospělců obou druhů stonkových krytonosců a stupně vývoje vajíček u jejich samic. Letová aktivita škůdců byla monitorována pomocí většího množství prostorově rozmístěných žlutých misek, které byly na lokalitu umístěny po zaznamenání prvních dní s teplotními maximy atakujícími hranici 10°C. Za příznivého počasí byly záchyty vyhodnocovány dvakrát týdně. U krytonosců bylo stanoveno pohlaví a pitvou ovariol stupeň vývoje vajíček u samic. Získané údaje sloužily k optimalizaci termínu ošetření proti krytonoscům. Záchyty ve žlutých miskách byly sledovány až do doby kvetení ozimé řepky. Následné poškození rostlin, způsobené žírem larev, bylo hodnoceno poprvé přibližně tři týdny po poslední aplikaci, ještě v době kvetení porostu. Druhé hodnocení proběhlo v polovině měsíce června, po odkvětu, ještě před opadem nejstarších listů na rostlinách. Po podélném rozříznutí stonku byla změřena délka žírem poškozené části a byla vypočtena účinnost dle Abbotta. Výsledky ze sklizně (výnos, vlhkost) byly zpracovány metodou analýzy variance. U hodnot označených stejným písmenem nejsou rozdíly statisticky průkazné.

Tabulka 1 Přehled ošetření insekticidy a termínů aplikací

varianta č.	1. termín aplikace	2. termín aplikace	3. termín aplikace
1	xxx	xxx	xxx
2	Karate Zeon (0.125 l/ha)		
3	Karate + MospilanMizu (0.125 l/ha + 0.35 l/ha)		
4		Karate Zeon (0.125 l/ha)	
5		Karate + Mospilan Mizu (0.125 l/ha + 0.35 l/ha)	
6		Magma (0.2 l/ha)	
7		Karate Zeon (0.125 l/ha)	Mospilan Mizu (0.35 l/ha)
8		Karate Zeon (0.125 l/ha)	Magma (0.2 l/ha)
9		Karate + Mospilan Mizu (0.125 l/ha + 0.35 l/ha)	Magma (0.2 l/ha)
10		Magma (0.2 l/ha)	Karate + Mospilan Mizu (0.125 l/ha + 0.35 l/ha)
11		Magma (0.2 l/ha)	Mospilan Mizu (0.35 l/ha)
12			Karate + Mospilan Mizu (0.125 l/ha + 0.35 l/ha)

<sup>1</sup>V Opavě postřik proveden 21.3. 2022, v Šumperku 19.3. 2022, v Troubsku 22.3.2022

<sup>2</sup>V Opavě postřik proveden 30.3. 2022, v Šumperku 29.3. 2022, v Troubsku 25.3.2022

<sup>3</sup>V Opavě postřik proveden 12.4. 2022, v Šumperku 15.4. 2022, v Troubsku 7.4.2022

## Výsledky

### Opava

Setí pokusné plochy proběhlo v první dekádě září, opožděně oproti agrotechnickému termínu z důvodu častých a vydatných dešťových srážek. Následný průběh počasí byl pro vzcházení a růst rostlin přívētívý, takže i pozdě seté plochy dobře vzcházely a vyvíjely se. Říjen a listopad byly měsíce teplé a suché, porosty ozimé řepky vcházely do zimního období v poměrně dobrém stavu. Zima byla mírná, vyznačující se nadprůměrnými teplotami a podprůměrným množstvím srážek, díky čemuž nedošlo k vymrznutí rostlin. Březen byl srážkově i teplotně normální, duben srážkově normální a studený. Byla zachována dobrá kondice rostlin, nástup kvetení datován na začátek května. Poté pokračoval ráz nadprůměrně teplého a suchého počasí – od května až do července, jehož důsledkem byla včasná a bezproblémová sklizeň pokusu. Porost se po dobu vedení pokusu dobře vyvíjel, byl vyrovnaný, bez defektů.

Vlivem chladného počasí bylo možné žluté misky rozmístit až 14.3.2022. Migrace krytonosců do porostu začala v polovině března (tabulka č. 2), v porovnání s rokem 2021 o tři týdny později. První ošetření bylo provedeno 21.3.2022. Hlavní vlna letové aktivity krytonosců byla na Opavsku 22. – 24.3., v té době došlo k překročení prahu škodlivosti. Druhé ošetření bylo provedeno 30.3. po nálezů prvních samic se zralými vajíčky. Provedení třetí aplikace následovalo 14 dní poté.

Tabulka č. 2 Letová aktivita škůdců Opava 2022, hon č. 100

17.3.	42Ceutqu* 32♂10♀ BV
21.3.	7Ceutqu 3♂4♀NV
24.3.	114Ceutqu* 34♂80♀12 BV/68NV, 10 Phylss, 1 Meliae
28.3.	23Ceutqu 15♂8♀NV, 1 Psylch., 10 Phylss, 6Ceutna
31.3.	33Ceutqu 15♂18♀12 NV/6 ZV, 1 Psylch, 2 Phylss
7.4.	17Ceutqu 6♂11♀4 NV/7 ZV, 6Phylss,
11.4.	19Ceutqu 10♂9♀ ZV, 1 Psylch., 10 Phylss

\* - překročení prahu škodlivosti, BV – bez vajíček, NV nezralá vajíčka, ZV zralá vajíčka  
 Ceutqu – krytonosec čtyřzubý, Ceutna – krytonosec řepkový, Psylch – dřepčik olejkový, Phylss – dřepčici rodu Phyllotreta, Meliae – blýskáček řepkový

Tabulka č. 3 Délka žírem poškozené části stonku, Opava 2022

Var.	Poškození cm	Účinnost %	Var.	Poškození cm	Účinnost %
1	16,65a	0	7	10,52ab	36,79
2	13,92ab	16,39	8	9,67ab	41,89
3	10,20ab	38,74	9	8,07b	51,50
4	18,02a	-8,26	10	7,62b	54,20
5	14,57ab	12,46	11	10,50ab	36,94
6	10,35ab	37,84	12	15,40a	7,51

Tabulka č. 4 Výnos semen Opava 2022

Var.	t/ha	%	Var.	t/ha	%
1	3,93a	100,00	7	4,07a	103,35
2	4,05a	102,84	8	4,04a	102,70
3	4,07a	103,25	9	4,28a	108,65
4	4,03a	102,41	10	4,45a	113,11
5	4,09a	103,9	11	3,92a	99,73
6	4,16a	105,58	12	4,12a	104,57

Pro charakterizaci poškození stonku byla délka žírem poškozené části vhodnější, protože ke kladení vajíček docházelo po dlouhé období. Ve stonku byly larvy různé velikosti, část z nich už stonkem opustila, a proto by mohl počet larev být tímto zkreslen. Z výsledků vyplývá, že jedno ošetření insekticidem (varianty 2 – 6 a 12) má účinek nedostatečný. Účinek dvou ošetření (varianta 7 – 11) je lepší, varianty č. 9 a 10 byly průkazně lepší než neošetřená kontrola, ale i zde byla biologická účinnost poměrně nízká. Varianty č. 9 a 10 měly i nejvyšší výnos semen (tabulka č. 4), vliv ošetření na výnos semen byl ale poměrně nízký.

Troubsko

Tabulka č. 5 Letová aktivita krytonosců v Troubsku

21.3.	10 ♂ 2 ♀ Ceutqu
23.3.	46 ♂ 40 ♀ Ceutqu*; 2 ♂ 3 ♀ Ceutna
25.3.	164 ♂ 209 ♀ ZV Ceutqu*; 12 ♂ 8 ♀ ZV Ceutna
28.3.	5 ♂ 6 ♀ ZV Ceutqu; 1 ♀ ZV Ceutna
30.3.	6 ♂ 11 ♀ ZV Ceutqu
7.4.	5 ♂ 10 ♀ BV Ceutqu
14.4.	10 ♂ 6 ♀ BV Ceutqu; 1 ♂ 1 ♀ BV Ceutna
19.4.	1 ♂ 1 ♀ BV Ceutqu
25.4.	2 ♂ 2 ♀ ZV Ceutqu
28.4.	1 ♂ 1 ♀ ZV Ceutqu
9.5.	1 ♂ 1 ♀ ZV Ceutqu
13.5.	5 ♂ 1 ♀ BV Ceutqu

Sledování letové aktivity bylo zahájeno 8.2.2022 (tabulka č. 5), první výskyty byly zjištěny až v polovině března s jedním vrcholem v poslední dekádě března. V tabulce nejsou uvedena hodnocení bez výskytu škůdců (14.2. – 14.3., 4.4., 21.4., 2 – 5.5. a 16.5.).

Tabulka č. 6 Poškození rostlin a sklizeň – Troubsko 2022

Var.	13.05.2022		09.06.2022		18.07.2022	
	poškození (v cm)	% biologické účinnosti	poškození (v cm)	% biologické účinnosti	t/ha	%
1	42,17a	0	87,57a	0	2,05a	100
2	28,83ab	31,62	90,27a	-3,08	2,31a	112,79
3	20,13ab	52,25	86,2a	1,56	2,4a	117,31
4	17,60ab	58,26	87,5a	0,08	2,32a	113,15
5	26,83ab	36,36	82,13a	6,2	2,58a	125,91
6	17,67ab	58,1	67,83a	22,54	2,14a	104,48
7	19,73ab	53,2	68,5a	20,63	2,24a	109,15
8	10,07b	76,13	56,5a	35,48	2,48a	121,07
9	17,43ab	58,66	75,73a	13,51	2,07a	101,01
10	13,47b	68,06	69,97a	20,1	2,16a	105,42
11	19,87ab	52,89	81,7a	6,7	2,34a	114,27
12	21,67ab	48,62	77,63a	11,34	2,19a	106,75

Při rozborování stonků (tabulka č. 6) byl zjištěn průkazný rozdíl mezi variantami 8 a 10 a ostatními sledovanými v prvním termínu hodnocení. Ve druhém termínu hodnocení výrazně poklesla biologická účinnost, mezi jednotlivými variantami nebyly zjištěny průkazné rozdíly. Při sklizňovém hodnocení nebyl zjištěn průkazný rozdíl, u všech ošetřených variant došlo ke zvýšení výnosu semen.

### Šumperk

V Šumperku byl pokus zaset 28.8. 2021. Porost se v období podzimu vyvíjel příznivě. Do zimy vstupoval jako vyrovnaný a dobře připravený snášet abiotické stresy (6 – 7 pravých listů, průměrná tloušťka kořenového krčku 10.5 – 11.5 mm). Zimu překonal bez větších problémů. Misky pro monitoring letové aktivity byly do porostu vloženy poměrně časně 15.2. Cílem bylo nepromeškat první letovou aktivitu, zachytit její průběh v její kompletní podobě a co nejdříve navázat na monitoring letové aktivity dřepčíka olejkového prováděný na této pokusné lokalitě až do počátku prosince 2021. Výsledky uvedené v Tabulce 7 také potvrzují, že dospělci tohoto druhu (*Psylch*) byli těmi prvními aktivními zástupci škodlivé hmyzí fauny přítomnými v porostu poměrně dlouho před tím (18.2. 2022), než se tam objevili první migranti krytonosce čtyřzubého (*Ceutqu*) a k. řepkového (*Ceutna* 21.3. 2022). Letová aktivita byla dvouvrcholová (24 - 28.3. a 29.4. – 10.5.) Jasně dominoval *Ceutqu*, avšak ani výskyt *Ceutna* nebyl zcela zanedbatelný. Z výsledků monitoringu vyplývá, že letová i ovipoziční aktivita k. čtyřzubého i k. řepkového se na pokusné lokalitě protáhla nejméně až do 20.5., kdy byl monitoring ukončen.

Tabulka č.7 Letová aktivita vybraných druhů škůdců, Šumperk 2022 (přepočteno na 1 miskou)

18.2.	0.67 <i>Psylch</i> 0.33 ♀ ZV
9.3.	1.33 <i>Psylch</i> 0.33 ♀ ZV, 0.33 <i>Phyni</i>
14.3.	1.33 <i>Psylch</i> 0.33 ♀ ZV, 0.67 <i>Phyni</i>
17.3.	2.00 <i>Psylch</i> 0.33 ♀ BV
21.3.	20.33 <i>Ceutqu</i> 5.33 ♀ BV, 0.67 <i>Ceutna</i> 0.33 ♀ BV, 1.33 <i>Psylch</i> 0.67 ♀ BV
24.3.	168.33 <i>Ceutqu</i> 67.33 ♀ 4.33 NV, 6.33 <i>Ceutna</i> 3.00 ♀ 1NV, 1.67 <i>Psylch</i> ♂
28.3.	140.33 <i>Ceutqu</i> 43.33 ♀ 10.33 NV/ZV, 9.00 <i>Ceutna</i> 2.33 ♀ 1NV/ZV, 5.67 <i>Psylch</i> 1 ♀ BV, 1.33 <i>Meliae</i>
31.3.	29.00 <i>Ceutqu</i> 16.33 ♀ 0.33 ZV, 1.67 <i>Ceutna</i> 0.33 ♀ ZV, 2.00 <i>Psylch</i> ♂, 5.00 <i>Meliae</i>
4.4.	0.67 <i>Ceutqu</i> 0.33 ♀ ZV
7.4.	2.00 <i>Ceutqu</i> 1.33 ♀ 0.67 ZV, 1.33 <i>Psylch</i> 0.67 ♀ BV, 1.00 <i>Meliae</i>
12.4.	4.33 <i>Ceutqu</i> 1.67 ♀ ZV, 0.33 <i>Psylch</i> ♂
14.4.	4.67 <i>Ceutqu</i> 2.00 ♀ ZV, 0.67 <i>Psylch</i> 0.33 ♀ ZV, 3.67 <i>Meliae</i>
19.4.	2.67 <i>Ceutqu</i> 1.00 ♀ ZV, 2.00 <i>Meliae</i>
22.4.	3.33 <i>Ceutqu</i> 2.33 ♀ 1.67 ZV, 16.33 <i>Meliae</i>
26.4.	3.67 <i>Ceutqu</i> 1.33 ♀ 1.00 ZV, 8.33 <i>Meliae</i>
29.4.	21.67 <i>Ceutqu</i> 10.67 ♀ 9.00 ZV, 1.00 <i>Ceutna</i> 0.67 ♀ 0.33 ZV, 21.67 <i>Meliae</i>
3.5.	58.00 <i>Ceutqu</i> 27.00 ♀ 24.67 ZV, 2.67 <i>Ceutna</i> 0.67 ♀ 0.33 ZV, 52.33 <i>Meliae</i>
6.5.	41.00 <i>Ceutqu</i> 17.00 ♀ 14.33 ZV, 2.67 <i>Ceutna</i> 2.00 ♀ 1.67 ZV, 20.67 <i>Meliae</i>
10.5.	25.67 <i>Ceutqu</i> 16.00 ♀ 10.33 ZV, 0.67 <i>Ceutna</i> ♀ 0.33 ZV, 21.67 <i>Meliae</i>
20.5.	9.00 <i>Ceutqu</i> 5.00 ♀ 3.50 ZV, 0.50 <i>Ceutna</i> ♀ ZV, 15.00 <i>Meliae</i>

Rozvleklost období letové aktivity a kladení zřejmě výrazně ovlivnila zaznamenané hodnoty poškození stonků od larev obou sledovaných krytonosců a nízkou účinnost porovnávaných

insekticidů. Z výsledků uvedených v Tabulce 8 je zřejmé, že pro získání nezkreslené představy o reálné účinnosti insekticidních aplikací zejména v podmínkách vysokého výskytu a dlouhého období kladení je také důležité, kdy se provádí odběr rostlin a kdy se úroveň poškození stonků hodnotí, neboť úroveň poškození postupně narůstá (viz rozdíly mezi 1. a 2. hodnocením).

Ze srovnání dat v tabulce 8 a 9 (výnosy) je patrné, že bez ohledu na zaznamenanou účinnost insekticidů na škůdce samotného, se dopad na výnos často vůbec neprojevil. Jako jedna z variant, o jejímž pozitivním přínosu lze v tomto smyslu přeci jen uvažovat, je aplikace etherického pyretroidu etofenprox těsně před počátkem kladení samic krytonosců, následovaná aplikací kombinace pyretroidu (zde lambda-cyhalothrin) s neonikotinoidem (acetamiprid) v nesnížených dávkách (var. 10). Zcela bezvýznamná je aplikace předčasná (zde termín I) a vlastně jakákoliv aplikace nezdojená (bez ohledu na termín postřiku).

Tabulka č. 8 Délka žirem poškozené části stonku, Šumperk 2022

	19.5.2022			6.6.2022		
	cm	s. odchylka	účinnost %	cm	s. odchylka	účinnost %
1	72,10	10,86	0,00	75,30	15,12	0,00
2	48,30	18,80	33,01	78,30	25,93	8,78
3	31,50	11,29	56,31	57,20	24,40	22,01
4	34,60	12,16	52,01	69,45	32,64	7,77
5	22,40	14,42	68,93	52,94	28,04	29,7
6	28,90	16,23	59,92	64,91	31,79	13,79
7	21,70	13,67	69,90	53,29	29,96	29,23
8	18,40	10,04	74,48	50,05	28,81	33,53
9	26,30	11,06	63,62	53,98	23,68	28,32
10	21,70	12,99	69,90	43,16	28,43	42,68
11	37,50	15,34	47,99	61,53	28,86	18,29
12	23,20	10,33	67,82	4856	23,74	35,51

Tabulka č. 9 Výnos semen Šumperk 2022

Var.	t/ha	%	Var.	t/ha	%
1	4.24a	100.00	7	4.52a	106.67
2	3.95a	93.21	8	4.04a	95.16
3	4.26a	100.38	9	4.61a	108.81
4	4.47a	105.47	10	4.98a	117.42
5	4.12a	97.17	11	4.03a	95.03
6	4.48a	105.66	12	4.24a	100.00

## Diskuse

V posledních asi pěti až osmi letech jsou u obou druhů stonkových krytonosců ve střední a západní Evropě zaznamenávány v porostech řepky vyšší výskyty, první záchyty dospělců ve žlutých miskách se ve vyšší frekvenci přesouvají do dřívějších termínů (únor, počátek března) a období kladení začíná dříve (Junk et al., 2012; Eickermann et al., 2014). To je samo o sobě dost důležité z hlediska nutnosti měnit přístup k ochraně, ale není to vše. To, co komplikuje zemědělcům ochranu porostů před těmito škůdci ještě více, je výrazně rozvleklejší průběh migrací do porostů zejména u krytonosce čtyřzubého. Rozvleklost letové aktivity je pak příčinou prodloužení období kladení o 2 – 4 týdny. Kombinace výrazného nárůstu výskytů a prodloužení období kladení jsou zřejmě těmi hlavními důvody, proč se škodám působeným



larvami zabránit nedaří (Eickermann et al., 2020). Je obtížné stanovit vhodný termín pro aplikaci insekticidu a reziduální účinnost jedné aplikace není dostatečně dlouhá, aby poskytla porostu ochranu po celé období kladení. Výsledky publikované v tomto příspěvku to potvrzují a jsou v souladu s několika dalšími studiemi (Milovac et al., 2017; Heimbach & Müller, 2013). V roce 2020 Havel a kolektiv zjistili, že účinnost jednoho ošetření syntetickými pyretroidy je v porovnání s organofosfáty zcela nedostatečná a že jedno ošetření insekticidem v současnosti pro ochranu řepky proti stonkovým krytonoscům naprosto nestačí. V roce 2022 se to potvrdilo, ale ani dvě ošetření insekticidy nedokázaly řepku dostatečně ochránit proti krytonoscům. Problémem je nedostatečná perzistence účinku u obou hlavních skupin insekticidů, pyretroidů i neonikotinoidů. Je to dáno vztahem, který se postupně mění: délka perzistence insekticidů se relativně snižuje v závislosti na prodlužování délek migrací a kladení. Ochrana porostů postavená na jednom postřiku provedeném někdy na začátku období kladení, a to i za předpokladu správného načasování (tedy těsně před zahájením kladení prvních samic v populaci), nemůže zajistit, aby zůstal porost nenapaden. Ze studií zabývajících se vlivem probíhající klimatické změny na chování řepkových škůdců vyplývá, že se u krytonosce čtyřzubého i krytonosce řepkového bude i nadále období migrací (a tedy i kladení) prodlužovat (Junk et al., 2012; Eickermann et al., 2014). První známky poklesu citlivosti populací krytonosce řepkového a krytonosce čtyřzubého k pyretroidům byly v Evropě zaznamenány již před několika lety (Heimbach & Müller, 2013). Také v ČR již byly populace k. čtyřzubého se sníženou citlivostí k pyretroidům zaznamenány. Poprvé v roce 2019 a po té opět v letech 2020 i 2021 (Seidenglanz et al., 2021b). Je proto možné, že někde se už rezistence v praxi projevuje. Je potřeba hledat technologie pěstování, které jsou méně závislé na pesticidech, zpřesňovat metody prognózy a signalizace, což je nyní mnohem důležitější než dřív (Eickermann et al., 2020), přehodnotit a na dost odlišných základech postavit způsob konstruování tak zvaných prahů škodlivosti (Ramsden et al., 2017), intenzivně hledat a reálně do šlechtitelských programů zařazovat zdroje tolerance a rezistence (Hervé & Cortessero, 2016), aby bylo možné více stavět na obranných mechanismech rostlin (zvýšit resilienci a rezistenci agrocenóz proti (a)biotickým stresům) a ověřovat a využívat pozitivní dopady spojené s odlišnou kompozicí a strukturou porostů na disperzi a výskyt škůdců (Cadoux et al., 2015; Dam et al., 2020). Otázkou do diskuse je, jestli při tak dlouhé aktivitě krytonosců a při tak výrazně nadprahových výskytech, jaké byly zaznamenány na lokalitě Šumperk, by neměla následovat ještě aplikace další na konci dubna.

### **Závěr**

V roce 2022 byla letová aktivita krytonosců v Opavě a Troubsku kratší než v předchozích letech, ale i přes to výrazně delší než před 10 lety. V Šumperku byla letová aktivita obou druhů stonkových krytonosců naopak relativně dlouhá se dvěma jasně odlišitelnými vrcholy. Situace se postupně zhoršuje, protože vlivem příznivých zim více škůdců přezimuje a není k dispozici dostatečně účinné opatření na jejich potlačení. Pěstitele jsou stavěni do situace, kdy se současnými registrovanými přípravky nelze řepku dostatečně ochránit a roste riziko vzniku rezistence, protože tytéž přípravky jsou registrovány i proti dalším jarním škůdcům, takže při jejich aplikaci s nimi část krytonosců přijde opakovaně do styku.

### **Literatura**

K dispozici u autora příspěvku

**Poděkování** (Dedikace): Výsledky uvedené v tomto příspěvku byly získány při řešení projektu č. QK21010332 (MZe ČR). Při přípravě rukopisu a též při zpracovávání výsledků byly využity prostředky z projektů MZE-RO1018, RO1718 a RO1818

**Kontaktní adresa:**

Ing. Veronika Gališová  
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.  
Pracoviště Opava  
Purkyňova 10, 746 01 Opava  
tel.: +420 553 624 160; e-mail: galisova@oseva.cz

## Monitoring patogenů ve směsích pro zatravňování tramvajových tratí

### Monitoring of pathogens in grass mixtures for tram tracks

Golosna L., Holubec V., Chrpová J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6-Ruzyně

#### Abstrakt

V roce 2022 byl proveden monitoring houbových onemocnění u 3 experimentálních travních směsí pro terénní úpravy ve dvou lokalitách v Praze na tramvajových točnách Sídliště Řepy a Spořilov. Výsledkem vizuálního posouzení a fytopatologického rozboru vybraných rostlin v laboratoři bylo zjištěno, že na trávách v městském prostředí byly nalezeny patogeny z rodů *Fusarium*, *Alternaria* a *Nigrospora*. Na rostlinách čeledi *Fabaceae* byly zjištěny druhy - *Erysiphe*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Ascochyta*, *Volutela*, *Alternaria*. Další druhy dvouděložných - *Achillea*, *Plantago*, *Cichorium* byly napadeny houbami z rodů *Septoria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Colletotrichum*.

**Klíčová slova:** zatravňovací koberce; trávy; byliny; jeteloviny; houbové choroby

#### Abstract

Disease monitoring was carried out on 3 experimental grass mixtures for landscaping in two locations of tram turning ends in Prague at the Sídliště Řepy and Spořilov in 2022. As a result of visual assessment and phytopathological analysis of selected plants in the laboratory, it was found that pathogens from the genera *Fusarium*, *Alternaria* and *Nigrospora* were localized on grasses in the urban environment. The genera *Erysiphe*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Ascochyta*, *Volutela*, *Alternaria* were found on the plants of the *Fabaceae* family. Other species of dicots - *Achillea*, *Plantago*, *Cichorium* were affected by fungi from the genera *Septoria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Alternaria* and *Colletotrichum*.

**Key words:** grass carpets; grasses; herbs; clovers; fungal diseases

#### Úvod

Tramvajové tratě v mnoha evropských městech jsou zatravňovány. Tyto zelené pruhy poskytují celou řadu výhod zejména snižování teploty výparem a transpirací, umožňují infiltraci dešťové vody, absorbují znečištění a hluk generovaný broušením kovových kol na kolejích (Kaushik, 2013). Náročné prostředí měst nás nutí vyhledávat druhy, které odolávají suchu, horku i vydatným dešťům. V obcích se objevují louky místo klasických sekaných trávníků. Jejich výhodou je, že jsou odolné vůči výkyvům počasí, mají nízké náklady na údržbu a jsou druhově rozmanité – je tedy velká šance, že v nich přežije větší množství druhů (Zelená domácnost, 2022).

Směsi vybrané pro ozeleňování dopravních staveb by měly mít vlastnosti vhodné pro růst v městském prostředí, neměly by vyžadovat dodatečné zalévání a měly by mít dobrý vzhled a přežití. Tyto vlastnosti mohou poskytnout plané druhy rostlin z extrémních lokalit, které jsou přizpůsobené nepříznivým faktorům. Současné klimatické změny a požadavky na životní prostředí v sídelních celcích a velkých průmyslových aglomeracích vedou k nutnému přehodnocení současných technologií klasických zelených tratí s přírodními trávníky a zeminami (Silnice železnice, 2019). V ČR není dostatečně široké spektrum komerčních materiálů pro ozeleňování, které by byly potřeba pro zátěžové a speciální podmínky měst a pro měnící se klimatické podmínky. V kolekcích genové banky bylo shromážděno v průběhu 30ti leté expediční aktivity v ČR přes tisíc genetických zdrojů. Právě tyto materiály byly využity pro speciální osivové směsi v kombinaci s komerčními domácími kultivary.

Údržba trávníku hraje zásadní roli v jakémkoli krajinném designu, včetně městského. Krásný a dobře udržovaný trávník může zlepšit okolní krajinu (Harsh et al., 2020). Jedním z faktorů ovlivňujících vzhled trávníkové směsi je odolnost vůči různým faktorům prostředí. Napadení trav patogeny zhoršuje jejich stav a může vést až k úplnému zničení trávníku.

Jeteloviny přítomné v bylinných směsích tak mohou být zvláště v pozdním létě a na podzim silně napadeny padlím. Přispívá k tomu sečení, které vede k šíření infekce. (Kobes, Slachta, 2011).

Na travách se nejčastěji vyskytují choroby kořenového systému, způsobené houbami z rodů *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*. Na listech se během vegetace běžně vyskytují rody *Septoria*, *Bipolaris*, *Puccinia*, *Alternaria* aj. Mimo sezónu trpí trávník plísní sněžnou (*Monographella nivalis*, syn.: *Microdochium nivale*) a tyfulózou (*Typhula incarnata* a *T. ishikariensis*). S příchodem jara dochází k výraznému rozvoji padlí (*Blumeria graminis*), zejména u *Poa pratensis* (Hsiang, Matsumoto, Millett, 1999; Vargas 1994; Retman, Nychyporuk, Shevchuk, 2018).

### Materiál a Metody

Pro terénní úpravy v Praze, zejména pro použití podél tramvajových tratí a na točnách, byly vybrány 3 směsi bylin:

1. Květnatá směs nižšího vzrůstu
2. Květnatá směs vyššího vzrůstu
3. Květnatá směs do sucha

Každá varianta byla ručně vyseta na plochu 30m<sup>2</sup>. Na každé lokalitě bylo tedy oseto 90 m<sup>2</sup>.

1. Květnatá směs nižšího vzrůstu obsahuje 11 druhů trav (*Agrostis capillaris*, *Anthoxanthum odoratum*, *Festuca rubra trichophylla*), *Festuca rupicola*, *Helictochloa pratensis*, *Phleum bertolonii*, *Phleum phleoides*, *Poa compressa*, *Poa pratensis*, *Trisetum flavescens*), 14 druhů bylin (*Dianthus carthusianorum*, *Dianthus deltoides*, *Echium vulgare*, *Filipendula vulgaris*, *Leontodon autumnalis*, *Leontodon hispidus*, *Linaria vulgaris*, *Matricaria chamomilla*, *Origanum vulgare*, *Plantago lanceolata*, *Plantago media*, *Sanquisorba minor*, *Sanquisorba officinalis*, *Silene vulgaris*) a 3 druhy jetelovin (*Anthyllis vulneraria*, *Trifolium incarnatum* a *Trifolium pratense*).

2. Květnatá směs vyššího vzrůstu obsahuje 9 druhů trav (*Brachypodium pinnatum* 3x, *Briza media*, *Bromus erectus*, *Cynosurus cristatus*, *Koeleria pyramidata*, *Trisetum flavescens*), 4 jeteloviny (*Astragalus cicer*, *Medicago sativa*, *Onobrychis viciifolia*, *Securigera varia*) a 12 druhů bylin (*Achillea ptarmica*, *Anchusa officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Betonica officinalis*, *Carum carvi*, *Cichorium intybus*, *Echinops sphaerocephalus*, *Galium album*, *Galium verum*, *Hypericum perforatum*, *Sanguisorba officinalis*, *Scabiosa ochroleuca*).

3. Květnatá směs do sucha zahrnuje 15 zástupců trav (*Agrostis capillaris*, *Bothriochloa ischaemum*, *Bromus erectus*, *Festuca filiformis*, *Festuca pallens*, *Festuca rupicola* 3x, *Festuca valesiaca*, *Helictochloa pratensis*, *Melica transsilvanica*, *Phleum bertolonphiii*, *Poa compressa*, *Stipa capillata*), 5 druhů jetelovin (*Anthyllis vulneraria*, *Lotus corniculatus*, *Medicago lupulina*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium repens*) a 10 bylin (*Achillea millefolium*, *Cichorium intybus*, *Dianthus carthusianorum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago media*, *Potentilla argentea*, *Ranunculus bulbosus*, *Sanquisorba minor*, *Thymus pulegioides*, *Tragopogon pratensis*).

Vybrané směsi byly hodnoceny na tramvajových točnách v Praze na dvou lokalitách: Sídliště Řepy a Spořilov. Fytopatologický monitoring plodin byl proveden na konci července, v období

vysoké prevalence hlavních patogenů. Na pozemcích byl vizuálně hodnocen stav porostů. Rostliny s příznaky poškození (povlak, skvrny na listech nebo stoncích, změna barvy, vadnutí atd.) byly vybrány pro další laboratorní analýzu.

Fytopatologický rozbor rostlin s příznaky poškození byl proveden v laboratoři týmu Genetika a šlechtitelské metody ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze - Ruzyně.

Části vybraných rostlin s příznaky poškození byly umístěny do sterilních plastových Petriho misek na bramborovo-dextrózový agar (PDA) s přidavkem antibiotika Gentamicin. Experiment byl také duplikován ve vlhké komoře ve skleněných Petriho miskách.

Nejprve byly části rostlin sterilizovány v 1% roztoku SAVO s přidavkem Twin 20 po dobu 3 minut. Po sterilizaci byly části rostlin 3x promyty ve sterilní vodě a vysušeny na sterilním papíru.

Inkubace byla prováděna po dobu 10 dnů pod UV lampou s režimem 14/10 při teplotě 20°C.

Fytopatogeny byly identifikovány pomocí binokuláru Olympus BX41 a mikroskopu Olympus SZ61 na základě morfologických charakteristik kolonií na PDA, přítomnosti a charakteristiky plodnic, strukturních a barevných znaků konidioforů a konidií hub.

### Výsledky

Fytopatologický monitoring pokusných ploch, kde byly vysety vybrané směsi ukázal, že koncem července byly rostliny v dobré kondici. U většiny směsí nebylo při vizuální kontrole zjištěno žádné významné poškození.

Na tramvajové zastávce Sídliště Řepy bylo poměrně vysoké napadení *Trifolium incarnatum* a *Trifolium pratense* padlím *Erysiphe trifolii*. Toto onemocnění se projevuje v podobě bílého pavučinového povlaku na horní i spodní části listu. Škodlivost choroby spočívá v poklesu asimilačního povrchu listů, poklesu turgoru a předčasném odumírání, napadené listy zasychají a drolí se. Vývoj onemocnění je pozorován ve druhé polovině léta, které je doprovázeno výraznými teplotními rozdíly, vlhkými a suchými obdobími.

Na ostatních rostlinách nebyly pozorovány žádné výrazné vizuální projevy chorob jak na lokalitě Sídliště Řepy, tak na lokalitě Spořilov. U některých druhů byly na listech a stoncích nalezeny malé skvrny. Nejčastěji se objevily na jetelovinách (*Trifolium repens*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Onobrychis viciifolia*, *Securigera varia*, *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago lupulina*, *Lotus corniculatus*) jako skvrny na listech a stoncích. Fytopatologickým rozbohem bylo zjištěno, že houby rodu *Fusarium* byly přítomny na všech druzích rostlin této skupiny. Přítomnost hub tohoto rodu za příznivých podmínek přispívá k systémovému poškození rostlin, ucpání cévního systému, hnilobě kořenů a vadnutí. Rozvoj choroby usnadňují zahuštěné porosty, rozdíly v suchých a vlhkých obdobích (Markov, 2017). Skvrnitost listů trav byla způsobena vývojem patogenů z rodů *Colletotrichum*, *Ascochyta*, *Volutella*, *Cymadothea*. Na *Trifolium* sp. byly zjištěny *Colletotrichum trifolii* Bain, původce antraknózy, *Cymadothea trifolii* a *Sphaeria trifolii*, původce černé skvrnitosti listů. Druhy *Medicago* byly postiženy plísní *Ascochita* - *Ascochita boltshauseri*, antraknózou - *Colletotrichum trifolii* a *Volutella* sp. Původce antraknózy *Colletotrichum lupini* byl nalezen na *Onobrychis viciifolia* a *Cymadothea trifolii*, černá skvrnitost listů (*Sphaeria trifolii*) byla nalezena na *Lotus corniculatus*.

Na travách byly během analýzy pozorovány houby z rodu *Fusarium* sp., včetně *Fusarium sporotrichioides*, komplex druhů *Alternaria* a *Nigrospora*.

Analýzováni byli i další zástupci dvouděložných. Na *Plantago lanceolata* byl zaznamenán vývoj patogenu *Septoria medicaginis*, *Phomopsis subordinaria*, antraknóza *Colletotrichum* sp. a *Fusarium* sp. Na *Cichorium intybus* byly přítomny druhy rodu *Fusarium* a *Alternaria*. *Achillea millefolium* byla napadena *Phomopsis achilleae*, dále houbami rodů *Alternaria* a *Fusarium*.



Při provádění fytopatologického rozboru byl kromě patogenních druhů identifikován významný počet saprofytických hub, které nepředstavují nebezpečí pro rostliny. Jde o zástupce rodů *Cladosporium*, *Myrothecium*, *Acremoniella*, *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Stemphyllium*, *Pithomyces*, *Torula*, *Mucor*, *Gliocladium*, *Trichotecium*. Tyto druhy se často podílejí na rozkladu rostlinných zbytků v půdě. Některé z nich však mohou za příznivých podmínek způsobit i poškození oslabených rostlin.

Na základě získaných výsledků můžeme pozorovat širokou škálu jak patogenních, tak saprofytických druhů hub. Nebylo pozorováno výraznější poškození vybraných směsí rostlin různými chorobami, což svědčí o příznivých podmínkách pro jejich růst na stanovišti. Druhy zjištěné v průběhu fytopatologického rozboru za příznivých podmínek pro svůj růst mohou zhoršit stav trávníku, způsobit poškození rostlin, zasychání a zhoršování jejich vzhledu.

Vybrané směsi jsou nenáročné v městském prostředí, nevyžadují další závlaku a mají dobrý vzhled a schopnost přežití.

### Závěr

S ohledem na klimatické změny je třeba ekologizovat zhoršující se podmínky života v aglomeracích a využít domácích genofondů se širokou ekologickou amplitudou. Výsev travních směsí v městském prostředí, zejména v blízkosti tramvajových tratí, zlepšuje mikroklima, čistí vzduch, pohlcuje z něj škodlivé výpary a prachové částice a pohlcuje hluk.

V důsledku monitoringu bylo zjištěno, že na trávách v městském prostředí Prahy byly nalezeny patogeny z rodů *Fusarium*, *Alternaria* a *Nigrospora*. Na rostlinách čeledi *Fabaceae* byly zjištěny rody *Erysiphe*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Ascochyta*, *Volutela*, *Alternaria*. Další druhy dvouděložných - *Achillea*, *Plantago*, *Cichorium* byly napadeny houbami z rodů *Septoria*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Fusarium* a *Colletotrichum*. U druhů rodu *Trifolium* bylo pozorováno značné poškození padlím *Erysiphe trifolii*, které nepříznivě ovlivňuje vzhled trávníku.

Tab. 1. Výsledky fytopatologické analýzy rostlin, lokalita Řepy

Rostliny	Zjištěné druhy hub	
	Patogenní houby	Saprofytické houby
1. Květnatá směs nižšího vzrůstu		
Jetel inkarnát <i>Trifolium incarnatum</i> jetel luční <i>Trifolium pratense</i>	<i>Colletotrichum trifolii</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Myrothecium</i> sp. <i>Acremoniella atra</i> <i>Trichoderma</i> sp.
2. Květnatá směs vyššího vzrůstu		
Čičorka pestrá <i>Securigera varia</i>	<i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Stemphyllium</i> sp.	<i>Myrothecium</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Trichoderma</i> sp.
Tolice vojtěška <i>Medicago sativa</i>	<i>Ascochyta boltshauseri</i> <i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Stemphyllium</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i> <i>Pithomyces chartarum</i> <i>Trichoderma</i> sp.
Trávy	<i>Fusarium</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp. <i>Myrothecium</i> sp. <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Stemphyllium</i> sp. <i>Alternaria</i> spp.
Vičenec ligrus	<i>Alternaria</i> spp.,	<i>Torula herbarum</i>

<i>Onobrichus viciifolia</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Colletotrichum lupini</i>	<i>Mucor sp.</i> <i>Acremoniella atra</i> <i>Myrothecium sp.</i> <i>Trichoderma sp.</i>
Tolice srpovitá <i>Medicago falcata</i>	<i>Alternaria sp.</i> , <i>Colletotrichum trifolii</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Stemphyllium sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>
3. Květnatá směs do sucha		
Trávy	<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i>	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Myrothecium sp.</i>
Tolice dětelová <i>Medicago lupulina</i>	<i>Volutella colletotrichoides</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Ascochita medicaginicola</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
Řebříček obecný <i>Achillea millefolium</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Phomopsis achilleae</i>	<i>Trichoderma sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Nigrospora sp.</i>
Jitrocel kopinatý <i>Plantago lanceolata</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Septoria medicaginis</i>	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Stemphyllium sp.</i>
Jetel plazivý <i>Trifolium repens</i>	<i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i>	<i>Myrothecium sp.</i> <i>Cladosporium herbarum</i>
Čekanka obecná <i>Cichorium intybus</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
Štírovník růžkatý <i>Lotus corniculatus</i>	<i>Cymadothea trifolii</i> ( <i>Sphaeria trifolii</i> ) <i>Alternaria sp.</i> <i>Stemphyllium sp.</i>	<i>Myrothecium sp.</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Gliocladium sp.</i>

Tab. 2. Výsledky fytopatologické analýzy rostlin, lokalita Spořilov

Rostliny	Zjištěné druhy hub	
	Patogenní houby	Saprofytické houby
1. Květnatá směs nižšího vzrůstu		
Jetel inkarnát <i>Trifolium incarnatum</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Alternaria sp.</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> <i>Acremoniella atra</i>
Jetel luční <i>Trifolium pratense</i>	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Stemphyllium sp.</i>	<i>Myrothecium sp.</i> <i>Cladosporium herbarum</i>
2. Květnatá směs vyššího vzrůstu		
Vičenec ligrus <i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Bipolaris sorokiniana</i> <i>Stemphyllium sp.</i>	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Myrothecium sp.</i> <i>Acremoniella atra</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Pithomyces chartarum</i>
Čekanka obecná <i>Cichorium intybus</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i>	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Epicoccum nigrum</i>

		<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Trichotecium roseum</i>
3. Kvetná směs do sucha		
Jetel plazivý <i>Trifolium repens</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Cymadothea trifolii</i> ( <i>Sphaeria trifolii</i> )	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Epicoccum nigrum</i>
Jitrocel kopinatý <i>Plantago lanceolata</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Phomopsis subordinaria</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Myrothecium sp.</i> <i>Stemphillium sp.</i> <i>Mucor sp.</i>

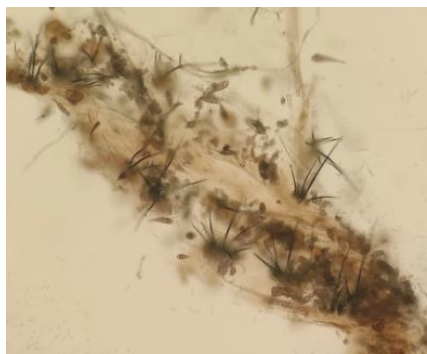
### Použitá literatura

- Harsh S. Hathi, Dipti L. Parmar, Ankit B. Babarya and Kishan Prajapati. Lawn establishment and maintenance. Vigian varta 1/8, 2020, p. 33-38.
- Hsiang T., Matsumoto N., Millett S.M. Biology and management of Tiphula snow mold of turfgrass. Plant Disease. 1999. V. 3, No 9. P. 788-798.
- Kaushik (2013). Grass covered tram tracks in Europe. Dostupné na <https://www.amusingplanet.com/2013/06/grass-covered-tram-tracks-in-europe.html>
- Kobes M., Slachta M. The occurrence of Erysiphe trifolii on Lathyrus pratensis in a foothill area of South Bohemia. Journal of agrobiological. 28(1) 2011 p. 25-31
- Markov I. at oll. Phytopathology: Textbook. National universitz of life and environmental sciences of Ukraine. Kyiv: Lira-K, 2017, 547 p. (in Ukrainian)
- Retman S., Nychporuk O., Shevchuk O. Leaf diseases of lawn grasses. Quarantine and plant protection. V11-12, 2018, p. 18-21 (in Ukrainian)
- Silnice železnice (2019). Zelená tramvajová trať = cirkulární ekonomika a přizpůsobení se klimatu = kolejový absorber hluku s funkcí retence vody BRENS STERED. Dostupné na: <http://www.silnice-zeleznice.cz/clanek/zelena-tramvajova-trat-cirkularni-ekonomika-a-prizpusobeni-se-klimatu-kolejovy-absorber-hluku-s-funkci-retence-vody-brens-stered/>
- Zelená domácnost. <https://ekolist.cz/cz/zelena-domacnost/rady-a-navody/klasicke-travniky-ve-mestech-chronou.nahradit-je-mohou-louky>
- Vargas J.M. Management of turfgrass Diseases. Boca Raton: CRC Press, 1994. 320 p.

### Obrazová příloha

Identifikované rody patogenních hub na rostlinách experimentálních zatravnovacích směsí (foto L. Golosna)

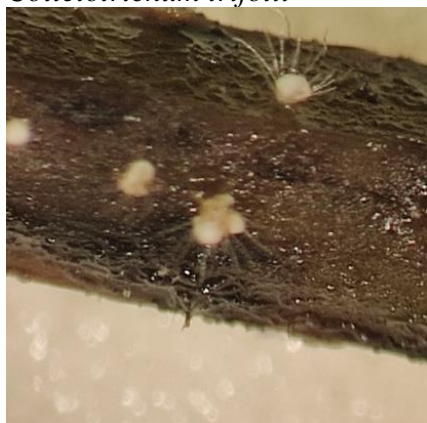




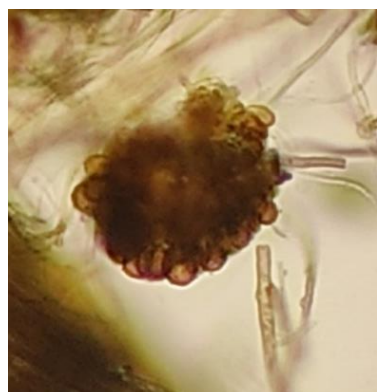
*Colletotrichum trifolii*



*Nigrospora*



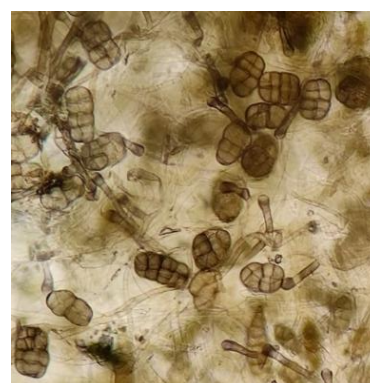
*Volutella* sp.



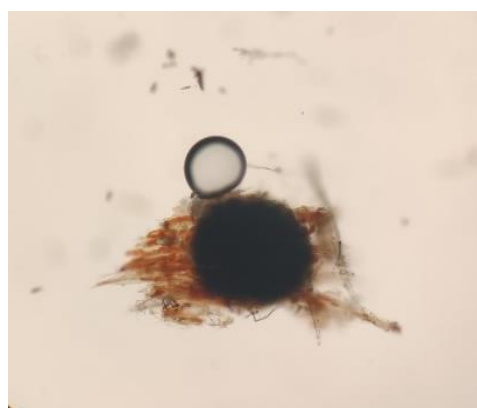
*Epicoccum nigrum*



*Myrothecium*



*Stemphylium*



*Cymadothea trifolii*  
(*Sphaeria trifolii*)



*Pithomyces chartarum*

**Kontaktní adresa:**

Lesia Golosna Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507

16106 Praha 6

[lesia.golosna@vurv.cz](mailto:lesia.golosna@vurv.cz)

## Laboratorní účinnost komponent silic na bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a *Dickeya solani*

Laboratory efficacy of essential oil components against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya solani*

Víchová J.<sup>1</sup>, Jílková B.<sup>1</sup>, Pokorný R.<sup>1</sup>, Holková L.<sup>1</sup>, Kmoch M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

### Abstrakt

V laboratorních podmínkách byla testována účinnost vybraných komponent silic (carvacrol, cinnamaldehyd, menthon, thymol přírodní a thymol syntetický) vůči bakteriím *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) a *Dickeya solani* (*Ds*). Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) komponent a dále byl testován účinek komponentu cinnamaldehyd na bakterii *Pcc* na discích hlíz bramboru.

U všech vybraných komponent silic byly prokázány antibakteriální účinky. Bylo zjištěno, že na bakterie *Pcc* i *Ds* byl nejúčinnější komponent silice cinnamaldehyd – MIC < 0,5 µl/ml a MBC 1,5 µl/ml pro *Pcc* a 2,5 µl/ml pro *Ds*. Disky hlíz ošetřené cinnamaldehydem o koncentraci MIC byly po 24 h od inokulace bez známek napadení *Pcc*, nicméně po 48 a 72 h byly již měřitelné skvrny mokré hniloby.

**Klíčová slova:** biologická ochrana, MIC, MBC, pektinolytické bakterie, *Solanum tuberosum*

### Abstract

The efficacy of selected essential oil components (carvacrol, cinnamaldehyde, menthone, natural thymol and synthetic thymol) against the bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) and *Dickeya solani* (*Ds*) was tested in laboratory conditions. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the components were determined, and the effect of the cinnamaldehyde component on *Pcc* bacteria on potato tuber discs was further tested. All selected components of essential oils were shown to have antibacterial effects. It was found that the most effective essential oil component was cinnamaldehyde on both *Pcc* and *Ds* – MIC < 0.5 µl/ml and MBC 1.5 µl/ml for *Pcc* and 2.5 µl/ml for *Ds*. Tuber discs treated with MIC concentration of cinnamaldehyde were free of *Pcc* infection after 24 h, however, after 48 and 72 h, soft rot spots were already measurable.

**Keywords:** biological control, MIC, MBC, pectinolytic bacteria, *Solanum tuberosum*

### Úvod

Bakterie rodu *Pectobacterium* a *Dickeya* patří k pektinolytickým prokaryotním organismům, které v porostu bramboru způsobují chorobu bakteriální černání stonku a měkkou hnilobu hlíz, čímž výrazně zhoršují kvalitu hlíz bramboru, významně redukuje výnos a skladovatelnost (Kůdela et al., 2002). Typické příznaky se objevují na bázi stonků, které nad povrchem půdy černají. Hniloba na hlízách se může projevit ihned v půdě, krátce po sklizni, nebo až v průběhu skladování (Vokál, 2013). Následný rozklad hlíz je většinou doprovázený silným zápachem (Hausvater a Doležal, 2014). Bakterie přežívají a šíří se napadenou nebo kontaminovanou sadbou, proto je proti bakteriálním patogenům velmi důležitá ochrana hlíz bramboru mořením. Jelikož v současné době nejsou povoleny žádné přípravky na moření hlíz proti bakteriálním patogenům, zaměřuje se pozornost na studium antagonistické aktivity bakteriálních a houbových organismů (Abd-El-Khair et al., 2021), nebo na využití silic z různých druhů rostlin nebo jejich jednotlivých purifikovaných složek (Hajian-Maleki et al., 2021).

Cinnamaldehyd, carvacrol, menthon, thymol přírodní a syntetický se jeví jako perspektivní pro moření hlíz bramboru. Rovněž silice ze skořice má silný baktericidní účinek (Božik et al., 2017b; Bravo Cadena et al., 2018). V silici dobromyslu je thymol obsažen 27 % (Bakkali et al., 2007), obsah carvacrolu se uvádí v rozmezí 30–67 % (Bakkali et al., 2007, Božik et al., 2017a). Dle Hussain et al. (2011) obsah thymolu, jako hlavní komponent silice tymiánu je 54 %. Komponent menthon je obsažen například v silici máty peprné a cinnamaldehyd je hlavní komponent (63 %) silice skořicovníku cejlonského (Barceloux, 2009). Cílem naší studie bylo v laboratorních podmínkách stanovit účinnost vybraných komponentů silic proti pektinolytickým bakteriím *Pcc* a *Ds*.

## **Materiál a metody**

Metodika hodnocení účinnosti silic a jejich komponentů byla převzata od Hajian-Maleki et al. (2021) a EUCAST (2003) a významně modifikována dle testovacích podmínek.

### Kultivace bakterií a příprava inokula

Do testů hodnocení účinnosti proti bakteriím způsobující měkké hniloby bylo vybráno pět komponent silic: cinnamaldehyd, carvacrol, menthon, thymol přírodní a syntetický a jako kontrola byla použita silice ze skořice, která slouží jako standard v našich pokusech (Jílková et al., 2021).

V testech byly použity sbírkové kmeny z VÚRV Praha-Ruzyně *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (*Pcc*), kmen CPPB 56 a *Dickeya solani* (*Ds*), kmen CPPB 200, který je ve sbírce uložen pod starším názvem *Dickeya dianthicola*. Oba kmeny byly vyizolované z napadených hlíz bramboru. Pro zajištění optimálního růstu byly kmeny *Pcc* a *Ds* kultivovány na King B médiu při teplotě 28 °C pro *Pcc* a pro *Ds* při teplotě 32 °C po dobu 48 h. Poté byla v Mueller Hinton Broth (MHB) (HiMedia Lab.) připravena bakteriální suspenze jednotlivých kmenů o koncentraci  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/ml, což odpovídá 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice.

### Hodnocení MIC

Roztoky komponent silic (M&H Míča a Harašta s.r.o., Sigma-Aldrich) byly připraveny 1,1x koncentrovanější z důvodu následného přidání inokula. Komponenty silic byly ředěny 96% ethanolem s přidáním Tween 20, čímž byla připravena základní koncentrace 100 µl/ml. Další koncentrace (75, 50, 25, 10, 5, 3, 2,5, 1,5 a 0,5 µl/ml) byly připraveny ze základního ředění přidáním MHB a Tween 20. Vzhledem k těkavosti komponent silic bylo zvoleno testování v 0,2 ml mikrozkuvkách, do kterých bylo pipetováno 135 µl roztoku přírodní látky v daných koncentracích a 15 µl inokula. Destička s mikrozkuvkami byla zabalena do folie a inkubována 24 h při teplotě 28 °C pro *Pcc* a při teplotě 32 °C pro *Ds* s nepřetržitým třepáním při rychlosti 100 rpm. Testování probíhalo ve čtyřech opakováních, s kontrolou růstu bakterie, kontrolou čistoty média, kontrolou čistoty komponentu silice v dané koncentraci bez inokula a standardem silice ze skořice.

Při hodnocení MIC byl nejprve z mikrozkuvek odebrán potřebný objem pro hodnocení MBC. Do zbylého objemu jednotlivých vzorků bylo pipetováno 15 µl 0,01% roztoku barviva resazurinu, jehož změna zbarvení v roztoku sloužila jako indikátor živých bakteriálních buněk. Vzorky byly opět zabaleny do folie a inkubovány další 2 h při teplotě 28 °C s nepřetržitým třepáním při rychlosti 120 rpm. Poté byly hodnoceny barevné změny vzorků oproti kontrolám. Fialové až růžové zbarvení testovaného vzorku znamenalo přítomnost živých bakterií, modré zbarvení znamenalo přítomnost mrtvých bakterií. Poslední koncentrace, u které bylo zjištěno modré zbarvení, byla hodnocena jako MIC.

### Hodnocení MBC

Ze vzorků připravených pro MIC (viz výše) byl odebrán objem 10 µl, který byl pipetován na plotny s Mueller Hinton Agar (HiMedia Lab.). Inkubace probíhala při teplotě 28 °C pro *Pcc* a při teplotě 32 °C pro *Ds* dalších 24 h. První koncentrace, u které nebyl zjištěn růst bakterií, byla hodnocena jako MBC.

Hodnocení účinnosti silice a komponentu na discích hlíz bramboru

Na discích hlíz bramboru odrůdy 'Red Anna' o tloušťce 1 cm byl testován účinek komponentu cinnamaldehyd na bakterii *Pcc*. Metodika byla převzata a upravena od Jiang et al. (2021). Koncentrační řada byla zvolena MIC, ½ MIC, ¼ MIC. Testování probíhalo v pěti opakováních, s kontrolou inokula bez silice, kontrolou sterilní destilované vody a kontrolou silice ze skořice v dané koncentrační řadě. Roztoky a inokulum byly připraveny a pipetovány do mikrozkušavek obdobně jako pro test MIC. Mikrozkušavky byly inkubovány na třepačce (150 rpm) po dobu 1 h při teplotě 28 °C. Poté byly pipetovány 2 µl vzorku do středu každého disku. Disky byly umístěny do Petriho misek na navlhčený sterilní filtrační papír. Inkubace probíhala při teplotě 28 °C a oblast skvrny onemocnění byla měřena po 24, 48, 72 h.

**Výsledky**Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a Minimální baktericidní koncentrace (MBC)

Laboratorními testy byl prokázán antibakteriální účinek všech vybraných komponent silic na bakterie *Pcc* a *Ds*. U obou bakterií bylo MIC dosaženo vždy při nižších hodnotách (Tab. 1) než byly hodnoty MBC (Tab. 2). MBC byla tedy ukázána schopnost bakterií částečně se zregenerovat z účinků komponent silic po přenosu na živnou půdu ideální k jejich růstu. Nejnižší hodnota MIC (< 0,5 µl/ml) byla zjištěna u cinnamaldehydu, a to shodně u obou bakterií (Tab. 1, Obr. 1), naopak nejvyšší hodnota MIC byla odečtena u carvacrolu (5 µl/ml) pro *Pcc* a u menthonu (10 µl/ml) pro *Ds* (Obr. 2).

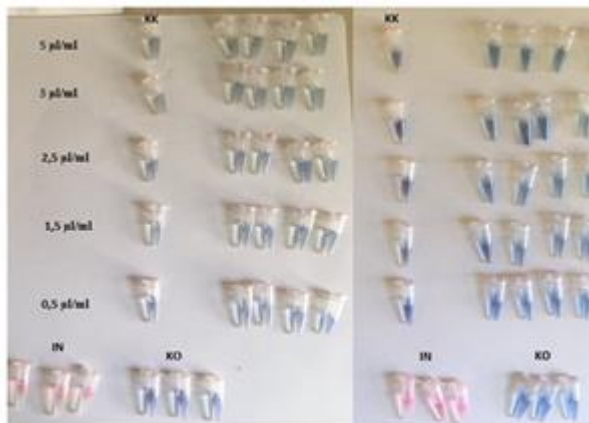
**Tabulka 1** Hodnoty Minimální inhibiční koncentrace komponentů silic na bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a *Dickeya solani*

	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Dickeya solani</i>
<b>Komponent silice</b>	<b>MIC (µl/ml)</b>	<b>MIC (µl/ml)</b>
carvacrol	5	2,5
cinnamaldehyd	< 0,5	< 0,5
menthon	2,5	10
thymol přírodní	3	2,5
thymol syntetický	2,5	2,5
silice ze skořice – kontrola	< 0,5	< 0,5

Hodnoty MBC (Tab. 2) byly u obou bakterií nejnižší opět u komponentu cinnamaldehyd (*Pcc* 1,5 µl/ml a *Ds* 2,5 µl/ml). Pro *Pcc* byla zjištěna nejvyšší MBC u dvou komponent carvacrol a menthon, zatímco pro *Ds* byla nejvyšší MBC při koncentraci 25 µl/ml.

**Tabulka 2** Hodnoty Minimální baktericidní koncentrace komponentů silic na bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a *Dickeya solani*

	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Dickeya solani</i>
<b>Komponent silice</b>	<b>MBC (µl/ml)</b>	<b>MBC (µl/ml)</b>
carvacrol	10	10
cinnamaldehyd	1,5	2,5
menthon	10	25
thymol přírodní	5	5
thymol syntetický	3	5
silice ze skořice – kontrola	2,5	1,5



**Obrázek 1** Stanovení MIC pro komponent cinnamaldehyd  
 Pozn.: vlevo MIC pro *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; vpravo MIC pro *Dickeya solani*; IN – kontrola inokulum; KO – kontrola médium; KK – kontrola komponentu bez inokula

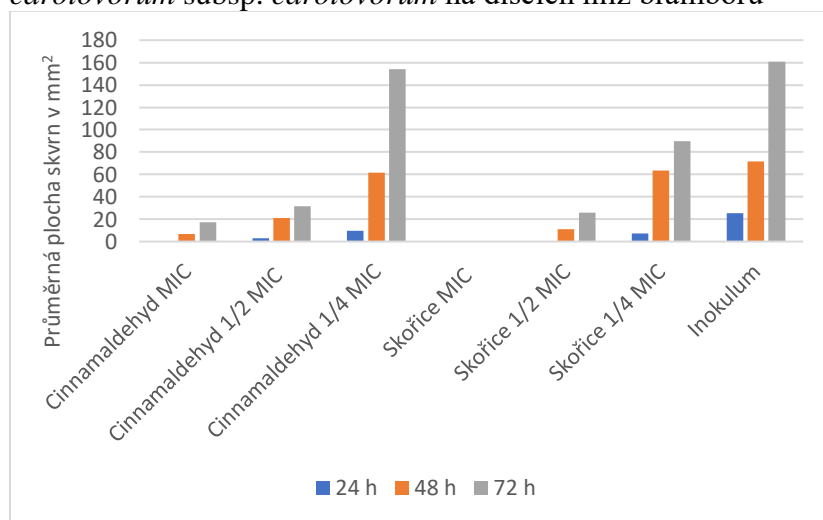


**Obrázek 2** Stanovení MIC pro komponent menthon  
 Pozn.: vlevo MIC pro *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; vpravo MIC pro *Dickeya solani*; IN – kontrola inokulum; KO – kontrola médium; KK – kontrola komponentu bez inokula

### Hodnocení účinnosti silice a komponentu na discích hlíz bramboru

Komponent cinnamaldehyd prokázal i na discích z hlíz bramboru účinky na bakterii *Pcc* (Graf 1). U disků, kde byla testována MIC, nebyly zjištěny po 24 h žádné příznaky napadení patogenem, po 48 h byla průměrná plocha skvrn 6,6 mm<sup>2</sup> a po 72 h bylo dosaženo hodnoty 17,3 mm<sup>2</sup>. Při porovnání hodnot komponentu cinnamaldehyd s kontrolou silice ze skořice bylo zřejmé, že silice ze skořice měla silnější účinnost na *Pcc*. Disky s testovanou MIC silice ze skořice byly ve všech sledovaných časových intervalech bez známek napadení a tato účinnost byl zachován ještě měsíc po inokulaci.

**Graf 1** Hodnocení účinnosti komponentu cinnamaldehyd na bakterii *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* na discích hlíz bramboru



Pozn.: časový interval 24, 48 a 72 h od inokulace patogenem

### Diskuze

Nejnižší hodnoty jak u minimální inhibiční, tak i u minimální baktericidní koncentrace byly stanoveny u komponentu cinnamaldehyd (hlavní složka skořice). Komponent dosáhl stejné účinnosti jako silice skořicovníku cejlonského, která má silné antimikrobiální účinky a v našich

testech ji používáme jako kontrolu (Jílková et al., 2021). Poměrně nízké hodnoty vykazoval i thymol přírodní i syntetický. Carvacrol měl srovnatelné hodnoty pouze v MIC u bakterie *Ds*, v ostatních případech dosahoval vyšších hodnot. Carvacrol a thymol jsou v literatuře uváděny jako komponenty se silným antimikrobiálním účinkem obsažené v silicích dobromysli obecné (*Origanum vulgare*) a tymiánu obecném (*Thymus vulgaris*). Carvacrol, jako hlavní komponent v silici tymiánu (45 %) a oreganu (60 až 74 %), je známý pro svou antibakteriální aktivitu proti širokému spektru grampozitivních a gramnegativních bakterií (Raveau et al., 2020). Didry et al. (1994) popisuje synergické působení carvacrolu a thymolu, také Božik et al. (2017b) a Jílková et al., (2021) potvrzují nižší účinnost samostatných komponentů carvacrolu a thymolu než měla silice z dobromysli. Podobné výsledky jsme zaznamenali i při hodnocení působení silice skořice a jejího komponentu na *Pcc* na bramborových discích. Stoprocentní účinnost na *Pcc* vykazovala silice ze skořice a zachovala si ji po dobu jednoho měsíce, kdežto její hlavní komponent cinnamaldehyd ji již po jednom dnu částečně ztrácel.

### Závěr

Všechny vybrané komponenty silic prokázaly antibakteriální účinek na vybrané pektinolytické bakterie, které způsobují významné onemocnění rostlin a hlíz bramboru. Vzhledem k tomu, že není registrován žádný preventivní či kurativní přípravek, který by mohl toto onemocnění účinně regulovat na hlízách ve skladovacích prostorách, je vhodné hledat látky na bázi přírodních komponent, které by se mohly využít k ochraně nejen v konvenčním, ale i ekologickém zemědělství. Jako vhodné do dalších testů lze doporučit komponenty cinnamaldehyd, který je hlavní složkou silice ze skořice, a thymol ve formě syntetické a přírodní. Tyto komponenty prokázaly nejvýznamnější antibakteriální účinky.

### Literatura

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2007. Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Barceloux D. G., 2009. Cinnamon (cinnamomum species). *Disease-a-month*, 6, 55, 327–335.
- Božik M., Nový P., Klouček P., 2017a. Chemical composition and antimicrobial activity of cinnamon, thyme, oregano and clove essential oils against plant pathogenic bacteria. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(4): 1129–1134.
- Božik M., Nový P., Klouček P., 2017b. Susceptibility of postharvest pathogens to essential oils. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48 (3), 103–111.
- Bravo Cadena M., Preston G. M., Van Der Hoorn R. A. L., Townley H. E., Thompson I. P., 2018. Species-specific antimicrobial activity of essential oils and enhancement by encapsulation in mesoporous silica nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 122 (1), 582–590.
- Didry N., Dubreuil L., Pinkas M., 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenole on oral bacterial. *Pharm Acta Helv.*, 69, 25–28.
- EUCAST, 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, CMI, 9, 1–7.
- Hajian-Maleki H., Baghaee-Ravari S., Moghaddam M., 2021. Herbal essential oil exert a preservative effect against the potato soft rot disease. *Scientia Horticulturae*, 285, 110192.
- Hausvater E., Doležal P., 2014. Nejdůležitější škodliví činitelé bramboru. *Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský, Praktické informace*, č. 48. ISBN 978-80-86940-54-0.
- Hussain A. I., Anwar F., Nigam P. S., Sarker S. D., Moore J. E., Rao J. R., Mazumdar A., 2011. Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT – Food Science and Technology* 44, 1199–1206.



- 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 zea*. *Current microbiology*, 78 (9): 3453–3463.
- Jílková B., Víchová J., Pokorný R., 2021. Účinnost vybraných silic druhů z čeledi *Lamiaceae* k patogenu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha, 245–250. ISSN 0139-6013.
- Kůdela V., Nováček A., Fucikovsky L., 2002. *Rostlinolékařská bakteriologie*. Praha: Academia, ISBN 80-200-0899-3.
- 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 (3), 365; <https://doi.org/10.3390/foods9030365>
- Vokál B., 2013. *Brambory: šlechtění, pěstování, užití, ekonomika*. 1 vydání. Praha: Profi Press, ISBN 978-80-86726-54-0.

### **Poděkování**

Tento příspěvek vznikl za finanční podpory NAZV Mze č. QK21010083.

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Jana Víchová, Ph.D.

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

Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

+420 545 133050, [vichova@mendelu.cz](mailto:vichova@mendelu.cz)



## Účinnost vybraných esenciálních olejů na *Helminthosporium solani* způsobující stříbřitost slupky bramboru

The efficiency of selected essential oils on *Helminthosporium solani* causing potato silver scurf

Kmoch M.<sup>1</sup>, Doležalová M.<sup>1</sup>, Jílková B.<sup>2</sup>, Víchová J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

<sup>2</sup>Mendelova univerzita v Brně

### Abstrakt

Stříbřitost slupky bramboru, způsobená houbou *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., (1849), je v posledních letech důležitá skládková choroba bramboru (*Solanum tuberosum* L.) snižující především tržní hodnotu hlíz. Kontrola onemocnění pomocí fungicidů zůstává obtížná. Ekologickou alternativou je využití esenciálních olejů (EO). Cílem experimentů bylo zjištění vlivu vybraných EO (D-carvone (R)-(+)-limonene, carvacrol, cinamaldehyd, L-linalool, eucalyptol, L-menthol) na růst *H. solani* pomocí *in vitro* testů (disková difuzní metoda). Antifungální aktivita byla stanovena při koncentraci 0–1600 ppm. Všechny hodnocené EO měly vliv na inhibici růstu *H. solani*. Mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi EO byly zjištěny většinou statisticky významné rozdíly. Antifungální aktivita jednotlivých EO se však lišila. Nejsilnější vliv na inhibici růstu mycelia prokázal carvacrol a cinamaldehyd, dále potom L-linalool, L-menthol a D-carvone, nejnižší naopak limonene a eucalyptol.

**Klíčová slova:** Brambory, skládkové choroby, ekologická ochrana.

### Abstract

Potato silver scurf caused by the fungus *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., (1849) has been an important storage disease of potato (*Solanum tuberosum* L.) in recent years, especially impairing market value of potato tubers. Disease control using fungicides remains difficult. Applying essential oils (EOs) is an ecological control alternative. The goal of the experiments was the determination of the effect of selected EOs (D-carvone, (R)-(+)-limonene, carvacrol, cinamaldehyde, L-linalool, eucalyptol, L-menthol) on *H. solani* growth using *in vitro* assays. The antifungal activity was determined by disc diffusion method at a concentration of 0-1600 ppm. All evaluated EOs had an effect on *H. solani* inhibition. Between control and individual EO concentration statistical significant differences were mostly found. However, the antifungal activity of individual EOs differed. The highest effect on mycelial growth inhibition was recorded for carvacrol and cinamaldehyde, then for L-linalool, L-menthol and D-carovone, on contrary, the lowest effect was found in limonene and eucalyptol.

**Keywords:** Potatoes, storage diseases, ecological control.

### Úvod

Stříbřitost slupky bramboru vyvolaná houbou *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., (1849) je choroba peridermu hlíz (Gore, 2017; Jellis & Taylor, 1977; Rodriguez *et al.*, 1996). Vzhledem k rostoucí poptávce po praných hlízách snižuje především tržní hodnotu hlíz (Cullen *et al.*, 2001). Nezpůsobuje ztráty na výnosech v době sklizně, ale může snižovat hmotnost skladovaných hlíz v důsledku zvýšené ztráty vody (Secor & Gudmestad, 1999). Hranolky a chipsy vyrobené z napadených hlíz mohou mít hnědé okraje (Holley & Kawchuck, 1996). *H. solani* nenapadá jiné rostliny než brambor (Jellis & Taylor, 1974). Houba vytváří tmavé mycelium, stromata a konidiofory s konidii (Barnett & Hunter, 1998). Na infikovaných hlízách se tvoří hnědé až šedé léze mající za vlhka charakteristický stříbřitý vzhled. Často se shlukují na stolonovém konci hlízy (Jellis & Taylor, 1977; Rodriguez *et al.*, 1996; Cullen *et al.*,

2001). Stříbrné zbarvení peridermu je způsobeno ztrátou pigmentu, prostřednictvím vysoušení buněk a ukládáním suberinu (Frazier *et al.*, 1998). Pigmentace hlíz je zcela skryta u kultivarů brambor s červenou slupkou (Jellis & Taylor, 1977; Secor, 1994). Léze zůstávají po vytvoření na hlízách v půdě malé, ale během skladování se zvětšují (Merida *et al.*, 1994). K infekci hlíz může dojít během vegetačního období z infikovaných sadbových hlíz (Secor & Gudmestad, 1999) a půdního inokula (Firman & Allen, 1995) nebo při skladování (Jellis & Taylor, 1977; Rodriguez *et al.*, 1996), kdy za příznivých podmínek dochází ke sporulaci houby činící hlízy sazovité. Závažnost onemocnění se výrazně zvyšuje při dlouhodobém skladování hlíz (Secor & Gudmestad, 1999) v důsledku postupných cyklů sporulace a infekce (Rodriguez *et al.*, 1996). Ačkoliv je *H. solani* považován za patogena hlíz, může přezimovat v půdě jako saprofyt na rostlinných zbytcích (Jellis & Taylor, 1977; Merida *et al.*, 1994). Závažnost onemocnění lze snížit ošetřením sadbových hlíz fungicidy nebo dodržováním osevního sledu (Kutuzova *et al.*, 2017). Ošetření hlíz fungicidy proti *H. solani* během skladování je velmi málo účinné díky vzniku rezistence (Tennison, 2000). Intenzivní a nesprávné používání fungicidů vedlo nejen k vývoji rezistence, ale i k toxickým účinkům na necílové organismy a k zvýšení kontaminace půdy (Arcury & Quandt 2003; Huang *et al.*, 2012). Evropská unie prosazuje regulaci používání pesticidů (Sempere *et al.*, 2021). Vzhledem k výše popsaným skutečnostem je třeba hledat alternativní způsoby ochrany před patogeny (Zubrod *et al.*, 2019). Ekologickou alternativou syntetických fungicidů jsou silice (esenciální oleje, EO) extrahované z aromatických rostlin (Bahrami *et al.*, 2016; Sempere *et al.*, 2021). EO jsou kvůli přirozenému původu snadno biologicky rozložitelné (Pavela, 2016) a šetrné k životnímu prostředí. Proto může být použití EO ekologickým přístupem v ochraně rostlin před patogeny (Colmen *et al.*, 2001). EO jsou koncentrované, hydrofobní kapaliny obsahující těžké aromatické látky (Bakkali *et al.*, 2008; Bergman *et al.*, 2019). Slouží mj. k obraně proti býložravým škůdcům a k přilákání opylovačů (Tholl, 2006). O některých je známo, že mají antimikrobiální vlastnosti (Maiti *et al.*, 1985; Albuquerque *et al.*, 2006). Získávají se z různých částí rostlin, jako jsou květy, pupeny, semena, listy, větve, kůra, dřevo, plody a kořeny (Bergman *et al.*, 2019). Některé EO jsou běžně obchodované na trzích. Používají se pro různé účely včetně tradiční medicíny a aromaterapie (Maiti *et al.*, 1985; Albuquerque *et al.*, 2006).

Cílem pokusů bylo vyhodnocení vlivu vybraných esenciálních olejů (D-carvone, (R)-(+)-limonene, carvacrol, cinamaldehyd, L-linalool, eucalyptol a L-menthol) na růst *H. solani* pomocí *in vitro* testů.

## **Materiál a Metody**

Houby *H. solani* potřebné pro pokusy byly izolovány z hlíz bramboru s typickými příznaky onemocnění (stříbřitost slupky hlíz) pocházejících z České republiky. Patogen byl potom identifikován pomocí real-time PCR dle Cullen *et al.* (2001).

Antifungální aktivita testovaných silic byla stanovena za použití techniky inhibice radiálního růstu mycelia (disková difuzní metoda). Pro pokusy byly vybrány čisté přírodní EO: (R)-(+)-limonene (97 %), D-carvone ( $\geq 96\%$ ), carvacrol (99%), cinamaldehyd ( $\geq 95\%$ ), L-linalool ( $\geq 95\%$ ), eucalyptol ( $\geq 99\%$ ) a L-menthol ( $\geq 99\%$ ) [Sigma-Aldrich, Německo]. Testované EO byly ředěny 96% etanolem (100  $\mu$ l oleje v 1 ml ethanolu) s následným přidáním pár kapek Tweenu 20 [0,01% (v/v)] k dokonalému rozptýlení v živném médiu. Příslušný objem rozpuštěné silice byl přidán do sterilizovaného média (Sabouraud Maltose Agar, SMA) o teplotě 40–45°C pro získání konečné koncentrace 0–1600 ppm. Po dostatečném promíchání byly výsledné roztoky SMA okamžitě nality do Petriho misek (PM) o průměru 9 cm (20 ml/PM). Po ztuhnutí živné půdy byl pomocí korkovrtu vykrojen agarový disk z mladé kultury s inokulem houby (o průměru 6 mm) a umístěn do středu PM, které byly následně utěsněny parafilmem. Od každé varianty koncentrace byly připraveny tři opakování a PM byly inkubovány při  $25 \pm 1$  ° C po dobu 14 dnů. Potom byl změřen průměr kolonií jednotlivých

variant pokusu (v mm) a byly vypočítány parametry inhibice růstu mycelia. MGI (inhibice růstu mycelia) byla vypočítána pomocí následujícího vzorce dle Albuquerque *et al.* (2006):  $MGI (\%) = [(DC - DO)/DC] \times 100$

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

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

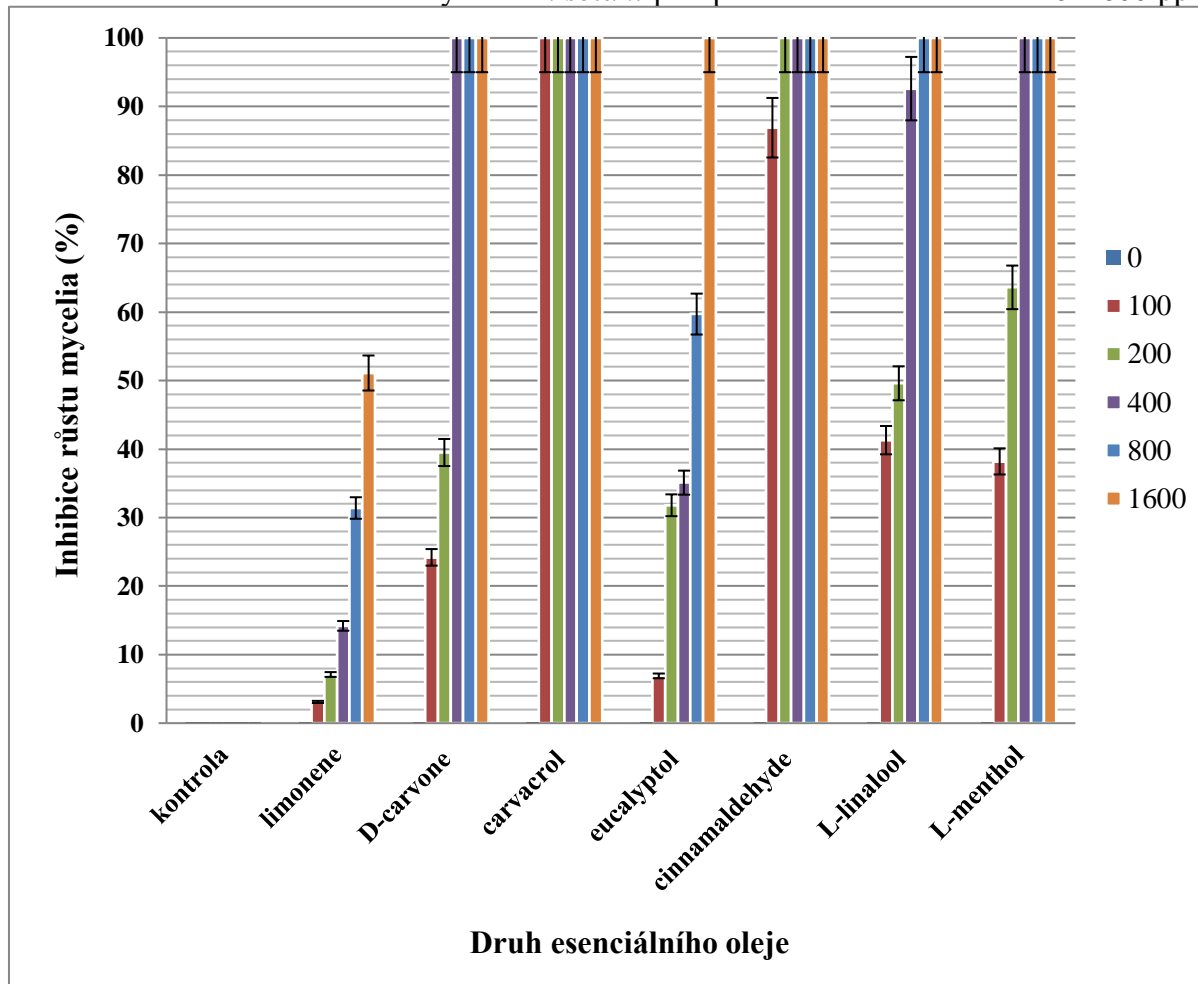
Statistické vyhodnocení pokusu bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (MS Excel) a Tukey-HSD testu ( $\alpha = 0,05$ ; program STATISTICA 7).

### Výsledky a diskuze

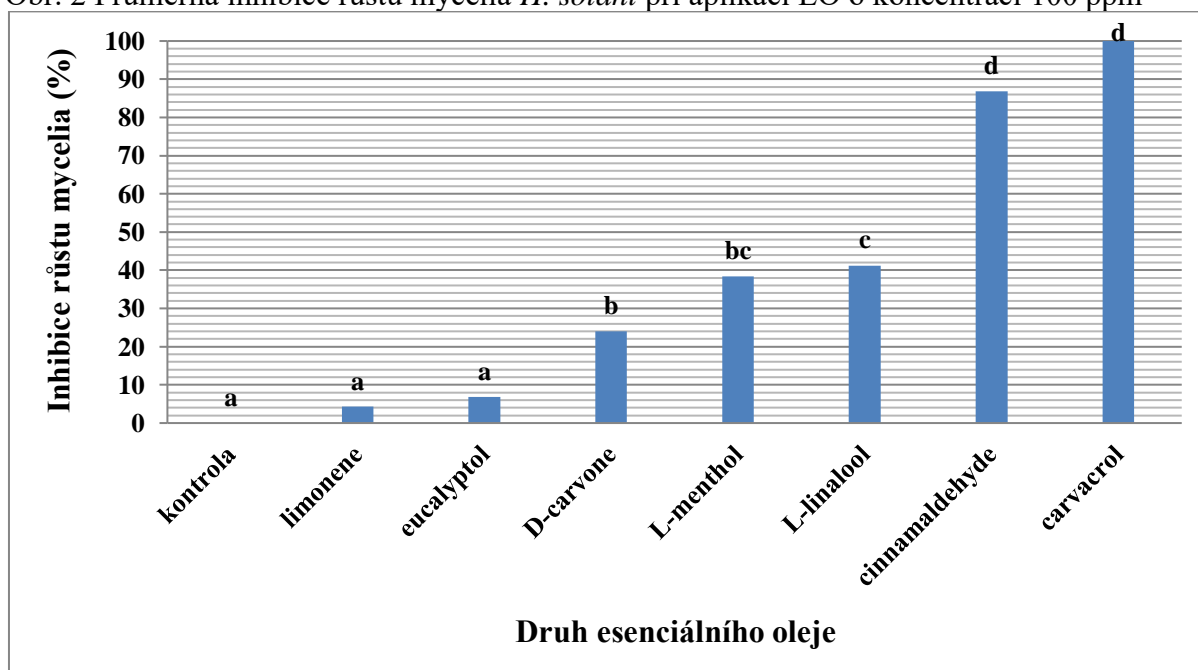
Pro zjištění vlivu vybraných rostlinných silic na růst houby *H. solani* byly provedeny laboratorní *in vitro* pokusy a byla vyhodnocena antifungální aktivita při různých koncentracích. Z výsledků pokusů vyplývá, že všechny hodnocené silice prokázaly antifungální aktivitu (obr. 1). Mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi silic byly zjištěny významné rozdíly. Antifungální aktivita jednotlivých EO se však významně lišila (obr. 2). Nejvyšší antifungální aktivita byla zaznamenána u carvacrolu (obr. 3) a cinamaldehydu, které způsobily již při koncentraci 100 ppm inhibici růstu mycelia *H. solani* 100 %, respektive 86,9 %. Carvacrol měl tedy 100% účinnost při všech koncentracích. Výsledky se shodují s pracemi jiných autorů. Dobrou antifungální aktivitu carvacrolu publikoval Sempere *et al.* (2021). Carvacrol je monoterpenoidní fenol s výraznou antifungální aktivitou, který byl izolovaný například z oregana (*Origanum vulgare*), majoránky (*Origanum majorana*) a tymiánu (*Thymus sp.*) [Vincenzi *et al.*, 2004]. Antimykotickou aktivitu cinamaldehydu popsal ve své studii Xie *et al.* (2017). Vynikající inhibiční účinek cinamaldehydu na houby *Rhizoctonia solani* a *Fusarium solani* publikoval Lee *et al.* (2005). Podle Shreaz *et al.* (2016) inhibuje cinnamaldehyd bakterie, kvasinky a vláknité houby prostřednictvím inhibice ATPáz, biosyntézy buněčné stěny a změny struktury a integrity membrány. Cinnamaldehyd je viskózní organická fenolická sloučenina poskytující charakteristickou chuť a vůni skořice. Nachází se v kůře skořicového stromu a dalších druhů rodu *Cinnamomum*. Skořicový olej EO může obsahovat až 90 % cinnamaldehydu (Guzman, 2014).

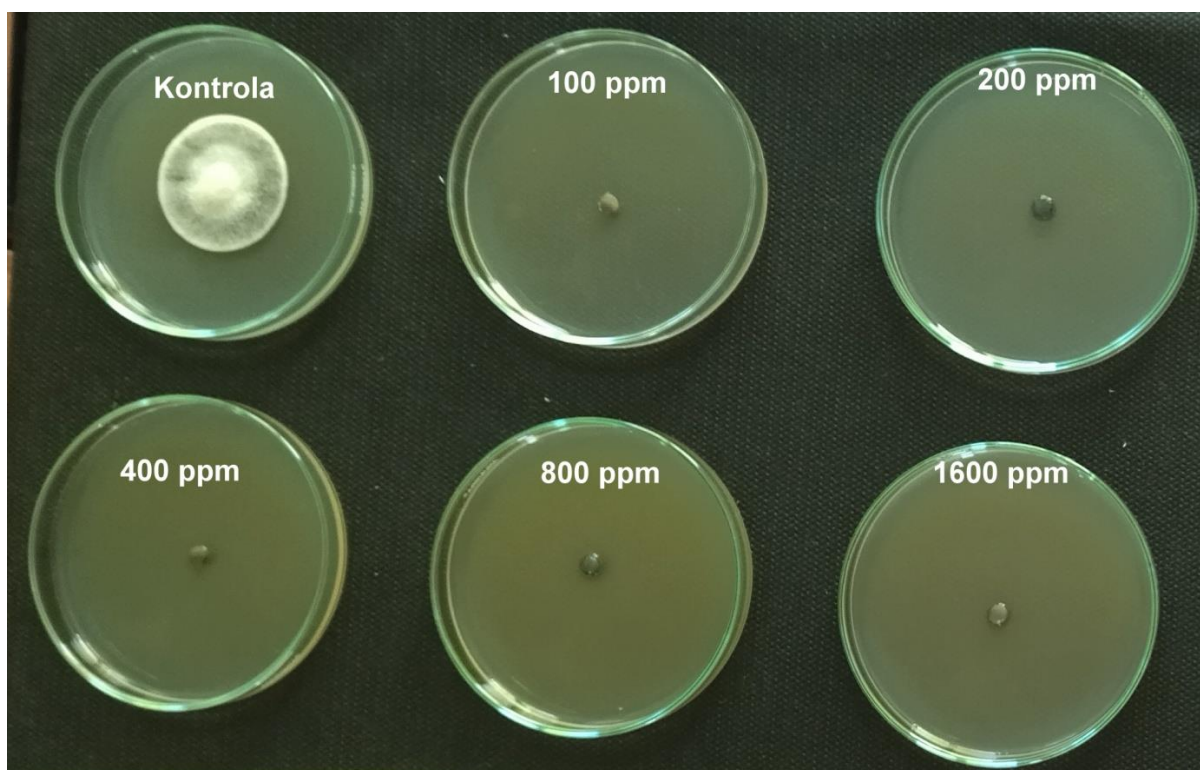
Účinnost L-linaloolu, L-mentholu a D-carvonu byla oproti carvacrolu a cinamaldehydu nižší. Antifungální účinek L-carvonu na *H. solani* publikoval Gorris *et al.* (1994). Hartmans *et al.* (1995) prokázal inhibiční účinek S-carvonu. Nejnižší antifungální aktivita byla zaznamenána u limonenu a eukalyptolu (obr. 4). Částečnou účinnost L-mentholu na *H. solani* zjistila Kutuzova *et al.* (2017). Rovněž Colmen *et al.* (2001) prokázal vliv L-mentholu obsaženého v *Mentha piperita* na inhibici patogenů bramboru. Limonene vykazoval při koncentraci 1600 ppm pouze 51,1% inhibici. Kromě limonenu, eukalyptolu a L-linaloolu měly všechny hodnocené silice 100% antifungální účinek již při 400 ppm.

Obr. 1 Průměrná inhibice růstu mycelia *H. solani* při aplikaci EO o koncentraci 0–1600 ppm

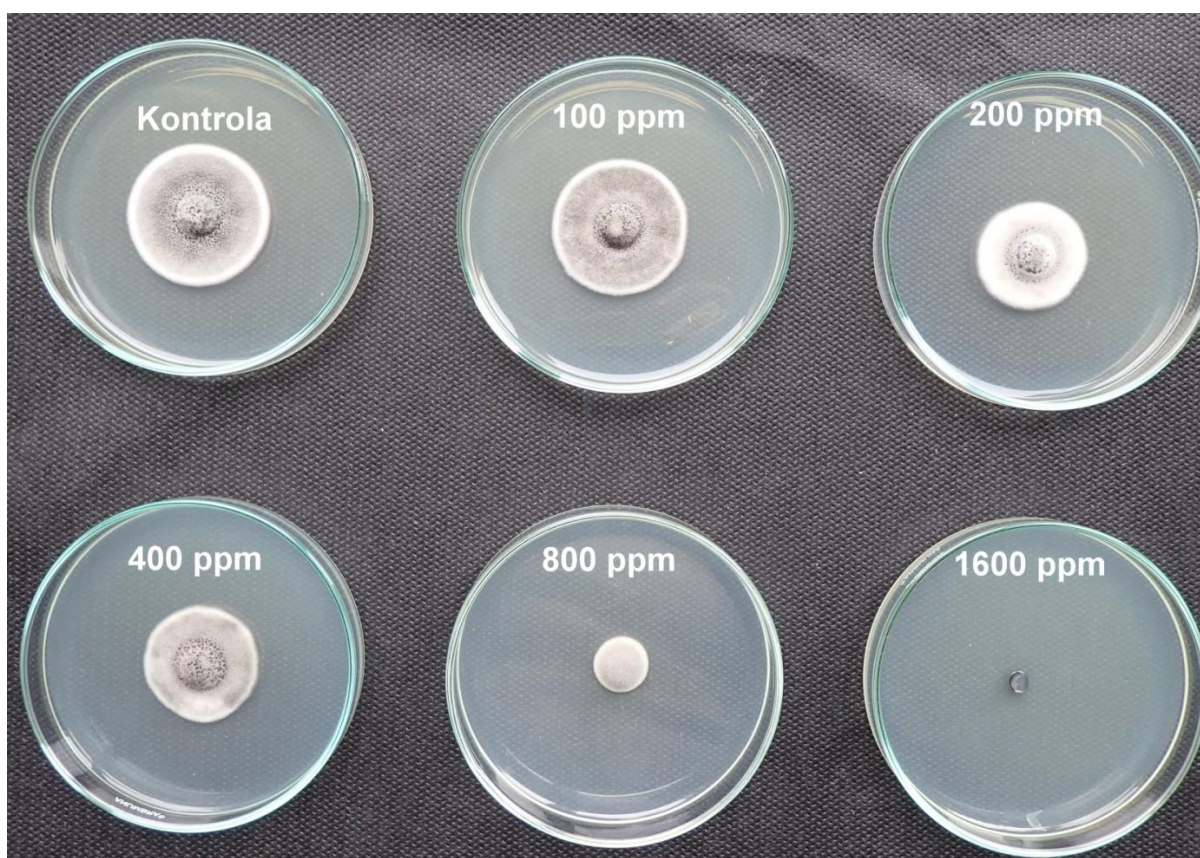


Obr. 2 Průměrná inhibice růstu mycelia *H. solani* při aplikaci EO o koncentraci 100 ppm





Obr. 3 Inhibice růstu mycelia *H. solani* při aplikaci carvacrolu o koncentraci 0–1600 ppm



Obr. 4 Inhibice růstu mycelia *H. solani* při aplikaci eucalyptolu o koncentraci 0–1600 ppm



## Závěr

V experimentech *in vitro* byl pomocí techniky inhibice radiálního růstu mycelia testován vliv vybraných esenciálních olejů (limonene, D-carvone, carvacrol, cinamaldehyd, L-linalool, eucalyptol a L-menthol) při různých koncentracích (0–1600 ppm) na houbu *H. solani* způsobující stříbřitost slupky bramboru. Všechny hodnocené EO měly vliv na inhibici růstu *H. solani*. Mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi EO byly zjištěny většinou statisticky významné rozdíly. Antifungální aktivita jednotlivých EO se však významně lišila. Nejsilnější vliv na inhibici růstu mycelia prokázal carvacrol a cinamaldehyd. Účinnost L-linaloolu, L-mentholu a D-carvonu byla oproti carvacrolu a cinamaldehydu nižší. Nejnižší antifungální aktivita byla zaznamenána u limonenu a eucalyptolu. Účinnost testovaných EO je nutné ještě ověřit v poloprovozních a provozních podmínkách, kde by mohly být použity pro ošetření sadbových hlíz před výsadbou nebo pro ošetření hlíz během skladování.

## Dedikace

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR – projekt NAZV č. QK21010083 „Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům“.

## Použitá literatura

- Albuquerque C.C., Camara T.R., Mariano R.L.P., Willadino L., Junior C.M., Ulisses C., 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. Braz. Arch. Biol. Technol., 49, 527–535.
- Arcury T.A., Quandt S.A., 2003. Pesticides at work and at home: exposure of migrant farmworkers. Lancet 362 (9400), 2021.
- Bahrami R., Kocheili F., Ziaee M., 2016. Fumigant toxicity and persistence of essential oils from asafetida, geranium, and walnut on adults of *Rhyzopertha dominica* (Col.: Bostrichidae). Toxin Rev., 35, 63–68.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils-A review. Food Chem. Toxicol., 46, 446–475.
- Barnett H.L., Hunter B.B., 1998. *Helminthosporium*. In: Barnett H.L., Hunter B.B., eds. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th edn. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press, 124–5.
- Bergman M.E., Davis B., Phillips M.A., 2019. Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. Molecules, 24, 3961.
- Colmen W.K., Lonergan G., Silk, P., 2001. “Potato sprout suppression by the volatile oil components menthone and neomenthol of *Minthostachys*, *Satureja*, *Bystropogon* and *Mentha* species,” Am. J. Potato Res., 78, 345–354.
- Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K., Duncan J.M., 2001. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. Eur. J. Plant Pathol., 107, 387–398.
- Firman D.M., Allen E.J., 1995. Transmission of *Helminthosporium solani* from potato seed tubers and effects of soil conditions, seed inoculum and seed physiology on silver scurf disease. J. Agric. Sci., 124, 219–234.
- Frazier M.J., Shetty K.K., Kleinkopf G.G., Nolte P., 1998. Survival of *Helminthosporium solani* in soil and in vitro colonization of senescent plant tissue. Am. Potato J., 71, 591–8.
- Gore M.E., 2017. Fungal seedborne pathogens infecting potato seed tubers from Turkey, J Plant Dis Prot., 1–13.
- Gorris L.G.M., Oosterhaven K., Hartmans K.J., de Witte Y., Smid E.J., DeWitte Y., 1994. Control of fungal storage diseases of potato by use of plant essential oil components.

- Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Farnham, UK: British Crop Protection Council, 307–12.
- Guzman J.D., 2014. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules*, 19, 19292–19349.
- Hartmans K.J., Diepenhorst P., Bakker W., Gorris L.G.M., 1995. “The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases,” *Ind. Crop. Prod.*, 4, 3–13.
- Holley J.D., Kawchuk L.M., 1996. Distribution of thiabendazole and thiophanate-methyl resistant strains of *Helminthosporium solani* and *Fusarium sambucinum* in Alberta potato storages. *Can. Plant Dis. Surv.*, 76, 21–27.
- Huang X., Zhang N., Yong X., Yang X., Shen Q., 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiol. Res.*, 167, 3, 135–143.
- Jellis G.J., Taylor G.S., 1974. The relative importance of silver scurf and black dot: two disfiguring diseases of potato tubers. *ADAS Q. Rev.*, 14, 97–112.
- Jellis G.J., Taylor G.S., 1977. The development of silver scurf (*Helminthosporium solani*) disease of potato. *Ann. Appl. Biol.*, 86, 19–28.
- Kutuzova I.A., Kokaeva L., Pobendinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Skolotneva E., Chudinova E., Elansky S., 2017. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to selected fungicides applied for tuber treatment. *J. Plant Pathol.*, 99 (3), 635–642.
- Lee H.Ch., Cheng S.S., Chang S.T., 2005. Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 2047–2053.
- Maiti D., Kole R.C., Sen, C., 1985. “Antimicrobial efficacy of some essential oils,” *J. Plant Dis. Prot.*, 92, 64–68.
- Merida C.L. and Loria R., 1994. “Comparison of Thiabendazole-sensitive and-resistant *Helminthosporium solani* isolates from New York,” *Plant Dis.*, 78, 187–192.
- Pavela R., Benelli G., 2016. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci.*, 21, 1000–1007.
- Rodriguez D.A., Secor G.A., Gudmestad N.C., Francl, L.J., 1996. Sporulation of *Helminthosporium solani* and infection of potato tubers in seed and commercial storages. *Plant Dis.* 80, 1063–1070.
- Secor G.A., 1994. Management strategies for fungal diseases of tubers. In: Zhender G.W., Powelson M.L., Jansson R.K., Raman K.V., eds. *Advances in Potato Pest Biology and Management*. St. Paul, USA: American Phytopathological Society Press, 155–7.
- Secor G.A., Gudmestad N.C., 1999. Managing fungal diseases of potato. *Can. J. Plant Pathol.*, 21, 213–221.
- Sempere F.F., Asamar J., Castell V. Roselló J., Santamarina M.P, 2021. Evaluating the Antifungal Potential of Botanical Compounds to Control *Botryotinia fuckeliana* and *Rhizoctonia solani*. *Molecules*, 26, 9, 2472.
- Shreaz S., Wani W., Behbehani J., Raja V., Irshad M., Karched M., Ali I., Siddiqui W., Ting H. L., 2016. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116–131.
- Tennison R., 2000. Co-ordinate your disease control strategies. *Top Crop Manager (Potatoes in Canada, a Special Issue)*, 26, 14–5.
- Tholl D., 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 297–304.
- Vincenzi De M., Stamatii A., Silano M., 2004. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. *Fitoterapia*, 75, 801–804.

- Xie Y.J., Huang Q., Wang Z., Cao H., Zhang D., 2017. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. *Ind Crops Prod*, 97, 388–394.
- Zubrod J.P., Bundschuh M., Arts G., Brühl C.A., Imfeld G., Knäbel A., Payraudeau S., Rasmussen J.J., Rohr J., Scharmüller A. *et al.*, 2019. Fungicides: an overlooked pesticide class. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 3347–3365.

**Kontaktní adresa:**

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



## Citlivosti nosatčků rodu *Apion* k účinným látkám insekticidů v letech 2018 – 2022

Results of susceptibility of laboratory testing of *Apion* weevils to the a.i. of  
insecticides in 2018 – 2022

Kolařík P., Kolaříková K.

Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Troubsko

### Abstrakt

Byla testována citlivost populací nosatčků rodu *Apion* z vybraných lokalit České republiky k lambda-cyhalothrinu (8 populací v roce 2018, 4 populace v roce 2019, 5 populací v roce 2020, 7 populací v roce 2022), k tau-fluvalinatu (5 populací v roce 2020, 2 populace v roce 2021), přípravku Biscaya 240 OD (5 populací v roce 2020) a indoxacaru (5 populací v roce 2022) metodou IRAC č. 011 verze 3 a č. 021 a 027. Ve všech letech převládaly vysoce citlivé populace. Výrazný posun v citlivosti byl zjištěn v roce 2022 u ú.l. lambda-cyhalothrin a tau-fluvalinate. Hodnoty LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub> a LD<sub>95</sub> odhadované pro testované populace se pohybovaly v porovnání s předchozími lety sledování na mnohem vyšší úrovni.

**Klíčová slova:** rezistence; hmyzí škůdci; insekticidy; jetel luční; nosatčci rodu *Apion*

### Abstract

The sensitivity of *Apion* weevil populations from selected locations in the Czech Republic to lambda-cyhalothrin (8 populations in 2018, 4 populations in 2019, 5 populations in 2020, 7 populations in 2022) and tau-fluvalinate (5 populations in 2020, 2 populations in 2022), of Biscaya 240 OD (5 populations in 2020) and indoxacarb (5 populations in 2022) by IRAC Method No. 011 Version 3 and No. 021 and 027. Highly susceptible populations predominated in all years. A significant shift in sensitivity was detected in 2022 at a.i. lambda-cyhalothrin and tau-fluvalinate. The LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub> and LD<sub>95</sub> values estimated for the tested populations were at a much higher level compared to previous years of monitoring.

**Keyword:** resistance; insect pests; insecticides; red clover; *Apion* weevils

### Úvod

Nosatčci rodu *Apion* a *Protapion* jsou uváděni jako nejvýznamnější škůdci u jetele lučního (Kolařík et al., 2012; Langer et al., 2008). V porostech mohou způsobit výrazné ztráty na výnosu jetelového semene. Jejich larvy vyžírají bazální části jetelových kvítků. Pro ochranu se zde dříve používaly především pouze pyrethroidní přípravky (registrace Karate se Zeon technologií 5 SC, ú.l. lambda-cyhalothrin). U tohoto škůdce se tak významně zvyšuje riziko vyselektování méně citlivé (rezistentní) populace k dané skupině účinných látek. Na území České republiky se vyskytují rezistentní populace blýskáčka řepkového k pyrethroidům (Seidenglanz et al., 2021), a mandelinky bramborové vůči pyrethroidům a organofosfátům (Kocourek et al., 2020). U dalších ú.l. pak dochází k posunu v jejich citlivosti proti hmyzím škůdcům.

Význam plošného monitoringu (u nás i v okolních zemích) je v současné době velmi důležitý nejen u druhů, u kterých již problémy s rezistencí zaznamenány byly, ale i u druhů a insekticidů, kde dosud (jak v laboratorních, tak v polních podmínkách) žádné problémy (změny, posuny) zaznamenány nebyly. A to z toho důvodu, že účinný dopad antirezistentních postupů (a v důsledku toho předejití praktickým problémům s kontrolou škůdců v polních podmínkách a zachování použitelnosti insekticidů na delší dobu) je možný (vnímáme-li to i jako možnost zachránit nějaký rezistencí ohrožený insekticid pro praxi) jen, když jsou posuny v citlivosti

odhaleny včas. Tedy v době, kdy je frekvence rezistentních jedinců (a tedy i frekvence rezistenci udělujících alel) v populacích ještě nízká.

Cílem naší práce bylo shromáždit a laboratorně otestovat populace hmyzích škůdců víceletých píceň (nosatčici rodu *Apion*) z různých pěstitelských oblastí České republiky pro zjištění iniciálního vývoje stavu citlivosti k vybraným účinným látkám.

### **Materiál a metody**

Laboratorní metodou použitou pro hodnocení citlivosti k insekticidům byl lahvičkový test (Adult vial test) doporučovaný organizací Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). Pro pyrethroidy (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate) je určena Metoda č. 011 (Met 011, verze 3, pro přípravek Biscaya 240 OD (ú.l. thiacloprid) pak metoda č. 021. Metody jsou detailně popsány na stránkách IRAC: <http://www.irac-online.org>. Roztoky insekticidů se aplikují do skleněných lahviček se známým vnitřním povrchem (v našem případě: 37,97 cm<sup>2</sup>) ve velmi nízkých koncentracích pomocí dávkovacích pipet. Jako rozpouštědlo slouží aceton. Cílem aplikace je dosáhnout rovnoměrného pokrytí vnitřních stěn testovacích lahviček příslušnou dávkou účinné látky: určitá dávka v µg ú.l./cm<sup>2</sup> povrchu lahvičky odpovídá určité hektarové dávce. Mezi testovanými dávkami je zařazena i kontrola (= 0 µg ú.l./cm<sup>2</sup>) a dávka odpovídající dávce registrované. U lambda-cyhalothrinu bylo testováno 6 různých dávek, u tau-fluvalinatu pak 5 různých dávek. Ověřovaná populace, resp. insekticid, byla každá dávka testována ve třech opakováních (= 3 lahvičky od každé dávky).

Příprava lahviček před vlastním testem: do testovací lahvičky byl z příslušného zásobního roztoku přenesen 1 ml tekutiny. Lahvičky s roztokem byly bezprostředně po aplikaci umístěny na otáčející se válečky rolleru. Po odpaření acetonu zůstala na vnitřních stěnách rovnoměrně rozprostřená vrstva konkrétní účinné látky.

Do připravených lahviček se vkládali dospělci (10 imag/lahvičku) odebraní z určité lokality. Reakce brouků na jednotlivé dávky účinné látky byly hodnoceny po 24 hodinách. Na základě charakteru reakcí jsou brouci zařazeni do kategorie 1 (živí a aktivní jedinci) či 2 (jedinci postižení a mrtví jedinci)

Pro každou testovací lahvičku (dávka a opakování) je vyjádřen počet brouků v kategorii 1 a počet brouků v kategorii 2. Na základě podílu brouků v kategorii 2 je stanoveno procento mortality pro jednotlivé dávky a opakování. Tyto hodnoty jsou využity pro vyjádření procent účinnosti a hodnot letálních dávek (LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub> a LD<sub>95</sub>). Pro jednotlivé sběry (= populace) byly stanoveny hodnoty účinnosti pro jednotlivé testované dávky (dle Abotta; 1925). K vyjádření hodnot letálních dávek (LD<sub>50-95</sub> v g ú.l./ha) je využit software Polo Plus (LEORA software; metoda probitová regrese). V případě pyrethroidů je na základě zaznamenaných výsledků populacím přiřazen určitý stupeň rezistence (resp. citlivosti) dle kategorizace užívané v IRAC.

### **Výsledky a diskuze**

Odebrané vzorky hmyzu (nosatčici rodu *Apion*) byly získány smýkáním porostu jetele lučního. Z účinností dosažených 100% a 20% dávkami vyplývá, že se v ČR v rámci testování k pyrethroidu lambda-cyhalothrin v roce 2018 nevyskytovaly necitlivé populace. V roce 2019 a 2020 pak byly zaznamenány pouze populace vysoce citlivé. Účinnost dosahovaná registrovanou dávkou byla ve většině případů plně dostatečná (100 %), hodnoty LD<sub>95</sub> jsou pro většinu populací v obou letech sledování hluboko pod úroveň registrované dávky (7,5 g ú.l./ha). V roce 2022 došlo v posunu v citlivosti u této ú.l., kdy byly na dvou testovaných lokalitách zjištěny populace středně rezistentní a rezistentní. Vypočtené hodnoty LD jsou tak v porovnání s minulými lety sledování výrazně vyšší i v rámci ostatních sledovaných lokalit. Může tak docházet k trendu postupného získání necitlivosti k této ú.l. tak jako v případě dalších hmyzích škůdců (Seidenglanz et al., 2018; Kocourek et al., 2018; Zimmer & Nauen 2011). Celkem bylo k této látce v roce 2018 otestováno 8 českých populací, v roce 2019 pak 4 české populace a

v roce 2020 5 českých populací a v roce 2022 7 populací. Podílové zastoupení populací a LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub> a LD<sub>95</sub> jsou znázorněny v tabulce 1 (rok 2018), v tabulce 2 (rok 2019), v tabulce 3 (pro rok 2020) a v tabulce 4 (pro rok 2022).

V rámci testování k pyrethroidu tau-fluvalinate (tabulka 5) vyplývá, že se na území ČR citlivost k dané ú.l. mění. V roce 2020 byly zaznamenány pouze populace vysoce citlivé. V roce 2022 pak byla v rámci testů situace odlišná. Celkem testovány 2 populace, z nichž obě dvě byly dle zařazení v rámci IRAC resistantní k dané ú.l. (tabulka 7). Došlo tak k významnému posunu v citlivosti, je ale nutno konstatovat že byly testovány v rámci České republiky pouze 2 populace. V roce 2021 nebylo nasbíráno dostatečné množství jedinců nosatčků pro sledování citlivosti, a proto výsledky z daného roku nejsou uvedeny jak pro ú.l. lambda-cyhalothrin tak i pro tau-fluvalinate. U blýskáčka je situace v rámci monitoringu k této ú.l. podobná (Seidenglanz et al. 2021). Pro thiacloprid (Biscaya 240 OD) se na území ČR vyskytovala 1 populace citlivá a 4 populace vysoce citlivé k dané ú.l. Hodnoty LD dávek se pro danou účinnou látku drží na velmi nízké úrovni. Naproti tomu u blýskáčků je patrné, že i v případě této látky minimální hodnoty LD (LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub>) v průběhu posledních několika let rostou (Seidenglanz et al., 2014). Do testů v roce 2022 byla místo dané ú.l. resp. přípravku zařazena ú.l. acetamiprid. Dle výsledků testů jsou daní jedinci na tuto látku příliš citliví a v dalších letech budou muset být zvoleny vhodnější poměry koncentrací pro vypočtení hodnot LD. V rámci testování byla zařazena i ú.l. indoxacarb, která ale není pro daného škůdce registrována pro jeho minimalizaci (Anonymus, 2022). V případě použití proti blýskáčkům je registrováno 25,5 g/ha. Z našich výsledků vyplývá že jsou k dané ú.l. spíše necitliví a hodnoty LD<sub>90</sub> a LD<sub>95</sub> jsou vyšší. I v případě použití této ú.l. proti blýskáčkům se jeho účinnost v poslední době taktéž snižuje (Seidenglanz et al. 2022).

Tabulka 1

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na esterický pyrethroid lambda-cyhalothrin v roce 2018

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 7,5 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 1,5 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)
1	1NOS	Němčičky	49.0494069N 16.4983489E	100,00	93,33	2	0,33	0.23-0.47	1,27	0.82-2.64	1,87	1.12-4.48
2	2NOS	Troubsko	49.1715461N 16.5119603E	100,00	90,00	2	0,24	0.15-0.36	1,26	0.77-2.87	2,03	1.13-5.53
3	3NOS	Litostrov	49.2298522N 16.3320908E	100,00	96,67	2	0,21	0.15-0.31	0,88	0.56-1.90	1,32	0.77-3.35
4	4NOS	Březi	48.8108578N 16.5829650E	100,00	100,00	1	0,19	0.13-0.27	0,65	0.42-1.36	0,92	0.56-2.26
5	5NOS	Vikýřovice	49.9771111N 17.0178056E	100,00	100,00	1	0,23	0.16-0.31	0,65	0.44-1.28	0,87	0.56-1.99
6	6NOS	Zábřeh na Moravě	49.8822081N 16.8972533E	100,00	96,67	2	0,23	0.16-0.33	0,86	0.55-1.78	1,25	0.75-3.02
7	7NOS	Náměšť na Hané	49.6086564N 17.0875061E	100,00	100,00	1	0,20	0.14-0.29	0,77	0.49-1.71	1,14	0.67-2.98
8	8NOS	Obmouc Topolany	49.5923169N 17.1865311E	100,00	100,00	1	0,23	0.16-0.33	0,86	0.55-1.85	1,25	0.74-3.14
		<b>průměr</b>		<b>100,00</b>	<b>97,08</b>		<b>0,23</b>		<b>0,90</b>		<b>1,33</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>97,08</b>		<b>0,22</b>		<b>0,85</b>		<b>1,26</b>	

Tabulka 2

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na esterický pyrethroid lambda-cyhalothrin v roce 2019

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 7,5 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 1,5 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)
1	1NOS	Němčičky	49.0469025N 16.5149814E	100,00	100,00	1	0,17	0.139- 0.183	0,28	0.236- 0.365	0,33	0.270- 0.452
2	2NOS	Javůrek	49.2513472N 16.3703139E	100,00	100,00	1	0,19	0.160- 0.226	0,41	0.316- 0.626	0,50	0.376- 0.852
3	3NOS	Troubsko	49.1758586N 16.5060336E	100,00	100,00	1	0,16	0.139- 0.186	0,30	0.246- 0.393	0,35	0.284- 0.495
4	4NOS	Tvořihráz	48.9185539N 16.1267206E	100,00	100,00	1	0,15	0.114- 0.207	0,75	0.461- 1.995	1,17	0.646- 4.013
		<b>průměr</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>0,17</b>		<b>0,43</b>		<b>0,59</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>0,16</b>		<b>0,35</b>		<b>0,43</b>	

Tabulka 3

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na esterický pyrethroid lambda-cyhalothrin v roce 2020

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 7,5 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 1,5 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)
1	1NOS	Jívoví	49.4021392N, 16.0966947E	100,00	100,00	1	0,25	0,186- 0,346	0,65	0,448- 1,263	0,84	0,555- 1,893
2	2NOS	Březejc	49.3461975N, 16.0937336E	100,00	100,00	1	0,19	0,115- 0,303	0,68	0,395- 1,979	0,99	0,531- 3,560
3	3NOS	Troubsko	49.1596914N, 16.5004114E	100,00	100,00	1	0,25	0,156- 0,391	0,71	0,434- 2,121	0,96	0,549- 3,620
4	4NOS	Tvořihráz	48.9194561N, 16.1288236E	100,00	100,00	1	0,22	0,161- 0,287	0,39	0,295- 1,388	0,46	0,329- 2,317
5	5NOS	Němčičky	49.0469850N, 16.5149911E	100,00	100,00	1	0,17	0,106- 0,252	0,39	0,254- 0,940 0	0,49	0,308- 1,439
		<b>průměr</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>0,21</b>		<b>0,56</b>		<b>0,75</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>0,22</b>		<b>0,65</b>		<b>0,84</b>	

Tabulka 4

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na esterický pyrethroid lambda-cyhalothrin v roce 2022

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 7,5 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 1,5 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha) CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha) CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha) CI (0,95)
1	1NOS	Troubsko	49.1721536N, 16.4989603E	100,00	93,30	2	0,17	0.071- 0.329	1,34	0.623- 7.237	2,41	0.980- 20.492
2	2NOS	Němčičky	49.0468944N, 16.5152233E	100,00	100,00	1	0,27	0.159- 0.448	1,05	0.601- 3.272	1,53	0.811- 6.201
3	3NOS	Bukov	49.4581731N, 16.2383403E	100,00	60,00	2	0,43	0.130- 1.138	5,55	1.863- 84.745	11,46	3.222- 353.611
4	4NOS	Ostrov nad oslavou	49.4800236N, 16.0018800E	93,75	66,67	3	0,30	0.090- 0.719	8,52	2.865- 89.683	21,93	5.911- 455.065
5	5NOS	Záblatí	49.3297419N, 16.1637933E	86,67	73,33	4	0,04	0.000- 0.192	8,36	1.1766- 3786.36	39,01	5.299- 456204.8
6	6NOS	Olší	49.4196078N, 16.2951381E	100,00	73,33	2	0,17	0.067- 0.320	1,35	0.639- 6.693	2,44	1.015- 18.872
7	7NOS	Radňovice	49.5628011N, 16.0092681E	100,00	87,50	2	0,20	0.121- 0.332	0,70	0.413- 2.164	1,00	0.544- 3,959
		<b>průměr</b>		<b>100,00</b>	<b>84,43</b>		<b>0,29</b>		<b>2,65</b>		<b>5,13</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>93,30</b>		<b>0,27</b>		<b>1,34</b>		<b>2,41</b>	

Tabulka 5

Výsledky testování citlivosti populací nosatčků rodu Apion na esterický neonikotinoid thiacloprid (Biscaya 240 OD) v roce 2020

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 72 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 14,4 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha) CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha) CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha) CI (0,95)
1	1NOS	Jívoví	49.4021392N, 16.0966947E	100,00	100,00	1	7,66	6,681- 8,992	11,18	9,393- 16,984	12,45	10,175- 20,680
2	2NOS	Troubsko	49.1596914N, 16.5004114E	100,00	100,00	1	1,66	1,202- 2,300	3,13	2,273- 6,713	3,75	2,612- 9,478
3	3NOS	Němčičky	49.0469850N, 16.5149911E	100,00	100,00	1	2,91	2,082- 4,884	6,60	4,173- 22,943	8,32	4,936- 36,619
4	4NOS	Tvořihráz	48.9194561N, 16.1288236E	100,00	100,00	1	3,43	2,403- 5,802	8,15	5,048- 26,291	10,42	6,059- 41,490
5	5NOS	Březejc	49.3461975N, 16.0937336E	100,00	93,33	2	1,93	1,057- 3,197	8,18	4,553- 34,060	12,32	6,191- 74,085
		<b>průměr</b>		<b>100,00</b>	<b>98,67</b>		<b>3,52</b>		<b>7,45</b>		<b>9,45</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>2,91</b>		<b>8,15</b>		<b>10,42</b>	

Tabulka 6

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na pyrethroid tau-fluvalinate v roce 2020

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 48 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 9.6 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)
1	1NOS	Troubsko	49.1596914N, 16.5004114E	100,00	100,00	1	1,35	0,990- 1,940	2,96	2,03,2- 9,468	3,70	2,377- 15,555
2	2NOS	Jívoví	49.4021392N, 16.0966947E	100,00	100,00	1	1,68	1,297- 2,763	3,19	2,201- 16,635	3,82	2,478- 28,552
3	3NOS	Němčičky	49.0469850N, 16.5149911E	100,00	100,00	1	1,23	0,901- 1,638	2,35	1,728- 6,000	2,82	1,971- 9,139
4	4NOS	Tvoříhráz	48.9194561N, 16.1288236E	100,00	100,00	1	1,68	1,297- 2,754	3,19	2,202- 16,401	3,82	2,479- 28,062
5	5NOS	Březejc	49.3461975N, 16.0937336E	100,00	100,00	1	1,52	1,147- 2,278	3,59	2,069- 12,056	3,59	2,352- 20,105
		<b>průměr</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>1,49</b>		<b>3,06</b>		<b>3,55</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		<b>1,52</b>		<b>3,19</b>		<b>3,70</b>	

Tabulka 7

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na pyrethroid tau-fluvalinate v roce 2022

číslo sběru	kód populace	obec (okres)	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 48 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost dávky 9.6 g/ha (%)	st. rezistence dle IRAC	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)
1	1NOS	Troubsko	49.1721536N, 16.4989603E	60,00	100,00	4	6,55	0.882- 18.178	281,51	72.323- 25779.312	817,70	151.757- 335224.2
2	2NOS	Olší	49.4196078N, 16.2951381E	94,44	82,35	3	1,56	0.164- 3.581	16,47	7.532- 100.487	32,16	13.164- 438.154
		<b>průměr</b>		<b>77,22</b>	<b>91,18</b>		<b>4,05</b>		<b>148,99</b>		<b>424,93</b>	
		<b>median</b>		<b>77,22</b>	<b>91,18</b>		<b>4,05</b>		<b>148,99</b>		<b>424,93</b>	

Tabulka 8

Výsledky testování citlivosti českých populací nosatčků rodu Apion na indoxacarb v roce 2022

číslo sběru	kód populace	obec	GPS souřadnice	kontakt. lab. účinnost max. registr. dávky 7,5 g/ha (%)	kontakt. lab. účinnost t dávky 1,5 g/ha (%)	LD <sub>50</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>90</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)	LD <sub>95</sub> (g ú.l./ha)	CI (0,95)
1	1NOS	Troubsko	49.1721536N, 16.4989603E	100,00	93,30	0,35	0.062- 0.899	7,96	2.902- 60.410	19,36	5.970- 287.409
2	2NOS	Záblatí	49.3297419N, 16.1637933E	100,00	100,00	3,13	1.392- 6.628	40,99	15.490- 403.427	85,02	26.619- 1489.882
3	3NOS	Ostrov nad oslavou	49.4800236N, 16.0018800E	100,00	60,00	3,47	1.173- 8.340	33,17	12.411- 495.290	62,91	19.901- 1918.822
4	4NOS	Oliší	49.4196078N, 16.2951381E	93,75	66,67	1,02	0.280- 2.682	22,71	7.094- 342.295	54,77	13.838- 1735.257
5	5NOS	Němčičky	49.0468944N, 16.5152233E	86,67	73,33	0,93	0.265- 2.269	16,77	5.925- 158.138	38,06	11.224- 670.692
		<b>průměr</b>		<b>96,08</b>	<b>78,66</b>	<b>1,78</b>		<b>24,32</b>		<b>52,02</b>	
		<b>median</b>		<b>100,00</b>	<b>73,33</b>	<b>1,02</b>		<b>22,71</b>		<b>54,77</b>	

### Závěr

V současnosti lze v rámci chemické ochrany použít proti nosatčímku rodu *Apion* tyto registrované přípravky: Karate se Zeon technologií 5 CS (úč. 1. lambda-cyhalothrin 50 g/l) v dávce 0,2 l/ha a Mospilan 20 SP resp. Mospilan MIZU 120 SL (úč. 1. acetamiprid – 20 %) v dávce 150 g/ha a 0,35 l/ha (Anonymus, 2022). Při aplikaci neonikotinoidních přípravků s kontaktním a systémovým účinkem dochází k průkaznému snížení početnosti nosatčímku, jak z hlediska vyskytujících se dospělců, tak následně i s menším výskytem larev v jetelových hlávkách. Na základě námi získaných výsledků došlo v roce 2022 v posunu v citlivosti v případě ú.l. lambda-cyhalothrin, kdy byly zjištěny 2 resistantní populace. Došlo ke zhoršení také v případě ú.l. tau-fluvalinate se stejným výsledkem (resistentní populace), je ale nutno podotknout že byly otestovány v rámci České republiky pouze tyto 2 populace.

### Literatura

K dispozici u autora příspěvku

### Poděkování

Výsledek byl získán za podpory MZe ČR, institucionální podpora MZE-RO1719 a při řešení výzkumného projektu QK21010332 „Mechanismus rezistence řepkových škůdců proti insekticidům, jejich výchozí citlivost k novým insekticidům a dopad insekticidních aplikací na vývoj larev škůdců a jejich přirozených nepřátel“, který financuje MZe ČR prostřednictvím Národní agentury pro zemědělský výzkum.

### Kontaktní adresa:

Ing. Pavel Kolařík  
Zemědělský výzkum, spol. s r.o.,  
Zahradní 1  
664 41 Troubsko  
kolarik@vupt.cz



**ZVT** | Zemědělský výzkum,  
spol. s r.o. Troubsko



## Fytotoxicita vybraných herbicidních účinných látek ke katránu etiopskému

The phytotoxicity of postemergence herbicides on crambe

Kubíková Z.<sup>1</sup>, Smejkalová H.<sup>1</sup>, Hutýrová H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r. o.;

### Abstrakt

Ve skleníkových pokusech byla u katránu etiopského (*Crambe abyssinica* Hochst.) zkoušena fytotoxicita účinných látek herbicidů. Byly zkoušeny účinné látky klopýralid v kombinaci s picloramem, metamitron v kombinaci s chinmerakem, tembotrion a metazachlor. U každé varianty byly zkoušeny dvě koncentrace účinných látek. Byla hodnocena fytotoxicita, výška rostlin a produkce biomasy. Nejvýznamnějšími příznaky fytotoxicity byly chlorózy, nekrózy a omezení růstu. U katránu etiopského byla nejvyšší fytotoxicita u tembotrionu, kde byla fytotoxicita 77 % u nižší dávky a 85 % u vyšší dávky. Nejnižší fytotoxicita byla zjištěna u kombinace účinných látek metamitron s chinmerakem.

**Klíčová slova:** selektivita, fytotoxicita, herbicidy, krambe

### Abstract

The phytotoxicity of clopyralid with picloram, metamitron with quinmerac, tembotrione, and metazachlor was studied in greenhouse experiments at two application rates to evaluate their effects on crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.) The influences of these herbicides on shoot phytotoxicity, plant height, and biomass production were evaluated. Herbicide-induced foliar injury ranged from early chlorosis, necrosis, and stunted growth. The highest phytotoxicity to crambe was found in tembotrione, it ranged from 77 to 85 % depending on the herbicide rate. The lowest phytotoxicity on crambe was in metamitron with quinmerac.

**Keywords:** selectivity, phytotoxicity, herbicides, *Crambe abyssinica*

### Úvod

Katrán etiopský (*Crambe abyssinica* Hochst. ex R.E. Fries) patří do čeledi brukvovité (Brassicaceae). Jak název napovídá pochází z Etiopie, kde roste na náhorních plošinách v nadpořských výškách až 2600 metrů nad mořem. Je to jednoletá bylina s krátkou vegetační dobou, mělce kořenící s jemným křovitým kořenem, který se ve svrchních vrstvách půdy bohatě větví. Lodyhy jsou ve spodní části ochlupené, nahoře lysé, vzpřímené a v horní části se silně větví v dlouhé, šikmo odstálé, řídké rozvětvené, podélně rýhované větve, které vyrůstají v úžlabí listenů (Strašil 2010). Listy jsou střídavé, vejčité s pilovitým okrajem. Květenství je prodloužený hrozen. Květy mají čtyři bílé korunní lístky, kopist'ovité kališní lístky a šest tyčinek. Plodem je kulovitá nažka. Pěstuje se jako olejina a meziplodina, je možné ji využívat do krmných směsí pro zvěř.

Počáteční vývoj krambe je středně rychlý a trvá 3 až 4 týdny, než se porost zapojí (Strašil 2010). V ranných fázích vývoje nemá dobrou konkurenční schopnost vůči plevelům, proto je vhodné vysévat tuto plodinu na méně zaplevelené pozemky. Při setí do širších řádků je možné v počátcích vegetace použít meziřádkovou kultivaci proti plevelům (Strašil 2010). Při užších řádcích je jedinou možností ochrany proti plevelům aplikace herbicidních přípravků. V současné době jsou do krambe registrovány čtyři herbicidní přípravky, z toho 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 a dva (Butisan Max s kombinací účinných látek chinmerak, dimethenamid-P, a metazachlor a Butisan Star s kombinací účinných látek chinmerak a metazachlor) jsou určeny proti dvouděložným plevelům. U přípravků proti dvouděložným plevelům se jedná o kombinace účinných látek, které jsou si velmi podobné. Studium herbicidního ošetření u katránu se zabýval Strašil (2010), který uvádí dobrou

selektivitu metazachloru. Širokým spektrem účinných látek se zabýval Souza et al (2014), ale dobrou selektivitu měl pouze trifluralin při předset'ové aplikaci.

V této práci byla v nádobových pokusech ověřována fytotoxicita dalších účinných látek a jejich kombinací.

## Materiál a metody

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 byl použit katrán etiopský odrůda Katka, osivo pocházelo z pěstebních ploch v okolí Troubska. Osivo bylo vyseto do květináčů o rozměrech 15x15x15 cm, které byly naplněny hlinitopísčitou půdou s následujícím obsahem živin: N anorganický 22 mg/kg, K 267 mg/kg, Mg 353 mg/kg, P 97 mg/kg, Ca 3470 mg/kg, humus 1,17 %. V každém květináči bylo pro hodnocení ponecháno 20 rostlin ktránu. Ošetření rostlin bylo provedeno 1.3.2021 ve fázi BBCH 12 až 14 (2 až 4 pravé listy). Pokusy byly uspořádány náhodně a ve třech opakováních pro každou variantu a koncentraci přípravku. Byly zkoušeny následující účinné látky a jejich kombinace: klopýralid s picloramem (Galera), metamitron v kombinaci s quinmeracem (Goltix titan), tembotrion v kombinaci s isoxadifenem (Laudis) a metazachlor (Butisan 400). U každého přípravku byly zkoušeny dvě koncentrace. Koncentrace byly zvoleny 0,5 N (poloviční aplikační dávka využívaná k hubení plevelů) a 1 N (běžná aplikační dávka přípravku). Seznam variant je uveden v tabulce 1.

**Tabulka 1: Seznam variant**

Varianta	Přípravek	Účinná látka	Dávka přípravku na ha	Dávka účinné látky na ha	Koncentrace
1	-	-	-	-	0 N
2_1	Galera	Klopýralid 267 g/l, Pikloram 67 g/l	0,175 l	46,7/ 11,7 g	0.5 N
2_2	Galera	Klopýralid 267 g/l, Pikloram 67 g/l	0,35 l	93,5/23,5 g	1 N
3_1	Goltix Titan	metamitron - 525 g, quinmerac - 40 g	1 l	525/ 40 g	0.5 N
3_2	Goltix Titan	metamitron - 525 g, quinmerac - 40 g	2 l	1050/ 80 g	1 N
4_1	Laudis	tembotrione - 44 g, isoxadifen-ethyl - 22 g	1 l	44/ 22 g	0.5 N
4_2	Laudis	tembotrione - 44 g, isoxadifen-ethyl - 22 g	2 l	88/ 44 g	1 N
5_1	Butisan 400	metazachlor - 400 g	1 l	400 g	0.5 N
5_2	Butisan 400	metazachlor - 400 g	2 l	800 g	1 N

Vyhodnocení stavu rostlin a fytotoxicity bylo prováděno vizuálně ve čtyřech termínech. Hodnocení probíhalo po 0, 4, 7 a 14 dnech od postřiku (T0, T3, T7 a T14). Fytotoxicita/stav rostlin byla hodnocena v % poškození rostlin. Ke každému hodnocení byl připojen podrobný popis příznaků fytotoxicity/poškození. Poškození rostlin bylo srovnáváno s neošetřenou kontrolou. V průběhu pokusu byla měřena výška rostlin u jednotlivých variant ve čtyřech termínech (T0, T7, T14 a T21) a na konci pokusu (T21) byla také sklizena a zvážena nadzemní hmota pěti rostlin a vypočítána průměrná hmotnost jedné rostliny. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Statistica 12 metodou analýzy rozptylu a následným testováním Tukeyho testem na hladině  $\alpha$  0,05.

## Výsledky

### Selektivita zkoušených herbicidních variant

U ktránu byly zjištěny rozdíly v selektivitě jednotlivých kombinací účinných látek. Nejvyšší fytotoxicita ke ktránu byla zjištěna u kombinace účinných látek tembotrion s isoxadifenem (Laudis). V průběhu hodnocení docházelo k prohlubování projevů fytotoxicity. V prvním termínu hodnocení po čtyřech dnech od aplikace byla průměrná fytotoxicita u obou koncentrací podobná a dosahovala 7 až 8 %. Po 7 dnech byla fytotoxicita u nižší koncentrace 40 % a u vyšší

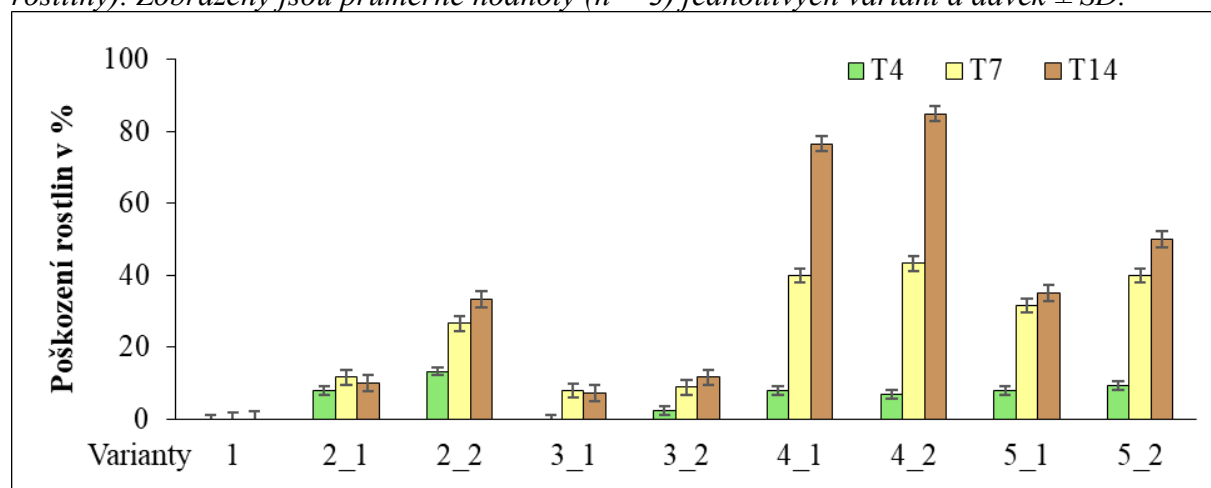
43 % a po 14 dnech byla fytotoxicita u nižší koncentrace 76 a u vyšší dokonce 85 %. Rozdíly byly ve srovnání s neošetřenou kontrolou průkazné. Hlavními příznaky fytotoxicity byly nekrózy, chlorózy, deformace listů a omezení růstu. Nejnižší fytotoxicita byla zjištěna u metamitronu v kombinaci s quinmeracem (Goltix titan), kde fytotoxicita po 14 dnech dosahovala 7 % u nižší koncentrace a 12 % u vyšší koncentrace. U obou koncentrací byla dobrá selektivita k plodině po aplikaci. Průkazný rozdíl oproti neošetřené kontrole byl u vyšší koncentrace. Hlavními příznaky fytotoxicity byly chlorózy a nekrózy na okrajích listů. Dobrou selektivitu vykazovala také kombinace klopýralidu s picloramem (Galera) v nižší koncentraci, kde byla průměrná fytotoxicita po 14 dnech od aplikace 10 %. Hlavními příznaky fytotoxicity byly nekrózy, deformace listů a omezení růstu. U vyšší dávky byla po 14 dnech od aplikace zjištěna uspokojivá fytotoxicita 33 %. Účinná látka metazachlor (Butisan 400) měla po 14 dnech zvýšenou fytotoxicitu 35 % u nižší dávky a silnou fytotoxicitu 50 % u vyšší dávky. Hlavními příznaky fytotoxicity byly chlorózy u mladých listů, nekrózy a omezení růstu. Výsledky fytotoxicity jsou uvedeny v tabulce 2 a znázorněny v Grafu 1.

**Tabulka 2: Stav rostlin na začátku pokusu/fytotoxicita – poškození rostlin v %**

Varianta	Přípravek	Dávka přípravku na ha	Stav rostlin/fytotoxicita v % poškození rostliny			
			T0	T4	T7	T14
1	-	-	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
2_1	Galera	0,175	0,00 a	8,00 cd	11,67 b	10,00 ab
2_2	Galera	0,35	0,00 a	13,33 d	26,67 c	33,33 c
3_1	Goltix Titan	1	0,00 a	0,00 a	8,00 ab	7,33 ab
3_2	Goltix Titan	2	0,00 a	2,33 ab	9,00 ab	11,67 b
4_1	Laudis	1	0,00 a	8,00 cd	40,00 de	76,67 e
4_2	Laudis	2	0,00 a	7,00 bc	43,33 e	85,00 e
5_1	Butisan 400	1	0,00 a	8,00 cd	31,67 cd	35,00 c
5_2	Butisan 400	2	0,00 a	9,33 cd	40,00 de	50,00 d

Pozn.: písmenné indexy znázorňují statistické rozdíly na hladině  $\alpha$  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 %

**Graf 1: Vliv ošetření herbicidními přípravky na poškození rostlin (fytoxicita v % poškození rostliny). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty (n = 3) jednotlivých variant a dávek ± SD.**



#### Vliv ošetření na výšku rostlin a hmotnost nadzemní biomasy

V průběhu pokusu byla hodnocena výška rostlin. První měření bylo provedeno v před aplikací v termínu T0. V tomto termínu se průměrná výška rostlin pohybovala v rozmezí od 12,2 do 13,2 cm a nebyly zjištěny významné rozdíly ve výšce. V pozdějších termínech výška rostlin

korespondovala se zjištěnou fyto toxicitou, která se zejména u některých variant projevovala také omezením růstu rostlin. Žádná z ošetřených variant svou výškou nepřesáhla neošetřenou kontrolu, kde průměrná výška v posledním termínu hodnocení dosahovala 26,4 cm. K největšímu omezení růstu rostlin došlo u kombinace účinných látek tembotrion s isoxadifenem, kde byla také největší fyto toxicita. Docházelo zde ke stagnaci až k poklesu výšky oproti počátečnímu stavu. V posledním termínu hodnocení byla průměrná výška u nižší dávky 10,1 cm a u vyšší dávky 9,6 cm a výškový rozdíl oproti neošetřené kontrole byl cca 16 cm. Rozdíl oproti neošetřené kontrole byl statisticky průkazný. Průkazný rozdíl ve výšce ve srovnání s neošetřenou kontrolou byl také u účinné látky metazachlor v obou dávkách, kde byla v posledním termínu hodnocení průměrná výška u nižší dávky 19,5 cm a u vyšší 16,6 cm. Snížení oproti neošetřené kontrole bylo téměř 7 cm u nižší dávky a téměř 10 cm u vyšší dávky. U kombinace klopuralidu s picloramem byla výška rostlin v posledním termínu hodnocení 24,6 cm u nižší dávky a 21,6 cm u vyšší dávky. K průkaznému snížení došlo pouze u vyšší dávky, kde byl rozdíl oproti neošetřené kontrole 4,7 cm. U nižší dávky a u metamitronu v kombinaci s quinmeracem se rozdíl oproti neošetřené kontrole pohyboval okolo 2 cm a nebyl statisticky průkazný.

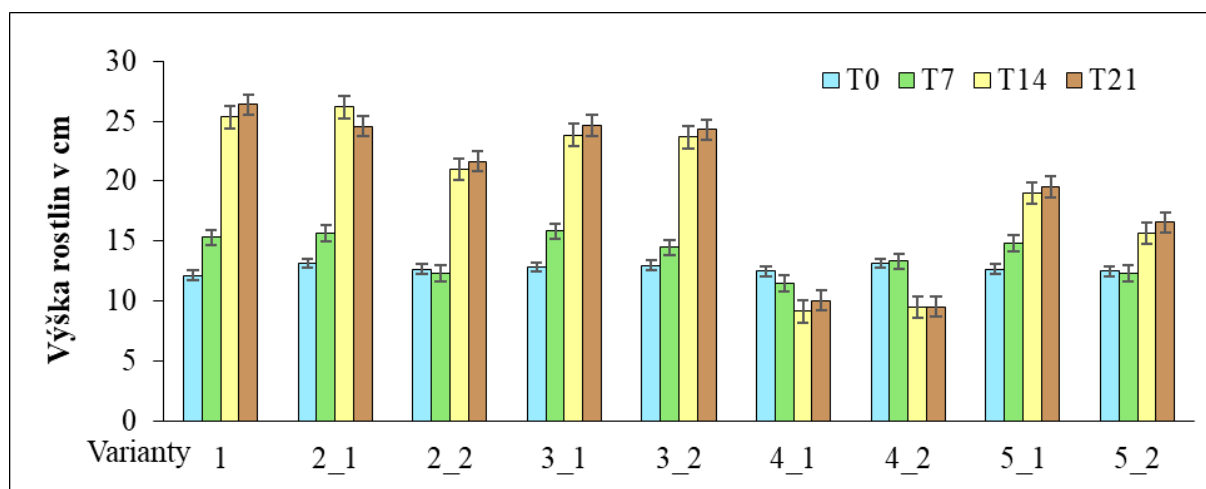
Byly zjištěny také rozdíly ve hmotnosti rostlin. Nejvyšší hmotnost čerstvé i suché hmoty byla zjištěna u kontroly (2,45 g). U kombinace klopuralidu s picloramem (var. 2) a u u metamitronu v kombinaci s quinmeracem (var.3) nebyl průkazný rozdíl v čerstvé hmotnosti oproti neošetřené kontrole. V suché hmotnosti byly zjištěny průkazné rozdíly s neošetřenou kontrolou téměř u všech variant s výjimkou u metamitronu v kombinaci s quinmeracem (var. 3) v nižší dávce.

**Tabulka 3: Výška a hmotnost rostlin**

Varianta	Přípravek	Dávka přípravku na ha	Výška v cm				Hmotnost rostliny v g	
			T0	T7	T14	T21	Čerstvá	Suchá
1	-	-	12.15 a	15.33 c	25.33 e	26.36 e	2.45 e	0.28 e
2_1	Galera	0.175	13.17 a	15.67 c	26.17 e	24.56 de	2.41 de	0.19 cd
2_2	Galera	0.35	12.67 a	12.33 ab	21.00 cd	21.64 cd	2.17 cde	0.16 bed
3_1	Goltix Titan	1	12.83 a	15.83 c	23.83 de	24.64 de	2.18 cde	0.22 de
3_2	Goltix Titan	2	13.00 a	14.50 bc	23.67 de	24.31 de	1.98 cde	0.16 bcd
4_1	Laudis	1	12.50 a	11.50 a	9.17 a	10.06 a	0.55 ab	0.08 ab
4_2	Laudis	2	13.17 a	13.33 abc	9.50 a	9.56 a	0.42 a	0.07 a
5_1	Butisan 400	1	12.67 a	14.83 bc	19.00 bc	19.53 bc	1.54 cd	0.14 abcd
5_2	Butisan 400	2	12.50 a	12.33 ab	15.67 b	16.56 b	1.36 bc	0.12 abc

Pozn.: písmenné indexy znázorňují statistické rozdíly na hladině  $\alpha$  0,05

**Graf 2: Vliv ošetření herbicidními přípravky na výšku rostlin (fyto toxicita v % poškození rostliny). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty ( $n = 6$ ) jednotlivých variant a dávek  $\pm$  SD.**



### Diskuse

U nás se herbicidní ochranou katránu zabýval Strašil (2010), který uvádí dobrý účinek účinné látky metazachlor (přípravek Butisan 400) při dávce přípravku 2,5 litru na ha. V našich pokusech se, ale tato účinná látka příliš neosvědčila a už v dávce 2 l přípravku na hektar měla počáteční fytotoxicitu 50 % poškození rostlin. Účinnou látku klopyralid zkoušeli do katránu Stougaard a Moomaw (1991). V této práci byla účinná látka klopyralid aplikována postemergentně v dávce 280 g/ha v kombinaci s předseťovým ošetřením účinnou látkou trifluralin v dávce 840 g/ha. Poškození rostlin bylo 0 až 25 %. V našich pokusech dosahovalo poškození rostlin při kombinaci klopyralidu s picloramem 10 až 33 % i přesto že dávka účinné látky klopyralidu byla mnohem nižší. To naznačuje, že na fytotoxicitě této kombinace se více podílela účinná látka picloram. Širokým spektrem účinných látek se zabýval Souza et al (2014)

### Závěr

Aplikace zkoušených herbicidních látek a jejich kombinací měla vliv na růst rostlin po aplikaci. Byla zjištěna fytotoxicita, která se projevovala nekrózami, chlorózami a také omezením růstu rostlin. Po aplikaci docházelo ke snížení výšky rostlin oproti neošetřené kontrole a také ke snížení produkce nadzemní hmoty. Nejperspektivnějším přípravkem pro použití v této plodině je ze zkoušených přípravků Goltix titan (metamitron v kombinaci s quinmeracem), u kterého byla zjištěna nejnižší fytotoxicita a nejmenší vliv na výšku rostlin a produkci nadzemní hmoty.

### Literatura

- Strašil Z. (2010): Základy pěstování a možnosti využití krambe. METODIKA PRO PRAXI. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 - Ruzyně, 21 s., ISBN 978-80-7427-033-8
- Souza G. S. F.; H. dos Santos Vitorino; A. C. da Costa Lara Fioreze; M. R. Rocha Pereira; D. Martins (2014): Selectivity of herbicides in crambe crop. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 35, n. 1, p. 161-168, DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n1p161
- Stougaard, R.N. - Moomaw, R.S.: Crambe (*Crambe abyssinica*) tolerance to herbicides. Weed Technology. 1991, 5: 3, 566-569.

**Poděkování**

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1722

**Kontaktní adresa:**

Zuzana Kubíková, Ing. Phd.  
Zemědělský výzkum spol. s r. o.  
Zahradní 1, 664 41  
telefon: 547 138 831, e-mail: kubikova@vupt.cz

## **Virus mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*): riziko pro pěstování košťálové zeleniny – Ano nebo Ne?**

*Turnip mosaic virus*: a risk for growing brassica vegetables - Yes or No?

**Navrátil M., Šafářová D.**

*Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta*

### **Abstrakt**

Na farmách zaměřených na ekologickou produkci košťálových zelenin a v jejich okolí byl monitorován výskyt viru mozaiky květáku (CaMV), viru mozaiky vodnice (TuMV), viru žluté mozaiky vodnice (TYMV) a viru žloutenky vodnice (TuYV). Na všech lokalitách, s výjimkou Lednice, byl potvrzen výskyt dvou virů, a to TuMV a TuYV. TuMV se vyskytoval na tuřínu a kedlubnu, a to často ve směsné infekci s TuYV. Na hlávkovém zelí se vyskytoval pouze TuYV, zatímco na rostlinách křenu pouze TuMV. Biologické testy rezistence košťálových zelenin potvrdily rezistenci vůči TuMV u vybraných odrůd kapusty kadeřavé a růžičkové, a čínského a pekingského zelí.

**Klíčová slova:** zdroje infekce, rezistence, ekologická produkce zeleniny

### **Abstract**

The occurrence of cauliflower mosaic virus (CaMV), turnip mosaic virus (TuMV), turnip yellow mosaic virus (TuYV), and turnip yellows virus (TuYV) was monitored on the farms focused on the ecological production of cruciferous vegetables and in their surroundings. At all localities, except for Lednice, the occurrence of two of them, TuMV and TuYV, was confirmed. TuMV was found infecting turnip and kohlrabi, often in mixed infection. The cabbage was infected only by TuYV, while horseradish was infected only by TuMV. Biological testing of resistance of cruciferous plants allowed identification of resistance against TuMV in some cultivars of curly cabbage, Brussels sprout, Chinese cabbage, and napa cabbage.

**Keywords:** sources of infection, resistance, organic production system

### **Úvod**

Košťálové zeleniny patří mezi nejvíce pěstované zeleniny v České republice. Zelí hlávkové (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) bylo v roce 2020 pěstované na 1 044 ha a jeho sklizeň činila 44 090 t, květák (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) byl pěstován na 240 ha a bylo ho sklizeno 2 641 t, kedluben (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) na 182 ha (4 595 t), brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck) na 113 ha (946 t), zelí pekingské (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) na 99 ha (1 832 t), kapusta hlávková (*Brassica oleracea* var. *sabauda* L.) na 77 ha (987 t), a kapusta růžičková (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* DC.) na 0,3 ha (3 t). Do téže čeledi *Brassicaceae* se řadí i oblíbená kořenová zelenina, ředkev setá ředkvička (*Raphanus sativus* L. convar. *radicula* Pers.) pěstovaná na 349 ha (4 750 t) (Němcová a Buchtová 2021).

Žloutenky patří k hlavním virovým chorobám košťálových zelenin. Jejich původci mohou být čtyři druhy virů, a to virus mozaiky květáku (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV, r. *Caulimovirus*), virus mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*, TuMV, r. *Potyvirus*), virus žluté mozaiky vodnice (*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV, r. *Tymovirus*) a virus žloutenky vodnice (*Turnip yellows virus*, TuYV, r. *Poleovirus*). Tyto viry se vyskytují nejen jednotlivě, ale často i ve směsných infekcích a negativně ovlivňují zemědělskou produkci. Jejich infekce vede průměrně ke 30% snížení výnosů a také negativně ovlivňuje kvalitu skladovaných zelenin (Shattuck 1992; Walsh a Jenner 2002).

Přestože bylo v posledních letech, a to nejen u nás, pozorováno šíření TuYV, které s vysokou pravděpodobností souvisí s rozšířením pěstování řepky olejky, a to i v blízkosti pěstitelských ploch košťálových zelenin, je za nejvýznamnější a nejrozšířenější virus infikující košťálové zeleniny považován virus mozaiky vodnice (TuMV) (Nellist a kol. 2022).

TuMV je taxonomicky řazen do rodu *Potyvirus* – nejpočetnějšího rodu rostlinných jednovláknových RNA virů. Mozaika brukvovitých, s největší pravděpodobností způsobená virem mozaiky vodnice, bylo poprvé popsáno v USA v roce 1921 na brukvi (*Brassica rapa* L.), čínském zelí (*B. pekinensis* Rupr.) a japonské hořčici (*B. japonica* Thunb.) (Gardner a Kendrick 1921; Schultz 1921), později pak ve Velké Británii na *B. oleracea* (Smith 1935) a v Číně na řepce *B. rapa* (Ling a Yang 1940).

Virus mozaiky vodnice patří mezi nejrozšířenější viry rostlin, vyskytuje se prakticky po celém světě. Jeho genom je tvořený jednou pozitivně orientovanou RNA molekulou o délce 9 798 nukleotidů kódující 10 proteinů. Je velice variabilní, do současné doby bylo popsáno více než 200 izolátů původem z různých zemí a hostitelských rostlin (NCBI 2022). Na základě biologických vlastností a podle symptomů, které vyvolávají na diferenciacních liniích zástupců *Brassica napus*, jsou izoláty TuMV rozdělovány do 12 patotypů. V současnosti se však častěji používá rozdělení do šesti fylogenetických skupin (tzv. basal-B, basal-BR, Asian-BR, world-B, Iranian a Orchis skupina), které dobře korelují s jejich rozdíly v patogenitě a odrážejí i jejich geografický původ (Yasaka et al. 2017). Nejrozšířenější z nich je fylogenetická skupina world-B, která se vyskytuje celosvětově a preferuje domestikované formy r. *Brassica*. Do této skupiny patří i všechny doposud analyzované české TuMV izoláty.

TuMV má široký okruh hostitelů zahrnující 318 druhů rostlin patřících do 43 různých čeledí, mezi které patří převážně kulturních, ale i plevelné nebo planě rostoucí rostliny. K hospodářsky nejvýznamnějším pak patří zástupci čeledi brukvovité (*Brassicaceae*): brukev - *Brassica*, křen - *Armoracia*, ředkev - *Raphanus*; č. laskavcovité (*Amaranthaceae*): řepa - *Beta*, laskavec - *Amaranthus*, špenát - *Spinacia*. Hostiteli jsou i okrasné rostliny, jako petunie (*Petunia*), cínie (*Zinnia*), astry (*Aster*) nebo chryzantémy (*Chrysanthemum*). Z epidemiologického hlediska jsou významné i brukvovité plevele, např. plevelná ředkev ohnice (*Raphanus raphanistrum*), penízek rolní (*Thlaspi arvense*), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*), hořčice polní (*Sinapis arvensis*); anebo laskavce (*Amaranthus*) a merlíky (*Chenopodium*) (Morero a Fereres, 2012; Zhu, 2016; Nguyen a kol. 2013).

Uvádí se, že virus mozaiky vodnice je přenášen neperzistentním způsobem více než 50 druhy mšic. Nejčastěji jsou jako vektory v ČR uváděny běžně se vyskytující, monitorované, druhy mšic, a to mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) (Rychlý a kol. 2022).

Kontrola šíření viru mozaiky vodnice je v běžné praxi obtížná. Doporučuje se prostorová izolace od možných zdrojů infekce a likvidace plevelů-hostitelů v okolí, monitoring výskytu příznaků infekce a pěstování odolných/rezistentních odrůd. Monitoring vektorů a jejich následná regulace pomocí insekticidů je problematická, a to jak z důvodu jejich často nízké účinnosti, tak z důvodu chemické kontaminace produkce a zvýšené ekologické zátěže životního prostředí.

Cílem prezentované studie byl monitoring výskytu viru mozaiky vodnice na košťálových zeleninách pěstovaných v systému ekologického zemědělství a testování rezistence odrůd různých košťálových zelenin vůči TuMV.

## **Materiál a metody**

Monitoring výskytu TuMV, TuYV, TYMV a CaMV byl proveden v první polovině září 2019 na 4 farmách zaměřených na ekologickou produkci zeleniny a 3 lokalitách s výskytem křenu selského. Byly provedeny vizuální prohlídky porostů, zaznamenány příznaky, jejich frekvence a odebrány vzorky listů pro laboratorní analýzy (Tabulka 1).



Detekce virů byla provedena komerčními DAS-ELISA testy podle návodu výrobců, TuMV, TuYV a TYMV podle LOEWE® Biochemica GmbH, CaMV podle Bioreba AG.

Vzorky osiva pro biologické testy vnímavosti/rezistence odrůd košťálových zelenin vůči TuMV byly získány od firmy Moravoseed, testovány byly: brokolice (Apolena F1, Leonora, Limba, Miranda), kadeřávek (Husar, Kadet, Kapitan F1, Kapral, Rednex, Rossignol, Scarlet, Sympatic, Tintoreto), kapusta hlávková (Blistra F1, Entira F1, Předzvěst, Raketa, Raná žlutá, Verita F1), kapusta růžičková (Casiopea, Dolores F1), kedluben (Ametyst F1, Ballot F1, Blankyt, Bohemia F1, Gaston F1, Gigant, Kartago F1, Korfu F1, Kref F1, Luna, Troja F1, Violeta), květák (Beta, Delta, Octavian), zelí hlávkové bílé (Albatros F1, Aros F1, Atila F1, Avak F1, Betti F1, Dynamic F1, Holt, Hornet F1, Kalibro F1, Libreto F1, Madison F1, Magion F1, Midor F1, Pluto, Polar, Pourovo polopozdní, Pourovo pozdní, Pylon F1, Status F1, Target F1, Zeus F1, Zora), zelí hlávkové červené (Kalibos, Mars, Moderat F1, Pourovo červené, Rufus), zelí čínské (Paket) a zelí pekingské (Bristol, Capitol F1, Forco F1, Hilton).

Osivo bylo vyseto do perlitu (Profi-Grow, Česká republika); naklíčené rostliny byly přepikýrovány do kontejnerů 9x9 cm a substrátu TS 3 medium s jílem (Klasmann-Deilmann GmbH, Německo) a pěstovány při fotoperiodě 16 h den/8 h noc a teplotě 20-22 °C/16-18 °C. Rostliny byly po celou dobu kultivace přihnojovány jednou týdně roztokem hnojiva Kristalon Start o koncentraci 1g/l (AGRO CS, Česká republika). První dva pravé listy byly mechanicky inokulovány homogenátem z infikované rostliny křenu TuMV, izolát TuMV43. Inokulum bylo připraveno rozetřením 1 g infikovaného listu v 9 ml 10 mM fosfátového pufru (pH 7,4), s 1% přídavkem křemeliny 'Celite'. V každé variantě bylo testováno 10 rostlin, dvě rostliny téže odrůdy byly použity jako negativní kontrola, a dvě rostliny hořčice, odrůda Polárka, inokulované stejným inokulem byly použity jako pozitivní kontrola pro ověření jeho infekčnosti. Průběh infekce byl monitorován v týdenních intervalech po dobu 3 týdnů, kdy byl zaznamenáván vývoj příznaků, a přítomnost viru byla zjišťována 3 týdny po inokulaci pomocí DAS-ELISA testu.

## Výsledky

Na podzim roku 2019 byl zaznamenán výskyt dvou, ze čtyř sledovaných virů, a to TuMV a TuYV na všech čtyřech ekologických farmách (Tabulka 1).

Nejběžnějším hostitelem obou virů byl tuřín. Příznakové, viry infikované rostliny byly zaznamenány na lokalitě II a III, typickými symptomy byly chlorotické mozaiky na listech. Při vizuální prohlídce přesahoval v obou případech podíl příznakových rostlin 50 %. U vybraných testovaných příznakových rostlin byla v 75 % případů prokázána smíšená infekce TuMV a TuYV, v jednom případě byla zaznamenána infekce pouze TuYV a v jednom případě infekce pouze TuMV.

Příznakové rostliny hlávkového zelí se vyskytovaly na všech lokalitách, kdy infikované rostliny vykazovaly chlorotickou mozaiku a zakrslost. Zatímco se na lokalitách I, II a III příznakové rostliny nacházely ojediněle, na lokalitě IV byla zaznamenána jejich vyšší četnost. Ve všech případech byl v příznakových rostlinách hlávkového zelí potvrzen TuYV. Vyšší výskyt TuYV na lokalitě IV je s vysokou pravděpodobností spojen s existencí zdroje infekce, tj. TuYV infikovanými rostlinami řepky nacházejícími se přímo v porostu zelí.

Na lokalitě I byl zaznamenán zvýšený počet příznakových rostlin kedlubnu, ve kterých převládala infekce TuYV nad TuMV, v jednom případě se jednalo o smíšenou infekci. Infikované rostliny vykazovaly mírnou chlorotickou mozaiku.

Na lokalitě II byl detekován ojediněle výskyt TuYV i na rostlinách zelí čínského vykazujících mírnou mozaiku.

Potenciálně významným hostitelem TuMV se ukázal křen selský, který byl infikován TuMV v blízkosti lokality II. To, že je křen epidemiologicky významným hostitelem potvrzuje zjištění výskytu TuMV ve 29 ze 46 podezřelých rostlin křenu v oblasti Lednice na Moravě. Typickým,

lehce rozpoznatelným příznakem, byla střední až silná chlorotická mozaika. Ani v jedné testované rostlině křenu však nebyl detekován TuYV, TYMV anebo CaMV.

**Tabulka 1: Detekce TuMV a TuYV na studovaných lokalitách.** (uveden je počet pozitivních /testovaných rostlin)

Lokalita	Druh zeleniny	TuMV	TuYV
<b>I</b>	zelí hlávkové	0/1	1/1
	kedluben	1/17	4/17
	zelí čínské	0/1	0/1
	tuřín	0/1	0/1
<b>II</b>	zelí hlávkové	0/7	3/7
	kedluben	0/1	0/1
	zelí čínské	0/3	2/3
	tuřín	6/7	7/7
	křen selský	1/1	0/1
<b>III</b>	zelí hlávkové	0/5	4/5
	tuřín	5/6	4/6
	hořčice bílá	0/5	5/5
<b>IV</b>	zelí hlávkové	0/26	17/26
	řepka olejka	0/3	3/3
<b>Lednice</b>	křen selský	29/46	0/46

Celkem bylo otestováno na rezistenci vůči TuMV 68 odrůd košťálových zelenin (Tabulka 2). Většina z nich byla k viru vnímavá a vykazovala typické příznaky infekce – chlorotické mozaiky a chlorotické kroužky na listech. Jako rezistentní se jeví odrůdy Rossignol (kapusta kadeřavá), Dolores F1 (kapusta růžičková) a Capitol F1 (zelí pekingské). Inokulované rostliny těchto odrůd nevykazovaly žádné příznaky infekce, přítomnost viru nebyla prokázána DAS-ELISA testem ani tři týdny po inokulaci.

Čtyři odrůdy reagovaly na infekci jen chlorotickými nebo nekrotickými lézemi na inokulovaných listech, přičemž nedošlo k šíření infekce do systému rostliny a inokulované listy brzy odumřely. Jednalo se o odrůdy kapusty kadeřavé - Ranná žlutá a Entira F1, zelí čínského – Paket a zelí pekingského - Bristol. Všechny testované odrůdy brokolice, kapusty hlávkové, kedlubnu, zelí hlávkového a květáku byly vnímavé a nebyla u nich detekována žádná úroveň odolnosti.

**Tabulka 2: Hodnocení rezistence košťálových zelenin vůči viru mozaiky vodnice (TuMV).**

Druh zeleniny	R/T	Rezistentní odrůdy	Lokalizovaná infekce
brokolice	0/4	---	---
kapusta kadeřavá	1/9	Rossignol	Ranná žlutá, Entira F1
kapusta hlávková	0/6	---	---
kapusta růžičková	1/2	Dolores F1	---
kedluben	0/12	---	---
květák	0/3	---	---
zelí hlávkové	0/27	---	---
zelí čínské	0/1	---	Paket
zelí pekingské	1/4	Capitol F1	Bristol

R: počet rezistentních odrůd; T: celkový počet testovaných odrůd;

## Diskuze

Virus mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*, TuMV) je od svého objevu považován za hospodářsky významný virus. Tomlinson (1987) ho dokonce považuje za druhý nejvýznamnější virus infikující polní plodiny po viru mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus*, CMV). Ztráty na výnosech a kvalitě produkce brukvovitých zelenin mohou dosahovat až 70 % (Li a kol. 2019). Za zvlášť významný je považován v Asii, a to hlavně díky šíření v čínském zelí a ředkvích (Green a Deng 1985; Sako 1981).

V České republice byl poprvé výskyt TuMV zaznamenán v polovině 80-ých let minulého století na rostlinách máku setého (*Papaver somniferum*) (Špak a Kubelková, 1990). V roce 1991 byl publikován jeho výskyt na rostlinách špenátu (*Spinacia oleracea*), u kterého je choroba zodpovědná za snížení kvality a výnosu čerstvé hmoty listů (Chod a Jokeš 1991).

V minulosti byly získány a analyzovány české izoláty TuMV původem ze zelí hlávkového (*B. oleracea*), řepky (*B. rapa*), křenu (*Armoracia rusticana*) a česnáčku (*Alliaria officinalis*) ve všech případech se jednalo o izoláty náležící do fylogenetické skupiny 'world-B' preferenčně infikující rostliny rodu *Brassica*. Podle patotypizace dle Jenner a Walsh (1996) byly řazeny k patotypům 3, 4 a 5. Izoláty získané v této práci náleží ke stejné fylogenetické skupině, tj. 'world-B' (data neukázána). Patotypizaci na diferenciacních hostitelích však nebylo možné provést, protože diferenciacní linie nebyly dostupné ani u autorů, ani v genových bankách, a proto je jejich zařazení do patotypů nejasné.

Uvádí se, že hlavním zdrojem infekce TuMV infekce jsou plevelné rostliny a infikované rostliny rostoucí na neobdělávaných plochách. Naše pozorování naznačila, že hlavním zdrojem šíření viróz na košťálových zeleninách jsou infikované rostliny řepky, její infikované výdrolky a její přezimující rostliny vyskytující se v blízkosti výsadeb. Významnou roli mohou sehrát i infikované planě rostoucí rostliny křenu. Z tohoto pohledu nejsou košťálové zeleniny rizikem pro řepku, ale naopak řepka pro košťáloviny.

Výskyt TuMV, ale i TuYV na košťálových zeleninách bude vyšší až ve druhé polovině vegetace, kdy dochází k rozvoji infekce na zdrojových rostlinách a šíření TuMV mšicemi. V našich podmínkách jsou nejvýznamnějšími vektory mšice zelná, která se vyskytuje od cca poloviny května do září až poloviny října s prvním vrcholem migrační vlny v červenci a podzimním maximem letové aktivity koncem září. Mšice broskvoňová bývá zachycována od počátku května až do listopadu s vrcholem migrace v druhé polovině září (Rychlý a kol. 2022). Je pravděpodobné, že vyšší výskyt TuMV na rostlinách tuřínu, ale i vodnice, pekingského a čínského zelí a křenu souvisí s tím, že povrch jejich listů není kryt voskovou vrstvou a tedy rostliny jsou náchylnější k vektorovému přenosu TuMV nebo TuYV.

Kontrola viru mozaiky vodnice je obtížná. Doporučená opatření spočívají v zakládání zeleninářských ploch v dostatečné vzdálenosti od zdrojů infekce, jejich monitoringu a odstraňování. Likvidace vektorů insekticidy je problematická, a to jak z pohledu efektivnosti, tak z pohledu environmentálního. Ideálním řešením je proto použití rezistentních odrůd. Převážně dominantní geny rezistence byly identifikovány u *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea* a *Lactuca sativa*. Z typických zelenin byly zdroje rezistence identifikovány u genotypů čínského zelí (*B. rapa*). V případě košťálových zelenin pocházejících z *B. oleracea* byly provedeny jen skriningové studie zaměřené na detekci rezistence bez podrobného mapování markerů nebo genů rezistence. Rezistentní nebo vysoce odolné genotypy byly nalezeny u zelí bílého, květáku, kapusty, kedlubnu, brokolice, růžičkové kapusty (Walkey a Neely 1980; Walkey a Pink 1988; Sevik a Deligoz 2016; Nyalugwe a kol. 2015; Guerret a kol. 2017; Lv a kol. 2020). Problémem zůstává velký počet těžko rozlišitelných patotypů TuMV, na které reagují jednotlivé genotypy hostitelských druhů zelenin různě.

## Závěr

Byl potvrzen zvýšený výskyt TuMV na tuřinu a kedlubnu převážně ve směsné infekci s TuYV a na křenu. Zelí bílé bylo ve všech případech infikovanou pouze TuYV. Jako nejvýznamnější potenciální zdroje infekce byly vyhodnoceny infikované rostliny řepky.

Z testovaných druhů brukvovité zeleniny byla rezistence vůči TuMV zjištěna u kapusty kadeřavé (cv. Rossignol), kapusty růžičkové (cv. Dolores F1) a pekingského zelí (cv. Capitol F1).

## Literatura

- Gardner M. W., Kendrick J. B. (1921): Turnip mosaic. *Journal of Agricultural Research* 22: 123–124.
- Green S. K., Deng T. C. (1985): Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts Taiwan. *Plant Disease* 69: 28–31.
- Guerret M. G. L., Nyalugwe E. P., Maina S., Barbetti M. J., van Leur J. A. G., Jones, R. A. C. (2017): Biological and molecular properties of a *Turnip mosaic virus* (TuMV) strain that breaks TuMV resistances in *Brassica napus*. *Plant Disease* 101: 674–683.
- Chod J., Jokes M. (1991): Turnip mosaic virus as a cause of spinach yellow-spotting. *Ochrana-Rostlin-UVTIZ (CSFR)* 27 (3-4): 211–215.
- Jenner C. E., Walsh J. A. (1996): Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology* 45 (5): 848–856.
- Li G., Lv H., Zhang S., Zhang S., Li F., Qian W., Fang Z., Sun R. (2019): TuMV management for brassica crops through host resistance: retrospect and prospects. *Plant Pathology* 68:1035–1044.
- Ling, L., Yang, J. A. (1940): Mosaic disease of rape and other cultivated Crucifers in China. *Phytopathology* 30: 338–342.
- Lv, H., Fang, Z., Yang, L., Zhang Y., Wang Y. (2020): An update on the arsenal: mining resistance genes for disease management of Brassica crops in the genomic era. *Horticulture Research* 7, 34.
- Moreno A., Fereres A. (2012): Virus diseases in lettuce in the Mediterranean Basin. In: Loebenstein, G., Lecoq, H. (Eds.): *Advances in Virus Research, Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*, pp. 247–288, Academic Press, San Diego.
- NCBI (2022): National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>. Navštíveno 8.6.2022.
- Nellist C. F., Ohshima K., Ponz F., Walsh J. A. (2022): Turnip mosaic virus, a virus for all seasons. *Annals of Applied Biology* 180 (3): 312–327.
- Němcová V., Buchtová I. (2021): Situační a výhledová zpráva – zelenina. Ministerstvo zemědělství. [https://eagri.cz/public/web/file/692977/Zelenina\\_2021\\_web.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/692977/Zelenina_2021_web.pdf)
- Nguyen H. D., Tomitaka Y., Ho S. Y. W., Duchêne S., Vetten H.-J., Lesemann D., Walsh J. A., Gibbs A. J., Ohshima, K. (2013): Turnip mosaic Potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One*, 8, e55336.
- Nyalugwe E. P., Barbetti M. J., Jones, R. A. C. (2015): Studies on resistance phenotypes to *Turnip mosaic virus* in five species of *Brassicaceae*, and identification of a virus resistance gene in *Brassica juncea*. *European Journal of Plant Pathology* 141: 647–666.
- Rychlý S., Fryč D., Škulavíková O. (2022) Monitorování letu mšic v České republice v roce 2021 a jejich očekávaný stav v roce 2022. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský pp. 187.

- Sako N. (1981): Virus disease of Chinese cabbage in Japan. In: Talekar N. S., Griggs T. D., editors. Chinese cabbage. Proceedings of the First International Symposium. AVRDC; Shanhou, Tawain, pp. 129–141.
- Sevik M. A., Deligoz I. (2016): The reaction of cabbage (*Brassica oleracea* L.) breeding lines against *Turnip mosaic virus*. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 15:111–119.
- Shattuck V. I. (1992): The biology, epidemiology and control of Turnip mosaic virus. In: J. Janick (Ed) *Plant breeding reviews* (pp. 199-238). New York, John Wiley and Sons.
- Schultz E. S. (1921): A transmissible mosaic disease of Chinese cabbage, mustard, and turnip. *Journal of Agricultural Research* 22: 173–177.
- Smith, K. M. (1935): A virus disease of cultivated Crucifers. *Annals of Applied Biology* 22: 239–242.
- Špak J., Kubelková D. (1990): Occurrence of turnip mosaic virus in opium poppy (*Papaver somniferum*) in CSFR. *Ochrana Rostlin - UVTIZ (CSFR)* 26: 257–261
- Tomlinson J. A. (1987): Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110: 661–681.
- Walsh J. A., Jenner C. E. (2022): Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology* 3: 289–300.
- Zhu F., Sun Y., Wang Y., Pan H., Wang F., Zhang X., Zhang Y., Liu J. (2016): Molecular characterization of the complete genome of three basal-BR isolates of *Turnip mosaic virus* infecting *Raphanus sativus* in China. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 888.

### Poděkování

Výsledek vzniknul s pomocí podpory projektu MZe QK1910070

### Kontaktní adresa:

Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.  
Katedra buněčné biologie a genetiky  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Palackého v Olomouci  
Šlechtitelů 27  
783 71 Olomouc  
Telefon: 585634900, e-mail [milan.navratil@upol.cz](mailto:milan.navratil@upol.cz)



## Esenciální olej z fenyklu obecného a jeho potenciální využití v ochraně rostlin

*Foeniculum vulgare* essential oil and its potential use in plant protection

Novák M.<sup>1,2</sup>, Pavela R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně

<sup>2</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze

### Abstrakt

Cílem práce bylo zjistit insekticidní účinnost esenciálního oleje (EO) z fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) proti kyjatce travní (*Metopolophium dirhodum*), se záměrem poskytnout informace o možnostech jeho využití jako účinné látky potenciálně environmentálně bezpečných botanických aphidicidů. Dospělci kyjatek byli podrobena testu na akutní toxicitu a při následném statistickém vyhodnocení byly pomocí probitové analýzy odhadnuty subletální (LC<sub>30</sub>) a letální (LC<sub>50</sub> a LC<sub>90</sub>) koncentrace. LC<sub>30</sub> byla odhadnuta na 0,11 ml/l, LC<sub>50</sub> na 0,29 ml/l a LC<sub>90</sub> na 2,79 ml/l. Dále byl zjištěn vliv EO na larvy slunéčka východního (*Harmonia axyridis*), jakožto významného predátora mšic. U slunéček jsme zjistili pouze zanedbatelný vliv EO na mortalitu larev a žádnou negativní účinnost na následný vývoj ošetřených jedinců. Na základě námi zjištěných výsledků lze uvažovat o EO z fenyklu jako o účinné látce vhodné pro další vývoj environmentálně přátelských botanických aphidicidů.

**Klíčová slova:** esenciální oleje, mortalita, fertilita, mšice, *Harmonia axyridis*

### Abstract

The aim of this work was to study the insecticidal efficacy of *Foeniculum vulgare* essential oil against *Metopolophium dirhodum*, to provide information on the possibilities of its use as an active ingredient of potential environmentally safe botanical aphicides. Apterous adults of *M. dirhodum* were subjected to an acute toxicity test. In subsequent statistical evaluation sublethal (LC<sub>30</sub>) and lethal (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) concentrations were estimated using the probit analysis. The LC<sub>30</sub> was estimated on 0.11 ml/l, the LC<sub>50</sub> on 0.29 ml/l and the LC<sub>90</sub> on 2.79 ml/l. Furthermore, the effect of EO on the larvae of *Harmonia axyridis*, as an important predator of aphids, was determined. We found only a negligible effect of EO on larval mortality and no negative effect of EO on the subsequent larval development of the treated individuals of *H.axyridis*. Based on our results, fennel EO can be considered as an effective substance suitable for the further development of environmentally friendly botanical aphicides.

**Keywords:** essential oils, mortality, fertility, aphids, *Harmonia axyridis*

### Úvod

V rámci snah o udržitelnější zemědělství, které méně ohrožuje biodiverzitu, se stále častěji ve veřejné i odborné debatě objevuje otázka snížení množství aplikovaných syntetických pesticidů na agroekosystém. V registru přípravků na ochranu rostlin se neustále snižuje množství povolených účinných látek a přípravků syntetického původu (Vasilii 2022). Kromě těchto konvenčních pesticidů je na trhu ale i několik pesticidů botanických. Tyto přípravky jsou mimo jiné povoleny v ekologickém zemědělství, zároveň jsou však i dostupné pro zahrádkáře (Pavela 2020).

Účinnými látkami botanických pesticidů jsou sekundární metabolity rostlin, které lze definovat jako biologicky aktivní látky přirozené obranyschopnosti rostlin. Tyto látky vykazují na hmyz insekticidní, protipožerové, antiovipoziční či repelentní účinky. Mezi takovými sekundárními metabolity rostlin patří právě i esenciální oleje (Pavela 2020).

Esenciální oleje (EO) jsou přírodní látky syntetizovány aromatickými rostlinami. Laické veřejnosti mohou být známy jako éterické oleje či silice. Rostliny vytvářejí tyto látky ve všech

svých orgánech a skladují je ve svých sekrečních buňkách, kanálcích, buňkách epidermis či v glandulárních trichomech. Tyto silice mívají často univerzální účinek - kromě insekticidních vlastností oplývají i vlastnostmi baktericidními, fungicidními či antivirovými. Esenciální oleje se už léta využívají v parfumerii, drogerii, konzervování potravin či lékařství (Pavela 2011). Z chemického hlediska jsou EO komplexní směsí různých okysličených či neokysličených uhlovodíků řadících se do skupiny monoterpenů, diterpenů a seskviterpenů (Nazzaro et al. 2013).

Esenciální oleje již byly extrahovány z více jak 3 000 druhů rostlin. Komerčnímu pěstování a uplatnění se zatím těší pouze okolo 300 rostlin (Bakkali et al. 2008), většinou jsou z čeledí Lamiaceae, Asteraceae či Apiaceae (Pavela 2020).

Esenciální olej z fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare* Mill.) jsme si vybrali kvůli jeho dostupnosti a již dříve zjištěným dobrým pesticidním vlastnostem. Tento EO jako majoritní komponenty obsahuje trans-anethol, fenchon a estragol. Kromě těchto tří látek jsou v této silici ještě obsaženy eugenol, limonen, alfa-pinen, methylchavicol a další látky. Antifungální aktivita tohoto EO byla v minulosti prokázána například proti *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* či *Rhizopus stolonifer* (Mota et al. 2015). Dále byla v minulosti testována i insekticidní aktivita fenyklového EO, kdy velmi dobré účinky byly prokázány například proti larvám komára *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), dospělých mouchy domácí (*Musca domestica* Linnaeus, 1758) a housenkám můry *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833. (Pavela et al. 2016). Další motýl, na kterém byl tento EO testován byla blýskavka kukuřičná (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797), u které byl zaznamenán značný antioviropoziční efekt způsobený tímto esenciálním olejem (Cruz et al. 2016).

Insekticidní potenciál esenciálního oleje z *F. vulgare* byl také zkoumán na skladištních škůdcích. Například byla prokázána fumigantní insekticidní aktivita proti červotoči tabákovému (*Lasioderma serricorne* Fabricius, 1792), pilousi růžovému (*Sitophilus oryzae* Linnaeus, 1763) či zrnokazovi čínskému (*Callosobruchus chinensis* Linnaeus, 1758) (Kim & Ahn 2001).

Cílem naší práce bylo zjistit účinnost tohoto EO na mortalitu dospělců kyjatky travní (*Metopolophium dirhodum* Walker, 1849) a dále vliv letálních nebo subletálních koncentrací EO na fertilitu přeživších dospělců tohoto ekonomicky důležitého škůdce. Protože zároveň považujeme za důležité také odhadnout environmentální bezpečnost EO, byl sledován vliv EO na mortalitu a larvální vývoj slunéčka východního (*Harmonia axyridis* Pallas, 1773), jakožto necílového organismu a častého predátora mšic.

## **Materiál a metody**

Esenciální olej byl získán ze semen *F. vulgare* cv. Moravský hydrodestilací pomocí aparatury typu Clevenger. Proces hydrodestilace trval 3 hodiny. Následně byl EO vysušen bezvodým síranem sodným a uchováván v tmavé skleněné láhvi při teplotě 4 °C.

Pokusy s kyjatkou travní probíhaly ve skleníku VÚRV, v.v.i. při teplotě 21±3 °C, a 65±5% relativní vlhkosti. Pokusy se slunéčkem východním probíhaly v laboratořích VÚRV, v.v.i. při teplotě 21±3 °C, fotoperiodě 16 hodin světla /8 hodin tmy a 65±5% relativní vlhkosti.

### Testy na akutní toxicitu u *M. dirhodum*

Tyto testy byly provedeny na bezkřídlých dospělých kyjatky travní získaných z chovů VÚRV v.v.i.. Tyto kyjatky byly přeneseny na rostliny pšenice seté (BBCH 11). Následně bylo provedeno ošetření emulzemi EO, po kterém byly květináče s rostlinami individuálně izolovány plastovými kryty, aby nedošlo k úniku jedinců.

V emulzích určených k ošetření rostlin byl EO obsažen v koncentracích 2; 1,8; 1,25; 0,5; a 0,25 ml/l. Tyto koncentrace byly odhadnuty dle předběžných testů. Do emulze byl dále přidán Tween 85, v takovém poměru, aby finální roztok obsahoval přesně 0,5 % Tweenu 85, což je



koncentrace, která emulzi přidá smáčivé vlastnosti. Po namíchání byly emulze homogenizovány na homogenizátoru.

Na jedno opakování bylo použito 5 ml emulze. Experiment s každou koncentrací byl opakován 5krát.

Jako negativní kontrola posloužil 0,5% vodný roztok Tweenu 85. Jako pozitivní kontrola byla použita 1,5% emulze pomocného prostředku na ochranu rostlin Rock Effect, jehož účinnou látkou je olej z kaledy lysé (*Pongamia pinnata* L.).

Mortalita byla spočítána po 48 hodinách. Při následném statistickém vyhodnocení byla pozorovaná mortalita upravena podle Abbotta (1925) a pomocí probitové analýzy podle Finneyho (1971) byly odhadnuty  $LC_{30}$ ,  $LC_{50}$  a  $LC_{90}$ .

#### Test vlivu EO na fertilitu *M. dirhodum*

Pokus byl proveden na bezkřídlých dospělých *M. dirhodum*. Všichni jedinci byli stejně staří, stádia dospělce dosáhli 1-2 dny před provedením experimentu. Tito jedinci byli ošetřeni esenciálním olejem v koncentracích odpovídající odhadnutým  $LC_{30}$  a  $LC_{50}$  z předchozího pokusu zabývajícího se akutní toxicitou, tedy 0,29 a 2,79 ml/l. Jedinci, kteří přežili ošetření, byli následně vyselektováni a nasazeny na nové rostlinky pšenice. Všechny květináče byly zakryty plastovými kryty, aby se zamezilo přebíhání kyjatek. Kyjatky byly pozorovány 10 dní a každý den ve stejný čas byl zaznamenán počet čerstvě narozených nymf, které byly pokaždé po spočítání zlikvidovány. Vliv na fertilitu byl zjišťován na principu inhibice natality (Vzorec 1).

#### **Vzorec 1:**

*Inhibice natality vs. kontrola (%)*

$$= 100 - \left( \frac{\bar{x} \text{ potenciálních natalit F1 nymf na samičku u } LCx * (1 - x)}{\bar{x} \text{ potenciálních natalit F1 nymf na samičku v kontrole}} * 100 \right)$$

#### Testy na akutní toxicitu a následný vývoj přeživších jedinců *H. axyridis*

Při tomto pokusu byly EO z fenyklu vystaveny larvy 3. instaru slunéčka východního. Larvy pocházeli z chovů VÚRV v.v.i.

Larvy byly ošetřeny koncentracemi odhadnutými jako  $LC_{50}$  a  $LC_{90}$  pro *M. dirhodum*. Negativní kontrola se prováděla stejně jako v případě pokusů s *M. dirhodum* 0,5% roztokem Tweenu 85. Larvy byly ošetřeny v Petriho miskách a následně byly přendány do plastových mističek s prodyšným víkem. Dna mističek byla vystlána filtračním papírem a do mističek byly po celou dobu konání pokusu vždy po 48 hodinách vkládány ustrížené rostlinky pšenice obalené kyjatkami travními. Aby se zamezilo kanibalismu, byla v každé mističce pouze jedna larva slunéčka.

Vyhodnocení testu na akutní toxicitu proběhlo 24 hodin po ošetření larev. Následně byly přeživší jedinci dále krmeni a bylo sledováno, zda dokončí svůj vývoj, respektive zda všichni přeživší dosáhnou stádia dospělce. Pozorovaná mortalita byla upravena dle Abbotta (1925)

#### **Výsledky**

##### Testy na akutní toxicitu u *M. dirhodum*

U kyjatek ošetřených EO z fenyklu byla u všech testovaných koncentrací pozorována významná mortalita (viz. Tab. 1). U nejnižší testované koncentrace 0,25 ml/l byla mortalita stanovena na 42,9 %, naopak u nejvyšší testované koncentrace 2 ml/l byla pozorována mortalita v hodnotě 88,0 %. V negativní kontrole byla mortalita stanovena na 7,3 % a u pozitivní kontroly, při které byly kyjatky ošetřeny přípravkem Rock Effect (výrobce doporučenou koncentrací) byla pozorována mortalita 88,4 %.

Na základě těchto výsledků byl probitovou analýzou proveden odhad subletální (LC<sub>30</sub>) a letálních (LC<sub>50</sub> a LC<sub>90</sub>) koncentrací. Výsledné odhadnuté koncentrace byly stanoveny u subletální koncentrace LC<sub>30</sub> na 0,11 ml/l (0,106 mg/ml), u letální koncentrace LC<sub>50</sub> na 0,29 ml/l (0,28 mg/ml) a u letální koncentrace LC<sub>90</sub> na 2,79 ml/l (2,7 mg/ml.).

**Tab. 1: Insekticidní aktivita esenciálního oleje z *F. vulgare* na dospělých *M. dirhodum*.**

Chi = Chi-kvadrát, vypočtená hodnota těsnosti pro hladinu významnosti P<0.05.

CI<sub>95</sub> = 95% interval spolehlivosti, kdy hodnoty, které se v uvedeném rozpětí nepřekrývají, jsou s 95%

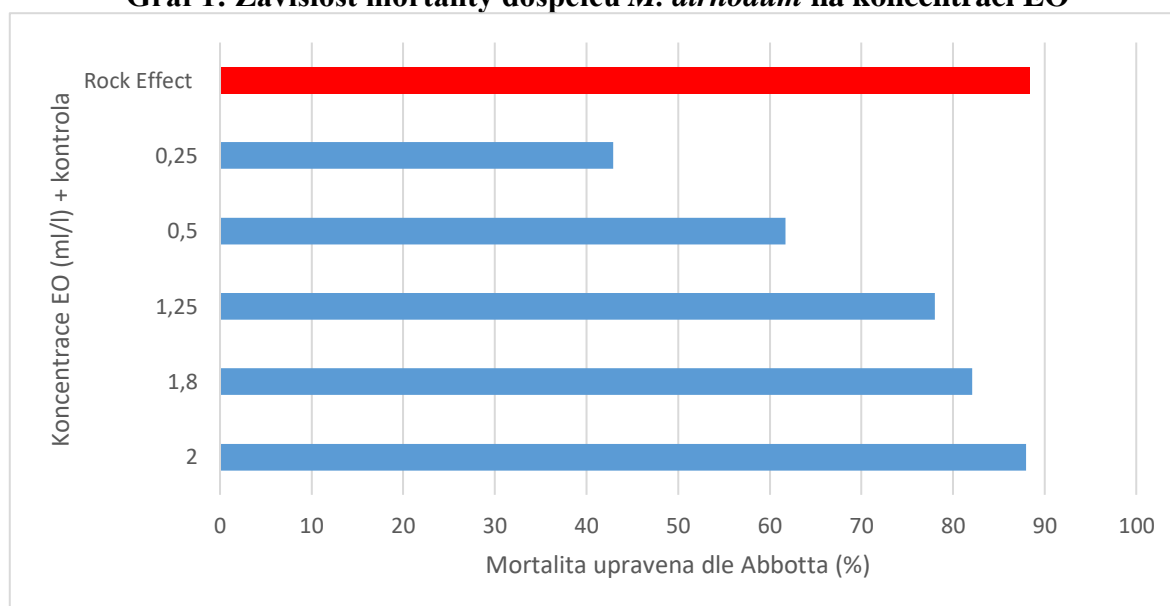
Koncentrace (ml/l)	Mortalita (%) ± SE	Mortalita – Abbott (%) ± SE	LC <sub>30</sub> (CI 95)	LC <sub>50</sub> (CI 95)	LC <sub>90</sub> (CI 95)	χ <sup>2</sup>
2	89,3 ± 11,0	88,0 ± 11,7	0,11 (0,05- 0,15) 95 %	0,29 (0,17- 0,39) 95 %	2,79 (1,90- 5,39) 95 %	0,832
1,8	84,0 ± 3,3	82,1 ± 4,24				
1,25	80,0 ± 7,3	78,0 ± 7,0				
0,5	65,3 ± 16,0	61,7 ± 17,1				
0,25	48,0 ± 7,8	42,9 ± 3,7				
Pozitivní kontrola	90,0 ± 8,0	88,4 ± 10,2				
Negativní kontrola	7,3 ± 10,5					

pravděpodobností od sebe odlišné.

Rozsah použitých koncentrací byl odhadnut na základě předběžných testů.

Abbott = přepočten dle Abbotta

**Graf 1: Závislost mortality dospělců *M. dirhodum* na koncentraci EO**



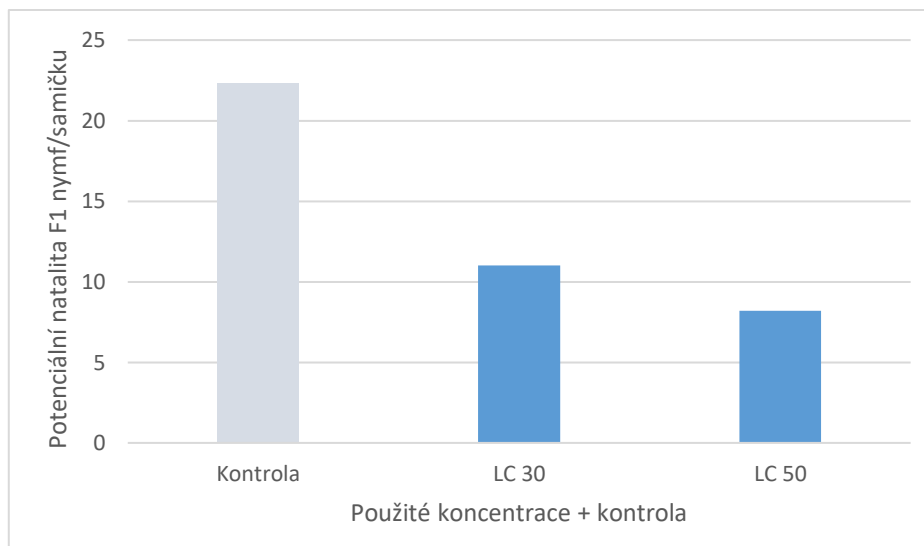
Test vlivu EO na fertilitu *M. dirhodum*

Vliv esenciálního oleje na fertilitu kyjatky travní byl zjišťován na principu inhibice natality. Podle předpokladu byla schopnost inhibice natality závislá na koncentraci. Inhibice natality byla pro LC<sub>30</sub> (0,11 ml/l) odhadnuta na 50,7 % a pro LC<sub>50</sub> (0,29 ml/l) na 63,2 % (viz. Tab. 2).

**Tab. 2: Vliv EO z *F. vulgare* na natalitu *M. dirhodum***

Koncentrace (ml/l)	Potenciální natalita F1 nymf/samičku ± SE	Inhibice natality vs. kontrola (%)
<b>0,11 (LC<sub>30</sub>)</b>	11,0 ± 3,0	50,7
<b>0,29 (LC<sub>50</sub>)</b>	8,2 ± 1,9	63,2
<b>Kontrola</b>	22,3 ± 2,6	

**Graf 2: Vliv EO z *F. vulgare* na natalitu *M. dirhodum***



#### Testy na akutní toxicitu u *H. axyridis*

Esenciální olej z *F. vulgare* nezpůsobil významnou mortalitu *H. axyridis* a ani neměl vliv na dokončení vývoje testovaných jedinců (viz. Tab. 3).

Koncentrace 0,29 ml/l (odhadnutá LC<sub>50</sub> při pokusu na akutní toxicitu u *M. dirhodum*) způsobila u sluníček po 24 hodinách mortalitu 10,0 % a koncentrace 2,79 ml/l (odhadnutá LC<sub>90</sub> při pokusu na akutní toxicitu u *M. dirhodum*) způsobila u sluníček po 24 hodinách mortalitu 10,3 %.

Kromě akutní mortality byla také pozorovaná absolutní mortalita jedinců za celý pokus, přičemž za konec experimentu bylo považováno vylihnutí dospělců ze všech přeživších jedinců.

V tomto případě byla mortalita u larev ošetřených koncentrací 0,29 ml/l stanovena na 10,4 % a u larev ošetřených koncentrací 2,79 ml/l na 14 %.

U všech jedinců, kteří přežili ošetření EO, došlo k úspěšnému dokončení vývoje.

**Tab. 3: Insekticidní aktivita esenciálního oleje z *F. vulgare* na larvy 3. instaru *H. axyridis***

Koncentrace (ml/l)	Mortalita po 24 hodinách (%) ± SE	Mortalita po 24 hodinách – Abbott (%) ± SE	Absolutní mortalita za celý pokus (%) ± SE	Absolutní mortalita za celý pokus – Abbott (%) ± SE	Přeživší, kteří dokončili vývoj (%)
<b>0,29</b> (LC <sub>50</sub> )	13,3 ± 4,7	10,0 ± 8,2	16,6 ± 4,7	10,4 ± 8,2	100
<b>2,79</b> (LC <sub>90</sub> )	17,5 ± 4,3	10,3 ± 7,0	22,5 ± 8,2	14,0 ± 4,9	100
<b>Tween 85 (5</b> <b>ml/l)</b>	7,5 ± 8,2		10 ± 7,0		100

Abbott = přepočet dle Abbotta

## Diskuze

Fenyklový esenciální olej se ukázal jako přírodní aphicid s výbornými účinky. Byla pozorována významná mortalita dospělých kyjatek travních u všech testovaných koncentrací. Naopak jsme očekávali, že inhibice natality bude o něco vyšší.

Z odborných publikací se insekticidní aktivitou EO právě proti *M. dirhodum* věnovala studie autorů Sánchez Chopa & Descamps (2012). V této studii jsou popsány testy na akutní toxicitu, ve kterých se jako účinná látka používali EO z rozmarýny lékařské (*Rosmarinus officinalis* L.), aksamitníku tenkolistého (*Tagetes terniflora* Kunth) a pepřovce *Schinus areira* (L.), u kterého byl zvlášť testovaný EO extrahovaný z plodů a zvlášť EO extrahovaný z listů. Výsledné LC<sub>50</sub> (po 48 hodinách) byly odhadnuty pro *R. officinalis* na 8,3 mg/ml a pro *T. terniflora* na 26,9 mg/ml. U EO extrahovaného z listů *S. areira* bylo LC<sub>50</sub> odhadnuto na 18,2 mg/ml a u EO získaného z plodů LC<sub>50</sub> 16,5 mg/ml. Dále například Benelli et al. (2020) vystavovali neokřídlené dospělé *M. dirhodum* EO ze stévie sladké (*Stevia rebaudiana* Bertoni). V tomto případě LC<sub>50</sub> byla odhadnuta na 5,1 ml/l a LC<sub>90</sub> na 10,8 ml/l.

Při shrnutí uvedených výsledků lze učinit závěr, že EO z *F. vulgare* v LC<sub>50</sub> a LC<sub>90</sub> odhadnutých v této práci (0,29 ml/l a 2,79 ml/l, respektive po přepočtu 0,28 mg/ml a 2,7 mg/ml) vychází pro mšice jako toxičtější než EO z *R. officinalis*, *T. terniflora*, *S. areira* a *S. rebaudiana*.

Fenyklový olej u testovaných necílových organismů sluněček východních způsobil pouze minimální mortalitu. Navíc nebyla ani pozorována žádná retardace u ošetřených larev při jejich dalším vývoji a všichni ošetření jedinci úspěšně dosáhli stádia dospělého. Nicméně je potřeba provést další pokusy, a to i na jiných necílových organismech, abychom měli lepší představu o reálné environmentální bezpečnosti tohoto EO.

Slabý insekticidní účinek na larvy *H. axyridis* teoreticky mohl být zapříčiněn silnější epikutikulou, která hmyz chrání před chemickými vlivy prostředí. *M. dirhodum* má kutikulu obecně velmi slabou. Na povrchu těla *H. axyridis* se také nacházejí štětinovité výrůstky, které by teoreticky mohli zabránit přímého kontaktu emulze s tělem. Na druhou stranu tento obranný faktor by při ošetření mělo eliminovat smáčedlo, v našem případě Tween 85.

Při hodnocení bezpečnosti pro námi testovaný necílový organismus se nabízí srovnání se studiemi, které se zabývali vystavením larev 3. instaru *H. axyridis* některým účinným látkám konvenčních pesticidů. Youn et al. (2003) testovali na larvách slunéček etofenprox, acetamiprid, imidacloprid a thiamethoxam v koncentracích určených výrobcem pro polní aplikaci. Larvy slunéček východních se ukázaly jako citlivé vůči acetamipridu a etofenproxu, u obou těchto látek byla pozorována 100% mortalita. Ošetření imidaclopridem přežilo jen 26,7 % testovaných jedinců. Jako nejméně nebezpečný insekticid pro 3. instar *H. axyridis* vyšel thiamethoxam, u kterého aplikací přežilo 86,7 %.

Podobnou studii provedl James (2003), který mimo jiné testoval i citlivost slunéček k účinným látkám chlorpyrifos a pirimicarb. U chlorpyrifosu byla pozorována 80% mortalita slunéček 2-3 instaru a u pirimikarbu byla výsledná mortalita v hodnotě 6,7 %.

Z výše napsaných řádků lze konstatovat, že EO z *F. vulgare* je pro 3. instar larev *H. axyridis* bezpečnější než přípravky obsahující účinnou látku acetamiprid, etofenprox, chlorpyrifos a imidacloprid.

Bohužel neexistuje moc studií věnujících se vlivu dalších EO na larvy slunéčka východního. Jako relevantní se dá brát například práce Benelliho et al. (2020), ve které ošetřil larvy slunéček 3. instaru esenciálním olejem ze stévie sladké (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) a to v koncentracích, které byly odhadnuty jako LC<sub>50</sub> a LC<sub>90</sub> pro kyjatku travní. V těchto pokusech při vystavení larev koncentraci zmíněné LC<sub>50</sub> (5,1 ml/l) nebyla po 48 hodinách pozorována žádná mortalita a u koncentrace rovné LC<sub>90</sub> (10,8 ml/l) byla pozorovaná mortalita pouze 7,5 %. Tedy v obou případech nižší než u námi testovaného EO z fenyklu.

## Závěr

V naší práci jsme v laboratorních podmínkách zjistili významné aphicidní účinky EO z fenyklu obecného proti kyjatce travní, která spolu s kyjatkou osenní a mšicí střemchovou patří mezi 3 nejvýznamnější mšice na obilninách. LC<sub>30</sub> pro tyto kyjatky byla odhadnuta na 0,11 ml/l, LC<sub>50</sub> na 0,29 ml/l a LC<sub>90</sub> na 2,79 ml/l. U kyjatky travní byla testována inhibice natality při ošetření koncentracemi 0,11 a 0,29 ml/l, nicméně vliv na fertilitu lze vzhledem k testovaným koncentracím charakterizovat, jako slabý. Kromě toho byla zjištěna environmentální bezpečnost tohoto EO vůči necílovému organismu slunéčku východnímu. U ošetřených slunéček byla zaznamenána pouze minimální mortalita (absolutní mortalita za celý pokus byla u koncentrace 0,29 stanovena na 10,4 ml/l a u koncentrace 2,79 ml/l na 14 %). Zároveň také bylo vyloučeno, že by tento EO nějak negativně ovlivňoval vývoj těchto brouků. Nicméně jsme si vědomi toho, že je potřeba provést další pokusy na dalších zástupcích necílových organismů, abychom měli lepší představu o reálné environmentální bezpečnosti tohoto EO.

EO z fenyklu tedy na kyjatku travní v LC<sub>50(90)</sub> vykázal vynikající účinky a zároveň nevykazoval insekticidní aktivitu vůči zástupcům necílových organismů, lze ho tedy doporučit jako potenciální účinnou látku botanických insekticidů cílených proti mšicím s nízkým environmentálním rizikem.

## Literatura

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.

- Benelli G, Pavela R, Drenaggi E, Desneux N, Maggi F. 2020. Phytol, (E)-nerolidol and spathulenol from *Stevia rebaudiana* leaf essential oil as effective and eco-friendly botanical insecticides against *Metopolophium dirhodum*. *Industrial Crops and Products*, 155:112844.
- Cruz GS, Wanderley-Teixeira V, Oliveira J V., Lopes FSC, Barbosa DRS, Breda MO, Dutra KA, Guedes CA, Navarro DMAF, Teixeira AAC. 2016. Sublethal effects of essential oils from *eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 109:660-666.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press. London.
- James DG. 2003. Pesticide susceptibility of two coccinellids (*Stethorus punctum picipes* and *Harmonia axyridis*) important in biological control of mites and aphids in Washington hops. *Biocontrol Science and Technology* 13:253-259.
- Kim DH, Ahn YJ. 2001. Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest Management Science* 57:301-306.
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6:1451-1474.
- Pavela R. 2011. Botanické pesticidy. Kurent, České Budějovice.
- Pavela R, Žabka M, Bednář J, Tříška J, Vrchotová N. 2016. New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Industrial Crops and Products* 83: 275-282.
- Pavela R. 2020. Přírodní cestou nejen proti chorobám a škůdcům. Kurent, České Budějovice.
- Sánchez Chopa C, Descamps LR. 2012. Composition and biological activity of essential oils against *Metopolophium dirhodum* (Hemiptera: Aphididae) cereal crop pest. *Pest Management Science*, 68:1492-1500.
- Youn YN, Seo MJ, Shin JG, Jang C, Yu YM. 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 28:164-170.
- Vasiliu C. 2022. Food Chains Transformation in the Context of EU Green Deal Strategy. *Amfiteatru Economic*, 24: 305-307.

### **Dedikace**

Tato práce byla financována z následujících zdrojů QK1910072.

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Matěj Novák

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507, Praha 6 –Ruzyně

Česká zemědělská univerzita v Praze

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Suchdol, 165 21 Praha

Tel. 605 063 147, e-mail: matej.novak@vurv.cz

## Posouzení vypovídací schopnosti polních testů o odolnosti k chorobám

Assessing the informativeness of field tests about resistance to disease

Plachká E.<sup>1</sup>, Rychlá A.<sup>1,2</sup>, Gališová V.<sup>1</sup>, Kořínek J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

<sup>2</sup>OSEVA PRO s.r.o.

### Abstrakt

Cílem práce bylo posoudit vypovídací schopnosti polních testů o zdravotním stavu hořčice bílé (*Sinapis alba* L.). Ve čtyřech sezónách byl hodnocen vliv termínu setí, šířky řádku a výsevu na zdravotní stav rostlin a sklizeň semen u 10 genotypů hořčice bílé. Ve dvou sezónách byl hodnocen vliv fungicidního ošetření na zdravotní stav rostlin a sklizeň semen. U genotypů byl hodnocen podíl šedých semen ve sklizni. Tento systém hodnocení zdravotního stavu sklizně u genotypů byl použit v pokusu s pesticidním ošetřením. Výsledky ukázaly zvýšení vypovídací schopnosti polních testů s fungicidy v roku nízkého napadení hořčice bílé původci chorob.

**Klíčová slova:** Hořčice bílá, genotyp, fungicid, zdravotní stav

### Abstract

The aim of the work was to assess the reporting capabilities of field tests focused on the health status of white mustard (*Sinapis alba* L.). The effect of sowing date, row width and seeding on plant health and seed yield was evaluated for 10 white mustard genotypes in four seasons. The effect of fungicide treatment on plant health and seed yield was evaluated in two seasons. The occurrence of gray seeds at harvest was evaluated for genotypes. This system of the seeds harvest health status assessment for genotypes was used in the experiment with pesticides treatment. The results show that the sensitivity of fungicide field tests was increased in year of low disease incidence.

**Keywords:** White mustard, genotypes, fungicide, health status

### Úvod

Hořčice bílá (*Sinapis alba* L.) je perspektivní brukvovitá olejnína používána jednak jako zelené hnojení, píče, vymrzající mulč, zelené hnojení s antinematocidním účinkem proti háďátku řepnému *Heterodera schachtii* a také pro sklizeň semen pro potravinářské účely pro výrobu hořčic a koření, ale má také léčivou sílu (Baranyk a kol., 2010, UKZUZ 2021). Pro zajištění kvalitního osiva a zdravých semen pro výrobu potravin je velice důležitý dobrý zdravotní stav. V porovnání let 2017 až 2021 byla v roce 2021 sklizňová plocha hořčice na semeno 14 474 ha, v roce 2022 bylo hořčicí oseto 13 020 ha (ČSÚ 2022). Od roku 2009, kdy bylo oseto 41.790 ha je zaznamenávána tendence snižování osevních ploch hořčice bílé na semeno. V letech 2016 až 2020 se osetá plocha hořčicí na semeno pohybovala mezi 11770 ha až 13240 ha. V roce 2021 a 2022 byla zaznamenána tendence mírného zvyšování osetých ploch hořčicí 14.288 ha a 15.274 ha.

Jakmile hořčice dozraje tak, že semena dostatečně vyschnou, aby se nemusela dosušovat, je nutno kvůli zachování kvality porost co nejdříve sklídit. Největší ohrožení kvality při opožděné sklizně představuje u hořčice bílé podíl šedých semen. Šedá semena jsou ve skutečnosti naplesnivělá a kromě ztráty sensorické kvality obsahují i podstatně zvýšený podíl mykotoxinů. Hlavní příčinou vzniku šedých semen je vlhké počasí v období dozrávání. Jedinou možností obrany je dodržování agrotechnických opatření, směřování pěstování do vhodných sušších

oblastí a optimální termín setí. Hořčice musí být sklizena v srpnu, kdy je většinou optimální počasí a optimální teploty (Baranyk a kol., 2010).

Podíl našedlých semen ve sklizni můžeme ovlivnit zvolenou pěstitelskou technologií včetně fungicidní ochrany. Na vyhodnocení vlivu pěstitelské technologie na podíl šedých semen ve sklizni byla zaměřena sledování v letech 2019 až 2022. V polních maloparcelních pokusech bylo sledováno několik faktorů: odrůda, termín setí, šířka řádku setí, výsevku a fungicidní ošetření. Tato práce představuje výsledky zaměřené na problematiku šedosemennosti.

### **Materiál a metody**

Maloparcelní pokusy byly ve sledovaných letech 2019 až 2022 zakládány na lokalitách Kylešovice a Chvalíkovice. Obě lokality se nacházejí v řepařské výrobní oblasti, leží v nadmořské výšce 250 až 290 m n. m. Dlouhodobé roční hodnoty 1980 až 2010 jsou 8,6 °C průměrná denní teplota a 567,6 mm roční suma srážek. Dle UKZUZ je lokalita zařazena pro zkoušení užitných hodnot odrůd do teplé oblasti (ÚKZÚZ, 2021).

Pracovali jsme s hořčicí bílou. Pokusy byly zasety secím strojem Winterstieger. Byly standardně plošně ošetřovány herbicidně a insekticidně dle výskytu plevelů a škůdců. S ohledem na dobrý výživný stav půdy nebyly pokusy přihnojovány dusíkem.

Byly zakládány 2 typy pokusů:

Technologie A: Pokus byl zakládán v letech 2019 až 2020. Byl v něm sledován vliv odrůdy (10 odrůd), výsevku (500 a 660 semen) na vysetou plochu parcely (7,5 m<sup>2</sup> a 6,75 m<sup>2</sup>), šířky řádku (12,5 a 25 cm) a termínu setí (2) na vybrané ukazatele – tvorba biomasy, zdravotní stav rostlin a sklizně a výnos. Předmětem této práce je posouzení vlivu zvolené odrůdy a technologie na podíl šedých semen ve sklizni nazývanou šedosemennost. Celkem bylo hodnoceno 8 „technologií“. Každá technologie byla založena na 10 odrůdách ve třech opakováních. Hodnocená plocha opakování byla dle šířky řádků 4,5 nebo 5 m<sup>2</sup>. Zvolené odrůdy a technologie jsou popsány v záhlaví tabulek 1, 2 a 3.

Technologie B: Jednalo se o pokus na 1 odrůdě s různým ošetřením fungicidy nebo fungicidy s morforegulačním účinkem. První pokus tohoto typu byl založen v roce 2021 na odrůdě Signal, v roce 2022 na odrůdě Olga. V pokusech byl hodnocen vliv ošetření na výšku porostu, zdravotní stav rostlin a sklizeň a výnos. Hodnocení zdravotního stavu rostlin bylo převzato z metodiky EPPO PP1/78(3) pro řepku olejku. S ohledem na nízký výskyt chorob, zvláště v roce 2022, bylo zařazeno hodnocení podílu šedých semen ve sklizni. V roce 2021 byly hodnoceny 4 ošetření, v roce 2022 10 ošetření k neošetřené kontrole ve čtyřech opakováních. Velikost hodnocené plochy byla 10,3 m<sup>2</sup>, šířka řádků 12,5 cm. Cílem pokusu nebylo posoudit účinnost konkrétních přípravků, ale nastavit vypovídací metodu hodnocení zdravotního stavu v případě nízkého napadení hořčice bílé původci chorob. Princip zvolených ošetření je uveden v tabulce 4.

Hodnocení podílu šedých semen: Na 1 opakování bylo hodnoceno 100 semen. Semena byla odečítána na čítači semen. Následně byl pod stojánkovou lupou proveden oční odečet šedých semen.

Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit program UPAV GEP a EXCEL.

### **Výsledky a diskuse**

Mezi sledovanými odrůdami a technologiemi byly zaznamenány rozdíly ve výskytu šedých semen. K náchylným odrůdám k šedosemennosti patřily odrůdy Chacha a Warta. Ty byly do testu zařazeny jako kontrastní odrůdy k odrůdám pěstovaným v ČR. V tabulce 1 s průměrnými výsledky z let 2020 až 2022 není uvedené tolik zřejmé. Proto byly do přehledu výsledků zařazeny ročníky 2019 a 2021 (tabulky 2 a 3). Výsledky ročníku 2019 dokumentují citlivost hořčice bílé na déšť a vlhko v období zrání. V případě technologie v 2. termínu setí u výsevku 500 semen na parcelu a řádků 25 cm byl zaznamenány nejvyšší podíly šedých semen. Výsledek



ovlivnilo ohniskově zamokřená půda v místě založení této technologie. V době setí nebyla tato skutečnost zřetelná. Výsledky z roku 2019 nebyly z tohoto důvodu zahrnuty do průměru let 2020-2022 a jsou uvedeny samostatně v tabulce 2. Samostatně je uveden také ročník 2021, kdy byly výskyty šedých semen vyšší (tabulka 3). Uvedené je viditelné zvláště u 2. termínu setí. V rámci pokusu technologie A se průměr výskytů šedých semen z let 2020 až 2022 pohyboval mezi 8 až 28 %.

U technologie B s fungicidním ošetřením byl v roce 2021 podíl šedých semen poměrně vyrovnaný mezi 28 až 36 %. Rozdíly mezi variantami nebyly signifikantní. Podíl šedých semen v roce 2022 se pohyboval mezi 4,50 až 11,25 %. Rozdíly ošetřených variant k neošetřené kontrole byly v tomto pokusu signifikantní při hladině průkaznosti 99 %.

Při zvažování vhodnosti zařazení hodnocení podílu šedých semen do metodiky hodnocení účinnosti fungicidních přípravků do hořčice bílé může sehrát negativní roli fakt, že není determinován jeden původce šedých/naplesnivělých semen. Jedná se o více patogenů.

**Tabulka 1: Výsledky podílu šedých semen (%) ve sklizni 2020 - 2022**

Varianta	500 semen, 12,5 cm, termín setí A	660 semen, 12,5 cm, termín setí A	500 semen, 25 cm, termín setí A	660 semen, 25 cm, termín setí A	Průměr termín setí A	500 semen, 12,5 cm, termín setí B	660 semen, 12,5 cm, termín setí B	500 semen, 25 cm, termín setí B	660 semen, 25 cm, termín setí B	Průměr termín setí B
<b>Agent</b>	10	8	12	12	<b>10,3</b>	13	13	14	11	<b>12,8</b>
<b>Andromeda</b>	16	15	15	18	<b>16,1</b>	14	11	15	14	<b>13,6</b>
<b>Chacha</b>	16	18	16	16	<b>16,4</b>	28	22	23	22	<b>23,8</b>
<b>Polárka</b>	14	15	15	16	<b>14,9</b>	13	10	15	14	<b>13,0</b>
<b>Severka</b>	15	15	15	15	<b>14,9</b>	11	12	11	13	<b>11,5</b>
<b>Veronika</b>	16	16	15	16	<b>15,7</b>	15	13	14	12	<b>13,6</b>
<b>Warta</b>	19	15	17	19	<b>17,8</b>	23	23	23	24	<b>23,3</b>
<b>Zlata</b>	18	18	16	18	<b>17,4</b>	19	18	18	15	<b>17,8</b>
<b>Otava</b>	15	17	15	17	<b>15,8</b>	15	15	13	15	<b>14,4</b>
<b>Olga</b>	17	16	15	16	<b>16,1</b>	12	15	15	14	<b>13,9</b>
<b>Průměr na technologii</b>	<b>15,6</b>	<b>15,2</b>	<b>15,0</b>	<b>16,4</b>	<b>15,6</b>	<b>16,3</b>	<b>15,3</b>	<b>16,1</b>	<b>15,4</b>	<b>15,8</b>

Tabulka 2: Výsledky podílu šedých semen (%) ve sklizni 2019

Varianta	500 semen, 12,5 cm, termín setí A	660 semen, 12,5 cm, termín setí A	500 semen, 25 cm, termín setí A	660 semen, 25 cm, termín setí A	Průměr termín setí A	500 semen, 12,5 cm, termín setí B	660 semen, 12,5 cm, termín setí B	500 semen, 25 cm, termín setí B	660 semen, 25 cm, termín setí B	Průměr termín setí B
Agent	3	8	6	16	<b>8,3</b>	5	3	45	14	<b>16,8</b>
Andromeda	5	8	7	13	<b>8,3</b>	6	3	68	15	<b>23,0</b>
Chacha	10	13	11	20	<b>13,5</b>	38	37	66	70	<b>52,8</b>
Polárka	4	7	8	15	<b>8,5</b>	4	2	25	11	<b>10,5</b>
Severka	4	7	6	11	<b>7,0</b>	3	2	48	17	<b>17,5</b>
Veronika	4	8	8	12	<b>8,0</b>	5	3	49	24	<b>20,3</b>
Warta	5	13	13	20	<b>12,8</b>	35	71	97	96	<b>74,8</b>
Zlata	3	7	8	14	<b>8,0</b>	5	3	46	19	<b>18,3</b>
Otava	3	7	7	21	<b>9,5</b>	5	3	51	15	<b>18,5</b>
Olga	3	5	6	13	<b>6,8</b>	4	2	32	16	<b>13,5</b>
Průměr na technologii	<b>4,4</b>	<b>8,3</b>	<b>8,0</b>	<b>15,5</b>	<b>9,1</b>	<b>11,0</b>	<b>12,9</b>	<b>52,7</b>	<b>29,7</b>	<b>26,6</b>

Tabulka 3: Výsledky podílu šedých semen (%) ve sklizni 2021

Varianta	500 semen, 12,5 cm, termín setí A	660 semen, 12,5 cm, termín setí A	500 semen, 25 cm, termín setí A	660 semen, 25 cm, termín setí A	Průměr termín setí A	500 semen, 12,5 cm, termín setí B	660 semen, 12,5 cm, termín setí B	500 semen, 25 cm, termín setí B	660 semen, 25 cm, termín setí B	Průměr termín setí B
Agent	13	8	13	12	<b>11,5</b>	20	22	23	16	<b>20,3</b>
Andromeda	25	28	27	35	<b>28,8</b>	22	20	26	26	<b>23,5</b>
Chacha	17	26	19	32	<b>23,5</b>	47	44	36	42	<b>42,3</b>
Polárka	22	26	25	31	<b>26,0</b>	19	15	27	27	<b>22,0</b>
Severka	28	31	31	31	<b>30,3</b>	19	19	17	24	<b>19,8</b>
Veronika	21	35	27	34	<b>29,3</b>	23	22	23	20	<b>22,0</b>
Warta	33	25	28	35	<b>30,3</b>	34	49	41	49	<b>43,3</b>
Zlata	31	36	29	35	<b>32,8</b>	30	38	26	26	<b>30,0</b>
Otava	28	35	27	36	<b>31,5</b>	22	29	17	31	<b>24,8</b>
Olga	34	31	28	32	<b>31,3</b>	19	30	22	26	<b>24,3</b>
Průměr na technologii	<b>25,2</b>	<b>28,1</b>	<b>25,4</b>	<b>31,3</b>	<b>27,5</b>	<b>25,5</b>	<b>28,8</b>	<b>25,8</b>	<b>28,7</b>	<b>27,2</b>

**Tabulka 4: Vliv fungicidního ošetření na podíl šedých semen (%) ve sklizni, rok 2022**

Číslo varianty	Popis varianty	Termín ošetření	Podíl šedých semen	Účinnost ošetření	Tukey test (99 %)
1	Neošetřená kontrola	-	11,25	0,00	A
2	Fungicidně morforegulační ošetření	55	5,50	51,11	B
3	Fungicidně morforegulační ošetření	55	5,00	55,56	B
4	Fungicidně morforegulační ošetření Fungicid	55 65	4,50	60,00	B
5	Fungicidně morforegulační ošetření fungicid	55 65	4,75	57,78	B
6	Fungicidně regulační ošetření	55	5,00	55,56	B
7	Fungicidně regulační ošetření	55	4,75	57,78	B
8	Fungicid	55	5,75	48,89	B
9	Fungicid	65	4,25	62,22	B
10	Fungicid	65	5,50	51,11	B
11	Fungicidně morfoegulační ošetření	55	5,50	51,11	B

**Závěr**

Šedosemennost, způsobená řadou patogenů, běžně postihuje produkci semen, která nebyla ošetřena v průběhu vegetace fungicidem. I v suchých letech a na lokalitách, které rozvoj patogena nepodporují, byl zaznamenán výskyt vyšší než 5 %. Díky tomu lze konstatovat, že zařazení hodnocení podílu šedých semen ve sklizni hořčice bílé do testů hodnocení účinnosti fungicidů by bylo, z pohledu komplexnosti, perspektivní. V našich testech však nebyly determinovány konkrétní patogeny, způsobující projevy šedosemennosti. Je proto vhodné ověřit, zda existuje požadavek autority, v tomto případě ÚKZÚZ, na determinaci původců šedých semen, aby bylo možné akceptovat toto hodnocení jako součást standardního hodnocení účinnosti fungicidních přípravků na ochranu rostlin.

### **Literatura**

[Výstupní objekt VDB \(czso.cz\)](http://czso.cz), 19. 10. 2022

[Výstupní objekt VDB \(czso.cz\)](http://czso.cz), 19. 10. 2022

Baranyk P. a kol., 2010: Olejniny. Hořčice bílá a sareptská. Profi Press. 2010.s. 206, s. 63-80. EPPO, PP 1/78(3). Root, stem, foliar and pod diseases of rape. Efficacy evaluation of fungicides. EPPO Bulletin 33. 25-32.

ÚKZÚZ, Národní odrůdový úřad. 2021: Seznam doporučených odrůd olejnin. ÚKZÚZ, Národní odrůdový úřad, Brno 2021.

### **Poděkování**

Výsledky byly získány za finanční podpory projektu MZe, NAZV QK1910225 a dotační podpory MZe ČR č. 206553/2011-17253 pro "Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity".

### **Kontaktní adresa:**

Eva Plachká, Ing., Ph.D.

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Provozovna Opava, Purkyňova 1653/10, Opava, 746 01

553 624 160, [plachka@oseva.cz](mailto:plachka@oseva.cz)

## Výsledky herbicidních pokusů s lesknicí kanárskou

Results of herbicide trials with *Phalaris canariensis* (L.)

Smejkalová H., Kubíková Z., Langová M.

Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Troubsko

### Abstrakt

Pěstování lesknice kanárské je soustředěno na produkci semen. Produkci semen často negativně ovlivňuje zaplevelení pozemku. V současné době je k ošetření lesknice proti plevelům v České republice povolen pouze jediný herbicidní přípravek. Za účelem rozšíření spektra přípravků vhodných k ošetření lesknice byl začátkem roku 2022 založen herbicidní nádobový pokus. Bylo vybráno 5 účinných látek k postemergentní aplikaci: *MCPB*, *nikosulfuron*, *chlortoluron*, *pyridát* a *mesotrion*. Byla sledována celková fytotoxicita, výška a hmotnost nadzemní hmoty. Účinné látky *MCPB* (1 N 1200 g/ha), *chlortoluron* (1 N 1500 g/ha) a *pyridát* (1 N 900 g/ha) vykazovaly k lesknici dobrou selektivitu (do 13,3 %). Zvýšená fytotoxicita až silná fytotoxicita se projevila při aplikaci dvojitě dávky u všech testovaných účinných látek kromě *MCPB*. K nejvyšší redukci výšky a váhy došlo u rostlin ošetřených účinnou látkou *nikosulfuron*.

**Klíčová slova:** chrastice, fytotoxicita, biomasa, průměrná výška

### Abstract

The cultivation of annual canarygrass is focused on the production of seeds. Seed production is often negatively affected by weeds. Currently, only one herbicide is registered for the canarygrass treatment in the Czech Republic. To widen the herbicide spectrum for canarygrass, a herbicide container experiment was conducted at the beginning of 2022. Five active substances were selected for post-emergence application: *MCPB*, *nicosulfuron*, *chlortoluron*, *pyridate*, and *mesotrione*. Total phytotoxicity, height, and weight of above-ground biomass were evaluated. The active substances *MCPB* (1 N 1200 g/ha), *chlortoluron* (1 N 1500 g/ha), and *pyridate* (1 N 900 g/ha) showed good selectivity (up to 13.3%) to the canarygrass. Double doses of all tested herbicides except *MCPB* caused high crop injury. The most height and weight reduction occurred in plants treated with the active substance *nicosulfuron*.

**Key words:** annual canarygrass, crop injury, biomass, average height

### Úvod

Lesknice kanárská (*Phalaris canariensis* L.) je jednoletá plodina pěstovaná primárně za účelem produkce semen, která se využívají jako součást krmných směsí pro exotické ptactvo.

Jedná se o teplomilnou plodinu. V České republice lze lesknici pěstovat v kukuřičné a řepářské VO. Kromě semenářského využití lze lesknici pěstovat pro produkci pícní trávy buď samostatně nebo v kombinaci s jinými jednoletými druhy pícnin. Vzhledem k mělkému kořenovému systému umístíme lesknici na půdy těžší, dobře zásobené vláhou. Semenné porosty je vhodné zakládat v brzkých jarních termínech do poloviny dubna, vegetační doba se pohybuje v rozmezí od 80 do 120 dní. K hmyzím škůdcům a chorobám je poměrně odolná. Z hmyzích škůdců napadají lesknici kanárskou především kohoutci, které lze dobře eliminovat povolenými přípravky Decis Forte nebo Mospilan Mizu 120 Sl. Výraznějším problémem v lesknici mohou být plevely, které nejsou dostatečně potlačeny vlivem pomalého počátečního vývoje plodiny. Zvláště v semenných porostech tak mohou způsobit ekonomické ztráty.

Roční světová produkce semen byla pro rok 2018 232 679 t. Z toho 183 649 t bylo vyprodukováno v Americe, v EU pouze 6 718 t. Největším producentem lesknice bylo Kanada s 157 600 t za rok 2018 (FAOSTAT, 2022). Zde jsou pro ošetření lesknice registrovány následující účinné látky: *bromoxynil*, *MCPA*, *dikamba*, *mekoprop*, *fluroxypyr* nebo *clopyralid* (Guide to crop protection, 2022).

V České republice je lesknice společně s prosem, čirokem nebo pohankou řazena mezi minoritní obiloviny, celková pěstební plocha všech minoritních obilnin byla v roce 2020 6,9 tisíc ha (Situační a výhledová zpráva obiloviny, 2021) a za rok 2018 produkce semen 810 t (FAOSTAT, 2022). I tato skutečnost přispívá k omezeným možnostem herbicidního ošetření lesknice v ČR, aktuálně je možné porost ošetřit jediným herbicidním přípravkem, Mustang s účinnými látkami 2,4-D a *florasulam* (Registr přípravků na ochranu rostlin, 2022). Jedná se o kombinaci dvou účinných látek (*florasulam* 6,25 g/l a 2,4-D 300 g/l). Použití přípravku je postemergentní, ideálně od třetího vyvinutého listu do fáze sloupkování – vytvoření druhého kolénka (BBCH 13–32). K citlivým plevelům k přípravku Mustang se řadí plevele heřmánkovité a brukvovité, svízel přitula, ptačinec žabinec, mák vlčí, laskavce, pcháč oset, chrpa modrák, pohanka svlačcovitá, rdesno blešník, úhorník mnohodílný, merlíky, ostrožka polní nebo výdrol slunečnice. Situace ve světě je obdobná např. v Argentině s roční produkcí semen 41 137 t. Jsou zde povoleny k ošetření porostů pouze 2 účinné látky: 2,4-D a *dikamba* (Senasa Registro nacional de terapéutica vegetal, 2022).

V rámci inovace prvků integrované ochrany píce a minoritních plodin byly testovány vybrané herbicidní přípravky v nádobovém pokusu s lesknicí kanárskou s cílem povolení rozšířeného použití přípravků na menšinová použití.

### **Materiál a metody**

V Zemědělském výzkumu spol. s r. o. Troubsko byl založen nádobový pokus s cílem zjistit fytotoxicitu vybraných herbicidních přípravků k lesknicí kanárské. Semena lesknice kanárské odrůdy Judita byla vyseta do kontejnerů o průměru 12 cm. Celkem bylo zkoušeno 5 účinných látek (*MCPB*, *nikosulfuron*, *chlortoluron*, *pyridát* a *mesotrion*) se spektrem účinku na dvouděložné plevele. Přípravky byly aplikovány vždy ve třech koncentracích. Koncentrace byly zvoleny 0,5 N (poloviční aplikační dávka využívaná k hubení plevelů), 1 N (běžná aplikační dávka přípravku) a 2 N (dvojnásobná aplikační dávka přípravku). Aplikace proběhla ve třech opakováních, termín byl postemergentní, v růstové fázi lesknice 2–3 vyvinutých listů (BBCH 12–13). Do pokusu byla zahrnuta i neošetřená kontrola. Nádoby byly umístěny do skleníku s fotoperiodou 16h světlo/8 h tma a průměrnou teplotou 20 °C. Seznam testovaných variant uvádí Tabulka 1.

Hodnocení fytotoxicity účinných látek k lesknicí bylo provedeno ve třech termínech (T1 = 7 dní od aplikace, T2 = 14 dní od aplikace a T3 = 21 dní od aplikace). Poškození rostlin bylo hodnoceno vizuálně, ošetřené rostliny byly srovnávány s neošetřenou kontrolou. Celková fytotoxicita je uvedena v % na stupnici 0–100 a rozdělena podle stupně poškození do 4 kategorií:

Nad 45 % poškození = silná fytotoxicita

31–45 % poškození = zvýšená fytotoxicita

21–30 % poškození = uspokojivá selektivita

0–20 % poškození = dobrá selektivita

Přípravky způsobující poškození rostlin 0–20 % jsou vyhodnoceny jako perspektivní k ochraně lesknice kanárské.

V termínu T3 byl kromě fytotoxicity hodnocen také vliv použitých přípravků na hmotnost a výšku rostlin. Hmotnost byla zvážena u 5 náhodných rostlin v čerstvém stavu, hodnocena byla pouze nadzemní část biomasy. Váha byla přepočtena na průměrnou váhu 1 rostliny v g.

Ošetřené varianty byly srovnány s neošetřenou kontrolou. Vliv postřiku na výšku biomasy byl hodnocen u 5 rostlin v květináči. Výška byla změřena v cm. Průměrná výška rostlin ošetřených herbicidními přípravky byla srovnána s neošetřenou kontrolou.

Pro zjištění statisticky průkazných rozdílů mezi ošetřenými variantami a neošetřenou kontrolou byla získaná data statisticky zhodnocena v programu Statistica 12 pomocí Tukeyho testu při  $\alpha=0,05$  zvláště pro jednotlivé termíny hodnocení fytotoxicity a pro hmotnost a výšku rostlin.

Tabulka 5: Zkoušené herbicidní přípravky do lesknice kanárské

Přípravek	Účinná látka	Aplikační dávka přípravku	
<b>Butoxone 400</b>	<i>MCPB</i> 400 g/l	0,5 N	1,5 l/ha
		1 N	3 l/ha
		2 N	6 l/ha
<b>Accent 75 WG</b>	<i>nikosulfuron</i> 750 g/kg	0,5 N	25 g/ha
		1 N	50 g/ha
		2 N	100 g/ha
<b>Lentipur Flo 500 SC</b>	<i>chlortoluron</i> 500 g/l	0,5 N	1,5 l/ha
		1 N	3 l/ha
		2 N	6 l/ha
<b>Onyx</b>	<i>pyridát</i> 600 g/l	0,5 N	0,75 l/ha
		1 N	1,5 l/ha
		2 N	3 l/ha
<b>Callisto 480 SC</b>	<i>mesotrion</i> 480 g/l	0,5 N	0,15 l/ha
		1 N	0,3 l/ha
		2 N	0,6 l/ha

## Výsledky

### Fytotoxicita testovaných přípravků

Přípravek Butoxone 400 s účinnou látkou *MCPB* 400 g/l je v dávce 3 l/ha registrován do hrachu a kmínu. V dávce 0,5 N (1,5 l/ha) i 1 N (3 l/ha) měl k lesknici dobrou selektivitu. Počáteční lehká fytotoxicita (1,7 – 8 %) se v termínu T3 snížila na 0–3,3 %. V případě dvojité dávky 6 l/ha došlo též k lehkému poškození rostlin, avšak fytotoxicita přípravku nepřesáhla 20 %.

Dobrou selektivitu k lesknici měl přípravek Accent 75 WG s účinnou látkou *nikosulfuron* 750 g/kg pouze v koncentraci 0,5 N (25 g/ha). V dávce 1 N (50 g, registrováno do kukuřice) způsobil na lesknici silnou fytotoxicitu v T3 51,7 %. U dávky 2 N se objevilo poškození rostlin v rozsahu 76,7 %.

Lentipur Flo 500 SC s účinnou látkou *chlortoluron* je vhodný k ochraně porostu také před chundelkou metlicí. V námi zkoušené dávce 3 l/ha je registrován do ozimé pšenice a ječmene. V dávce 1,5 l/ha a 3 l/ha má k lesknici dobrou selektivitu, poškození rostlin v termínu T3 bylo do 13,3 %. Ve dvojité dávce přípravku 6 l/ha způsobil silnou fytotoxicitu až 65 % v termínu T2, v termínu T3 došlo k mírnému poklesu fytotoxicity na 63,3 %.

Dalším testovaným přípravkem byl Onyx s účinnou látkou *pyridát*. Ten je registrovaný do kukuřice v aplikační dávce 1,5 l/ha. Prvotní poškození rostlin odečtené v termínu T1 při dávce 0,75 l/ha a 1,5 l/ha bylo 10–15 %. Fytotoxicita postupně klesala a v termínu T3 byly rostliny poškozeny pouze z 1,7–6,7 %. Zatímco dávky 0,5 N a 1 N měly k lesknici dobrou selektivitu, dávka 2 N 3 l/ha způsobil zvýšenou fytotoxicitu. Poškození týden po postřiku bylo 56,7 %, tři týdny po postřiku kleslo poškození rostlin na 35 %.

Posledním testovaným přípravkem bylo Callisto 480 SC s účinnou látkou *mesotrion*. V dávce 0,3 l/ha je registrováno do kukuřice. Při použití poloviční dávky 0,15 l/ha došlo k poškození

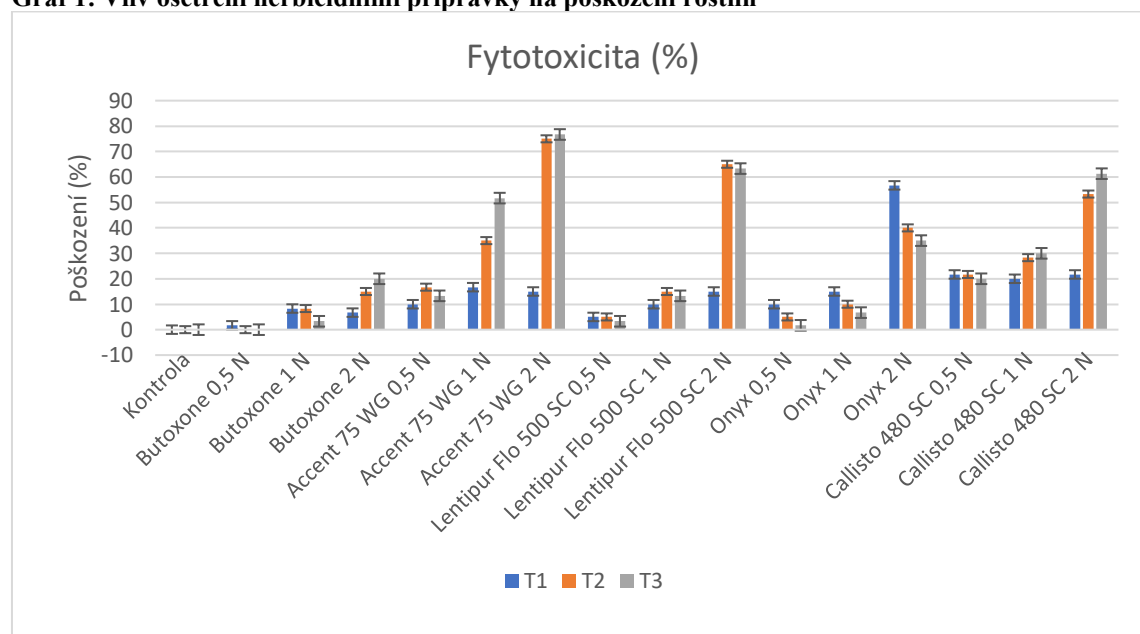
rostlin 20 % v posledním termínu hodnocení. Výsledky prvních dvou termínů hodnocení ale zařazují přípravek spíše do kategorie s uspokojivou selektivitou (poškození 21,7 %), kam lze zařadit i výsledky pro koncentraci 1 N. Při ní došlo k poškození rostlin v průběhu pokusu v rozsahu od 20 do 30 %. Vyšší koncentrace už způsobila vysokou fytotoxicitu až 61,3 %. Fytotoxicita ve všech termínech hodnocení pro všechny použité koncentrace je graficky znázorněna v Grafu 1. Statistické vyhodnocení průkazných rozdílů ve fytotoxicitě je uvedeno v Tabulce č. 2. Statistická data byla získána pomocí Tukeyho testu při  $\alpha=0,05$ .

Tabulka 6: Vyhodnocení fytotoxicity zkoušených herbicidů k lesknici kanárské

Přípravek	Koncentrace	T1		T2		T3	
		Fytox (%)	Tukey $\alpha=0,05$	Fytox (%)	Tukey $\alpha=0,05$	Fytox (%)	Tukey $\alpha=0,05$
<b>Kontrola</b>	-	0	a	0	a	0	a
<b>Butoxone 400</b>	0,5 N	1,7	ab	0	a	0	a
	1 N	8,3	abcd	8,3	bc	3,3	ab
	2 N	6,7	abc	15	cde	20	cd
<b>Accent 75 WG</b>	0,5 N	10	bcd	16,7	de	13,3	bc
	1 N	16,7	de	35	gh	51,7	f
	2 N	15	cde	75	k	76,7	h
<b>Lentipur Flo 500 SC</b>	0,5 N	5	ab	5	ab	3,3	ab
	1 N	10	bcd	15	cde	13,3	bc
	2 N	15	cde	65	j	63,3	g
<b>Onyx</b>	0,5 N	10	bcd	5	ab	1,7	a
	1 N	15	cde	10	bcd	6,7	ab
	2 N	56,7	f	40	h	35	e
<b>Callisto 480 SC</b>	0,5 N	21,7	e	21,7	ef	20	cd
	1 N	20	e	28,3	fg	30	de
	2 N	21,7	e	53,3	i	61,3	fg

\* nad 45 % poškození = silná fytotoxicita, 31 – 45 % poškození = zvýšená fytotoxicita, 21 – 30 % poškození = uspokojivá selektivita, 0 – 20 % poškození = dobrá selektivita

Graf 1: Vliv ošetření herbicidními přípravky na poškození rostlin



Pozn.: Zobrazeny jsou průměrné hodnoty ( $n=3$ ) jednotlivých variant a dávek přípravků  $\pm$  SD.



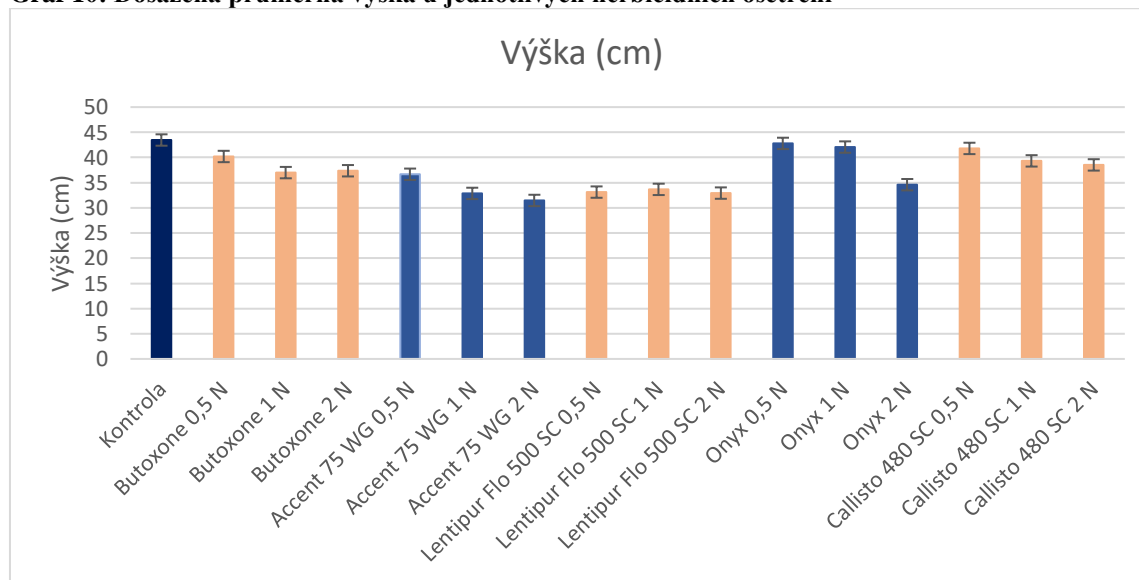
### Výška a hmotnost

Průměrná výška rostlin na neošetřené kontrole byla ve třetím týdnu hodnocení 43,47 cm. Na ošetřených variantách docházelo k redukci výšky, u žádné z ošetřených variant nedošlo k nárůstu výšky oproti neošetřené kontrole. Mezi variantami ošetřenými Butoxone 400 0,5 N, Onyxem 0,5 N a 1 N a Callistem 480 SC ve všech třech koncentracích nebyl statisticky průkazný rozdíl ve výšce oproti neošetřené kontrole. Ošetřené rostliny dosahovaly od 89 do 98 % výšky kontrolních rostlin. Nejnižší výšky dosahovaly rostliny ošetřené přípravky Accent 75 WG a Lentipur Flo 500 SC. U přípravku Accent 75 WG byla průměrná výška rostlin 31,47–36,67 cm, což představuje snížení výšky oproti neošetřené kontrole o 16 až 28 %. U přípravku Lentipur Flo 500 SC došlo ke snížení výšky o 23 až 24 %.

Průměrná váha jedné rostliny u kontrolní varianty byla ve třetím termínu hodnocení 0,715 g. U ostatních variant došlo ke snížení průměrné hmotnosti. Nejvyšší redukce váhy byla zjištěna u rostlin s nejvyšším poškozením, kde docházelo k zasychání nadzemní části. Statisticky průkazný rozdíl v redukci váhy oproti neošetřené kontrole byl zjištěn u variant ošetřených Accentem 75 WG 1 N a 2 N, Lentipurem Flo 500 SC 1 N a 2 N, Onyxem 2 N a Callistem 480 SC. 2 N. Kromě varianty Lentipur Flo 500 SC 1 N šlo o varianty s fyto toxicitou vyšší než 35 %. Rostliny dosahovaly o 48 až 80 % nižší váhy oproti kontrolní variantě.

Rozdíly ve výškách a hmotnostech jsou znázorněny v Grafu 2 a 3. Souhrn výsledků hmotností a výšek včetně statistického vyhodnocení a dosažené výšky a hmotnosti ve vztahu ke kontrolní variantě v % je uveden v Tabulce č. 3.

**Graf 10: Dosažená průměrná výška u jednotlivých herbicidních ošetření**

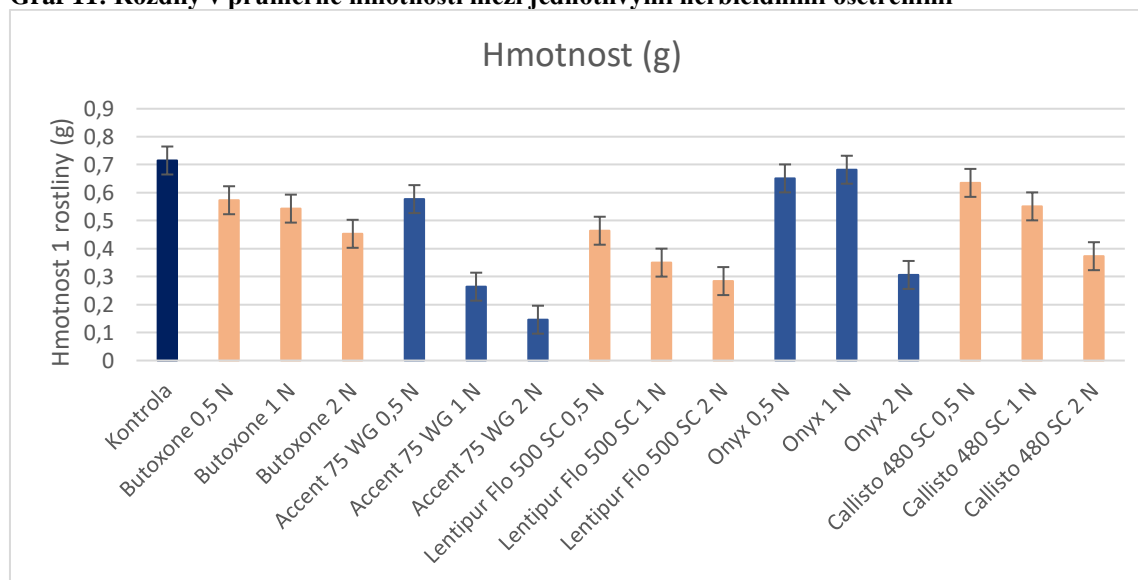


Pozn.: Zobrazeny jsou průměrné hodnoty (n=3) jednotlivých variant a dávek přípravků ± SD.

Tabulka 7: Vyhodnocení váhy a výšky rostlin ošetřených vybranými herbicidy

Přípravek	Koncentrace	Výška			Hmotnost		
		Výška (cm)	Tukey $\alpha=0,05$	% kontroly	Hmotnost (g)	Tukey $\alpha=0,05$	% kontroly
<b>Kontrola</b>	-	43,47	g	100	0,715	f	100
<b>Butoxone 400</b>	0,5 N	40,2	defg	92	0,573	def	80
	1 N	37	abcdef	85	0,543	cdef	76
	2 N	37,37	abcdef	86	0,453	bcdef	63
<b>Accent 75 WG</b>	0,5 N	36,67	abcde	84	0,577	def	81
	1 N	32,87	ab	76	0,264	ab	37
	2 N	31,47	a	72	0,146	a	20
<b>Lentipur Flo 500 SC</b>	0,5 N	33,13	ab	76	0,464	bcdef	65
	1 N	33,67	abc	77	0,35	abcd	49
	2 N	32,93	ab	76	0,284	abc	40
<b>Onyx</b>	0,5 N	42,8	fg	98	0,651	f	91
	1 N	42,07	efg	97	0,682	f	95
	2 N	34,6	abcd	80	0,306	abcd	43
<b>Callisto 480 SC</b>	0,5 N	41,8	efg	96	0,635	ef	89
	1 N	39,33	cdefg	90	0,551	cdef	77
	2 N	38,53	bcdefg	89	0,373	abcde	52

Graf 11: Rozdíly v průměrné hmotnosti mezi jednotlivými herbicidními ošetřeními



Pozn.: Zobrazeny jsou průměrné hodnoty ( $n=3$ ) jednotlivých variant a dávek přípravků  $\pm$  SD.

## Diskuze

Za účelem zisku kvalitního osiva lesknice je často nezbytná chemická regulace plevelů. Lesknice se vyznačuje malou konkurenceschopností k plevelům, která je dána pomalým vývojem od vzcházení po stádium odnožování (Putman et al., 1996). Účinné látky MCPA, difenzoquat, clopyralid, florasulam a fluroxypyr zkoušel ve své práci kolektiv autorů May (2014). Proti jednoděložným plevelům v porostech lesknice zkoušeli Cogliatti et al. (2011) účinné látky difenzoquat a triallate a Smejkalová a Kubíková (2022) propaquizafop, pinoxaden, fenoxaprop, cycloxydim a rimsulfuron. V této práci jsme se zaměřily na účinné látky MCPB, nikosulfuron, chlortoluron, pyridát a mesotrion.

Účinná látka *MCPB* obsažená v přípravku Butoxone 400 je v dávce 3 l/ha registrována do hrachu a kmínu, v dávce 2 – 2,5 l/ha pak do jetelů. Podobná je z hlediska účinku účinná látka *MCPA*, která je do lesknice registrována v Kanadě. Ve svých pokusech s účinnou látkou *MCPA* pracuje také May et al. (2014), kde v kombinaci s dalšími účinnými látkami měla k lesknici dobrou selektivitu. Podobně jako *MCPA* v práci May et al. (2014) vykazovala účinná látka *MCPB*, kterou jsme zkoušely v naší práci, dobrou selektivitu k lesknici.

*Nicosulfuron* je vhodný k ošetření kukuřice proti jednoděložným plevelům. Ve své práci hodnotili jeho použití proti vybraným plevelům Dobbels a Kapusta (1993). Na rozdíl od kukuřice, na lesknici způsobuje *nicosulfuron* silnou fytotoxicitu. Se silnou fytotoxicitou byla spojena i redukce váhy a výšky rostlin. Vliv na biomasu u jílku zkoumali Chelotte et al. (2019). Podobně jako v našich pokusech záviselo snížení hmotnosti a výšky na dávce účinné látky. Při dávce *nicosulfuronu* vyšší než 6,3 g/ha došlo 4 týdny po aplikaci k redukci váhy u jílku o více než 65 %. U lesknice kanárské došlo v našem pokusu při aplikaci *nicosulfuronu* v dávce 3,75 g/ha o úbytek hmotnosti 63 % ve srovnání s neošetřenou kontrolou a při 7,5 g/ha o 80 % úbytku váhy. Cholette et al. (2019) uvádějí pro 25 % redukci biomasy u jílku dávku *nicosulfuronu* 1,3 až 1,8 g/ha a pro 50% redukci biomasy 3,9 až 5,4 g/ha. Redukce biomasy byla v naší práci s lesknici nižší. Při aplikaci 1,875 g *nicosulfuronu* na ha (0,5 N) snížila svou výšku o 16 %, při aplikaci 3,75 g/ha (1 N) o 24 %.

Účinná látka *chlortoluron* je registrována v přípravku Lentipur Flo 500 SC do ozimého žita, triticale, pšenice a ječmene. Pro pšenici a ječmen je uvedena aplikační dávka 3 l/ha (Registr přípravků na ochranu rostlin, 2022). V naší práci jsme jako 1 N dávku zvolily 3 l/ha. Při této dávce nedošlo k vážným projevům fytotoxicity, přípravek měl dobrou selektivitu k lesknici.

## Závěr

Lesknice kanárská velmi dobře snášela ošetření účinnými látkami *MCPB*, *chlortoluronem* a *pyridátem* v 1 N koncentracích. Bezpečná z hlediska poškození rostlin byla i aplikace *MCPB* ve dvojitě dávce (Butoxone 400 6 l/ha). U ostatních přípravků způsobila dvojitá dávka zvýšenou až vysokou fytotoxicitu. Jako nevhodná se k ošetření lesknice jeví účinná látka *nikosulfuron* obsažená v přípravku Accent 75 WG. Přípravek při dávce 50 g/ha způsobil vysokou fytotoxicitu a s ní související redukci výšky a váhy. Podobně účinná látka *mesotrion* obsažená v přípravku Callisto 480 SC při aplikaci dávky 0,3 a 0,6 l/ha způsobila zvýšenou až vysokou fytotoxicitu.

## Použitá literatura

- Cogliatti M., V. F., Juan F., Bongiorno H., Dalla Valle a W. J. Rogers. 2011. Control of grassy weeds in annual canarygrass. *Crop Protection*. 2011(30), 125-129. ISSN 0261-2194.
- Dobbels, A., & Kapusta, G. (1993). Postemergence Weed Control in Corn (*Zea mays*) with Nicosulfuron Combinations. *Weed Technology*, 7(4), 844-850. doi:10.1017/S0890037X00037866
- FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations [online]. 2022 [cit. 2022-10-14]. Dostupné z: <https://www.fao.org/faostat/en/#search/Canary%20seed>
- Guide to crop protection: For the chemical management of weeds, plant diseases and insects [online]. Saskatchewan: Saskatchewan Ministry of Agriculture, 2022 [cit. 2022-10-14].
- Cholette, T., Soltani, N., Hooker, D., Robinson, D., & Sikkema, P. (2019). Suppression of Annual Ryegrass in Corn with Nicosulfuron. *Weed Technology*, 33(1), 173-177. doi:10.1017/wet.2018.106
- May, W. E., Johnson, E. N., Sapsford, K. L., Stevenson, F. C., Lafond, G. P., Holzapfel, C. B. and Holm, F. A. 2014. *Tolerance of annual canarygrass (Phalaris canariensis L.) to*

- combinations of MCPA, clopyralid, fluroxypyr and florasulam*. Can. J. Plant Sci. 94: 701\_708.
- Putnam, D. H., Miller, P. R. and Hucl, P. 1996. *Potential for production and utilization of annual canarygrass*. CFW 41:75-83.
- Registr přípravků na ochranu rostlin* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2022 [cit. 2022-10-14]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/>
- Senasa Registro nacional de terapéutica vegetal* [online]. Buenos Aires: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria - Dirección de Tecnología de la Información, 2022 [cit. 2022-10-14]. Dostupné z: <https://aps2.senasa.gov.ar/vademecum/app/publico/formulados>
- Situační a výhledová zpráva*. [Praha]: Ministerstvo zemědělství České republiky, [2021]-. ISBN 978-80-7434-611-8. ISSN 1211-7692.
- Smejkalová H., Kubíková Z. 2022. Pěstování lesknice kanárské. *Agromanuál: Profesionální ochrana rostlin*. České Budějovice: Kurent s r. o., 17(5), 135-137. ISSN 1801-7673.

### **Dedikace**

Výsledek byl získán za podpory MZe ČR, institucionální podpora MZE-RO1718

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Smejkalová Hana  
Zemědělský výzkum spol. s r. o.  
Zahradní 1, Troubsko 66441  
[smejkalova@vupt.cz](mailto:smejkalova@vupt.cz)

## Biodiverzita škůdců a jejich přirozených nepřátel v luskovinoobilných směsích s podsevem jetele a vojtěšky

Biodiversity of legumes pests and their natural enemies in legumes–cereal intercropping with clover and alfalfa undersowing

Šafář J.<sup>1</sup>, Seidenglanz M.<sup>1</sup>, Gališová V.<sup>2</sup>, Plachká E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Agritec Plant Research, s.r.o.*

<sup>2</sup>*OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejnin Opava*

### Abstrakt

V letech 2020–2021 byly vedeny přesné polní pokusy směsek luskovin s obilovinou a podsevem jetele nebo vojtěšky. Takto byly založeny parcely o velikosti 60 m<sup>2</sup> ve čtyřech znáhodněných opakováních. Proběhlo hodnocení výnosu píce a zejména vztahů mezi klíčovými škůdci luskovin a jejich přirozenými nepřáteli. Dále byla zjištěna vysoká aktivita střevlíkovitých brouků ve směsích luskovin a obilovin, kde docházelo k rychlejšímu úbytku populací kyjatky hrachové, jež tyto predátory po dlouhou dobu vegetace drželi pod početností považovanou za nebezpečnou pro zdravotní stav porostu. Z hlediska víceletých porostů vojtěšky bylo vhodné zařadit monokulturu hrachu úponkového typu, jež byl atraktivnější pro zástupce listopasů než vojtěška samotná.

**Klíčová slova:** Carabidae, biodiverzita, luskovinoobilné směsky

### Abstract

In the years 2020–2021 were field trials of intercrop with legumes and cereals with clover or alfalfa undersowing were established. In this way, plots of 60 m<sup>2</sup> were established in four randomized replications. The aim was assessments forage yield, relationships between natural enemies and legume pests were studied. A high activity of ground beetles (Carabidae) was focused in mixtures of legumes and cereals, where there was a faster decline in the populations of the pea aphid, which for a long period of the growing season these populations were below the number considered as harmful. By establishing perennial alfalfa crop, it was appropriate to include a semi-leaf pea as monoculture, which was more attractive to pea leaf weevil than alfalfa.

**Keywords:** Carabidae, biodiversity, intercrops

### Úvod

Luskovino–obilní směsky (LOS) mají v zemědělství dlouhou tradici a jejich pozitivní přínos spočívá ve fixaci vzdušného dusíku, v produkci zrna luskovin a obilovin, jež dovedou z přítomnosti luskoviny těžit. V intenzivních konvenčních osevních postupech se LOS příliš nevyužívali nebo se užívali spíše pouze jako meziplodiny. Nedávné turbulentní změny v cenách průmyslových hnojiv, rajonizace marginálních zemědělských oblastí převodem na trvalé travní porosty, a to o nezanedbatelné rozloze v rámci ČR nabízí možnost četnějšího využívání LOS pro produkci krmiv a osiv i fixací vzdušného dusíku do půdy při obnově travních porostů. Některými výzkumy bylo také ověřeno, že z hlediska ochrany proti chorobám i škůdcům může být pěstování ve směsích velkým přínosem pro snížení tlaku chorob a škůdců (Boudreau and Mundt 1992, Jensen et al 2006, Ondráčková 2010). Rozvoj diverzity rostlin ve směsích vytváří prostředí pro růst populací užitečných predátorů (pestřenek, sluníček), kteří omezují šíření škůdců (Hauggaard–Nielsen and Andersen 2000, Seidenglanz 2011).

## Materiál a metody

Během let 2020 a 2021 byly založeny polní pokusy s 9ti variantami směsí (Tab. 1) a kontroly–samotného podsevu (var. 1). Takto byly vytvořeny dva totožné pokusy s podsevem vojtěšky v prvním případě a také s podsevem jetele lučního. Pokus byl veden v plně znáhodněných blocích ve čtyřech opakováních o velikosti jedné parcely (varianty v opakování) 60 m<sup>2</sup>. Plocha parcely byla stanovena s ohledem na dostatečnou plochu pro kolonizaci a rozvoj konkrétních populací škůdců a disperzalitu přirozených nepřátel vč. okřídlených druhů (střevlíkovitých brouků) ve vyhovujících směsích pokusu z hlediska trofické vazby. Velikost parcely byla dostatečná k hodnocení aktivity přirozených nepřátel v místě výskytu škůdců luskovin, jež byli zástupci listopasů (*Sitona* sp.) a mšic – kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776). Pro studium vztahů predátor vs. kořist byly sledovány tyto hodnotící znaky: počet výkusů na prvních dvou pravých listech způsobených dospělci listopasů a procentický úbytek listové plochy (hodnocen šablonou vytvořenou na milimetrovém papíře z velikostně totožných zdravých listů). Na každé parcele v opakování bylo takto hodnoceno dvacet rostlin náhodným výběrem úhlopříčně v parcelce, tzn. 40 listů na parcelu, resp. 160 ks listů na variantu, hodnocení proběhlo jednou za sezónu čtrnáct dnů po vzejití rostlin z fáze děložních listů. Vyhodnocení poškození dospělci listopasů bylo uskutečněno v programu Statistica 12, výpočtem průměrů s intervaly spolehlivosti (95 %) pro hodnocení preference uvnitř porostu mezi luskovinou (hrách, bob, peluška) a poškozením podsevu (jetel, vojtěška). Dalším sledovaným škůdcem byla kyjatka hrachová, jež byla v pravidelných intervalech (3–4 dnů) od prvních výskytů mšic sledována alespoň čtyři týdny do pádu početnosti jedinců v porostech. V každém týdnu docházelo (dvakrát) k odečtu počtu mšic na jednotlivých dvaceti rostlinách na parcelu u variant s podsevem vojtěšky i jetele. Z početností kyjatek v jednotlivých odběrech byl vypočítán průměr počtu jedinců. Přirození nepřátelé, konkrétně střevlíci (Carabidae) byli odchytávány pomocí 0,5 l PE kelímků zapuštěných po okraj do země. V každé parcele byla uprostřed umístěna jedna zemní past (pit fall traps) a střevlíkovití brouci byli určováni do druhů a početnosti s výběrem pastí dvakrát týdně.

Tab. 1: Navržené směsi monokultur luskovin a směsí s obilovinou. Varianty byly zopakovány jak s podsevem vojtěšky i s podsevem jetele lučního. Varianta číslo 1 byl samotný podsev.

Var.	Směs plodin	Odrůda	MKS	Výsevek kg/ha
2	hrách úponkový	Eso	0,5	120,4
3	ječmen j. + hrách úponkový	Sebastian + Eso	1,0 + 0,5	41,0+120,4
4	ječmen j.+ hrách listový	Sebastian + Protecta	1,0 + 0,5	41,0+115,4
5	hrách listový	Protecta	0,5	115,4
6	bob + hrách úponkový	Merkur + Eso	0,25 + 0,25	120,0+60
7	bob + peluška	Merkur + Arvika	0,25 + 0,25	120,0+25
8	Bob	Merkur	0,25	120,0
9	pšenice j.+ hrách úponkový	Izzy + Eso	1,0 + 0,5	51,3+120,4
10	pšenice j. + hrách listový	Izzy + Protecta	1,0 + 0,5	51,3+115,4

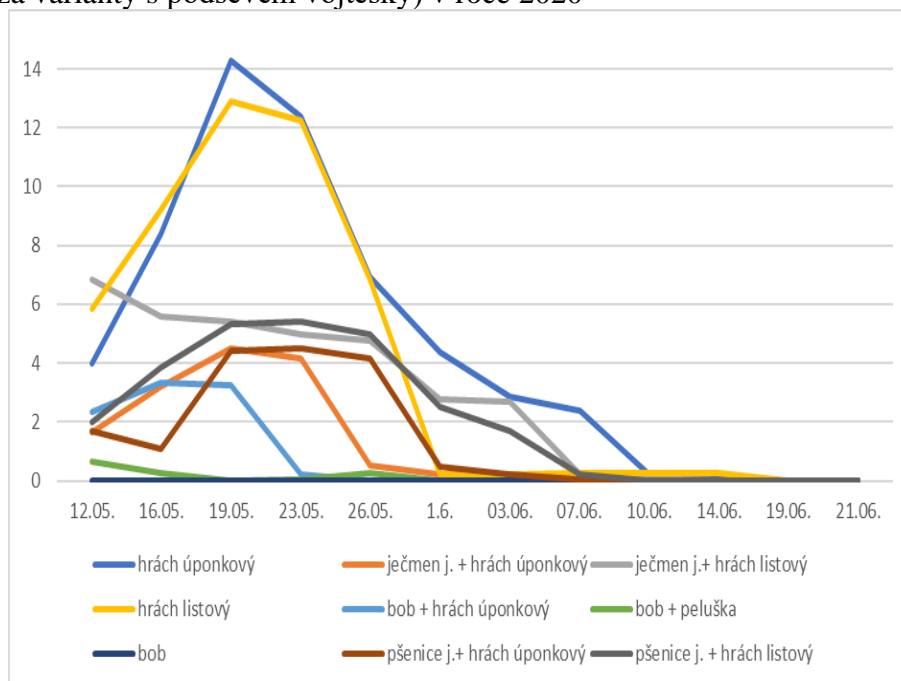
## Výsledky

V roce 2020–2021 byl v okolí města Šumperk za pomoci různě založených směsí luskovin (LOS, monokultura s podsevem vojtěšky nebo jetele) sledovány vztahy mezi přirozenými nepřáteli a škůdci luskovin z hlediska jejich četnosti, aktivity a poškozením plodin. Ze střevlíkovitých brouků bylo odchyceno za sledované sezóny 32 druhů. Eudominantním druhem byl střevlíček měděný (*Poecilus cupreus*, Linnaeus 1758), dále dominantními druhy jako *Pterostichus melanarius* (Illiger, 1798), *Pseudoophonus rufipes* (De Geer, 1774) a subdominantní *Harpalus affinis* (Schrank, 1781), *Harpalus atratus* (Latreille, 1804) a *Nebria brevicollis* (Fabricius, 1792).

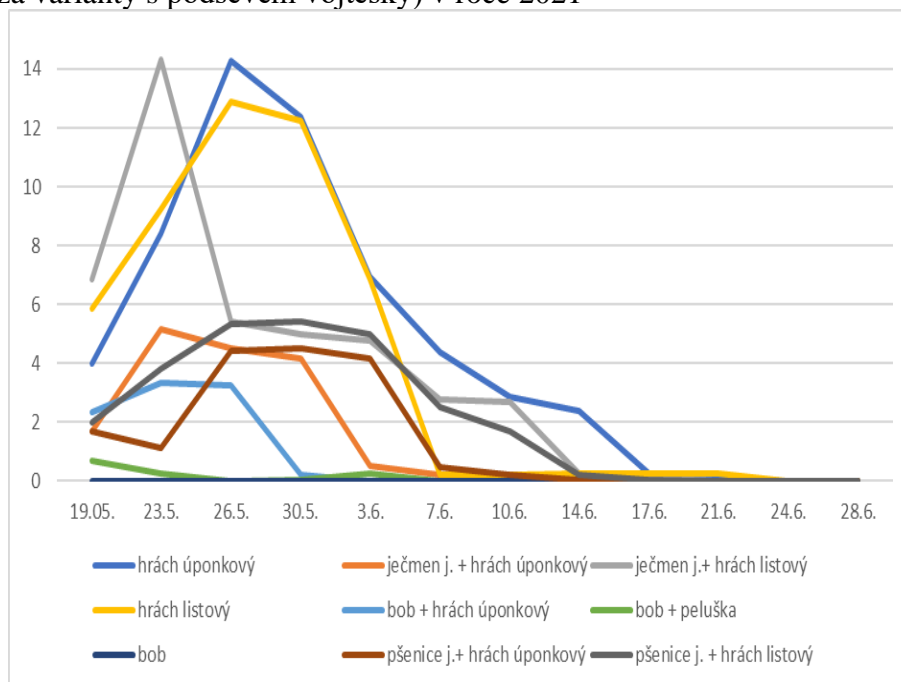
V jednotlivých letech docházelo k prudkému nárstu populací kyjatek v monokulturách hrachu bez ohledu na druh podsevové plodiny (Graf 1 a 2) a bez rozdílu na typ hrachu (listový; semi-leaf, tzn. úponkový). Ve směsích luskovin a obilovin (zejména s ječmenem jarním) docházelo k postupnému vzestupu populací kyjatek méně dramaticky, s výjimkou u směsi s bobem s převládající mšicí makovou (*Aphis fabae*) s prakticky nulovým výskytem kyjatek. Odlišnost také nastala v roce 2021, kdy v ječmeni jarním ve směsi s listovou formou hrachu byl silný výskyt kyjatek z důvodu příznivějšího mikroklima porostu (jarní ječmen tvořil mnoho odnoží a společně s listovou formou hrachu vykazoval v suchém období během jara vyšší pokrývnost půdy). Ve směsích luskovin s obilovinou docházelo k prudkému nárstu aktivity eudominantního druhu střevlíčka měděného *P. cupreus* pro něž jsou mšice potravou (Williams et al. 2010), což bezesporu zapříčinilo postupné snižování početnosti populací kyjatek, resp. tyto populace kyjatek nerostly v abundanci jedinců zdaleka tak prudce a rychle upadaly. Naprosto totožný průběh se odehrával u druhů *Pterostichus melanarius*, *Pseudoophonus rufipes*, *Harpalus affinis*, *Harpalus atratus*, *Nebria brevicollis* ve směsích hrachu a obilovin. Zmíněné druhy střevlíků jsou taktéž karnivorní ve vztahu k hmyzu (Williams et al. 2010). Ve stejném složení variant s podsevem jetele nedocházelo k tak prudkému nárstu početnosti *P. cupreus* (Graf 5 a 6) oproti aktivitě tohoto druhu v LOS s vojtěškou.

Co se týče hodnocení poškození vzházejících rostlin luskovin dospělci listopasů nebyly zjištěny příliš jednoznačně interpretovatelné výsledky u hodnocení počtu výkusů na prvních pravých listech (čtrnáct dní po vzejití rostlin). V grafu č. 4 jsou uvedeny výsledky procentického poškození listové plochy a v Grafu č. 3 jsou zobrazeny počty výkusů způsobených dospělci na listech s intervaly spolehlivosti za obě sezóny dohromady. Nejsou zobrazeny kontroly (var. 1 a 11), kde nelze hodnotit dopad na vztahy mezi škůdci a přirozenými nepřáteli u krycí plodiny. Tyto kontroly s vojtěškou a jetelem sloužily pouze pro zjištění aktivity střevlíků. Varianty v Grafu č. 3 a 4 jsou sloučeny z hlediska poškození vojtěšky var. 2–10 pro varianty s vojtěškou a totožné varianty označené čísly 12–20, což jsou chronologicky seřazeny identické varianty, jež se vztahují k luskovině (viz legenda u Grafu 3 a 4). Ze zkušenosti autorů na lokalitě převládá listopas čárkovaný (*S. lineatus*) a v omezenější míře l. zdobený (*S. macularius*), oba druhy škodí na zelených částech a jejich larvy na hlízkách jetele, vojtěšky, bobu, hrachu, pelušky a jiných bobovitých. Výsledky zmíněného designu pokusu přinesly statisticky významné rozdíly v nižší ztrátě listové plochy na vojtěšce, jež byla u směsi s úponkovou formou hrachu, a to zejména v monokultuře úponkového hrachu s podsevem vojtěšky, což bylo zapříčiněno atraktivitou úponkového hrachu ve směsích v podsevech vojtěšky. V případě luskovin, resp. LOS v podsevu s jetelem nebyly zjištěny rozdíly v počtu výkusů nebo ztrátě listové plochy způsobenou dospělci listopasů mezi jetelem a luskovinou. Poškození bylo více vyrovnané, kdy jetel ve směsích byl podstatně více poškozen a tedy atraktivní jako luskovina. Výnos píče jednotlivých variant vyšel statisticky nevýznamně mezi 19,5 až 39,8 zelené hmoty v t/ha.

Graf č. 1: Vývoj průměrného počtu kyjaty hrachové na rostlinách luskoviny (průměry jsou v podsevu za varianty s podsevem vojtěšky) v roce 2020

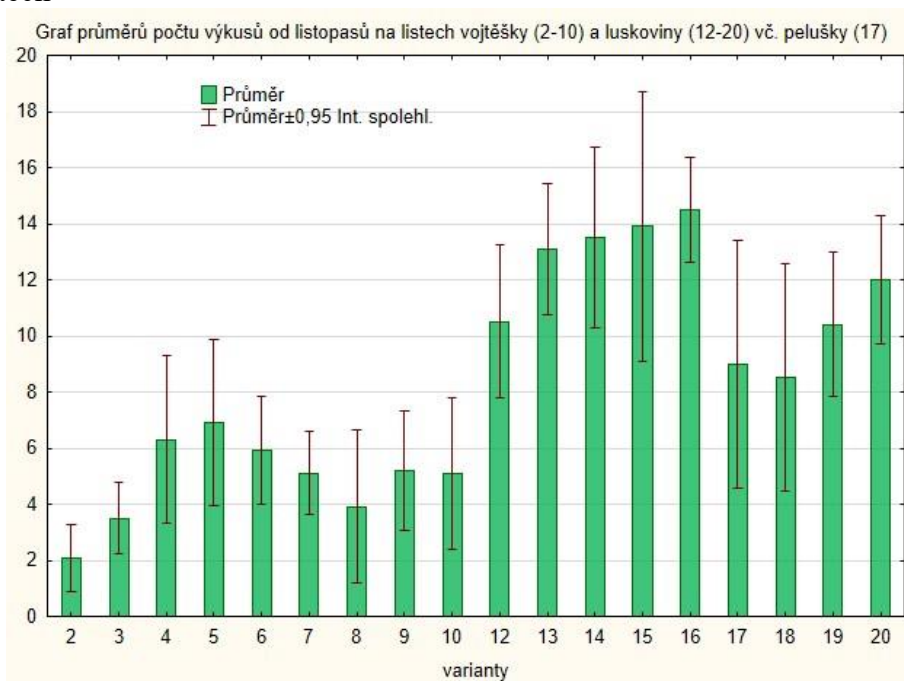


Graf č. 2: Vývoj průměrného počtu kyjaty hrachové na rostlinách luskoviny (průměry jsou v podsevu za varianty s podsevem vojtěšky) v roce 2021



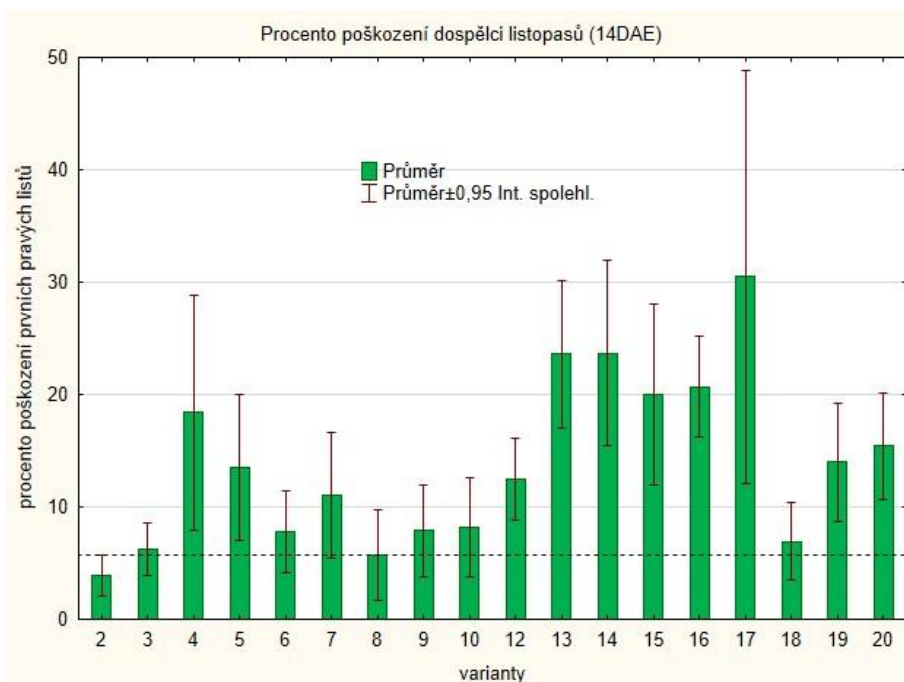


Graf č. 3: Průměr počtu výkusů (zejků) od dospělců listopasů (roky 2020–2021) na prvních pravých listech



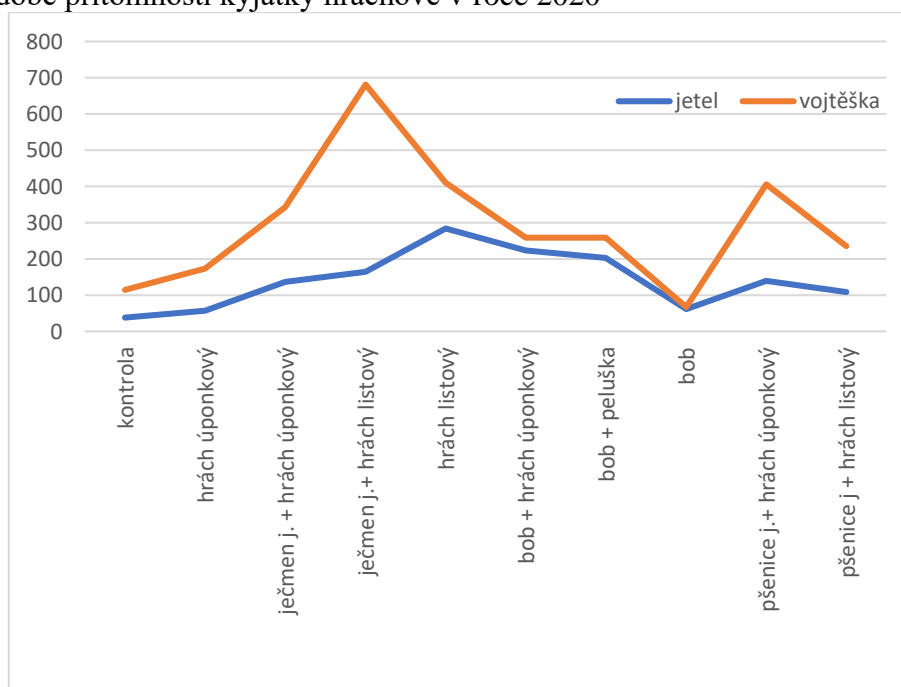
Legenda: varianta 2-10 znázorňuje napadení podsevu vojtěšky v luskovině (viz Tab 1); dále varianty zobrazují poškození pro úponkový hrách 12, 16, hrách úponkový v LOS 13, 19, hrách listový 15, hrách listový v LOS 14, 20, pelušku 17 a bob 18

Graf č. 4: Průměrná ztráta plochy prvních pravých listů způsobenou výkusy od dospělců listopasů (roky 2020–2021)

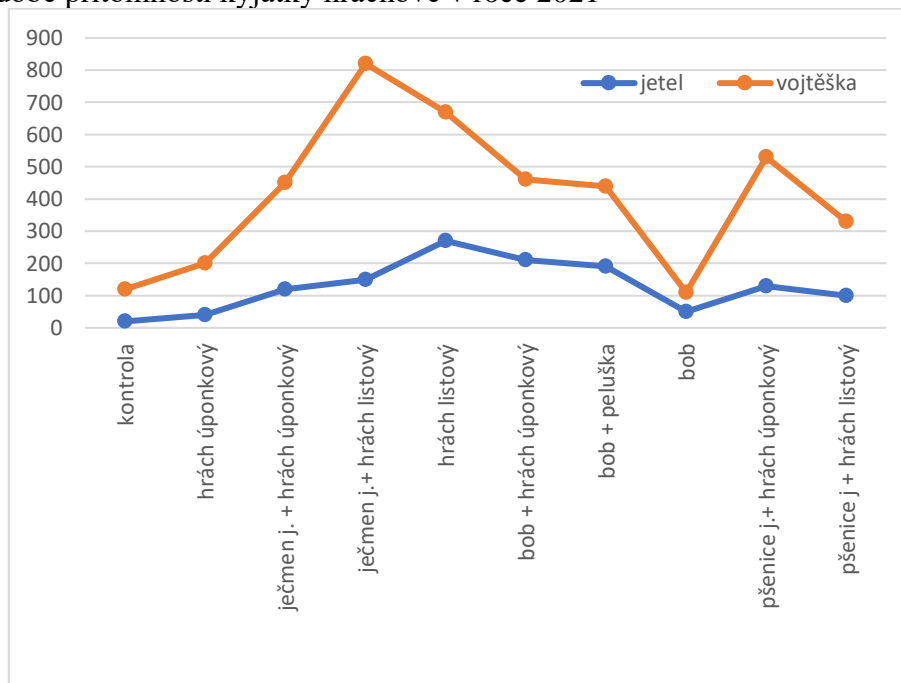


Legenda: varianta 2-10 znázorňuje napadení podsevu vojtěšky v luskovině (viz Tab 1); dále varianty zobrazují poškození pro úponkový hrách 12, 16, hrách úponkový v LOS 13, 19, hrách listový 15, hrách listový v LOS 14, 20, pelušku 17 a bob 18

Graf č. 5: Celková početnost zaznamenaných jedinců střevlíčka měděného (*P. cupreus*), jejich aktivita, v době přítomnosti kyjatky hrachové v roce 2020



Graf č. 6: Celková početnost zaznamenaných jedinců střevlíčka měděného (*P. cupreus*), jejich aktivita, v době přítomnosti kyjatky hrachové v roce 2021



## Diskuze

Ochrana rostlin se nyní potýká s razantní změnou v přístupu k chemickým pesticidním zásahům. Spotřeba pesticidů celkově klesá a účinné látky jsou stále častěji legislativně restringovány. Z hlediska ochrany rostlin je důležité postihnout zákonitosti v distribuci

škodlivých organismů a jejich přirozených nepřátel v porostech plodin, jež není prakticky v žádném případě náhodná. Pochopení těchto vztahů může vést k možnostem založení porostu (z hlediska struktury) pro snížení dopadů škodlivých činitelů nechemickou cestou. Některé směsi plodin dovedou omezit výskyt chorob, škůdců i plevelů (Ondráčková et al. 2010, Seidenglanz et al. 2011, Jensen et al. 2006). Ve směskách luskovin s obilovinami ve srovnání s monokulturami luskovin byl vyhodnocen výskyt nejvýznamnějších škůdců negenerativních částí rostlin–listopasů a kyjaty hrachové. Autoři práce se pokusili dát do souvislosti výskyt zmíněných škůdců s aktivitou konkrétních střevlíkovitých brouků. Vliv jiných přirozených nepřátel zejména larev pestřenek (Syrphidae), sluněček (Coccinellidae) nebo parazitoidů byl v minulosti v porostech luskovino–obilních směsek v podmínkách ČR studován (Seidenglanz 2011). Bylo zjištěno, že způsob založení porostů (monokultura x směska x podsev) pravděpodobně ovlivňuje výsledné napadení rostlin od listopasů (dospělci i larvami) rodu *Sitona*. Při zakládání pokusů do směsí dochází k jiné disperzibilitě jedinců oproti monokultuře a ve sledovaném pokuse byl vnesen další faktor–podsev, jež je rovněž živnou rostlinou listopasů. Bylo potvrzeno, že rostliny úponkového hrachu jsou napadány bez ohledu na růstový typ hrachu, ovšem v monokultuře úponkového hrachu je vojteška před listopasy více „chráněna“. Z hlediska rozšíření kyjatek v porostech hrachu bylo potvrzeno, že až na výjimky, kdy mikroklima porostu může v suchém období vyhovovat kyjatkám k růstu počtu jedinců na začátku vegetace (hustší porost v ječmene a hrachu v roce 2021). Ve směskách hrachu s obilovinou docházelo k nižšímu napadení kyjatkami (zapříčiněnou vyšší aktivitou střevlíků jako kupř. *P. cupreus*) a rychlejšímu pádu populací kyjatek. Monokultury hrachu bez ohledu na podsev vykazovaly prudký nárůst jedinců kyjatek během krátkého časového období a pád těchto populací byl daleko povlnnější. V poloprovozních pokusech zakládaných na několika lokalitách na Šumpersku byly výsledky velice obdobné (Huňady et al. 2013). Ve zmíněných podsevových pokusech byly do směsí zakomponovány odrůdy hrachu fenologicky prakticky totožné. Díky tomu byly tyto výsledky srovnatelné v napadení rostlin hrachu kyjatkou hrachovou. Takto založené screeningové pokusy jsou cenným zdrojem dat o atraktivnosti jednotlivých komponent luskovin v různých směsích plodin. Využití atraktivnějších směsí plodin lze v praxi uplatnit pro umístění na okraj pozemku s luskovinou („border effect“) nebo vsetí mezipásů k ochraně cílového porostu luskovin určeného ke sklizni, což bylo potvrzeno u zrnokaze hrachového (Seidenglanz et al. 2022).

### **Závěr**

Z výsledků vyplývá, že druhově bohaté směsi luskovin a obilovin s podsevy jetele či vojtešky znemožňují rychlý nárůst populací kyjaty hrachové (vektor viróz luskovin), projevují se výrazně vyšší druhovou pestrostí střevlíků, vysokou mobilitou za kořistí–mšic pohybujících se po povrchu půdy (způsobenou pádem mšic vlivem stresu nebo větru), na bázích listů obilovin. Dále je podsev víceleté vojtešky v monokultuře úponkové růstové formy hrachu méně likvidován listopasy, což má bezesporu vliv na fixaci vzdušného dusíku od raných vývojových fází postupně do hlubších vrstev půdy.

### **Literatura**

- Boudreau M. A., Mundt C. C. 1992: Mechanisms of alterations in bean rust epidemiology due to intercropping with maize. *Phytopathology*, 82, 1051–1060.
- Hauggaard–Nielsen H., Andersen M. K. 2000: Intercropping grain legumes and cereals in organic cropping systems. *Grain Legumes*, 30, 18–19
- Huňady I., Hochman M., Seidenglanz M., Ondráčková E., Ponížil A., Poslušná J., Hlavjenka V., Smýkalová I. 2013: Metodika pěstování luskovino–obilních směsek v ekologickém zemědělství, 1–54, ISBN 978–80–8760–18–7

- Jensen E. S., Ambus P., Bellostas N. Boisen S., Brisson N., Corre–Hellou G., Crozat Y., Dahlmann C., Dibet A., Von Fragstein P., Gooding M., Hauggaard–Nielsen H., Kasyanova E., Launay M., Monti M., Pristeri A. 2006: Intercropping of cereals and grain legumes for increased production, weed control, improved product quality and prevention of N–losses in European organic farming systems (INTER–CROP, Conference proceedings, Joint Organic Congress, May 2006, Odense, Denmark)
- Ondráčková E., Huňady I., Hochman M. 2010: Vliv luskovino–obilních směsek na redukci výskytu chorob hrachu. *Rostlinolékař*, 4: 12–14; ISSN 1211–3565
- Seidenglanz M., Huňady I., Poslušná J., Loes A. K. 2011: Influence of intercropping with spring cereals on the occurrence of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776) and their natural enemies in field pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Protection Science*, vol. 47, No. 1, 25–36
- Seidenglanz M., Munoz M. A., Šafář J., Heděnc P., Ondráčková E., Bajerova R. 2022: Early flowering field pea variety (*Pisum sativum* L.) as a trap crop for pea weevils (*Bruchus pisorum* L.). *Plant Protection Science*, ISSN 1212–2580.
- Williams I. H., (ed.) 2010: Ground Beetles as Predators of Oilseed Rape Pests: Incidence, Spatio–Temporal Distributions and Feeding, *Biocontrol–Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*, Springer, New York, 115–149 s.

### **Poděkování**

Příspěvek byl zpracován za podpory Ministerstva zemědělství, QK21010332 a institucionální podpory MZE–RO–10/18 a MZE–RO–18/18.

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Jaroslav Šafář, Ph.D.  
Agritec Plant Research, s.r.o.  
Zemědělská 16  
+420 776 748 289, safar@agritec

## Efektivní ochrana porostu hrachu proti kyjatce hrachové – *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776)

Effective crop protection of the peas against the pea aphid –  
*Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776)

Šafář J.<sup>1</sup>, Seidenglanz M.<sup>1</sup>, Gališová V.<sup>2</sup>, Plachká E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Agritec Plant Research, s.r.o.*

<sup>2</sup>*OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin Opava*

### Abstrakt

Kyjatka hrachová (*A. pisum*) poškozují porosty hrachu sáním při němž dochází k přenosu viróz do rostlin. Sání samotné snižuje vitalitu rostlin, nasazenost pater lusků a projev viróz dále prohlubuje snížení výnosového potenciálu až likvidaci porostu (Barlow et al. 1977, Houba et al. 2009). V letech 2018 a 2019 byl založen maloparcelkový pokus, pro zjištění účinnosti konvenčních a biologických přípravků na ochranu rostlin proti kyjatce hrachové. Statistické zpracování bylo vypočítáno pomocí Tukeyova HSD testu v programu ARM a Statistica 12. Přesnými pokusy byla zjištěna velmi dobrá účinnost proti kyjatce hrachové u variant s azadirachtinem, olejem z *Pongamia pinnata* se smáčedlem Wetcit, dále spynosyny. Dobrá účinnost byla potvrzena u konvenčních produktů s neonicotinoidními účinnými látkami a eterického pyretroidu (etofenprox).

**Klíčová slova:** ochrana rostlin, kyjatka hrachová

### Abstract

The pea aphid (*A. pisum*) damages pea crop by sucking, during which viruses are vectored to the plants. Sucking itself reduces the vitality of plants, they reduce the deployment of pea pods quantity, and the damage of viruses further increases the reduction of yield potential up to the destruction of the pea crop (Barlow et al. 1977, Houba et al. 2009). In 2018 and 2019, a small-plot trial was carry out to found the efficacy of conventional and biological products against pea aphid. Statistical assessments was calculated using Tukey's HSD test in the ARM program and Statistica 12. The trials showed very good efficacy against the pea aphid in the treatments with azadirachtin, *Pongamia pinnata* oil with the adjuvant Wetcit (orange oil), and spynosyn products. Good efficacy has been confirmed for conventional products with neonicotinoids active ingredients and an etheric pyrethroid (etofenprox).

**Keywords:** plant protection, pea aphid

### Úvod

Pro dobrý zdravotní stav porostu hrachu setého je klíčová chemická ochrana rostlin, protože porosty hrachu jsou sáním kyjatek a přenosem virů rychle oslabovány. Klíčoví přirození nepřátele kyjatek, což jsou zejména larvy pestřenek (Syrphidae), sluněčka (Coccinellidae), larvy zlatooček (*Chrysoperla carnea*) či blanokřídlí parazitoidi (Hymenoptera) nezvládají silné populace kyjatek efektivně likvidovat (Nikolova 2010), což způsobuje zásadní sklizňové ztráty pro produkci hrachu na semeno nebo výživu. Nebezpečnými viry přenášenými kyjatkami jsou výrůstková mozaika hrachu (PEMV), obecná mozaika hrachu (PMV) a virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Při perzistentním přenosu virů (v případě PEMV), kdy dochází k okamžitému proniknutí viru do rostliny se dosud bez chemické ochrany pěstitelé hrachu neobejdou. Vzhledem k pokračujícím restrikcím konvenčních účinných látek (zejména neonicotinoidů) a čistě pokračujícím novým legislativním změnám omezujícím množství účinných látek a jejich používání je nutné hledat alternativy pro ochranu hrachu proti kyjatce hrachové mezi pesticidy, které nepřinášejí vysoké ekologické riziko pro produkci semen nebo

potravin (Hummel & Kleeberg 2002, Šarapatka & Urban 2003). Již během raných vývojových fází porostu hrachu početnost kyjatek v populacích rychle stoupá. Rostliny hrachu jsou kolonizovány těmito mšicemi zejména z okolních porostů víceletých píceň. Kyjatka hrachová je tedy škodlivá i v porostech píceň a nejkritičtější období pro napadení je zejména vývoj poupat a lusků (Nikolova 2010).

### Materiál a metody

V průběhu vegetačních sezón 2018-2019 byl založen maloparcelkový pokus v hrachu setém na lokalitách v okolí obce Rapotín (Šumperk). Parcely byly vytvořeny ve čtyřech plně randomizovaných opakováních o velikosti parcel 12 m<sup>2</sup>. Pro zvýšení výskytu škůdců byly včleněny neošetřované mezipásky parcel s totožnou rozlohou s vedlejší parcelou, a to vždy po dvou ošetřených variantách v opakování. Pro provedení aplikace, která proběhla 25.5.2018 a 20.6.2019 byl volen termín při akceleraci nárůstu početnosti kyjatek, panovaly teploty do 25 °C a bezvětřné počasí. Úhlopříčně na parcelu byla hodnocena početnost kyjatek na jednotlivých 20ti náhodně vybraných rostlinách na parcele ve čtyřech opakováních za variantu (80 hodnocených rostlin na variantu), tzn. s hodnocením 6 a 11 dní po aplikaci v roce 2018 a 6 a 10 dní v roce 2019. Seznam použitých variant je v Tab. č. 1. Ze zjištěných početností kyjatek byl vypočítán Tukeyův HSD test pro statistické srovnání variant k neošetřené kontrolce (Tab. č. 2 a 3).

Tab. 1: Seznam použitých variant v pokusu sledujícím účinnost na kyjátku hrachovou (*A. pisum*); obchodní názvy jsou uvedeny z důvodu množství látek, které jsou přítomny v jednotlivých produktech s účinnou látkou (v dávce vody 300 l/ha).

Varianta pokusu	Dávka	Skupina látek
1	Kontrola	-
2	Biscaya	0,3 l/ha
3	Biscaya + Wetcit (adj.)	0,3 l/ha + 0,2 %
4	Decis Mega	0,1 l/ha
5	Neemazal + Wetcit (adj.)	3 l/ha + 0,2 %
6	Neemazal	3 l/ha
7	Proteus	0,5 l/ha
8	Trebon OSR	0,2 l/ha
9	Trebon + Wetcit (adj.)	0,2 l/ha + 0,2 %
10	Mavrik New	0,2 l/ha
11	Pirimor	0,5 kg/ha
12	Rock Effect	1 %
13	Rock Effect + Wetcit (adj.)	1 % + 0,2 %
14	Silicea D6 + Wetcit (adj.)	0,3 l/ha + 0,2 %
15	Chrysopa	25 ks/m <sup>2</sup>
16	Bufo C30	0,015 g/ha
17	Canela	0,3 l/ha
18	Spintor	0,4 l/ha
19	Spinetoram	0,45 l/ha

\* adj: smáčedlo

## Výsledky

Z početnosti kyjatek byla za pomoci Tukeyova HSD testu vypočítána účinnost ošetření v procentech vůči neošetřené kontrole. Výsledky a rozdíly v početnosti mšic (kyjatky hrachové) jsou zobrazeny v Tab. č. 2 a 3 jako průměrné početnosti napadení vypočtené ze čtyř opakování. V roce 2018 bylo napadení hrachu kyjatkami velice vysoké a v Tab 2 je názorně vidět ve statistickém zpracování výsledků, že z krátkodobého hlediska (po šesti dnech od aplikace) nejlépe fungovaly neonekotinoidy (var. 2 a 3) či neonikotinoid (thiakloprid) zesílen pyretroidní složkou (produkt Proteus). Účinnost neonikotinu, thiaklopridu, bylo rovněž zesíleno olejovým smáčedlem Wetcit, jež v této kombinaci účinnosti přesáhl 90 % podobně jako aficid Pirimor. Zajímavé výsledky přinesl Neemazal s účinnou látkou azadirachtin, jež je používán v ekologickém zemědělství. Neemazal v kombinaci se smáčedlem Wetcit měl krátkodobě po aplikaci nízkou účinnost, ovšem s odstupem jedenácti dní po aplikaci dosáhl vůbec nejvyšší účinnosti na kyjatky, kdy konvenčně využívané insekticidy začínali „selhávat“. V roce 2019 při hodnocení deset dnů po aplikaci stojí za zmínku jiné insekticidy, jež jsou využívány k ochraně rostlin ve způsobech hospodaření se sníženým využíváním konvenčních pesticidů. Byla potvrzena vynikající funkčnost z hlediska účinnosti na kyjatky u přípravku Neemazal se smáčedlem, ovšem jako alternativou ke konvenčním pesticidům s dlouholetou znalostí v jejich funkčnosti, se dále jeví varianta 18 a 19 s účinnou látkou spinosad a spinetoram. Tyto látky vhodné pro ekologickou produkci byly dříve využívány zejména pro žravý hmyz. Bezesporu nesmíme opomenout výluh z *Pongamia pinnata* – Rock Effect, jež rovněž přesahoval v účinnosti bezpečných 90 %.

Výnos semen nebo nadzemní hmoty je bezesporu určujícím faktorem pro ekonomiku pěstování hrachu. Výnosová deficienze se tedy sáním mšic může projevit velice výrazně a druhotné snížení výnosového potenciálu vlivem rozšíření viróz v porostu. Dle Grafu č. 1 je z průměrů (s intervaly spolehlivosti) patrné, že vyšších výnosů dosahovala varianta č. 9 – Trebon s Wetcitem a ošetření Rock Effect(em) s Wetcitem (var. č. 13). Wetcit tedy významně zlepšil dopad eterického pyretroidu Trebon s účinnou látkou etofenprox, dále ekologický přípravek Rock Effect, výluh z *Pongamia pinnata* (kaleda lysá). Tyto varianty v průměru z let 2018 a 2019 vykazovaly signifikantní výsledky oproti neošetřené kontrole, konkrétně u varianty s Trebon + Wetcit bylo navýšení výnosu semen hrachu o 1,30 t/ha, u varianty s Rock Effect + Wetcit 0,77 t/ha.

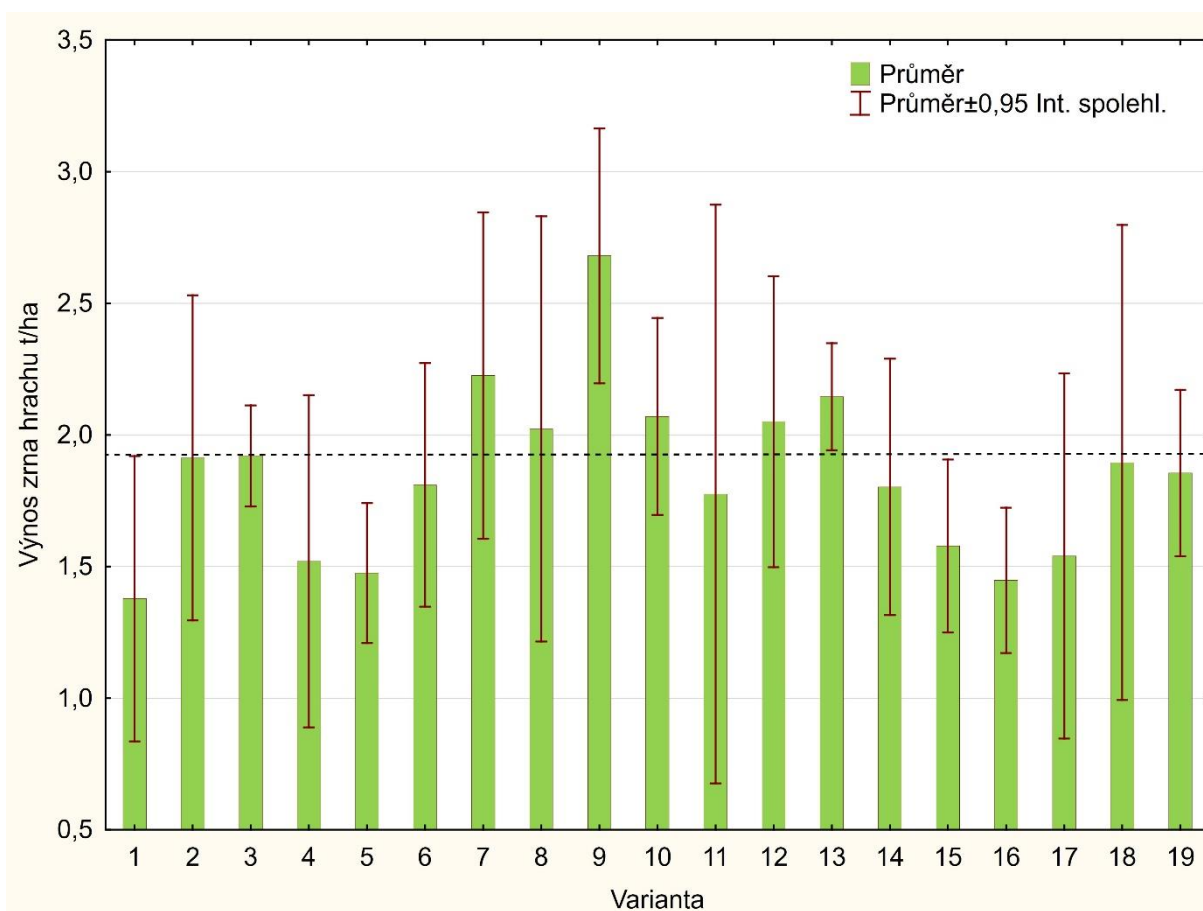
Tab. 2: Výsledky Tukeyova HSD testu variant pokusu v roce 2018; 6 dní po aplikaci (31.5.) a 11 dní (5.6.);  $P < 0,05$  (průměrné napadení kyjatkou hrachovou na rostlinu, účinnost – kurzívou); signifikantní rozdíly mezi průměry skupin znázorněny malými písmeny

Varianta	Napadení 31.5.2018		Účinnost (% kontroly) 31.5.2018		Napadení 5.6.2018		Účinnost (% kontroly) 5.6.2018	
	1. Kontrola	17,69	a	0,00	a	15,51	a	0,00
2. Biscaya	2,61	cde	82,97	c	4,51	f	73,83	e
3. Biscaya+Wetcit	1,31	e	92,14	a	2,86	h	80,31	c
4. DecisMega	9,51	bcd	38,55	i	8,89	c	52,76	h
5. Neemazal+Wetcit	10,11	bc	42,41	h	1,81	j	90,10	a
6. Neemazal	11,36	ab	45,05	g	2,66	i	84,12	b
7. Proteus	2,15	de	86,84	d	4,08	g	75,83	d
8. Trebon OSR	3,49	cde	64,81	b	5,68	e	56,89	g
9. Trebon OSR+Wetcit	2,89	cde	80,91	e	6,76	d	61,56	f
10. Mavrik New	9,81	bc	40,72	d	9,05	b	47,42	i
11. Pirimor	1,81	e	90,72	f	4,05	g	75,40	d

Tab. 3: Výsledky Tukeyova HSD testu variant pokusu v roce 2019; 6 dní po aplikaci (26.6.) a 10 dní (30.6.);  $P < 0,05$  (průměrné napadení kyjatkou hrachovou na rostlinu, účinnost – kurzívou); signifikantní rozdíly mezi průměry skupin znázorněny malými písmeny

Varianta	Napadení 26.6.2019		Účinnost (% kontroly) 26.6.2019		Napadení 2019 30.6.2019		Účinnost (% kontroly) 30.6. 2019	
1. <i>Kontrola</i>	0,93	a	0	a	0,88	a	0	a
2. <i>Biscaya</i>	0,04	b	95,2	b	0,03	b	96,2	b
3. <i>Biscaya+Wetcit</i>	0,03	b	96,3	b	0,03	b	96,2	b
4. <i>DecisMega</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
5. <i>Neemazal+Wetcit</i>	0,31	b	85,7	b	0	b	100	b
6. <i>Neemazal</i>	0,31	b	85,7	b	0	b	100	b
7. <i>Proteus</i>	0,31	b	85,7	b	0	b	100	b
8. <i>Trebon</i>	0,04	b	95,2	b	0	b	100	b
9. <i>Trebon OSR+Wetcit</i>	0,04	b	95,2	b	0,02	b	98,1	b
10. <i>Mavrik New</i>	0,04	b	95,2	b	0,02	b	98,1	b
11. <i>Pirimor</i>	0,00	b	100	b	0,02	b	98,1	b
12. <i>Rock Effect</i>	0,11	b	88,1	b	0,03	b	96,2	b
13. <i>Rock Effect + Wetcit</i>	0,02	b	97,6	b	0,05	b	94,3	b
14. <i>Silicea D6 + Wetcit</i>	0,11	b	88,1	b	0,23	b	73,6	b
15. <i>Chrysopa</i>	0,09	b	90,5	b	0,25	b	71,7	b
16. <i>Bufo C30</i>	0,11	b	88,2	b	0,05	b	94,3	b
17. <i>Canela</i>	0,09	b	90,5	b	0,27	b	69,8	b
18. <i>Spintor</i>	0,07	b	92,9	b	0,05	b	94,3	b
19. <i>Spinetoram</i>	0,02	b	97,6	b	0	b	100	b





Graf. 1: Průměr výnosu semen hrachu za jednotlivé varianty s intervaly spolehlivosti z roku 2018 a 2019. Vizualizováno programem Statistica 12. Přerušovanou čarou je znázorněn horní limit intervalu spolehlivosti neošetřené kontroly.

## Diskuze

Z hlediska početnosti kyjatek byl v roce 2018 jejich výskyt výjimečně vysoký, kdežto v roce 2019 byla početnost kyjatek v porostech hrachu v okolí města Šumperk spíše průměrná. Pro hodnocení polní účinnosti byly zvoleny insekticidy z různých skupin účinných látek. Za velmi účinné insekticidy jsou považovány produkty s neonikotinoidní účinnou složkou (Proteus, Biscaya), (Tomizawa M., & Casida J.E. 2005), tato skupina látek je dlouhodobě restringovaná, proto je potřeba hledat v jiných skupinách látek částečnou náhradu. Dále byly použity látky ze skupiny pyretroidů, kterých se dosud ze zmiňovaných skupin látek omezení používání dotýká nejméně, ovšem z rostlinolékařského hlediska jsou problematické kvůli snížení citlivosti hmyzu vůči chemickým zásahům (Slater et al. 2011). Jako pyretroid byl použit produkt Decis Mega (pouze v roce 2018 a později vyřazen) a Mavrik New, což jsou hojně užívané esterické pyretroidy. Méně užívané pyretroidy jsou eterické, mají rozdílný mechanismus účinku, proto jsou využívány kupř. v řepce olejce v rámci rostlinolékařských zásad pro zmírnění selekčního tlaku na populace škůdců se sníženou citlivostí k pyretroidům. Vzhledem k pokračujícímu omezení množství účinných látek v zemědělství byly dále zařazeny varianty s komerčními produkty považovanými za šetrné k životnímu prostředí nebo využívanými v ekologickém zemědělství – Neemazal, Rock Effect, Silicea, Chrysopa, Bufo C30, Canela, Spintor, Spinetoram, u některých variant bylo využito smáčedlo registrované do ekologické produkce s obchodním názvem Wetcitm což je synteticky vyrobený pomerančový olej zvyšující účinnost insekticidních přípravků. Vzhledem k podmínkám počasí při aplikaci, vysokým teplotám, mohlo dojít k ovlivnění funkčnosti a účinnosti některých pyretroidních látek, což je pro

funkčnost ošetření nebezpečné. Přihlédneme-li ke konvenčním variantám pokusu, tak velmi dobrou účinnost dosáhla varianta s produktem Biscaya, thiacloprid – neonikotinoid, s přidáním ekologického smáčedla Wetcit. Eterický pyretroid Trebon dosahoval rovněž velmi dobrých výsledků v obou sledovaných letech, esterický pyretroid Mavrik New byl spolehlivý pouze v roce 2019. Ekologické přípravky jako neemový olej (Neemazal, jež není do hrachu registrován) byly charakteristické poklesem početnosti jedinců kyjatek se statisticky významnými rozdíly. V počátečních dnech po aplikaci, vyjma některých pyretroidů, byla početnost kyjatek v roce 2018 výrazně nižší u syntetických insekticidů. Situace se změnila při hodnocení po 11 dnech po aplikaci, kdy insekticid z neemového oleje (účinná látka azadirachtin) patřil k nejlepším variantám s nejnižší početností kyjatek (Tab. č. 2), což je dáno mechanismem účinku azadirachtinu (Mordue & Blacwell 1993, Lowery & Isman 1994), kdy tento přípravek způsobuje při proměnách v životním cyklu (v jiné vývojové stádium hmyzu) nevratné změny v organech vedoucí k uhynutí (Pavela 2007, Isman 2006). V roce 2019 byly k přírodě šetrné přípravky výrazně rozšířeny o další varianty, a tak jako Neemazal, byly v každé sezóně pokusu i tyto varianty až na výjimky spolehlivé po deseti dnech po aplikaci. Jako nespolehlivý se jevil křemičitý písek (u nějž je uváděn vliv na zesílení pletiv rostlin) s pomerančovým olejem (Silicea D6 + Wetcit), samotný skořicový olej (produkt Canela) a larvy zlatooček (*Chrysopa*) kdy z velmi dobré účinnosti po deseti dnech došlo k selhání účinnosti na kyjatku hrachovou. Jako standardní přípravek byl využit aficid – Pirimor, karbamát s vysokou účinností na mšice.

Obsah dusíku v zelených částech rostlin hrachu setého je obecně považován jako indikátor kvality produkce, což je primárně ovlivněno přirozenou vazbou vzdušného dusíku rostlinami hrachu, předplodinou nebo základním hnojením. Rostliny hrachu s nízkým obsahem dusíku, strádající rostliny, jsou kyjatkou hrachovou méně napadány (Moravvej & Hatefi, 2008) a vyšší obsah dusíku v pletivech rostlin je pro tohoto škůdce atraktivní, což je důvod expanze okřídlených jedinců a zakládání populací do dosud zdravých porostů. Vliv účinnosti přípravků v jednotlivých variantách na napadení rostlin kyjatkami může mít eventuelní dopad na obsah dusíku v semenech hrachu. Ve zmíněném dvouletém pokuse nebyl ve sledovaných letech vliv na obsah dusíku v semenech statisticky průkazný (proto jej autoři neuvádí).

## Závěr

Koncentrace živin a jejich poměry jsou základem tvorby krmných dávek. Při vysokém napadení porostů hrachu kyjatkou hrachovou dochází v důsledku sání a zejména vlivem viróz k velmi nízkému růstu rostlin hrachu a jejich odumírání. Vyšší podíl luskovin v krmivech mohou nahradit nákladná bílkovinná krmiva pro výživu zvířat. Byly zjištěny vyšší výnosy semen hrachu u variant s eterickým pyretroidem etofenproxem (Trebon) a olejem s *Pongamia pinnata* za předpokladu, že v těchto variantách bylo použito smáčedlo Wetcit. Při pěstování hrachu je do budoucna těžko představitelné, že nebude docházet k dalšímu omezování neonikotinoidů, kdy dnes je do hrachu registrován pouze acetamiprid. Dalším zjištěním tedy bylo, že na vyšší výnosový potenciál mohou mít statisticky průkazný dopad i jiné látky než neonikotinoidy, které působí systémově a jsou v rostlinách různě mobilní na rozdíl od pyretroidů. Neonikotinoidy byly v této práci brány pouze jako srovnávací varianty, podobně jako karbamát (Pirimor), jež měl vynikající účinnost na kyjatku hrachovou s vyšším výnosem oproti neošetřené kontrole, jež nebyla statisticky průkazná. Přípravky považované za k přírodě šetrné vykazovaly v případě Neemazalu přibližně o 10 % nižší účinnost oproti neonikotinoidům, ovšem srovnatelnou s pyretroidy jako kupř. s deltamethrinem. Nicméně zejména u produktu Rock Effect s aplikací se smáčedlem Wetcit byla tato aplikace plně srovnatelná s jinými látkami využívanými v konvenčním způsobu hospodaření jak s pyretroidy, tak rovněž i neonikotinoidy.

## Literatura

- Barlow, C. A. – Polley, A. – Randolph, J. C. (1977): Effects of Pea Aphids, *Acyrtosiphon pisum*, (Homoptera: Aphididae, on growth and productivity of pea plants, *Pisum sativum*. The Canadian Entomologist, Volume 109, Issue 11, November 1977, pp. 1491–1502
- Pavela, R. (2007): Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. Pest Technology, 1, 47-52
- Houba, 2009: Luskoviny, pěstování a využití, Kurent České Budějovice, 132 pp.
- Hummel, E. – Kleeberg, H. (2002): First results of the application of a new Neem-Azal-Peg powder formulation in dydropinica against different pest insects. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Uniwersiteit Gent 67: 631-639
- Moravvej, G. H. – Hatefi, S. (2008): Role of nitrogen content of pea (*Pisum sativum* L.) on pea aphid (*Acyrtosiphon pisum* Harris) establishment. Caspian Journal of Environmental Sciences 6, 113–131.
- Mordue, A. J. – Blackwell, A. (1993): Azadirachtin: An update. Journal of Insect Physiology, 39, 903-924.
- Lowery, D. T. – Isman, M. B. (1994): Insect growth regulating effects of neem extract and azadirachtin on aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72: 77-84
- Nikolova, I. (2010): Study of entomofauna in spring field pea (*Pisum sativum* L.) in Pleven region. In: Jubilee Scientific Conference „Bulgaria and the Bulgarians abroad, „ held in, Veliko Tarnovo, 2009 (pp. 539-548). Veliko Tarnovo, Bulgaria: Faber Press.
- Isman, M. B. (2006): The role of botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world, *Annual Review of Entomology*, 54, 45-66.
- Seidenglanz M., – Šafář J., – Huňady I. (2018): Jak složení porostů ovlivňuje výskyt a disperzi škůdců a jejich přirozených nepřátel? *Rostlinolékař*. 2018, 29(2), 27–31. ISSN 1211-3565.
- Slater, R. – Ellis, S., – Genay, J. P., – Heimbach, U. – Huart, G., Sarazin, M. – Longhurst, C. – Müller, A. – Nauen, R. – Rison, J. L. – Robin, F. (2011). Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Management Science*, 67: 633–638. <https://doi.org/10.1002/ps.2101>
- Šarapatka, B., Urban, J. eds. (2006): Ekologické zemědělství v praxi. Šumperk: PRO-BIO Svaz ekologických zemědělců. 2006, 502 s. ISBN 978-80-903583-0-0.
- Tomizawa, M. – & Casida, J.E. (2005): Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanism of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005: 45, 247-268.

**Poděkování**

Příspěvek byl zpracován za podpory Ministerstva zemědělství, QK21010332 a institucionální podpory MZE-RO-10/18 a MZE-RO-18/18.

**Kontaktní adresa:**

Ing. Jaroslav Šafář, Ph.D.  
Agritec Plant Research, s.r.o.  
Zemědělská 16  
+420 776 748 289, safar@agritec.cz

## Výsledky účinku vybraných nanočástic a oligopeptidů proti patogenu *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* způsobujícímu bakteriální spálu mrkve

Results of the effect of selected nanoparticles and oligopeptides against the pathogen *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* causing bacterial blight of carrots

Wohlmuth J.<sup>1</sup>, Hakalová E.<sup>1</sup>, Klapcová G.<sup>1</sup>, Tekielska D. A.<sup>1</sup>, Bytešnicková Z.<sup>2</sup>, Richtera L.<sup>2</sup>, Baránek M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendeleum – Ústav genetiky ZF MENDELU

<sup>2</sup>Ústav chemie a biochemie AF MENDELU

### Abstrakt

Nanočástice na bázi stříbra, mědi a selenu a oligopeptidy na bázi Novicidinu byly testovány jako potenciálně účinné látky proti bakterii *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, způsobující bakteriální spálu mrkve. Testovaným kmenem bakterie byly sbírkové izoláty NCPPB 4410 a 2 naturální izoláty pocházející z České Republiky. Testy na Petriho miskách i na mikrodestičkách bylo potvrzeno, že testované oligopeptidy i nanočástice mají vůči této bakterii antagonistický účinek.

**Klíčová slova:** NCPPB 4410; Novicidin; stříbrné nanočástice, měděné nanočástice, grafenoxid

### Abstract

Nanoparticles based on silver, copper and selenium and oligopeptides based on Novicidin were tested as potentially effective agents against the bacterium *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, causing bacterial blight of carrots. The tested strain of the bacterium was collection isolates NCPPB 4410 and 2 natural isolates originating from the Czech Republic. Tests on Petri dishes and microplates confirmed that tested oligopeptides and nanoparticles have an antagonistic effect on this bacterium.

**Keywords:** NCPPB 4410; Novicidin; silver nanoparticles, copper nanoparticles, graphene oxide

### Úvod

Bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (dále Xhc), je celosvětově rozšířeným patogenem rostlin čeledi *Apiaceae*. Škody způsobuje především v porostech mrkve (*Daucus carota* L.), hostitelskými druhy jsou ale také další rostliny jako petržel, celer, libeček, koriandr, fenykl, nebo pastinák. Bakterie způsobuje nepravidelné skvrny na listech a stoncích, které mohou přecházet až v nekrotické léze, následuje postupné odumírání listové části rostlin, čímž dochází ke snížení fotosynteticky aktivní plochy rostlin a ke snížení výnosu. V příznivých podmínkách, tedy při teplotě v rozmezí 25 až 30 °C, při přetrvávajícím ovlhčení listů, probíhá velmi rychlá kolonizace rostliny, což může způsobit i její kompletní odlistění. Často je však výskyt bakterie asymptomatický. Zásadním problémem je pak schopnost bakterie proniknout do semen napadených rostlin, pokud jsou napadeny v době květu, a přenést se tak osivem do zcela nových oblastí (Du Toit et al. 2014; Hakalová et al. 2020; Pflieger et al. 1974; Temple et al. 2013).

Pro ozdravování osiva od přítomných patogenů existuje řada způsobů. Z fyzikálních metod se dá vyzdvihnout například ošetření horkou vodou (Hot Water Treatment) (Mandiriza et al. 2018; Nega et al. 2003; Singh et al. 2019), ošetření suchým teplem (Nishioka et al. 2016), ošetření ozonem (Pandiselvam et al. 2020), nebo ošetření UV zářením (Brown et al. 2001; Rifna et al. 2019). Uvedené přístupy však mohou mít za následek i negativní dopad na kvalitativní vlastnosti osiva. Nejčastěji uváděným je snížená klíčivost a životaschopnost osiva. Častěji užívané jsou metody chemické.

V aktuálních trendech výzkumu figuruje řada materiálů, sloužících jako alternativy komerčním pesticidům používaných v ochraně rostlin. Mezi perspektivní materiály patří i materiály na bázi nanočástic (Ma et al. 2017; Pečenka et al. 2021; Singh et al. 2018) a antimikrobiálních peptidů (Dorosz et al. 2010; Nielsen and Otzen 2010; Soren et al. 2015). Výzkumy ukazují, že tyto látky mají antimikrobiální účinky a v řadě případů je jejich účinek zřejmý již při výrazně menších koncentracích, než je koncentrace obdobné látky v komerčních přípravcích. To je vlastnost velmi důležitá z hlediska snižování chemické zátěže v ochraně rostlin. Tento typ materiálů však přináší další synergický efekt, kdy při jejich použití je velmi často pozorován podpůrný účinek na vývoj a růst pěstovaných rostlin (Wohlmuth et al. 2022).

### Materiál a metody

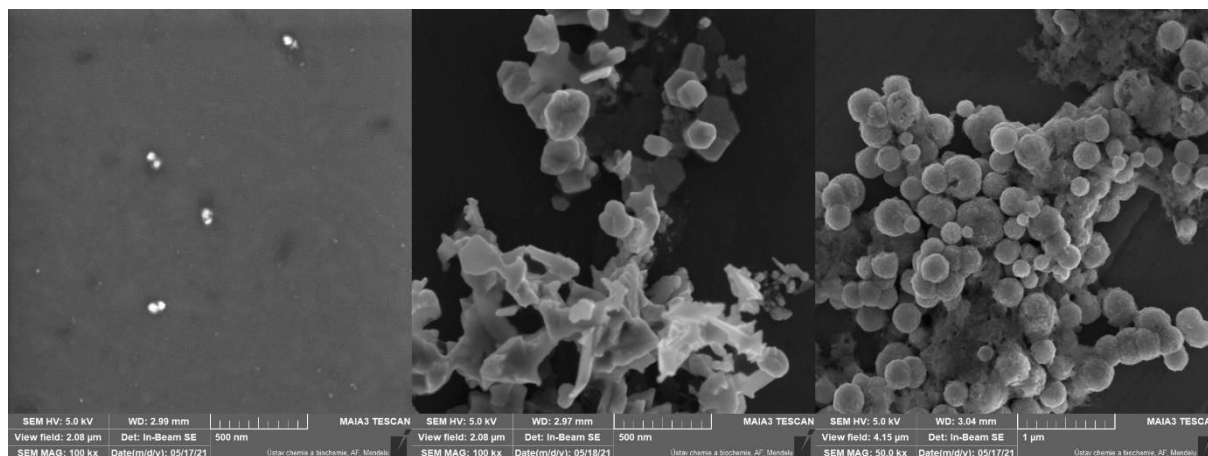
V experimentu použité nanočástice a oligopeptidy byly nově syntetizovány ze strany Ústavu chemie a biochemie, AF MENDELU v Brně. Jednalo se o 8 nanomateriálů a 6 oligopeptidů, které byly následně předány na ZF MENDELU pro jejich testování inhibičního účinku vůči Xhc. Výběr proběhl na základě výsledků předchozího testování účinnosti nanomateriálů obdobných vlastností na příbuzné bakterii *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, škodící na rostlinách čeledi *Brassicaceae*. Okruh nanomateriálů byl soustředěn na nanomateriály na bázi stříbra [Ag], které jsou svými antimikrobiálními účinky dobře známé, na bázi mědi [Cu], která je základem celé řady komerčních pesticidů, na bázi grafenoxidu, jehož významná antimikrobiální aktivita byla také dříve popsána a na bázi selenu [Se].

Tabulka 8 Použité typy nanočástic a oligopeptidů Příklady charakterizace použitých nanomateriálů prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie zachycuje Obrázek 12.

Použité nanočástice	Použité oligopeptidy
Ag_NPs_29	NVC A-A
Ag_NPs_30	NVC F-A
AgSe_NPs_8	NVC G
Cu_NPs_50	NVC G-I
Cu_NPs_53	NVC G-K
rGO_Cu_25	NVC Y-A
rGO_NaBH4	
Se_NPs_40	

Nanomateriály (viz. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) byly dodány ve formě vodní suspenze. Tím byla zajištěna možnost okamžitého použití, ovšem s kratší trvanlivostí, kdy při delším skladování byly vizuálně patrné tendence k aglomeraci nanomateriálu.

Oligopeptidy (viz. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) na bázi Novicidinu byly dodány ve formě prášku. Díky tomu nebyla významně omezena doba skladování. Pro použití bylo nutné prášek vhodně naředit sterilní vodou. Naředěné oligopeptidy byly použity stejným způsobem, jako nanomateriály (viz. kapitoly níže).



Obrázek 12 Nanomateriály Ag\_NPs\_29; AgSe\_NPs\_8 a Cu\_NPs\_53 – ukázka při vizualizaci pomocí elektronového mikroskopu

### **Příprava použitého kmene Xhc:**

Kmen bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* NCPPB 4410 byl vybrán jako referenční z 3 testovaných, na základě předchozího výzkumu v laboratořích Mendelea – Ústavu genetiky, ZF MENDELU. Současně byly pro srovnání použity také 2 naturální kmeny, získané při celorepublikovém sběru vzorků při mapování výskytu Xhc (Ragasová et al. 2021). Uchováván byl v kryoprezervovaných konzervách v chladícím zařízení při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Bakteriální suspenze byla pomocí očkovací kličky převedena na Petriho misku, s naneseným kultivačním médiem Luria Agar (LA). Bakteriální kolonie byly 2-3 dny kultivovány v kultivačním boxu při teplotě  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby dosáhly velikosti dostatečné pro odběr. Poté byly očkovací kličkou převedeny do Erlenmayerovy baňky s Luria Broth (LB) médiem a kultivovány 24 hodin při  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  na kultivační třepačce. Bakteriální suspenze byla kvantifikována pomocí přístroje SpectroStar Nano s úpravou suspenze na  $0,1\text{ OD}_{600}$  ( $0,5\text{ McF} \sim 0,1\text{ OD}_{600} \sim 1 \times 10^8\text{ CFU/ml}$ ).

### **Testy antagonistického účinku použitých materiálů na Petriho miskách**

Základní testování účinnosti nanomateriálů bylo provedeno miskovým testem. Bylo připraveno 5 roztoků (viz. Tabulka 9) po 2 ml, které představují variantu Pozitivní kontrola (PC), kde byla použita čistá bakteriální suspenze, Akutní toxicita (AT), kde bylo k bakteriální suspenzi přidáno stejné množství neředěné suspenze obsahující daný nanomateriál, a varianty  $10\times$ ,  $100\times$  a  $1000\times$ , kde bylo k bakteriální suspenzi přidáno množství suspenze obsahující daný nanomateriál, naředěné dle výše uvedené diluční řady roztokem Phosphate-Buffered Saline (PBS). Varianty s naředěnou suspenzí nanomateriálu byly ihned dány na kultivační třepačku a podrobeny kultivaci po dobu 24 hodin. PC a AT byly rozetřeny na Petriho misky s médiem LA ihned po smíchání (PCi; ATi) a po 30 minutách na kultivační třepačce (PC30; AT30). Po kultivaci po dobu 24 hodin byly rozetřeny naředěné ( $10\times$ ;  $100\times$ ;  $1000\times$ ) i kontrolní varianty (PC24; AT24). Rozetřené kultury byly umístěny do kultivačního boxu, 48 hodin kultivovány při teplotě  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté fotografovány (viz výsledky). Význam této metody spočíval v hrubém stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Tabulka 9 Členění variant při miskových testech

Základní vzorek	PC			AT			10×	100×	1000×
Vzniklé varianty	PCi	PC30	PC24	ATi	AT30	AT24	10×	100×	1000×

### **Testy antagonistického účinku použitých materiálů na mikrodestičkách**

Pro další zpřesnění stanovení antagonistického účinku testovaných materiálů vůči bakterii *Xhc* byly použity přístupy měření minimální inhibiční (MIC) a minimální baktericidní (MBC) koncentrace. Ty byly provedeny spektrometricky destičkovými testy na přístroji SpectroStar Nano, podle dříve publikovaných metod (Tajik et al. 2015). Stručně, bakteriální suspenze byla nejdříve připravena stejným způsobem, jako pro předchozí miskový test. Nanočástice byly následně zředěny tekutým médiem na nejvyšší hodnotu, při které byla při miskovém testu pozorována inhibice. Použitá zředění se tedy u jednotlivých nanočástic lišila a dosahovala hodnot 0×; 10× nebo 100× (100× ředěno pouze jednou, a to u nanočástice AgSe\_NPs\_8). Takto připravené nanočástice byly použity jako standartní roztok pro test inhibičního účinku proti danému kmenu bakterie.

Upravená bakteriální suspenze a připravená suspenze nanomateriálu byly následně převedeny na mikrodestičku. Zde byly složky pomocí multikanálové pipety rozmístěny do jednotlivých jamek a rozděleny na příslušné varianty. Použitým způsobem bylo dosaženo polovičního zředění každé varianty, a to ve 3 řadách s kontrolami. Destička byla posléze zakryta víčkem, spektrometricky změřeno OD<sub>600</sub> všech variant oproti čistému LB mediu a umístěna na kultivační třepačku. Kultivace probíhala při 28 °C a 300 rpm po dobu 24 hodin. Poté bylo provedeno opětovné spektrometrické měření s porovnáním předešlého měření pro stanovení MIC. Následně byla všechna opakování převedena do mikrozkušavek a promíchána na třepačce vortex. Dále byly vzorky očkovačí kličkou převedeny na Petriho misky, které byly umístěny do kultivačního boxu. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin. Na základě úspěšnosti či neúspěšnosti kultivace jednotlivých variant tak byla následně stanovena MBC.

### **Výsledky**

Testy ukázaly, že řada nanočástic má antimikrobiální účinek nejen v základní koncentraci, ale i při několikanásobném zředění. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u variant AgSe\_NPs\_8, AgNPs\_29 a Cu\_NPs\_53, kde nanokompozit na bázi stříbra a selenu dokázal bakterii inhibovat ještě při dvousetnásobném zředění a eliminovat při sedmdesátinásobném zředění (viz. Tabulka 10). Naopak nanomateriály na bázi grafenoxidu a samotné selenové [Se] nanočástice se při testech antimikrobiální účinnosti příliš neosvědčily (viz. Obrázek 13 a Tabulka 10). U oligopeptidů bylo dosaženo nejlepší účinnosti při použití variant NVC F-A, NVC A-A a NVC G. Nejúčinnější varianta NVC F-A dokázala bakterii inhibovat ještě při koncentraci 0,25 mg/l a eliminovat při koncentraci 0,5 mg/l (viz. Tabulka 11).



Tabulka 10 Nejnižší účinné koncentrace nanočástic

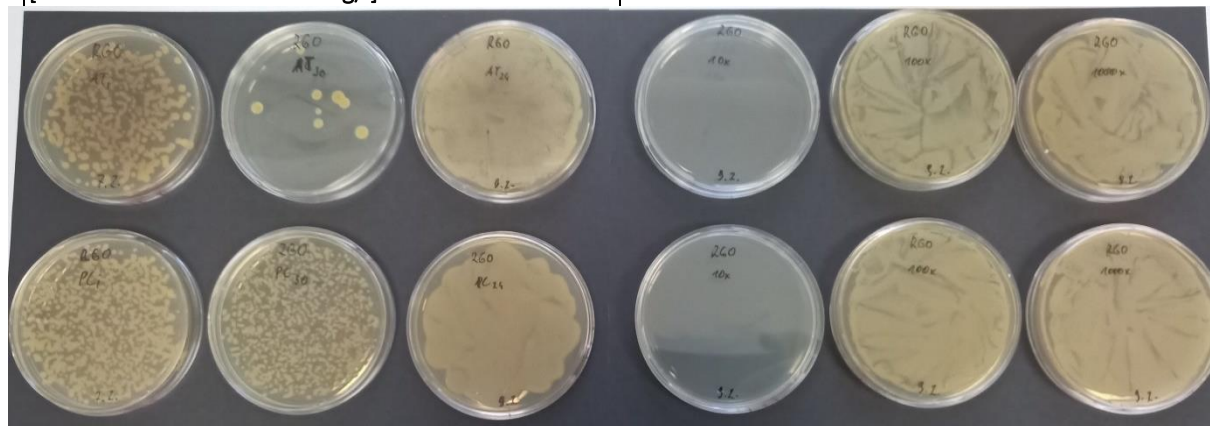
Nanočástice							
MIC				MBC			
	Xhc 26	Xhc 27	Xhc 4410		Xhc 26	Xhc 27	Xhc 4410
Ag_NPs_29	2,5 mg/l	2 mg/l	2,5 mg/l	Ag_NPs_29	50 mg/l	5 mg/l	10 mg/l
Ag_NPs_30	10 mg/l	2,5 mg/l	2,5 mg/l	Ag_NPs_30	50 mg/l	-	-
AgSe_NPs_8	9,26 mg/l; 1,87 mg/l	21,8 mg/l; 4,4 mg/l	18,5 mg/l; 3,74 mg/l	AgSe_NPs_8	41,2 mg/l; 8,31 mg/l	37 mg/l; 7,48 mg/l	52,9 mg/l; 10,68 mg/l
Cu_NPs_50	-	136,2 mg/l	-	Cu_NPs_50	-	-	-
Cu_NPs_53	198,7 mg/l	198,7 mg/l	198,7 mg/l	Cu_NPs_53	397,4 mg/l	397,4 mg/l	397,4 mg/l
rGO_Cu_25	196,4 mg/l	196,4 mg/l	196,4 mg/l	rGO_Cu_25	846,8 mg/l	846,8 mg/l	846,8 mg/l
rGO_NaBH4	-	-	-	rGO_NaBH4	-	-	-
Se_NPs_40	-	-	-	Se_NPs_40	-	-	-

(Pozn. Varianty bez uvedené koncentrace neměly pozorovatelný účinek ani v základní koncentraci)

Tabulka 11 Nejnižší účinné koncentrace oligopeptidů

Oligopeptidy							
MIC				MBC			
	Xhc 26	Xhc 27	Xhc 4410		Xhc 26	Xhc 27	Xhc 4410
NVC A-A	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	NVC AA	1 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
NVC F-A	0,25 mg/l	0,25 mg/l	0,25 mg/l	NVC FA	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l
NVC G	0,25 mg/l	0,5 mg/l	0,25 mg/l	NVC G	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
NVC G-I	0,5 mg/l	1 mg/l	1 mg/l	NVC G-I	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
NVC G-K	1 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	NVC G-K	4 mg/l	2 mg/l	-
NVC Y-A	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l	NVC Y-A	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l

[základní koncentrace = 16 mg/l]



Obrázek 13 Miskové testy nanočástice rGO

### Diskuze

Tato studie přináší nové poznatky o vlivu vybraných nanomateriálů a oligopeptidů na bázi novicidinu na bakterii *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. Existuje mnoho studií zaměřených na antimikrobiální aktivitu nanomateriálů. Bylo ověřeno, že nanočástice na bázi mědi a stříbra vykazují vyšší antibakteriální účinnost ve srovnání s ostatními použitými nanočásticemi, což je v souladu s jinými literárními zdroji. Účinky stříbra popisuje např. Shrivastava et al. (2007), kteří uvádí až 60 % zpomalení růstu bakterie *Escherichia coli* na LB médiu s přidáními nanočásticemi stříbra. Zajímavé výsledky účinnosti také popisuje Ma (2017) při použití

nanokomplexů stříbra [Ag] a chitosanu. Tato kombinace dokáže likvidovat biofilmy mnohem účinněji než samotné stříbrné nanočástice. Je zajímavé, že i v předložené studii vykazuje nevyšší účinek nanokompozitní částice. Konkrétně kombinace nanočástic stříbra [Ag] a selenu vykazovaly podstatně vyšší antimikrobiální aktivitu, než samostatné nanočástice stříbra [Ag] a selenu. Zde je nutno uvést, že nanočástice stříbra [Ag] měly u každé varianty alespoň minimální pozorovatelný antimikrobiální účinek, zatím co nanočástice selenu nevykazovaly sebemenší účinnost.

Oligopeptidy byly v testech úspěšné ve všech variantách. Dorosz (2010) uvádí výsledky testování peptidů na bázi novicidinu v porovnání s peptidy na bázi melittinu a konvenčního antibiotika streptomycinu. Z výsledků je jasně patrné, že nízká MIC novicidinu potvrzuje jeho významné antibakteriální vlastnosti. Z variant použitých v této studii nejlépe vyšel NVC F-A. Zajímavé srovnání nabízí hodnoty účinných koncentrací pozorované u nanočástic a oligopeptidů. Přestože se jedná o chemicky výrazně odlišné entity, mohou být z hlediska zátěže životního prostředí nižší dosahované funkční koncentrace u oligopeptidů námětem na zamyšlení.

### Závěr

Testy potvrdily, že nanočástice i oligopeptidy mají prokazatelně antimikrobiální účinky. U nanočástic i oligopeptidů byly pozorovány materiály, které se svou účinností vyjímaly a jsou proto potenciálně perspektivní pro testování na rostlinách. Antimikrobiální účinky byly potvrzeny *in vitro*. V následných experimentech bude jejich účinnost ověřována také v podmínkách *in planta*.

### Literatura

- BROWN, J., T. LU, C. STEVENS, V. KHAN, et al. The effect of low dose ultraviolet light-C seed treatment on induced resistance in cabbage to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). *Crop Protection*, 2001, 20(10), 873-883.
- DOROSZ, J., Y. GOFMAN, S. KOLUSHEVA, D. OTZEN, et al. Membrane interactions of novicidin, a novel antimicrobial peptide: phosphatidylglycerol promotes bilayer insertion. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(34), 11053-11060.
- DU TOIT, L., M. DERIE, C. CHRISTIANSON, L. HOAGLAND, et al. First report of bacterial blight of carrot in Indiana caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. *Plant disease*, 2014, 98(5), 685-685.
- Sada primerů pro specifickou detekci bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. HAKALOVÁ, E., L. RAGASOVÁ, J. ČECHOVÁ, J. WOHLMUTH, et al.
- MA, Z., A. GARRIDO-MAESTU AND K. C. JEONG Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate polymers*, 2017, 176, 257-265.
- MANDIRIZA, G., Q. KRITZINGER AND T. AVELING The evaluation of plant extracts, biocontrol agents and hot water as seed treatments to control black rot of rape in South Africa. *Crop Protection*, 2018, 114, 129-136.
- NEGA, E., R. ULRICH, S. WERNER AND M. JAHN Hot water treatment of vegetable seed—an alternative seed treatment method to control seed-borne pathogens in organic farming/Heißwasserbehandlung von Gemüsesaatgut—eine alternative Saatgutbehandlungsmethode zur Bekämpfung samenbürtiger Pathogene im ökologischen Landbau. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 2003, 220-234.

- NIELSEN, S. B. AND D. E. OTZEN Impact of the antimicrobial peptide Novicidin on membrane structure and integrity. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 345(2), 248-256.
- NISHIOKA, T., Y. TAKAI, T. MISHIMA, M. KAWARADANI, et al. Low-pressure plasma application for the inactivation of the seed-borne pathogen *Xanthomonas campestris*. *Biocontrol Science*, 2016, 21(1), 37-43.
- PANDISELVAM, R., V. MAYOOKHA, A. KOTHAKOTA, L. SHARMILA, et al. Impact of ozone treatment on seed germination—a systematic review. *Ozone: Science & Engineering*, 2020, 42(4), 331-346.
- PEČENKA, J., Z. BYTEŠNÍKOVÁ, T. KISS, E. PEŇÁZOVÁ, et al. Silver nanoparticles eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage seeds more efficiently than hot water treatment. *Materials Today Communications*, 2021, 27.
- PFLEGER, F., G. HARMAN AND G. MARX Bacterial blight of carrots: Interaction of temperature, light, and inoculation procedures on disease development of various carrot cultivars. *Phytopathology*, 1974, 64(5), 746-749.
- RAGASOVÁ, L., E. HAKALOVÁ, G. KLAPCOVÁ, S. BUCHTOVÁ, et al. Výskyt bakteriální spály mrkve v České republice. *Zahradnictví*, 12.01.2021 2021, 20(1), 17-19.
- RIFNA, E., K. R. RAMANAN AND R. MAHENDRAN Emerging technology applications for improving seed germination. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 86, 95-108.
- SHRIVASTAVA, S., T. BERA, A. ROY, G. SINGH, et al. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2007, 18(22), 225103.
- SINGH, A., N. Á. SINGH, S. AFZAL, T. SINGH, et al. Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *Journal of materials science*, 2018, 53(1), 185-201.
- SINGH, S., N. K. BHARAT, H. SINGH, S. KUMAR, et al. Effect of hot water treatment of seeds on seed quality parameters and seedling growth parameters in bell pepper (*Capsicum annuum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 89(1), 133-137.
- SOREN, O., K. S. BRINCH, D. PATEL, Y. LIU, et al. Antimicrobial peptide novicidin synergizes with rifampin, ceftriaxone, and ceftazidime against antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(10), 6233-6240.
- TAJIK, H., M. AMINZARE, T. MOUNESI RAAD, M. HASHEMI, et al. Effect of *Z. ataria* multiflora Boiss Essential Oil and Grape Seed Extract on the Shelf Life of Raw Buffalo Patty and Fate of Inoculated *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2015, 39(6), 3005-3013.
- TEMPLE, T. N., L. J. DU TOIT, M. L. DERIE AND K. B. JOHNSON Quantitative molecular detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment. *Plant disease*, 2013, 97(12), 1585-1592.
- WOHLMUTH, J., D. TEKIELSKA, J. ČECHOVÁ AND M. BARÁNEK Interaction of the Nanoparticles and Plants in Selective Growth Stages—Usual Effects and Resulting Impact on Usage Perspectives. *Plants*, 2022, 11(18), 2405.

**Poděkování**

Tento článek vznikl na základě podpory projektu IGA-ZF/2022-SI1-006 (financovaného Mendelovou univerzitou v Brně) a projektu QK22010031 „Využití inovačního potenciálu nanotechnologií ke zvýšení rentability vybraných oblastí zemědělské výroby“ (NAZV, MZe ČR)

**Kontaktní adresa:**

Ing. Jan Wohlmuth  
Mendelova univerzita v Brně  
Zahradnická fakulta  
Valtická 337, 69144 Lednice  
+420728550429, jan.wohlmuth.mendelu@mail.com

## Inhibiční účinek anetholu, významné složky silice fenyklu a anýzu, na *Phytophthora infestans*

Inhibition effect of anethole, significant component of fennel and anise essential oil, on *Phytophthora infestans*

Žabka M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně

### Abstrakt

V této práci byla testována přírodní látka anethol, která je významnou kompoziční složkou silic rostlinných vonných druhů a to především anýzu a fenyklu. Tato látka prokázala vysoký inhibiční efekt na významného patogena ze skupiny oomycét *Phytophthora infestans*. Pomocí *In vitro* kontrolovaných experimentů byly testovány efektivní koncentrace a dose-response křivky patogena v závislosti na koncentraci anetholu. Inhibiční efekt byl porovnán s inhibičním efektem syntetického fungicidu tebukonazolu a přírodního fungicidu natamycinu použitými jako referenční standardy. V práci byl potvrzen vysoký inhibiční efekt anetholu a to dokonce i významně vyšší než u obou referenčních látek. Anethol reprezentuje přírodní látky, které jsou, díky své nezávadnosti i účinnosti potenciálními kandidáty pro rozšíření alternativních preparátů na ochranu rostlin.

**Klíčová slova:** Anethol, Aromatické rostliny, Antifungální aktivita, *Oomycetes*, *Phytophthora infestans*.

### Abstract

In this work, the natural substance anethole was tested, which is an important compositional component of the essential oils of aromatic plant species, especially anise and fennel. This substance demonstrated a high inhibitory effect on an important pathogen from the group of oomycetes *Phytophthora infestans*. Using *in vitro* controlled experiments, the effective concentration and dose-response curves of the pathogen depending on the anethole concentration were tested. The inhibitory effect was compared with that of the synthetic fungicide tebuconazole and the natural fungicide natamycin, used as reference standards. The study confirmed the high inhibitory effect of anethole, even significantly higher than that of both reference substances. Anethole represents natural substances that, thanks to their harmlessness and effectiveness, are potential candidates for the expansion of alternative preparations for plant protection.

**Keywords:** Anethole, Aromatic plants, Antifungal activity, *Oomycetes*, *Phytophthora infestans*.

### Úvod

Používání chemických syntetických fungicidních látek v lékařství, kosmetice a jiných oblastech se již dávno stalo nedílnou součástí moderního vyspělého světa. Nicméně, v žádné z uvedených oblastí nerezonuje problém používání fungicidů tak výrazně, jako v oblasti zemědělství, které čím dál častěji naráží na oprávněné či přehnané environmentální bariery. Nadějnou cestou je výzkum antifungálních vlastností mnohých přírodních látek, které mohou zastoupit či snížit spotřebu syntetických pesticidů obecně. V současnosti podléhá používání klasických pesticidů čím dál větším restrikcím z důvodu vzrůstajících tendencí v ochraně životního prostředí (Brauer et al., 2019). 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 velmi významnou efektivitu anetholu, který je významnou přírodní látkou obsaženou ve vonných silicích především anýzu (*Pimpinella*

*anisum*) a fenyklu (*Foenicullum vulgare*) proti velmi nebezpečnému, destruktivnímu rostlinnému patogenu *Phytophthora infestans*, způsobující závažné symptomy potato late blight především na bramborách a rajčatech. Význam tohoto patogena je historicky potvrzen například hladomorem v Irsku v letech 1845-1847 (Judelson, 1997).

## Materiál a metody

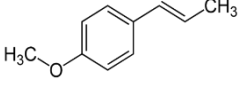
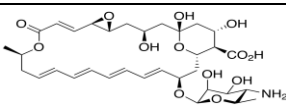
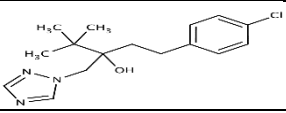
### Izolace a udržování kultury *P. infestans*

Testovaný izolát *P. infestans* (Pi-2106MZ) byl izolován v roce 2021 pod mikroskopem z infikovaného listu bramboru. Po 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 žitném agaru (Rye A agar).

### Testování inhibičního efektu anetholu proti vybranému patogenu

Inhibiční vlastnosti testovaných látek na myceliární růst *P. infestans* 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 rozpouštědla (sterilní destilovaná voda) a důkladně rozmícháno v RAA médiu při teplotě pod 60°C v přesně dané koncentrační řadě. Ta byla zvolena na základě předchozích testů následovně: 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5 a 2 mg.ml<sup>-1</sup> tak, aby maximálně pokrývala předpokládané rozpětí „dose-response“ křivek u jednotlivých látek a testovaného patogenního organismu *P. infestans*. Kontrolní sada byla připravena přidáním ekvivalentního množství stejného rozpouštědla, tedy sterilní destilované vody. Jako pozitivní referenční kontrola byla připravena sada s četně používanou syntetickou fungicidní látkou tebukonazol a přírodní antifungální látkou natamycin, které byly připraveny ve stejné koncentrační řadě. Připravené Petriho misky (9 cm) byly sterilně naočkovány pomocí myceliárních disků (0,4 cm) odebraných z okraje čtrnáctidenních povrchových kultur *P. infestans*. 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**

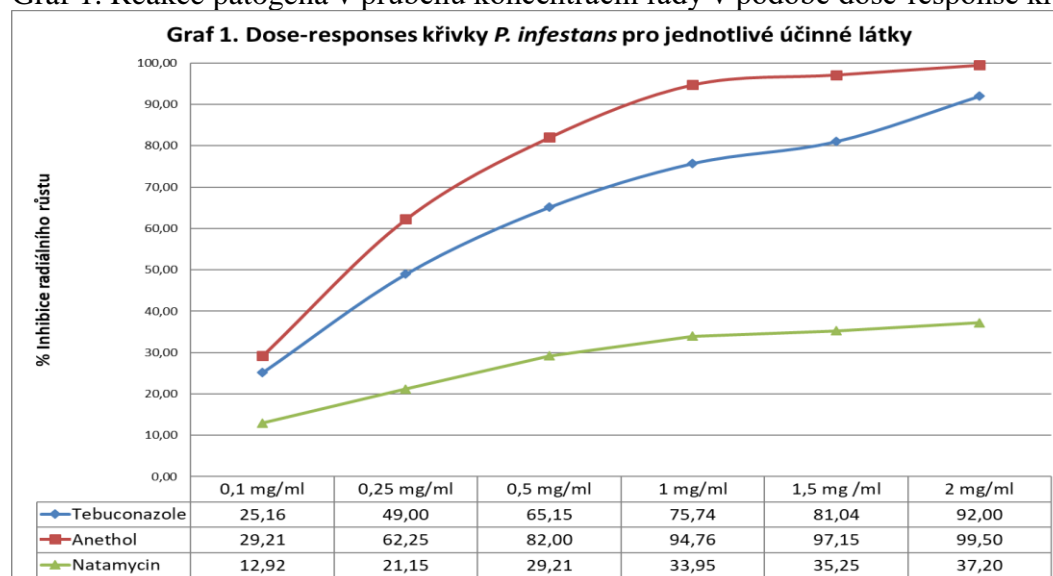
Látka	IUPAC název *popis	Strukturální vzorec
Anethol (trans-anethol)	1-Methoxy-4-[(1 <i>E</i> )-prop-1-en-1-yl]benzene	
Natamycin	*Amphoterická macrolidová antifungální látka z bakterie <i>Streptomyces natalensis</i>	
Tebukonazol	( <i>RS</i> )- 1-(4-Chlorophenyl)- 4,4-dimethyl-3-(1 <i>H</i> , 1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan- 3-ol	

### Výsledky a diskuse

Výsledky potvrzují inhibiční účinky na růst *P. infestans* u všech testovaných látek (Graf 1.). Anethol však prokázal velmi vysokou účinnost na růst *P. infestans*. Anethol dosáhl nejvyšší efektivity již při nejnižší experimentální koncentraci, která byla v experimentu stanovena na úrovni 0,1 mg/ml. Tato vysoká inhibice byla u anetholu překvapivá především v porovnání s účinností syntetického fungicidu tebukonazolu. Stejně tak prokazoval anethol významně vyšší

účinnost proti radiálnímu růstu kolonií *P. infestans* ve vyšších koncentracích (nad 1,5 mg/ml). Inhibiční efekt nad touto koncentrací dosahoval významně přes 99 % zatím co u tebukonazolu bylo dosaženo účinnosti v rozmezí 80-90 %. Překvapivě nízká účinnost byla prokázána u natamycinu, který nedosáhl hranice efektivní účinnosti (nad 50 %) ani v nejvyšších bodech koncentrační řady. Natamycin byl v našich předchozích výzkumech velmi efektivní látkou u mnoha jiných patogenů a to i při daleko nižších koncentracích. Předpokládáme, že mechanismus účinku natamycinu více zasahuje do vývoje skupiny tzv. pravých hub, ale díky morfologickým i fyziologickým odlišnostem skupiny Oomycet není proti *P. infestans* efektivní (Žabka 2018, He et al., 2019, Davidson 2020). Průběh dose-response křivky u natamycinu zjevně ani v jednom bodě nedosahuje účinnosti anetholu ani referenčního tebukonazolu. Anethol je vzhledem k inhibičnímu efektu na *P. infestans* slibná přírodní látka, bez škodlivých environmentálních vlivů. Jedná se o aromatickou sloučeninu ze skupiny fenylypropanoidů, která je přítomna ve větším či menším množství ve velmi oblíbených a hojně používaných aromatických rostlinných druzích jako je fenykl, anýz, badyánu (Ponte et al., 2012, Sharafan et al., 2020). Vysoká efektivita anetholu v případě *P. infestans* je způsobena nejspíše více mechanismy, které ale nejsou zcela uceleně popsány. Pravděpodobně zasahují na úrovni blokace tvorby některých enzymů. Bylo dále zjištěno, že efektivita anetholu není spojena s poškozením membránových struktur (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). Oba způsoby účinku se nevyklučují a z praktického hlediska se vhodně doplňují.

Graf 1. Reakce patogena v průběhu koncentrační řady v podobě dose-response křivek



## Závěr

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 již ve velmi nízkých koncentracích se jeví jako vysoce účinný inhibitor růstu závažného patogena ze skupiny oomycet *P. infestans*. Oproti referenčnímu standardu, syntetickému a velmi účinnému fungicidu tebukonazolu, vykázal zdravotně nezávadný a zcela přírodní anethol významně vyšší účinnost. Jedná se o látku s prokázanou velmi nízkou zdravotní závadností pro člověka. Stejně tak je tato vonná přírodní látka v životním prostředí rychle degradovatelná. V naší další práci se této látce budeme déle věnovat s cílem poskytnout nové poznatky a možnosti v oblasti ochrany rostlin



především tam, kde není možnost použít konvenční syntetické fungicidy, nebo s cílem snižování jejich spotřeby v ochraně proti *P. infestans*.

### Použitá literatura

- 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.
- El Hadrami, A., Adam, LR., El Hadrami, I. & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine drugs*, 8(4), 968-987
- Davidson, P. M., & Doan, C. (2020). Natamycin. In *Antimicrobials in Food* (pp. 339-356). CRC Press.
- Sharafan, M., Jaferník, 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.
- 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.
- 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.
- Judelson H.S. (1997). The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genet Biol* 22, 65-76.
- 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.
- 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, 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.

### Dedikace

Tato práce byla financována z následujících zdrojů QK22010073

### Kontaktní adresa:

Ing. Martin Žabka, Ph.D

e-mail: [zabka@vurv.cz](mailto:zabka@vurv.cz);

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507, Praha6 –Ruzyně



## Vliv ošetření osiva řepky olejné nanočásticemi na parametry související s jejich klíčením

Effect of rape seed treatment with nanoparticles on parameters related to their germination

Baránek M., Hakalová E., Pečenka J., Tekielska D., Eichmeier A., Richtera L., Bytešníková Z., Čechová J.

*Mendelova univerzita v Brně*

### Abstrakt

Nanotechnologiím se od jejich objevu dostalo obrovské pozornosti. Současné studie ukazují vysoký aplikační potenciál nanočástic také pro ošetření rostlin, kde jsou dobře využitelné některé jejich obecné vlastnosti. Mezi ně patří například potřeba jejich nižší koncentrace pro dosažení odpovídajícího účinku, postupné uvolňování živin v případě jejich nanoforem nebo jejich antimikrobiální účinek. V posledním období se objevují studie referující o tom, že pozitivní efekt může přinášet také ošetření semen nanočásticemi, kdy tento fenomén nese označení nanopríming. V předloženém příspěvku jsou představeny nejčastější účinky nanoprímingu vyplývající z literární rešerše, a to spolu s možnými hypotézami vysvětlujícími tyto pozorované jevy. Na praktickém příkladu je pak prezentován vliv ošetření osiv řepky různými nanočásticemi na bázi mědi na růstové parametry sazenic.

**Klíčová slova:** nanopríming, měďnaté nanočástice, sazenice, růstové parametry

### Abstract

Nanotechnology has received enormous attention since its discovery. Current studies show a high application potential of nanoparticles also for the treatment of plants, where some of their general properties can be well utilized. These include, for example, adequate effect is achievable by using significantly lower concentrations, the gradual release of nutrients in the case of their nanoforms, or their antimicrobial effect. Recently, there is an increasing number of studies reporting that seed treatment with nanoparticles can also have a positive effect, when this phenomenon is called nanopríming. In the presented contribution, the most common effects of nanopríming resulting from the literature search are presented, along with possible hypotheses explaining these observed phenomena. Using a practical example, the effect of treating rape seeds with various copper-based nanoparticles on seedling growth parameters is presented.

**Keywords:** nanopríming, copper-based nanoparticles, plantlets, growth parameters

### Úvod

Nanočástice jsou obecně částice, které mají jeden nebo více rozměrů v rozmezí 1-100 nm. Mohou se skládat z mnoha prvků a jejich sloučenin, které jsou tvořeny zejména uhlíkem, kovy, oxidy kovů a různými organickými látkami (Elmer and White, 2018; Fernando et al., 2018; Hasan, 2015; Wang et al., 2017; Zítka et al., 2013). Tvar nanočástic může být plochý, kulovitý, válcový, duté jádro, kónický, spirálový, nepravidelný aj. a jejich povrch může být rovnoměrný nebo nepravidelný s různými variacemi (Machado et al., 2015). Vzhledem k jejich velkému poměru plochy povrchu k objemu se vyznačují značnou reaktivitou, díky čemuž jsou využitelné v mnoha oblastech průmyslu (Jurkow et al., 2020; Kolenčík et al., 2020; Yu et al., 2017).

Současné studie ukazují, že nanočástice mají vysoký aplikační potenciál i v zemědělství. Jedním z možných účelů je použití nanočástic (NPs) jako nanohnojiv za účelem zvýšení produkce plodin. Další významnou skupinu tvoří nanočástice, které se používají jako nanopesticidy (Duhan et al., 2017; Hong et al., 2021), kde se využívá silného antimikrobiálního účinku mnoha typů nanočástic. Relativně novým odvětvím aplikace nanočástic v zemědělství je jejich použití při ošetřování osiva. Ošetření semen za účelem využití jejich zlepšených užitečných vlastností se obecně nazývá priming, v případě použití nanočástic hovoříme o tzv. nanoprimingu. Jedná se o velmi perspektivní metodu pro ovlivnění základních vlastností rostlin ještě před začátkem jejich vývoje (Do Espirito Santo Pereira et al., 2021; Marthandan et al., 2020). Podle účelu použití lze nanopriming rozdělit na aplikace za účelem zlepšení zdravotního stavu osiva z hlediska zabránění jeho kontaminace nežádoucími mikroorganismy, za účelem zvýšení tolerance vůči abiotickým stresovým faktorům a pro zlepšení produkčních vlastností rostlin, které jsou vypěstované z takto ošetřených semen.

V literatuře často zastoupenou oblastí jsou aplikace nanočástic za účelem zlepšení růstových vlastností rostlin. Zvýšení rychlosti klíčení má velký význam zejména u rostlin, které z různých důvodů vykazují přirozeně sníženou rychlost klíčení. Typickým příkladem jsou triploidní odrůdy vodních melounů (*Citrullus lanatus* (Thunb.)), které jsou cenné zejména svými bezsemennými plody. Mechanismy účinků nanočástic stříbra [Ag] v kombinaci s účinky nanoemulzí kurkumového oleje (TNE) byly studovány po jejich aplikaci na semena diploidních a triploidních kultivarů. Aplikace nanočástic přispěla ke zvýšení rychlosti klíčení, metabolické aktivity, zvýšení produkce biomasy a tím i k vyššímu výnosu (Acharya et al., 2020).

Nanočástice stříbra [Ag] mají mnohokrát prokázaný antimikrobiální účinek, po jejich aplikaci byl ale pozorován i efekt zvýšené vitality semen. Jako příklad lze uvést výsledky studie o krátkém vystavení zestárlých semen rýže (*Oryza sativa* L.) nanočásticím stříbra, které vznikly zelenou syntézou a jejich následným sušením. Toto opatření způsobilo zvýšení aktivity enzymů a v důsledku toho se zvýšila i rychlost klíčení a následného vývoje semenáčků (Mahakham et al., 2017). Příznivý účinek nanočástic stříbra [Ag] byl také pozorován při aplikaci na zestárlá semena fazolu (*Vicia faba* L.). Účinkem těchto nanočástic došlo ke snížení genotoxických účinků, které jsou spojeny se stárnutím semen (Younis et al., 2019).

Pro ošetření semen fazolí mungo (*Vigna radiata* L.) byly použity nanočástice oxidu hořečnatého [MgO], kde se zvýšila jejich klíčivost a podpořilo se prodloužení sazenic (Vijai Anand et al., 2020). Semena mungo fazolí byla použita také Sarkarem et al. (2021) pro jejich ošetření nanočásticemi oxidu měďnatého [CuO], které byly potaženy 3-Aminopropyl triethoxysilanem, který byl syntetizován pomocí extraktu z koriandru (*Coriandrum sativum* L.). Autoři pozorovali podobný pozitivní účinek na klíčení a zvýšený příjem vody, jako tomu bylo v případě MgO NPs. Nanopriming manganatými nanočásticemi byl také zkoumán z hlediska možného účinku na příjem dusíku a metabolismus semen fazolí mungo (*Vigna radiata* L.) (Pradhan et al., 2014). Aplikace nanočástic platiny [Pt] stabilizovaných polyvinylpyrrolidonem na semena hrachu (*Pisum sativum* L.) vedla k inhibici rhizobiální kolonizace a arbuskulárních mykorhizních hub. I přes tento negativní efekt vyprodukovaly ošetřené rostliny více semen za kratší dobu než kontrolní rostliny, nicméně semena měla nižší hmotnost (Rahman et al., 2020). Výzkum vlivu nanočástic sulfidu kovů, konkrétně sulfidu stříbrného [Ag<sub>2</sub>S] a sulfidu zinečnatého [ZnS], na semena sóji (*Glycine max* L.) a pšenice (*Triticum aestivum* L.) prokázal pozitivní vliv na rychlost klíčení semen a parametry růstu (Afsheen et al., 2020). Další výsledky potvrdily, že nanopriming semen kukuřice (*Zea mays* L.) nanočásticemi chitosanu se zapouzdřeným zinkem [Zn] má pozitivní vliv na klíčení semen. Současně byl kompenzován nedostatek zinku [Zn] v rostlinách a byl pozorován antimikrobiální účinek proti patogenní houbě *Curvularia lunata* (Choudhary et al., 2019). Aby se zvýšila klíčivost semen rýže (*Oryza sativa* L.) a vitalita sazenic, Afzal et al. (2021) použili dvě formy železných částic: oxid železitý [FeO], který byl fytochemicky stabilizován extraktem z květů *Cassia occidentalis* L., a síran

železitý [FeSO<sub>4</sub>]. Nanočástice FeO ve výsledcích vykazovaly příznivější vliv na růst rostlin ve srovnání s FeSO<sub>4</sub>. V jiné studii bylo popsáno nanoprimování semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) nanočásticemi oxidu železa [Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>] pro zvýšení klíčivosti semen. Je zajímavé, že ošetření semen způsobilo zvýšení biofortifikace železem [Fe] a akumulaci v produkovaných semenech (Sundaria et al., 2018). Další nanočástice na bázi Fe byla použita jako stabilizátor na křemičitém substrátu a aplikována do půdy. Následně byla do tohoto substrátu vyseta semena kukuřice (*Zea mays* L.) a ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Bylo pozorováno zkrácení doby klíčení, zvýšení rychlosti růstu a vyšší tvorba biomasy (Najafi Disfani et al., 2016). Ne vždy však byl po ošetření nanočásticemi pozorován jasný pozitivní efekt. Například nanopriming, který byl proveden na semenech pšenice (*Triticum aestivum* L.) s použitím nanočástic oxidu zinečnatého [ZnO] potvrdil, že má sice příznivý vliv na klíčení semen, ale negativně ovlivnil následný vývoj rostlin (Awasthi et al., 2017). Podobné pozorování učinili v další studii Xiang et al. (2015), kde čtyři typy nanočástic na bázi Zn neměly negativní vliv na rychlost klíčení, byl však zaznamenán inhibiční účinek na prodlužování kořenů a výhonků rostlin čínské zelí (*Brassica pekinensis* L.).

V předloženém článku jsou představeny výsledky testování účinku různých modifikací nanočástic na bázi mědi na vlastnosti semenáčů tří odrůd řepky olejně.

## **Materiál a metody**

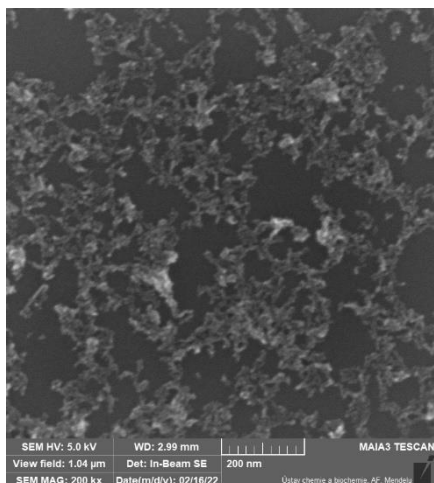
### Rostlinný materiál

Nanopriming byl proveden na odrůdách brukve řepky (*Brassica napus* L.) Ocelot, Sonyx a Orex. Navážky osiva byly nejprve povrchově desinfikovány s použitím 1% roztoku chlornanu sodného, ve kterém bylo máčeno po dobu 2 minut. Poté bylo osivo 3x opláchnuto ekvivalentním objemem sterilní vody z řadu. Desinfikované osivo bylo v tenké vrstvě umístěno na filtrační papír, kde došlo za neustálého proudění vzduchu k oschnutí při pokojové teplotě po 24 hodin.

### Nanopriming

K nanoprimingu byly použity nanočástice na bázi mědi používající různé nosiče a přídavné materiály. Všechny tyto nanočástice byly syntetizovány na Ústavu chemie a biochemie, AF MENDELU, kde také prošly kontrolou prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie z hlediska jejich charakteru a distribuce velikostí. Konkrétně se jedná o nanočástice s pracovním označením GO\_Cu1 (GO = grafenoxid), rGO\_Cu2 (rGO = redukovaný grafenoxid), Biochar\_Cu1 a Cu\_NPs\_57 (viz Obr. 1). Postup nanoprimingu spočíval v máčení jednotlivých navážek osiva v roztocích jednotlivých NPs po dobu 2,5 hodin, za stálého míchání při 22°C. Objemový poměr osiva k primovacímu roztoku činil vždy 1:4. Koncentrace všech použitých NPs byly ředěním v demineralizované vodě sjednoceny na 50 mg Cu/l. Jako kontrolní varianta byla použita sterilní voda z řadu, rovněž byla zahrnuta suchá varianta představující navážku desinfikovaného osiva bez jakékoli další úpravy. Po uplynutí času pro priming bylo osivo zbaveno přebytečného roztoku NPs na filtračním papíře, poté bylo ihned umístěno na vlhký nakličovací papír. Osivo na papíře bylo umístěno do nakličovacích boxů a inkubováno při 22°C a 8hodinové světelné periodě. Každá varianta byla vyhotovena ve třech opakováních, přičemž jedno opakování tvořilo vždy 50 kusů semen. U osiva byl hodnocen parametr klíčivosti, váha semenáčku a sušina, dále byla individuálně u každé klíčící rostliny posuzována délka stonku a délka kořene. Nevyklíčené osivo bylo hodnoceno dle metodiky zkoušení osiva a sadby vycházejícím ze standardu ISTA. Data z měření byla zpracována s využitím programu STATISTICA.

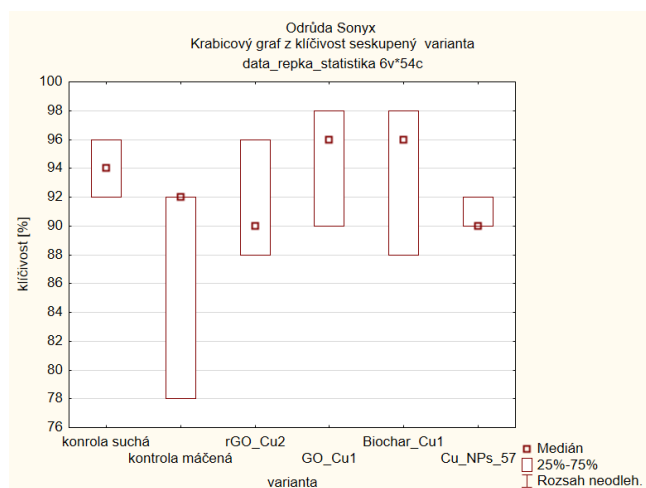
Obrázek 1. Nanočástice Cu\_NPs\_57 zobrazené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu



## Výsledky

Jak je uvedeno výše, mezi hodnocenými parametry byla i klíčivost. U všech tří odrůd obvykle dosahovala klíčivost zaznamenaná u neošetřených variant hodnoty nad 95 % a teoretický prostor na zlepšení tohoto parametru nanoprimingem u byl proto nízký. To se také potvrdilo, analýzy neprokázaly u žádné z variant statisticky průkazné zvýšení klíčivosti univerzálně u všech tří odrůd (data nejsou prezentována). Také u dalších parametrů nebyly pozorovány statisticky průkazné rozdíly, pokud byly parametry hodnoceny směsně pro všechny tři odrůdy (data nejsou prezentována). Rozdíly lze ale zaznamenat při posouzení ošetření na úrovni jednotlivých odrůd. Jedním z takovýchto parametrů je klíčivost u odrůdy Sonyx, kde bylo oproti mokré kontrole, tzn. bez ošetření nanočásticemi, zaznamenáno u některých variant ošetření zlepšení tohoto parametru (viz Obr. 2).

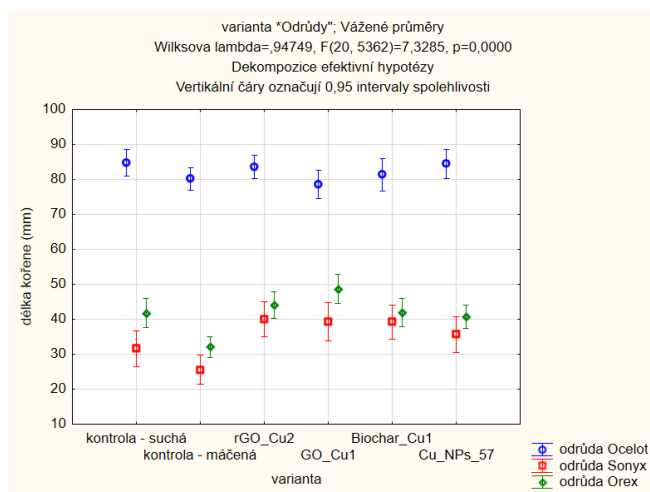
Obrázek 2. Výsledky srovnání klíčivosti u kontrolních a nanočásticemi ošetřených variant odrůdy Sonyx



Dalším příkladem je vlastnost délky kořene (viz Obr. 3), kde bylo dosaženo statisticky průkazné prodloužení délky kořene oproti mokré kontrole u všech ošetřených variant odrůdy Sonyx. Podobný efekt tzn. statisticky průkazně delší kořeny oproti mokré kontrole byly

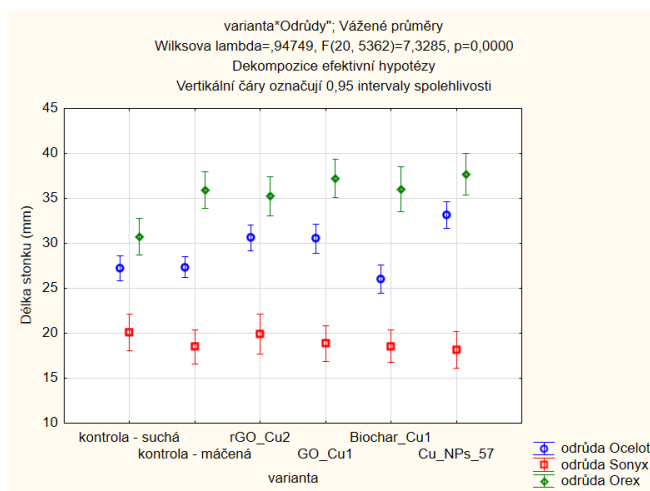
pozorovány také u odrůdy Orel, přičemž nejsilněji tento efekt vyvolávaly varianty ošetřené nanočásticemi rGO\_Cu2 a GO\_Cu1.

Obrázek 3. Výsledky srovnání délky kořene u kontrolních a nanočásticemi ošetřených variant tří odrůd řepky



Posledním parametrem, u kterého byly na úrovni odrůd zaznamenány statisticky průkazné rozdíly je délka stonku (viz Obr. 4). Zde došlo k průkaznému navýšení oproti suché kontrole u odrůdy Orel u všech dalších variant. V případě odrůdy Ocelot pak došlo k průkaznému prodloužení stonku oproti oběma kontrolám u variant ošetřených nanočásticemi rGO\_Cu2, GO\_Cu1 a Cu\_NPs\_57, kde byl prodlužovací efekt na stonek nejvyšší.

Obrázek 4. Výsledky srovnání délky stonku u kontrolních a nanočásticemi ošetřených variant tří odrůd řepky



## Diskuze

Ze získaných výsledků je zřejmé, že ošetření osiva řepky nanočásticemi na bázi mědi může statisticky významně ovlivňovat vzrůst kořenové části rostliny a délku stonku. Dosažený efekt se však různí mezi použitými odrůdami a není tedy bohužel univerzální. Pokud budeme považovat za pozitivní efekt zvýšenou délku kořene, jeví se jako perspektivní pro další testování nanočástice GO\_Cu1. V případě prodloužení délky stonku se pak jako perspektivní jeví nanočástice Cu\_NPs\_57. Intenzivnější růst při použití nanočástic na bázi mědi publikovali také např. Shah a Belozereva (2008) u salátu, Van Nguyen et al. (2021) uvádí nárůst obsahu chlorofylu, karotenoidů a zvýšenou aktivitu antioxidantních enzymů. Další publikace při použití nanočástic na bázi mědi uvádí zlepšení klíčení u pšenice (Yasmeen et al., 2017) a mungo fazolí (Sarkar et al., 2021). Vzhledem k relativně vysokým úrovním klíčivosti u všech tří testovaných odrůd bylo obtížné takovéto trendy v rámci našeho experimentu zachytit, nicméně výsledky u odrůdy Sonyx naznačují, že své uplatnění může tento typ nanočástic najít i u řepky. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o počáteční sérii experimentů realizovaných na daném pracovišti, je prozatím obtížné identifikovat příčiny rozdílné odezvy mezi odrůdami. Ke zevšeobecnění bude nutné analyzovat více sad experimentů. Nicméně předpokládáme, že jedním z parametrů, které mohou mít na tuto variabilitu vliv, je stáří testovaného osiva.

## Závěr

Výsledky naznačují pozitivní účinek nanoprímingu v oblasti klíčení a prodlužovacího růstu kořene a stonku u rostlin vzešlých ze semen po nanoprímingu. V následném období budeme chtít ověřit účinek nejperspektivnějších nanočástic a dále otestovat další nanočástice na jiné chemické bázi. Na základě požadavků z praxe bychom také rádi připravili varianty se sníženou klíčivostí, které by se staly základem pro testování využitelnosti nanočástic u osiv s problematickou klíčivostí.

## Poděkování

Tento článek vznikl na základě podpory projektu QK22010031 „Využití inovačního potenciálu nanotechnologií ke zvýšení rentability vybraných oblastí zemědělské výroby“ (agentura NAZV, MZe ČR) a využitím infrastruktury získané Operačním programem pro Výzkum, vývoj a vzdělávání - Výzkumná infrastruktura pro mladé vědce, číslo projektu CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002334.

## Literatura

- Afzal, S.; Sharma, D.; Singh, N.K. Eco-friendly synthesis of phytochemical-capped iron oxide nanoparticles as nano-priming agent for boosting seed germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Sci Pollut Res Int* **2021**, *28*, 40275–40287, doi:10.1007/s11356-020-12056-5.
- Afsheen, S.; Naseer, H.; Iqbal, T.; Abrar, M.; Bashir, A.; Ijaz, M. Synthesis and characterization of metal sulphide nanoparticles to investigate the effect of nanoparticles on germination of soybean and wheat seeds. *Materials Chemistry and Physics* **2020**, *252*, doi:10.1016/j.matchemphys.2020.123216.
- Acharya, P.; Jayaprakasha, G.K.; Crosby, K.M.; Jifon, J.L.; Patil, B.S. Nanoparticle-Mediated Seed Priming Improves Germination, Growth, Yield, and Quality of Watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. *Sci Rep* **2020**, *10*, 5037, doi:10.1038/s41598-020-61696-7.

- Awasthi, A.; Bansal, S.; Jangir, L.K.; Awasthi, G.; Awasthi, K.K.; Awasthi, K. Effect of ZnO Nanoparticles on Germination of Triticum aestivum Seeds. *Macromolecular Symposia* **2017**, *376*, doi:10.1002/masy.201700043.
- Do Espirito Santo Pereira, A.; Caixeta Oliveira, H.; Fernandes Fraceto, L.; Santaella, C. Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, *11*, doi:10.3390/nano11020267.
- Duhan, J.S.; Kumar, R.; Kumar, N.; Kaur, P.; Nehra, K.; Duhan, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnol Rep (Amst)* **2017**, *15*, 11-23, doi:10.1016/j.btre.2017.03.002.
- Elmer, W.; White, J.C. The Future of Nanotechnology in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology* **2018**, *56*, 111-133, doi:10.1146/annurev-phyto-080417-050108.
- Fernando, S.S.N.; Gunasekara, T.; Holton, J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases* **2018**, *8*, doi:10.4038/sljid.v8i1.8167.
- Choudhary, R.C.; Kumaraswamy, R.V.; Kumari, S.; Sharma, S.S.; Pal, A.; Raliya, R.; Biswas, P.; Saharan, V. Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop yield. *Int J Biol Macromol* **2019**, *127*, 126-135, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.274.
- Jurkow, R.; Pokluda, R.; Sekara, A.; Kalisz, A. Impact of foliar application of some metal nanoparticles on antioxidant system in oakleaf lettuce seedlings. *BMC Plant Biol* **2020**, *20*, 290, doi:10.1186/s12870-020-02490-5.
- Hasan, S. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Res. J. Recent. Sci.* **2015**, *4*, 1-3.
- Hong, J.; Wang, C.; Wagner, D.C.; Gardea-Torresdey, J.L.; He, F.; Rico, C.M. Foliar application of nanoparticles: mechanisms of absorption, transfer, and multiple impacts. *Environmental Science: Nano* **2021**, *8*, 1196-1210, doi:10.1039/d0en01129k.
- Kolencik, M.; Ernst, D.; Urik, M.; Durisova, L.; Bujdos, M.; Sebesta, M.; Dobrocka, E.; Ksinan, S.; Illa, R.; Qian, Y.; et al. Foliar Application of Low Concentrations of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles to the Common Sunflower under Field Conditions. *Nanomaterials (Basel)* **2020**, *10*, doi:10.3390/nano10081619.
- Machado, S.; Pacheco, J.G.; Nouws, H.P.; Albergaria, J.T.; Delerue-Matos, C. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Sci Total Environ* **2015**, *533*, 76-81, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.091.
- Mahakham, W.; Sarmah, A.K.; Maensiri, S.; Theerakulpisut, P. Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Sci Rep* **2017**, *7*, 8263, doi:10.1038/s41598-017-08669-5.
- Marthandan, V.; Geetha, R.; Kumutha, K.; Renganathan, V.G.; Karthikeyan, A.; Ramalingam, J. Seed Priming: A Feasible Strategy to Enhance Drought Tolerance in Crop Plants. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21218258.
- Najafi Disfani, M.; Mikhak, A.; Kassae, M.Z.; Maghari, A. Effects of nano Fe/SiO<sub>2</sub> fertilizers on germination and growth of barley and maize. *Archives of Agronomy and Soil Science* **2016**, *63*, 817-826, doi:10.1080/03650340.2016.1239016.
- Pradhan, S.; Patra, P.; Mitra, S.; Dey, K.K.; Jain, S.; Sarkar, S.; Roy, S.; Palit, P.; Goswami, A. Manganese nanoparticles: impact on non-nodulated plant as a potent enhancer in nitrogen metabolism and toxicity study both in vivo and in vitro. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 8777-8785, doi:10.1021/jf502716c.
- Rahman, M.S.; Chakraborty, A.; Mazumdar, S.; Nandi, N.C.; Bhuiyan, M.N.I.; Alauddin, S.M.; Khan, I.A.; Hossain, M.J. Effects of poly(vinylpyrrolidone) protected platinum nanoparticles on seed germination and growth performance of Pisum sativum. *Nano-Structures & Nano-Objects* **2020**, *21*, doi:10.1016/j.nanoso.2019.100408.

- Sarkar, N.; Sharma, R.S.; Kaushik, M. Innovative application of facile single pot green synthesized CuO and CuO@APTES nanoparticles in nanopriming of *Vigna radiata* seeds. *Environ Sci Pollut Res Int* **2021**, *28*, 13221-13228, doi:10.1007/s11356-020-11493-6.
- Shah, V.; Belozerova, I. Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water Air Soil Pollut.* **2008**, *197*, 143–148
- Sundaria, N.; Singh, M.; Upreti, P.; Chauhan, R.P.; Jaiswal, J.P.; Kumar, A. Seed Priming with Iron Oxide Nanoparticles Triggers Iron Acquisition and Biofortification in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grains. *Journal of Plant Growth Regulation* **2018**, *38*, 122-131, doi:10.1007/s00344-018-9818-7.
- Van Nguyen, D.; Nguyen, H.M.; Le, N.T.; Nguyen, K.H.; Nguyen, H.T.; Le, H.M.; Nguyen, A.T.; Dinh, N.T.T.; Hoang, S.A.; Van Ha, C. Copper Nanoparticle Application Enhances Plant Growth and Grain Yield in Maize Under Drought Stress Conditions. *J. Plant Growth Regul.* **2021**, *41*, 364–375.
- Vijai Anand, K.; Anugraha, A.R.; Kannan, M.; Singaravelu, G.; Govindaraju, K. Bio-engineered magnesium oxide nanoparticles as nano-priming agent for enhancing seed germination and seedling vigour of green gram (*Vigna radiata* L.). *Materials Letters* **2020**, *271*, doi:10.1016/j.matlet.2020.127792.
- Wang, L.; Hu, C.; Shao, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine* **2017**, *Volume 12*, 1227-1249, doi:10.2147/ijn.s121956.
- Xiang, L.; Zhao, H.M.; Li, Y.W.; Huang, X.P.; Wu, X.L.; Zhai, T.; Yuan, Y.; Cai, Q.Y.; Mo, C.H. Effects of the size and morphology of zinc oxide nanoparticles on the germination of Chinese cabbage seeds. *Environ Sci Pollut Res Int* **2015**, *22*, 10452-10462, doi:10.1007/s11356-015-4172-9.
- Yasmeen, F.; Raja, N.I.; Razzaq, A.; Komatsu, S. Proteomic and physiological analyses of wheat seeds exposed to copper and iron nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2017**, *1865*, 28–42.
- Younis, M.E.; Abdel-Aziz, H.M.M.; Heikal, Y.M. Nanopriming technology enhances vigor and mitotic index of aged *Vicia faba* seeds using chemically synthesized silver nanoparticles. *South African Journal of Botany* **2019**, *125*, 393-401, doi:10.1016/j.sajb.2019.08.018.
- Yu, M.; Yao, J.; Liang, J.; Zeng, Z.; Cui, B.; Zhao, X.; Sun, C.; Wang, Y.; Liu, G.; Cui, H. Development of functionalized abamectin poly(lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. *RSC Advances* **2017**, *7*, 11271-11280, doi:10.1039/c6ra27345a.
- Zítka, O.; *Moderní nanotechnologie na počátku 21. století: kolekce učebních textů projektu OPVK NANOTEAM*; Vysoké učení technické v Brně: **2013**.

## Kontakt

doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

Mendeleum – ústav genetiky, Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně

Valtická 334, Lednice, 691 44, Česká republika

608871214, [baranek@mendelu.cz](mailto:baranek@mendelu.cz)



## Semena lnu po ošetření laserem

Flax seeds after laser treatment

Bjelková M<sup>1</sup>, Wagner J,<sup>2</sup> Skopal J<sup>2</sup>, Ondráčková E<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Agritec Plant Research s.r.o.

<sup>2</sup>Fytolaser s.r.o.

### Abstrakt

Nevhodné klimatické podmínky při dozrávání lněných semen (*Linum usitatissimum*), chybně vedená sklizeň a nepříliš optimální podmínky uskladnění mohou být příčinou ataku chorob a následně sníženého klíčení semen. Pro omezení těchto negativních vlivů byla využita laserová stimulace jako alternativa udržitelná k chemickému ošetření. V příspěvku je hodnoceno ošetření semen olejného lnu odrůd Raciol, Astella a Agriol a vliv na výskyt patogenů a schopnost klíčení.

**Klíčová slova:** Len, laser, klíčení,

### Abstract

Unsuitable climatic conditions during the ripening of flax seeds (*Linum usitatissimum*), wrongly managed harvesting and sub-optimal storage conditions can be the cause of disease attack and subsequently reduced seed germination. Laser stimulation was used as a sustainable alternative to chemical treatment to limit these negative effects. The article evaluates the treatment of oilseeds of the Raciol, Astella and Agriol varieties and the effect on the occurrence of pathogens and the germination capacity.

**Keywords:** Flax, laser, germination

### Úvod

Semena olejného lnu jsou cenným artiklem s aplikacemi v různých odvětvích, včetně potravin a krmiv pro zvířata, především pro vysoký obsah omega-3 mastných kyselin, lignanů a rozpustné vlákniny, které jej činí vysoce atraktivním. Základním parametrem semen je jeho vitalita, která může být ovlivněna nevhodnými povětrnostními podmínkami, případně agrotechnickou chybou při vedení porostu a sklizně a nakonec i nevhodnými skladovacími podmínkami. Z důvodu snižování pesticidních přípravků na ochranu rostlin jsou testovány různé metody ošetření semen jako náhrada za moření. Jedněmi ze zkoušených metod jsou i optické techniky. Optické metody mohou snížit škodlivé účinky používání chemikálií na životní prostředí a současně zlepšit vitalitu semen pro optimální růst plodiny. Vliv laserové biostimulace na zvýšení růstových charakteristik různých semen byly zkoumány u pšenice (Jamil et al., 2013), hrachu (Podlesna et al., 2015), slunečnice a sóji (Asgar et al., 2012, 2016) i například lupiny (Podlesny et al., 2012). V roce 2022 byl publikován první pokus laserové biostimulace na klíčivost lněných semen na zvrácení důsledků špatného skladování (Nadini et al., 2022a, 2022b). Výsledky naší studie budou základní znalostí o biostimulaci lněných semen laserem v České republice.

### Materiál a metody

Semena lnu setého olejného, odrůd Raciol, Astella a Agriol byly ošetřeny laserovou expozicí metodou FYTOLASER. Toto zařízení bylo konstruováno pro stimulaci biomasy a bylo navrženo variabilně pro široké spektrum použití. Hlavními prvky jsou násypka, dopravníkový

pás a expoziční laserová "hlava". Laserová hlava obsahuje lasery a optomechaniku pro distribuci laserového záření na vrstvu osiva na páse. Zvolená konfigurace využívá rozmítání laserového svazku do linie pomocí polygonu. Zařízení FYTOLASER umožňuje úpravu a distribuci laserového svazku tak, aby laserový svazek pokryl s vysokou rovnoměrností, zvolenou intenzitou laserového svazku a zvolenou dávkou laserového záření. Intenzita laserového svazku je upravována běžnou optikou, dávka záření je nastavena rychlostí posuvu pásu a výkonovými parametry laseru. I tato základní konfigurace má svoje limity v pokrytí vhodné šířky pásu. Pro zvýšení výkonu zařízení je v laserové hlavě více polygonů s unikátní konfigurací více laserů. Každá ze skupin laserů vytváří za provozu na dopravníkové pásu linii, v níž dochází k expozici osiva. Do jedné skupiny laserů je možné umístit lasery různé vlnové délky, případně různých výkonů, které mohou působit souběžně. Lasery jedné skupiny je možno zapínat jednotlivě, nebo společně. Svazek každého laseru je podle potřeby optikou upravován na vhodný průměr, tím je modifikována jeho intenzita. Optickomechanické uspořádání FYTOLASERu zajišťuje úpravu laserového svazku na vhodnou expozici a rovnoměrné rozdělení energie laserů v linii na pásu v šířce, která umožňuje praktické použití. Násypka – zásobník na exponovaný materiál je vybavena vibrátorem, posuvným hradítkem, které způsobuje na dně násypky šterbinu. Tato sestava zajišťuje při provozu rovnoměrné vysypávání materiálu různých pro expozici z násypky na dopravníkový pás tak, aby se vrstvil rovnoměrně ve vrstvě, odpovídající příčnému rozměru exponovaného zrna. Konstrukce byla ověřena jako funkční pro osivo velikosti máku až sóje. Dopravníkový pás je poháněn elektromotorem, elektronika umožňuje měnit rychlost posuvu pásu. Jeho šířka odpovídá šířce expoziční linie laseru. Součástí dopravníkového pásu je „výsypka“, která zajišťuje sběr exponovaného osiva do nádoby k další manipulaci. V pokusech bylo sledováno 11 variant včetně kontroly (tabulka 1). Varianty se lišily vlnovou délkou použitého laseru (modré 450 nm, zelené 532 nm, červené 650 nm) výkonem použitého laseru (200 - 1000 mW) a dobou expozice. Přehled jednotlivých variant je v následující tabulce. Konkrétní hodnoty expozice jsou k dispozici u autorů (tabulka 1). Pro určení kontaminace byly vzorky semen aplikovány na agarový substrát (RoseBengal Chloramphenicol Agar (Himedia)). Tento agar byl sterilizován v autoklávu 15 minut při 121 °C. Do každé Petriho misky byla rozložena semena a po 9 dnech byl vyhodnocen výskyt hub. Klíčení bylo provedeno dle standardní metodiky pro klíčení semen dle ÚKZÚZ.

Tabulka 1: Varianty ošetření semen

Označení varianty	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ošetření – expozice	Kontrola	1 – 2	1 – 8	2 – 8	4 – 8	11 – 8	21 – 8	41 – 8	42 – 8	123 – 2	123 – 8

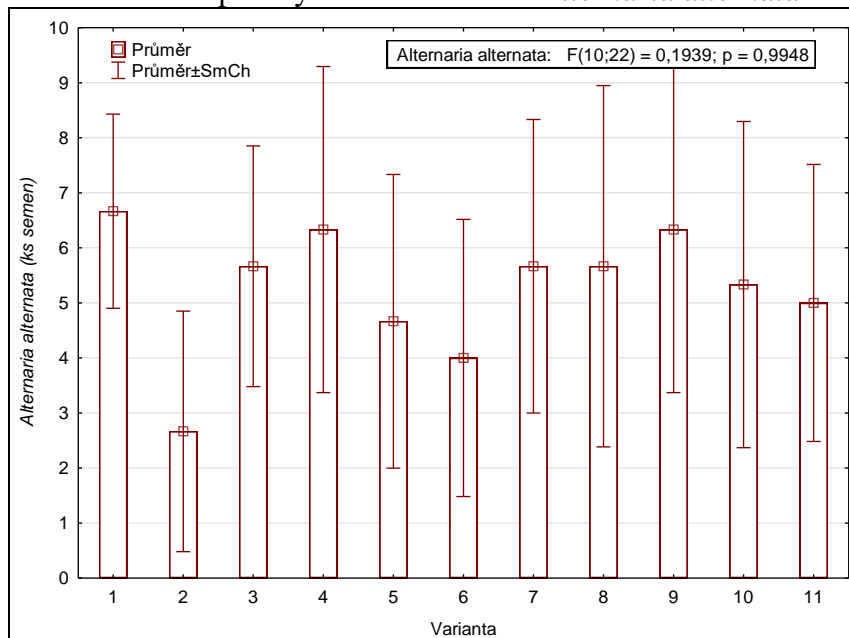
## Výsledky

Z pohledu zdravotního stavu byl hodnocen výskyt hub na semenech lnu v ošetřených variantách oproti kontrole. Byly diagnostikovány houby rodu *Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp., *Mucor*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Coletotrichum lini* a bakterie *Bacillus subtilis*, včetně dalších neurčených bakteriálních kontaminací. Zajímavé bylo hodnocení výskytu hub rodu *Alternaria alternata*, kde bylo zjištěno snížení výskytu oproti kontrole a u varianty expozice 1-2 nm signifikantně oproti kontrole (Graf 1). Velmi zajímavým zjištěním byl signifikantní výskyt nepatogenní v půdě žijící grampozitivní aerobní bakterie *Bacillus subtilis* ve všech ošetřených variantách a nulový výskyt v kontrole (Graf 2). Při hodnocení napadených semen houbami rodu *Fusarium* spp. byly zjištěny významné meziodrůdové rozdíly, kdy u odrůd Astella a Raciol byl výskyt nevýznamný, ale u odrůdy Agriol měla většina testovaných variant vliv na snížení výskytu výše jmenované houby (tabulka 2 a graf 3).

Tabulka 2: Výsledky zjištěných rodů hub u odrůd olejných lnů

Odrůda	Varianta	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	další bakteriální kontaminace	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Mucor</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> sp.	Neurčené	<i>Colletotrichum lini</i>
Raciol	Kontrola	4	0	6	1	0	0	0	0	0	0
Raciol	1-2	0	11	1	0	0	0	0	0	0	0
Raciol	1-8	3	9	0	0	1	0	0	0	0	0
Raciol	2-8	5	7	2	0	0	0	0	0	0	0
Raciol	4-8	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Raciol	11-8	2	10	0	1	0	0	0	0	0	0
Raciol	21-8	3	9	0	3	0	1	0	0	0	0
Raciol	41-8	4	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Raciol	42-8	5	8	1	2	0	0	0	0	0	0
Raciol	123-2	1	11	0	0	1	0	0	0	0	0
Raciol	123-8	2	9	0	0	1	1	0	0	1	0
Astella	Kontrola	6	0	3	0	0	0	0	3	0	0
Astella	1-2	1	9	0	0	1	0	0	0	0	0
Astella	1-8	4	6	0	0	0	1	0	1	0	0
Astella	2-8	2	5	0	0	1	0	0	0	0	0
Astella	4-8	2	9	0	0	0	0	0	1	0	0
Astella	11-8	1	10	0	0	0	0	0	1	4	0
Astella	21-8	3	8	0	0	0	0	0	2	0	0
Astella	41-8	1	12	0	0	0	0	0	1	1	0
Astella	42-8	2	9	0	0	2	0	0	2	2	0
Astella	123-2	4	11	0	0	0	0	0	1	2	0
Astella	123-8	3	9	0	0	0	0	0	1	1	0
Agriol	Kontrola	10	0	5	0	0	3	0	0	2	0
Agriol	1-2	7	2	1	0	0	1	0	0	0	0
Agriol	1-8	10	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Agriol	2-8	12	0	11	0	0	2	0	0	0	0
Agriol	4-8	10	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Agriol	11-8	9	1	8	0	0	2	0	0	0	0
Agriol	21-8	11	0	10	0	1	2	0	0	0	0
Agriol	41-8	12	0	10	0	0	3	0	0	0	0
Agriol	42-8	12	0	8	0	1	3	0	0	0	0
Agriol	123-2	11	2	9	0	0	1	0	0	0	0
Agriol	123-8	10	0	7	0	0	2	0	0	0	1

Graf 1: Počet napadených semen houbou *Alternaria alternata*



Pozn.:

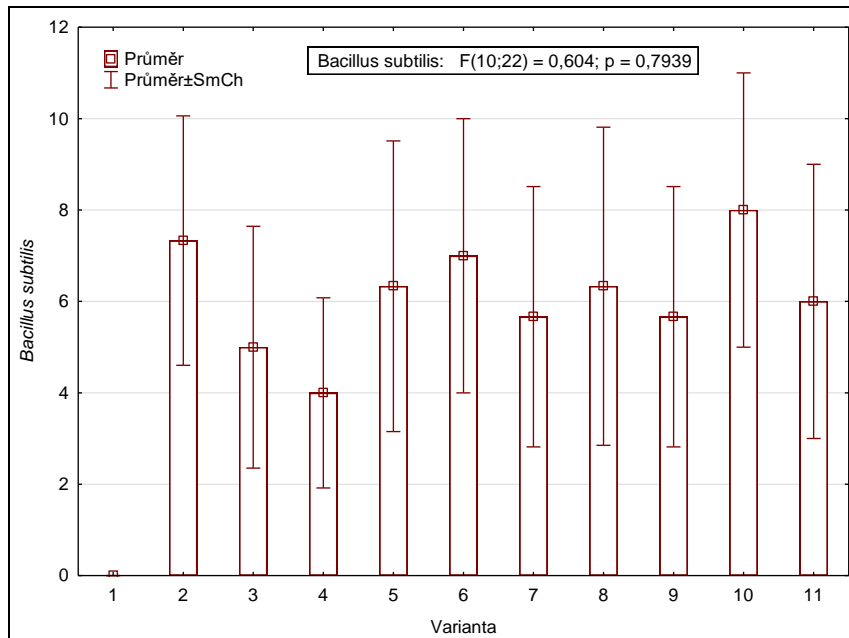
Označení

varianty 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Ošetření –

expozice Kontrola 1–2 1–8 2–8 4–8 11–8 21–8 41–8 42–8 123–2 123–8

Graf 2: Počet napadených semen bakterií *Bacillus subtilis*



Pozn.:

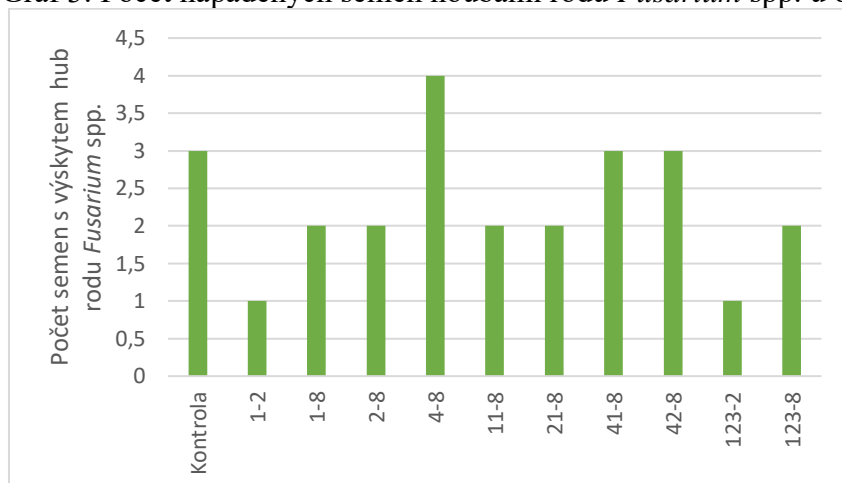
Označení

varianty 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Ošetření –

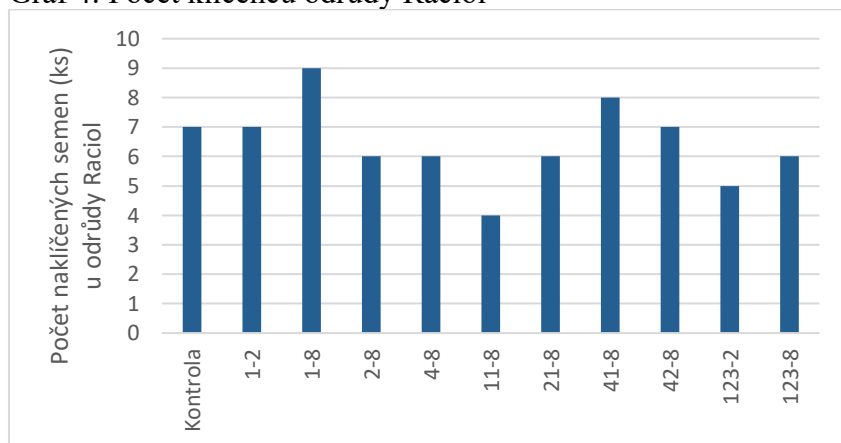
expozice Kontrola 1–2 1–8 2–8 4–8 11–8 21–8 41–8 42–8 123–2 123–8

Graf 3: Počet napadených semen houbami rodu *Fusarium* spp. u odrůdy Agriol

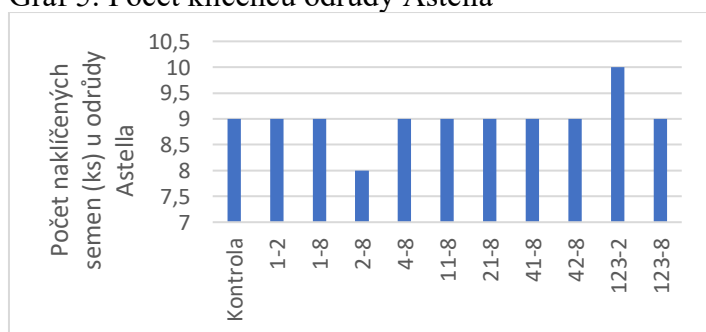


Hodnocením celkového počtu klíčenců byl zjištěn odlišný vliv expozice ošetření na jednotlivé odrůdy, jak ukazují grafy 4, 5, 6. U odrůdy Raciol došlo ke zvýšení počtu klíčenců u variant expozice 1-8 a 41-8 nm oproti kontrole, ale u odrůd Astella a Agriol se tyto varianty expozice v pozitivním výsledku neprojeví. U odrůdy Astella byl zjištěn pozitivní vliv pouze u varianty expozice 123-2 nm a průkazně snížení u varianty expozice 2-8 nm oproti kontrolní variantě. U odrůdy Agriol byl zjištěn negativní vliv všech variant oproti kontrole a tento výsledek také kompletně ovlivnil celkový průměr za len jako plodinu (graf 7). Z těchto předložených výsledků je možno usuzovat, že ne všechna ošetření semen budou stejně vhodná z pohledu jednotlivých odrůd.

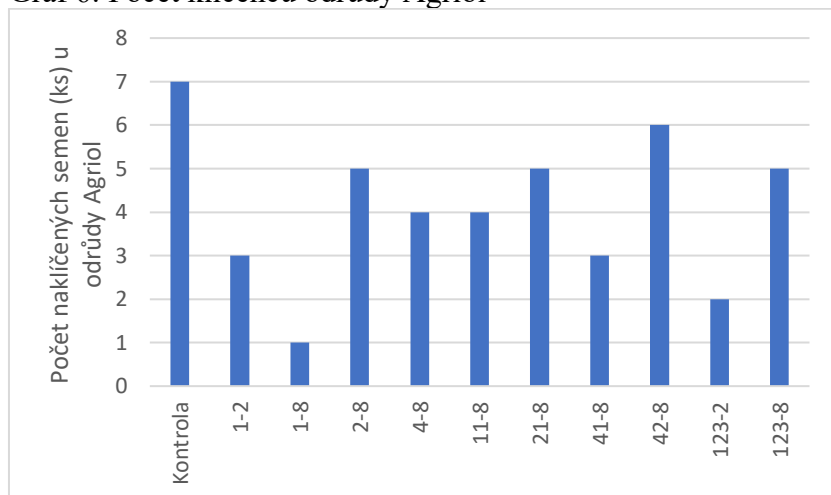
Graf 4: Počet klíčenců odrůdy Raciol



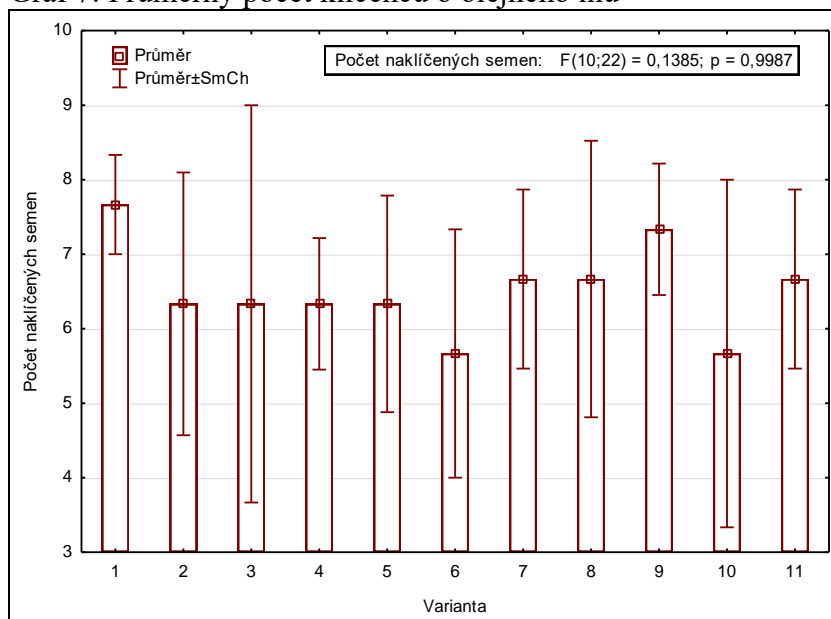
Graf 5: Počet klíčenců odrůdy Astella



Graf 6: Počet klíčenců odrůdy Agriol



Graf 7: Průměrný počet klíčenců o olejného lnu



Pozn.:

Označení

varianty 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Ošetření –

expozice Kontrola 1-2 1-8 2-8 4-8 11-8 21-8 41-8 42-8 123-2 123-8

Při vyhodnocení vzájemných vztahů zjištěných houbových patogenů a počtu vyklíčených semen byla zjištěna negativní signifikantně vysoká korelace mezi bakterií *Bacillus subtilis* a *Alternaria alternata* ( $r = -0,89$ ) a vysoká, pozitivně signifikantní korelace mezi *Alternaria alternata* a dalšími bakteriálními kontaminacemi ( $r = 0,80$ ) a podobně také ke vztahu k houbě *Fusarium* ( $r = 0,84$ ). Hodnocením počtu vyklíčených semen byl zjištěn středně vysoký negativní vztah k *Alternaria alternata* ( $r = -0,63$ ). Také vztah mezi počtem vyklíčených semen a houbami rodu *Fusarium* spp. a vykazoval středně negativní signifikantní vztah ( $r = -0,58$ ) a naopak střední signifikantně pozitivní k houbám rodu *Penicilium* sp. ( $r = 0,58$ ). Zajímavý byl vztah mezi *Bacillus subtilis* a počtem vyklíčených semen, který vykazoval signifikantně střední závislost ( $r = 0,55$ ).

Tabulka 3: Vzájemné korelace sledovaných parametrů

	<i>Bacillus subtilis</i>	Další bakteriální kontaminace	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Mucor</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> sp.	Neurčené	<i>Colletotrichum lini</i>	Počet vyklíčených semen
<i>Alternaria alternata</i>	-0,89*	0,80*	-0,14	-0,18	0,84*	-0,27	-0,23	0,21	-0,63*
<i>Bacillus subtilis</i>		-0,73*	0,15	0,15	-0,75*	0,17	0,29	-0,22	0,55*
další bakteriální kontaminace			-0,12	-0,07	0,58*	-0,26	-0,21	0,22	-0,46*
<i>Cladosporium</i> sp.				-0,18	-0,12	-0,18	-0,15	-0,06	-0,05
<i>Mucor</i>					-0,08	0,04	0,10	-0,09	0,19
<i>Fusarium</i> spp.						-0,36*	-0,12	0,18	-0,58*
<i>Penicillium</i> sp.							0,32	-0,09	0,58*
Neurčené								-0,08	0,40*
<i>Colletotrichum lini</i>									-0,11

Pozn.: \* vyznačení průkaznosti

## Diskuze

Výsledky Nadimi et al., 2022b poukazují na nesignifikantní výsledky, ale jejich zeleným/infračerveným laserem s dvojitou vlnovou délkou bylo vhodným nastavením zlepšeno procento klíčení. Námi testované ošetření se projevilo pouze u některých variant odrůd Agriol a Astella. Kromě toho bylo dosaženo významného snížení výskytu hub rodu *Alternaria alternata* a *Fusarium* spp. Celkově tato studie demonstruje schopnost ošetření laserem a nabízí novou cestu ke snížení počtu používání chemikálií.

## Závěr

Byly předloženy prvotní pozitivní i negativní výsledky, které ukazují, že ve výzkumné práci v této oblasti je nutné pokračovat. Nabízí se diskuze ohledně toku biomasy při ošetření laserem, její možnosti s expozicí celých povrchů semen a využitím i širšího spektra vlnových délek i odrůd lnu.

## Poděkování

Príspevek vznikl v rámci řešení výzkumného projektu MZe RO1019, MZe NAZV QJ1910302 a QK21010151.

## Literatura

Jamil, Y.; Perveen, R.; Ashraf, M.; Ali, Q.; Iqbal, M.; Ahmad, M.R. He-Ne Laser-Induced Changes in Germination, Thermodynamic Parameters, Internal Energy, Enzyme Activities and Physiological Attributes of Wheat during Germination and Early Growth. *Laser Phys. Lett.* 2013, 10, 045606.

Podlesna, A.; Gładyszewska, B.; Podlesny, J.; Zgrajka, W. Changes in the Germination Process and Growth of Pea in Effect of Laser Seed Irradiation. *Int. Agrophys.* 2015, 29, 485–492.

Asghar, T.; Iqbal, M.; Jamil, Y.; Haq, Z.U.; Nisar, J.; Shahid, M. Comparison of He-Ne Laser and Sinusoidal Non-Uniform Magnetic Field Seed Pre-Sowing Treatment Effect on Glycine Max (Var 90-I) Germination, Growth and Yield. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2017, 166, 212–219.

Asghar, T.; Jamil, Y.; Iqbal, M.; Haq, Z.U.; Abbas, M. Laser Light and Magnetic Field Stimulation Effect on Biochemical, Enzymes Activities and Chlorophyll Contents in Soybean Seeds and Seedlings during Early Growth Stages. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2016, 165, 283–290.

Podlesny, J.; Stochmal, A.; Podlesna, A.; Misiak, L.E. Effect of Laser Light Treatment on Some Biochemical and Physiological Processes in Seeds and Seedlings of White Lupine and Faba Bean. *Plant Growth Regul.* 2012, 67, 227–233

Nadimi, M.; Sun, D.W.; Paliwal, J. Effect of Laser Biostimulation on Germination of Wheat. *Appl. Eng. Agric.* 2022a, 38, 77–84.

Nadimi, M.; Loewen, G.; Paliwal, J. Assessment of Mechanical Damage to Flaxseeds Using Radiographic Imaging and Tomography. *Smart Agric. Technol.* 2022b, 2, 100057

## Kontakt:

Ing. Marie Bjelková, Ph.D.,  
Agritec Plant Research s.r.o.,  
Zemědělská 2520/16,  
Šumperk;  
[bjelkova@agritec.cz](mailto:bjelkova@agritec.cz)



## Výnos zrna obilnin v dlouhodobém polním pokusu v žabčicích

### The grain yields of cereals in long-term field experiment in Žabčice

Dryšlová T., Smutný V., Křen J., Procházková B., Rábek M.

*Mendelova univerzita v Brně*

#### Abstrakt

Cílem příspěvku je představit vliv zpracování půdy, střídání plodin a ročníku na výnosy zrna ozimé pšenice a jarního ječmene v dlouhodobém polním pokusu v Žabčicích. Pokus je veden od r. 1969 v kukuřičné výrobní oblasti na Polní pokusné stanici Mendelovy univerzity v Brně; na lokalitě je průměrná roční teplota vzduchu je 10,3 °C, průměrný roční úhrn srážek 491 mm. Z výsledků vyplývá, že u obou plodin byl klíčovým faktorem rok (hodnoceny jsou roky 2012-2021), podíl vlivu ročníku byl u obou plodin vyšší než 50 %. Posouzení vlivu dalších dvou pokusných faktorů ukazuje, že vliv osevního postupu byl statisticky významný pro obě plodiny. Ozimá pšenice dosáhla vyššího výnosu v osevním postupu Norfolk, jarní ječmen při monokulturním pěstování. Faktor zpracování půdy byl statisticky významný u jarního ječmene, vyšších výnosů bylo dosaženo při minimálním zpracování.

**Klíčová slova:** dlouhodobý polní pokus; zpracování půdy; osevní postup, ozimá pšenice, jarní ječmen

#### Abstract

The aim of the contribution is to present the effect of tillage, crop rotation and year on grain yields of winter wheat and spring barley in a long-term field trial in Žabčice. The experiment has been conducted since 1969 in the maize-growing region on the Field Experiment Station of Mendel University in Brno; in the location is average annual air temperature is 10.3 °C and average annual precipitation is 491 mm. The results show that the year was the key factor for both crops (years 2012-2021 are evaluated), the share of year effect was higher than 50% for both crops. Effect assessment of the other two experimental factors show that effect of the crop rotation was statistically significant for both crops. Winter wheat achieved a higher yield in the Norfolk, spring barley in monoculture growing. The tillage factor was significant for spring barley, higher yields were achieved with minimum tillage.

**Keywords:** long-term field experiment; soil tillage; crop rotation; winter wheat; spring barley

#### Úvod

Změna klimatu pro území ČR znamená nárůst průměrné teploty, změnu distribuce srážek a zvýšení četnosti extrémních jevů (sucho, přivalové srážky). V zemědělství lze situaci částečně řešit agronomickými opatřeními. V suchých oblastech je potřeba modifikovat celý systém hospodaření, zejména agrotechnická opatření, s ohledem na dostupnost půdní vláhy rostlinám, která je limitujícím faktorem výše a stability výnosů pěstovaných plodin. Jde o používání vhodných agrotechnických opatření, především vhodných technologií zpracování půdy a zakládání porostů, vhodnou skladbu plodin a jejich střídání v rámci osevních postupů. V suchých oblastech vyžaduje některá specifika také výživa rostlin či problematika organického hnojení. Z výsledků výzkumu v suchých a teplejších podmínkách se obvykle lépe uplatňují technologické postupy s nižší intenzitou zpracování půdy, které lépe hospodaří s půdní vodou. V dnešních podmínkách hospodaření na půdě je důležité, jak působí jednotlivá agrotechnická opatření samostatně, ale zejména ve vzájemných interakcích. Nelze opomenout vliv průběhu povětrnostních podmínek ročníku (Smutný et al., 2015; Dryšlová et al., 2018).

*Pokus na lokalitě Žabčice byl založen na podzim r. 1969 a v roce 1970 proběhla první sklizeň, v roce 2020 jsme si připomenuli 50. výročí trvání pokusu. Cílem založení pokusu byl „Výzkum agroekologických činitelů ječmene jarního“, výzkum řešící produktivnost osevních postupů jako celku a vztahy produkce a změn půdního prostředí. Hlavní experimentální faktory se opírají o opatření základní agrotechniky, zejména o různou koncentraci obilnin a technologie zpracování půdy, ale také např. o management hospodaření se slámou. Myšlenku na založení stacionárního polního pokusu přinesl profesor Šimon (prof. Ing. Jaroslav Šimon, DrSc.), působící v té době na VŠZ v Brně. V druhé polovině šedesátých let se rozhodl tuto myšlenku realizovat a spolu s ním se na realizaci podílela řada specialistů z různých úseků rostlinné produkce. Historie vzniku a původní koncepce jsou plně uvedeny v publikaci profesora Krejčíře (Krejčíř, 1996). V původní koncepci jako hlavní sledovaná plodina byl stanoven jarní ječmen, vzhledem k tradici hanáckého ječmenářství.*

*V současné podobě stacionárního polního pokusu jsou vedeny tři monokultury polních plodin (jarního ječmene, ozimé pšenice a kukuřice na zrna) a jeden osevní postup, založený na principech norfolkského osevního postupu. Unikátem tohoto pokusu je monokultura jarního ječmene založená na jaře roku 1970. Polní pokus byl v následujících letech úspěšně realizován a stal se významným pokusným zázemím. Původní katedra základní agrotechniky, dnes Ústav agrosystémů a bioklimatologie zajišťuje současný chod pokusu.*

## **Materiál a metody**

### ***Půdní a klimatická charakteristika lokality Žabčice***

Dlouhodobý stacionární polní pokus je významnou součástí Polní pokusné stanice v Žabčicích (49°01'20"N, 16°37'55"E), která se nachází v kukuřičné výrobní oblasti, na zrnitostně těžších půdách fluvizemního typu, přibližně 25 km od města Brna, v nadmořské výšce 180 m n. m. Polní pokusná stanice v Žabčicích je výzkumným zařízením Mendelovy univerzity v Brně. Průměrná roční teplota vzduchu zde dosahuje 10,3 °C a třicetiletý průměr ročních úhrnů srážek zde činí 491 mm. Z tohoto hlediska patří tato lokalita k nejteplejším a zároveň nejsušším oblastem v České republice.

### ***Pokusné faktory***

U všech plodin je po celou dobu vedení pokusu sledován *vliv zpracování půdy* (I. tradiční zpracování půdy, tj. orba do hloubky 0,22 m a II. minimalizační zpracování půdy, tj. mělké zpracování půdy talířovým nářadím do hloubky 0,12 - 0,15 m). U plodiny jarního ječmene je navíc sledován *vliv tří úrovní minerálního hnojení*, diferencovaných zejména dávkami dusíku (1. 30 kg; 2. 60 kg; 3. 90 kg N na hektar). U monokultury jarního ječmene jsou vedeny *tři varianty hospodaření se slámou*: 1. sláma sklizená, 2. sláma zapravovaná do půdy, 3. sláma pálená. V předkládaném příspěvku jsou u ozimé pšenice a jarního ječmene porovnány výnosové výsledky v osevním postupu a v monokultuře, zároveň u obou variant zpracování půdy. U ječmene jarního, vzhledem k uspořádání pokusu, byla vyhodnocena pouze varianta s dávkou dusíku 60 kg na hektar u slámy sklizené. Dosažené výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí analýzy variance s následným testováním dle Tukeye na hladině pravděpodobnosti 95 % pomocí programu STATISTICA verze 14 a jsou uvedeny v grafech na obr. 1-4.

## **Výsledky a diskuze**

*V předkládaném příspěvku jsou uvedeny výsledky hodnocení vlivu osevního postupu a zpracování půdy na výnos zrna ozimé pšenice a jarního ječmene; hodnoceny byly roky 2012-2021. U obou plodin byl klíčovým faktorem rok, kdy podíl vlivu ročníku byl u obou plodin vyšší než 50 %. Posouzení dalších dvou experimentálních faktorů ukazuje, že vliv střídání plodin byl statisticky významný pro obě plodiny. Ozimá pšenice dosáhla vyššího výnosu*

v osevním postupu Norfolk, jarní ječmen při monokulturním pěstování. Faktor zpracování půdy byl statisticky významný u jarního ječmene a vyšších výnosů bylo dosaženo při minimálním zpracování.

Výsledky potvrzují fakt, že ozimá pšenice je především náročná na předplodinu, kterou zde v osevním postupu Norfolk představuje kvalitní jetelovina. U jarního ječmene se potvrzuje poznatek, že ječmen prokazuje vyšší toleranci k zastoupení obilnin v osevním postupu a také možná negativní dopad náhrady cukrovky v osevním postupu Norfolk kukuřicí na zrno. Tato plodina je typickou pro kukuřičnou oblast, ale zanechává po sklizni vyšší množství posklizňových zbytků, a někdy ne úplně ideální stav pozemku. Podobná zjištění z této nebo z klimaticky podobných lokalit uvádějí (Smutný et al., 2015; Dryšlová et al., 2018; Vrtílek et al., 2019).

Vztahy, které jsou hodnoceny v předkládaném příspěvku, není zcela jednoduché na dané lokalitě vyhodnotit. Analýzu by si zasloužil pohled na průběh povětrnosti v daných ročnících ale hlavně ve stěžejních měsících vegetačního období. Dalšími důležitými vlivy by se mohly projevit termíny agrotechnických zásahů, zejména podzimní zpracování půdy a jarní termíny setí, celkově pak délka vegetačních období u obou plodin.

Lze konstatovat, že na dané lokalitě s daným průběhem povětrnosti se v poslední dekádě projevuje náročnost ozimé pšenice na dobrou předplodinu; u plodiny jarního ječmene také vyšší citlivost k předplodině, ale také k způsobu zpracování půdy.

## **Závěr**

Ústav agrosystémů a bioklimatologie AF MENDELU se dlouhodobě zabývá návrhy vhodných způsobů hospodaření na půdě, s důrazem sladění produkčního využívání půdy s potřebou půdu chránit. Existence a výsledky dlouhodobých polních pokusů jsou cenným zdrojem informací, zejména v současném období probíhající klimatické změny, která výrazně ovlivňuje hospodaření na zemědělské půdě. Ukazuje se, že můžeme očekávat vyšší četnost ročníků s extrémními průběhy počasí a následně tak se silným dopadem na výnos i kvalitu plodin, zejména v sušších oblastech, jako je lokalita Žabčice. Zde potom bude mít velmi důležitou roli správně zvolená technologie zpracování půdy s ohledem na předplodinu.

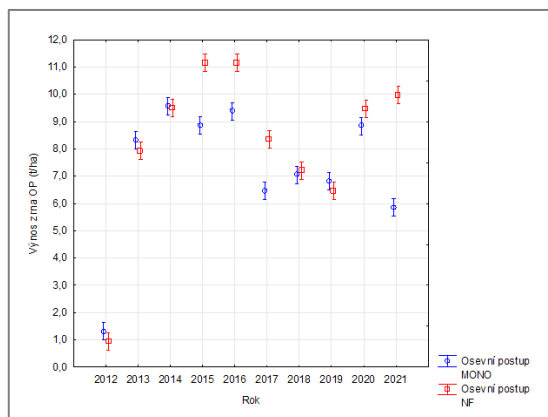
## **Poděkování**

The work was supported by the project No. SS02030018 (TAČR) and project No. QK1810186 (NAZV).

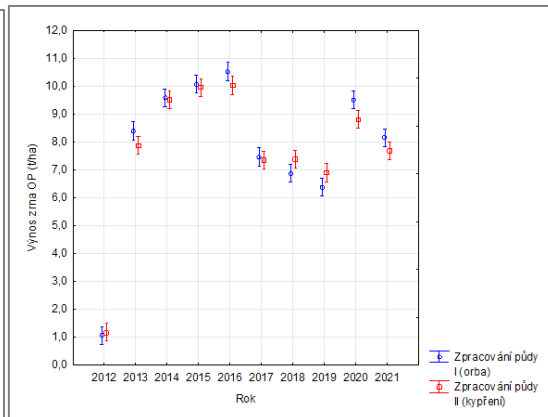
## **Použitá literatura**

- Dryšlová T., a kol., 2018.: *Optimalizace agrotechnických opatření při hospodaření v suchých oblastech*. Certifikovaná metodika, 56 s. ISBN 978-80-7509-629-6
- Krejčíř J., 1996: *Koncepce a metodika dlouhodobého stacionárního polního pokusu v Žabčicích a problematika jeho hodnocení*. In Křen J., Lipavský J. (Eds.) *Sborník Význam a perspektivy dlouhodobých polních pokusů v České republice*, s. 43.
- Smutný V., a kol. 2015: *Význam technologií zpracování půdy a dalších agrotechnických opatření při pěstování obilnin*. Certifikovaná metodika, 57 s. ISBN 978-80-7509-369-1
- Smutný V., Neudert L., Dryšlová T., 2016: Vliv předplodin a zpracování půdy na výnosy ozimé pšenice. *Úroda*, 12: 66-68.
- Vrtílek P., Smutný V., Dryšlová T., a kol., 2019: The effect of agronomic measures on grain yield of winter wheat in drier conditions. *Plant, Soil and Environment*, 65(2): 63-70.

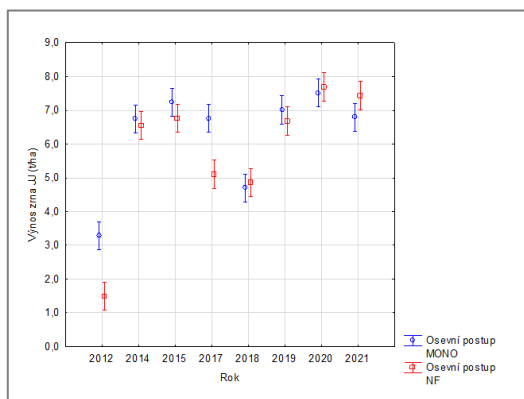
Obr. 1 Výnos zrna ozimé pšenice (t/ha)  
- interakce rok a osevní postup



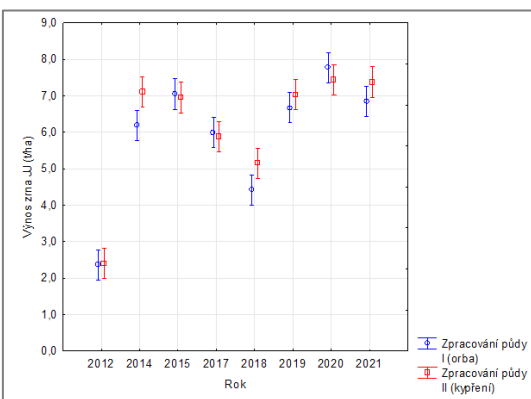
Obr. 2 Výnos zrna ozimé pšenice (t/ha)  
- interakce rok a zpracování půdy



Obr. 3 Výnos zrna jarního ječmene (t/ha)  
- interakce rok a osevní postup



Obr. 4 Výnos zrna jarního ječmene (t/ha)  
- interakce rok a zpracování půdy



**Kontaktní adresa:**

Ing. Tamara Dryšlová, Ph.D.

Ústav agrosystémů a bioklimatologie, Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 1, 613 00 BRNO

e-mail: tamara.dryšlova@mendelu.cz; tel. +420 545 133 118

## Využití intercroppingu leguminóz a pšenice ke zvýšení výnosu a kvality zrna

Use of intercropping of legumes and wheat to increase grain yield and quality

Dvořák P.<sup>1</sup>, Capouchová I.<sup>1</sup>, Král M.<sup>1</sup>, Konvalina P.<sup>2</sup>, Janovská D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Česká zemědělská univerzita, Praha; <sup>2</sup>Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích;

<sup>3</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze

### Abstrakt

Hodnocen byl vliv souběžného pěstování ozimé pšenice s různými leguminózami – bobem, hrachem a jetelem nachovým na vybrané produkční a kvalitativní parametry pšenice. Ta pěstování s leguminózami dosáhla vyššího výnosu zrna ve srovnání s čistě setou pšenicí. Kromě toho byl zaznamenán vliv způsobu vysetí pšenice a leguminóz na výnos zrna. V ekologickém režimu pěstování (zejména s hrachem a bobem) bylo dosaženo o 14 - 17 % vyššího výnosu zrna ve srovnání s čistě setou pšenicí. V konvenčním systému byly výnosy pšenice výrazně slabší a s některými leguminózami dokonce i opačné. Pokud jde o způsob setí, tak společné setí s leguminózami výnosy zrna u pšenice výrazně navyšovalo, než jejich pěstování v samostatných řádcích. Souběžné pěstování pšenice s leguminózami obvykle zajistilo vyšší obsah hrubých bílkovin v zrna a vyšší hodnoty zeleného testu.

**Klíčová slova:** hrách; bob; jetele nachový; povětrnostní podmínky; způsob výsevu

### Abstract

The influence of the simultaneous cultivation of winter wheat with various legumes - beans, peas and purple clover - on selected production and quality parameters of wheat was evaluated. By growing it with legumes, it achieved a higher grain yield compared to purely sown wheat. In addition, the influence of wheat and leguminous sowing methods on grain yield was recorded. In the ecological mode of cultivation (especially with peas and broad beans), a 14-17% higher grain yield was achieved compared to pure sown wheat. In the conventional system, wheat yields were significantly weaker and with some legumes even the opposite. As far as the sowing method is concerned, joint sowing with legumes significantly increased grain yields in wheat compared to their cultivation in separate rows. Co-cultivation of wheat with legumes usually ensured higher crude protein content in the grain and higher green test values.

**Keywords:** pea; bean; purple clover; field conditions; method of sowing

### Úvod

Intercropping obilovin s leguminózami je celosvětově nejčastěji používaným intercroppingovým systémem. Výhody tohoto intercroppingu spočívají především ve využití zdrojů N druhů používanými při intercroppingu (Bedoussac a Justes 2010). Luštěniny tak zajišťují přirozený přísun N do systému symbiotickou fixací, která umožňuje poskytnout vysoké množství fixovaného N, použitelného pro obiloviny (Amossé et al. 2014). To se promítá do zvýšení výnosu a koncentrace bílkovin ve srovnání s monoplodinami. Dále zlepšují ochranu půdy a mají lepší účinnost využití vody a živin. Tyto systémy navíc pomáhají při hubení plevelů (Bedoussac et al. 2015, Lithourgidis et al. 2010), ale luštěniny také mohou obilovinám konkurovat během jejich růstu (Bergkvist et al. 2011).

Proto produktivita interroppingového systému závisí na faktorech, jako jsou použité druhy plodin, jejich odrůdy, poměr hustoty výsevu či prostorové uspořádání jednotlivých komponent (Bedoussac et al. 2015, Hauggard-Nielsen et al. 2001).

Meziplodíkové systémy obilovin a leguminóz mohou optimalizovat dostupnost a využití půdního a vzdušného N a zároveň zachovat vysoký výnos (Pelzer et al. 2012) a zvyšovat obsah dusíku v zrna (Gooding et al. 2007).

Naproti tomu někteří autoři ukázali, že souběžné meziplodíkové systémy mohou omezit nebo dokonce snížit výnos obilovin v případě vysokého růstu nebo vysoké hustoty luštěnin a z toho vyplývající konkurence o živiny a světlo (Bergkvist et al. 2011). Podobně Lithourgidis a Dordas (2010) uvádí, že meziplodíkový systém může snížit výnos směsi ve srovnání s čistě setou pšenicí.

Cílem této práce bylo vyhodnotit souběžné pěstování ozimé pšenice s vybranými leguminózami a určit výnosový potenciál a změnu kvalitativních parametrů zrna ve vztahu k jednotlivým leguminózám, metodám výsevu a rokům sklizně.

## Materiál a metody

Vliv souběžného pěstování ozimé pšenice s různými leguminózami na vybrané produkční a kvalitativní parametry pšenice byl hodnocen v přesných polních pokusech prováděných v roce 2020/2021 na Výzkumné stanici Uhřetěves České zemědělské univerzity v Praze (295 m n. m. a průměrná roční teplota 8,4 °C a průměrné srážky 575 mm). Pokud jde o povětrnostní podmínky, jsou uvedeny v tabulce 1. Pokud jde o srážky, byl rok 2020/2021 bohatší na srážky a překračoval dlouhodobý normál.

Tabulka 1. Přehled průměrných měsíčních teplot a úhrnů srážek (2020/2021) ve srovnání s dlouhodobým normálem

Měsíc	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Průměrná teplota (°C)	14,4	10,5	4,3	2,8	0,1	-0,1	4,5	7	11,8	20,2	19,9	17,5
<i>normál</i>	14	8,6	3,2	-0,5	-2,1	-0,8	3,4	8,2	13,4	16,3	18,2	18
Σ srážek (mm)	38,6	32,7	35,8	18,8	42,2	28,5	33,6	23,4	101	103	87,9	77,6
<i>normál</i>	49,2	41,8	34	34,6	28,4	27,5	31,8	46,9	65	74,1	74,3	76,5

Polní pokusy byly prováděny v rámci ekologických i konvenčních pěstebních systémů. V ekologickém režimu nebyla použita žádná další hnojiva ani pesticidy. Dusík (80 kg N/ha) aplikovaný na jaře ve dvou dávkách a fungicid byl použit při konvenčním způsobu pěstování. Do souběžného pěstování byly pro pokusy vybrány 4 druhy leguminóz současně s pšenicí ozimou, a založeny na začátku října. Pokusné parcelky byly náhodně rozmístěny ve třech opakováních s průměrnou experimentální plochou 12 m<sup>2</sup>. U všech variant byla použita pšenice ozimá (odrůdy Butterfly) s výsevem 148 kg/ha (400 semen/m<sup>2</sup>). Bob (odrůdy Merkur) byl vyset v dávce 200 kg (30 semen/m<sup>2</sup>), hrách jarní (odrůdy Avatar) a hrách ozimý (odrůdy Balltrap) byly vysety v poměru 50 semen/m<sup>2</sup> (125 kg/ha u odrůdy Avatar a 105 kg/ha u odrůdy Balltrap), jetel nachový (odrůdy Kardinal) byl vyset v poměru 14 kg/ha (300 semen/m<sup>2</sup>). Jako kontrolní varianta byla vyseta pouze pšenice pěstovaná jako monokultura. Polní experiment zahrnoval jak založení porostu smíšeným výsevem pšenice s jednotlivými leguminózami (formou směsi v jednom řádku), tak výsev střídavým výsevem pšenice a luštěniny v samostatných řádcích (row by row).

Před sklizní pšenice byl stanoven počet klasů na m<sup>2</sup>. Po sklizni byl stanoven výnos zrna pšenice a HTZ (hmotnost tisíce zrn) a byly odebrány vzorky zrn pro hodnocení jakosti. Obsah hrubých bílkovin podle Kjeldahlovy metody (Kjeltec KT 200, FOSS, Švédsko). Rovněž byl stanoven sedimentační zelenýho test podle ICC 116/1.

## Výsledky

### Vliv leguminóz na výnos pšenice

Existují protichůdné studie týkající se vlivu leguminóz na pšenici a vlivu leguminóz na výnosy zrna pšenice. Rozdíl výnosů ve směsi s hrachem byl až 1,02 t/ha ve prospěch směsi. Zároveň nebyly významné rozdíly ve výnosech pšenice mezi pšenicí ve směsi s jarním hrachem a ozimím hrachem (Tabulka 2).

Tabulka 2. Produkční parametry porostů ozimé pšenice

Varianty	Způsob setí	Počet klasů na m <sup>2</sup> před sklizní	HTZ (g)	Výnos (t/ha)	Počet klasů na m <sup>2</sup> před sklizní	HTZ (g)	Výnos (t/ha)
		Ekologický systém			Konvenční systém		
jarní hrách (setí s pšenicí)	Row-by-row	361	52,84	6,62	548	43,27	8,07
bob (setí s pšenicí)	Row-by-row	378	52,29	6,71	527	43,97	8,00
inkarnát (setí s pšenicí)	Row-by-row	355	51,19	6,00	544	42,96	8,24
ozimý hrách (setí s pšenicí)	Row-by-row	388	52,70	6,81	538	42,95	8,00
Butterfly řádky 25 cm (kontrola)	Row-by-row	340	51,39	5,80	550	42,87	8,23
jarní hrách (setí s pšenicí)	Směs	391	51,58	6,83	590	42,77	8,87
bob (setí s pšenicí)	Směs	394	52,10	6,67	605	43,11	9,26
inkarnát (setí s pšenicí)	Směs	376	51,49	6,70	579	42,47	8,44
ozimý hrách (setí s pšenicí)	Směs	389	52,34	6,83	580	42,91	8,61
Butterfly řádky 12,5 cm (kontrola)	Směs	354	51,14	5,81	556	42,78	8,10

V systému konvenčního pěstování byly výnosy čistě seté pšenice ve srovnání s organickým pěstováním přibližně o 2,3 - 2,4 t/ha vyšší, a i zde byla situace podobná – výnos zrna v konvenci u čistě seté pšenice ve srovnání s výnosy pšenice ve směsi byly spíše nižší. Pouze při výsevu row by row u směsi hrachem (jarním, tak i ozimým) tomu bylo i opačně (Tabulka 2). Je také patrné, že výsledný výnos zrna závisel na struktuře výnosových prvků (počtu klasů na m<sup>2</sup>, hmotnosti tisíců zrn), které se lišily v závislosti na systému pěstování a v menší míře i na způsobu setí. Pokusný rok 2020/21 byl charakterizován nízkým počtem klasů na m<sup>2</sup>, ale vysokou HTZ v systému ekologického pěstování, zatímco v konvenčním systému dosahovaly

hodnocené varianty velmi vysokého počtu klasů na m<sup>2</sup> – zejména při výsevu směsi, ale HTZ byl velmi nízký.

Celkově lze konstatovat, že v roce 2021 v systému ekologického pěstování byl vliv použitých leguminóz na výnosy pšenice zřejmý a významnější. V konvenčním systému byl méně výrazný – výnosové rozdíly mezi variantami byly nižší.

#### Vliv leguminóz na kvalitativní parametry pšenice

Nejvyšší obsah hrubých bílkovin v zrně byl obvykle zjištěn v pšenici pěstované s hrachem nebo bobem, ale rozdíly v obsahu bílkovin v pšeničném zrně mezi jednotlivými ošetřeními byly v ekologickém systému pěstování od 0,02 do 0,73 %. Podobně i v konvenčním systému vyšší obsah hrubých bílkovin zajistilo pěstování pšenice ve směsi s leguminózou (rozdíly byly od 0,07 do 0,5 %). Další výsledky kvalitativního hodnocení ukázaly, že pšenice ve směsi s leguminózami dosahovala vyšších hodnot Zeleného sedimentace. Podrobnější pohled na výsledky za jednotlivé varianty a způsoby setí je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3. Hodnoty kvalitativních parametrů ozimé pšenice

Varianty	Způsob setí	Obsah N-látek (%)	Zeleného test (ml)	Obsah N-látek (%)	Zeleného test (ml)
		Ekologický systém		Konvenční systém	
jarní hrách (setí s pšenicí)	Row-by-row	11,98	46	12,65	56
bob (setí s pšenicí)	Row-by-row	11,42	47	12,49	56
inkarnát (setí s pšenicí)	Row-by-row	11,23	46	12,45	58
ozimý hrách (setí s pšenicí)	Row-by-row	11,88	48	12,78	59
Butterfly řádky 25 cm (kontrola)	Row-by-row	11,25	45	12,28	54
jarní hrách (setí s pšenicí)	Směs	11,42	47	12,28	55
bob (setí s pšenicí)	Směs	11,31	48	12,38	57
inkarnát (setí s pšenicí)	Směs	10,88	44	12,35	53
ozimý hrách (setí s pšenicí)	Směs	11,32	48	12,72	57
Butterfly řádky 12,5 cm (kontrola)	Směs	10,99	44	12,21	54

#### **Diskuze**

Leguminózy v dobře zvolené směsné kultuře mohou přispět k pozitivní bilanci dostupného dusíku v půdě (Kintl et al. 2015), který je pak využíván hlavní plodinou. To může vést k vyšším výnosům hlavní plodiny ve srovnání s monokulturou (Lithourgidis et al. 2011, Dong et al. 2018). Na druhou stranu Bergkvist (2003) naznačil, že je obtížné dosáhnout vyššího výnosu



pšenice pěstované ve směsi ve srovnání s čistě setou pšenicí a Vrignon-Brenas et al. (2018) na základě svých výsledků konstatoval, že ve výnosech pšenice, ať už řádkově oddělené nebo ne, nejsou významné rozdíly. Podobně Amossé et al. (2013) zjistil, že výskyt luštěnin neměl obecně žádný významný vliv na výnos zrna.

Naše výsledky ukázaly, že na kontrole (čistě setá pšenice) byl výnos pšenice v systému ekologického pěstování nejnižší a výrazně se lišil od výnosů pšenice ve směsi. Vrignon-Brenas et al. (2018) uvádí, že za slibnější způsoby založení smíšených kultur jsou považovány systémy, kde jsou jednotlivé složky směsi (pšenice a leguminózy) vysévány v samostatných, střídavých řádcích. Při tomto způsobu setí se podpůrná plodina (například leguminóza) nedostane do těsné blízkosti hlavní plodiny a nemůže vést k potlačení hlavní plodiny (Ehrmann a Ritz 2014, Vandermeer 2012). Vliv metody výsevu na výnosy pšenice byl v tomto pokuse minimální, ale rozdíly mezi čistě setou a pšenicí ve směsi byly poměrně vysoké. Jak je také patrné z našich výsledků, systém výsevu (row by row) pšenice a hrachu v samostatných řádcích může vést i ke snížení výnosu pšenice, pravděpodobně díky větší konkurenci mezi rostlinami.

V systému ekologického pěstování byl vliv použitých leguminóz na výnosy pšenice zřejmý a významnější. V konvenčním systému byl méně výrazný – rozdíly mezi variantami s nejnižším výnosem, což byla obvykle kontrola bez leguminóz, a variantami s nejvyšším výnosem, což byly většinou varianty s ozimým nebo jarním hrachem, se pohybovaly kolem 0,77 - 1,16 t/ha. V roce 2021 byl růst leguminóz v systému ekologického pěstování na jaře poměrně intenzivní, pšenice je nemohla příliš utlumit, což mělo pravděpodobně pozitivní vliv na výnos pšenice. V systému konvenčního pěstování však byla v roce 2021 situace v porovnání s organickým pěstováním jiná – pšenice zde rostla velmi intenzivně a leguminózy silně potlačovala. Výsledkem byl růst pšenice s velmi vysokou konečnou hustotou (počet klasů na m<sup>2</sup> na úrovni až 600 klasů a více); v takto hustém porostu již nebyla pravděpodobnost, že by přínos leguminóz mohl být výrazněji vysoký.

Některé předchozí studie ukázaly, že začlenění obilovin a leguminóz může zvýšit koncentraci dusíku (nebo hrubých bílkovin) v obilných zrnech (Knudsen et al. 2004, Ghaley et al. 2005). Naše výsledky uvedené v tabulce 3 jsou s těmito zjištěními v souladu a ukázaly, že jak v ekologickém systému, tak konvenčním byl nejnižší obsah bílkovin v zrna zjištěn na kontrole – čistě seté pšenici a byl výrazně odlišný od pšenice pěstované ve směsi s leguminózou.

Výsledky dále ukázaly, že v tomto hodnocení bylo obvykle dosaženo vyššího obsahu hrubých bílkovin v zrna, pokud byla pšenice a leguminóza vyseta do samostatných řádků (row by row). Naše zjištění jsou v souladu se závěry Gooding et al. (2007), kteří hodnotili vliv směsi pšenice s bobem a pšenici s hrachem v polních pokusech během tří pěstebních období a zjistili, že směs pšenice s leguminózami zvyšovala koncentraci dusíku v obilném zrna. Podobně Dordas a Lithourgidis (2011) došli k závěru, že koncentrace dusíku byla u obilovin vyšší, když bylo do směsi zařazen bob a Kamalongo a Cannon (2020) zjistili, že koncentrace dusíku v zrnech pšenice pěstované s leguminózami byla asi o 1,7 % vyšší ve srovnání s čistě setou pšenicí.

Naše výsledky jsou také v souladu se závěry Gooding et al. (2007) neboť ukázaly, že pšenice ve směsi s leguminózami dosahovala vyšších hodnot Zeleného sedimentace. Rozdíly v hodnotách Zeleného sedimentace mezi kontrolní pšenicí a pšenicí ve směsi s leguminózami v systému ekologického pěstování byly většinou vyšší ve srovnání s konvenčními hodnotami.

Na druhou stranu naše výsledky nepotvrdily zjištění Gooding et al. (2007) a Kamalongo and Cannon (2020), že zvýšení koncentrace bílkovin v pšeničném zrna při pěstování ve směsi s leguminózami bylo spojeno se snížením výnosu pšenice o 25 - 30 % ve srovnání s pšenicí čistě setou (kontrolou).

## **Závěr**

Závěrem lze konstatovat, že výsledky této práce ukázaly, že pšenice ve směsi s leguminózami (zejména hrachem či bobem) dosahovala ve srovnání s čistě setou pšenicí vyšších výnosů zrna. Vliv směsi pšenice s leguminózami na výnosy pšenice byl vyšší v systému ekologického pěstování ve srovnání s konvenčním systémem. Pokud jde o způsob setí, jak v ekologickém, tak v konvenčním systému pěstování, výnosy pšenice pěstované s luštěninami ve smíšených kulturách výrazně převyšovaly výnosy pšenice pěstované s luštěninami v samostatných, střídavých řadách (row by row). Pokud jde o kvalitativní parametry, pšenice ve směsi s leguminózami dosahovala ve srovnání s čistě setou pšenicí obvykle vyššího obsahu hrubých bílkovin v zrna a vyšších hodnot zeleného sedimentace.

## **Poděkování**

Studie byla podpořena projektem NAZV MZe ČR, č.: QK1910046.

## Literatura

- Amossé C., Jeuffroy M.H., David Ch. (2013): Relay intercropping of legume cover crops in organic winter wheat: Effects on performance and resource availability. *Field Crops Research*, 145:78-87.
- Amossé C., Jeuffroy M.H., Mary B., David Ch. (2014): Contribution of relay intercropping with legume cover crops on nitrogen dynamics in organic grain systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 98:1-14.
- Bedoussac L., Justes E. (2010): Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat – winter pea intercrop. *Plant and Soil*, 330:37-54.
- Bergkvist G. (2003): Effect of white clover and nitrogen availability on the grain yield of winter wheat in a three-season intercropping system. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B- Soil and Plant Science*, 53:97-109.
- Bergkvist G., Stenberg M., Wetterlind J., Bath B., Elfstrand S. (2011): Clover cover crops under-sown in winter wheat increase yield of subsequent spring barely – effect of N dose and companion grass. *Field Crops Research*, 120:292-298
- Dong N., Tang M.M., Zhang W.P., Bao X.G., Wang Y., Christie P., Li L. (2018): Temporal differentiation of crop growth as one of the drivers of intercropping yield advantage. *Scientific Reports* 8.
- Dordas C.A., Lithourgidis A.S. (2011): Growth, yield and nitrogen performance of faba bean intercrops with oat and triticale at varying seeding ratios. *Grass and Forage Science*, 66:569-577.
- Ehrmann J., Ritz K. (2014): Plant: soil interactions in temperate multi-cropping production systems. *Plant and Soil*, 376:1-29.
- Ghaley B.B., Hauggard-Nielsen H., Høgh-Jensen H., Jensen E.S. (2005): Intercropping of wheat and pea as influenced by nitrogen fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 73:201-212.
- Gooding M.J., Kasyanova E., Ruske R., Hauggard-Nielsen H., Jensen E.S., Dahlmann C., von Fragstein P., Dibet A., Corre-Hellou G., Crozat Y., Pristeri A., Romeo M., Monti M., Launay M. (2007): Intercropping with pulses to concentrate nitrogen and sulphur in wheat. *Journal of Agricultural Science*, 145:469-479.
- Hauggard-Nielsen H., Ambus P., Jensen E.S. (2001): Interspecific competition, N use and interference with weeds in pea-barley intercropping. *Field Crops Research*, 70:101-109.
- Kamalongo D.M., Cannon N.D. (2020): Advantages of bi-cropping field beans (*Vicia faba*) and wheat (*Triticum aestivum*) on cereal forage yield and quality. *Biological Agriculture & Horticulture*, 36:213-229.
- Kintl A., Elbl J., Záhora J., Kynický J., Brtnický M., Mikajlo I. (2015): Evaluation of grain yield in mixed legume-cereal cropping systems. *AD ALTA: Journal of Interdisciplinary Research*, 96:98.
- Knudsen M.T., Hauggard-Nielsen H., Jørnsgård B., Jensen E.S. (2004): Comparison of interspecific competition and N use in pea-barley, faba bean-barley and lupin-barley intercrops grown at two temperate locations. *Journal of Agricultural Science*, 142:617-627.
- Lithourgidis A.S., Dordas C.A. (2010): Forage yield, growth rate and nitrogen uptake of wheat, barely and rye-faba bean intercrops in three seeding ratios. *Crop Science*, 50:2148-2158.
- Pelzer E., Bazot M., Makowski D., Corre-Hellou G., Naudin C., Al Rifai M., Baranger E., Bedoussac L., Biarnes V., Boucheny P., Carroue B., Dorvillez D., Foissy D., Gaillard B., Guichard L., Mansard M.C., Omon B., Prieur L., Yvergniaux M., Justes E., Jeuffroy M.H.

- (2012): Pea-wheat intercrops in low input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. *European Journal of Agronomy*, 40:39-53.
- Vandermeer J.H. (2012): *The ecology of intercropping*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vrignon-Brenas S., Celette F., Piquet-Pissaloux A., Corre-Hellou G., David Ch. (2018): Intercropping strategies of white clover with organic wheat to improve the trade-off between wheat yield, protein content and the provision of ecological services by white clover. *Field Crops Research*, 224:160-169.

**Kontakt:**

Ing. Petr Dvořák, Ph.D.  
Česká zemědělská univerzita Praha  
Kamýcká 129, 165 00 Praha Suchbát  
+420 605 967 290, [dvorakp@af.czu.cz](mailto:dvorakp@af.czu.cz)

## Variabilita fixace dusíku u vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) a symbiotických bakterií z čeledi Rhizobiaceae

Variability of nitrogen fixation at alfalfa (*Medicago sativa* L.) and symbiotic bacteria of the family Rhizobiaceae

Dybová M., Hofbauer J., Trněný O., Staveníková J, Vejražka K.

Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko

### Abstrakt

Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.) je významnou rostlinou v zemědělství, je využívána jako píče pro dobytek a jako plodina pro zlepšení kvality půdy. Vojtěška, stejně jako i další rostliny z čeledi bobovité (*Fabaceae*), půdu obohacuje o dusík ve formě dostupné pro rostliny díky symbióze s hlízkovými bakteriemi, které umí fixovat vzdušný dusík za pomoci enzymu nitrogenázy. Aktivitu tohoto enzymu lze stanovit pomocí acetylen redukční metody (ARA), která využívá schopnosti nitrogenázy použít jako substrát acetylen místo vzdušného dusíku. Acetylen je bakteriemi redukován na etylen, jehož koncentrace je změřena pomocí plynového chromatografu. Tato studie měla za cíl určit, jaký bakteriální kmen vyizolovaný z hlízek vojtěšky nejlépe spolupracuje s rostlinami vojtěšky (schopnost tvořit hlízky, ARA, čerstvá hmotnost). Z testovaných kmenů byl jako nejvhodnější kmen pro další experimenty v polních podmínkách vyhodnocen kmen z varianty 4.

**Klíčová slova:** biologická fixace dusíku, *Medicago sativa*, hlízkové bakterie, acetylen redukční metoda

### Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is an important plant in agriculture like fodder and to improve soil quality. Alfalfa, like other legumes, enriches the soil with nitrogen in a plant-available form through symbiosis with tuberous bacteria. These bacteria can fix atmospheric nitrogen using the enzyme nitrogenase. The activity of this enzyme can be determined by the acetylene reduction assay (ARA), which uses the ability of nitrogenase to use acetylene as a substrate instead of atmospheric nitrogen. Acetylene is reduced by the bacteria to ethylene, the concentration of which is measured using a gas chromatograph. This study aimed to determine which bacterial strain isolated from alfalfa tubers interacts best with alfalfa plants (ability to form tubers, ARA, fresh weight). Among the strains tested, the strain from variant 4 was evaluated as the most suitable strain for further experiments under field conditions.

**Key words:** biological nitrogen fixation, *Medicago sativa*, tuberous bacteria, acetylene reduction method

### Úvod

Zástupci čeledě bobovitých (*Fabaceae*) se využívají v zemědělství, potravinářství, zahradnictví i včelařství, neboť mají vysoký obsah bílkovin, tuků a jsou medonosné. V zemědělství se některé bobovité rostliny využívají jako píče pro hospodářská zvířata a zelené hnojení – poskytují velké množství organické hmoty a díky symbióze s hlízkovými bakteriemi zanechávají půdu obohacenou o dusík (200-300 kg/ha/rok) (Mikanová a Šimon, 2013). Mezi pícniny patří také vojtěška setá (*Medicago sativa* L.), která je bohatá na minerální látky, především vápník, bílkoviny, obsahuje také všech 8 pro člověka esenciálních aminokyselin, tedy obsahuje velké množství dusíkatých látek a mnoho energie. Kvůli přítomnosti fytoestrogenů a vysokému obsahu energie musí být s vojtěškou jakožto s krmivem nakládáno obezřetně. Kořen vojtěšky proniká půdou velmi hluboko, díky čemuž je poměrně

suchovzdorná. Seč se provádí až 4x ročně. Vojtěšku opylují především samotářsky žijící včely. Vysévá se jako podsevová plodina, předplodina či meziplodina a někdy také jako monokultura (Pelikán, Hýbl a kol., 2012).

Hlízkové bakterie jsou nazývány jako rhizobia, ale tento původní rod se dnes člení na několik rodů, např. *Rhizobium* v užším pojetí, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Neorhizobium* či *Azorhizobium*. Jsou to gramnegativní bakterie žijící volně v půdě a při vytvoření symbiózy s rostlinou žijí v hlízkách na kořenech. Vytvoření hlízky je velmi specifické z hlediska obou partnerů, některé rostliny vytvoří symbiózu pouze s jedním konkrétním druhem, nebo dokonce kmenem bakterie. Tedy při setí rostlin, které nejsou pro danou oblast typické, se v půdě nemusí nacházet kompatibilní bakterie. Daný bakteriální kmen se musí dodat do půdy prostřednictvím inokulace osiva. Komunikace a rozpoznání vhodného partnera se mezi hostitelským kořenem a bakterií odehrává prostřednictvím flavonoidů rostliny a následně vytvořených bakteriálních specifických proteinů zvaných Nod faktory. Při setkání vhodných partnerů nastává deformace kořenového vlásku indukovaná Nod faktory a další anatomické a morfologické změny vedoucí k vytvoření hlízky (podrobně v Gage, 2004). Poté již bakterie mohou redukovat molekulární dusík (vzdušný, N<sub>2</sub>) na amonný ion, což je katalyzováno enzymem nitrogenáza. Tato reakce je energeticky náročná – na vytvoření 1 molu amonných iontů se spotřebuje přibližně 13,5 molu ATP (Sprentová, 1987 v Möllerová, 2006). Bakterie tuto energii získávají od hostitelské rostliny ve formě cukrů vytvořených ve fotosyntéze a na oplátku rostlině poskytují právě amonné ionty. Rostlinám se tedy symbiotická fixace dusíku vyplatí především v prostředí s nedostatkem dusíku ve formě přístupné rostlinám (nitrátové nebo amonné ionty) a při nadprodukcii cukrů. Činnost bakterií je rostlinou nejvíce podporována před počátkem kvetení, kdy je aktivita nitrogenázy nejvyšší. Při kvetení se počet hlízek i jejich hmotnost snižuje. Za efektivně fixující hlízky jsou považovány takové, které jsou velké, dobře vyvinuté a na řezu růžové (zbarvené leghemoglobinem). Bílé a zelené hlízky jsou málo efektivní až parazitické a hnědé odumírají.

Nitrogenáza redukující vzdušný dusík na amonný ion může jako substrát využít acetylén, který redukuje na etylén. Toho se využívá při měření nitrogenázové aktivity pomocí acetylén redukční metody (acetylen reduction assay; ARA), kdy se předpokládá, že rychlost redukce acetylénu je vztažitelná k rychlosti fixace dusíku. Výhodou metody ARA je, že je jednoduchá, rychlá a citlivá (Hardy et al., 1968).

Tato studie se zaměřuje na schopnost mikroorganismů tvořit hlízky s vojtěškou setou a jejich efektivitu fixace vzdušného dusíku, neboť tuto biologickou fixaci dusíku nelze úplně nahradit průmyslovými hnojivy. Není to výhodné ani z hlediska výnosu, ani následného vlivu na úrodnost půdy (Houba a Hochman, 2009). Dodáním vhodného bakteriálního kmene inokulací osiva vojtěšky by se mohl zvýšit výnos i obsah dusíkatých látek v půdě dostupných následným rostlinám.

## **Materiál a metody**

### Mikroorganismy

Byly využity 4 kmene hlízkových bakterií rodu *Ensifer* ze sbírky Zemědělského výzkumu, spol. s r. o. (ZVT). Identifikace byla provedena pomocí sekvenace 16S ribozomální RNA již dříve na pracovišti ZVT (postup identifikace viz Matoušková et al., 2020). Kmene bakterií byly vyizolovány z hlízek rostlin vojtěšky seté pěstovaných ve skleníku ZVT a uchovávány v kryokonzervovaném stavu při -80 °C v tekutém kultivačním médiu dle Tittabutr et al. (2007) s přídavkem glycerolu o objemu 150 ml/l kryoprotektiva.

### Příprava inokula

Jednotlivé bakteriální kmeny byly kultivovány v tekutém médiu (yeast mannitol media) o objemu 125 ml a složení: 10 g/l mannitol, 0,5 g/l  $K_2HPO_4$ , 0,2 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,1 g/l NaCl a 0,5 g/l kvasnicový extrakt (Tittabutr et al., 2007). Inokula byla promíchávána na třepačce o rychlosti 115 rpm, při 25 °C, ve tmě, po dobu 3 dnů. Koncentrace mikroorganismů po ukončení kultivace byla řádově  $10^9$  CFU/ml (colony forming units). Bezprostředně před inokulací byla inokula naředěna vodou na výslednou koncentraci  $10^8$  CFU/ml.

### Rostlinný materiál

Vojtěška setá byla pěstována po 20 rostlinách v 5 nádobách s perlitem po dobu 8 týdnů ve skleníku. Inokula byla aplikovaná do perlitu s rostlinami s prvním pravým listem (2 týdny od zasetí; fenofáze BBCH 11), vždy do jedné nádoby jedno inokulum, pátá nádoba byla kontrolní a nebyla zalita žádným inokulem. Rostliny byly zalévány dle potřeby závlivkou deficitní na dusík. Koncentrace makroprvků v zásobních roztocích, ředěny 100x: 50 g/l  $K_2HPO_4$ , 37 g/l  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ , 15 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ . Koncentrace mikroprvků v zásobních roztocích, ředěny 1000x: 13,5 g/l  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ , 50,3 g/l Chelaton 3, 125 mg/l  $Na_2MoO_4 \cdot 5 H_2O$ , 2900 mg/l  $H_3BO_3$ , 80 mg/l  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 1800 mg/l  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ , 220 mg/l  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ .

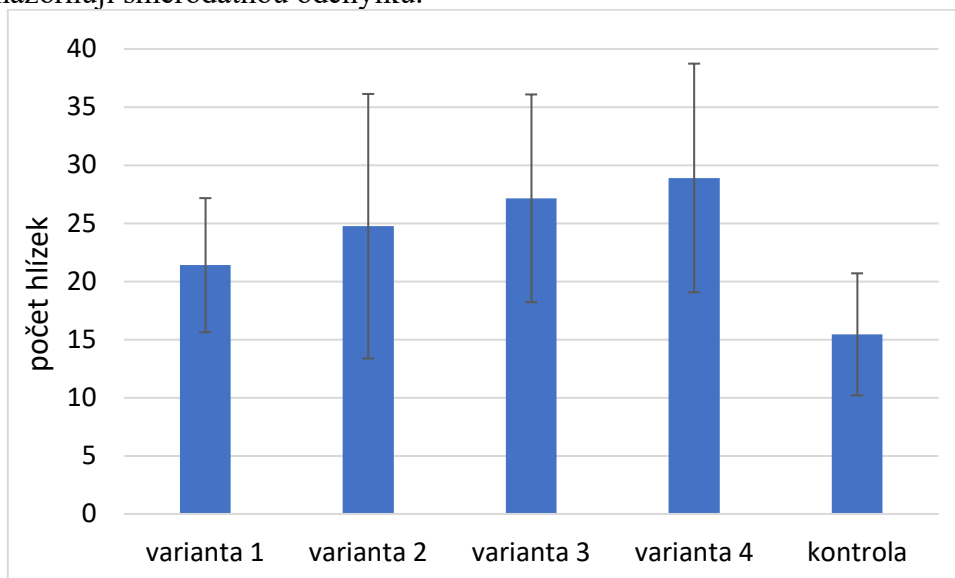
### Stanovení schopnosti bakterií tvořit kořenové hlízky a efektivity fixace vzdušného dusíku

Efektivita fixace vzdušného dusíku (hodnota nitrogenázové aktivity) byla stanovena pomocí acetylén redukční metody (ARA). Rostliny vojtěšky byly vyjmuty z perlitu, zváženy a vloženy do skleněné lahvičky o objemu 330 ml s gumovým uzávěrem. Pomocí injekční stříkačky bylo do lahviček vstříknuto 10 ml plynného acetylénu. Inkubace rostlin s acetylénem trvala 30 minut. Poté byl injekční stříkačkou odebrán 1 ml plynného obsahu lahvičky a v tomto vzorku bylo změřeno množství vyprodukovaného etylénu pomocí plynového chromatografu CHROM 5. Pak byly spočítány kořenové hlízky. Hodnoty naměřené chromatografem byly přepočítány na koncentraci etylénu v  $\mu\text{mol/ml}$  ve vzorku [(plocha píku vzorku \* koncentrace standardu v ppm) / (plocha píku standardu \* objem 1 mol plynu)] a pomocí Pearsonova korelačního koeficientu určena korelace mezi počtem hlízek a koncentrací etylénu ve vzorku, mezi čerstvou hmotností a koncentrací etylénu a mezi čerstvou hmotností a počtem hlízek u analyzovaných rostlin. Závislost koncentrace etylénu na čase měření v rámci jednoho měřicího dne byla stanovena pomocí neparametrického párového Wilcoxonova testu (Hollander a kol., 1972) v programu R.

### **Výsledky**

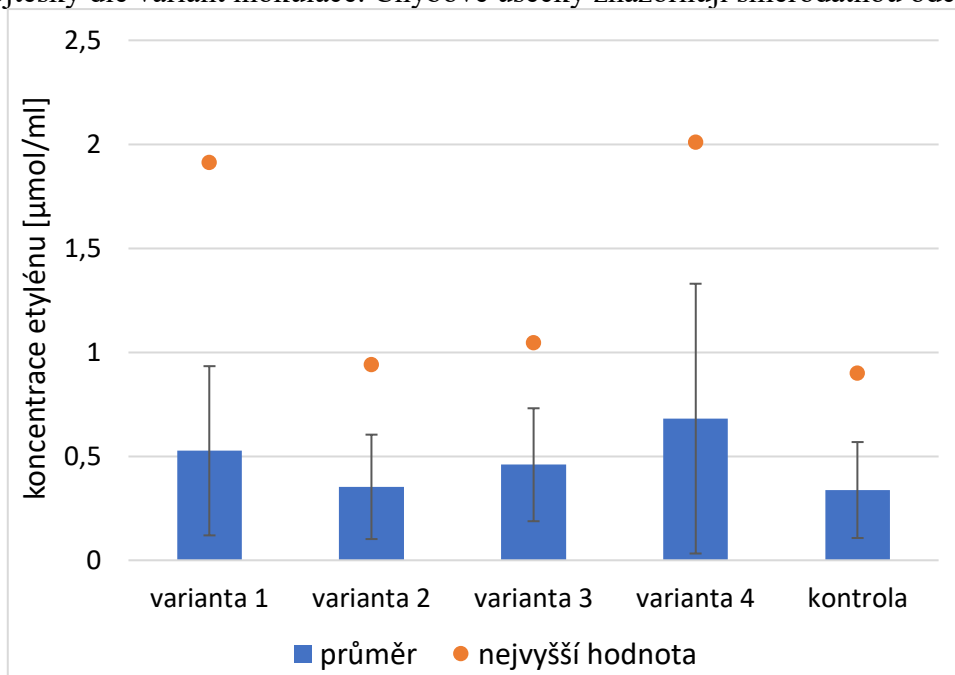
Rostliny vojtěšky byly rozděleny do 5 variant dle aplikovaného bakteriálního kmene – 4 varianty s různými kmeny (*Ensifer sp.*, *Rhizobium sp.*), pátá varianta bez aplikace inokula sloužila jako kontrola. I když kontrolní rostliny nebyly inokulovány, všechny měly na kořenech hlízky. Jejich hlízky oproti těm z inokulovaných variant byly větší a méně početné – ve většině případů měly více vrcholů, tvořily klastry. Často byly přítomny 2 klastry blízko báze a několik malých kulovitých světlých hlízek. Kontrolní rostliny byly tedy pravděpodobně nějakým způsobem kontaminovány. Z těchto neočekávaných hlízek jsou vyizolovány bakterie a připraveny na sekvenaci. Průměrný počet hlízek na rostlinu vojtěšky dle variant ukazuje Graf 1. Nejnižší počet hlízek byl u kontroly (6), u inokulované varianty to bylo 12 hlízek, a to u varianty 2. Nejvíce hlízek (57) bylo u rostliny z varianty 4. Žádná rostlina napříč variantami, včetně kontroly, nebyla bez hlízek.

**Graf 1:** Průměrný počet hlízek na kořenech rostlin vojtěšky dle variant inokulace. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



Nitrogenázová aktivita byla měřena po sadách o 20 rostlinách, které obsahovaly vždy 4 rostliny z každé varianty, aby se snížila chyba daná různou aktivitou enzymu nitrogenázy v čase. Z naměřených hodnot plyne, že nejefektivnější je varianta 4 (Graf 2), u které byla zaznamenána i nejvyšší hodnota. Aktivita nitrogenázy byla zjištěna také u hlízek na kořenech kontrolních rostlin a byla nižší než aktivita u inokulovaných variant 1, 3 a 4. Hodnoty varianty 2 byly srovnatelné s hodnotami kontroly.

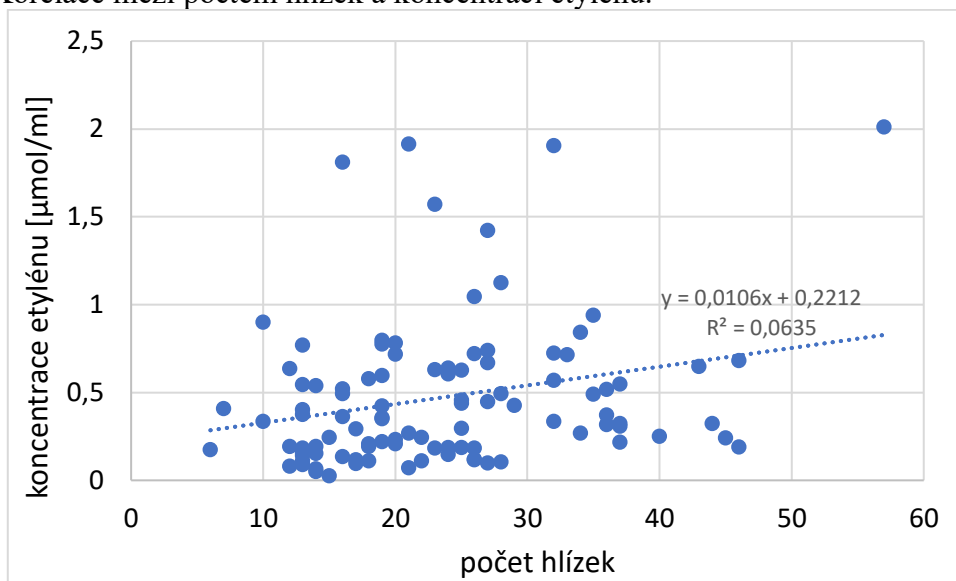
**Graf 2:** Průměrná koncentrace etylénu a nejvyšší naměřená hodnota koncentrace etylénu u rostlin vojtěšky dle variant inokulace. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.





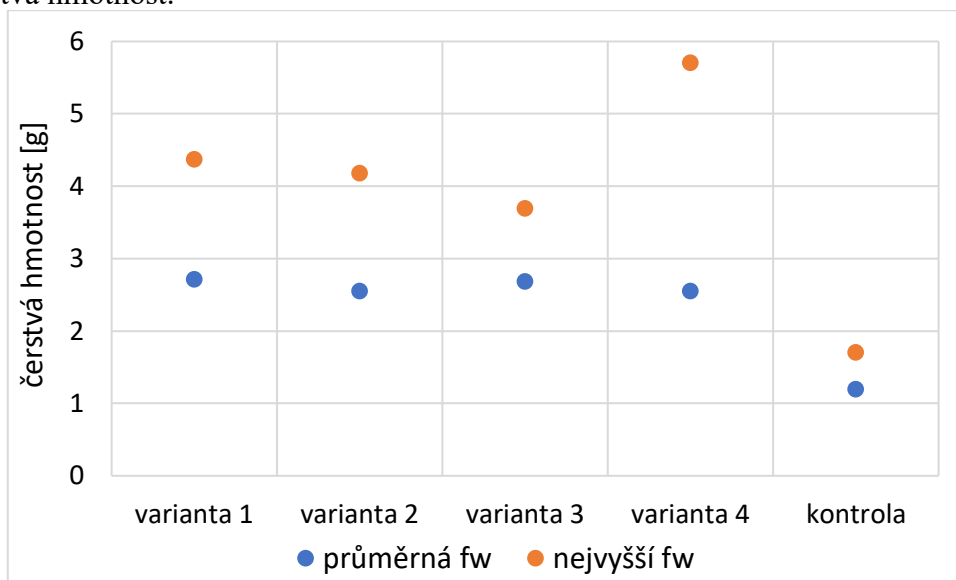
Dále byla určena závislost koncentrace etylénu (aktivita nitrogenázy) na počtu hlízek (Graf 3). Mezi těmito parametry byla zjištěna slabá pozitivní korelace ( $r = 0,252$ ).

**Graf 3:** Korelace mezi počtem hlízek a koncentrací etylénu.



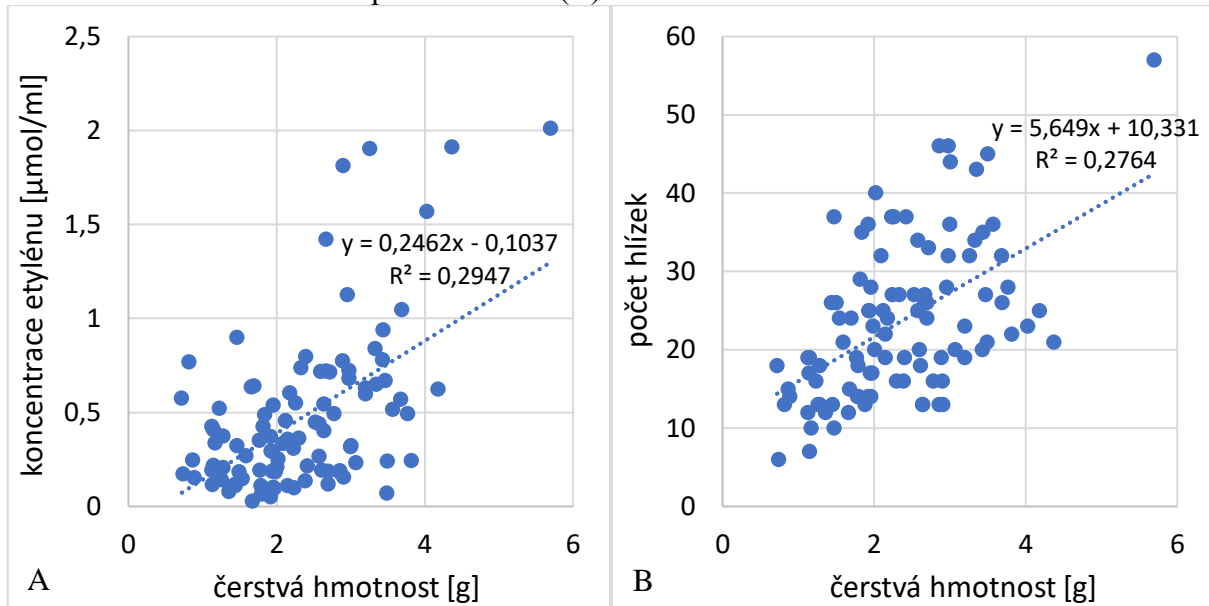
Jelikož dostupnost dusíku pro rostlinu hraje roli v růstu a vývoji rostliny, byla zvážena také čerstvá hmotnost rostlin (Graf 4), a to před měřením ARA. Průměrná čerstvá hmotnost se mezi inokulovanými variantami téměř nelišila, u kontroly byla nižší přibližně o polovinu. Inokulace tedy měla pozitivní vliv na růst rostlin. Dobře patrné jsou rozdíly v nejvyšší hodnotě čerstvé hmotnosti. Rostlina s nejvyšší čerstvou hmotností (z varianty 4) měla také nejvyšší počet hlízek a nejvyšší hodnotu koncentrace etylénu.

**Graf 4:** Průměrná a nejvyšší hodnota čerstvé hmotnosti rostlin vojtěšky dle variant inokulace. fw – čerstvá hmotnost.



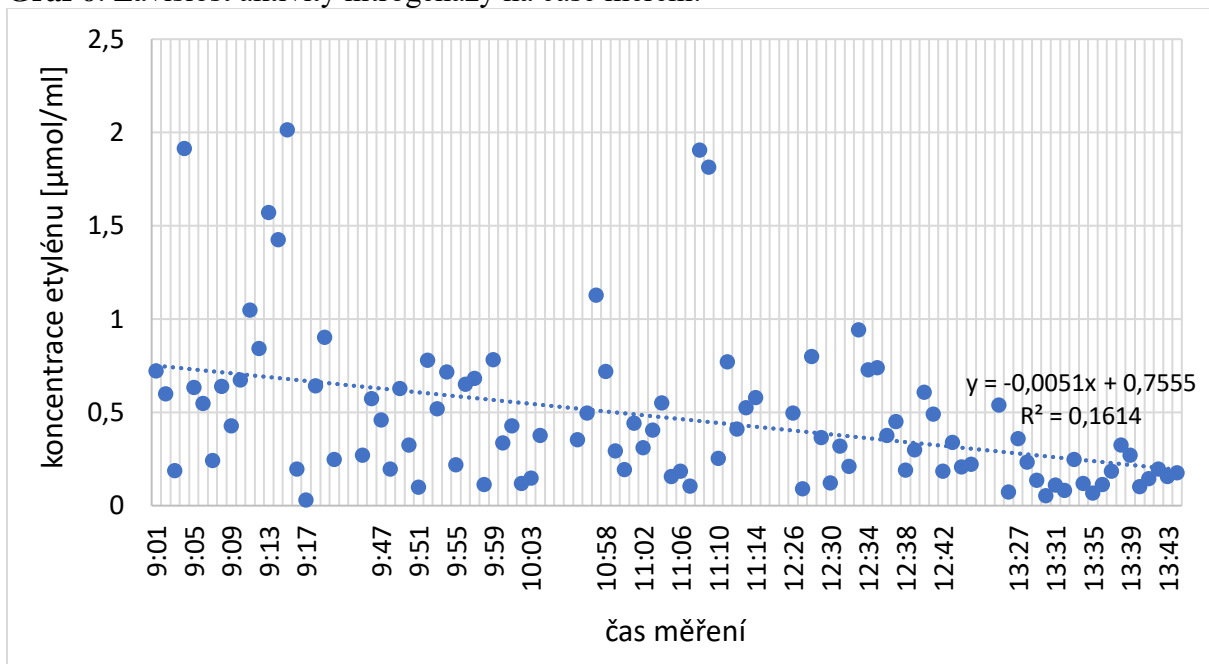
Byla také určena závislost mezi čerstvou hmotností a koncentrací etylénu (Graf 5A) a mezi čerstvou hmotností a počtem hlízek (Graf 5B). V obou případech byla zjištěna střední pozitivní korelace ( $r = 0,543$ ; resp.  $r = 0,526$ ).

**Graf 5:** Korelace mezi čerstvou hmotností rostlin a koncentrací etylénu (A), korelace mezi čerstvou hmotností rostlin a počtem hlízek (B).



Koncentrace etylénu byla měřena od 9:00 do 13:50 hodin v jednom dni. Na hodnotách, které byly změřeny po 13. hodině, lze vidět snížení nitrogenázové aktivity (Graf 6). Pro statistické hodnocení byly odebrány odlehlé hodnoty větší/menší než 1,5násobek interkvartilového rozpětí (hodnoty vyšší než  $1,2 \mu\text{mol/ml}$ ). Snížení aktivity nitrogenázy v průběhu dne bylo statisticky průkazné na hladině významnosti  $p < 0,01$ .

**Graf 6:** Závislost aktivity nitrogenázy na čase měření.



## Diskuse

Symbióza dusík fixujících bakterií rodu *Ensifer* a vojtěšky seté prokazatelně zvýšila čerstvou hmotnost inokulovaných rostlin. Zlepšení růstu rostlin vojtěšky pozorovali také Biró et al. (2000) při symbióze se dvěma různými rody rhizobií. Tato studie se zaměřila i na vliv arbuskulární mykorhizní houby a kombinaci ošetření houby s rhizobii, kdy ošetření všemi třemi symbionty vykazalo další posílení sledovaných parametrů. Je tedy otázka, jak se budou bakteriální kmeny rodu *Ensifer* vybrané v tomto příspěvku chovat v kombinaci s mykorhizní houbou, ale také s půdní mikroflórou, neboť přítomnost houby může snižovat nitrogeázovou aktivitu hlízkových bakterií (Plšková et al., 2004). Je ovšem pravděpodobné, že ošetřené rostliny by i přes to dosahovaly zlepšení parametrů v polních podmínkách. Rhizobia a další mikroorganismy by se mohly používat jako biohnojiva, neboť např. zvyšují obsah fotosyntetických pigmentů, zlepšují růst, výnos, účinnost využití vody a také napomáhají rostlinám překonávat stresové podmínky (podrobně v Yapa et al., 2022).

## Závěr

Z testovaných kmenů druhu *Ensifer sp.* má nejlepší schopnost tvořit hlízky s vojtěškou setou a v této symbióze fixovat vzdušný dusík kmen, který byl použit na inokulaci varianty 4. Druhých nejlepších hodnot v koncentraci etylénu vyprodukovaném za 30 minut dosáhl kmen varianty 1, i když vytvořil nejnižší průměrný počet hlízek na rostlinu z inokulovaných variant. Při dalším podobném experimentu by bylo vhodné měření aktivity nitrogeázy rozdělit do více dnů a provádět ve stejnou denní dobu, neboť se prokázal vliv denní doby na efektivitu fixace. Také by bylo dobré pěstovat kontrolní rostliny odděleně od inokulovaných variant, aby se předešlo možné kontaminaci při kontrole vlhkosti perlitu. Případně povrchově vydezinfikovat osivo, neboť rhizobia by mohla být přítomna na jeho povrchu.

Je v plánu identifikovat další kmeny mikroorganismů z hlízek vojtěšky. Při testování jejich účinnosti symbiózy s vojtěškou by bylo vhodné zařadit do experimentu také již testovaný kmen z varianty 4. Dalším krokem by měly být experimenty v polních podmínkách, kdy bude osivo ošetřeno inokuly z nejlepších testovaných kmenů bakterií, a budou sledovány vybrané fenotypové znaky rostlin.

## Dedikace

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení projektu DKRVO, číslo MZE-RO1722, financovaného Ministerstvem zemědělství

## Použitá literatura

- Biró B., Köves-Péchy K., Vörös I., Takács T., Eggenberg P. a Strasser R. J. (2000) Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied Soil Ecology*, 15 (2): 159-168.
- Gage D. J. (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2): 280-300.
- Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K. a Burns R. C. (1968) The Acetylene – Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation. *Plant Physiology*, 43: 1185-1207.
- Hollander M. Wolfe D. A. a Chicken E. (1972) Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons. Strany 68-75.
- Houba M. a Hochman M., (2009) Zásady pěstování a agrotechniky. LUSKOVINY pěstování a užití. Asociace pěstitelů a zpracovatelů luskovin, České Budějovice: KURENT.

- Matoušková M., Malec J., Trněný O., Hofbauer J. a Vejražka K. (2020) Biologická fixace dusíku symbiotickými kmeny bakterií u jestřabiny východní (*Galega orientalis* Lamb.). Vědecká příloha časopisu *Úroda* 12/2020: 427-436.
- Mikanová O. a Šimon T. (2013) Alternativní výživa rostlin dusíkem. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
- Möllerová J. (2006) Symbiotická fixace dusíku: Bakterie *Rhizobium* s. l. a *Frankia*. *Živa* 54(1): 9-12.
- Pelikán J., Hýbl M., Hutýrová H., Knotová D., Minjaríková P., Nedělník J., Raab S a Vymyslický T. (2012) Rody a druhy vyskytující se v České republice. Rostliny čeledi *Fabaceae* LINDL. (bobovité) České republiky. Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko.
- Plšková M., Kieu T. V., Mikanová O. a Šimon T. (2004). Vliv kombinovaných mikrobiologických přípravků na produkci biomasy sóji (*Glycine max*). Ústav půdoznalství a mikrobiologie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně.
- Tittabutr P., Payakapong W., Teaumroong N., Singleton P. W. a Boonkerd N. (2007) Growth, Survival and Field Performance of Bradyrhizobial Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives. *ScienceAsia* 33: 69-77.
- Yapa N., Lakmali D., De Zoysa K. S., Silva S., Manawadu C., Herath B. M., Madhushan A., Perera G., Ratnayakae O., Kapilan R., Rathnayake A., Sirisena A. I., Asad S., Karunarathna S. C. a Bamunuarachchige C. (2022) Biofertilizers: An Emerging Trend in Agricultural Sustainability. *Chiang Mai Journal of Science*, 49 (3): 608-640.

**Kontaktní adresa:**

Mgr. Magdaléna Dybová  
Zemědělský výzkum, spol. s r. o.  
Zahradní 1  
644 41 Troubsko  
dybova@vupt.cz

## Udržitelnost pěstování minoritních druhů jetelovin v suchých podmínkách okrajových oblastí s využitím hnojení

Sustainability of cultivation of minor clover species in dry conditions of marginal areas with the use of fertilization

Frei I.<sup>1</sup>, Hutyrová H.<sup>1</sup>, Pelikán J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Troubsko

<sup>2</sup>Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., Troubsko

### Abstrakt

V polním pokuse byl na jaře v roce 2020 založen pokus výsevem třech jetelotravních směsí a jedné bylinotravní směsi metodou znáhodněných bloků ve třech opakováních a dvou variantách – hnojené a nehnojené. V prvním a druhém užitkovém roce byly z každé varianty a opakování odebrány třikrát za vegetační období vzorky určeny k laboratorním analýzám na zjištění kvalitativních parametrů a k výnosovým charakteristikám zhodnocených Tukey HSD testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

V 1. užitkovém roce v obou variantách se ve výnosech zelené hmoty a sena nejlépe projevila směs 1: jílek vytrvalý „Jaran“, lipnice luční „Struga“, jitrocel kopinatý a čekanka obecná. Ve 2. užitkovém roce byly nejvyšší výnosy zelené hmoty a sena zjištěny u směsi 3: ovsík vyvýšený „Arone“, kostrava luční „Rožnovská“, štírovník růžkatý „Tenor“.

**Klíčová slova:** zelené hmota, seno, trávy, jeteloviny, byliny

### Abstract

The field trial was established in the spring of 2020 by sowing three clover grass mixtures and one herb grass mixture using the method of randomized block design with three replications and two variants - fertilized and unfertilized. In 2021 and 2022, samples from each variant and repetition were taken three times during the growing season for laboratory analysis to determine qualitative parameters and yield characteristics evaluated by the Tukey HSD test at the  $\alpha = 0.05$  significance level.

In the 1st year of use in both variants, mixture 1 showed the best results in terms of green matter and hay yields: *Lolium perenne* "Jaran", *Poa pratensis* "Struga", *Plantago lanceolata* and *Cichorium intybus*. In the 2nd useful year, the highest yields of green matter and hay were found in mixture 3: *Arrhenatherum elatius* "Arone", *Festuca pratensis* "Rožnovská", *Lotus corniculatus* "Tenor".

**Keywords:** green matter, hay, grasses, clovers, herbs

### Úvod

Stále častěji se objevující periody sucha mohou přispět k částečnému návratu jetelotravních či bylinotravních směsí do osevního postupu, a mohou tak produkovat hospodářský výnos (organická hmota do bioplynových stanic, prvovýroba krmiv) v době, kdy to u jiných plodin není možné. Je nutné šlechtit, selektovat a zkoušet druhy a odrůdy tolerující suché periody a zařazovat je do portfolia pícninářské výroby. Výběr a šlechtění na odolnost k suchu se samozřejmě týká i jednoletých pícnin (Žofajová a kol. 2016). Vliv sucha je řešen také v produkčních sadech a vinohradech, kde se zkouší zatravnovací směsi s minimálními nároky na půdní vláhu (Vymyslický, 2016).

## Materiál a metody

Na parcelách o velikosti 10 m<sup>2</sup> byl na jaře v roce 2020 založen pokus výsevem 3 jetelotravních směsí a 1 bylinotravní směsí metodou znáhodněných bloků ve třech opakováních a dvou variantách. Varianta 1 – nehnojená (kontrola) a varianta 2 – hnojená dávkami NPK. Hnojení porostu bylo provedené v dubnu roku 2021 a roku 2022 v dávkách: 333 g LAV (27 % N) + 177 g Superfosfát (17 % P) + 99,5 g Draselná sůl (60 % K) = N90+P30+K60. Složení směsí znázorňuje Tab. 1. Porost byl jak v roce 2020 tak i v roce 2021 ošetřen třemi plevelnými sečemi. V roce 2022 plevelná seč prováděna nebyla. Ve třech termínech (viz Tab. 2) během vegetačního období byly v každém opakování z 0,25 m<sup>2</sup> (50 × 50 cm) odebrány vzorky určené k zvažení zelené hmoty a následnému rozboru na trávy a jeteloviny, ve směsi 1 na trávy a byliny. Vzorky z první seče byly následně usušeny a byl proveden laboratorní rozbor na sušinu, N-látky (organicky vázaný dusík i veškerý dusík), vlákninu, tuk, popeloviny, vodorozpustné cukry, ADF, NDF, makroprvky a mikroprvky.

Celkové výsledky výnosu sena a zelené hmoty hnojené i nehnojené varianty za rok 2021 a 2022 byly statisticky vyhodnoceny metodou analýzy variance s následným testováním statistické významnosti rozdílů středních hodnot pomocí Tukeyova HSD testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Tabulka 1: Složení směsí

směs č. 1	%	směs č. 2	%	směs č. 3	%	směs č. 4	%
Jílek vytrvalý „Jaran“	30	Jílek vytrvalý „Jaran“	30	Ovsík vyvýšený „Arone“	30	Jílek vytrvalý „Jaran“	30
Lipnice luční „Struga“	40	Lipnice luční „Struga“	50	Kostřava luční „Rožnovská“	50	Lipnice luční „Struga“	40
Jitrocel kopinatý	10	Vičenec ligrus „Višňovský“	20	Štírovník růžkatý „Tenor“	20	Vojtěška měňavá „Kometa“	30
Čekanka obecná	20						

Tabulka 2: Termíny odběru vzorků

rok 2021	1. seč	3.6.	rok 2022	1. seč	23.5.
	2. seč	3.8.		2. seč	28.7.
	3. seč	21.9.		3. seč	1.9.

## Výsledky

### Zastoupení komponent:

Tabulka 3 uvádí zastoupení komponent v jednotlivých směsích. U směsi 1 došlo v prvním roce u obou variant k postupnému ústupu trávy a nárůstu bylin. Především jitrocele. Ve hnojené variantě ve druhém roce došlo k nárůstu nevysetých plevelných druhů. U směsi 2 v obou variantách byl zaznamenán vysoký podíl travní komponenty v obou letech až na její ústup ve 3. seči 2. užitkového roku. Bylinná komponenta (vičenec) se udržoval po celou dobu pěstování přibližně na stejné úrovni a ve 3. seči 2. užitkového roku byl dominantní komponentou. Ve směsi 3 se štírovník růžkatý projevil výrazněji v nehnojené variantě. Ve směsi dominovala travní komponenta a ve třetí seči druhého roku došlo k prudkému poklesu zkoušených komponent a porost se silně zaplevelil. Ve směsi 4 se vojtěška výrazněji uplatnila v nehnojené variantě, v níž byl zaznamenán poměrně vysoký podíl nevysetých plevelných druhů.

Tabulka 3: Zastoupení komponent

Směs č.	užitkový rok	seč	% komponent					
			nehnojená varianta			hnojená varianta		
			tráva	byliny	plevel	tráva	byliny	plevel
1	1.	1.	73.63	26.37	0	90.34	9.66	0
		2.	36.11	63.11	0.78	63.6	34.84	1.56
		3.	47.64	52.36	0	41.71	57.5	0.79
	2.	1.	55.45	44.55	0	72.51	27.49	0
		2.	9.69	86.86	3.45	12.21	80.5	7.29
		3.	0	78.29	21.71	0	64.78	35.22
2	1.	1.	95.65	4.35	0	92.35	2.61	5.04
		2.	87.21	8.99	3.8	94	6	0
		3.	65.33	19.67	15	96.33	3.67	0
	2.	1.	87.75	9.65	2.6	89.78	5.75	4.47
		2.	50.47	24.5	25.03	57.15	19.3	23.55
		3.	0	100	0	0	100	0
3	1.	1.	98.67	1.33	0	99.72	0.28	0
		2.	91.74	6.69	1.57	88.3	11.7	0
		3.	88.05	11.95	0	98.02	1.98	0
	2.	1.	84.76	15.24	0	95.23	4.77	0
		2.	67.2	32.8	0	96	3	1
		3.	7.72	3.75	88.53	41.06	0	58.94
4	1.	1.	97.21	2.79	0	99.01	0.99	0
		2.	65.58	18.97	15.45	88.02	7.98	4
		3.	60	25.51	14.49	97.8	1.37	0.83
	2.	1.	59.15	36.22	4.63	83.75	12.8	3.45
		2.	20.88	73.65	5.47	40.85	22.66	36.49
		3.	96.83	3.17	0	100	0	0

### Zelená hmota:

U nehnojené varianty se výnosy v 1. užitkovém roce v 1. seči pohybovaly od 28,47 do 35,80 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 3,37 do 6,83 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 1,97 do 3,87 t.ha<sup>-1</sup>. Ve všech sečích byl dosažen nejvyšší výnos u směsi č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní směsi s výjimkou směsi č. 3. V celkové roční produkci se výnosy pohybovaly od 33,8 do 46,5 t.ha<sup>-1</sup>. Nejvyšší výnos byl dosažen směsí č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. Ve 2. užitkovém roce se výnosy pohybovaly v 1. seči od 2,83 do 9,53 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 0,17 do 1,83 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 1,10 do 1,57 t.ha<sup>-1</sup>. V 1. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. Ve 2. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi a ve 3. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi s výjimkou směsi č. 1. V celkové roční produkci zelené hmoty 2. užitkového roku se výnosy pohybovaly od 4,10 do 11,63 a nejvyšší výnos byl zaznamenán u směsi č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi.

U hnojené varianty se výnosy v 1. užitkovém roce v 1. seči pohybovaly od 41,77 do 46,77 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 4,87 do 8,70 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 1,93 do 4,13 t.ha<sup>-1</sup>. V 1. seči byl dosažen nejvyšší výnos u směsi č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. Ve 2. a 3. seči směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní směsi s výjimkou směsi č. 1. V celkové roční produkci se výnosy pohybovaly od 49,20 do 57,83 t.ha<sup>-1</sup> a nejvyšší výnos byl dosažen směsí č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi,

s výjimkou směsi č. 3. Ve 2. užitkovém roce se výnosy pohybovaly v 1. seči od 6,80 do 15,40 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 0,53 do 2,07 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 1,30 do 2,23 t.ha<sup>-1</sup>. V 1. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. V 2. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi s výjimkou směsi č. 3 a ve 3. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi s výjimkou směsi č. 1. V celkové roční produkci zelené hmoty 2. užitkového roku se výnosy pohybovaly od 8,63 do 19,57 t.ha<sup>-1</sup> a nejvyšší výnos byl zaznamenán u směsi č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. Získané hodnoty z výnosů zelené hmoty znázorňuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Výnosy zelené hmoty z hnojené a nehnojené varianty

**zelená hmota: nehnojená varianta**

směs	1. užitkový rok								2. užitkový rok							
	1. seč		2. seč		3. seč		celkem		1. seč		2. seč		3. seč		celkem	
	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.
1	35,80 <sup>a</sup>	1	6,83 <sup>a</sup>	1	3,87 <sup>a</sup>	1	46,50 <sup>a</sup>	1	3,17 <sup>c</sup>	3	1,83 <sup>a</sup>	1	1,47 <sup>a</sup>	2	6,33 <sup>b</sup>	3
2	28,47 <sup>c</sup>	4	3,37 <sup>c</sup>	4	1,97 <sup>b</sup>	4	33,80 <sup>d</sup>	4	2,83 <sup>c</sup>	4	0,17 <sup>c</sup>	4	1,10 <sup>b</sup>	4	4,10 <sup>c</sup>	4
3	33,43 <sup>ab</sup>	2	5,67 <sup>b</sup>	2	3,53 <sup>a</sup>	2	42,63 <sup>b</sup>	2	9,53 <sup>a</sup>	1	0,83 <sup>b</sup>	2	1,27 <sup>ab</sup>	3	11,63 <sup>a</sup>	1
4	32,77 <sup>b</sup>	3	4,00 <sup>c</sup>	3	2,70 <sup>b</sup>	3	39,47 <sup>c</sup>	3	4,57 <sup>b</sup>	2	0,37 <sup>c</sup>	3	1,57 <sup>a</sup>	1	6,50 <sup>b</sup>	2

**zelená hmota: hnojená varianta**

směs	1. užitkový rok								2. užitkový rok							
	1. seč		2. seč		3. seč		celkem		1. seč		2. seč		3. seč		celkem	
	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.
1	46,77 <sup>a</sup>	1	7,63 <sup>ab</sup>	2	3,43 <sup>a</sup>	2	57,83 <sup>a</sup>	1	7,70 <sup>b</sup>	2	2,07 <sup>a</sup>	1	2,03 <sup>ab</sup>	2	11,80 <sup>b</sup>	2
2	42,13 <sup>b</sup>	3	4,87 <sup>c</sup>	4	2,20 <sup>b</sup>	3	49,20 <sup>c</sup>	4	7,70 <sup>b</sup>	3	1,20 <sup>b</sup>	3	1,37 <sup>bc</sup>	3	10,27 <sup>bc</sup>	3
3	41,77 <sup>b</sup>	4	8,70 <sup>a</sup>	1	4,13 <sup>a</sup>	1	54,60 <sup>ab</sup>	2	15,40 <sup>a</sup>	1	1,93 <sup>a</sup>	2	2,23 <sup>a</sup>	1	19,57 <sup>a</sup>	1
4	42,53 <sup>b</sup>	2	7,10 <sup>b</sup>	3	1,93 <sup>b</sup>	4	51,57 <sup>bc</sup>	3	6,80 <sup>b</sup>	4	0,53 <sup>c</sup>	4	1,30 <sup>c</sup>	4	8,63 <sup>c</sup>	4

**Seno:**

U nehnojené varianty se výnosy v 1. užitkovém roce v 1. seči pohybovaly od 7,48 do 9,06 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 1,05 do 2,68 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 0,77 do 1,06 t.ha<sup>-1</sup>. V první seči byl dosažen nejvyšší výnos u směsi č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní směsi s výjimkou směsi č. 4. Ve zbývajících sečích byl nejvyšší výnos zaznamenán u směsi č. 1, která ve 2. seči statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi a ve 3. seči nebyl mezi zkoušenými variantami zjištěn statistický rozdíl. V celkové roční produkci se výnosy pohybovaly od 9,71 do 12,19 t.ha<sup>-1</sup>. Nejvyšší výnos byl dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi, s výjimkou směsi č. 1. Ve 2. užitkovém roce se výnosy pohybovaly v 1. seči od 0,76 do 2,31 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 0,07 do 0,40 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči



od 0,31 do 0,45 t.ha<sup>-1</sup>. V 1. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. Ve 2. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi a ve 3. seči byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 4, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi s výjimkou směsi č. 3. V celkové roční produkci sena 2. užitkového roku se výnosy pohybovaly od 1,16 do 2,85 t.ha<sup>-1</sup> a nejvyšší výnos byl zaznamenán u směsi č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi.

U hnojené varianty se výnosy v 1. užitkovém roce v 1. seči pohybovaly od 9,30 do 10,79 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 1,95 do 3,12 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 0,62 do 1,26 t.ha<sup>-1</sup>. V 1. seči byl dosažen nejvyšší výnos u směsi č. 1, která statisticky průkazně překonala pouze směs č. 3. Ve 2. a 3. seči směsí č. 3, která ve 2. seči statisticky průkazně překonala ostatní směsi s výjimkou směsi č. 1 a ve 3. seči ostatní zkoušené směsi. V celkové roční produkci se výnosy pohybovaly od 12,34 do 14,79 t.ha<sup>-1</sup> a nejvyšší výnos byl dosažen směsí č. 1, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi, s výjimkou směsi č. 3. Ve 2. užitkovém roce se výnosy pohybovaly v 1. seči od 1,94 do 4,79 t.ha<sup>-1</sup>, ve 2. seči od 0,14 do 0,59 t.ha<sup>-1</sup> a ve 3. seči od 0,31 do 0,96 t.ha<sup>-1</sup>. Ve všech sečích byl nejvyšší výnos dosažen směsí č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. V celkové roční produkci sena 2. užitkového roku se výnosy pohybovaly od 2,41 do 6,34 t.ha<sup>-1</sup> a nejvyšší výnos byl zaznamenán u směsi č. 3, která statisticky průkazně překonala ostatní zkoušené směsi. Výnosy sena z 1. a 2. užitkového roku znázorňuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Výnosy sena z hnojené a nehnojené varianty

**seno: nehnojená varianta**

směs	1. užitkový rok								2. užitkový rok							
	1. seč		2. seč		3. seč		celkem		1. seč		2. seč		3. seč		celkem	
	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.
1	7,74 <sup>b</sup>	3	<b>2,68<sup>a</sup></b>	1	<b>1,06<sup>a</sup></b>	1	11,48 <sup>ab</sup>	2	0,76 <sup>c</sup>	3	<b>0,40<sup>a</sup></b>	1	0,36 <sup>b</sup>	3	1,52 <sup>bc</sup>	3
2	7,48 <sup>b</sup>	4	1,05 <sup>c</sup>	4	0,95 <sup>a</sup>	3	9,71 <sup>c</sup>	4	0,76 <sup>c</sup>	4	0,08 <sup>b</sup>	3	0,31 <sup>b</sup>	4	1,16 <sup>c</sup>	4
3	<b>9,06<sup>a</sup></b>	1	2,10 <sup>b</sup>	2	1,04 <sup>a</sup>	2	<b>12,19<sup>a</sup></b>	1	<b>2,31<sup>a</sup></b>	1	0,17 <sup>b</sup>	2	0,38 <sup>ab</sup>	2	<b>2,85<sup>a</sup></b>	1
4	8,49 <sup>ab</sup>	2	1,42 <sup>c</sup>	3	0,77 <sup>a</sup>	4	10,68 <sup>bc</sup>	3	1,18 <sup>b</sup>	2	0,07 <sup>b</sup>	4	<b>0,45<sup>a</sup></b>	1	1,70 <sup>b</sup>	2

**seno: hnojená varianta**

směs	1. užitkový rok								2. užitkový rok							
	1. seč		2. seč		3. seč		celkem		1. seč		2. seč		3. seč		celkem	
	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.	t.ha <sup>-1</sup>	poř.
1	<b>10,79<sup>a</sup></b>	1	3,06 <sup>ab</sup>	2	0,94 <sup>b</sup>	2	<b>14,79<sup>a</sup></b>	1	1,99 <sup>b</sup>	3	0,44 <sup>b</sup>	2	0,51 <sup>b</sup>	2	2,94 <sup>b</sup>	2
2	9,72 <sup>ab</sup>	3	1,95 <sup>c</sup>	4	0,68 <sup>bc</sup>	3	12,34 <sup>b</sup>	4	2,18 <sup>b</sup>	2	0,38 <sup>b</sup>	3	0,31 <sup>c</sup>	4	2,88 <sup>b</sup>	3
3	10,07 <sup>ab</sup>	2	<b>3,12<sup>a</sup></b>	1	<b>1,26<sup>a</sup></b>	1	14,46 <sup>a</sup>	2	<b>4,79<sup>a</sup></b>	1	<b>0,59<sup>a</sup></b>	1	<b>0,96<sup>a</sup></b>	1	<b>6,34<sup>a</sup></b>	1
4	9,30 <sup>b</sup>	4	2,49 <sup>bc</sup>	3	0,62 <sup>c</sup>	4	12,41 <sup>b</sup>	3	1,94 <sup>b</sup>	4	0,14 <sup>c</sup>	4	0,33 <sup>c</sup>	3	2,41 <sup>c</sup>	4

## Diskuze

Základními porosty s pícninářským využitím jsou louky a pastviny. Tyto porosty svou živinovou, biologickou a pícninářskou hodnotou tvoří základ pro vývoj zvěře, její zdravotní odolnost a reprodukci (Mohelský, 2020). Volba složení porostů je daná podmínkami stanoviště a využitím. Jak uvádí Šantrůčková (2014), při zakládání je nutné si prověřit, co je možné v daných ekologických poměrech s úspěchem pěstovat. V oblastech, kde převládá evapotranspirace nad srážkami, vznikají v půdách málo rozpustné uhličitany a posouvá se pH, což ovlivňuje obsah i přísun živin potřebných pro rozvoj rostlin. Proto se náš výzkum zaměřil na pěstování a využití minoritních druhů vhodných pro pěstování v suchých oblastech s využitím hnojení.

Tabulky 4 a 5 uvádí vyšší výnosů zelené hmoty a sena, jak hnojené tak nehnojené varianty v 1. užitkovém roce (2021) a v 2. užitkovém roce (2022). Hnojená varianta v 1. užitkovém roce zvýšila výnos zelené hmoty oproti nehnojené variantě od 24 % (směs 1) až do 45 % (směs 2). V 2. užitkovém roce se výnos zelené hmoty hnojené varianty oproti variantě nehnojené několikanásobně zvýšil. U směsi 4 o 32 % a u směsi 2 až o 150 %.

Hnojení porostu zvýšilo i produkci sena. V 1. užitkovém roce byly výnosy v hnojené variantě o 16 % (směs 4) až 29 % (směs 1) vyšší oproti variantě nehnojené. V 2. užitkovém roce byly výnosy sena oproti nehnojené variantě o 42 % (směs 4) až 148 % (směs 2) vyšší. Z hlediska kvality píce dle laboratorních rozborů z první seče hnojení zvýšilo obsah dusíkatých látek a tuku v zelené hmotě.

Zelená píce je objemovým krmivem s vyšším obsahem vody. Její nutriční hodnotu ovlivňuje nejen hnojení, ale i botanické složení, fenofáze v období sklizně, a zejména stanovištní a klimatické podmínky (Ryant, Skládanka, 2004). Na vyšší výnosu měl proto mimo hnojení výrazný vliv i úhrn srážek v období leden-září, kdy v roce 2022 spadlo o 31,5 % méně srážek (325,6 mm) oproti roku 2021 (474,8 mm). Vyšší úhrn srážek ovlivňuje růst trav a bylin, nižší úhrn srážek zas podporuje růst jetelovin.

Tabulka 6: Kvalita píce

2021	NL		ADF		NDF		Tuk		Cukry	
	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená
1. seč										
směs 1	8,31	9,09	30,23	30,56	57,14	57,19	1,42	1,42	12,46	12,86
směs 2	6,65	10,38	28,52	29,91	56,32	54,84	1,2	1,6	17,24	12,97
směs 3	9,92	11,75	33,87	34,5	62,43	60,88	1,86	1,34	13,43	14,68
směs 4	7,73	11,4	28,9	30,31	49,77	54,25	1,21	2,45	13,71	10,87

2022	NL		ADF		NDF		Tuk		Cukry	
	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená	nehnojená	hnojená
1. seč										
směs 1	11,38	14,15	28,93	30,87	52,74	53,87	1,53	2,05	13,26	10,35
směs 2	10,8	13,42	30,14	29,22	55,81	55,67	1,86	2,4	12,8	17,35
směs 3	10,21	11,53	34,15	33,93	60,35	63,45	1,58	1,87	10,7	13,65
směs 4	10,72	14,74	29,6	27,98	53,01	53,58	1,71	2,06	19,63	16,21

## Závěr

V 1. užitkovém roce (v hnojené i nehnojené variantě) se ve výnosech zelené hmoty a sena nejlépe projevila bylino-travní směs 1, se složením jílek vytrvalý „Jaran“, lipnice luční „Struga“, jitrocel kopinatý a čekanka obecná. Úspěch této směsi je v přítomnosti jitrocele kopinatého, který v 2. a 3. seči (tj. v měsících s nižším či nízkým úhrnem srážek) vytvořil oproti trávám velké množství biomasy. Druhou směsí v 1. užitkovém roce ve výnosu zelené hmoty a sena byla jetelotavní směs 3 se složením ovsík vyvýšený „Arone“, košťava luční „Rožnovská“, štírovník růžkatý „Tenor“. Výnosy hnojené i nehnojené varianty výrazně ovlivnila přítomnost ovsíku, který při dostatečném množství živin v půdě vytváří velké množství biomasy.

Ve 2. užitkovém roce se nejlépe projevila v hnojené i nehnojené variantě ve výnosech zelené hmoty a sena směs 3, což je dáno zesílením kořenového systému a stabilizací vyrostlých rostlin. Druhou směsí s nejvyšším výnosem byla v nehnojené variantě směs 4 a v hnojené variantě směs 1.

Odběr živin travních porostů, dle Ryanta a Skládanky (2004), je značně závislý i na množství sklizené píče a úrovni hnojení. Při produkci 7 t sena z 1 ha odebere travní porost 130 – 150 kg dusíku, 25 – 30 kg fosforu a 150 – 180 kg draslíku. Potřeba hnojení dusíkem je významná zejména pro travní druhy. Bez dostatečné zásoby draslíku a fosforu v půdě se význam hnojení dusíkem snižuje. Proto má z hlediska výnosů hnojení porostů určených pro pastvu, nebo seč na seno v suchých oblastech svůj význam.

## Poděkování

Příspěvek byl zpracován za podpory projektu "Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity", Jeteloviny a ostatní pícniny, VÚP Troubsko 51834/2017-MZE-17253/6.2.2. a DKRVO, číslo MZE-RO1722, financovaného Ministerstvem zemědělství.

## Literatura

- Mohelský, M.: Porovnání úživnosti stanovišť přírodních a kulturních porostů [online]. 2020 [cit. 2022-10-05]. Dostupné z: <https://myslivost.cz/Casopis-Myslivost/MYSLIVOST-Straz-myslivosti/2020/Prosinec-2020/Porovnani-uzivnosti-stanovist-prirodnich-a-kulturn>
- Ryant, P., Skládanka, J.: Výživa a hnojení trvalých travních porostů (2004). Sborník přednášek z mezinárodní konference a setkání chovatelů ovce – kozy – seč, Seč 19.-20.11.2004, s. 16-22.
- Šantrůčková, H.: Základy ekologie půdy (2014). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 125 s. ISBN: 978-80-7394-480-3.
- Vymyslický, T., Pavloušek P.: Multifunkční role leguminóz ve vinohradech a sadech (2016). *Úroda* 12-2016, vědecká příloha, s. 193-196. ISSN 0139-6013.
- Žofajová, A., Švec, M., Hauptvogel, P.: Tolerancia voči suchu pri pšenici (2016). *Úroda* 12-2016, vědecká příloha, s. 193-196. ISSN 0139-6013.

## Kontakt:

Ing. Ivana Frei, Ph.D.  
Zemědělský výzkum, spol. s r.o.  
Zahradní 1, 664 41 Troubsko  
608 126 267, frei@vupt.cz

## Výzkum pěstitelské technologie zrnového čiroku s ohledem na klimatickou změnu v oblasti Beskyd

Research of cultivation technology of grain sorghum with respect to climate change in the Beskyd area

Frydrych J.<sup>1</sup>, Hermuth J.<sup>2</sup>, Bradáčová L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Zubří

<sup>2</sup> Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha

### Abstrakt

Čirok zrnový 'Ruzrok' byl v roce 2017 až 2021 sklizen na výnos zelené, suché hmoty a sušiny na stanovišti v Zubří v jednosečném a dvousečném režimu. Z výnosových výsledků zelené, suché hmoty a sušiny dosáhl čirok nejvyššího výnosu ve všech sklizňových letech při dvousečné i jednosečné sklizni u varianty s výsevem 25 kg.ha<sup>-1</sup>. Varianta s výsevem 25 kg.ha<sup>-1</sup> dosáhla v roce 2017 a 2018 průměrného výnosu 60,78 t.ha<sup>-1</sup> zelené hmoty a 17,14 t.ha<sup>-1</sup> sušiny při dvousečné sklizni. Při jednosečné sklizni s výsevem 25 kg.ha<sup>-1</sup> dosáhla varianta čiroku v letech 2019–2021 průměrného výnosu 30,79 t.ha<sup>-1</sup> zelené hmoty a 11,99 t.ha<sup>-1</sup> sušiny. V podmínkách Zubří dosáhl čirok zrnový 'Ruzrok' velice příznivých výsledků v období zkušebních let 2017–2021 a lze jej do oblasti Beskyd pro jeho široké multifunkční využití pro pěstování doporučit. Čirok zrnový 'Ruzrok' představuje v současnosti perspektivní letní mezplodinu v podmínkách měnícího se klimatu v souvislosti s oteplováním.

**Klíčová slova:** čirok, odrůda 'Ruzrok', výnos zelené a suché hmoty, sklizeň, termín sklizně

### Abstract

Grain sorghum 'Ruzrok' was harvested from 2017 to 2021 for the yield of green, dry matter and dry weight at the site in Zubří in a single-cut and double-cut regime. From the yield results of green matter, dry matter and dry weight, sorghum achieved the highest yield in all harvest years in both double-cut and single-cut harvesting in the variant with sowing of 25 kg.ha<sup>-1</sup>. The variant with a sowing rate of 25 kg.ha<sup>-1</sup> achieved an average yield of 60.78 t.ha<sup>-1</sup> of green matter and 17.14 t.ha<sup>-1</sup> of dry weight 2017 and 2018 during two-cut harvesting. In a single-cut harvest with a sowing rate of 25 t.ha<sup>-1</sup>, the sorghum variant achieved an average yield of 30.79 t.ha<sup>-1</sup> of green matter and 11.99 t.ha<sup>-1</sup> of dry weight in the years 2019–2021. In the conditions of Zubří, grain sorghum 'Ruzrok' achieved very favorable results during the trial years 2017–2021 and can be recommended for the Beskydy region for its wide multifunctional use for cultivation. Grain sorghum 'Ruzrok' is currently a promising summer intercrop in the conditions of a changing climate in connection with warming.

**Keywords:** sorghum, 'Ruzrok' variety, yield of green and dry matter, harvest, harvest date

### Úvod

Čirok (*Sorghum*) je zemědělsky významný rod rostlin z čeledi lipnicovité. Je pěstován jako obilnina, např. na výrobu mouky a používá se též ke krmným a technickým účelům.

Hospodářský význam mají zejména různé variety čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*): čirok zrnový (*Sorghum bicolor* var. *eusorghum*) – varieta čiroku pěstovaná pro zrno (obilky); čirok technický (metlový) (*Sorghum bicolor* var. *technicum*) – pěstuje se pro latu, ze které se vyrábějí košťata a kartáče, vedlejší produkt lidově nazývané „rýžové“ zrno se používá ke

krmným účelům; čirok cukrový (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum*) – stébla této variety obsahují šťávu až s osmnácti procenty glukózy; čirok súdanský (tzv. „sudánská tráva“) (*Sorghum bicolor* var. *sudanense*) – tato varieta se pro bujný růst používá jako pícnina. Zrna čiroku neobsahují lepek. Hlavními komponenty jsou přibližně: 10 % vody, 8–10 % bílkovin (horší kvality), 70 % sacharidů, 1–3 % vlákniny, 3–6 % tuků. Dále obsahuje taniny a alkaloid dhurrin.

**Tab. 1: Hlavní producenti čiroku ve světě**

Stát	Výměra		Produkce	
	%	mil. ha	%	mil. t
Afrika	65,0	26,7	43,0	26,0
S/J Amerika	14,0	5,7	33,0	20,5
Austrálie, Čína, Indie	17,0	7,0	19,0	11,8
Evropa	1,5	0,6	2,5	1,5
Ostatní	2,5	1,0	2,5	1,5

(Zdroj: USDA 2015/2017)

56 % z celkové produkce určeno pro lidskou výživu; 44 % krmivo pro zvířata

Hlavní exportér – USA, dále Austrálie a Argentina

Hlavní importér – Čína, dále Japonsko, Mexiko a Evropa

**Tab. 2: Evropská produkce zrna čiroku (EU-28 + Ukrajina a Rusko); 2018**

Země	Výměra (tis. ha) nárůst oproti 2017		Produkce (tis. tun)
Rusko	90	–	200
Francie	70	+ 14 %	350
Ukrajina	54	+ 25 %	180
Itálie	46	+ 9 %	300
Maďarsko	20	+ 50 %	90
Rumunsko	19	+ 18 %	95
Španělsko	9	+ 28 %	43
Bulharsko	4	+ 100 %	18
Rakousko	4	+30 %	40
<b>Celkem</b>	<b>316</b>		<b>1316</b>

Se změnou klimatu je spojeno mnoho nežádoucích aspektů, které mohou v budoucnu silně ovlivnit zemědělskou produkci nejen v ČR, ale i v dalších zemích střední Evropy. Problémy způsobené suchem a jeho dopadem na zemědělskou produkci začínají být vážné a naléhavé. Čirok a bér italský by mohly být řešením pro české poměry. Mohou poskytovat dobré výnosy i v suchých obdobích (Hermuth a kol. 2016).

Rostoucí náklady na energii a omezené zásoby ropy a plynu vyvolaly potřebu vyvinout alternativní paliva z obnovitelných zdrojů. Potřeba vytvářet velké a udržitelné dodávky biomasy, aby byla výroba biopaliv z lignocelulózy zisková, bude vyžadovat vývoj plodin pěstovaných speciálně pro výrobu bioenergie. Jako specializované bioenergetické plodiny se bude používat několik různých druhů, a to z několika důvodů; očekává se, že čirok (*Sorghum bicolor* L. Moench) bude jedním z těchto druhů (Roney a kol. 2007).

Hodnocení komerčních hybridů za omezené dostupnosti vody má primární význam pro posouzení čiroku dvoubarevného (Moench) jako potenciální víceúčelové bioenergetické plodiny v prostředích náchylných k suchu ve Středomoří. Deset genotypů bylo pěstováno

během tří vegetačních období (2010, 2011 a 2012) v pokusech na otevřeném poli a v pokusech v nádobách (2014). Fenologické vlastnosti, produkce biomasy, obsah vlákniny a chemické složení biomasy byly měřeny v podmínkách zavlažování a deště. Rozdíly v produkci biomasy mezi deseti genotypy se v průběhu let lišily. V tříletém experimentu byly zjištěny významné rozdíly mezi deseti genotypy z hlediska délky vegetativního růstu ( $P < 0,05$ ) a produkce nadzemní suché biomasy ( $P < 0,1$ ) v reakci na zavlažované a dešťové podmínky (Fracasso a kol. 2017).

## Materiál a metody

Na pokusném stanovišti OSEVA Zubří byl zaset čirok zrnový 'Ruzrok' v letech 2017–2021. Porosty byly sledovány na výnos zelené hmoty, suché hmoty a obsah sušiny, s možností využití produkce pro energetické účely.

## Čirok zrnový 'Ruzrok'

'Ruzrok' představuje první multiliniový kultivar čiroku českého původu p. Ing. Jiřího Hermutha z Výzkumného ústavu rostlinné výroby Praha. (CRI). Jedná se o liniový kultivar, který byl vyprodukován řadou pozitivních a negativních selekcí z populace shromážděné v Bílých Karpatech na Moravě. V CRI se také provádí udržovací šlechtění kultivaru. 'Ruzrok' lze pěstovat jako energetickou plodinu pro produkci biomasy, krmiv a píce pro zvířata (přežvýkavce). Hlavními výhodami odrůdy 'Ruzrok' jsou vysoká relativní rychlost růstu, vysoká konečná výška rostliny a vysoký výtěžek rostlinné biomasy produkované během vegetačního období rostlin. 'Ruzrok' lze však pěstovat i na zrno, protože je schopen produkovat zralá semena v mírném klimatu střední Evropy. Díky svým specifickým znakům, především rychlému vegetačnímu růstu a ranosti, ale též schopnosti dozrát a vyprodukovat zrno v podmínkách ČR, je odrůda vhodná do osevních postupů jako hlavní plodina pěstovaná pro biomasu anebo i pro zrno, ale také jako fyto-sanitární meziplodina.

## Potravinářské využití čiroku 'Ruzrok' na zrno

Zrno může být využito pro potravinářské účely. Musí však být splněny normy pro obsah taninu, který se vyskytuje v obalových vrstvách zrna. Zrno čiroku odrůdy 'Ruzrok' lze technologickými postupy zbavit vnějších obalů bohatých na taniny, polyfenolických látek svíravé chuti, které způsobují specifické tmavě rubínové zbarvení zrna. Obroušená zrna zbavená vnějších obalů lze pak mlít na krupici či mouku. Společnost PRO-BIO Staré Město pod Sněžníkem, která se zabývá zpracováním a výrobou biopotravin rostlinného původu, použila technologii obroušení zrna, která vedla k účinnému odstranění vnějších vrstev zrna obsahujících tanin, a tím vytvořila produkt prostý taninu. Čiroková mouka sice nemá takové technologické vlastnosti, aby se z ní samostatně dalo péct pečivo, ale lze ji přidávat do různých směsí. Velkou výhodou čirokové krupice, mouky a dalších produktů z čirokových zrn je, že jsou bezlepkové, jsou tedy vhodné pro osoby trpící celiakií.

**Tab. 3: Chemická charakterizace složení zrna (%) u odrůdy 'Ruzrok'**

Obsah hrubých bílkovin	Tuky	BNLV	Vláknina	Popeloviny
12,62	2,89	69,15	5,61	1,31

## Využití čiroku zrnového 'Ruzrok' v pivovarnictví

V roce 2018 byla připravena: Ověřená technologie ve využití první české odrůdy zrnového čiroku 'Ruzrok' v pivovarnictví, vývoj receptur různých druhů svrchně kvašených piv, testování

a chování sladovaného i nesladovaného čiroku (odrůdy 'Ruzrok') v procesu výroby piva a jeho vlivu na sensorické vlastnosti piva. Ověřená technologie je vyvinutá ve spolupráci VÚRV, v. v. i. a Řemeslného pivovaru Clock s.r.o., zajišťující sériovou výrobu požadovaného typu piva. Originalita této technologie spočívá ve využití čirokového sladu z české odrůdy 'Ruzrok', který pomáhá snížit množství lepku v pivu. Rozborem zjištěné množství gliadinu je pod  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ , toto svrchně kvašené pivo je řazené mezi bezlepkové vhodné pro celiaky. Dosud v České republice nebylo využito při výrobě speciálních piv čirokového sladu. Pivo se prodává pod názvem GLEE, ANTONIO a HERBEE.

### Výsledky a diskuze

Ve všech testovaných letech 2017–2021 příznivě ovlivnilo vzházení čiroku preemergentní aplikace přípravku Gardoprim Gold v dávce  $4 \text{ l.ha}^{-1}$  na  $400 \text{ l}$  vody. Porost čiroku byl bez plevelů, které by negativně ovlivnily jeho vzejití a následný vývoj. Pokus s čírokiem 'Ruzrok' byl založen na přelomu května a června v testovaných letech. Pokus byl zaset do jednoho bloku o velikosti parcel  $10 \text{ m}^2$ . Před setím byl pokus přihnojen dávkou  $50 \text{ kg N.ha}^{-1}$  ve formě kombinovaného hnojiva NPK. V průběhu vegetace byl číroek přihnojen dávkou  $90 \text{ kg N.ha}^{-1}$  ve formě ledku amonného s vápencem. Zvoleny byly dvě varianty výsevu  $20$  a  $25 \text{ kg.ha}^{-1}$ , každá ve 2 opakováních v roce 2017 a 2018, v roce 2019–2021 ve výsevu  $25 \text{ kg.ha}^{-1}$  s roztečí řádků  $21 \text{ cm}$  ve čtyřech opakováních. Sklizeň porostu byla provedena v jednosečném (v letech 2017–2021) a dvousečném režimu (v roce 2017 a 2018).

**Tab. 4: Výnosy zrnového čiroku 'Ruzrok' v roce 2017 (průměr 2 opakování)**

Varianta	Počet sečí	Datum sklizně	% sušiny v zelené hmotě	Výnos zelené hmoty ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	Výnos suché hmoty při 85% sušiny v suché hmotě ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	Výnos sušiny ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	
						v seči	celkem
Výsev $20 \text{ kg.ha}^{-1}$	I. seč	2. 8.	24,73	33,60	9,78	8,31	14,20
	II. seč	2. 10.	25,37	23,20	6,93	5,89	
	jedna seč	2. 10.	37,42	21,35	9,40	7,99	7,99
Výsev $25 \text{ kg.ha}^{-1}$	I. seč	2. 8.	28,79	36,00	12,19	10,36	17,30
	II. seč	2. 10.	26,73	25,95	8,16	6,94	
	jedna seč	2. 10.	38,59	27,85	12,65	10,75	10,75

**Tab. 5: Výnosy zrnového čiroku 'Ruzrok' v roce 2018 (průměr 2 opakování)**

Varianta	Počet sečí	Datum sklizně	% sušiny v zelené hmotě	Výnos zelené hmoty ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	Výnos suché hmoty při 85% sušiny v suché hmotě ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	Výnos sušiny ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	
						v seči	celkem
Výsev $20 \text{ kg.ha}^{-1}$	I. seč	9. 8.	28,34	30,10	10,04	8,53	14,88
	II. seč	9. 10.	25,83	24,60	7,48	6,35	
	jedna seč	9. 10.	36,38	22,50	9,64	8,19	8,19
Výsev $25 \text{ kg.ha}^{-1}$	I. seč	9. 8.	29,40	32,80	11,34	9,64	16,97
	II. seč	9. 10.	27,32	26,80	8,62	7,33	
	jedna seč	9. 10.	37,18	28,40	12,42	10,56	10,56

Z výnosových výsledků zelené, suché hmoty a sušiny (Tab. 4) dosáhl číroek nejvyššího výnosu sušiny  $17,3 \text{ t.ha}^{-1}$  při dvousečné sklizni u varianty s výsevem  $25 \text{ kg.ha}^{-1}$  v roce 2017. Varianta s výsevem  $25 \text{ kg.ha}^{-1}$  se projevila vhodnější do klimatických a stanovištních podmínek Zubří. Současně bylo dosaženo i výnosu  $61,95 \text{ t.ha}^{-1}$  zelené hmoty v roce 2017.



Veškeré varianty a opakování byly sklizeny jako celé rostliny v roce 2018. Z výnosových výsledků zelené, suché hmoty a sušiny dosáhl širok nejvyššího výnosu sušiny 16,97 t.ha<sup>-1</sup> při dvouosečné sklizni u varianty s výsevem 25 kg.ha<sup>-1</sup> (Tab. 5). Varianta s výsevem 25 kg.ha<sup>-1</sup> dosáhla v roce 2017 a 2018 průměrného výnosu 60,78 t.ha<sup>-1</sup> zelené hmoty a 17,14 t.ha<sup>-1</sup> sušiny.

**Tab. 6: Výnosy zrnového čiroku 'Ruzrok' v roce 2019–2021 (průměr 4 opakování)**

Varianta	Rok sklizně	Datum sklizně	% sušiny v zelené hmotě	Výnos zelené hmoty (t.ha <sup>-1</sup> )	Výnos suché hmoty při 85% sušiny v suché hmotě (t.ha <sup>-1</sup> )	Výnos sušiny (t.ha <sup>-1</sup> )
						celkem
Výsev 25 kg.ha <sup>-1</sup>	2019	1.10.	39,09	29,80	13,70	11,65
	2020	27.9.	39,42	30,57	14,18	12,05
	2021	30.9.	38,77	31,78	14,49	12,32
<b>Průměr</b>	<b>2019–2021</b>		<b>39,09</b>	<b>30,79</b>	<b>14,12</b>	<b>11,99</b>

V letech 2019–2021 byl širok sklizen v jednosečném režimu se založením na přelomu května a června a se sklizní na přelomu září a října nejpozději do konce první dekády v říjnu.

Při jednosečné sklizni dosáhla varianta čiroku v letech 2019–2021 průměrného výnosu 30,79 t.ha<sup>-1</sup> zelené hmoty a 11,99 t.ha<sup>-1</sup> sušiny. V průběhu zkušebních let 2017–2021 byly zaznamenány ojediněle červené skvrny a na listech a zaschlé listy (po odeslání vzorků a konzultaci s p. Ing. Hermuthem byl zjištěn komplex chorob vyskytujících se na čiroku a skvrny způsobené abiotickými faktory). Jiné závažné onemocnění na rostlinách čiroku nebylo zaznamenáno.

Na podzim širok obsahuje více než 50 % vody, a proto je vhodnější ho sklízet samochodnými sklízecími rezačkami koncem zimy, kdy mráz rostliny částečně vysuší. Bohužel přes zimní období dochází v důsledku nepříznivých podmínek k lámání rostlin a tím i k vysokým ztrátám biomasy, které dosahují až 50 % v porovnání s podzimním termínem sklizně (Petříková a kol. 2006). Širok na zrno se sklízí sklízecí mlátičkou upravenou na vysoký řez, a to v plné zralosti, když jsou zrna vybarvená a lesklá (Kára a kol. 2005). Doporučuje se provést dvoufázovou sklizeň, neboť v době žluté zralosti zrn má zelená hmota poměrně vysoký obsah vody (Moudrý, Stražil 1999). Vymláčené zrno je třeba dočistit a dosušit na vlhkost 15 °C. Semeno je třeba pečlivě uskladnit, protože velmi snadno plesniví (Kára a kol. 2005).

### Komentář k počasí v letech 2017–2021

Rok 2017 byl na základě měření teploty vzduchu na lokalitě Zubří podle metodiky Světové meteorologické organizace hodnocen jako teplotně mimořádně nadnormální s průměrnou teplotou vzduchu 9,2 °C (odchylka proti normálu +1,7 °C) a srážkově normální s ročním úhrnem srážek 845,3 mm (odchylka od normálu –19,2 mm).

Rok 2018 byl na základě měření teploty vzduchu na lokalitě Zubří hodnocen jako teplotně mimořádně nadnormální s průměrnou teplotou vzduchu 10,3 °C (odchylka proti normálu +2,8 °C) a srážkově silně podnormální s ročním úhrnem srážek 586,5 mm (odchylka od normálu –278 mm).

Rok 2019 pokračoval v trendu zvyšující se průměrné teploty vzduchu, a tak patří k nejteplejšímu roku za posledních 10 let. Na základě měření teploty vzduchu podle metodiky Světové meteorologické organizace, kdy Zubří dosáhlo průměrné teploty 10,4 °C (odchylka oproti normálu +2,9 °C), je hodnoceno jako mimořádně nadnormální. Srážky s hodnotou 844 mm (odchylka od normálu –20 mm) se udržely v normálu.

Rok 2020 byl s průměrnou teplotou 9,8 °C mimořádně nadnormální a srážkově s množstvím srážek 1105,3 mm nadnormální.

Rok 2021 byl s průměrnou teplotou 9 °C teplotně nadnormální a srážkově s množstvím srážek 763 mm podnormální.

Uvedené meteorologické údaje za roky 2017–2021 dokládají zejména zvýšení průměrné teploty vzduchu oproti dlouhodobému normálu ve všech letech. Zejména zvýšené průměrné teploty vzduchu v testovaných letech ovlivnily růst, vývoj a výnos čiroku jako perspektivní letní meziplodiny v podmínkách měnícího se klimatu v souvislosti s oteplováním.

## **Závěr**

V současnosti nabývá na významu inovace pěstitelské technologie čiroku zejména z hlediska jeho multifunkčního využití jako meziplodiny, zdroje biomasy pro krmné a energetické účely a využití zrna pro potravinářské a krmné účely v souvislosti s měnící se klimatickou změnou. Odrůda čiroku zrnového 'Ruzrok' je první česká odrůda čiroku zrnového, vyšlechtěná Ing. Jiřím Hermuthem z VÚRV, v. v. i., která byla registrována v roce 2014 pro podmínky České republiky a byla testována v podmínkách marginální oblasti výzkumné stanice travinářské v Zubří. Čirok je možné využít pro sklizeň ve dvou sečích. Varianta s výsevkem 25 kg.ha<sup>-1</sup> dosáhla v roce 2017 a 2018 průměrného výnosu 60,78 t.ha<sup>-1</sup> zelené hmoty a 17,14 t.ha<sup>-1</sup> sušiny při dvousečné sklizni. Při jednosečné sklizni dosáhla varianta čiroku v letech 2019–2021 průměrného výnosu 30,79 t.ha<sup>-1</sup> zelené hmoty a 11,99 t.ha<sup>-1</sup> sušiny. Optimální zásev čiroku je pro dvousečnou i jednosečnou sklizeň v podmínkách Zubří do 31.5. Termín sklizně první seče u dvousečného využití je optimální v poslední dekádě července, maximálně na přelomu července a srpna a sklizně druhé seče koncem září až v první dekádě října. U jednosečného využití je optimální sklizeň čiroku na přelomu září a října a do konce první dekády října. Využití čiroku v marginální oblasti Beskyd můžeme směřovat zejména pro krmné, energetické účely případně i jako meziplodiny. Ve všech sklizňových letech 2017–2021 čirok dozrál na zrno, které lze rovněž využít pro potravinářské a krmné účely. V podmínkách Zubří dosáhl čirok zrnový 'Ruzrok' velice příznivých výsledků a lze jej do oblasti Beskyd pro jeho široké multifunkční využití doporučit pro pěstování. Meteorologické údaje za roky 2017–2021 dokládají zejména zvýšení průměrné teploty vzduchu oproti dlouhodobému normálu a ovlivnily růst, vývoj a výnos čiroku jako perspektivní letní meziplodiny v podmínkách měnícího se klimatu v souvislosti s oteplováním v marginální oblasti Beskyd.

## **Dedikace**

Publikace je 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-1818 a na základě finanční podpory projektu Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., Praha MZe RO0418 Udržitelné systémy a technologie pěstování zemědělských plodin pro zlepšení a zkvalitnění produkce potravin, krmiv a surovin v podmínkách měnícího se klimatu.

### Použitá literatura

- Fracasso, A., Perego, A., Amaducci, S., 2017. Characterisation of ten commercial sorghum genotypes grown under water-limited conditions for bioenergy production in Mediterranean environment. *Italian Journal of Agronomy*; 12: 898: 302-314. Available at <https://publicatt.unicatt.it/handle/10807/112878>
- Frydrych, J., Hermuth, J., Lošák, M., Bradáčová, L., 2021. Trávy a vybrané C<sub>4</sub> plodiny jako meziploidy a jejich využití v současných podmínkách měnícího se klimatu. Certifikovaná metodika. Vydavatel OSEVA vývoj a výzkum, 2021. 40 s. ISBN 978-80-908008-0-9.
- Frydrych, J., Volková, P., Pikulová, M., Gerndtová, I., Andert, D., 2018. Čiroky v marginální oblasti Beskyd a výzkum energetických plodin pro zvýšení ochrany půdy s využitím trav a jetelovin. *Agromanuál*. 2018, roč. 13, č. 5, s. 113–115. ISSN 1801-7673.
- Hermuth, J., Janovská, D., Hlásná Čepková, P., Ust'ak, S., Strašil, Z., Dvořáková, Z., 2016. Sorghum and Foxtail Millet – promising crops for the changing climate in Central Europe. In: Konvalina P. (ed.): *Alternative Crops and Cropping Systems*. Intech Open Science/Open Minds: 5–27. Available at <http://dx.doi.org/10.5772/62642>
- Hermuth, J., Kosová, K., Podrábský, M., Trávníček, P., Frydrych, J., Hladík, J., Král, L., 2018. Pěstební technologie zrnového čiroku odrůdy Ruzrok. Ověřená technologie. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2018, 30 s. ISBN 978-80-7427-259-2.
- Kára, J., Pastorek, Z., Jevič, P., 2004. *Biomasa: obnovitelný zdroj energie*, Praha, FCC Public, 288 s.
- Kára, J., Strašil, Z., Hutla, P., Ust'ak, S., 2005. *Energetické rostliny, technologie pro pěstování a využití*. Výzkumný ústav zemědělské techniky, Praha, 80 s.
- Moudrý, J., Strašil, Z., 1999. *Pěstování alternativních plodin (učební texty)*. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 162 s.
- Petříková, V., Sladký, V., Strašil, Z., Šafařík, M., Ust'ak, S., Váňa, J., 2006. *Energetické plodiny*. Profi Press, s.r.o., Praha, 127 s.
- Rooney, W. L., Blumenthal, J., Bean, B., Mullet, J. E., 2007. Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1: 147–157 Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bbb.15>

### Kontaktní adresa:

Ing. Jan Frydrych  
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.  
Hamerská 698, Zubří 756 54  
[frydrych@oseva.cz](mailto:frydrych@oseva.cz)



## Využití vybraných travních druhů a jejich směsí jako meziplodin

Use of selected grass species and their mixtures as intercrop

Frydrych J., Bradáčová L.

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Zubří

### Abstrakt

V podmínkách OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. Zubří byly testovány v letech 2019, 2020 a 2021 vybrané druhy trav jako meziplodiny. Do sledování byl zařazen jílek vytrvalý 'Kentaur', kostřava červená 'Zulu' a kostřava rákosovitá 'Kora' ve směsích s využitím jako meziplodiny. Vybrané travní směsi byly založeny na přelomu května a června, koncem srpna a v měsíci říjnu v letech 2018, 2019 a 2020. U travních směsí sklizených v prvním užitkovém roce 2019, 2020 a 2021 byl zjištěn výnos zelené, suché hmoty a sušiny. Produkci travních směsí a jílku vytrvalého je možné využít pro energetické účely. Výnos sušiny u jednotlivých směsí a jílku vytrvalého byl přepočítán na ekvivalent černého uhlí (t). Nejvyššího průměrného výnosu zelené hmoty ( $38,4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), suché hmoty ( $15 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) a sušiny ( $12,8 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) dosáhla směs jílku vytrvalého 'Kentaur' a kostřavy rákosovité 'Kora' založená v prvním termínu zásevu na přelomu května a června v letech 2018, 2019 a 2020 v dávce  $20 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Současně byl dosažen i nejvyšší ekvivalent černého uhlí z jednoho hektaru ( $7,5 \text{ t}$ ).

**Klíčová slova:** výzkum, plodina, výnos zelené hmoty, suchá hmota, travní směs

### Abstract

In the conditions of OSEVA Development and Research Ltd. Zubří were tested in 2019, 2020 and 2021 with selected types of grasses as intercrops. Perennial ryegrass 'Kentaur', red fescue 'Zulu' and reed fescue 'Kora' were included in the monitoring in mixtures with use as catch crops. The selected grass mixtures were established at the turn of May and June, at the end of August and in the month of October in the years 2018, 2019 and 2020. For the grass mixtures harvested in the first useful year of 2019, 2020 and 2021, the yield of green matter, dry matter and dry matter was determined. The production of grass mixtures and perennial ryegrass can be used for energy purposes. The yield of dry matter for individual mixtures and perennial ryegrass was recalculated to the equivalent of black coal (t). The highest average yield of green matter ( $38.4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), dry matter weight ( $15 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) and dry matter ( $12.8 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) was achieved by a mixture of perennial ryegrass 'Kentaur' and reed fescue 'Kora' established at the first sowing date at the turn of May and June in 2018, 2019 and 2020 in a dose of  $20 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . At the same time, the highest equivalent of hard coal from one hectare ( $7.5 \text{ t}$ ) was also achieved.

**Keywords:** research, crop, green matter yield, dry matter, grass mixture

### Úvod

Udržitelná intenzifikace zemědělského hospodaření vyžaduje agroekologické a adaptivní řízení agropotravinářského komplexu. Zde je vhodné se zaměřit na meziplodiny a na to, jak lze tuto agroekologickou praxi využít ke zvýšení udržitelnosti rostlinné výroby. Kromě dosažení vyšší produktivity může diverzifikace pěstebních systémů pomocí strategických meziplodin zvýšit stabilitu výnosu, snížit výskyt škůdců a zlepšit zdraví půdy. V industrializované zemědělské krajině je již zavedeno několik systémů meziplodin, včetně smíšených meziplodin s vytrvalými travami a luskovinami, pícniny a meziplodiny s ozimou pšenicí a jetelem (Bybee-Finley, A. a kol. 2018). Meziplodiny jsou přínosem pro životní prostředí a jsou široce doporučovány

programy, které podporují zemědělské postupy šetrné k životnímu prostředí. Meziplodiny mohou omezit migraci živin (zejména dusíku N a fosfor – P) do hlubších vrstev půdy a ovlivňují pH půdy, fyzikální parametry půdy, jako je zhutnění, pórovitost, obsah vody a teplota a biologické a enzymatická aktivita půdy. Meziplodiny hrají velmi důležitou roli v zemědělských ekosystémech, a jejich vliv je dán především stanovištními podmínkami (počasí a půdní parametry) a dále rostlinnými druhy, objemem biomasy a agronomickými faktory (Wanic, M. a kol. 2019).

Trávy jsou velmi obsáhlou a rozmanitou čeledí lipnicovitých (*Poaceae*), která je na území České republiky zastoupena 64 rody (včetně významných obilnin) a více než 200 druhy. (Kubát 2002). Výskyt trav je vázán na travinné ekosystémy, z nichž nejvýznamnější jsou společenstva různých typů přirozených a polopřirozených lučních porostů. V systému rostlin patří trávy mezi rostliny jednoděložné, které jsou charakterizované přítomností pouze jediného děložního lístku a dalšími znaky, jako je typ kořenového systému, stavba květů a rovnoběžná žilnatina listů. Zahrnují druhy jednoleté, víceleté i vytrvalé, ozimé i jarní, cizosprašné i samosprašné. Morfologicky tvoří poměrně jednotnou skupinu (Cagaš a kol. 2010). Pro využití trav jako meziplodin je důležitá jejich rychlost vývinu po zasetí. Rychlost vývinu i stupeň vytrvalosti se neřídí jen biologickými vlastnostmi jednotlivých druhů trav, ale současně i stanovištními podmínkami a agrotechnikou. Správnou agrotechnikou a racionálním využitím můžeme podstatně zvýšit vytrvalost volně trsnatých trav. Do výzkumu byl vybrán jílek vytrvalý s rychlým vývinem, kostřava červená a kostřava rákosovitá se středně rychlým vývinem.

Klesnil a kol. (1982) uvádějí, že rychlost vývinu je nepřímě úměrná vytrvalosti trav. Podle rychlosti vývinu můžeme víceleté trávy rozdělit do tří skupin:

1. Trávy s rychlým vývinem, dosahující nejvyšších výnosů již v prvním užitkovém roce. Jejich vytrvalost je však poměrně velmi nízká a mnohé z nich již v druhém až pátém užitkovém roce hynou.
2. Trávy se středně rychlým vývinem, dospívající do plné výkonnosti zpravidla v prvním až druhém užitkovém roce. Trávy této skupiny se vyznačují vyšší vytrvalostí, tj. 5–10 let.
3. Trávy s pomalým vývinem dosahují maximální růstovou energii pravidelně až ve třetím nebo čtvrtém roce. Jejich vytrvalost v příznivých podmínkách bývá delší než 10 let.

Cagaš a kol. (2010) uvádějí jako druhy, které rostou a vyvíjejí se po zasetí poměrně rychle bojínky luční, bojínky hlíznatý, jílek mnohokvětý, jílek vytrvalý, jílek hybridní, lipnice obecnou, ovsík vyvýšený, sverep bezbranný. Středně rychle se vyvíjí po zasetí kostřava červená, kostřava luční, kostřava rákosovitá, srha laločnatá, srha hajní, medyněk vlnatý, pohánka hřebenitá, tomka vonná, trojštět žlutavý. Pomalý růst a vývoj autoři uvádějí u kostřavy ovčí, lipnice luční, lipnice nízké, lipnice smáčkuté, psárky luční, psinečku obecného, psinečku psího, psinečku velikého, chrastice rákosovité, metlice trsnaté, smělku štíhlého.

Význam víceletých pícnin na orné půdě se zvyšuje v souvislosti s udržitelným systémem hospodaření v českém zemědělství. V posledních 20 letech došlo ke snížení stavu víceletých pícnin na současných 10–15 % na orné půdě a ke zvýšení ploch kukuřice. K nárůstu ploch kukuřice došlo i v souvislosti s výstavbou zemědělských bioplynových stanic, kterých je v současnosti v České republice více jak 500.

Cagaš (1996) uvádí v Metodice pro zemědělskou praxi 3/96: Restrukturalizace a extenzifikace rostlinné výroby (Vrkoč a kol. 1996): Trávy samotné, tak i jejich směsi s nejrůznějšími druhy jetelovin splňují základní požadavky kladené na trvalý pokryv půdy, snížení rizika eroze, omezení druhotného zaplevelení, zlepšení fyzikálního a chemického stavu půdy, podporu

biologického života v půdě a v neposlední řadě i okamžitou pohotovost k převodu těchto ploch do běžné zemědělské výroby. Ve větší či menší míře se mohou trávy a jeteloviny podílet na:

- krátkodobých úhorech (1–3 roky),
- dlouhodobém zatravnění,
- vytvoření produkce zdrojů obnovitelné energie.

Zařazením vhodných meziplodin, tzn. směsí trav s jinými plodinami případně jetelovinami a jiných plodin do osevních postupů jako meziplodin se sníží negativní dopad menší plochy víceletých pícnin na orné půdě a zlepší celkový stav půdy ve vztahu k půdní úrodnosti.

### **Charakteristika trav testovaných v podmínkách OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. v Zubří**

Jílek vytrvalý – vyznačuje se rychlým vývinem po zasetí. Je nižšího vzrůstu, ale s dobrou konkurenční schopností. Patří mezi volně trsnaté trávy ozimého charakteru. Poskytuje velmi kvalitní píci. Snáší dobře sešlapávání a intenzivní spásání. Má velmi dobrou regenerační schopnost. Je základem všech směsí pro rychlou obnovu ploch a regenerační přisevy, kde se uplatní jeho rychlý vývoj po zasetí.

Jílek vytrvalý 'Kentaur' poskytuje velmi vysoké výnosy při sklizni na siláž – 116 % v první seči ve srovnání se 4n kontrolami. Kvalita píce je na vysoké úrovni se všemi výhodami tetraploidních odrůd, jako je snadná konzervace díky vysokému obsahu cukrů a vyšší kvalitě hmoty v dalších sečích v porovnání s diploidními odrůdami. Jedná se o tetraploidní odrůdu se střední až pozdní dobou metání, určenou pro pastevní využití, která byla ve Státní odrůdové knize ČR registrována v roce 2002. Odrůda je odolná proti napadení plísní sněžnou, méně odolná proti napadení listovými skvrnitostmi, středně odolná proti napadení rzi (ÚKZÚZ, 2020). Odrůda byla vyšlechtěna křížením a následným výběrem pozdních typů zahraničních tetraploidních odrůd.

Kostřava červená – pícní odrůdy kostřavy červené náleží převážně k výběžkaté formě a uplatňují se v extenzivně obhospodařovaných trvalých lučních i pastevních porostech na extrémnějších stanovištích (ve vyšších polohách, chudších půdách) zaplňují v nich spodní patro porostu a zvyšují stabilitu drnu. Kostřava červená se šlechtí především pro trávnickové a doplňkově pro pícninářské využití. Nabídka zejména trávnickových odrůd ve světě je velmi bohatá ve třech morfologicky odlišných formách: trsnaté, krátce výběžkaté a dlouze výběžkaté.

Kostřava červená 'Zulu' je velmi raná odrůda s velmi časným začátkem jarního růstu a časnou produkcí zelené hmoty, výrazně ranější než ostatní povolené odrůdy, je trsnatá ozimého charakteru. Obrůstání po sečích v letních měsících jen střední až slabší. Odolnosti proti chorobám střední, vytrvalost dobrá. Pícninářské výnosy střední až nižší. Semenářsky jistá, výkonná, méně vypadáva. Je vhodným komponentem směsí pro víceleté až vytrvalé pastevní porosty, které na jaře umožňují až o 14 dní časnější zahájení první pastvy. Vzhledem k příznivému jarnímu obrůstání je vhodná též pro běžné, méně náročné trávnické i v sušších podmínkách.

Kostřava rákosovitá – zpočátku byla využívána pouze jako vysoce produkční pícní tráva. Nyní převládá využití jejích mimořádných vlastností v trávnickářství. Tomu odpovídá i velký nárůst počtu trávnickových odrůd, které převažují nad pícními. V evropském katalogu (2009) je zapsáno celkem 212 odrůd. Listina OECD (2010) uvádí celkem 357 odrůd. Vzhledem k vysoké adaptabilitě druhu vůči různým nepříznivým faktorům se uplatňuje v hrubších, ne příliš nízko kosených zatěžovaných trávnicích (dostihové dráhy, výběhy, letištní plochy), v užitkových trávnicích veřejné zeleně, v extenzivních trávnicích krajinného charakteru na výsušných i mokřích stanovištích, k zatravnění mezíradí ovocných sadů a vinic. Jemnější trávnickové odrůdy se stále častěji uplatňují v hřišťových trávnicích.

Kostrava rákosovitá 'Kora' je raná až středně raná odrůda, vhodná pro luční i pastevní využití. Jarní růst velmi rychlý, po sečích hustě obrůstá. Odolná proti napadení plísní sněžnou, je vytrvalá a zimovzdorná. Dobře snáší letní přísušky i zamokření. List je střední a široký. Rostlina je v nástupu do fáze metání velmi raná. Lichoklas je dlouhý, široký až velmi široký se silným zakřivením. Lichoklas, jeho kompaktnost je řídká až střední. Barva plevy semene je krémově žlutá, semeno je kulaté, barvy zlatavě žluté. Hmotnost tisíce semen je vysoká.

## Materiál a metody

Travní směsi a jílek vytrvalý byly vysety v polních maloparcelních pokusech s různými způsoby, resp. termíny zakládání v parcelkách o velikosti 10 m<sup>2</sup> s meziřádkovou vzdáleností 21 cm. Současně byly odzkoušeny tři zásevy travních směsí na přelomu května a června, koncem srpna a v měsíci říjnu v letech 2018, 2019 a 2020. Jílek vytrvalý byl odzkoušen v zásevu na přelomu srpna a září a října ve třech testovaných letech 2018, 2019 a 2020. Plodiny byly nahnojeny před setím dávkou 40 kg N.ha<sup>-1</sup>. Ve sklizňových letech 2019, 2020 a 2021 byly pokusy přihnojeny dávkou 54 kg N.ha<sup>-1</sup> v měsíci dubnu.

Pokusy byly sklizeny na výnos zelené hmoty, suché hmoty a sušiny v jedné seči. Produkci travních směsí a jílků vytrvalého je možné využít pro energetické účely. Produkce sušiny byla přepočtena ekvivalentem černého uhlí pro jednotlivé varianty směsí. Uvedený ekvivalent černého uhlí v tunách udává produkci sušiny z 1 ha, která by nahradila uvedené množství černého uhlí.

V roce 2019, 2020 a 2021 byly zařazeny do výzkumu jílek vytrvalý 'Kentaur', kostrava červená 'Zulu' a kostrava rákosovitá 'Kora'.

## Popis pokusné lokality

Pozemky OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. v Zubří leží v nadmořské výšce 345 m. Dlouhodobá průměrná roční teplota je 7,5 °C a dlouhodobý roční úhrn srážek činí 864,5 mm. Dlouhodobá průměrná teplota za vegetační období je 14,3 °C a dlouhodobý úhrn srážek za vegetační období činí 546,8 mm. Pozemky na stanici se nacházejí v klimatickém regionu 7 – mírně teplém.

## Výsledky a diskuze

V maloparcelkových pokusech byly založeny směsi trav s jílkem vytrvalým 'Kentaur' a kostravou rákosovitou 'Kora' v dávkce 10 a 20 kg.ha<sup>-1</sup> a směs jílků vytrvalého 'Kentaur' a kostravy červené 'Zulu' v dávkce 10 a 20 kg.ha<sup>-1</sup> na přelomu měsíce května a června 2018, 2019 a 2020 a přelomu měsíce srpna a září 2018, 2019 a 2020. Na přelomu měsíce srpna a září 2018, 2019 a 2020 byl rovněž založen jílek vytrvalý v dávkce 20 kg.ha<sup>-1</sup> ve třech zkušebních letech 2018, 2019 a 2020. V říjnu 2018, 2019 a 2020 byla založena směs jílků vytrvalého 'Kentaur' a kostravy rákosovité 'Kora' s výsevem 20 kg.ha<sup>-1</sup> a jílků vytrvalého s výsevem 20 kg.ha<sup>-1</sup>. Celkově byly srovnány zásevy travních směsí ve třech výsevních termínech v letech 2018, 2019 a 2020 a zásev jílků vytrvalého v letech 2018, 2019 a 2020 ve dvou termínech.

**Tab. 1: Průměrný výnos zelené hmoty, suché hmoty, sušiny a energetická produkce vybraných travních směsí s hektarovými a polovičními výsevky v roce 2019–2021**

Hodnocení	Směs JV + KR 20 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KR 10 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KR 20 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KR 10 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KR 20 kg.ha <sup>-1</sup>
	I. termín výsevu	I. termín výsevu	II. termín výsevu	II. termín výsevu	III. termín Výsevu
Výnos zelené hmoty (t.ha <sup>-1</sup> )	38,4	36,1	35,8	34,0	18,0



Výnos suché hmoty (t.ha <sup>-1</sup> )	15,0	13,9	13,8	13,2	6,8
Výnos sušiny (t.ha <sup>-1</sup> )	12,8	11,8	11,7	11,2	5,8
Ekvivalent černého uhlí (t)	7,5	7,0	6,6	6,5	3,4

Směs JV + KR – směs jílku vytrvalého a kostřavy rákosovité

**Tab. 2: Průměrný výnos zelené hmoty, suché hmoty, sušiny a energetická produkce vybraných travních směsí s hektarovými a polovičními výsevy v roce 2019–2021**

Hodnocení	Směs JV + KČ 20 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KČ 10 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KČ 20 kg.ha <sup>-1</sup>	Směs JV + KČ 10 kg.ha <sup>-1</sup>	JV 20 kg.ha <sup>-1</sup>	JV 20 kg.ha <sup>-1</sup>
	I. termín výsevu	I. termín výsevu	II. termín výsevu	II. termín výsevu	II. termín výsevu	III. termín výsevu
Výnos zelené hmoty (t.ha <sup>-1</sup> )	37,0	35,3	34,9	33,8	31,0	17,1
Výnos suché hmoty (t.ha <sup>-1</sup> )	13,7	13,4	13,1	12,1	11,6	6,2
Výnos sušiny (t.ha <sup>-1</sup> )	12,0	11,3	10,8	10,3	9,5	5,5
Ekvivalent černého uhlí (t)	7,0	6,6	6,6	6,2	5,8	3,1

Směs JV + KČ – směs jílku vytrvalého a kostřavy červené

Ekvivalent černého uhlí (t) – uvedený ekvivalent černého uhlí v tunách udává produkci sušiny z 1 ha, která by nahradila uvedené množství černého uhlí.

V měsíci červnu 2019, 2020 a 2021 ve třech sklizňových letech byly pokusy sklizeny na výnos zelené, suché hmoty a sušiny. Nejvyššího průměrného výnosu zelené (38,4 t.ha<sup>-1</sup>), suché hmoty (15 t.ha<sup>-1</sup>) a sušiny (12,8 t.ha<sup>-1</sup>) dosáhla směs jílku vytrvalého 'Kentaur' a kostřavy rákosovité 'Kora' založená v prvním termínu zásevu na přelomu května a června 2018, 2019 a 2020. Současně byla dosažena i nejvyšší produkce černého uhlí z jednoho hektaru (7,5 t) jako ekvivalentní náhrada produkce sušiny dané směsi. U prvního zásevu na přelomu května a června 2018, 2019 a 2020 se projevila odolnost kostřavy rákosovité a její přizpůsobivost vůči zejména deficitu srážek v letních měsících, kdy směs jílku vytrvalého 'Kentaur' a kostřavy rákosovité 'Kora' ve výsevním množství 20 kg.ha<sup>-1</sup> dosáhla nejvyššího výnosu zelené, suché hmoty a sušiny oproti ostatním variantám směsí a jílku vytrvalého. Jílky jsou charakteristické zejména rychlým vzcházením a zapojením porostu.

Jílky a jejich směsi lze doporučit jako meziplodiny na jaře, v pozdním létě a na počátku podzimu. Jako meziplodiny lze využít i jílek mnohokvětý (italský) a jílek jednoletý. Cagaš (2010) charakterizuje jílek mnohokvětý jako nejvýznamnější travní druh pro intenzivní pícninářství na orné půdě, který se rovněž pěstuje jako rychlerostoucí meziplodina.

Macháč (2019) doporučuje výsev jílku jednoletého co nejčasněji na jaře, pokud to půdní podmínky dovolí. V příznivých oblastech (mírné zimy) lze některé odrůdy vysévat i ve třetí dekádě září, podzimní setí může částečně eliminovat nedostatek vláhy v jarních měsících. Jílek jednoletý je možné využít tímto způsobem jako meziplodinu pro setí na podzim.

Trávy jsou významnou součástí obnovitelných zdrojů energie a pro energetické účely je možné využít i produkci travní biomasy meziplodin. Andert a kol. (2009) uvádějí, že zvyšování úrovně a produktivity zemědělské produkce také zvyšuje plochu půdy nevyužitou pro produkci potravin. Tyto plochy lze využít pro pěstování energetických plodin včetně trav. Trávy pro energetické účely rozšiřují spektrum použití trav pro zemědělské a nezemědělské účely o průmyslové využití v oboru jako je fytoenergetika.

## Závěr

Byly ověřeny možnosti zakládání trav jako meziplodin ve třech termínech založení. Trávy a jejich směsi jsou využitelné jako meziplodiny. Směsi jílků zejména s kostřavou rákosovitou a jílků s kostřavou červenou lze doporučit pro výsev meziplodiny založené v pozdním jarním

období a na počátku léta. Kostřava rákosovitá 'Kora' se vyznačuje značnou přizpůsobivostí různým stanovištním podmínkám a patří mezi trávy s nejširší stanovištní amplitudou. To platí zejména o nárocích na vláhu. Kostřava rákosovitá snáší dobře přísušky i vlhčí stanoviště. Jílek vytrvalý je charakteristický rychlým počátečním vývojem a zapojením oproti kostřavě rákosovité. Jílky a jejich směsi lze doporučit jako meziplodiny v pozdním létě a na počátku podzimu. Produkce biomasy meziplodin je využitelná jako obnovitelný zdroj energie pro spalování i výrobu bioplynu. V publikaci je energetická produkce vyjádřena ekvivalentem černého uhlí v tunách udávajícího produkci sušiny v 1 ha, která by nahradila uvedené množství černého uhlí. Produkce meziplodin je vyjádřena pro účely spalování.

Experimentálně byly zařazeny do výzkumu i snížené poloviční výsevnické dávky u směsi zejména jílků vytrvalého s kostřavou rákosovitou a kostřavou červenou (10 kg.ha<sup>-1</sup>). Porosty s uvedeným sníženým množstvím dosahovaly nižšího výnosu zelené, suché hmoty a sušiny oproti dávkám směsi 20 kg.ha<sup>-1</sup>. I když nebylo snížení výrazné, je nutné uvedené výsevnické množství ještě ověřit v dlouhodobých pokusech. Na základě výsledků výzkumu můžeme jednoznačně doporučit výsevnické dávky u směsi jílků vytrvalého s kostřavou rákosovitou a kostřavou červenou 20 kg.ha<sup>-1</sup> (představují 50% podíl u jednotlivých druhů dvousložkových směsí) a jílků vytrvalého 20 kg.ha<sup>-1</sup>.

## Dedikace

Publikace je 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-1818.

## Použitá literatura

- Andert, D., Frydrych, J., Gerndtová, I., Hanzlíková, I. 2009. Utilization of grass for anaerobic fermentation. In Cagaš, B., Macháč, R., Nedělník, J. (eds): Alternative Functions of Grassland. Book of Abstracts. International Occasional Symposium European Grassland Federation Brno, Czech Republic 7-9 September 2009, p. 38. ISBN 978-80-86908-16-8.
- Bybee-Finley, A., K., Ryan, R., M. 2018. Advancing Intercropping Research 8 (6), and Practices in Industrialized Agricultural Landscapes. Agriculture, 2018, 80. <https://doi.org/10.3390/agriculture8060080>
- Cagaš, B. et al. 2010. Trávy pěstované na seno. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Ing. Petr Baštan, 2010. 276 s. ISBN 978-80-87091-11-1.
- Klesnil a kol. 1982. Pícninářství – vysokoškolská skripta. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Kubát, K. (ed.) 2002. Klíč ke květeně České republiky. 928 s. Academia, Praha. ISBN 80-200-0836-5.
- Macháč, R., Frydrych, J. 2019. Pěstování jílků (*Lolium* sp.) na seno. Certifikovaná metodika 1/2019, Zubří. 31 s. ISBN: 978-80-905808-7-9.
- Vrkoč, F. et al. 1996. Restrukturalizace a extenzifikace rostlinné výroby. Metodika ÚZPI, 3/ 1996, s. 25–32. ISBN 80-85120-72-0.
- Wanic, M., Żuk-Golasewaka, K., Orzech, K. 2019. Catchcrops and the soil environment – a review of the literature. Journal of Elementology. 2019, J. Elem., 24 (1): 31–45. DOI: 10.5601/jelem.2018.23.3.1638. ISSN 1644-2296 <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-f380246b-6231-47a0-86ac-90495cfc7af>

## Kontaktní adresa:

Ing. Jan Frydrych  
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.  
Hamerská 698, Zubří 756 54  
[frydrych@oseva.cz](mailto:frydrych@oseva.cz)

## Vliv aplikace síry kombinované s kompostem na výnos řepky a půdní parametry

Effect of sulphur application combined with compost on yield and soil parameters

Hammerschmiedt T.<sup>1</sup>, Holátko J.<sup>1,2</sup>, Kintl A.<sup>3</sup>, Sedláčková I.<sup>4</sup>, Látal, O.<sup>1,2</sup>, Brtnický M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendelova Univerzita v Brně, Česká republika

<sup>2</sup>Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Česká republika

<sup>3</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Česká republika

<sup>4</sup>Agrotest fyto, s.r.o., Česká republika

### Abstrakt

Aplikace kompostu prospívá půdě, ale kompost získaný z rostlinného materiálu může mít nedostatečný obsah živin pro podporu rostlin. Pro výživu řepky olejné je klíčovou živinou síra. Kombinace kompostu s elementární sírou může zlepšit transformaci živin, půdní mikrobiální aktivitu a výnosy řepky (*Brassica napus* subsp. *napus*). Aplikace různých půdních přísad, kompostu (10 t/ha), kompostu a elementární síry (10 t/ha + 150 kg/ha) a síry (150 kg/ha), v polním pokusu změnila půdní vlastnosti: významně zvýšila pH, dehydrogenasovou a ureasovou aktivitu v porovnání s kontrolou bez ošetření. Fosfatasa a N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidasa byly naopak sníženy. Nejvyšší průměrnou výšku rostlin řepky v průběhu vegetačního období (červen) a nejvyšší výnos řepky při sklizni vykazovala varianta ošetřená kombinací kompostu a síry.

**Klíčová slova:** polní pokus, půdní enzymy, oxidace síry, aktivita hub, výška rostlin

### Abstract

Compost application is good for the soil, but compost derived from plant material may not have sufficient nutrient content to support plants. Sulfur is a key nutrient for oilseed rape nutrition. Combining compost with elemental sulphur can improve nutrient transformation, soil microbial activity and yield of oilseed rape (*Brassica napus* subsp. *napus*). The application of different soil amendments, compost (10 t/ha), compost and elemental sulphur (10 t/ha + 150 kg/ha) and sulphur (150 kg/ha), in a field experiment changed soil properties: significantly increased pH, dehydrogenase and urease activity compared to the control without treatment. In contrast, phosphatase and N-acetyl-D-glucosaminidase were reduced. The variant treated with the combination of compost and sulphur showed the highest average height of canola plants during the growing season (June) and the highest yield of oilseed rape at harvest.

**Keywords:** field experiment, soil enzymes, sulphur oxidation, fungal activity, plant height

### Úvod

Široce pozorovaná degradace půdy je v současnosti jedním z hlavních globálních problémů, vedoucích k hrozbám znečištění půdy, degradace životního prostředí a změny klimatu (Lal 2020). Aplikace kompostu vyrobeného z živočišného hnoje nebo rostlinných odpadů může obnovit a zachovat udržitelný obsah půdní organické hmoty v půdě (Liu et al. 2011).

Oproti dlouhodobým aplikacím minerálních hnojiv nemá užití kompostu jako organického hnojiva žádné negativní důsledky pro půdní ekosystém a kvalitu, pro většinu zemědělských aplikací je však málo vhodné (Seufert et al. 2012), z důvodu pomalého uvolňování a limitovaného obsahu živin, suboptimálního pro podporu rostlin (Berry et al. 2002). Pro výživu a zdraví polních kultur řepky olejné je např. klíčovou živinou síra (Sarda et al. 2014).

Síra není jen užitečnou živinou pro mikroorganismy a rostliny (Bouranis et al. 2019), ale zlepšuje fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (Abou Hussien et al. 2020). Bylo také prokázáno, že zvyšuje výnosy plodin (Soltanaeva et al. 2018). Nedostatek síry v zemědělských půdách v Evropě souvisí s výrazným poklesem emisí oxidu siřičitého (SO<sub>2</sub>), které se za posledních 30 let snížily o 70–80 % (Hoesly et al. 2017). Z dostupných výsledků půdních rozborů provedených v ČR vyplývá, že 85 % vzorků má nízký obsah síry (Kulhánek et al. 2018). Vliv elementární síry (S<sup>0</sup>) s pomalým uvolňováním a nízkým rizikem ztrát vlivem vyplavování z půdy na vlastnosti půdy a růst rostlin, není dosud dostatečně prostudován a ponechává tak prostor pro další výzkum. Navíc úprava kompostovaného materiálu S<sup>0</sup> může významně změnit aktivitu půdních enzymů (Malik et al. 2021), s předpokládaným přínosem zlepšené transformace živin prostřednictvím zvýšení mikrobiální aktivity (Hammerschmidt et al. 2021). Proto bylo cílem této práce otestovat účinky různých půdních přísad (kompostu, sypké S<sup>0</sup> a jejich kombinace) na vlastnosti půdy a růst řepky (*Brassica napus* subsp. *napus*) v polním experimentu. Hypoteticky největší přínos pro půdní vlastnosti a výživu řepky byl očekáván při aplikaci kombinovaného přísadku kompostu a sypké S<sup>0</sup>.

## Materiál a metody

V polním pokusu byl sledován vliv hnojení řepky odrůdy TREZZOR (*Brassica napus* subsp. *napus*) sypkou elementární sírou (S<sup>0</sup>) získanou z odsíření bioplynu, kompostem Organic a jejich kombinací. Na konci srpna 2020 byly založeny varianty o ploše 0,25-0,50 ha: Kontrola, Síra (150 kg/ha), Kompost (10 t/ha), Kompost (10 t/ha) + Síra (150 kg/ha). Pokusné pole se nacházelo nedaleko obce Sloveč (Česká republika) v řepařské výrobní oblasti s úrodnou černozemí, v průměrné nadmořské výšce 212 m n. m., průměrná roční teplota je 9,4 °C a průměrný roční úhrn srážek 550-600 mm.

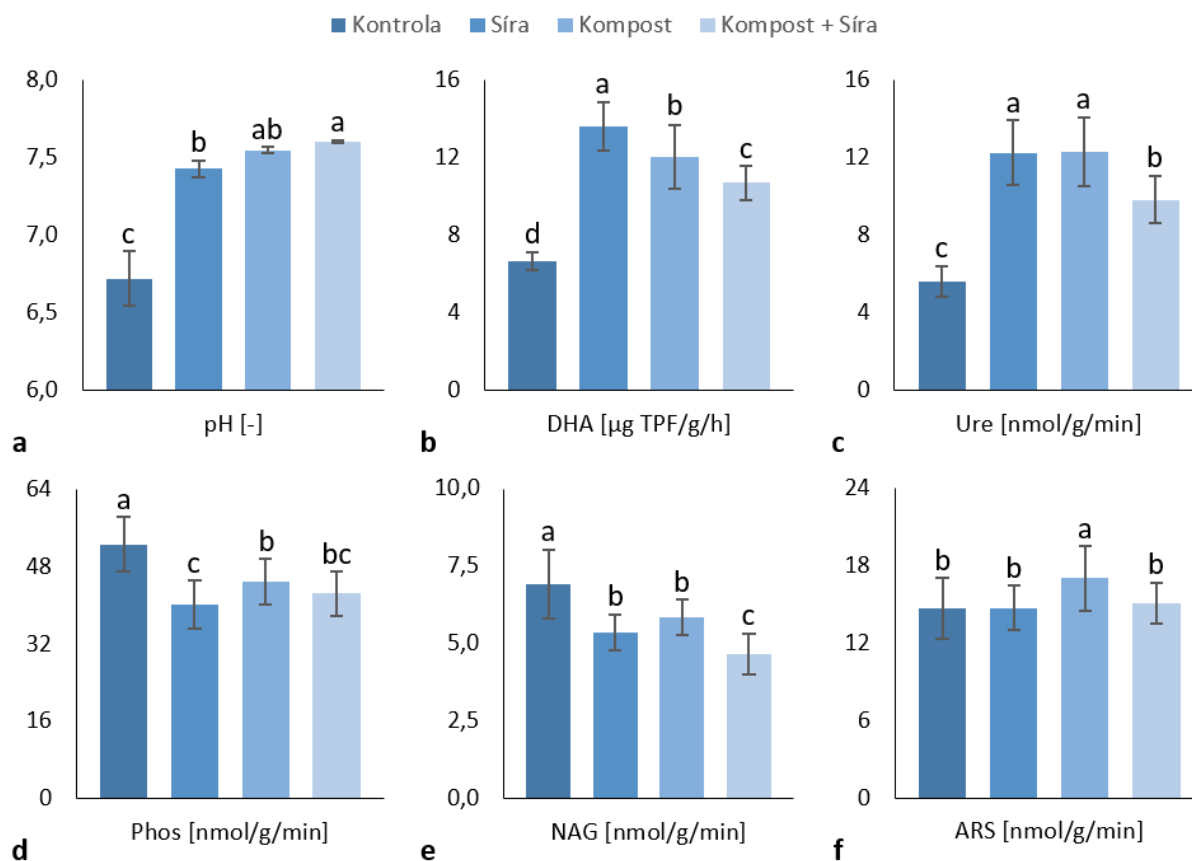
Po sklizni řepky byly z každé varianty odebrány 3 půdní vzorky, u kterých byly dále analyzovány následující parametry: pH (CaCl<sub>2</sub>) podle metodiky (ISO 10390:2005), DHA podle metodiky (Doi and Ranamukhaarachchi, 2009) a ostatní enzymatické aktivity, ureasa (Ure), N-acetyl-β-D-glukosaminidasa (NAG), arylsulfatasa (ARS), fosfatasa (Phos), podle metodiky (ISO 20130:2018). V průběhu hospodářského roku 2020/2021 byla hodnocena tři růstová stadia rostlin řepky ozimé dle Baiera, Smetánkové a Baierové (1988): I. hodnocení [rozvinutí čtyř až šesti pravých listů] listopad 2020; II. hodnocení [plný květ: asi 50 % květů na hlavním stonku otevřených] červen 2021; III. hodnocení [druhá technická zralost, sklizeň] červenec 2021.

Porovnání souborů dat bylo provedeno jednosměrnou analýzou rozptylu (ANOVA) a Tukeyho HSD testem, hodnota  $p \leq 0,05$  byla považována za statisticky významný rozdíl v hodnocených souborech. Všechna data byla analyzována s použitím software R, jazyku pro statistické výpočty a grafiku (R Core TEAM 2020).

## Výsledky

U všech variant s přísadkou bylo pH signifikantně zvýšeno v porovnání s neošetřenou Kontrolou, Obr. 1a. Tento alkalizační účinek byl nejvýraznější u varianty Kompost + Síra, jejíž pH bylo statisticky významně vyšší než u varianty Síra.

Ve shodě s vyšším pH byla výrazně zvýšena i aktivita dehydrogenasy (DHA) u všech ošetřených variant v porovnání s Kontrolou, Obr. 1b. DHA bylo signifikantně nejvyšší v půdě se Sírou, která měla ze všech tří variant s přísadkou nejnižší pH. Přísadka Kompost + Síra stimuloval DHA méně než samostatný Kompost nebo Síra. Také ureasa (Ure) ukazuje zvýšení v souvislosti s půdními přísadkami v porovnání s Kontrolou. Kompost nebo Síra (jinými mechanismy účinku) vedly shodně k nejvyšší Ure v ošetřené půdě, signifikantně vyšší než u varianty Kompost + Síra, Obr. 1c.

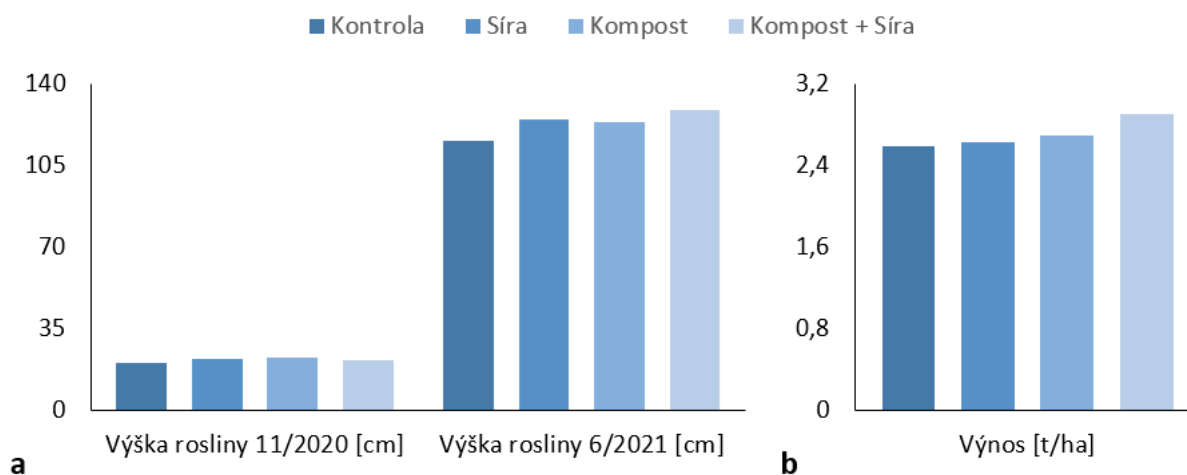


**Obr. 1** pH (a), DHA (b), ureasa (c), fosfatasa (d), N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidasa (e) a arylsulfatasa (f) v půdě hnojené sypkou elementární sírou a kompostem  
Průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, písmena vyjadřují statistické rozdíly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Hodnoty aktivity fosfatasy (Phos) na rozdíl od DHA a Ure byly ve variantách s přidavky nižší než v Kontrolě, Obr. 1d. Oproti samotnému Kompostu byla ve variantě Síra Phos signifikantně snížena a její hodnota byla nejnižší ze všech variant. Mezi ošetřenými variantami měla tato shodně nejnižší, neutrální hodnotě blízké, pH i aktivitu Phos.

Stejně jako u Phos, byla N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidasa (NAG) snížena u všech ošetřených variant v porovnání s Kontrolou, Obr. 1e. Kompostem ošetřená varianta měla NAG srovnatelnou s variantou Síra a oproti nim byla signifikantně nejnižší NAG u varianty Kompost + Síra.

Arylsulfatasa (ARS), ukazatel mineralizace organosulfátů, měla hodnoty srovnatelně vysoké jak v Kontrolě, tak ve variantách s přidavkem síry, tj. Kompost + Síra a Síra, Obr. 1f. Jediná varianta se signifikantně vyšší ARS byla Kompost. Zdá se, že ARS nebyla zvýšena i přes přísun zdroje síry, a to z důvodu zvýšeného okamžitého příjmu podstatné části oxidované síry rostlinami v příslušných sírou obohacených variantách, jak dokládají výsledky měření růstu rostlin řepky a výpočet výnosu na konci vegetační sezóny, Obr. 2a,b. Z výsledků je patrné, že přísun síry vedl v průběhu vegetační sezóny (červen) k nejvyššímu vzrůstu rostlin u variant Kompost + Síra a Síra a na konci sezóny byl nejvyšší výnos dosažen ve variantě Kompost + Síra, Obr. 2b.



**Obr. 2** Výška rostlin (a) a výnos sklizené biomasy (b) řepky pěstované v půdě hnojené sypkou elementární sírou a kompostem

Průměr ± směrodatná odchylka, písmena vyjadřují statistické rozdíly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## Diskuze

Elementární síra ( $S^0$ ) má obecně acidifikační účinek v kompostovaném materiálu (Mahimairaja et al. 1994) i v půdě (Gupta et al. 1988). Předpokladem bylo, že oxidace  $S^0$  na kyselinu sírovou a sírany povede k poklesu pH. Namísto toho bylo pH v obou variantách obohacených  $S^0$  zvýšeno. Možným vysvětlením může být vysoká pufrční schopnost půdy podmíněná obsahem minerálů (vápník, hořčík), což může zabránit poklesu pH (Germida and Janzen 1993). Ve variantě Kompost + Síra mohl kompost zvýšit celkové pH i více pufrovat (Costello and Sullivan 2013) acidifikační účinek oxidované  $S^0$ . Také zvýšený okamžitý příjem oxidované síry řepkou, který byl již popsán (Vong et al. 2002), mohl působit proti půdní acidifikaci.

Dehydrogenasová aktivita (DHA) je indikátorem dekompoziční aktivity půdního mikrobiomu (Elbl et al. 2019). Výsledná vysoká DHA ve variantě Síra je ve shodě se zjištěným stimulačním účinkem  $S^0$  na aktivitu půdního mikrobiomu (Tabak et al. 2020). Naopak kombinace Kompost + Síra měla méně pozitivní efekt na aktivitu DHA než Kompost samotný. Mohlo k tomu dojít potlačením prospěšného efektu zvýšené oxidace  $S^0$ : studie (Malik et al. 2021) uvádí, že v alkalické půdě byla při koaplikaci  $S^0$  a organického přídatku aktivita DHA bez pozitivní změny. Na aktivitě DHA se podílí jak půdní bakterie, tak houby, jejichž biomasa s DHA významně koreluje (Luo et al. 2015). Nízká aktivita N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidasy (NAG) ve variantě Kompost + Síra mohla indikovat sníženou dekompozici fungální nekromasy kvůli celkově nižší abundanci hub v půdě s kompostem a  $S^0$ . Méně hub v půdě podmínilo jak signifikantně nejnižší hodnoty NAG, tak DHA. Společný trend změn v hodnotách obsahu půdních hub, aktivitě NAG a DHA byl již popsán (Rajper et al. 2016).

Aktivita NAG, enzymu zapojeného do degradační dráhy chitinu (klíčového polysacharidu buněčné stěny hub), byla snížena ve všech přídatky ošetřených variantách, které jevíly zásadité pH (cca 7,6) oproti kyselé reakci Kontroly (cca 6,7). Protože kyselé pH prospívá růstu hub více a alkalita méně (Zifcakova 2020), vysvětlujeme tímto vlivem pH pozorované rozdíly v hodnotách NAG.

Enzymem indikujícím mineralizaci dusíku je ureasa (Ure), která katalyzuje deaminaci močoviny. Výrazně zvýšená aktivita Ure ve všech ošetřených variantách souvisela s vyšším přísunem dusíkatých živin z kompostu (varianty Kompost a Kompost + Síra) (Cordovil et al. 2017) a se stimulací aktivity Ure vlivem přídatku  $S^0$  (Godlewska 2018a). Kombinace obou přídatků (Kompost + Síra) ale vedla k nejnižší hodnotě Ure. Zde mohla negativně přispět i

snížená biomasa hub, neboť houby se také významně podílí na cyklu mineralizace dusíku (De Vries 2009).

Fosfatasa (Phos), hlavní enzym zúčastněný v solubilizaci půdního fosforu, byla překvapivě signifikantně nejvyšší ve variantě Kontrola, statisticky významně nižší hodnoty vykazovaly všechny ošetřené varianty s pH blízkým hodnotě 7,5. Podle studie (Penn and Camberato 2019) významně ovlivňuje solubilizaci fosforu v půdě obsah dostupného, rozpustného vápníku a ten významně roste s pH klesajícím pod hodnotu 7,5. Signifikantně nejnižší hodnotu Phos ve variantě Síra, s očekávanou vyšší oxidací síry na sírany, mohl způsobit popsáný efekt vyššího obsahu  $\text{SO}_4^{2-}$  na precipitaci vápníku a fosforu v půdě (Cao et al. 2007).

Arylsulfatasa (ARS) hraje klíčovou roli v metabolismu síry v rhizosféře a v mineralizaci síry do půdy pro její využití v rostlinách. Je široce produkována mnoha půdními bakteriemi a je tedy semi-kvantitativním indikátorem půdní bakteriální biomasy. Nejvyšší aktivita ARS byla zjištěna ve variantě Kompost pravděpodobně proto, že v ostatních dvou obohacených variantách byla síranová forma živiny výsledkem oxidace  $\text{S}^0$ , nikoliv výsledkem mineralizace organosulfátů. Ve studii (Ye et al. 2011) bylo uvedeno, že aplikace  $\text{S}^0$  nestimulovala mineralizační aktivity v půdě.

Nejvyšší průměrná výška rostlin řepky v průběhu vegetačního období (červen) a nejvyšší výnos biomasy při sklizni, byly zjištěny u varianty Kompost + Síra, s nejnižšími aktivitami enzymů DHA, Ure, NAG. Předpokladem pro nejlepší růst řepky v této variantě byl zvýšený přísun živin vlivem kombinovaného půdního přídatku, který podmínil intenzivní příjem nutrientů rostlinami. V kompetici o živiny mezi řepkou a půdní mikroflórou, která byly prokázána u některých zdrojů živin (Ma et al. 2021), mohlo dojít k potlačení půdní mikrobiální aktivity na konci vegetačního období.

## Závěr

Hodnocením účinku různých půdních přídatků, kompostu (10 t/ha), kompostu a elementární síry (10 t/ha + 150 kg/ha) a samotné síry (150 kg/ha), na vlastnosti půdy a růst řepky (*Brassica napus* subsp. *napus*) v polním experimentu bylo zjištěno, že tyto přídatky signifikantně zvyšují pH v porovnání s kontrolou do alkalických hodnot. Všechny přídatky stimulovaly aktivitu půdní dehydrogenasy a ureasy, jen kompost nebo síra výrazněji než kombinovaný přídatek. Aktivity fosfatasy a N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidasy byly oproti kontrole potlačeny aplikací přídatků do půdy, pravděpodobně negativním vlivem vyššího pH na solubilizaci fosforu a na růst půdních hub. Arylsulfatasou katalyzovaná mineralizace organosulfátů nebyla aplikací elementární síry stimulována, její aktivita byla zvýšená pouze samotným kompostem. Nejvyšší průměrnou výšku rostlin řepky v průběhu vegetačního období (červen) a nejvyšší výnos řepky při sklizni vykazovala varianta ošetřená kombinací kompostu a syké síry, čímž se potvrdil předpoklad nejvíce prospěšného účinku tohoto přídatku na výživu řepky.

## Poděkování

Tato práce byla podpořena projekty Technologické agentury České republiky č. TH04030142 „Využití odpadu produkovaného při výrobě bioplynu ke zlepšení půdních vlastností a zvýšení obsahu síry v rostlinách“ a č. TH02030169 „Vliv aplikace biologicky transformované organické hmoty a biouhlu na stabilitu produkčních vlastností půd a snížení environmentálních rizik“ a také za podpory Ministerstva zemědělství- institucionální podpora MZE-RO1722 a MZE-RO1218.

## Literatura

- Abou Hussien E., Nada W., Elgezery M. (2020): „Influence of sulphur compost application on some chemical properties of calcareous soil and consequent responses of *Hordeum vulgare* L. plants.“ Egyptian Journal of Soil Science, 60(1): 67-82.
- Berry, P., Sylvester-Bradley, R., Philipps, L., Hatch, D., Cuttle, S., Rayns, F., et al. (2002). "Is the productivity of organic farms restricted by the supply of available nitrogen?" Soil Use Manage. 18: 248–255. doi: 10.1079/SUM2002129
- Bouranis D.L., Venieraki A., Chorianopoulou S.N., Katinakis P. (2019): „Impact of elemental sulfur on the rhizospheric bacteria of durum wheat crop cultivated on a calcareous soil.“ Plants, 8(10): 379.
- Cao, X., Harris, W. G., Josan, M. S. and Nair, V. D. (2007). "Inhibition of calcium phosphate precipitation under environmentally-relevant conditions." Science of The Total Environment 383(1): 205-215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.05.012>.
- Cordovil, C. M. D., de Varennes, A., Pinto, R. M. D., Alves, T. F., Mendes, P. and Sampaio, S. C. (2017). "Decomposition rate and enzymatic activity of composted municipal waste and poultry manure in the soil in a biofuel crops field." Journal of the Science of Food and Agriculture 97(7): 2245-2255.10.1002/jsfa.8035
- Costello, R. C. and Sullivan, D. M. (2013). "Determining the ph buffering capacity of compost via titration with dilute sulfuric acid." Waste and Biomass Valorization 5(3): 505-513.10.1007/s12649-013-9279-y
- De Vries, F. T. (2009). Soil fungi and nitrogen cycling. Causes and consequences of changing fungal biomass in grasslands. Wageningen, Wageningen Universiteit. Ph.D.
- Doi R., Ranamukhaarachchi S.L. (2009): „Soil dehydrogenase in a land degradation-rehabilitation gradient: observations from a savanna site with a wet/dry seasonal cycle.“ Revista de Biología Tropical, 57: 223-234.
- Elbl, J., Maková, J., Javreková, S., Medo, J., Kintl, A., Lošák, T. and Lukas, V. (2019). "Response of microbial activities in soil to various organic and mineral amendments as an indicator of soil quality." Agronomy 9(9).10.3390/agronomy9090485
- Germida, J. J. and Janzen, H. H. (1993). "Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils." Fertilizer Research 35(1-2): 101-114.10.1007/bf00750224
- Godlewska, A. (2018a). "Assessment of the effect of NPK fertilisation and elemental sulphur on soil enzyme activity." Fresenius Environmental Bulletin 27(1): 180-186
- Godlewska A. (2018b). „Sulphur content in test plants and arylsulfatase activity in soil after application of waste materials.“ Appl. Ecol. Environ. Res., 16(1): 145-152.
- Gupta, V. V. S. R., Lawrence, J. R. and Germida, J. J. (1988). "Impact of elemental sulfur fertilization on agricultural soils. I. Effects on microbial biomass and enzyme activities." Canadian Journal of Soil Science 68(3): 463-473.10.4141/cjss88-045
- Hammerschmidt T., Holatko J., Sudoma M., Kintl A., Vopravil J., Ryant P., Skarpa P., Radziemska M., Latal O., Brtnicky M. (2021). "Biochar and sulphur enriched digestate: Utilization of agriculture associated waste products for improved soil carbon and nitrogen content, microbial activity, and plant growth." Agronomy 11(10): 2041.
- Hoesly R.M., Smith S.J., Feng L., Klimont Z., Janssens-Maenhout G., Pitkanen T., Seibert J.J., Vu L., Andres R.J., Bolt R.M., Bond T.C. (2018): "Historical (1750–2014) anthropogenic emissions of reactive gases and aerosols from the Community Emissions Data System (CEDS)." Geoscientific Model Development, 11(1): 369-408.
- ISO 10390:2005. Soil quality - determination of pH. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2005.
- ISO 20130:2018. Soil quality — Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2018.



- Kulhánek M., Balík J., Sedlář O., Zbíral J., Smatanová M., Suran P. (2018): "Determination of available sulphur in soil by the method Mehlich 3. Certified methodology." (in Czech). Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Brno, Czech Republic; Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic.
- Lal R. (2020): „Managing soils for resolving the conflict between agriculture and nature: The hard talk.“ *Eur. J. Soil Sci.*, 71: 1-9.
- Liu X., Herbert S.J., Hashemi A.M., Zhang X., Ding, G. (2011): „Effects of agricultural management on soil organic matter and carbon transformation - a review.“ *Plant, Soil and Environment*, 52: 531-543.
- Luo, P., Han, X., Wang, Y., Han, M., Shi, H., Liu, N. and Bai, H. (2015). "Influence of long-term fertilization on soil microbial biomass, dehydrogenase activity, and bacterial and fungal community structure in a brown soil of northeast china." *Annals of Microbiology* 65(1): 533-542. doi: 10.1007/s13213-014-0889-9.
- Ma, Q. X., Hill, P. W., Chadwick, D. R., Wu, L. H. and Jones, D. L. (2021). "Competition for s-containing amino acids between rhizosphere microorganisms and plant roots: The role of cysteine in plant s acquisition." *Biology and Fertility of Soils* 57(6): 825-836. doi: 10.1007/s00374-021-01572-2.
- Mahimairaja, S., Bolan, N. S., Hedley, M. J. and Macgregor, A. N. (1994). "Losses and transformation of nitrogen during composting of poultry manure with different amendments: An incubation experiment." *Bioresource Technology* 47(3): 265-273.10.1016/0960-8524(94)90190-2
- Malik, K. M., Khan, K. S., Billah, M., Akhtar, M. S., Rukh, S., Alam, S., Munir, A., Mahmood Aulakh, A., Rahim, M., Qaisrani, M. M. and Khan, N. (2021). "Organic amendments and elemental sulfur stimulate microbial biomass and sulfur oxidation in alkaline subtropical soils." *Agronomy* 11(12): 2514.10.3390/agronomy11122514
- Penn, C. and Camberato, J. (2019). "A critical review on soil chemical processes that control how soil ph affects phosphorus availability to plants." *Agriculture* 9(6): 120. doi: 10.3390/agriculture9060120.
- Rajper, A. M., Udawatta, R. P., Kremer, R. J., Lin, C. H. and Jose, S. (2016). "Effects of probiotics on soil microbial activity, biomass and enzymatic activity under cover crops in field and greenhouse studies." *Agroforestry Systems* 90(5): 811-827. doi: 10.1007/s10457-016-9895-1.
- R Core TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- Sarda, X., Diquelou, S., Abdallah, M., Nesi, N., Cantat, O., Le Gouee, P., Avice, J. C. and Ourry, A. (2014). "Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis." *Journal of Agricultural Science* 152(4): 616-633. doi: 10.1017/s0021859613000105.
- Seufert, V., Ramankutty, N., and Foley, J.A.(2012). "Comparing the yields of organic and conventional agriculture." *Nature* 485: 229–232. doi: 10.1038/nature11069
- Soltanaeva A., Suleimenov B., Saparov G., Vassilina T. (2018): "Effect of sulfur-containing fertilizers on the chemical properties of soil and winter wheat yield." *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(4): 586-91.
- Tabak, M., Lisowska, A. and Filipek-Mazur, B. (2020). "Bioavailability of sulfur from waste obtained during biogas desulfurization and the effect of sulfur on soil acidity and biological activity." *Processes* 8(7): 863.10.3390/pr8070863

- Vong, P.-C., Lasserre-Joulin, F. and Guckert, A. (2002). "Mobilization of labelled organic sulfur in rhizosphere of rape and barley and in non-rhizosphere soil." *Journal of Plant Nutrition* 25(10): 2191-2204. doi: 10.1081/PLN-120014070.
- Ye, R., McCray, J. M. and Wright, A. L. (2011). "Microbial response of a calcareous histosol to sulfur amendment." *Soil Science* 176(9): 479-486.10.1097/SS.0b013e31822769e7
- Zifcakova, L. (2020). *Factors affecting soil microbial processes. Carbon and nitrogen cycling in soil*, Springer: 439-461.

**Kontakt:**

Ing. Martin Brtnický  
Mendelova univerzita v Brně  
Zemědělská 1  
613 00 Brno  
Česká republika  
e-mail: martin.brtnicky@mendelu.cz

## Vliv aplikace digestátu do porostu vojtěšky na její výnos a půdní parametry

Effect of digestate application to alfalfa stands on biomass yield and soil parameters

Holátko J.<sup>1,2</sup>, Látal O.<sup>1,2</sup>, Hammerschmidt T.<sup>1</sup>, Kintl A.<sup>3</sup>, Sedláčková I.<sup>4</sup>, Brtnický M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendelova Univerzita v Brně, Česká republika

<sup>2</sup>Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Česká republika

<sup>3</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Česká republika

<sup>4</sup>Agrotest fyto, s.r.o., Česká republika

### Abstrakt

Digestát je odpadní produkt, využitelný v zemědělství jako hnojivo. Snížení ztrát v něm obsaženého dusíku lze dosáhnout nahrazením jednorázové fertilizace 2-3 časově rozloženými dávkami během sezóny. Přísun dusíku ke kultuře vojtěšky (*Medicago sativa* L.) organickým hnojením může mít pozitivní vliv na kvalitu výnosu i vlastnosti půdy. Proto byl otestován vliv hnojení vojtěšky digestátem po I. a II. seči v jedné nebo dvou dávkách různé výše na výnosy biomasy i na půdní vlastnosti. Pozitivní vliv dělené dávky digestátu na výnos vojtěšky byl prokázán pouze na výsledcích ze IV. seče. Nejvyššího výnosu bylo dosaženo jednorázovým hnojením vysokou dávkou digestátu po II. seči (0+50). Jako nejprospěšnější pro sledované funkční skupiny půdní mikroflóry se jeví varianty 0+25 i 0+50, které měly nejvyšší roční výnos.

**Klíčová slova:** odpadní biomasa, tekutá hnojiva, utilizace dusíku, půdní respirace, mineralizace

### Abstract

Digestate is a waste product that can be used in agriculture as a fertiliser. Reduction of nitrogen losses can be achieved by replacing single fertilisation with 2-3 doses spread over the season. The addition of nitrogen to alfalfa (*Medicago sativa* L.) by organic fertilisation can have a positive effect on yield quality and soil properties. Therefore, the effect of fertilising alfalfa with digestate after the first and second cutting in one or two doses of different doses on biomass yield and soil properties was tested. The positive effect of the split dose of digestate on the alfalfa yield was only demonstrated on the results from the IV. cutting. The highest yield was achieved by a single application of a high rate of digestate after the II. cutting (0+50). Both the 0+25 and 0+50 variants appeared to be the most beneficial for the studied functional groups of soil microflora, with the highest annual yield.

**Keywords:** waste biomass, liquid fertilizers, nitrogen utilization, soil respiration, mineralization

### Úvod

Digestát je odpadním produktem výroby bioplynu, který je využitelný v zemědělství jako hnojivo pro obsah minerálních látek, především N, P, K (Koszel et Lorencowicz, 2015). Digestát má potenciál nahradit minerální hnojiva jako jediný zdroj dusíku pro ornou půdu i pastviny. Jeho použití může mít pozitivní vliv na kvalitu rostlin, na jejich růst i obsah nutričních látek a živin (Pawlett et al. 2018; Lee et al. 2021).

Při aplikaci digestátu může docházet ke ztrátám dusíku (volatilizací, vlivem denitrifikace) i k tvorbě skleníkových plynů (CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) (Dieterich et al. 2012; Eickenscheidt et al. 2014; Fangueiro et al. 2017), kterým lze předcházet volbou vhodných způsobů aplikace (Johansen et

al. 2013; Fangueiro et al. 2017; Seidel et al. 2017). Tyto postupy zahrnují načasování aplikace hnojiva v optimální fázi vegetační sezóny (Delin and Stenberg 2021) a rozdělení větších jednorázových dávek do dvou nebo více časově rozložených dávek během sezóny (Du et al. 2019; de Aquino et al. 2021; Ma et al. 2021; Ma et al. 2022). Někteří autoři uvádějí příznivý vliv opakované aplikace kejdy na výnos semen a příjem dusíku (Sieling et al. 1998) nebo snížení ztráty dusíku vyplavením dusičnanů (Park et al. 2017). Nicméně jen málo studií, např. (Zhang et al. 2022) uvádí vliv rozdělené aplikace dusíkatých hnojiv na biologické vlastnosti půdy (např. hojnost funkčních genů zapojených do metabolismu dusíku).

Vojtěška (*Medicago sativa* L.) je ekonomicky významnou pícevníkem v oblastech mírného pásma, známá symbiózou s atmosférickými rhizobii vázajícími dusík (Pini et al. 2012). I přes schopnost kultury vojtěšky asimilací obohacovat půdu dusíkem bez přídavku této živiny hnojením, přísun dusíku organickým hnojením může mít pozitivní vliv na kvalitu výnosu, tvorbu kořenové hmoty vojtěšky a kvalitu a množství půdní organické hmoty (Vasileva and Kostov 2015). Cílem této práce bylo ověřit možnosti prospěšného užití tekutých organických hnojiv (digestátu) na vlastnosti půdy, růst a výnos polní kultury vojtěšky.

### **Materiál a metody**

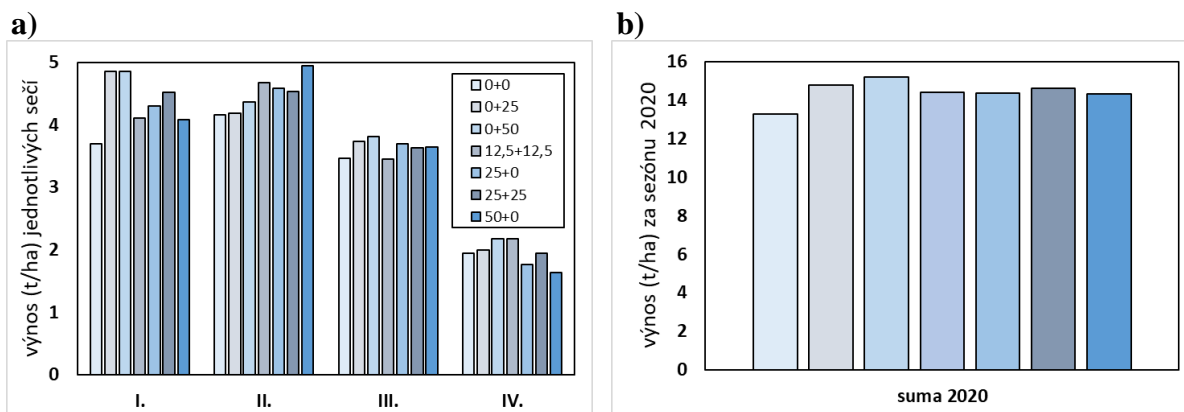
Polní pokus byl založen na jaře 2019 nedaleko obce Senice na Hané (Česká republika). Bylo založeno 7 poloprovozních variant o velikost cca 0,6 ha s definovanou aplikací digestátu v dávkách (t/ha) 0+0, 0+25, 0+50, 12,5+12,5, 25+0, 25+25, 50+0. Aplikace digestátu s využitím samohodného stroje VREDO (typ VT4556) vybaveného vegetačním aplikátorem firmy P&L byla provedena v obou letech po I. seči a II. seči. Vojtěška byla obhospodařována dle agrotechnických postupů v místě obvyklých. Ve druhém užitkovém roce 2020 byly uskutečněny čtyři seče: v květnu, červenci, srpnu a říjnu.

Po poslední seči v roce 2020 byly z každé varianty odebrány půdní vzorky, u kterých byly dále analyzovány následující parametry: půdní substrátem (N-acetyl- $\beta$ -D-glukosamin, L-arginin, D-glukosa, D-trehalosa) indukovaná respirace pomocí metody MicroResp® (Technical Manual v2.1, The James Hutton Institute a (Campbell et al. 2003).

Porovnání souborů dat bylo provedeno jednosměrnou analýzou rozptylu (ANOVA) a Tukeyho HSD testem, hodnota  $p \leq 0,05$  byla považována za statisticky významný rozdíl v hodnocených soborech. Všechna data byla analyzována s použitím software R, jazyku pro statistické výpočty a grafiku (R\_CORE\_TEAM 2020).

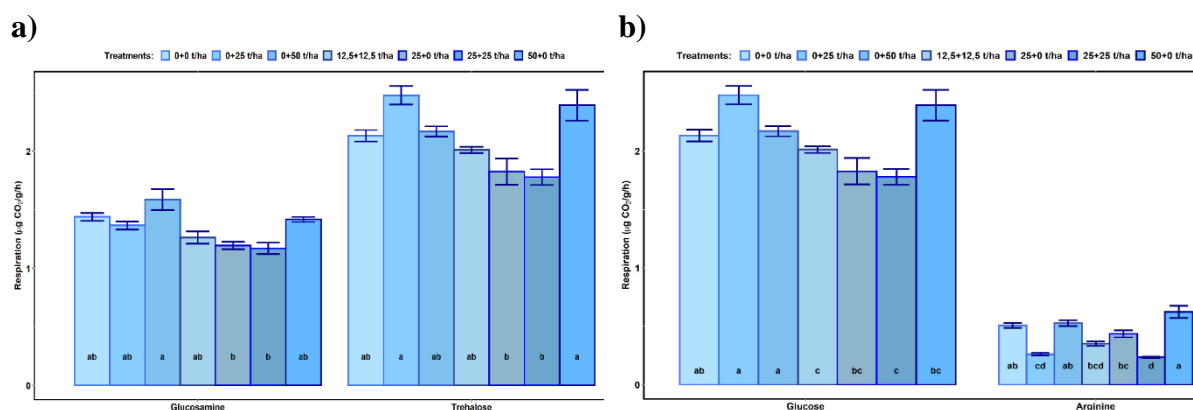
### **Výsledky**

Výnosy z jednotlivých sečí byly vyjádřeny jako hodnoty suché rostlinné biomasy, Obr. 1a. Nejvyšších hodnot dosahovaly výnosy u variant 0+25 (po seči I. a III.), 0+50 (po seči I. III. a IV.) a 12,5+12,5 (druhé nejvyšší hodnoty po seči II. a IV.). Hodnoty souhrnných výnosů za rok 2020 byly opět nejvyšší u variant 0+25 a 0+50, dále u varianty 25+25, Obr. 1b. Vyjma variant 25+0 a 50+0 po seči IV., všechny způsoby hnojení půdy zvyšovaly v porovnání s kontrolou bez hnojení výnosy vojtěšky z prvních 3 sečí a všechny varianty zvýšily souhrnný roční výnos oproti neošetřené kontrole 0+0.



**Obr. 1** Výnosy suché biomasy vojtěšky z jednotlivých sečí I. až IV. roku 2020 (a) a celkem ze všech 4 sečí za rok 2020 (b) u polní kultury vojtěšky hnojené digestátem.

Předpokladem pro zvýšené výnosy vojtěšky bylo ovlivnění vlastností půdy testovanými dávkami a časováním hnojení. Při hodnocení těchto změn v půdě jsme se zaměřili na posouzení rozdílů v mikrobiální aktivitě, určující intenzitu transformace živin v půdě, zejména mineralizaci dusíku. Byla stanovena intenzita půdní respirace specifická pro funkční frakce půdní mikrobioty se substrátovou preferencí pro tyto zdroje dusíku a uhlíku: N-acetyl- $\beta$ -D-glukosamin (NAG-SIR), L-arginin (Arg-SIR), D-glukosa (Glc-SIR), D-trehalosa (Tre-SIR). Respirace indukovaná sacharidovými substráty (Tre-SIR a NAG-SIR) byla u jednotlivých pokusných variant odlišná pouze nesignifikantně, avšak byly patrné trendy k nejvyšším hodnotám u variant 50+0, 0+50 a 0+25. Ostatní varianty jeví v porovnání s kontrolní nehnojenou půdou statisticky neprůkazný, ale patrný pokles (Obr. 2a).



**Obr. 2** Půdní respirace indukovaná N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminem, D-trehalosou (a) a D-glukosou, L-argininem (b) v půdě polní kultury vojtěšky hnojené digestátem. Sloupce = průměrné hodnoty, chybové úsečky = střední chyba průměru, písmena vyjadřují statistické rozdíly na hladině významnosti  $p \leq 0,05$ .

Signifikantní pokles Glc-SIR byl zjištěn u variant 12,5+12,5 a 25+25 v porovnání s kontrolou, ostatní hnojené varianty měly hodnoty srovnatelné navzájem a s kontrolou (Obr. 2b). Arg-SIR byla statisticky významně snížena ve variantách 0+25 a 25+25 ve srovnání s nehnojenou kontrolou (Obr. 2b) Glc-SIR a Arg-SIR jeví trend k vyšší respiraci ve variantě 50+0 v porovnání s kontrolou, ale rozdíl by nesignifikantní.

## Diskuze

Digestát lze použít jako hnojivo s významným obsahem živin, zejména rychle dostupných, mineralizovatelných forem dusíku (amoniakální, v menší míře i nitrátový) pro rostliny i půdní mikroorganismy (Makádi et al. 2012). Prokázaný prospěšný efekt hnojení rostlin určených k rychlé výrobě zelené biomasy (Pawlett et al. 2018; Lee et al. 2021) závisí vedle aplikovaných dávek také na rozdělení celkového použitého množství hnojiva do dvou či více aplikačních dávek a časování jejich přidání do půdy v průběhu vegetační sezóny. Přídavek kejdy ve více dávkách zlepšil výživu a výnos (Prior et al. 2013; Aita et al. 2015) mj. snížením ztrát dusíku vyplavováním (Park et al. 2017) nebo emisemi N<sub>2</sub>O (Aita et al. 2015). Rozdělení fertilizační dávky digestátu, která snížila příjem dusíku, na polovinu (s časným a pozdním přídavkem v intervalu 35 dnů) vedlo k opačnému, pozitivnímu efektu zvýšeného příjmu dusíku z důvodu prodloužení fáze rychlého vstřebávání dusíku z půdy (Du et al. 2019).

I v tomto experimentu vedla aplikace různých dávek digestátu v různých fázích obhospodařování polní kultury vojtěšky k výrazným rozdílům. Ty byly v druhém užitkovém roce už před aplikací 1. dávky digestátu po seči I., Obr. 1a. Tyto rozdíly lze přičíst dlouhodobému doznívání vlivů specifických podmínek agromanagementu v předchozí sezóně. Seče I. a II. byly obecně neproduktivnější s vyššími výnosy v porovnání s III. a IV. sečí, což bylo ve shodě např. se studií (Gollner et al. 2016). Hodnoty výnosů ze seče II. už odpovídaly efektu první fertilizační dávky digestátu, proto byly nejvyšší u varianty 50+0, dále byly vyšší u variant 25+0 a 25+25 v porovnání s variantami 0+25 a 0+50, Obr. 1a. Naopak výnosy ze seče III. (po aplikaci 2. dávky digestátu) byly vyšší u variant 0+25 a 0+50 v porovnání s variantami 25+0 a 50+0, ale i 12,5+12,5 a 25+25. Z výsledků výnosu ze IV. seče, které ukázaly, že podobné nejvyšší hodnoty u variant 0+50 a 12,5+12,5 dokazují srovnatelný efekt poloviční dávky digestátu aplikované ve dvou termínech s jednorázovým hnojením na využití živin z půdy pro tvorbu rostlinné biomasy.

Hodnoty souhrnných výnosů za rok 2020, které byly nejvyšší u variant 0+25, 0+50, 25+25 (Obr. 1b), nicméně dokazují, že pro celkový efekt hnojení vojtěšky digestátem na výnosy biomasy bylo více než rozdělení dávek důležité časování. V pozdější fázi vegetačního období bylo předpokládáno, že došlo k rozvoji diazotrofní rhizosféry mikroflóry (Zhao et al. 2017), která podminila vyšší intenzitu mineralizace dusíku. Mezi II. a III. sečí mohl tedy být zvýšen nitrifikační potenciál půdy pro přeměnu dusíku do rostlinami využitelné formy a přídavek digestátu v tomto období vedl k efektivnějšímu příjmu dusíku. Synergický efekt aplikace digestátu a vojtěšky (její rhizosféry mikroflóry) na mineralizaci dusíku v půdě se blížil již referovaným výsledkům (Munn et al. 1997).

Prospěšný vliv pokusných podmínek na výnosy a příjem živin (zejména dusíku) z půdy byl podmíněn stavem mikrobiomu a biologických vlastností půdy. Ty byly hodnoceny substrátem indukovanou respirací, zaměřili jsme se na respiraci mikroorganismů, jejichž aktivita souvisí s degradací zdrojů dusíku - N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminem (NAG) a L-argininem (Arg) – ale i sacharidových zdrojů uhlíku - D-glukosou (Glc) a D-trehalosou (Tre).

Z výsledků indukovaných respirací Glc-SIR a Arg-SIR lze předpokládat, že aplikace digestátu ve dvou dávkách (25+25, také 12,5+12,5) negativně ovlivňuje respirační aktivitu příslušných funkčních subpopulací půdního mikrobiomu, jejichž katabolická aktivita souvisí mineralizací dusíku (Obr. 2b). Varianta 25+25 měla až čtvrtý nejvyšší výnos při IV. seči a třetí celkový výnos za vegetační sezónu 2020. Naopak jako nejprospěšnější pro dané funkční skupiny mikroflóry se na základě výsledků jeví varianty 0+25 i 0+50, které měly nejvyšší výnosy při III. seči vojtěšky i celkově. Také varianta 50+0, s druhou nejvyšší Tre-SIR, Glc-SIR a nejvyšší Arg-SIR, měla nejvyšší výnos při II. seči (Obr. 2a,b). Z těchto výsledků odvozujeme pozitivní vztah mezi zvýšenou respirací a nitrifikací, podmíněnou synergickým účinkem digestátu a

s vojtěškou asociovaných rhizobií (Stancheva et al. 2008; Ashrafi et al. 2014), s vyšší dostupností dusíku a jeho příjmem rostlinami. Tato zvýšená utilizace dusíku vedla k vyšším výnosům suché biomasy vojtěšky.

### **Závěr**

Hodnocení vlivu dávky digestátu a její rozdělení během vegetační sezony na výnosy vojtěšky a biologické vlastnosti půdy v polní kultuře ukázaly, že je výnos z jednotlivých sečí bezprostředně ovlivněn předcházejícím hnojením. Což potvrzuje účinek digestátu jako hnojiva s vysokou, ale krátkodobou využitelností zdrojů dusíku a dalších živin. Nicméně, při hodnocení IV. seče bylo patrné, že vliv dělené dávky digestátu (12,5+12,5) byl srovnatelně vysoký s jednorázovou pozdně aplikovanou dvounásobnou dávkou (0+50). Pozitivní efekt dělení fertilizační dávky byl tedy alespoň částečně prokázán. Varianty s nejvyšším celkovým výnosem vykazovaly nejvyšší substrátově specifické respirace půdní mikroflóry, spojené s mineralizačními aktivitami dusíku a uhlíku. Nejvyššího výnosu bylo dosaženo jednorázovým hnojením vysokou dávkou digestátu po II. seči (0+50).

### **Poděkování**

Tato práce byla podpořena projekty Technologické agentury České republiky č. TH04030132 „Systémy aplikace tekutých organických hnojiv jako prostředek ke zlepšení půdního prostředí, zvýšení využitelnosti živin rostlinami a jako prostředek k minimalizaci dopadů na životní prostředí“ a č. TH02030169 „Vliv aplikace biologicky transformované organické hmoty a biouhlu na stabilitu produkčních vlastností půd a snížení environmentálních rizik“ a také za podpory Ministerstva zemědělství- institucionální podpora MZE-RO1722 a MZE-RO1218.

## Literatura

- Aita, C., Schirrmann, J., Pujol, S. B., Giacomini, S. J., Rochette, P., Angers, D. A., Chantigny, M. H., Gonzatto, R., Giacomini, D. A. and Doneda, A. (2015). "Reducing nitrous oxide emissions from a maize-wheat sequence by decreasing soil nitrate concentration: Effects of split application of pig slurry and dicyandiamide." *European Journal of Soil Science* 66(2): 359-368. doi: 10.1111/ejss.12181.
- Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S. and Potts, J. M. (2003). "A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil." *Appl Environ Microbiol* 69(6): 3593-3599. doi: 10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.
- de Aquino, R. F. B. A., Cavalcante, A. G., Clemente, J. M., Macedo, W. R., Novais, R. F. and de Aquino, L. A. (2021). "Split fertilization of phosphate in onion as strategy to improve the phosphorus use efficiency." *Scientia Horticulturae* 290: 110494. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110494>.
- Delin, S. and Stenberg, M. (2021). "Effects on nitrate leaching of the timing of cattle slurry application to leys." *Soil Use and Management* 37(3): 436-448. doi: 10.1111/sum.12595.
- Dieterich, B., Finnan, J., Frost, P., Gilkinson, S. and Müller, C. (2012). "The extent of methane (ch<sub>4</sub>) emissions after fertilisation of grassland with digestate." *Biology and Fertility of Soils* 48(8): 981-985. doi: 10.1007/s00374-012-0714-1.
- Du, X., Xi, M. and Kong, L. (2019). "Split application of reduced nitrogen rate improves nitrogen uptake and use efficiency in sweetpotato." *Sci Rep* 9(1): 14058. doi: 10.1038/s41598-019-50532-2.
- Eickenscheidt, T., Freibauer, A., Heinichen, J., Augustin, J. and Drösler, M. (2014). "Short-term effects of biogas digestate and cattle slurry application on greenhouse gas emissions affected by n availability from grasslands on drained fen peatlands and associated organic soils." *Biogeosciences* 11(22): 6187-6207. doi: 10.5194/bg-11-6187-2014.
- Fangueiro, D., Pereira, J. L. S., Macedo, S., Trindade, H., Vasconcelos, E. and Coutinho, J. (2017). "Surface application of acidified cattle slurry compared to slurry injection: Impact on nh<sub>3</sub>, n<sub>2</sub>o, co<sub>2</sub> and ch<sub>4</sub> emissions and crop uptake." *Geoderma* 306: 160-166. doi: 10.1016/j.geoderma.2017.07.023.
- Gollner, G., Fedoseyenko, D., Grausgruber-Groeger, S., Grausgruber, H., Friedel, J. K. and Freyer, B. (2016). "Lucerne in arable cropping systems: Potential of different varieties on biomass production and nitrogen balance." *Romanian Agricultural Research* 33: 45-51.
- Johansen, A., Carter, M. S., Jensen, E. S., Hauggard-Nielsen, H. and Ambus, P. (2013). "Effects of digestate from anaerobically digested cattle slurry and plant materials on soil microbial community and emission of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O." *Applied Soil Ecology* 63: 36-44. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.09.003.
- Koszel, M., Lorencowicz, E. (2015). „Agricultural use of biogas digestate as a replacement fertilizers.“ *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 7: 119-124.
- Lee, M.-S., Urgun-Demirtas, M., Shen, Y., Zumpf, C., Anderson, E. K., Rayburn, A. L. and Lee, D. K. (2021). "Effect of digestate and digestate supplemented with biochar on switchgrass growth and chemical composition." *Biomass and Bioenergy* 144: 105928. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105928.
- Ma, Q., Tao, R., Ding, Y., Zhang, X., Li, F., Zhu, M., Ding, J., Li, C., Guo, W., Zhu, X. and Sheng, H. (2022). "Can split application of slow-release fertilizer improve wheat yield, nitrogen efficiency and their stability in different ecological regions?" *Agronomy* 12(2): 407. doi: 10.3390/agronomy12020407.



- Ma, Q., Wang, M. Y., Zheng, G. L., Yao, Y., Tao, R. R., Zhu, M., Ding, J. F., Li, C. Y., Guo, W. S. and Zhu, X. K. (2021). "Twice-split application of controlled-release nitrogen fertilizer met the nitrogen demand of winter wheat." *Field Crops Research* 267: 9. doi: 10.1016/j.fcr.2021.108163.
- Makádi, M., Tomócsik, A. and Orosz, V. (2012). Digestate: A new nutrient source - review: 295-310. doi: 10.5772/31355.
- Munn, K. J., Evans, J., Chalk, P. M., Morris, S. G. and Whatmuff, M. (1997). "Symbiotic effectiveness of rhizobium trifolii and mineralisation of legume nitrogen in response to past amendment of a soil with sewage sludge." *Journal of Sustainable Agriculture* 11(1): 23-37. doi: 10.1300/J064v11n01\_04.
- Park, S. H., Lee, B. R., Cho, W. M. and Kim, T. H. (2017). "Comparative nitrogen use efficiency of urea and pig slurry for regrowth yield and nutritive value in perennial ryegrass sward." *Asian-Australas J Anim Sci* 30(4): 514-522. doi: 10.5713/ajas.16.0520.
- Pawlett, M., Owen, A. and Tibbett, M. (2018). "Amenity grassland quality following anaerobic digestate application." *Grassland Science* 64(3): 185-189. doi: 10.1111/grs.12202.
- Pini, F., Frascella, A., Santopolo, L., Bazzicalupo, M., Biondi, E. G., Scotti, C. and Mengoni, A. (2012). "Exploring the plant-associated bacterial communities in medicago sativa l." *BMC Microbiol* 12(1): 78. doi: 10.1186/1471-2180-12-78.
- Prior, M., Sampaio, S., Nóbrega, L., Uribe Opazo, M., Dieter, J. and Pegoraro, T. (2013). "Combined pig slurry and mineral fertilization for corn cultivation." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 337-348. doi: 10.1590/S1516-89132013000200020.
- R\_CORE\_TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- Seidel, A., Pacholski, A., Nyord, T., Vestergaard, A., Pahlmann, I., Herrmann, A. and Kage, H. (2017). "Effects of acidification and injection of pasture applied cattle slurry on ammonia losses, n<sub>2</sub>o emissions and crop n uptake." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 247: 23-32. doi: 10.1016/j.agee.2017.05.030.
- Sieling, K., Schroder, H. and Hanus, H. (1998). "Mineral and slurry nitrogen effects on yield, n uptake, and apparent n-use efficiency of oilseed rape (brassica napus)." *Journal of Agricultural Science* 130: 165-172. doi: 10.1017/s0021859697005170.
- Vasileva, V. and Kostov, O. (2015). "Effect of mineral and organic fertilization on alfalfa forage and soil fertility." *Emirates Journal of Food and Agriculture* 27: 1. doi: 10.9755/ejfa.2015.05.288.
- Zhang, Z., Yu, Z. W., Zhang, Y. L. and Shi, Y. (2022). "Impacts of fertilization optimization on soil nitrogen cycling and wheat nitrogen utilization under water-saving irrigation." *Frontiers in Plant Science* 13. doi: 10.3389/fpls.2022.878424.
- Zhao, M., Jones, C. M., Meijer, J., Lundquist, P. O., Fransson, P., Carlsson, G. and Hallin, S. (2017). "Intercropping affects genetic potential for inorganic nitrogen cycling by root-associated microorganisms in medicago sativa and dactylis glomerata." *Applied Soil Ecology* 119: 260-266. doi: 10.1016/j.apsoil.2017.06.040.

**Kontakt:**

Ing. Martin Brtnický  
Mendelova univerzita v Brně  
Zemědělská 1  
613 00 Brno  
Česká republika  
e-mail: martin.brtnicky@mendelu.cz

## Botanická skladba a produktivita pastevního porostu při různém zatížení a systému pastvy

Botanical composition and productivity of pasture under different stocking rates and grazing systems

Kobes, M., Jarošová, M., Hýbl, M., Mráz, M.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*

### Abstrakt

V návaznosti na předcházející hodnocení byl posuzován vliv systémů pastvy a odlišného zatížení pastevních porostů na botanickou skladbu, produktivitu a intenzitu vypásání pastevních porostů (2010 – 2015, Velký Chuchelec, 650 m n.m., Rojovský hřbet). Porosty byly vypásány po celé pokusné období masným skotem plemene Charolais, kontinuálně a rotačně s frekvencí 2x – 4x ročně (bez hnojení a při hnojení 100 kg/ha N + PK). S rostoucí frekvencí pastvy klesala pokryvnost produktivních druhů trav a produkce pastevní píce. Chutnost píce naopak neklesala a množství nedopasků bylo nižší. Nejvyšší množství přijaté píce bylo zjištěno při frekvenci spásání 3x ročně oplůtkově a při hnojení NPK. Kontinuální pastva vykazovala nižší produktivitu.

**Klíčová slova:** Pastviny; druhové složení; intenzita pastvy; produkce píce; efektivní výnos.

### Abstract

Following the previous evaluation, the influence of grazing systems and different grazing loads on the botanical composition, productivity and grazing intensity of the grazing stands was evaluated (2010-2015, Velký Chuchelec, 650 m above sea level, Rojovský hřbet). The stands were grazed throughout the experimental period by beef cattle of the Charolais breed, continuously and rotationally with a frequency of 2 - 4 times per year (without fertilization and with fertilization of 100 kg/ha N + PK). With increasing grazing frequency, the cover of productive grass species and grazing forage production decreased. In contrast, forage palatability did not decrease and the amount of ungrazed forage was lower. The highest amount of forage intake was found at a grazing frequency of 3 times per year by strip grazing and NPK fertilization. Continuous grazing showed lower productivity.

**Keywords:** Grazing stands; species composition; grazing intensity; forage production; effective yield.

### Úvod

Louky a pastviny významně ovlivňují charakter krajiny, jsou neopominutelnou estetickou součástí krajiny a krajinného rázu ve vyšších polohách, i v údolních nivách, kde poskytují zadržovací prostor pro případ povodní (Pozdíšek a kol., 2004). V současné době se zvyšuje plocha pastevních porostů na úkor orné půdy, nebo sečených ploch vzhledem k nižším nákladům na pastevní využití vyprodukované biomasy. Pastevní porosty se vyznačují odlišnou četností odběru nadzemní části biomasy než u sečených porostů. Dochází k narušování vegetace sešlapem, zhutňováním půdy a k návratu některých živin ve formě exkrementů od pasoucích se zvířat (Kollárová et al., 2007). Průměrné zatížení pastevních porostů u různých zemědělských podniků se pohybuje nejčastěji v rozpětí 0,25 – 1 DJ/ha s maximální frekvencí hodnot 0,5 – 0,75 DJ/ha (Moudrý et al., 2008). V jarních měsících je vliv pasoucích se zvířat na půdu nejvyšší, neboť zvířata spásají porost již při výšce 10 – 15 cm (Svobodová et al., 2016) a půda je vlhká. Zvířata způsobují kolísání hustoty porostu, kdy udupáním vytvářejí holá místa

bez vegetace. K největšímu poškození dochází na mokřích půdách a v letních měsících (Ludvíková et al., 2014). Sešlapání porostu, které způsobuje holá místa na pastvinách, vytváří vhodné podmínky pro kolonizující druhy (Scimone et al., 2007). Zvířata na pastvě také ovlivňují prostorovou heterogenitu pastvin a to tím, že využívají krátký porost s vyšší nutriční hodnotou (Dumont et al., 2009). Při vhodném pastevním systému a zatížení, respektive při dostatečné produktivitě pastevního porostu, se denní aktivita skotu ustaluje podle typických životních projevů (Voříšková et al., 2001).

Pastevní systémy lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupinou je kontinuální pastva a druhou skupinou je rotační pastva. Vybrat si určitý pastevní systém vyžaduje znalost o produktivitě pastviny a odezvě zvířat v delším časovém horizontu (Mrkvička et al., 2002). V podmínkách klimaticky mírného pásu Evropy je možno dosáhnout rotační pastvou o 8–10 % vyšší produkci zvířat než při kontinuální pastvě (Mrkvička, 1998, Skládanka et al., 2014).

Cílem práce je vyhodnocení botanické skladby a produktivity při různém systému pastvy a zatížení pastevních porostů.

## Materiál a metody

V podhorské oblasti Šumavy (Kaplice, Velký Chuchelec, 650 m n.m.) byl v letech 2005 – 2015 sledován vliv odlišné intenzity (zatížení) a systému pastvy na vývoj botanické skladby travních porostů a na produkci biomasy. Pokusy byly založeny na stejné ploše se shodnou výchozí porostovou skladbou (porostový typ *Lolio-Cynosuteum*), která byla původně využívána pastvou masných plemen skotu 3x ročně. Byly sledovány rotační oplůtková pastva s frekvencí 2x – 4x ročně bez hnojení a při hnojení 100 kg/ha N + 30 kg/ha P + 50 kg/ha K a kontinuální pastva bez hnojení s odlišným zatížením (tabulka 1). Při oplůtkovém systému pastvy byla vypásána plocha 1,62 ha, zahrnující pokusné parcely (4 opakování o ploše 30 m<sup>2</sup>, celkem 120 m<sup>2</sup>) stádem o průměrném počtu 52 ks krav. K vlastním pokusným parcelám byla mobilním ohradníkem vyčleněna bezprostředně navazující plocha pastviny, aby nedocházelo ke zneklidňování zvířat uzavřením jen na malé ploše pokusných parcel. Porosty využívané rotační oplůtkovou pastvou a porosty spásané kontinuálně se nacházely v bezprostřední blízkosti (shodný porostový typ) na obdobných půdních podmínkách (kambizem ilimerizovaná na svoru, hlinitá až písčitohlinitá, s příměsí skeletu, kyselá, pH 4,89 – 5,38, obsah přístupných živin dle Mehlicha v mg/kg půdy: P – 18 mg, K – 170 mg, Mg – 128 mg a Ca 1150 mg/kg). Porosty byly využívány pastvou skotu plemene Charolais (stejně stádo pro všechny plochy o počtu 46 – 54 kusů, průměrně 52 kusů o hmotnosti 670 kg – ŽH stáda 34,84 t, 69,68 DJ, na 1,62 ha 43,04 DJ/ha, dobu vypásání uvádí tabulka 1). Před prvním pastevním cyklem byla zhodnocena druhová skladba porostů – pokryvnost na ploše 30 m<sup>2</sup>. Byl zjištěn výnos píce vysečením pásu (10 m<sup>2</sup>, ve 4 opakováních). U kontinuální pastvy byly využívány pro hodnocení přírůstků biomasy přenosné klece (4 m<sup>2</sup>). Metodika řešení pokusů v letech 2005 – 2015 navazuje na předchozí shodně aplikované postupy v letech 2000 – 2005 (Kobes et al., 2019). Pro fytoecologické analýzy byly využívány botanické snímky, zapsané metodou redukované projektivní dominance každoročně před 1. pastevním cyklem. Po vypásání byly posečeny (2 – 4 cm nad zemí) a zváženy nedopasky a byl vypočten efektivní výnos, tedy množství spasené biomasy jako rozdíl výnosu před spasením a odečtených nedopasků. Nedopasky byly u kontinuální pastvy orientačně hodnoceny vysečením a zvážením plochy odpovídající ploše klece (4 m<sup>2</sup>) posečením zbytků 2 - 4 cm nad zemí a jejich zvážením. U všech pastevních systémů bylo vypočteno okamžité zatížení pastevní plochy (DJ/ha) a zatížení vztažené k 180 dnům pastevního období a celkové roční zatížení jako násobek okamžitého zatížení a poměru skutečné doby spásání a doby pastevního období, nebo roku ve dnech.

## Výsledky a diskuze

V porostu s původními dominantními druhy jílkem vytrvalým (*Lolium perenne*) a trojštětem žlutavým (*Trisetum flavescens*, porostový typ *Triseteto-Lolietum*) se vlivem odlišného způsobu sklizně více uplatnily další druhy trav a došlo k typologické přestavbě porostů. U oplůtkově 2x ročně spásaného porostu byla pokryvnost hlavních dominantních druhů trav vyrovnaná nejčastěji v rozmezí 5 – 15 % D (graf 1) po 10 - 15 letech rotační pastvy. Čtyři převažující druhy trav (srha říznačka (*Dactylis glomerata*), lipnice luční, kostřava luční (*Festuca pratensis*) a jílek vytrvalý) dosahovaly pokryvnosti nejčastěji 35 – 40 %, jedná se o spíše nitrofilní druhy náročnější na obsah živin v půdě. Odnos živin pastvou jen 2x ročně byl nízký a dochází tak k částečné akumulaci živin. To souvisí i s vyšším návratem živin ve formě nedopasků. Kumulaci živin potvrzuje i výskyt na živiny náročnějších druhů bylin – pcháče rolního (*Cirsium arvense*), řebříčku obecného (*Achillea millefolium*), svízele bílého (*Galium album*) a kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), které dále zvyšují množství nedopasků. Ještě výraznější byla akumulace živin patrná u prostu spásaného 2x ročně při hnojení 100 kg/ha N + PK (graf 2), kde ke konci vývoje společenstva převažoval jílek vytrvalý. U rotační oplůtkové pastvy 3x ročně byla botanická skladba porostu obdobná jako při pastvě 2x ročně, avšak vyšší pokryvnosti dosahoval psineček tenký (*Agrostis capillaris*) a čtyři další dominantní druhy trav dosahovaly pokryvnosti 20 – 30 % D. Tento rozvoj psinečku tenkého koresponduje s jeho bioindikační charakteristikou, spojenou s výraznějším ochuzováním trofického potenciálu intenzivně využívaných nehnojených porostů (Klimeš, 2007). Postupné pozvolné snižování zásoby živin v půdě potvrzuje i zvýšená pokryvnost nízkých méně náročných druhů pampelišky podzimní (*Leontodon autumnale*), sedmikrásky chudobky (*Bellis perennis*), jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*). Naopak odlišný je vývoj 3x ročně oplůtkově spásaného porostu při hnojení 100 kg/ha N + PK. U tohoto porostu dosahovaly čtyři dominantní nitrofilní druhy trav pokryvnosti stabilně 45 – 50 % D a pokryvnost psinečku tenkého nedosahovala významných hodnot. Zvýšená pokryvnost jílku vytrvalého, kostřavy luční a lipnice luční dávala u tohoto porostu předpoklad vysoké produkce i kvality píce, což se skutečně potvrdilo i menším množstvím nedopasků. Pokryvnost nitrofilních druhů bylin (pcháč rolní, mochna husí (*Potentilla anserina*), řebříček obecný) byla nízká a v porostu byly zastoupeny i méně náročné druhy, obdobně jako v nehnojeném 3x spásaném porostu. Akumulace živin byla u 3x spásaného hnojeného porostu pomalejší ve srovnání s 2x spásaným porostem. Rotační oplůtková pastva 4x ročně bez hnojení vedla ke snížení pokryvnosti agrobotanické skupiny trav (graf 3). Pokryvnost čtyř kvalitních a produktivních druhů se snížila na 15 – 25 % a v porostu měl větší zastoupení psineček tenký a pohánka hřebenitá (*Cynosurus cristatus*). To ovlivnilo i nízkou produktivitu tohoto porostu, kvalita a chutnost však zůstala téměř zachována, což způsobovalo i malé množství nedopasků. Pokryvnost trav zde vykazovala 3 – 5 letý cyklus. Odnos živin pastvou zde převažoval nad jejich návratem i přes vyšší množství exkrementů zvířat. V porostu měla vysokou pokryvnost agrobotanická skupina ostatních bylin, reprezentovaná nízkými, na živiny méně náročnými druhy (sedmikráska chudobka, pampeliška podzimní, jitrocel kopinatý). Rostoucí výskyt komprimofilních druhů na vysoce zatížených plochách pastvin je typický zejména v blízkosti vstupních bran a napajedel (Míka, 1978). Výška porostu byla v průběhu vegetace průběžně nižší. Nižší produktivita 4x spásaného porostu byla v interakci s vyšší druhovou pestrostí (nižším podílem konkurenčně silných trav) a s vyšším odběrem živin. Obdobné tendence vykazují pastevní porosty v podobných půdně-klimatických podmínkách (Tonn et al., 2019). Při pastvě masného plemene Charolais je intenzitou pastvy více ovlivněna početnost (frekvence a abundance) druhů, než druhová pestrost (Dumont et al., 2009). Při hnojení NPK 4x spásané rotační pastvy zůstala pokryvnost kvalitních a produktivnějších druhů nejčastěji v rozmezí 30 – 37 % D (graf 4). Pokryvnost psinečku tenkého se pohybovala v rozmezí 3 - 6 % D. Převažujícími druhy trav byly jílek vytrvalý a lipnice luční,

pokryvnost srhy říznačky a kostřavy luční byla i přes hnojení snížena vysokým pastevním tlakem (sešlap, nízká výška zbývajícího porostu). To dává předpoklad zachování zejména vysoké kvality porostu, což potvrdilo i nízké množství nedopasků. Nicméně i přes hnojení byl patrný mírný nárůst pokryvnosti psinečku tenkého a v agrobotanické skupině bylin převažovaly nízké druhy obdobně jako v nehnojeném porostu. Odebírané množství živin již nemusí aplikovaná dávka 100 kg/ha N + PK zcela doplňovat. Na potřebu hnojení pastevních porostů i přes jednostranný návrat živin upozorňuje Míka (1978) vzhledem k nižšímu množství kořenů v pastevních porostech. Zajímavá je zjištěná vyšší pokryvnost jetele lučního při oplůtkové pastvě s frekvencí 3x a 4x ročně a potvrzuje se tak vhodnost jetele lučního pro přísevy i do pastevních porostů. Jako méně vhodný způsob pastvy se jeví pastva kontinuální, kdy při vyšším zatížení (3,5-6 DJ/ha) dochází k rozvoji nízkých druhů bylin - pampelišky podzimní (*Leontodon autumnalis*), sedmikráska chudobka (*Bellis perennis*), smetánky lékařské (*Taraxacum sect. ruderalia*) aj. a trav – psinečku tenkého, lipnice úzkolisté (*Poa angustifolia*), pohánky hřebenité a při nízkém zatížení pod 1 DJ dochází k ruderalizaci porostů. Kontinuální pastva však zvyšuje také pokryvnost hodnotných trav jílku vytrvalého a lipnice luční (prosvětlení a sešlap porostu).

Produkční schopnost ověřovaných pastevních porostů v letech 2005 – 2009 byla vyhodnocena v předešlé práci (Kobes et al., 2019), v letech 2010 – 2015 vykazoval vysokou produkci biomasy rotačně spásaný porost 2x ročně a to i bez hnojení (tab. 2). Vysokou produkci vykazoval také 3x ročně spásaný porost, avšak zde již pouze při zvýšené výživě. Vyšší produktivita těchto porostů korelovala s vyšší pokryvností produktivních druhů trav a vysokých druhů bylin. Porost spásaný 3x ročně bez hnojení měl nižší produktivitu a obdobně i porost spásaný 4x ročně a to i při zvýšené výživě. S rostoucím zatížením tedy produktivita pastevních porostů klesá, avšak kvalita vyprodukované i přijímané biomasy může být vysoká.

Produktivita kontinuálně spásaných porostů je srovnatelná s produktivitou rotační pastvy s frekvencí 4x ročně, s rostoucím zatížením klesá produktivita porostu. Zatížení porostů, respektive frekvence pastvy měla na produktivitu signifikantní vliv ( $p < 0,01$ ). Vedle intenzity pastvy ovlivňuje produktivitu i výživa porostů, nejvyšší zvýšení produkce nastalo při hnojení NPK u 3x rotačně spásaných porostů (signifikantní rozdíly mezi hnojenou a nehnojenou variantou rotační pastvy byly zaznamenány i při frekvenci 2x a 4x ročně,  $p < 0,05$ ). Nižší produktivita kontinuální pastvy je způsobena redukcí asimilační plochy porostu stálým spásáním a sešlapáváním. Vedle výživy porostů ovlivňoval produktivitu signifikantně i ročník (klimatické podmínky, teplotně nadprůměrný a srážkově podprůměrný průběh počasí v roce 2015 produkci výrazně snížil). Z teoretických principů oplůtkového systému pastvy vyplývá, že výnos a využití pastevní píce je tím větší, čím je doba spásání jednoho oplůtku kratší (Mrkvička, 1998). Uvedené vztahy popisují rovnice:  $RZop = Czp = Ozop \cdot a_t / t$ .  $Czp / Ozop = a_t / t$ . Hustota osazení oplůtku (Hop), okamžité zatížení oplůtku (OZop), roční průměrné zatížení oplůtku (RZop), (Mrkvička, 1998):  $Hop = \dot{Z} / Po$ ;  $OZop = Hop \cdot 2$ ;  $RZop = Hop \cdot 2 \cdot a_t / t$ . Z uvedeného vyplývá, že zatížení pastvin (oplůtku) ovlivňují zejména tři proměnné: (1) počet zvířat ve stádě (skupině), (2) délka pastevního období (resp. i vegetační doby) a (3) doba pobytu zvířat v oplůtku (Kobes et al., 2019).

Efektivitu pastevní techniky lze posoudit rovněž podle množství nedopasků a množství skutečně spasené pícní biomasy. Podíl nedopasků v období 2010 – 2015 uvádí tabulka 3. Vyšší podíl nedopasků byl opakovaně zjištěn u porostu spásaného dvakrát ročně (bez hnojení i při zvýšené výživě) a u kontinuální pastvy (II) s nižším zatížením. To je dáno spásáním porostů v pokročilejší fenofázi a vyšším podílem hrubších druhů. Zatímco při spásání porostů 3x – 4x ročně byl porost spásán obvykle na počátku sloupkování převažujících trav při výšce 15 – 30 cm, při pastvě 2x ročně byl spásán i ve fenofázi počátku metání (výška porostu 25 – 35 cm). Byl zde také vyšší podíl plodných (hrubších) stébel a vyšší pokryvnost bylin s tužšími lodyhami - pcháč oset (*Cirsium arvense*), řebříček obecný (*Achillea millefolium*), bolševník obecný

(*Heracleum sphondylium*). Značný vliv na podíl nedopasků měl také ročník, respektive rychlost vývinu porostů a fenofáze při spásání v jednotlivých pastevních cyklech. Při nízké produkci v posledním pastevním cyklu může být relativní podíl nedopasků (poměr množství biomasy po a před vypasením) vyšší.

Efektivní výnos pastevních porostů, tedy množství skutečně přijaté píce, se pohyboval v širokém rozmezí 3,95 – 6,84 t.ha<sup>-1</sup> (tabulka 4). Nejvyšší množství přijaté píce bylo z porostu spásaného 3x ročně a hnojeného NPK, pak následoval porost dvakrát spásaný a to i bez hnojení. Množství přijaté píce tedy ovlivňuje především produktivita porostu, tedy frekvence pastvy a zatížení a pak výživa (oba faktory signifikantně,  $p < 0,05$ ). Při spásání porostu 2x ročně však přijatá píce může obsahovat více vlákniny a může mít nižší využitelnost živin (produkční účinnost) a navíc zde již dochází k akumulaci živin v půdě a pozvolné ruderalizaci porostu. Rovněž při kontinuálním spásání porostů klesala produktivita se vzrůstajícím zatížením porostů. Významný vliv na množství přijaté píce měl rovněž ročník ( $p < 0,05$ ).

Tab. 1 Přehled ověřovaných variant pastvy a zatížení při pastvě krav plemene Charolais.

Varianta	Doba vypásání	Ozop (DJ/ha)	Czop (180 dní) (DJ/ha)	Roční zatížení (DJ/ha)
<b>Pastva 2x/0, OP, 1,6188 ha</b>	6 dnů	43,04	1,43	0,71
<b>Pastva 2x/NPK, OP, 1,6188 ha</b>	6 dnů	43,04	1,43	0,71
<b>Pastva 3x/0, OP 1,6188 ha</b>	8 dnů	43,04	1,91	0,94
<b>Pastva 3x/NPK, OP, 1,6188 ha</b>	8 dnů	43,04	1,91	0,94
<b>Pastva 4x/0, OP, 1,6188 ha</b>	10 dnů	43,04	2,39	1,18
<b>Pastva 4x/NPK, OP, 1,6188 ha</b>	10 dnů	43,04	2,39	1,18
<b>Kontinuální I, 10,59 ha</b>	238 dnů	6,58	8,70	4,29
<b>Kontinuální II, 23,84 ha</b>	126 dnů	2,92	2,04	1,01

Tab. 2 Průměrné výnosy pícní biomasy u ověřovaných pastevních porostů při různé intenzitě jejich využívání a zatížení (2010 – 2015).

Systém pastvy	Varianta	Výnos sena v t . ha <sup>-1</sup>						
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	$\bar{X}_{10-15}$
Rotační oplůtková	P-2x/O	7,23	7,17	6,38	6,14	5,42	5,19	<b>6,26</b>
	P-2x/NPK	8,29	8,41	7,45	7,66	6,34	6,99	<b>7,52</b>
	P-3x/0	7,08	7,60	5,46	5,04	3,61	3,44	<b>5,37</b>
	P-3x/NPK	9,70	8,52	6,72	7,03	7,15	5,87	<b>7,50</b>
	P-4x/0	6,04	5,53	4,50	3,61	3,30	3,28	<b>4,38</b>
	P-4x/NPK	7,36	6,80	4,12	4,16	5,19	4,84	<b>5,41</b>
Kontinuální	KP I	4,96	5,21	4,23	4,42	3,98	3,36	<b>4,36</b>
	KP II	6,02	6,05	5,21	5,37	4,89	4,18	<b>5,29</b>
$\bar{X}_{roky}$		<b>7,09</b>	<b>6,91</b>	<b>5,51</b>	<b>5,43</b>	<b>4,99</b>	<b>4,64</b>	<b>5,76</b>

Tab. 3 Podíl nedopasků (v %) z celkové produkce pastevní píce u ověřovaných pastevních porostů při různé intenzitě jejich využívání a zatížení (2010 – 2015).

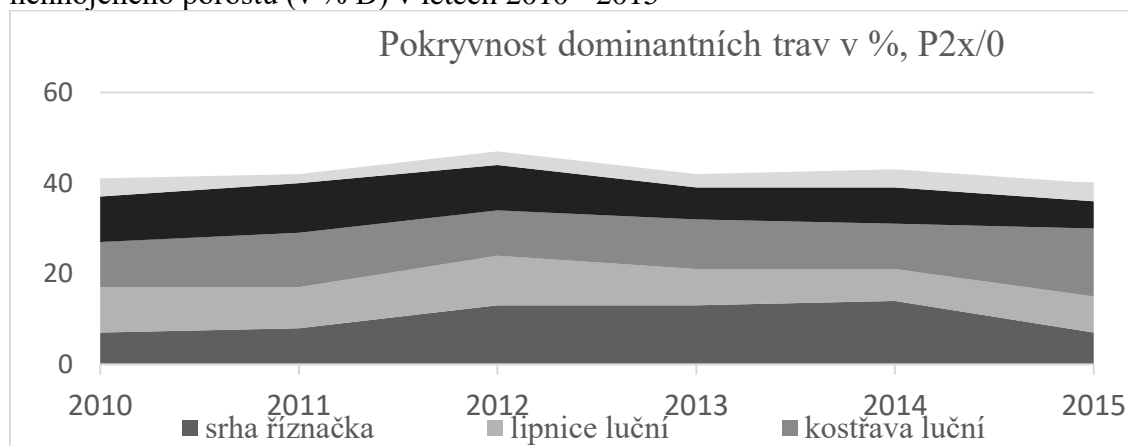
Systém pastvy	Varianta	Nedopasky %						
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	$\bar{X}_{10-15}$
Rotační oplůtková	P-2x/O	15,8	15,7	16,4	9,3	9,5	13,4	<b>13,35</b>
	P-2x/NPK	16,6	14,6	15,2	8,4	10,1	17,1	<b>13,67</b>
	P-3x/0	9,5	12,1	10,2	6,6	7,9	7,1	<b>8,90</b>
	P-3x/NPK	9,5	12,5	9,1	6,9	7,0	7,9	<b>8,82</b>
	P-4x/0	10,7	11,7	8,3	6,6	6,8	5,1	<b>8,20</b>

	P-4x/NPK	11,5	12,6	7,6	7,0	5,5	4,4	<b>8,10</b>
Kontinuální	KP I	12,2	8,7	10,2	9,6	8,7	6,2	<b>9,27</b>
	KP II	15,3	15,7	14,3	14,2	15,1	13,2	<b>14,63</b>
$\bar{X}_{\text{roky}}$		<b>12,64</b>	<b>12,95</b>	<b>11,41</b>	<b>8,58</b>	<b>8,83</b>	<b>9,30</b>	<b>10,62</b>

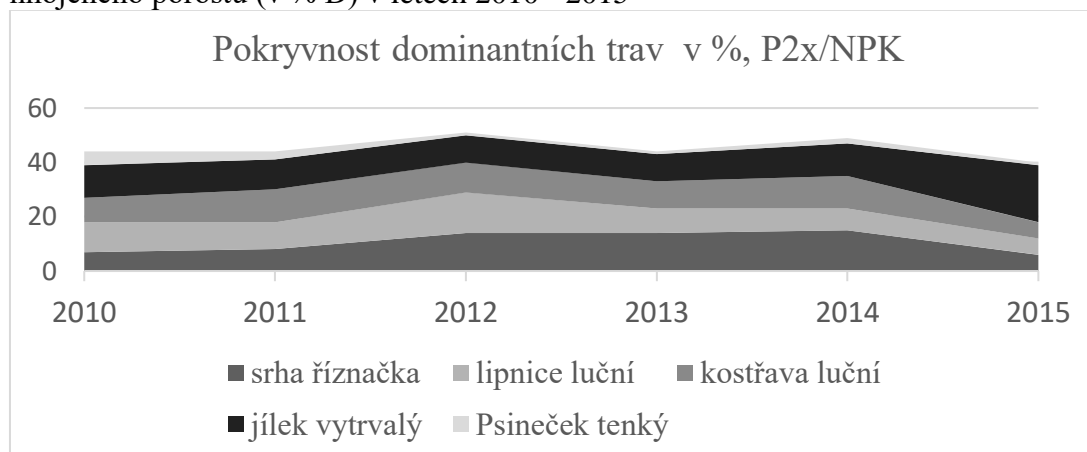
Tab. 4 Výnosy využitě (spasené) pícní biomasy (v t.ha<sup>-1</sup> sena) u pasterově využívaných porostů při různé intenzitě jejich využívání a zatížení (2010 – 2015).

Systém pastvy	Varianta	Výnos využitě (spasené) píce (t . ha <sup>-1</sup> sena)						
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	$\bar{X}_{10-15}$
Rotační oplůtková	P-2x/O	6,08	6,06	5,34	5,57	4,91	4,52	<b>5,41</b>
	P-2x/NPK	6,92	7,19	6,32	7,02	5,70	5,80	<b>6,49</b>
	P-3x/0	6,41	6,72	4,90	4,71	3,32	3,20	<b>4,88</b>
	P-3x/NPK	8,79	7,50	6,11	6,56	6,67	5,41	<b>6,84</b>
	P-4x/0	5,38	4,89	4,12	3,37	3,08	3,11	<b>3,99</b>
	P-4x/NPK	6,48	5,95	4,55	3,87	4,91	4,63	<b>5,07</b>
Kontinuální	KP I	4,35	4,76	3,80	4,00	3,63	3,15	<b>3,95</b>
	KP II	5,10	5,10	4,46	4,61	4,15	3,63	<b>4,51</b>
$\bar{X}_{\text{roky}}$		<b>6,19</b>	<b>6,02</b>	<b>4,95</b>	<b>4,96</b>	<b>4,55</b>	<b>4,18</b>	<b>5,14</b>

Graf 1. Vývoj pokryvnosti dominantních druhů trav u rotačně oplůtkově 2x spásaného, nehnojeného porostu (v % D) v letech 2010 - 2015

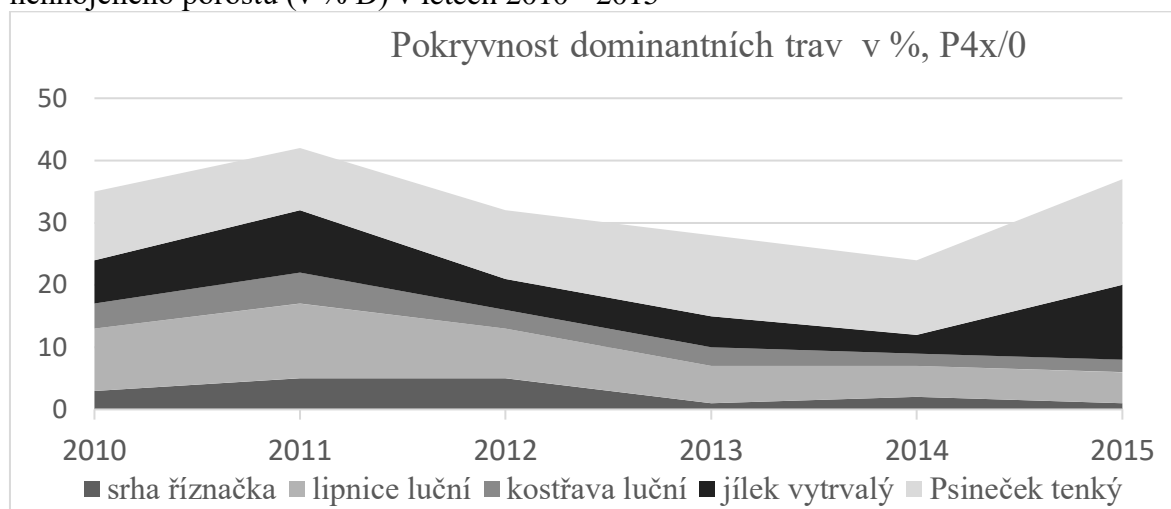


Graf 2. Vývoj pokryvnosti dominantních druhů trav u rotačně oplůtkově 2x spásaného, hnojeného porostu (v % D) v letech 2010 - 2015

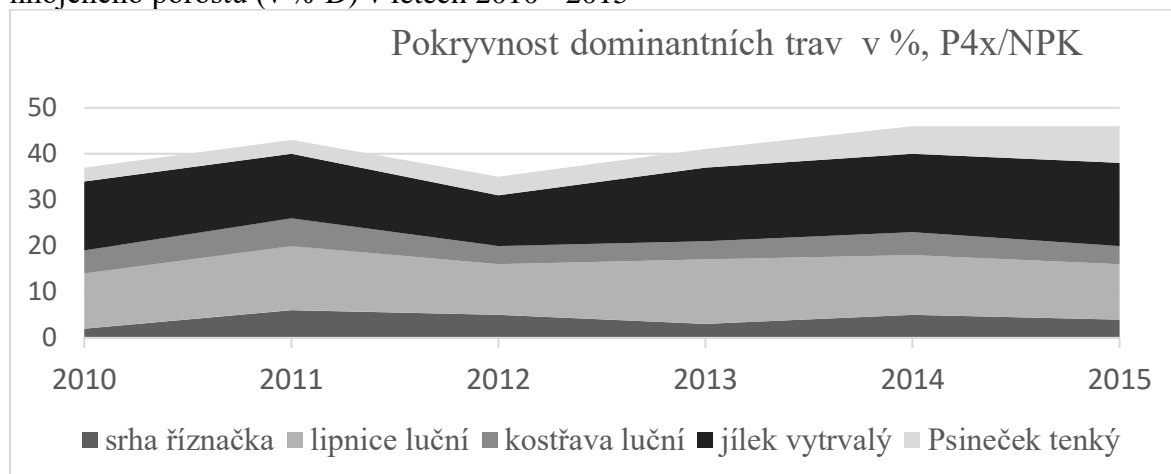




Graf 3. Vývoj pokryvnosti dominantních druhů trav u rotačně oplůtkově 4x spásaného, nehnojeného porostu (v % D) v letech 2010 - 2015



Graf 4. Vývoj pokryvnosti dominantních druhů trav u rotačně oplůtkově 4x spásaného, hnojeného porostu (v % D) v letech 2010 - 2015



## Závěr

Oplůtkový systém pastvy vykazuje příznivější druhovou skladbu porostu, kdy při vypásání porostu 3x a 4x ročně dochází k rozvoji kvalitních druhů trav (kostřava luční, jílek vytrvalý, lipnice luční) a jetelovin (jetel plazivý, jetel luční). Při vypásání porostů pouze dvakrát ročně však dochází k ruderalizaci porostu a ke zvýšení pokryvnosti méně hodnotných druhů (kostřava červená, pýr plazivý, pcháč oset aj.). Kontinuální pastva vede ke snížení počtu druhů a ke zvýšení výskytu bylin s nízkou přízemní listovou růžicí a nízkých trav. Produktivita pastevních porostů klesá s rostoucím zatížením více než kvalita píce, což je způsobeno nejen spásáním v ranější růstové fázi, ale i vyšší pokryvností jílkou vytrvalého, lipnice luční a jetele plazivého. U rotační pastvy s vyšší frekvencí (3x a 4x) je již patrná potřeba hnojení k udržení produktivity při zachování chutnosti píce, efektivní výnos je vysoký a množství nedopasků nevzrůstá.

## Literatura

- Dumont, B. et al. (2009). How does grazing intensity influence the diversity of plants and insects in a species-rich upland grassland on basalt soils? *Grass and Forage Science*, 64 (1): 92 – 105. ISSN:1365-2494
- Klimeš, F., Kobes, M., Švehla, J., Voženílková, B., Koukolová, V., Suchý, K.: Možnosti rozvíjení multifunkčního uplatnění pastevních cenóz. In: *Súčasnosc' a perspektívy krmovinárskeho výzkumu a vzdelávania v multifunkčnom využívaníu krajiny*. SPU Nitra, 2007, 59 – 61.
- Kobes, M. et al. (2019). Vliv systému a intenzity pastvy na porostovou skladbu, produktivitu a mimoprodukční funkce dlouhodobého pastevního porostu. The influence of grazing systém and intensity on botanical composition, productivity and nonproductive functions of long term pasture sward. In: *Úroda 12, roč. LXVII, věd. příloha, s. 307 – 314*. ISSN 0139-6013.
- Kollárová, M. et al. (2007). *Zásady pro obhospodařování trvalých travních porostů*. Praha: Výzkumný ústav zemědělské techniky Praha, 53 s. ISBN 978-80-86884-20-2.
- Míka, V. (1978). Intenzita sešlapávání a produktivnost rostlinných společenstev v oplůtkových pastvinách. *Rostlinná výroba, ÚZPI Praha*, s. 1305 – 1310. ISSN 1214-1178.
- Moudrý, J., Friebel, L., Konvalina, P.: *Hospodaření na trvalých travních porostech a využívání agroenvironmentálních programů v ČR. Acta Universitatis Bohemiae Meridionales*. Č. Budějovice, 2008, XI., s. 95 – 99.
- Mrkvička, J. et al. (2002). *Pastvinářství v ekologickém zemědělství*. [1. vyd.]. Praha: ÚZPI. Příručka ekologického zemědělce, 20 s. ISBN 80-7271-118-0.
- Mrkvička, J.: *Pastvinářství*. AF ČZU Praha, 1998, 81 s.
- Pozdíšek, J., a kol.: *Využití trvalých travních porostů chovem skotu bez tržní produkce mléka*. *Zemědělské informace, ÚZPI, Praha, 2, 2004*, 103 s.
- Scimone, M. et al. (2007). Effects of livestock breed and grazing intensity on grazing systems: 3. Effects on diversity of vegetation. *Grass and Forage Science*, 62(2): 172-184.
- Skládanka, J. et al. (2014). *Pastva skotu*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 244 s. ISBN 978-80-7509-145-1.
- Svobodová, M., Šantrůček, J., Skalický, M.: *Pastva a zastoupení jetelovin v TTP*. *Úroda*, 2016, dostupné z [www.uroda.cz](http://www.uroda.cz), [on line], cit. 27.1.2017
- Tonn, B., Densing, E.M., Gabler, J., Isselstein, J. (2019). Grazing-induced patchiness, not grazing intensity, drives plant diversity in European low-input pastures. *Journal of Applied Ecology*, 56 (7), s. 1624-1636. ISSN: 1365-2664
- Voříšková, J. et al. (2001). *Etologie hospodářských zvířat*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. 168 s. ISBN 80-7040-513-9.

## Kontakt:

Ing. Milan Kobes, Ph.D.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zemědělská a technologická  
Katedra rostlinné výroby  
Na Sádkách 1780  
370 05 České Budějovice  
Tel.: 387772918, e-mail: [kobes@fzt.jcu.cz](mailto:kobes@fzt.jcu.cz)

## Fermentovaná zelenina ošetřená vysokým tlakem

### Fermented Vegetable and High Pressure Treatment

Kováříková Eliška

*Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i.*

#### Abstrakt

Fermentovaná zelenina je kvalitní potravina a kombinuje v sobě živé mikroorganismy, jejich metabolity, vlákninu a bioaktivní látky ze zeleniny. Ošetření vysokým tlakem obvykle vede k poškození buněk, jejich šetrné deaktivaci a zachovává maximum ostatních bioaktivních látek. Všechny druhy bakterií ale nejsou stejně citlivé a i když vysoký tlak inaktivoval většinu bakterií mléčného kvašení v testovaných fermentovaných směsích, ostatní druhy bakterií byly vůči testovaným podmínkám odolné. Postbiotika doplňují skupinu probiotik a prebiotik o jasně definovanou skupinu terapeutických preparátů určených ke zlepšení zdravotního stavu příjemce. Jedná se o deaktivovanou mikrobiální populaci a její metabolity. Z tohoto důvodu a vzhledem k nutnosti ověřeného účinku nelze zeleninu ošetřenou vysokým tlakem jako postbiotikum označit.

**Klíčová slova:** Ošetření vysokým tlakem, postbiotika, probiotika, bakterie mléčného kvašení

#### Abstract

Fermented vegetable is known as a good quality food and combine together positives of alive bacteria, fiber and bioactive compounds from vegetable. High pressure treatment causes microbial cells damage but preserves maximum of other bioactive compounds. Sensitivity of microbes toward high pressure treatment is different. Inactivation of lactic acid bacteria in our fermented vegetable samples was high, but other strains were resistant to our high pressure conditions. Postbiotics complements group of probiotics and prebiotics to strictly defined group of therapeutic preparations that confers a health benefit on the host. Microbial population in postbiotics is inanimate and served together with their metabolites. Due to this effect and because the effect to be host must be verified, fermented vegetable cannot be labeled as a postbiotic.

**Keywords:** High pressure treatment, postbiotic, probiotic, lactic acid bacteria

#### Úvod

Výrobci potravin a doplňků stravy hledají cesty jak označit své výrobky souladu s moderními trendy. Salminen et al. (2021) v roce 2021 definovali postbiotikum jako přípravek, který obsahuje neživé mikroorganismy a/nebo jejich části a který přináší uživateli nějakou výhodu. Postbiotika jsou tedy záměrně inaktivované mikrobiální buňky s/nebo bez metabolitů, nebo části buněk. Čisté mikrobiální metabolity ani vakcíny nejsou postbiotikum. Pozitivní efekt musí být prokázán pro cílového hostitele. Místo účinku postbiotika není omezeno na střevo. Může se jednat také o ústní dutinu, kůži, urogenitální trakt nebo nosohltan. Injekční podávání není zahrnuto v ideji postbiotik. Důležitou částí definice je ověřená bezpečnost podávání postbiotik pro cílového hostitele.

Mléčná fermentace dokáže zhodnotit zeleninu a povýšit ji na živou, aktivní a funkční potravinu. Kromě zachování většiny živin obohacuje zeleninu o skupinu krátkých mastných kyselin (SCFA) a o jejich producenty. Do skupiny mléčných bakterií patří většina probiotických kmenů. Bohužel ani fermentovaná zelenina není zcela bez rizika pro konzumaci. Jedním z problémů jsou kontaminující bakterie, které mohou přežít i nízké pH kysaných potravin (Skowron et al., 2022). Tyto potraviny mohou být rizikové pro konzumenty s některými nemocemi střev, pokud je střevní bariera porušena. V tomto případě lze využít fermentované potraviny s inaktivovanými bakteriemi. Kromě klasické sterilace vysokou teplotou, lze použít i moderní metody využívající vysokého tlaku. Vysoký tlak dokáže inaktivovat bakterie,

kvasinky i plísně, ale účinnost je závislá na podmínkách (tlak, doba výdrže, pH, typ mikroorganismu) (Houška and Silva, 2018).

### **Materiál a metody**

Byly připraveny 3 typy fermentovaných zeleninových směsí a skladovány v chladu po dobu 6 měsíců. Směs číslo 1 byla tvořena směsí rajčat, papriky a cukety v poměru 1:1:1 a doplněna cibulí a česnekem v poměru 0,5:0,1. Směs číslo 2 byla sestavena ze zelí, tuřínu a mrkve (2:1:1) a doplněna opět cibulí a česnekem (0,5; 0,03). Směs číslo 3 byla koncipována jako směs zelí a červené řepy (3:1) a doplněna cibulí, křenem a česnekem (1:0,25:0,03). Zelenina byla krouhána, osolena (1,5% NaCl) a inokulována (fermentovaná zelná šťáva v dávce 5%). Po skončení hlavního kvašení (1-2 týdny, 20-23°C) byly směsi uloženy při 8°C. Pro vlastní pokus byla část vzorku skladována dále ve stejných podmínkách (zatavený plastový sáček, 8°C, tma) a část vzorku byla ve skladovacím obalu ošetřena vysokým tlakem (HP – high pressure 400 MPa, 15 minut). Po ošetření byla provedena orientační senzorká analýza (sledován pouze rozdíl mezi ošetřeným a neošetřeným vzorkem), změřeno pH a proveden mikrobiologický rozbor.

Stanovení počtu živých mikroorganismů bylo provedeno kultivační metodou na selektivním mediu. Odebraná fermentovaná směs byla naředěna definovaným množstvím sterilního fyziologického roztoku a homogenizována pomocí přístroje Stomacher. Suspenze byly očkované na povrch selektivní půdy a po kultivaci byly počítány kolonie. Po přepočtu bylo množství mikroorganismů vyjádřeno jako počet kolonie tvořících jednotek v 1 gramu vzorku – KTJ/g. Skupiny mikroorganismů byly definovány pomocí selektivní půdy. Pro celkový počet mikroorganismů (CPM) jsme použili Nutrient agar (Himedia) a pro mléčné bakterie (LAB) MRS agar (Oxoid). Senzorické srovnání proběhlo metodou dotazníku, kde se srovnávala směs ošetřená vysokým tlakem a neošetřená. Dotazované parametry byly: vzhled, vůně, chuť a textura. Hodnocení bylo nastaveno na odpověď liší se/ neliší se. Pro stanovení pH jsme použili stolní pH metr Testo 206 a měření proběhlo v uvolněné šťávě.

### **Výsledky**

Ošetření vysokým tlakem se používá jako šetrná náhrada pasterace, protože sice ovlivňuje životaschopnost přítomných bakterií, ale neovlivňuje termolabilní živiny. Pro srovnání jsme fermentované zeleninové směsi zabalili do plastového sáčku, jednu dávku ponechali bez ošetření jako kontrolu a druhou jsme vystavili působení tlaku 400 MPa po dobu 15 minut, což je standardní postup ověřený pro čerstvé zeleninové šťávy. Po provedeném ošetření jsme nepozorovali žádné výrazné změny barvy nebo textury. Pouze u letní směsi došlo k částečnému rozptýlení červené barvy uvolněné z rajčat, jak ukazuje Obr 1. Ostatní směsi nevykazovaly změnu žádnou, neboť jejich probarvení je homogenní a textura zeleniny výrazně tvrdší, což ilustrují Obr. 2 a Or. 3.



Obr. 1. Fermentovaná směs zeleniny číslo 1 před a po ošetření vysokým tlakem (400 MPa, 15 minut).



Obr. 2. Fermentovaná směs zeleniny číslo 2 před a po ošetření vysokým tlakem (400 MPa, 15 minut).



Obr. 3. Fermentovaná směs zeleniny číslo 3 před a po ošetření vysokým tlakem (400 MPa, 15 minut).

K podobnému výsledku jsme došli pomocí dotazníkového hodnocení sensorických vjemů. Ve vzhledu a vůni u žádného druhu směsi žádný z hodnotitelů nezaznamenal rozdíl mezi ošetřeným a neošetřeným vzorkem. V chuti pouze 5 % hodnotitelů zaznamenalo rozdíl u směsi č. 1 a č. 2, ale v poznámce byl hodnocen jako nevýrazný. Směs číslo 3 byla hodnocena jako bez rozdílu všemi hodnotiteli. Nejvýraznější vliv měla aplikace vysokého tlaku na texturu. Rozdíl zaznamenalo 85 % hodnotitelů pro směs č. 1 a 20 % pro směs č. 2. Směs č. 3 byla hodnocena jako bez rozdílu všemi hodnotiteli v parametru textury.

Sledování změny v počtu aktivních mikroorganismů mléčného kvašení ukázalo, že ošetření vysokým tlakem v kombinaci s kyselým prostředím inaktivovalo přítomné mléčné bakterie o 3 až 6 řádů, ačkoliv obsah ostatních bakterií zůstal téměř nezměněn.

Tab. 1: Počet živých mikroorganismů ve fermentovaných směsích zeleniny před a po ošetření vysokým tlakem (400 MPa; 10 minut)

Zeleninová směs	CPM (KTJ/g) neošetřené	CPM (KTJ/g) Ošetřené HP	LAB (KTJ/g) neošetřené	LAB (KTJ/g) Ošetřené HP
1	$3,5 \cdot 10^2 \pm 7,1 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^2 \pm 1,1 \cdot 10^2$	$5,3 \cdot 10^6 \pm 4,2 \cdot 10^5$	nenalezeno
2	$3,0 \cdot 10^2 \pm 1,4 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^2 \pm 7,7 \cdot 10^1$	$7,7 \cdot 10^6 \pm 3,3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^1 \pm 2,8 \cdot 10^0$
3	$3,3 \cdot 10^2 \pm 1,1 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^2 \pm 2,8 \cdot 10^1$	$3,5 \cdot 10^4 \pm 7,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^1 \pm 7,1 \cdot 10^{-1}$

Ošetření vysokým tlakem neovlivnilo pH vzorků. Směs číslo 1 měla pH před ošetřením  $3,37 \pm 0,03$  a po ošetření  $3,40 \pm 0,04$ . Směs číslo 2 měla pH před ošetřením  $3,62 \pm 0,16$  a po ošetření  $3,47 \pm 0,04$ . Směs číslo 3 měla pH před ošetřením  $3,95 \pm 0,11$  a po ošetření  $3,91 \pm 0,03$ .

## Diskuze

Postbiotikum je charakterizováno podobně jako probiotikum, ale bez důrazu na živé mikroorganismy. Společné pro obě definice je nutnost ověřit pozitivní účinek připraveného preparátu, nejlépe klinickou studií. Tento přístup u potravin není snadno realizovatelný a je tudíž vhodnější hovořit o potenciálním probiotickém nebo postbiotickém účinku. Z hlediska bezpečnosti pro konzumenta je dostatečný obecný požadavek nezávadnosti potravin a důsledné značení alergenů. V zeleninových směsích se snadno mohou vyskytnout složky schopné způsobit silnou alergickou reakci, jako například celer. Účinek inaktivovaných mikroorganismů označil za probiotický paradox Adams v přehledové studii již roku 2010. Předpokládaný účinek živých buněk, prezentovaný ve zmíněném článku, je ve změně gastrointestinální mikroflóry, ale inaktivované buňky ovlivňují gastrointestinální mukosu a tím zánětlivou odpověď imunitního systému. Obě složky se také ovlivňují navzájem. Tento efekt je dobře využitelný v potravinách s vysokým obsahem potenciálně probiotických mikroorganismů, jakými by fermentovaná zelenina měla být. Nicméně za postbiotické lze jen těžko považovat původně probiotické potraviny které ztratily životaschopnost své probiotické složky v důsledku skladování (Vinderola et al., 2022). Fermentovaná zelenina s aktivně usmrcenými buňkami obsahuje nejen celé inaktivované buňky (tepelná inaktivace), ale i jejich fragmenty (ošetření vysokým tlakem). Navíc takto připravená potravina obsahuje kromě buněk i jejich metabolity a dále prospěšné a esenciální složky přímo z použité zeleniny. Při ošetření vysokým tlakem sice nedojde ke kompletní inaktivaci přítomných mikroorganismů, ale vitamíny a ostatní termolabilní látky jsou zachovány (Houška and Silva, 2018).

## Závěr

Vzhledem k podmínkám stanoveným v definici pro postbiotika nelze vysokým tlakem ošetřenou fermentovanou zeleninu takto označit. Přetrvání části živých mikroorganismů sice

může u disponovaných jedinců představovat zdravotní riziko, nicméně se zde jedná o běžnou mikroflóru. Pozitivním závěrem je, že vysoký tlak nemá negativní vliv na sensorické vlastnosti fermentované zeleniny, kromě ovlivnění textury u měkčích druhů. Fermentovaná zelenina ošetřená vysokým tlakem tak může snadno nalézt své konzumenty, stejně jako ostatní fermentované potraviny.

**Poděkování**

Práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0318

### **Literatura**

- Adams C.A. The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews* 23, 37-46 (2010) doi: 10.101/S0954422410000090
- Houška M., Silva F. V. M. (eds.) *High Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products*. CRC Press, 2018. ISBN: 13:978-1-4987-3902-3
- Skowron K, Budzyńska A, Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Andrzejewska M, Wałęcka-Zacharska E and Gospodarek-Komkowska E. Two Faces of Fermented Foods — The Benefits and Threats of Its Consumption. *Front. Microbiol.*, 07 March 2022; doi: 10.3389/fmicb.2022.845166
- Salminen S, Collado MC, Endo A et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 649–667 (2021). doi: 10.1038/s41575-021-00440-6
- Vinderola G, Sanders ME, Salminen S. The Concept of Postbiotics. *Foods* 11, 1077 (2022) doi: 10.3390/foods11081077

### **Kontakt:**

Ing. Eliška Kovářiková, Ph.D.  
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i.  
Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař  
[eliska.kovarikova@vupp.cz](mailto:eliska.kovarikova@vupp.cz)



## Aspekty použití kompostu jako mulče při pěstování brambor

Aspects of using compost as mulch at potatoes cultivation

Král M., Dvořák P.

*Katedra Agroekologie a rostlinné produkce, ČZU Praha*

### Abstrakt

V rámci maloparcelového pokusu byly ověřovány přínosy kompostu aplikovaného jako mulč, tedy přímo na povrch hrůbků brambor. Byl použit kompost ze 3 různých provozů, zabývajících se jeho výrobou. Aplikace proběhla bezprostředně po výsadbě přímo na hrůbky, kde se kompost během vegetace postupně vytrácel. Během vegetace se sledovaly vybrané parametry úrovně půdní vláhý a fyzikální stav půdy, dále byl sledován výživný stav porostů brambor. Na závěr pokusu se hodnotili produkční ukazatele brambor. Z těchto pozorování vyplynulo, že kompost aplikovaný jako mulč měl pozitivní vliv na nárůst konzumních hlíz (nad 40 mm) a snížil povrchové utužení půdy. Výsledky pozorování půdní vláhý v hrůbcích nicméně trend zvýšené půdní vláhý na parcelách s kompostem zcela nepotvrdily.

**Klíčová slova:** hrůbky, hlízy, výnos, půdní vláha, utužení půdy

### Abstract

As part of a small-plot experiment, the benefits of compost applied as mulch directly on the surface of potato hills, were verified. Compost from 3 different plants involved in its production was used. The application took place immediately after planting directly on the hills, where the compost gradually disappeared during the vegetation. During the growing season, selected parameters of the soil moisture level and the physical condition of the soil were monitored, and the nutritional status of the potato stands was also monitored. At the end of the experiment, potato production indicators were evaluated. These observations showed that compost applied as mulch had a positive effect on the growth of tubers (over 40 mm) and reduced soil surface compaction. However, the results of observing soil moisture in the graves did not completely confirm the trend of increased soil moisture in plots with compost.

**Keywords:** hills, tubers, yield, soil moisture, soil compaction

### Úvod

Používání kompostu v rostlinné výrobě je v poslední letech vidět stále častěji. Řada zemědělských podniků v rámci jeho aplikace řeší celou škálu problému počínajících od nedostatku organických hnojiv až po zhoršenou kvalitu půdy a její vlastnosti. Kompost dokáže zlepšit řadu půdních aspektů souvisejících s bilancí živin, vodním, vzdušným i tepelným režimem, sorpční schopností, tvorbou strukturních agregátů, využitelností živin a mikrobiální aktivitou půdy (Badalíková 2019, Fischer and Glaser 2012, Wilson et al. 2019).

Přínosy kompostu by měly být nejvíce patrné u plodin vyžadujících organická hnojiva a vykazujících vyšší citlivost na sucho, jako jsou okopaniny. U brambor bylo dokonce pozorováno průkazné zvýšení výnosů (Halloran et al. 2013; Setiyo et al. 2016). V případě, že kompost slouží jako alternativa k organickým hnojivům, jsou nutné, vzhledem k jeho nízkému obsahu živin, vyšší dávky na hektar (oproti statkovým hnojivům o desítky tun). Jeho aplikace se provádí nejčastěji v období před podzimní orbou, s kterou je poté kompost dostatečně zapraven, což je výhodné hlavně z legislativních důvodů (vyhláška č. 274/1998 Sb.). Otázkou je, zda takto hluboko zapravený kompost, může ještě v následné sezóně plnit řadu výše zmíněných funkcí, zejména zvýšení mikrobiální aktivity půdy. Ponechání kompostu na povrchu by mohlo být ještě prospěšnější pro zlepšení některých půdních vlastností. V případě ponechání kompostu po aplikaci na povrchu, by mohl více působit v povrchové (mělké) vrstvě půdy. To by se mohlo pozitivně projevit na snížení utužení a omezení tvorby půdního škraloupu Edwards (2009). Bližšímu zkoumání by u povrchové aplikace, pak měla být podrobena i aplikační dávka

kompostu, kdy by mohlo postačit menší množství. Z hlediska úspěšnosti kompostu ve vytváření lepších podmínek v půdě pro růst plodin je klíčovou otázkou samotný způsob aplikace. Řada studií ukázala, že ani vysoké dávky kompostu nemusí zlepšit půdní podmínky, pokud je nevhodně zapraven. Proto vyvstává otázka, zda-li mělké zapravení nebo ponechání kompostu zcela na povrchu, nemůže účel zlepšení půdních podmínek plnit stejně či lépe. Dalším významným faktorem pro působení kompostu v půdě bude i termín aplikace (podzim vs. jaro), což je provázáno s řadou pochodů v půdě a hlavně časem, po který kompost v půdě působí.

## **Materiál a metody**

Za účelem ověření předpokladů, že aplikace kompostu by mohla zlepšit pěstování brambor, byli na pozemcích Výzkumné stanice v Uhříněvsi katedry Agroekologie a rostlinné produkce při ČZU v Praze, založeny na jaře 2022 maloparcelkové pokusy. Pokusné pozemky stanice se nachází v řepařské výrobní oblasti, nadmořská výška je 295 m, průměrná teplota vzduchu 8,4°C a průměrný roční úhrn srážek činí 575 mm. Jako pokusná plodina byly zvoleny brambory, raná odrůda Dicolora. K aplikaci byl použit kompost ze tří podniků: Jevíčko, Blatnice, Hostěrádky. Jako kontrolní varianta posloužily parcely založené bez následné aplikace kompostu. Celkem tak byly, včetně kontroly založeny 4 varianty, každá varianta měla 4 opakování. Pokusnou dvouřádkovou parcelu tvořilo 16 trsů. Výsadba proběhla ručně 28. dubna, aplikace kompostu 10. května (přepočtená dávka 20 t/ha) a ukončení vegetace a sklizeň 13. září. Během vegetace byl pokus standartně ošetřován herbicidní, insekticidní a fungicidní ochranou. Kompost byl aplikován ručně přímo na hrůbky bezprostředně po výsadbě brambor s cílem zlepšit pěstitelské podmínky. Ke kontinuálnímu sledování půdní vláhly v kořenové zóně byla použita čidla EM50 Data Logger s intervalem 10 min (instalována 4.7. 2022), do hloubky 10 cm od vrcholu hrůbku. Pro zjištění povrchového utužení hrůbků byl měřen, i jako nepřímý indikátor schopnosti infiltrovat srážky, na sklonku vegetace penetrometrický odpor (do hloubky 10 cm, penetrometrem FieldScout SC 900). Jako nepřímý indikátor výživného stavu rostlin byl v průběhu vegetace měřen chlorofyl v listech chlorofylmetrem SPAD 502). Z produkčních ukazatelů byl sledován výnos hlíz a jejich velikostní zastoupení, tedy počet a hmotnost hlíz ve frakcích pod 40 mm a nad 40 mm (stanovení na čtvercových sítích).

## **Výsledky**

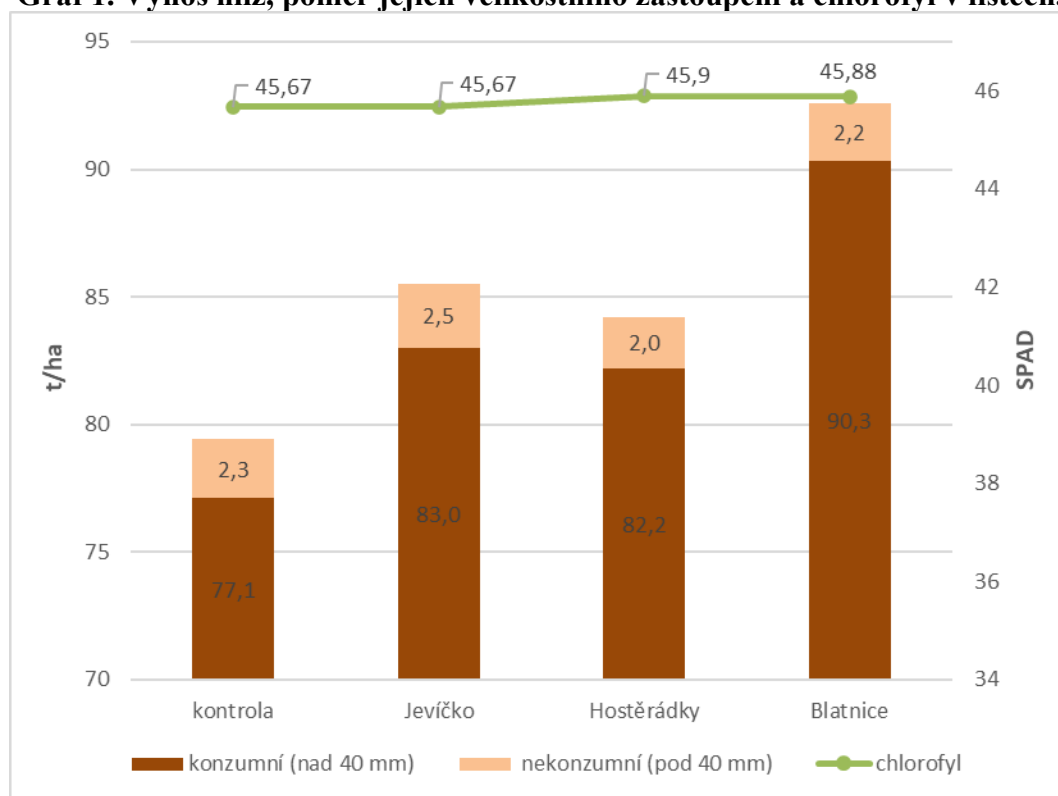
Průběh povětrnostních podmínek během vegetace pokusu, by se dal ve srovnání s dlouhodobým normálem charakterizovat jako teplotně mírně nadprůměrný, díky měsícům květen a červen. Srážkově lze průběh počasí hodnotit jako nevyrovnaný, s nadbytkem srážek během měsíce června a deficitní během května a července. Více charakterizuje průběh počasí tabulka 1.

Z výsledků získaných z pozorování produkčních ukazatelů vyplývá, že nejvyšší úrovně sklizených hlíz, přepočteno na hektar, bylo dosaženo z parcel s aplikací kompostu z podniku Blatnice (Graf 1). Dále následovaly parcely s aplikací kompostu z podniku Jevíčko a Hostěrádky, nejnižší úroveň výnosu hlíz byla zjištěna u kontrolních parcel bez kompostu. Nejlepší poměr výnosu hlíz konzumní velikosti na výnosu celkovém byl zjištěn u varianty s kompostem z Hostěrádek (pouze 2,46 % hlíz nekonzumní velikosti). Naopak nejhůře dopadla s tímto poměrem varianta kompostu z Jevíčka (podíl hlíz nekonzumní velikosti 3,05 %) a kontrola (podíl 2,99 %). Z pozorování chlorofylu v listech vycházely nejvyšší hodnoty u varianty kompostu z Hostěrádek (Graf 1), naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny u kontrolní varianty a varianty s kompostem z Jevíčka.

**Tabulka 1. Měsíční údaje za vegetační období Uhřetěves (duben – září 2022).**

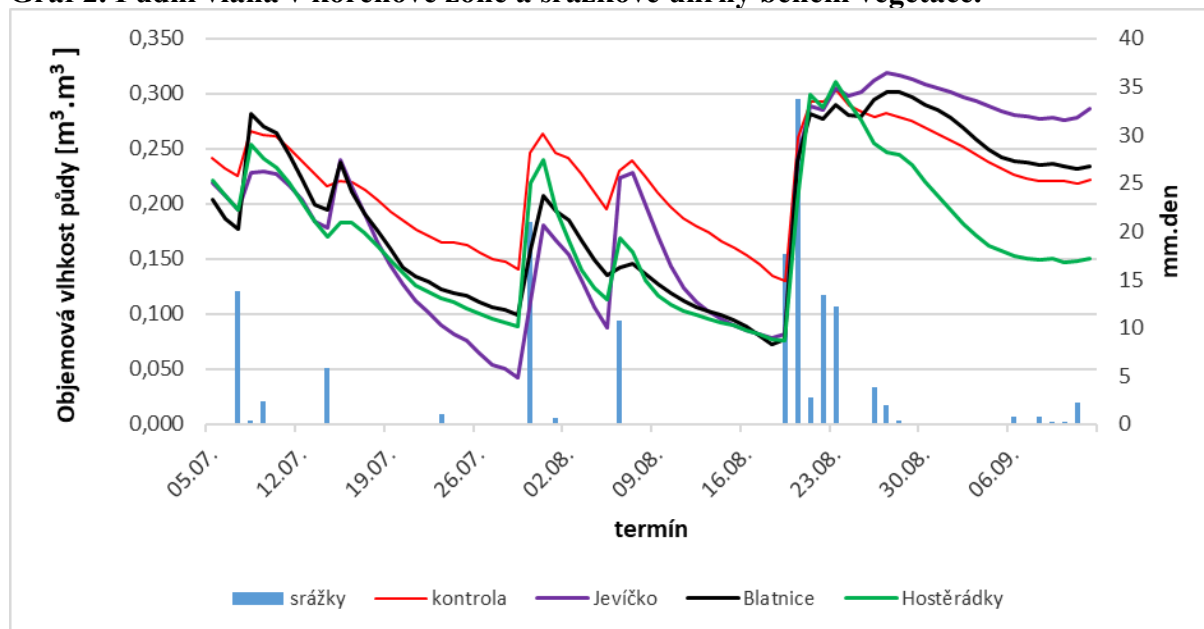
Měsíc	Teplota vzduchu (°C)			Srážky (mm)			Měsíční normál	
	Denní průměr	Min.	Max.	Suma	Počet dní se srážkami		Teplota (°C)	Srážky (mm)
					do 5 mm	nad 5 mm		
IV.	7,65	-1,7	22,5	28,8	11	3	9,97	26,9
V.	16,1	4,7	30,1	21,6	8	0	14,47	64,7
VI.	20,1	7,9	36,8	181,4	4	7	17,93	77,1
VII.	20,0	9,6	35,3	50,0	4	4	19,65	77,5
VIII.	20,3	10,3	34,9	94,4	5	5	19,25	70,8
IX.	13,6	3,3	27,3	76,4	10	6	14,39	48,4

**Graf 1. Výnos hlíz, poměr jejich velikostního zastoupení a chlorofyl v listech.**



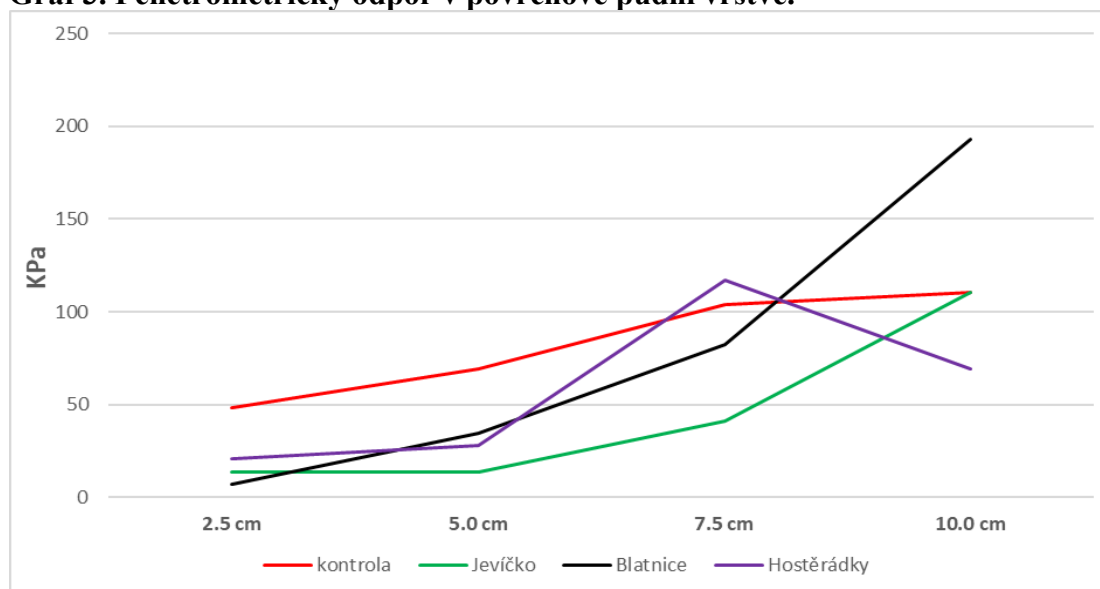
Z výsledků získaných z pozorování úrovně půdní vláhy vyplývá, že od období tuberizace (fáze objemového růstu hlíz, v případě pokusu červenec až srpen), byly nejnižší hodnoty půdní vláhy zaznamenávány u aplikace kompostu z Jevíčka (Graf 2). Následovaly parcely s dalšími komposty a nejvíce půdní vláhy bylo zaznamenáno u kontrolní varianty. Tento trend trval až do začátku 3 dekády měsíce srpna, kdy po delším období sucha přišly významnější srážkové úhrny (Graf 2), zde se trend obrátil ve prospěch variant s komposty (vyjma kompostu z Hostěrádek) a trval až do ukončení pokusu.

**Graf 2. Půdní vláha v kořenové zóně a srážkové úhrny během vegetace.**



Z pozorování utužení povrchové vrstvy půdy je patrné, že hodnoty odporu (do 7,5 cm) jsou u kontrolní varianty, oproti variantám s komposty, vyšší (Graf 3). To naznačuje příznivější stav půdy z hlediska tvorby hlíz, lepší schopnost infiltrovat srážky a zároveň horší podmínky pro tvorbu půdního škraloupu a pro celkové utužení půdy v hrúbku.

**Graf 3. Penetrometrický odpor v povrchové půdní vrstvě.**



## Diskuze

Ze získaných výsledků byl zjištěn pozitivní trend nárůstu konzumních hlíz u všech variant s kompostem, což je v souladu s výsledky pokusu Setiyo et al. (2016), kde měl kompost rovněž pozitivní vliv na výnos hlíz oproti kontrole. Pozitivní trend byl zaznamenán i pro poměr tvorby konzumních hlíz (nad 40 mm) na celkovém výnose u variant s komposty (vyjma kompostu z Jevíčka) proti kontrolním parcelám, obdobných výsledků dosáhli Halloran et al.

(2013). Výsledky dále naznačují vztah mezi chlorofylem v listech (SPAD) a působením kompostu na rostliny, kdy byly u rostlin na parcelách s kompostem hodnoty oproti hodnotám rostlin na kontrolních parcelách zvýšené, byť rozdíl byl nepatrný. K podobným výsledkům dospěla i práce Suruban et al. (2022), kde se ukázalo průkazné zvýšení chlorofylu u rostlin pěstovaných s pomocí kompostu. U výsledků z pozorování úrovně vláhy v půdě není přínos kompostu jednoznačný a po určitou část pokusu působil spíše protichůdně. V tříletém pokuse s mulči (Král et. al 2019) kompost aplikovaný jako mulč, půdní vláhu povrchové vrstvy (do 4 cm hloubky), ale i hlubších vrstev (do 20 cm) oproti neupravené kontrole zvyšoval. Výsledky se mohou rozcházet z více důvodů, a to těch, které počínají u typu použitého kompostu (a ty se mohou lišit) a končí u okolností, za jakých byl kompost aplikován (půdní vlaha, počasí) a jaké podmínky panovaly bezprostředně po aplikaci. Pokud jsou okolnosti nepříznivé, kompost může být snadno rozplaven (splaven) a za několik týdnů nemusí být už patrná jeho přítomnost. Naměřené hodnoty penetrometrického odporu naznačují pozitivní vliv kompostu na příznivý fyzikální stav půdy a snížení utužení povrchové vrstvy. Snížení penetrometrického odporu zaznamenal při použití kompostu v pokusech i Sullivan (2015).

### **Závěr**

Závěrem lze uvést, že získané výsledky polního pokusu s povrchovou aplikací kompostu jako mulče přinesly v jistém ohledu překvapivá zjištění. Z pohledu produkčních ukazatelů to bylo zvýšení výnosu hlíz při použití kompostu, na druhé straně sledování půdní vláhy vysvětlení pro toto zvýšení nepřineslo (alespoň v první polovině vegetace). Na základě těchto výsledků nelze jednoznačně tvrdit, že se přítomnost kompostu podílela na větším nárůstu hlíz prostřednictvím zvýšené úrovně půdní vláhy (jako u jiných obdobných pokusů). Na druhou stranu výsledky sledování utužení půdy v hrůbcích ukázaly příznivý vliv kompostu na pěstitelské podmínky. Pro lepší pochopení úlohy kompostu bude nutné v pokusech pokračovat. Jedině detailnější pozorování i v dalších pokusných letech, může přinést spolehlivé výsledky k objasnění působení kompostu ve formě mulče v půdě při pěstování brambor.

### **Literatura**

- Badalíková B. 2019. Význam hnojení kompostem. *Zemědělec* 18: 21-22.
- Edwards L. 2009. Biowaste usage for soil erosion control and soil physical improvement under potatoes (*Solanum tuberosum*) in Atlantic Canada. *Canadian Journal Soil Science* 90: 103-111.
- Fischer D, Glaser B. 2012. Synergisms between compost and biochar for sustainable soil amelioration. Pages 167-191 in Kumar S, Bharti A, editors. *Management of Organic Waste*. 9533079258
- Halloran JM, Larkin RP, DeFauw SL., Olanya OM, He Z. 2013. Economic potential of compost amendment as an alternative to irrigation in maine potato production systems. *American Journal of Plant Sciences* 4: 238-245.
- Král K, Dvořák, P, Capouchová I. 2019. The straw as mulch and compost as a tool for mitigation of drought impacts in the potatoes cultivation. *Plant, Soil and Environment* 65: 530-535.
- Setiyo Y, Gunadnya IBP, Gunam IBW, Permana DGM, Susrusa KB, Triani GAL. 2016. Improving physical and chemical soil characteristic on potatoes (*Solanum tuberosum* L.) cultivation by implementation of Leisa system. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9: 525–531.
- Sullivan DM, Bell N. 2015. Preplant compost application improves landscape plant establishment and sequesters carbon in compacted soil. *RAMIRAN 2015 – 16th International Conference*. <https://www.researchgate.net/publication/315075247>  
Rural-Urban Symbiosis, 8th – 10th September 2015, Hamburg, Germany

- Suruban Ch, Kader Md. A. Solaiman ZM. 2022. Influence of various composted organic amendments and their rates of application on nitrogen mineralization and soil productivity using chinese cabbage (*Brassica rapa*. L. var. *Chinensis*) as an indicator crop. *Agriculture*, 12: 201.
- Wilson C, Zebarth BJ, Burton DL, Goyer C, Moreau G, Dixon T. 2019. Effect of diverse compost products on potato yield and nutrient availability. *American Journal of Potato Research* 96: 272-284.

### **Poděkování**

Prezentovaná data vznikla díky podpoře a projektu NAZV QK22020032 Analýza a úpravy aplikačních schémat kompostů směřujících k posílení systému ochrany půdy v rámci stabilizace produkční schopnosti.

### **Kontakt:**

Ing. Martin Král, Ph.D.

ČZU

Kamýcká 129, Praha – Suchdol, 165 00

728528902, [kralmartin@af.czu.cz](mailto:kralmartin@af.czu.cz)

## Technologický postup sklizně vybraných odrůd luskovin pěstovaných na dvou lokalitách

Technological process of harvesting selected leguminous varieties grown at two locations

Loučka R.<sup>1</sup>, Jančík F.<sup>1</sup>, Homolka P.<sup>1</sup>, Jambor V.<sup>2</sup>, Dostálová R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves; <sup>2</sup>NutriVet s.r.o. Pohořelice;

<sup>3</sup>AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk

### Abstrakt

Hrách polní *Pisum sativum* L. byl pěstován na dvou stanovištích 2 roky s cílem získat informace o výživných hodnotách a vhodnosti termínu sklizně za účelem konzervace silážováním. První pokus proběhl v lokalitě Brťov u Velkých Opatovic. Byl zaměřen na získání informací o výživné hodnotě siláží. Silážována byla odrůda hrachu úponkového Gambit a pelušky Arvika. Lepší ukazatele kvality siláže a nejnižší ztráty byly dosaženy s hrachem Gambit. Arvika měla lepší biozplynovatelnost. Druhý pokus proběhl na pozemcích Agritec v Šumperku pokus se 7 odrůdami hrachu úponkového. Porovnávány byly s listovým hrachem Protecta a pelušky úponkového typu Turnia. Nejlepší výsledky byly s úponkovým hrachem odrůdy Gambit. Výživové hodnoty i výnosy hrachu listové odrůdy Protecta byly s úponkovým hrachem srovnatelné.

**Klíčová slova:** *Pisum sativum* L., chemické analýzy; siláž; ztráty; výnos; biozplynovatelnost

### Abstract

Field pea *Pisum sativum* L. was grown on two sites for 2 years with the aim of obtaining information on nutritional values and the suitability of the harvest date for conservation by ensiling. The first attempt took place in the locality of Brťov near Velké Opatovice. It was aimed at obtaining information on the nutritional value of silage. The Gambit semi-leafless and Arvika fodder pea variety were used as silage. Better silage quality indicators and lowest losses were achieved with Gambit peas. Arvika had better biogasification. The second experiment took place on the Agritec plots in Šumperk, an experiment with 7 varieties of semi-leafless pea. They were compared with the leaf pea Protecta and the semi-leafless type Turnia. The best results were with creeper peas of the Gambit variety. The nutritional values and yields of the pea variety Protecta were comparable to those of the semi-leafless pea.

**Keywords:** *Pisum sativum* L., chemical analyses; silage; losses; yield; biogasability

### Úvod

Národohospodářský význam jednoletých píceň není sice vzhledem k počtu zasetých hektarů výrazný, ale je významný. Na orné půdě mají nezastupitelné postavení. Je to jednak proto, že zajišťují požadované množství krmiv o dobré kvalitě pro hospodářská zvířata a jednak proto, že jsou významnou součástí vyvážených osevních postupů, které mají v systému rostlinné produkce rozhodující úlohu při zajišťování úrodnosti půdy biologickým způsobem. Luskoviny mají na následné plodiny příznivý efekt z důvodu fixace atmosférického dusíku, prokořnění půdy, vynášení živin ze spodních vrstev zpět do ornice, obohacení půdy humusem, rozšíření biodiverzity agro-ekosystému, navíc zvyšují jejich výnos i obsah bílkovin. Podle Lu et al. (2019) má hrách polní relativně nový typ rostlinných proteinů zahrnující globulin, albumin, prolamin a glutelin. Globulin a albumin jsou hlavními zásobními proteiny v semenech hrachu.

Výhody luskovin a jejich směsek s obilovinami (LOS), jakožto zdroje vysoce kvalitních krmiv, lze dosáhnout však pouze v případě, že z nich bude vyrobena kvalitní a zdravotně nezávadná siláž o vysoké nutriční hodnotě, a že u vyrobených siláží nutriční hodnota bude co nejpřesněji stanovena, a dále že tyto siláže budou dobře zařazeny do krmných dávek. Problém je v tom, že ti, kteří počítají návrhy krmných dávek pro skot mají jen zastaralé, nebo jen kusé informace o výživných hodnotách luskovin a LOS. To byl i důvod, proč vzniknul projekt NAZV QK21010344 „Domácí bílkovinné plodiny ve výživě skotu.“

V ČR je dominantní luskovinou hrách polní – *Pisum sativum L.*, který, pokud se sklízí v plné zralosti, se vyznačuje kulatými hladkými semeny a oválnými škrobovými zrny. Za účelem silážování se nyní více používá hrách úponkový (semi-leafless) než klasický hrách listového typu. Většinou se pěstují jako součást LOS. Komponenty do směsek je třeba volit podle stanovištních podmínek a požadavků ke zkrmování, přičemž musí být vývojově sladěny tak, aby v době jejich společné sklizně dosahovaly optimální píceňářskou zralost. Výsevek jednotlivých komponentů je třeba sestavit podle jejich konkurenčních i podpůrných vztahů.

Samostatný úponkový hrách se jako monokultura vysévá v dávce 250 až 300 kg/ha. Výhodou je jednoduchý způsob založení, na druhou stranu v první fázi růstu nevytváří dokonalé zastínění, a proto není vhodný do aridních oblastí. Při sklizni na vlhčích stanovištích hrozí nebezpečí vytahování rostlin i s kořeny, namísto čistého sečení. Nižší sklizňová sušina u této plodiny podmiňuje většinou nutnost dvoufázové sklizně. Je však třeba dát pozor, aby sušina řezanky nebyla příliš vysoká. Při sušině zhruba 30 % se hrách nezahřívá a zůstanou v něm beta-karoteny. Při vyšší sušině nad 35 % lze s velkou pravděpodobností předpokládat, že siláž bude mít velmi nízkou aerobní stabilitu a po otevření siláže bude plesnivět (zvláště při uskladnění ve vaku), protože i po fermentaci zůstává v siláži hodně cukrů. Princip výborného krmného účinku hrachové siláže je v tom, že není zkrmována zásobní bílkovina semene hrachu, ale celá rostlina, přičemž bílkoviny semene ve voskově-mléčné zralosti jsou funkční, nikoliv zásobní a siláž se vyznačuje i vysokou chutností.

Hlavním cílem předložené studie bylo porovnat mezi sebou vybrané odrůdy hrachu úponkového a pelušky podle skladby živin a vhodnosti pro sklizeň na siláž. Z Metodiky ÚKZÚZ pro zkoušky užitné hodnoty (ZUH), která platí s účinností od 1.8.2019 a byla aktualizována pro rok 2022 se informace o výživných hodnotách hrachu pro účely silážování nelze dočíst. Metodika je určena pro studium zrna hrachu. Podkladem pro zootechniky a krmiváře tak zůstává „Katalog krmiv VÚVZ Pohořelice“ z roku 1995 (Zeman a kol. 1995). V tomto katalogu je hrách veden jako silážovaná drť o obsahu sušiny 18 %, resp. obsahu vlákniny 22 % a stravitelných dusíkatých látek 13 % v sušině. Obsah škrobu není uveden vůbec. To jsou údaje pro sestavení krmné dávky pro vysokoužitkové dojnice nepoužitelné. Obdobné je to i pro bob.

## Metodika

V předložené studii byl hrách setý pěstován na dvou stanovištích 2 roky s cílem získat informace o výživných hodnotách a vhodnosti termínu sklizně za účelem konzervace silážováním.

V roce 2021 proběhl pokus na Šumpersku na poli VOS zemědělců, a.s., lokalita Brťov u Velkých Opatovic. Byl zaměřen na získání informací o výživné hodnotě siláží. Vedle úponkového hrachu Gambit a pelušky Arvika byly vzorky odebrány i od dvou odrůd bobu (Merkur a Mistral). Odrůdy byly předvedeny na Polním dnu. Odběr vzorků pro výrobu siláží proběhl 7. 7. 2021. Technologie pěstování a silážování je podrobně popsána v publikaci Loučka a Tyrolová (2013). Píceňiny byly silážovány do speciálních nádob. Do nádob bylo udusáno 10 kg řezanky (o délce v průměru 25 mm, zatíženo 10 kg závažím a anaerobně zakryto). Řezanka byla silážována bez aditiv. Po 90 dnech byly nádoby otevřeny a bezprostředně po tom byly u



siláží uskutečněny chemické analýzy podle AOAC (2005) v agrolaboratoři NutriVet s.r.o. v Pohořelicích. Stravitelnost in vitro byla stanovena po 24 hodinách inkubace, NEL a NEV byly vypočteny podle metody Van Es (1978). Potenciál pro produkci mléka byl vypočten podle MILK 2006 (Schwab et al. 2003). Metan byl stanoven podle metodiky Mayer et al. (2014).

V roce 2022 byl pokus opakován také na Šumpersku na poli VOS zemědělců, a.s. u Velkých Opatovic. Zasety byly odrůdy úponkového hrachu Gambit, Avatar a Protecta, pelušky Arvika a dvou odrůd bobu (Merkur a Mistral). Opět byly odrůdy předvedeny na Polním dnu (28. 6. 2022). V ten den byly pořízeny fotografie porostů. Těsně před odběrem vzorků za účelem silážování však byly porosty úplně zničeny přívalem krup.

Hlavní pokus proběhl v roce 2022 na pozemcích firmy Agritec v Šumperku. Ze 14 odrůd hrachu úponkového bylo vybráno 7 z nich, které by mohly být vhodné pro silážování (Gambit, Impuls, Trendy, Avatar, Saxon, Protin, Atoll). K nim byly přiřazeny listový typ Protecta a peluška úponkového typu Turnia. Charakteristika jednotlivých odrůd je v tab. 11. Sklizeň na zrno proběhla 29. 7. 2022.

Polní pokus s odrůdami hrachu byl vyšetřován na lokalitě Šumperk maloparcelkovým secím strojem HEGE ve třech opakováních. Během vegetace byl pokus ošetřen registrovanými herbicidy proti jednoděložným a dvouděložným plevelům. Před květem byl aplikován i insekticid proti mšicím a preventivně proti zrnokazovi.

Během vegetace byla prováděna běžná fenologická hodnocení (vzcházení, začátek a konec kvetení, zralost). Byly hodnoceny délky rostlin, výška porostu a poléhání. Byla porovnána úroveň zdravotního stavu – choroby a škůdci. Technologie pěstování je podrobně popsána v publikaci Metodiky pro pěstitelskou praxi hrách, kterou vydalo v roce 2007 MZE z podkladů Asociace pěstitelů a zpracovatelů luskovin (APZL).

Odběr vzorků byl proveden ve dvou termínech 11. 7. a 26. 7. 2022. Veškeré chemické analýzy opět proběhly v agrolaboratoři NutriVet s.r.o. v Pohořelicích.

K vyhodnocení výsledků byl použit program Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Vzhledem k porovnávaným faktorům byl v pokusech v lokalitě Velké Opatovice použit Tukeyho test HSD na hladině významnosti  $P < 0,05$ , a v lokalitě Šumperk analýza rozptylu (ANOVA) s vícerozměrným designem.

## Výsledky a diskuze

### Pokus v lokalitě Velké Opatovice

Porovnání výsledků chemických analýz čerstvé řezanky a siláží je v tab. 1. Nižší obsah sušiny u siláží, než u řezanky, ukazuje na vyšší ztráty, což potvrdily výsledky v tab. 2. Ztráty sušiny silážováním byly poměrně vysoké (mezi 18,3 a 26,4 %), ale ne statisticky významné mezi pícninami. V chemických analýzách siláží (tab. 3) nebyly statisticky významné rozdíly mezi hrachem úponkovým a peluškou v žádném ukazateli. Hrachové siláže měly méně acido detergentní vlákniny (ADF) než siláže bobu. Co se týče výživné hodnoty (tab. 4), tak hrachové siláže měly vyšší energetickou hodnotu než siláže bobu. Produkce metanu byly nejnižší u úponkového hrachu. Ukazatele fermentace (tab. 5) mezi hrachem úponkovým a peluškou nebyly statisticky významné, významné byly pouze rozdíly mezi silážemi hrachů a bobu. Siláže hrachů měly vyšší obsahy kyseliny mléčné, vyšší poměr kyseliny mléčné k těkavým mastným kyselinám a nižší obsahy čpavkového dusíku než siláže bobů.

Výsledky lze porovnat s těmi, které získali Loučka a Tyrolová (2013). Bezlistový hrách Concorde s výsevkem 220 kg/ha pěstovali a sklízeli na účelovém hospodářství VÚŽV v.v.i. Praha Uhřetěves v Netlukách. Hrách byl sklizen ve třech termínech (první 24. 6., druhý 30. 6. a poslední 7. 7.), přičemž ten prostřední se ukázal z pohledu vhodnosti pro silážování jako nejlepší. Z výsledků byl patrný klasický trend, kdy se stárnutím rostliny sice stoupá obsah sušiny, ale klesá obsah dusíkatých látek a vzrůstá obsah vlákniny. Rovněž cukry, jejichž obsah

je důležitý pro správný fermentační proces, s fyziologickým stárnutím rostliny pozvolna klesají. Termín sklizně píce ve Velkých Opatovicích byl sice 7. 7. 2021, tedy později než v Uhřetěvsi, ale to je dáno i polohou, kdy Velké Opatovice leží na Šumpersku, což již lze považovat na podhůří. Odpovídají tomu i obsahy sušiny a živin sledované píce.

Bohužel, pokus v roce 2022 se nepodařilo sklidit, protože těsně před sklizní porosty zcela zničily kroupy. Existují z toho jen fotografie.

Tab. 1: Chemické analýzy původní hmoty a siláží

Index	Původní hmota	Siláž	SEM
Sušina g/kg	193 <sup>b</sup> ± 51,5	158 <sup>a</sup> ± 45,9	4,00
N-látky g/kg s.	184 <sup>b</sup> ± 43,2	163 <sup>a</sup> ± 37,6	2,80
Škrob g/kg s.	114 ± 37,5	112 ± 76,5	10,0
Hrubá vláknina g/kg s.	202 <sup>a</sup> ± 14,7	232 <sup>b</sup> ± 34,7	5,30
ADF g/kg s.	268 <sup>a</sup> ± 32,3	310 <sup>b</sup> ± 56,7	5,90
NDF g/kg s.	387 ± 45,5	377 ± 41,4	5,50
Popel g/kg s.	80,6 ± 16,2	131 ± 15,9	29,0
Cukry g/kg s.	75,4 <sup>b</sup> ± 28,9	31,6 <sup>a</sup> ± 19,4	2,90

ADF = acido detergentní vláknina; NDF = neutrálně detergentní vláknina; ± = směrodatná odchylka; v řádcích písmena (<sup>a,b</sup>) v horním indexu čísel značí statistickou významnost  $P < 0,05$

Tab. 2: Ztráty sušiny silážováním

ZTRÁTY	Bob Merkur	Bob Mistral	Peluška Arvika	Hrách Gambit
%	26,4	22,7	21,4	18,3
sd	1,59	0,05	7,23	10,1

sd = směrodatná odchylka; v řádcích písmena (<sup>a,b</sup>) v horním indexu čísel značí statistickou významnost  $P < 0,05$

Tab. 3: Chemické analýzy siláží luskovin

Siláž	Bob Merkur	Bob Mistral	Peluška Arvika	Hrách úponkový Gambit
Sušina g/kg	118 <sup>a</sup>	123	146	172 <sup>b</sup>
N-látky g/kg s.	197 <sup>b</sup>	190 <sup>b</sup>	180	147 <sup>a</sup>
Škrob g/kg s.	827	21,4 <sup>a</sup>	106	157 <sup>b</sup>
Hrubá vláknina g/kg s.	236	237	272	198
ADF g/kg s.	371 <sup>b</sup>	369 <sup>b</sup>	296 <sup>a</sup>	263 <sup>a</sup>
NDF g/kg s.	423 <sup>b</sup>	396	357	320 <sup>a</sup>
Popel g/kg s.	1,4	122	285	69,2
Cukry g/kg s.	17,7	12,9	33,7	32,0

ADF = acido detergentní vláknina; NDF = neutrálně detergentní vláknina; sd = směrodatná odchylka; v řádcích písmena (<sup>a,b</sup>) v horním indexu čísel značí statistickou významnost  $P < 0,05$

Tab. 4: Výživné hodnoty hrachu a pelušky ve dvou odběrech, včetně obsahu metanu, resp. informaci pro bioplynové stanice

Siláž	Bob	Bob	Peluška	Hrách
	Merkur	Mistral	Arvika	úponkový Gambit
SVI24	47,6	39,7	27,3	37,9
sd	4,63	3,02	19,07	2,93
SOH24	67,2	53,1	70,2	70,8
sd	4,02	41,88	3,01	2,87
NEL	4,76 <sup>a</sup>	4,52 <sup>a</sup>	5,38 <sup>b</sup>	5,49 <sup>b</sup>
sd	0,17	0,12	0,24	0,11
Mléko	1503 <sup>a</sup>	1426 <sup>a</sup>	1695	1731 <sup>b</sup>
sd	52,1	37,0	75,2	33,2
Metan	462 <sup>b</sup>	443 <sup>b</sup>	444 <sup>b</sup>	389 <sup>a</sup>
sd	17,1	10,5	9,2	28,7

SVI24 = % stravitelnosti vlákniny za 24 hodin inkubace; SOH24 = % stravitelnosti organické hmoty za 24 hodin inkubace; NEL = netto energie laktace v MJ/kg sušiny; Mléko = potenciální produkce mléka v kg/t sušiny; Metan = změřená produkce metanu v kg/t sušiny; sd = směrodatná odchylka; v rádcích písmena (<sup>a,b</sup>) v horním indexu čísel značí statistickou významnost  $P < 0,05$

Tab. 5: Charakteristika výsledků fermentace siláží

Siláž	Bob	Bob	Peluška	Hrách
	Merkur	Mistral	Arvika	úponkový Gambit
pH	4,63 <sup>b</sup>	5,08 <sup>b</sup>	4,32	4,02 <sup>a</sup>
sd	0,14	0,16	0,47	0,16
KVV	1387	640	1104	1974
sd	271	547	487	274
KM	0,26 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	2,28 <sup>b</sup>	2,73 <sup>b</sup>
sd	0,07	0,14	0,68	0,50
TMK	1,35 <sup>b</sup>	1,21 <sup>b</sup>	0,91	0,63 <sup>a</sup>
sd	0,31	0,10	0,31	0,09
KM/TMK	0,20 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	2,80	4,45 <sup>b</sup>
sd	0,09	0,10	1,37	1,31
N-NH <sub>3</sub>	8,97	12,27 <sup>b</sup>	6,50 <sup>a</sup>	6,27 <sup>a</sup>
sd	1,17	0,32	1,36	1,23

KVV = kyselost vodního výluhu v g KOH/100 ml siláže; KM = kyselina mléčná v %; TMK = těkavé mastné kyseliny v %; N-NH<sub>3</sub> v mg N/100 g siláže; sd = směrodatná odchylka; v rádcích písmena (<sup>a,b</sup>) v horním indexu čísel značí statistickou významnost  $P < 0,05$

### Pokus s odrůdami hrachu v lokalitě Šumperk

Chemické analýzy hrachu úponkového, listového a pelušky z lokality Šumperk jsou v tab. 6., výživné hodnoty jsou v tab. 7. Významný rozdíl byl v obsahu sušiny mezi prvním a druhým odběrem. Při prvním odběru byl obsah sušiny u všech odrůd ještě pro silážování nízký, ale zvládnutelný s použitím vhodného silážního přípravku, nejlépe chemického na bázi kyseliny mravenčí. Ve druhém odběru, pouhých 14 dnů po tom prvním, však již byl obsah sušiny natolik

vysoký, že silážování takové hmoty by nebylo možné. Z toho vyplývá, že termín sklizně je nutné velmi pečlivě hlídat a včas porosty sklídit. To zdůrazňují např. Bal et al. (2000).

Významný rozdíl mezi úponkovým hrachem a ostatními typy hrachu byl v obsahu škrobu (v prvním odběru 245 vs. 214, resp. v druhém odběru 270 vs. 215 g/kg sušiny) a obsahu popelovin (v prvním odběru 58 vs. 71, resp. v druhém odběru 69 vs. 78 g/kg sušiny). Rozdíl mezi oběma odběry byl také v obsahu popelovin a ve stravitelnosti organické hmoty.

Chemické analýzy a výživné hodnoty jednotlivých odrůd hrachu (tab. 11) v prvním odběru jsou v tab. 8 a ve druhém odběru v tab. 9. Z pohledu výživné hodnoty i potenciální produkce mléka měla nejvyšší NEL nově vyšlechtěná odrůda Atoll, naopak nejméně NEL měla odrůda Protin. Pro využití v bioplynových stanicích se nejlépe hodí listový typ odrůdy Protecta z prvního odběru. Pro zpracování na siláž se nejlépe hodí odrůda úponkového hrachu Gambit nejen proto, že má v době první sklizně nejvyšší obsah škrobu, ale má příhodný poměr mezi NDF a ADF, což je hemicelulóza, která je při fermentaci silážováním lehce rozložitelná bakteriemi mléčného kvašení. Obsahy škrobu jsou v souladu se studií Dostálová a Horáček (2009).

Krátce po druhém odběru (29. 6. 2022) byly výnosy (tab. 10) při sklizni na zrno v rozmezí 3,86 a 5,25 kg na 10 m<sup>2</sup>, přičemž nejvyšší byl u odrůdy Saxon a nejnižší u odrůdy Impuls. Výnosy hrachu listové odrůdy Protecta byly s výnosy úponkového hrachu srovnatelné.

Tab. 6: Chemické analýzy hrachu a pelušky ve dvou odběrech (živiny v g/kg sušiny)

Index	HÚ		HLP		SEM			P-value		
	2. odběr	1. odběr	2. odběr	1. odběr	HÚ	HLP	O	D	O	D x O
Sušina g/kg	707,8	296,5	658,1	247,3	20,6	38,5	21,8	0,131	<b>0,001</b>	0,992
sd	73,9	38,0	2,2	1,3						
NL	162,1	133,8	150,9	147,0	5,78	10,81	6,13	0,911	0,084	0,182
sd	21,8	6,0	13,2	6,0						
Tuk	18,1	32,5	24,6	30,5	3,40	6,35	3,60	0,664	0,067	0,416
sd	3,8	12,0	1,8	13,5						
HV	198,3	221,7	189,4	206,6	7,68	14,4	8,15	0,312	0,100	0,793
sd	27,6	8,3	27,9	3,5						
NDF	392,5	403,1	385,9	382,4	21,8	40,7	23,1	0,682	0,914	0,833
sd	82,6	24,1	40,0	20,4						
ADF	279,9	285,9	258,8	277,0	16,1	30,1	17,0	0,543	0,623	0,804
sd	62,1	17,1	9,6	16,8						
Škrob	269,7	244,6	214,7	213,7	9,9	18,6	10,6	<b>0,012</b>	0,397	0,435
sd	37,7	13,8	6,6	2,6						
Popel	68,9	58,4	77,7	71,5	1,62	3,03	1,72	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	0,401
sd	4,62	3,86	4,38	4,45						

HÚ = Hrách úponkový; HLP = hrách listový a peluška; D = druh pícniny; O = pořadí odběru; NL= N-látky; HV = hrubá vláknina; ADF = acido detergentní vláknina; NDF = neutrálně detergentní vláknina; sd = směrodatná odchylka; P-value = vícerozměrná analýza

Tab. 7: Výživné hodnoty hrachu a pelušky ve dvou odběrech, včetně obsahu metanu, resp. informaci pro bioplynové stanice

Index	HÚ		HLP		SEM			P-value		
	2. odběr	1. odběr	2. odběr	1. odběr	HÚ	HLP	O	D	O	D x O
SVI	45,8	38,6	41,7	45,1	3,03	5,67	3,21	0,79	0,687	0,268
sd	6,88	7,47	14,22	8,86						
SOH	70,7	64,9	71,2	67,5	1,10	2,05	1,16	0,37	<b>0,012</b>	0,522
sd	3,17	2,56	4,29	0,06						

NEL	5,71	5,50	5,57	5,63	0,07	0,14	0,08	0,90	0,504	0,237
sd	0,15	0,19	0,36	0,19						
Mléko	1803	1737	1755	1775	23,1	43,3	24,5	0,89	0,522	0,231
sd	46,2	61,8	114,5	60,5						
Metan	398	412	393	413	11,1	20,8	11,8	0,88	0,338	0,860
sd	29,2	27,9	3,16	48,0						

HÚ = Hrách úponkový; HLP = hrách listový a peluška; D = druh píce; O = pořadí odběru; SVI24 = % stravitelnosti vlákniny za 24 hodin inkubace; SOH24 = % stravitelnosti organické hmoty za 24 hodin inkubace; NEL = netto energie laktace v MJ/kg sušiny; Mléko = potenciální produkce mléka v kg/t sušiny; Metan = změřená produkce metanu v kg/t sušiny; sd = směrodatná odchylka; P-value = vícerozměrná analýza

Tab. 8: Chemické analýzy a výživné hodnoty odrůd hrachu v prvním odběru

Index	Gambit	Impuls	Trendy	Avatar	Saxon	Protin	Atoll	Protecta	Turnia
Sušina	250,6	284,3	374,8	281,5	290,8	301,2	292	248,2	246,4
NL	141,8	129,9	130,2	133,2	142,4	126,9	132,2	151,2	142,7
Tuk	29,5	42	41,1	41,1	17,9	14,5	41,1	40	20,9
HV	210,7	214,1	224,1	222,4	228	235	217,7	209	204,1
NDF	382,4	376,1	417,3	407	380,4	439,9	418,5	368	396,8
ADF	266,1	260,3	310,4	290,2	292,9	290,6	291,1	265,1	288,9
Škrob	268,8	246,7	243,9	224,2	238,4	238,3	252,2	211,8	215,5
Popel	57,1	63,1	61	57,2	61,6	57,4	51,6	68,3	74,6
SVI24	39,83	30,4	42,17	39,76	39,1	28,42	50,78	51,37	38,84
SOH24	66,84	64,09	62,31	64,95	66,51	61,2	68,36	67,55	67,47
NEL	5,59	5,3	5,55	5,52	5,5	5,24	5,83	5,76	5,49
Mléko	1764	1672	1750	1742	1735	1653	1840	1818	1732
Metan	412	430	424	435	386	362	435	446	379

Legenda viz tabulky 6 a 7

Tab. 9: Chemické analýzy a výživné hodnoty odrůd hrachu ve druhém odběru

Index	Gambit	Impuls	Trendy	Avatar	Saxon	Protin	Atoll	Protecta	Turnia
Sušina	738,4	599,0	804,6	718,6	659,0	780,4	654,7	659,6	656,5
NL	193,7	163,2	156,4	130,0	186,5	152,3	152,5	141,6	160,2
Tuk	15,2	16,8	17,2	15,9	15,9	19,4	26,1	25,9	23,3
HV	182,6	205,7	193,7	157,0	185,7	240,0	223,7	209,1	169,6
NDF	329,6	313,8	408,3	412,0	341,9	558,5	383,3	414,1	357,6
ADF	236,6	221,3	373,8	272,0	237,8	361,5	256,4	265,6	252,0
Škrob	321,7	272,9	292,1	250,1	299,9	219,2	231,7	219,4	210,0
Popel	61,4	70,1	70,9	73,2	69,7	63,6	73,3	74,6	80,8
sVI24	39,77	59,02	48,6	38,42	46,28	45,54	42,62	31,68	51,79
sOH24	75,04	73,6	69,84	68,11	72,91	66,48	68,96	68,13	74,19
NEL	5,71	5,97	5,77	5,68	5,76	5,6	5,51	5,31	5,82
Mléko	1 800	1 884	1 820	1 793	1 818	1 768	1 738	1 674	1 836
Metan	431	400	389	339	417	404	409	391	395

Legenda viz tabulky 6 a 7

Tab. 10: Výnosy odrůd hrachu (kg/10 m<sup>2</sup>) po druhém odběru při sklizni na zrno

Index	Gambit	Impuls	Trendy	Avatar	Saxon	Protin	Atoll	Protecta	Turnia
Výnos	4,51	3,86	4,93	4,74	5,25	4,83	4,84	4,25	4,91

Tab. 11: Základní charakteristiky použitých odrůd v Šumperku

Index	Gambit	Impuls	Trendy	Avatar	Saxon	Protin	Atoll	Protecta	Turnia
Růstový typ	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	LT	SF
Barva květu	bílá	bílá	bílá	bílá	bílá	bílá	bílá	bílá	fialová
Barva semene	žlutá	zelená	žlutá	žlutá	žlutá	žlutá	zelená	žlutá	hnědá
Obsah N-látek	23,4	23,2	22,5	23,5	23,0	23,2	22,4	23,5	22,7
TIA (TIU/mg)	3,7	4,4	5,2	2,9	4,5	3,9	3,8	3,2	4,9

SF = semi-leafless úponkový; LT = listový; TIA = inhibitor trypsinu

### Závěr

V oblasti Šumperska je vhodná doba pro sklizeň na začátku července. Z obou pokusů vyplynulo, že pro silážování byl nejvíce vhodný hrách úponkový odrůdy Gambit zejména proto, že při silážování měl nejnižší ztráty. Výživové hodnoty i výnosy hrachu listové odrůdy Protecta byly s úponkovým hrachem srovnatelné.

Vzhledem k problémům s počasím je nutné pokusy opakovat, zaměřit se na zpracování osvědčených odrůd na siláže, eventuálně založit pokus také na LOS, protože je-li hrách sklizen pro silážování ve vhodném stádiu, nedosahuje potřebný obsah sušiny a dvoufázová sklizeň není vhodná (obtížné zavádění a většinou i vyšší obsah popelovin).

### Literatura

- AOAC – Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 18th ed. Washington, DC: AOAC International; 2005.
- Bal MA, Shaver RD, Shinnors KJ, Coors JG, Lauer JG, Straub RJ, Koegel RG. Stage of maturity, processing, and hybrid effects on ruminal in situ disappearance of whole-plant corn silage. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2000 July 31;86(1-2):83-94.
- Dostálová R. a Horáček J. Sledování změn obsahu škrobu a rezistentního škrobu u hrachu *Chem. listy*. 2009;103:753-782.
- Loučka, R. a Tyrolová Y. Správná praxe při silážování hrachu. *Certifikovaná metodika MZe*, 2013, 29 s.
- Lu ZX, He JF, Zhang YC, Bing DJ. Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019:1-12.
- Mayer, F., Gerin, P.A., Noo, A., Foucart, G., Flammang, J., Lemaigre, S., Sinnaeve, G., Dardenne, P., Delfosse, P. Assessment of factors influencing the biomethane yield of maize silages. *Bioresour. Technol.* 2014;153:260–268.
- Schwab EC, Shaver RD, Lauer JG, Coors JG. Estimating silage energy value and milk yield to rank corn hybrids. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2003 Oct;109:1-18.
- Van Es AJH. Feed evaluation for ruminants. I. The systems in use from May 1977-onwards in The Netherlands. *Livestock Prod. Sci.* 1978 Oct;4:331-345.
- Zeman L. a kol. Katalog krmiv. VÚVZ Pohořelice, 1995, 465 s.

### Poděkování

Príspevek vzniknul díky podpory projektu NAZV QK21010344.

### Kontakt:

Ing. Radko Loučka, CSc.  
 Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.  
 Práteleství 815, 104 00 Praha Uhřetěves  
 Telefon 731650836, e-mail: [loucka.radko@vuzv.cz](mailto:loucka.radko@vuzv.cz)

## Vliv výše výsevu na výnos semen jílku mnohokvětého jednoletého

### Effect of Sowing rate on Seed Yield of Annual Ryegrass

Macháč R.<sup>1</sup>, Petřeková H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., <sup>2</sup>OSEVA PRO s.r.o.

#### Abstrakt

V českém travním semenářství jsou obecně používány vyšší výsevní množství, než je to obvyklé v zemích s vysokou úrovní pěstování trav na semeno. Cílem této práce bylo ověření možností snížení výsevků jílku mnohokvětého jednoletého v podmínkách českého zemědělství. V dvouletých polních pokusech byl sledován vliv výše výsevu na výnos semen jílku mnohokvětého jednoletého a výnosové parametry. V průměru byl nejvyšší výnos semen dosažen u varianty s výsevku 6 MKS, což koresponduje s výsevním množstvím běžně užívaným v českém travním semenářství. U této varianty byla zaznamenána i nejvyšší HTS. U počtu plodných stébel byly v obou vláhově rozdílných letech u jednotlivých variant zaznamenány rozdíly ve výsledcích jednotlivých pokusných let. V pokusech se bude dále pokračovat, aby se získaly výsledky z více let.

**Klíčová slova:** trávy, semenářství, MKS

#### Abstract

In the Czech grass seed production are generally used higher seed rates, than is that a usual in countries with high level of grass seed production. Main goal those work was to verification of possibilities for reduction of Annual ryegrass sowing rate in Czech agriculture. In two - year field trials we evaluated influence of sowing rate on Annual ryegrass seed yield and yield characteristics. On average, the highest seed yield was achieved at variant with seed rate 6 millions of pure live seeds (PLS), which correspond with seed rates currently used in Czech grass seed practices. The variant with 6 PLS showed also highest Thousand seed weight. The number of fertile stems were in both humidity different years in some variants different. Trial will be continued to obtaining more results from different years.

**Keywords:** grass, seed production, pure live seed

#### Úvod

Jílek mnohokvětý jednoletý (*Lolium multiflorum* Lam. var. *westervoldicum*) je jedním z nejčastěji pěstovaných travních druhů v České republice. Jeho výměra se pohybuje mezi 1.300 až 2.400 ha, přičemž průměrná výměra za posledních 10 let činí 1.624 ha. Tím se řadí na druhé místo těsně za jílek mnohokvětý italský (Cagaš, 2022). Osivo jílku mnohokvětého je významným exportním artiklem, v průměru se vyváží 88 % domácí produkce (Macháč, 2021). Jedná se o tzv. zahraniční množení, kdy je do České republiky dovezeno osivo vyšších stupňů, které je použito pro založení semenářských porostů, z kterých se produkce osiv odveze zpět k zahraničnímu partnerovi. Tito partneři často upozorňují na skutečnost, že výsevní množství používaná v ČR výrazně převyšují množství používaná v zahraničí na západ od našich hranic. Naši zemědělci se však ke snížení výsevního množství stavějí skepticky, přestože mají k dispozici kvalitnější techniku na přípravu půdy i setí než tomu bylo v minulosti. Použití nižších výsevních množství by navíc snížilo náklady na založení semenářských porostů, neboť cena výchozího osiva vyšších stupňů několikanásobně převyšuje cenu, za kterou zemědělci prodávají sklizenou produkci. Na druhé straně nemá pěstování trav na semeno v řadě podniku

prioritu a nejsou tak pro jejich pěstování vytvořeny optimální podmínky. Často nejsou dodrženy termíny setí a ošetřování, nebo nejsou použity doporučené dávky hnojení, případně nejsou některé doporučované úkony vůbec provedeny (např. ošetření před zimou). I toto jsou důvody, proč se v praxi nižší výsevni množství nepoužívají. Cílem této práce je ověřit možnosti snižování výsevniho množství jílku mnohokvětého jednoletého v podmínkách českého zemědělství.

## Materiál a metody

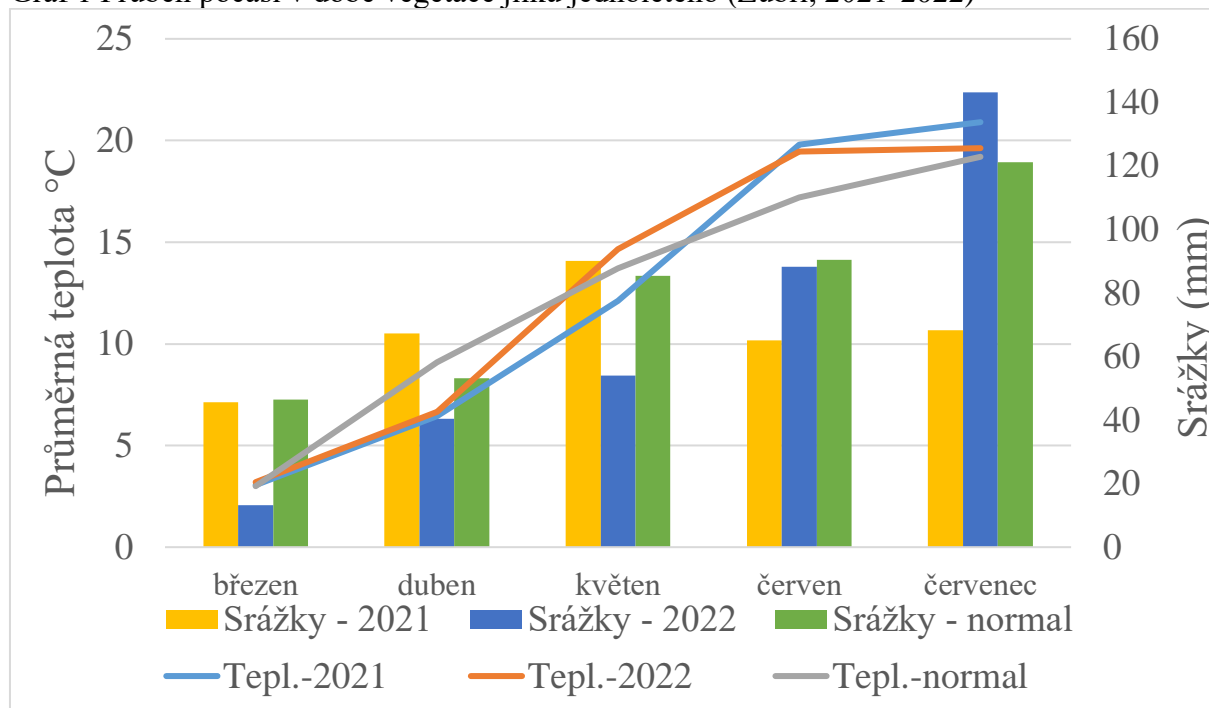
Polní maloparcelní pokusy byly provedeny v letech 2021-2022 na pozemcích Výzkumné stanice travinářské v Zubří. Charakteristiky stanoviště: nadmořská výška: 356 m, průměrná teplota: 7,5 °C, srážkový normál: 864 mm, půdní typ: luvizem oglejená, půdní druh: písčitohlinitá. Před setím bylo provedeno hnojení NPK v dávce ekvivalentní 60 kg dusíku na ha. Pokusné parcely byly sety přesným bezezbytkovým parcelním secím strojem Hege 80, agregovaným s traktorem vybaveným autopilotem pro přesné setí. Jílek byl vyséván do řádků 21 cm (6 řádků na parcelu), do hloubky 3 cm. Výsevky činily 3-8 MKS (viz tabulka 1). Pokus byl vyséván 28.3.2021, resp. 23.3.2022. Sklizňová velikost parcely činila 10 m<sup>2</sup>, všechny varianty byly ve 4 opakováních. V pokusech byla použita tetraploidní odrůda Demi. Po výsevu byl celý pokus přiválen cambridžskými válci. V období odnožování bylo provedeno přihnojení ledkem amonným s dolomitem v dávce 40 kg dusíku na ha. V období před počátkem sloupkování byly pokusy přihnojeny močovinou v dávce 20 kg dusíku na ha. Celková dávka dusíku činila 120 kg na ha. Na konci odnožování bylo provedeno ošetření proti plevelům přípravkem Mustang (2,4-D + florasulam) v dávce 0,6 l.ha<sup>-1</sup>. Vzhledem k nízkým srážkám i přísuškům ve vegetačním období nebyla provedena ochrana proti poléhání. Na počátku metání byl aplikován fungicid Amistar (azoxystrobin) v dávce 0,6 l.ha<sup>-1</sup> proti rzivostem. Aplikace pesticidů proběhla pomocí bezezbytkového přesného parcelního postřikovače Zems 09/00. Před sklizní byly odebrány vzorky plodných stébel pro stanovení počtu plodných stébel. Výmlat trav byl proveden přímou sklizní maloparcelní sklízecí mlátičkou Wintersteiger Elite (21.7.2021; 12.7.2022). Vymláčené osivo bylo šetrně dosušeno v komorové sušárně a následně vyčištěno na soustavě laboratorních čističek Westrup-Kamas. Z vyčištěného osiva byl stanoven výnos semen a odebrány vzorky pro stanovení kvalitativních parametrů. Výsledky byly statisticky analyzovány prostřednictvím programu Statistica 10 (Cochranův test, ANOVA, post hoc test dle Tukeye).

Tabulka 1 Použité výsevky a HTS osiva

varianta	MKS	2021	2022
		kg.ha <sup>-1</sup>	kg.ha <sup>-1</sup>
1	3	10,2	13,7
2	4	13,6	18,2
3	5	17,0	22,8
4	6	20,4	27,4
5	7	23,8	31,9
6	8	27,2	36,5
HTS (g)		4,18	4,32
MKS (kg)		3,40	4,56



Graf 1 Průběh počasí v době vegetace jílku jednoletého (Zubří, 2021-2022)



## Výsledky

Výnosy semen (obilek) jílku mnohokvětého jednoletého byly poznamenány průběhem počasí v obou sklizňových letech. Zatímco v roce 2021 byly poměrně příznivé vláhové podmínky pro vzcházení a také v době odnožování a sloupkování, tak v období kvetení a dozrávání se projevil výrazný nedostatek vláhy, znásobený vyššími teplotami. Naopak v roce 2022 byl zaznamenán nedostatek vláhy v době vzcházení až metání, naopak poměrně dobré vláhové podmínky byly v období kvetení a dozrávání (viz graf 1). Obecně byly dosažené výnosy dosti nízké a neodpovídaly produkční schopnosti jílku mnohokvětého jednoletého, při intenzivní agrotechnice.

V průměru byl nejvyšší výnos semen dosažen u varianty s výsevkem 6 MKS. U této varianty byl nejvyšší výnos dosažen v roce 2021, v roce 2022 to byl druhý nejvyšší výnos. Naopak nejnižší výnos byl v obou letech dosažen u varianty s výsevkem 3 MKS. Zajímavé je, že u varianty s výsevkem 7 MKS byl v roce 2021 zaznamenán téměř nejnižší výnos, zatímco v roce 2022 byl zde výnos nejvyšší. U ostatních variant byl výnos relativně stejný v obou letech. Rozdíly ve výnosu semen byly v obou pokusných letech statisticky vysoce významné. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Rovněž u hmotnosti tisíce semen byly nejvyšší hodnoty dosaženy u varianty s výsevním množstvím 6 MKS. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány pouze v roce 2021, resp. i u průměru obou let. U variant se sníženým výsevkem (3-5 MKS) byly zaznamenány vyšší hodnoty, než u variant s vysokými výsevky (7-8 MKS).

Velké rozdíly mezi výsledky obou pokusných let byly v počtu plodných stébel. Zatímco v roce 2021 byl nejvyšší počet plodných stébel zaznamenán u nejvyššího výsevku a s klesajícím počtem MKS klesal i počet plodných stébel, tak v roce 2022 byl nejvyšší počet stébel zaznamenán u varianty s výsevkem 4 MKS, následovaným 3 MKS. Rozdíly v počtu plodných stébel byly statisticky vysoce významné v obou pokusných letech.

Počet obilek na květenství byl v průměru statisticky významně vyšší u variant s vyšším výsevkem. Nicméně i zde byly zaznamenány rozdíly mezi variantami v jednotlivých pokusných letech.

Tabulka 2 Vliv výsevku na výnos semen (obilek), HTS a výnosotvorné prvky

Rok	MKS	Výnos semen			HTS		Počet plodných stébel		Počet obilek	
		kg.ha <sup>-1</sup>	T <sub>05</sub>	rel. (%)		T <sub>05</sub>	ks.m <sup>-2</sup>	T <sub>05</sub>	ks	T <sub>05</sub>
2021	3	927,9	c	100	3,93	bc	1339	c	16,2	c
	4	945,7	c	102	3,95	b	1345	c	15,6	c
	5	984,2	b	106	3,89	c	1373	c	18,9	b
	6	1078,9	a	116	4,00	a	1377	c	19,6	a
	7	927,9	c	100	3,83	d	1456	b	17,7	a
	8	974,9	b	105	3,79	d	1539	a	19,1	a
	ANOVA	<0,001			<0,001		<0,001		<0,001	
2022	3	1216,3	c	100	4,85	a	1356	b	22,5	c
	4	1217,5	c	100	4,85	a	1434	a	21,4	c
	5	1300,9	bc	107	4,81	a	1230	d	26,8	b
	6	1356,8	ab	112	4,91	a	1313	c	25,7	b
	7	1436,9	a	118	4,75	a	1260	d	29,3	a
	8	1270,4	bc	104	4,71	a	1259	d	26,2	b
	ANOVA	<0,001			0,478		<0,001		<0,001	
Průměr 21/22	3	1072,1	d	100	4,39	ab	1113	b	19,4	b
	4	1081,6	cd	101	4,40	ab	1177	a	18,5	b
	5	1142,5	bc	107	4,35	ab	1009	d	22,9	a
	6	1217,8	a	114	4,46	a	1077	c	22,6	a
	7	1182,4	ab	110	4,29	b	1034	d	23,5	a
	8	1122,7	bcd	105	4,25	b	1033	d	22,6	a
	ANOVA	<0,001			0,006		<0,001		0,003	

## Diskuze

Vyšší výsevky jsou obecně doporučovány u pících porostů jílku mnohokvětého (např. Venuto *et al.*, 2004, Harmer, 2015). Ovšem u porostů jílku na semeno se výsevní množství významně snižuje. Obecně zahraniční autoři používají k vyjádření výsevního množství hmotnostní veličiny, než počet milionů klíčivých semen. Např. Mellbye *et al.* (2011) doporučují u jílku jednoletého vysévat 17 lb osiva na akr, což je 19 kg na hektar. Při přepočtu na MKS osiva použitého v našich pokusech, by to činilo 5,5 MKS v roce 2021, ale jen 4,1 MKS v roce 2022. Nicméně jednotky MKS používají Koeritz *et al.* (2015) kteří referují, že u jílku vytrvalého je dosahováno stejného výnosu semen u výsevního množství 2,6 MKS jakožto i u výsevku vyšších (5,2, 7,8 nebo 10,4 MKS). V našich pokusech byl nejvyšší výnos jílku dosažen u výsevku 6 MKS, což bylo v průměru o 14 % více než u polovičního výsevku (3 MKS) a o 7 % více než u výsevku sníženého o 1 MKS. Dvouleté výsledky však nejsou pro tento typ výzkumu dostačující a bude potřeba v pokusech pokračovat. V žádném pokusném roce nebyly pro pěstování jílku jednoletého optimální vlhkostní podmínky, což se projevilo i rozdílnými výsledky, zejména u počtu plodných stébel. Zatímco v roce 2021 byly vhodnější podmínky pro vzcházení a odnožování, a v období kvetení a dozrávání přišly přísušky, tak v roce 2022 byly povětrnostní podmínky opačné. O vlivu průběhu počasí na produkci jílku jednoletého referují např. Chastain *et al.* (2017), kteří v devítiletém sledování zjistili, že nejvyšší výnosy jílku jednoletého byly dosaženy v letech, kdy byly v období duben-červen vyšší průměrné teploty (+1,2 °C) a nižší

srážky (o 48 mm). Toto do jisté míry koresponduje s průběhem počasí v roce 2022, kdy byly i na stanovišti v Zubří dosaženy vyšší výnosy než v roce předchozím, který byl v období duben-červen chladnější se srážkami na úrovni normálu. Nicméně v porovnání srážek a teplot v Oregonu (Willamette Valley) s podmínkami Zubří jsme tam hůře jak v teplotách, tak v ročním úhrnu i průběhu srážek. I toto může být důvodem, proč snížení výsevního množství jílku jednoletého nepřineslo dobré výsledky.

### **Závěr**

Výsledky dvouletých pokusů s využitím rozdílných výsevních množství jílku mnohokvětého jednoletého nepřinesly jednoznačné výsledky. Nejlepší výsledky byly dosaženy u výsevního množství 6 MKS, což je množství obecně doporučované v našich podmínkách, ale je významně vyšší, než je používané v semenářsky vyspělých zemích. Nicméně v obou pokusných letech nebyly pro pěstování jílku jednoletého optimální vlhkostní podmínky a proto bude vhodné v pokusech pokračovat i v dalších letech.

### **Poděkování**

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení projektu DKRVO MZE-RO1818

## Literatura

- Cagaš B. 2022: Produkce osiv trav a jetelovin v České republice v roce 2020. *Pícninářské listy 2022*. Agriprint Olomouc, s. 4-8.
- Harmer, M. 2015: Optimising Italian ryegrass sowing rates. In Building Productive, Diverse and Sustainable Landscapes, 17th Australian Agronomy Conference, 20-24 September 2015, Hobart, Australia. Conference Proceedings. s. 302-305.
- Chastain T.G., Garbacik C.J., Young III W.C. 2017: Tillage and establishment system effects on annual ryegrass seed crops. *Field Crops Research*, 209, 144-150.
- Koeritz E.J., Watkins E., Ehlke N.J. 2015: Seeding rate, row spacing, and nitrogen rate effects on perennial ryegrass seed production. *Crop Science*, 55(5), s. 2319-2333.
- Macháč J. 2021: Vývoj exportu a importu osiv trav a jetelovin za poslední dva roky. *Pícninářské listy 2021*. Agriprint Olomouc, s. 14-15.
- Mellbye M.E., Young III W.C, Garbacik C.J. 2011: Long-term evaluation of Annula ryegrass cropping system for seed production. *Seed Production Research* 1.
- Venuto B.C., Redfearn D.D., Pitman W.D., Alison M.W. 2004: Impact of seeding rate on annual ryegrass performance. *Grass and Forage Science*. 59, p.8-14.

## Kontakt:

Ing. Radek Macháč, Ph.D.

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Hamerská 698, 756 54 Zubří

telefon 571 658 294, e-mail [machac@oseva.cz](mailto:machac@oseva.cz)

## Vliv různých technologií zpracování půdy na emise CO<sub>2</sub>

Effect of different soil tillage practices on CO<sub>2</sub> emissions

Mühlbachová G., Růžek P., Kusá H.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně

### Abstrakt

Emise CO<sub>2</sub> jsou jedním ze skleníkových plynů významně ovlivňujících změnu klimatu. Omezené postupy zpracování půdy mohou přispět ke snížení emisí CO<sub>2</sub> z půdy. Vliv zpracování půdy s různým zapracováním slámy na emise CO<sub>2</sub> byl v letech 2020 a 2022 sledován v polních pokusech po sklizni pšenice ozimé. Varianty pokusů byly následující: 1) podmítka do 10-12 cm, 2) mělká podmítka (hloubka 5-6 cm), 3) mulčování slámou, 4) strniště. Teplota půdy a emise CO<sub>2</sub> byly nejvyšší po podmítce do 10-12 cm a dále klesaly v pořadí > mělká podmítka ≥ strniště ≥ mulč. Podmítka v letním období může výrazně zvýšit emise CO<sub>2</sub> z půdy, zejména za teplého počasí, kdy průměrné denní teploty překročí 20°C. Dalšími důležitými faktory kromě hloubky zpracování půdy a manipulace s posklizňovými zbytky jsou pro emise CO<sub>2</sub> z půdy aktuální povětrnostní podmínky, především teploty vzduchu a půdy a srážky.

**Klíčová slova:** Podmítka; Mulč; Strniště; Počasí; Oxid uhličitý

### Abstract

CO<sub>2</sub> emissions represent one of greenhouse gases significantly affecting the climate change. Reduced tillage practices can contribute to mitigation of CO<sub>2</sub> emissions from soils. The effect of tillage practices with different straw incorporation on CO<sub>2</sub> emissions was studied in field experiments in the years 2020 and 2022. Treatments were: 1) chiselling to 10-12 cm, 2) shallow chiselling (5-6 cm depth), 3) straw mulch, 4) stubble. The soil temperature and CO<sub>2</sub> emissions decreased in following order: chiselling to 10-12 cm > shallow chiselling ≥ stubble ≥ mulch. Chiselling in the summer season significantly increases CO<sub>2</sub> emissions from the soil, mainly in warm weather, when average daily temperatures exceed 20°C. Other important factors for CO<sub>2</sub> emissions others as soil tillage and handling of postharvest residues are current weather conditions, air and soil temperatures and precipitation.

**Keywords:** Chiselling; Mulch; Stubble; Weather; Carbon dioxide

### Úvod

Pokračující změny klimatu, častější období sucha, nepravidelné srážky a zvyšující se teploty přináší nové problémy při zpracování půdy, které by při správném použití měly zmírňovat ztráty organické hmoty v půdě a udržovat přijatelné výnosy plodin. Klasické zpracování půdy, jako je orba, hlubší podmítka nebo diskování, podporuje ztrátu organické hmoty v půdě v důsledku značného množství emisí CO<sub>2</sub> do atmosféry a vede k následným problémům, jako je narušení půdních agregátů nebo zvýšená eroze půdy (Melero et al. 2009). Emise CO<sub>2</sub> z půdy představují významnou součást koloběhu uhlíku v suchozemských ekosystémech a postupy zpracování půdy mohou ovlivnit emise CO<sub>2</sub> z půdy (Dong et al. 2017). V souvislosti se změnou klimatu je proto důležité sledovat vliv zemědělských činností a ponechání posklizňových zbytků na poli na obsah uhlíku, vlhkost, teplotu a emise CO<sub>2</sub> v půdě a jejich vzájemné interakce (Chi et al. 2017; Feiziene et al. 2012; Dong et al. 2017). Vhodné způsoby zpracování půdy proto mohou zvýšit obsah uhlíku v zemědělské půdě a pomoci snížit emise CO<sub>2</sub>. Curtin et al. (1998, 2000) ukázali, že sláma zbývající na povrchu půdy snížila asi 5krát emise CO<sub>2</sub> ve srovnání se zapracováním slámy při konvenčním zpracování půdy. Zpracování půdy v létě se provádí před

setím plodin vyžadujících časné setí (např. řepka olejná). Teploty přesahující 20-25 °C v denním průměru a 30 °C odpoledne jsou často naměřeny v letním období a podporují vyšší emise CO<sub>2</sub>. V tomto případě může použití mulčovacích zbytků ponechaných na povrchu půdy pozitivně ovlivnit různé aspekty osevního systému, jako je zvýšení infiltrace vody v důsledku snížení odtoku, snížení eroze půdy, zvýšení retence vlhkosti, kontrola a snížení teploty půdy v létě (Mancinelli et al. 2015).

Cílem výzkumu proto bylo zhodnotit vliv různých postupů zpracování půdy prováděných po sklizni obilovin na teplotu půdy, vlhkost a emise CO<sub>2</sub> z půdy.

## **Materiály a metody**

Polní pokusy, ve kterých byly zjišťovány emise CO<sub>2</sub> při různém zpracování půdy, byly provedeny ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze – Ruzyni, Česká republika (50,0891708 N, 14,2964372 E, nadmořská výška = 340 m; typ půdy = illimerizovaný luvisol, Corg = 1,25 %; obsah jílnatých částic = 29,3 %). Třicetiletý roční průměr srážek byl 513 mm, průměrná roční teplota vzduchu 9,0 °C. Na začátku pokusů byly vytvořeny pásy (50 x 6 m) pro každou technologii zpracování půdy. Pro měření byla zvolena střední část každého pásu o délce 25 m. Technologie zpracování byly následující: hlubší podmítka (10-12 cm), mělká podmítka (5-6 cm), mulč se slámou na povrchu půdy a strniště se slámou. Zpracování půdy nebo mulčování bylo provedeno 7.8. 2020 a 29.7. 2022. Veškerá sklizená sláma byla v pokusu použita podle technologie zpracování půdy.

Denní teploty vzduchu a srážky byly měřeny meteorologickou stanicí Výzkumného ústavu rostlinné výroby. Teploty půdy byly měřeny ve třech opakováních pomocí Tinytag Talk 2 Data Loggers (Chichester, Velká Británie) v hloubce 5 cm. Objemová vlhkost půdy byla stanovena do hloubky 12 cm pomocí FieldScout TDR Soil Moisture Meter (Spectrum Technologies, Inc., Velká Británie) na 10 místech v každém pásu. Gravimetrická vlhkost půdy byla měřena v půdách odebraných v hloubce 0-20 cm sušením při 105 °C. Emise CO<sub>2</sub> byly měřeny pomocí automatického analyzátoru CO<sub>2</sub> LI-COR 8100 Automated Soil CO<sub>2</sub> Flux s multiplexerem 8150 a komorami (LI-8100-104, USA) (průměr 20 cm) pracujícími v open-closed systému.

Kolmé úsečky na histogramech představují směrodatné odchylky.

## **Výsledky a diskuze**

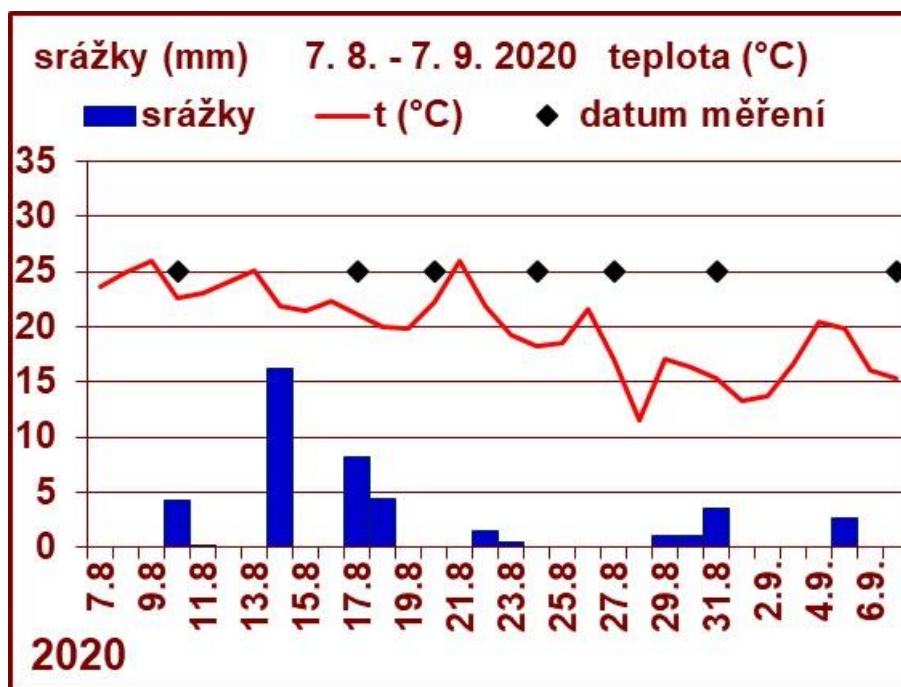
### **Teplota a vlhkost vzduchu a půdy**

Polní pokus v roce 2020 (od 7.8.2020 – podmítka a mulčování slámy, do 7.9.2020) charakterizovaly teploty vzduchu mezi 11,5-26,0 °C s průměrem 20,8 °C. Úhrn srážek byl 40,7 mm (Obr. 1a). V roce 2022 mezi 28.7., kdy byly provedeny podmítka a mulčování slámy, a 9.9. se průměrné teploty vzduchu pohybovaly mezi 16,2-27,2 °C s průměrem 19,8 °C (Obr. 1b). V roce 2020 tři čtvrtiny celkových srážek (33 mm) připadaly na první tři měření CO<sub>2</sub>. dále již byly minimální. Oproti roku 2020 byly v roce 2022 téměř trojnásobné srážky, které dosáhly do konce měření celkem 116,3 mm.

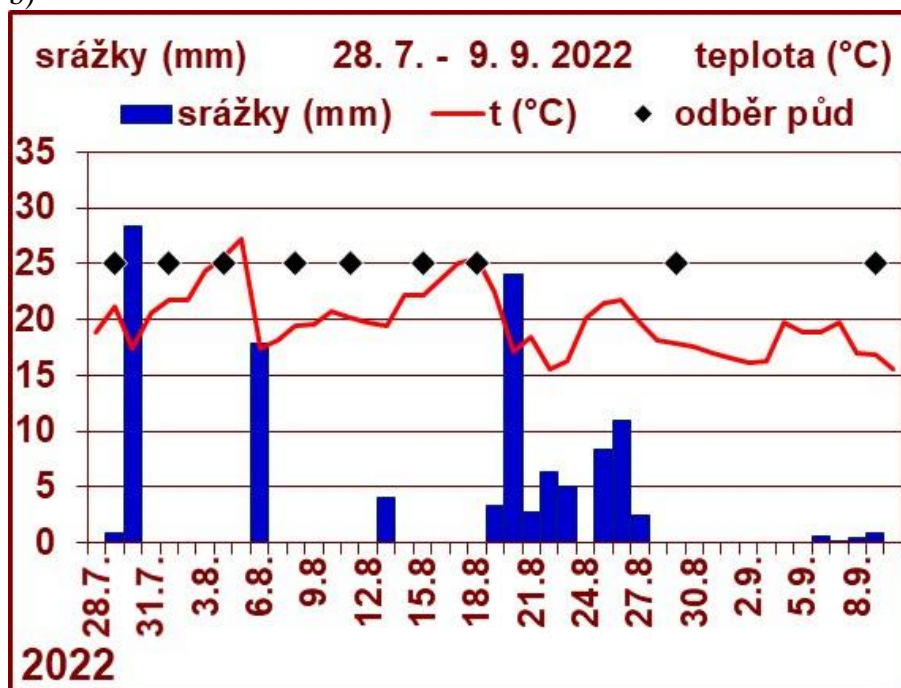
V roce 2022 byly na počátku pokusu zaznamenány dvoje vyšší úhrny srážek (30.7. celkem 28,3 mm a 6.8. celkem 17,8 mm), v dalším období přišlo více v druhé polovině srpna, kdy spadlo celkem 63,2 mm (Obr. 1b). Tyto podmínky ovlivnily jak vlhkost půdy, tak i emise CO<sub>2</sub> v obou sledovaných letech.

Obr 1 a,b: Průběh počasí v letech 2020 a 2022 v Praze-Ruzyni

a)



b)

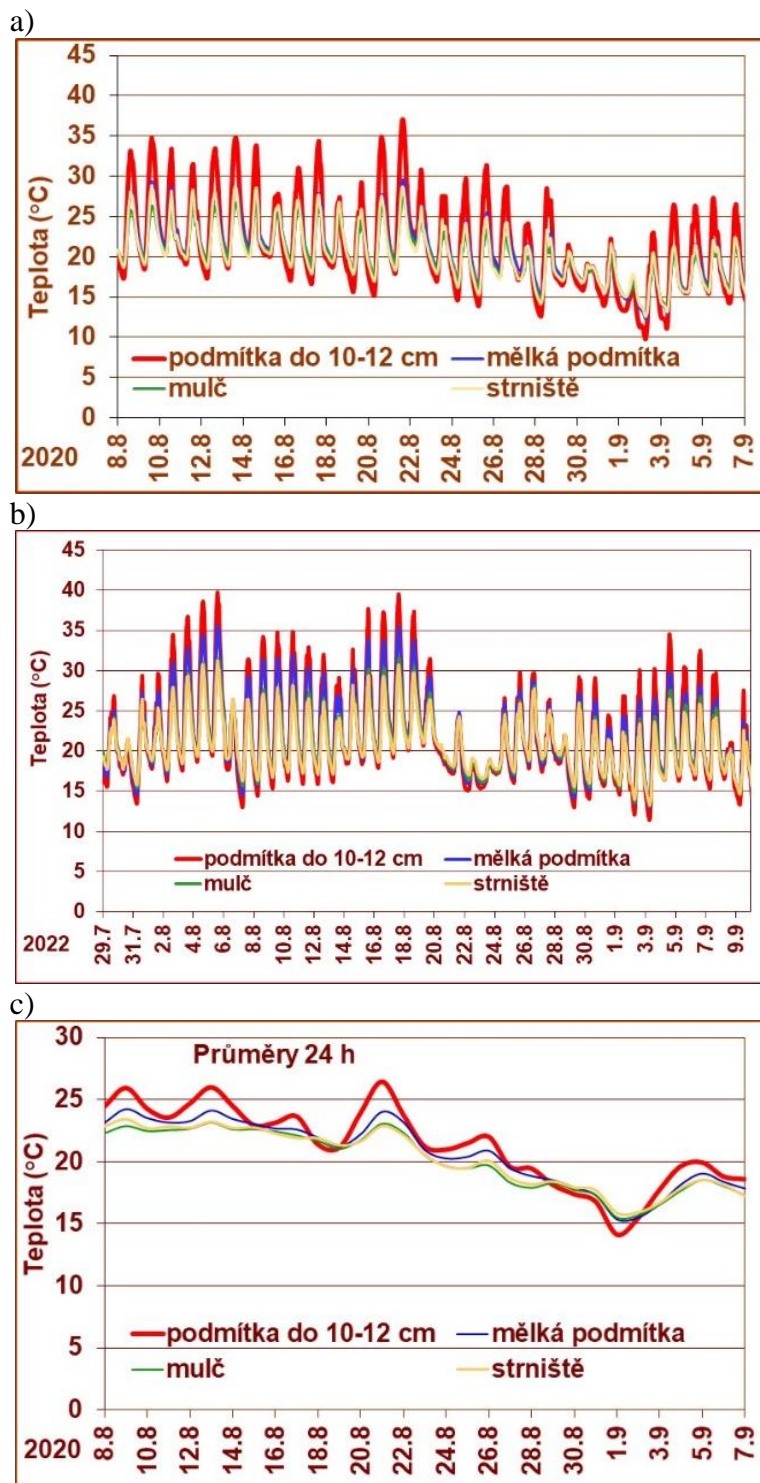


Teploty půdy v letech 2020 a 2022 jsou uvedeny na Obr. 2a-d. V závislosti na zpracování půdy se teplota půdy během slunečního dne intenzivně ohřívala a v noci se ochlazovala. Teplota půdy po podmítce do 10-12 cm v roce 2020 vykazovala teplotní výkyvy během 24 hodin dosahující až 20 °C. V roce 2022 teplota půdy po hlubší podmítce (10-12 cm) sice nevykázala tak vysoké rozdíly v průběhu dne, přesto dosáhla rozdílů až okolo 15 °C v porovnání s ostatními technologiemi půdy. Půdy u ostatních technologií ani v jednom ze sledovaných let nedosáhly tak vysokých denních rozdílů. Denní průměry ukazují, že v obou sledovaných letech byla vyšší teplota zaznamenána po hlubší podmítce do 10-12 cm. Nejnižší teploty půdy byly zjištěny

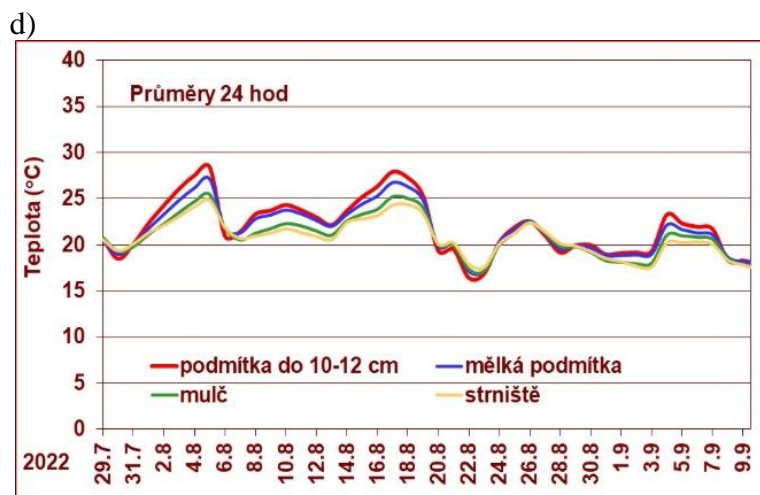


v půdě, kde byl na povrchu mulč nebo strniště. Snížení intenzity zpracování půdy vedlo ke snížení prohřívání půdy, což je podstatné pro snížení výparu vody z půdy a současně i pro nížení mineralizace organické hmoty. Tyto údaje jsou i v dobrém souladu s Noorem et al. (2021), kteří konstatovali, že mulč slámy denní teploty půdy snížil téměř o 2 °C, současně zvýšil vlhkost půdy a v konečném důsledku zlepšil i výnosy následující plodiny.

Obr.2 a-d: Teplota půdy v hloubce 5 cm v letech 2020 a 2022 – (a,b) denní výkyvy, (c,d) denní průměry





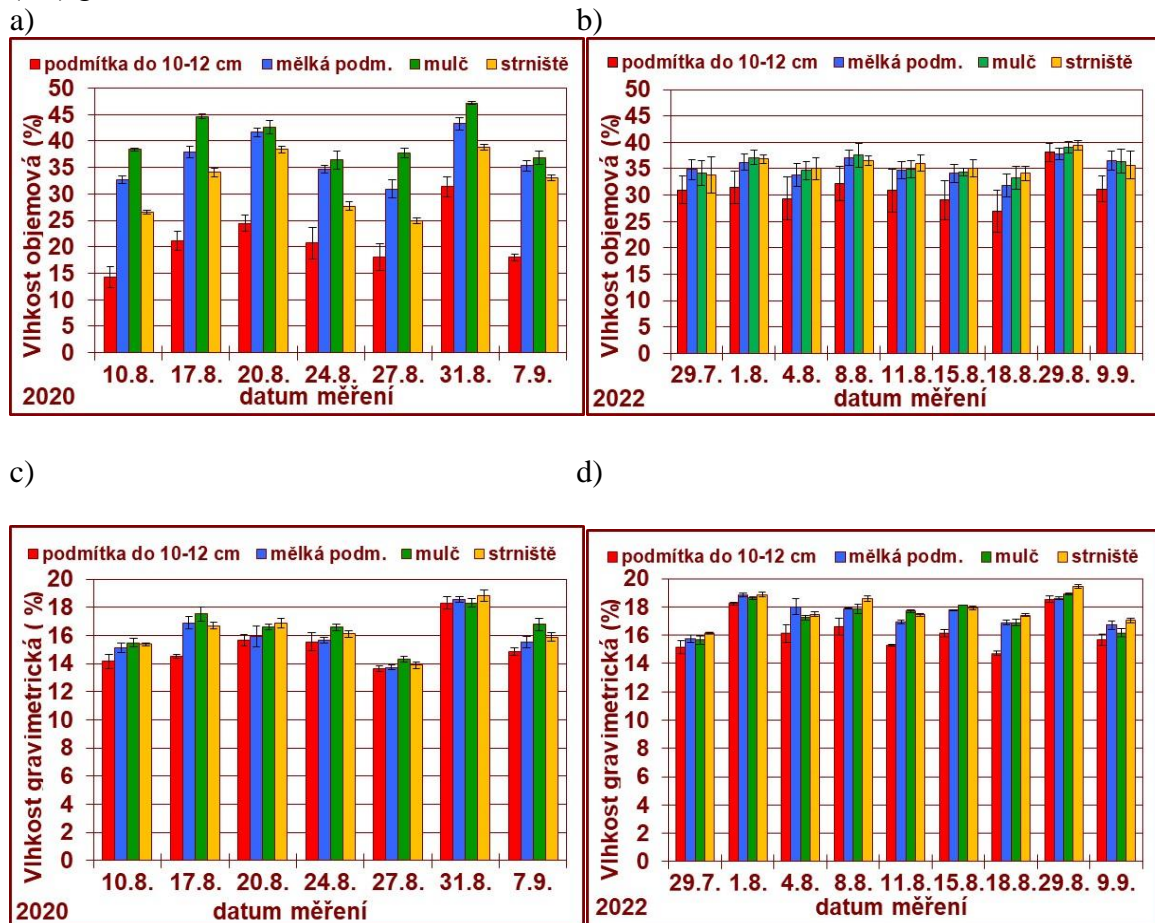


Nejnižší vlhkost v roce 2020 i 2022 byla jak objemově, tak i gravimetricky zjištěna v půdě při podmítce do 10-12 cm (obr. 3a-d). Snížení intenzity zpracování půdy vlhkost v obou letech zvýšilo. V případě strniště duté stonky mohly usnadnit hlavně v sušším roce 2020 výpar půdy, proto byla objemová vlhkost půdy nižší v porovnání s mělkou podmítkou a mulčem. Naopak u gravimetrické vlhkosti, kde byla půda odebrána do 20 cm, podstatný rozdíl ve vlhkosti půdy mezi strništěm a mulčem nebyl zjištěn. Zvláště v suchých letech by proto především mulč měl být pokud možno ponechán na půdě delší dobu, aby se zabránilo nadměrnému výparu vody a zbytečnému prohřívání půdy. Půdní vlhkost a teplota obecně souvisí s emisemi CO<sub>2</sub> z půd (Dong et al. 2017). Wang et al. (2019) uvedli, že emise CO<sub>2</sub> rostou s rostoucí teplotou půdy.

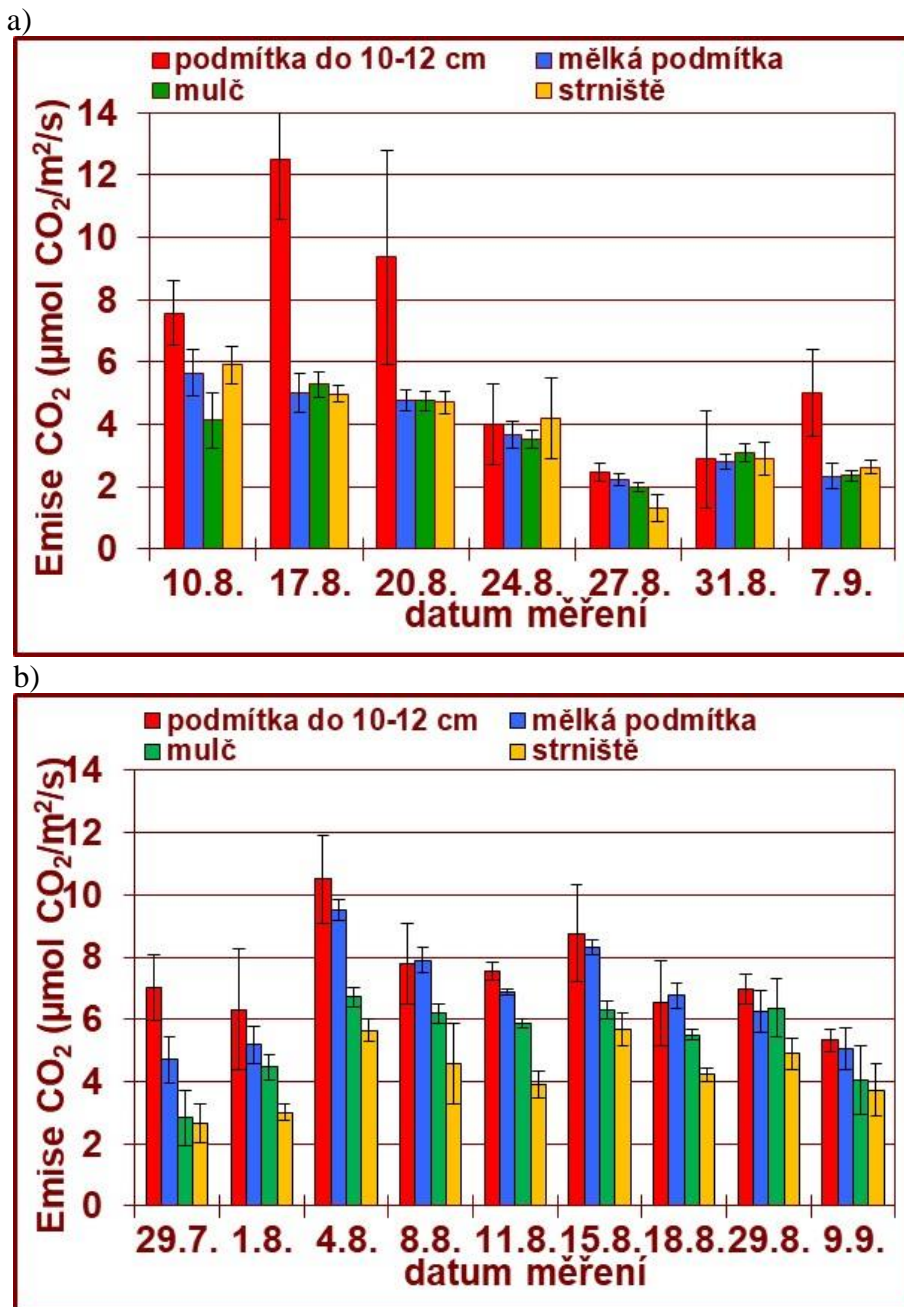
### Emise CO<sub>2</sub>

Nejvyšší emise CO<sub>2</sub> v obou letech 2020 a 2022 byly naměřeny po podmítce do 10-12 cm. Emise CO<sub>2</sub> po hlubší podmítce do 10-12 cm byly v roce 2020 v některých dnech až dvojnásobné v porovnání s dalšími způsoby zpracování půdy (Obr. 4a). Mezi ostatními variantami nebyly významné rozdíly. V roce 2022 nebylo dosaženo tak vysokého rozdílu v emisích CO<sub>2</sub> jako v roce 2020, ale na počátku pokusu byly emise CO<sub>2</sub> po mělké podmítce nižší o třetinu a při ponechaném strništi a mulči až o 60 % ve srovnání s podmítkou do 10-12 cm. Na rozdíl od roku 2020 byly ale zjištěny větší rozdíly i mezi mělkou podmítkou a mulčem nebo strništěm. I v dalším období byly emise CO<sub>2</sub> u mělké podmítky nižší o 5-18 % a u strniště o 10-36 % a u mulče o 30-50 %. Tyto výsledky jsou srovnatelné s Curtinem et al. (2000), kteří zaznamenali emise CO<sub>2</sub> asi o 20–25 % nižší u nezpracované půdy ve srovnání s konvenčním zpracováním půdy. Toto zjištění také naznačuje, že dalším významným faktorem ovlivňujícím emise CO<sub>2</sub> bylo počasí a srážky, které byly rozdílné v obou letech, které následně ovlivnily teplotu a vlhkost půdy. Podobně Mancinelli et al. (2015) zjistili, že letní období s nejvyššími teplotami půdy ovlivnilo obsah vody v půdě a emise CO<sub>2</sub> a Guttières et al. (2021) uvedli, že zvýšení teploty z 15 na 20 °C zvýšilo bazální mineralizaci půdní organické hmoty o 38 %, což přispělo k vyšším emisím CO<sub>2</sub>. Naopak strniště i mulč nejvíce snižovaly nadměrné prohřívání půdy a ztrátu půdní vlhkosti (Obr. 2,3) i emise CO<sub>2</sub>, což svědčí o nižší mineralizaci organické hmoty. Sláma ponechaná na povrchu půdy může být proto dobrou metodou ke snížení emisí CO<sub>2</sub> z půdy. Snížení hloubky podmítky nicméně ukazuje, že i snížení hloubky o několik centimetrů může emise CO<sub>2</sub> snížit. Výsledky jsou v souladu například i s Langeroodi et al. (2019), kteří také zjistili, že emise CO<sub>2</sub> byly nejnižší při nezpracování půdy spojené s mulčem zbytků pšenice.

**Obr. 3a-d:** Vlhkost půdy po různém zpracování půdy v letech 2020 a 2022 (a,b) objemová; (c,d) gravimetrická



Obr. 4a,b: Emise CO<sub>2</sub> po různém zpracování půdy v letech 2020 (a) a 2022 (b)



## Závěr

Výsledky polních pokusů s různým zpracováním půdy ukázaly, že pro zvýšení emisí CO<sub>2</sub> z půd na stanovišti v Praze – Ruzyni je rozhodující hloubka zpracování půdy, teplota půdy a vlhkost. Podmítka do 10-12 cm brzy po sklizni obilovin v teplém suchém letním období může zvýšit emise CO<sub>2</sub> z půd až dvojnásobně ve srovnání s jinými používanými postupy zpracování půdy. Proto by po sklizni obilovin mělo být upřednostňováno ponechání strniště se slámou nebo mulč, který v teplých letních dnech přiměřeně zakryje půdu a slámu zapravovat později v chladnějších dnech. Podmítka se často provádí v létě před setím řepky olejky. Podle našich výsledků může podmítka v tomto období výrazně zvýšit emise CO<sub>2</sub> z půdy, zejména za teplého počasí, kdy průměrné denní teploty překročí 20°C. Zpracování půdy by mělo být prováděno později při nižších teplotách, protože může snížit ztráty CO<sub>2</sub> ve srovnání se zpracováním bezprostředně po sklizni v létě. Mulč nebo ponechané strniště může být vhodné pro snížení

emisí CO<sub>2</sub> v letním období (až o 50 %), kdy může udržovat vlhkost půdy po sklizni plodin a předcházet přehřívání půdy.

### Poděkování

Výzkum byl podpořen projekty MZE-RO0418 a QK21020121

### Literatura

- Chi J., Waldo S., Pressley S. N., Russell E. S., O’Keeffe P. T., Pan W. L., Lamb B. K. (2017): Effects of climatic conditions and management practices on agricultural carbon and water budgets in the inland Pacific Northwest USA. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 122, 3142–3160. <https://doi.org/10.1002/2017JG004148>
- Curtin D., Selles F., Wang H., Biederbeck V.O., Campbell C.A. (1998): Carbon Dioxide Emissions and Transformation of Soil Carbon and Nitrogen during Wheat Straw Decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 62, 1035-1041.
- Curtin D., Wang H., Selles F., McConkey B.G., Campbell C.A. (2000): Tillage Effects on Carbon Fluxes in Continuous Wheat and Fallow–Wheat Rotations. *Soil Science Academy America Journal*, 64, 2080-2086.
- Dong W., Liu E., Wang J., Yan C., Li J., Zhang Y. (2017): Impact of tillage management on the short- and long-term soil carbon dioxide emissions in the dryland of Loess Plateau in China. *Geoderma*, 307, 38-45
- Feiziene D., Feiza V., Kadziene G. Vaideliene, A. Povilaitis V. Deveikyte I. (2012): CO<sub>2</sub> fluxes and drivers as affected by soil type, tillage and fertilization. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 62: 311-328
- Guttières R., Nunan N., Raynaud X., Lacroix G., Barot S., Barré P., Girardin C., Guenet B., Lata J.C., Abbadie L. (2021): Temperature and soil management effects on carbon fluxes and priming effect intensity. *Soil Biology and Biochemistry*, 153, 108103. [doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108103](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108103)
- Langeroodi A.R.S., Osipitan O.A., Radicetti E. (2019): Benefits of sustainable management practices on mitigating greenhouse gas emissions in soybean crop (*Glycine max*). *Science of the total Environment*, 660, 1593-1601.
- Mancinelli R., Marinari S., Brunetti P., Radicetti E., Campiglia E. (2015): Organic mulching, irrigation and fertilization affect soil CO<sub>2</sub> emission and C storage in tomato crop in the Mediterranean environment. *Soil and Tillage Research*, 152: 39-51
- Melero S., López-Garrido R., Murillo J.M., Moreno F. (2009): Conservation tillage: Short- and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil Till. Res.*, 104, 292-298.
- Noor M.A., Nawaz M.M., Ma W., Zhao M. (2021): Wheat straw mulch improves summer maize productivity and soil properties. *Italian Journal of Agronomy*, 16, 1623, [10.4081/ija.2020.1623](https://doi.org/10.4081/ija.2020.1623).
- Wang W., Akhtar K., Yang G., Feng Y., Yuan L. (2019): Impact of straw management on seasonal soil carbon dioxide emissions, soil water content, and temperature in a semi-arid region of China. *Science of the total environment*, 652, 471-482

### Kontakt:

Ing. Gabriela Mühlbachová, Ph.D.  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
161 06 Praha 6 – Ruzyně  
E-mail: [muhlbachova@vurv.cz](mailto:muhlbachova@vurv.cz)

## Výnos pšenice jarní pěstované společně s různými leguminózami v systému intercropping

Yield of spring wheat grown together with different legumes in an intercropping system

Mühlbachová G., Janovská D., Hlásná Čepková P., Vavera R., Káš M.

*Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně*

### Abstrakt

Ve tříletém polním pokusu na ekologickém pozemku v Praze-Ruzyni byla v letech 2020-2022 pěstovaná pšenice jarní v systému intercropping s hrachem a bobem. V pokusu byly současně ověřovány celkem tři odrůdy pšenice jarní s různými charakteristikami, jejich vzájemné kombinace a současně i kombinace s leguminózami. V průměru vyšší výnos byl zjištěn u pšenice pěstované samostatně. Varianty pěstování pšenice s hrachem nebo bobem daly v průměru mírně nižší výnos. Z nich se v příznivějších letech 2020 a 2022 lépe projevila kombinace odrůd Alicia a Toccata spolu s hrachem. Výnos v jednotlivých letech byl ovlivněn průběhem počasí, kdy v roce 2021 bylo chladné jaro s vysokými srážkami v květnu, což zpozdilo růst a vývoj rostlin. Nejvyšší celkový výnos zrna byl zjištěn v roce 2022, kdy bylo příznivé počasí a předplodinou byl hrách, po kterém v půdě zůstalo více dusíku.

**Klíčová slova:** Odrůdy pšenice; Počasí; Hrách; Bob

### Abstract

The three-year field trial (2020-2022) on an organic plot in Prague-Ruzyně with spring wheat was grown in an intercropping system with peas and beans. Three spring wheat varieties with different characteristics, their mutual combinations and at the same time combinations with legumes were checked simultaneously. On average, a higher yield was found for separately grown wheat. Variants of wheat cultivated with peas or beans gave a lower yield on average. Of these higher yields were obtained in the combination of the varieties Alicia and Toccata together with pea in the more favourable years 2020 and 2022. The yield in each year was affected by weather conditions, when, especially in 2021, there was a cold spring with abundant rainfall in May, which delayed the growth and development of the plants. The highest total grain yield was found in 2022, when the weather was favourable and the pre-crop was peas, as a result of which more nitrogen remained in the soil.

**Keywords:** Wheat cultivar; Weather; Pea; Bean

### Úvod

Intercropping je pěstební systém, který využívá vzájemném vztahu dvou druhů plodin nebo odrůd. Základním cílem pěstování plodin v systému intercropping je zlepšení kvality produkce, snížení rizika eroze, zlepšení půdních charakteristik, ale i snížení rizika znečištění podzemních vod nitráty. V pěstebních systémech intercroppingu jsou využívány různé druhy leguminóz a obilnin (Šarunaite et al. 2010, Tsialtas et al. 2018, Jensen et al. 2020, Zang et al. 2015, Chapagain 2014, Tortorela et al. 2013). Zejména v ekologickém zemědělství může případná interakce mezi leguminózami a obilninami zlepšit a stabilizovat výnosy obilnin. Výnosy pšenice v systému ekologického zemědělství běžně vykazují velkou variabilitu především kvůli omezeným zdrojům dusíku (Vrignon-Brenas et al. 2018, Poudel et al. 2002, Doltra et al. 2011), kdy nejsou do půdy aplikována žádná minerální dusíkatá hnojiva. Společné pěstování pšenice s leguminózami tak může biologickou fixací dusíku luštěninami a jeho využitím obilninami zlepšit výnos, případně kvalitu produkce (Liu et al. 2022). Biologickou fixací dusíku je využitý

N<sub>2</sub> z atmosféry a tento mechanismus je považován za možný způsob rozvoje udržitelného ekologického zemědělství (Yao et al. 2019) a pěstování obilnin (Zang et al 2015; Tsialtas et al. 2018). Leguminózy produkující větší semena také akumulují značné množství dusíku získaného z půdy a lze je použít k větší variabilitě osevních sledů a jako zlepšující plodinu díky vyššímu využití dusíku (Jensen et al. 2020). Obilniny mají nižší účinnost ve využití zdrojů dusíku než luskoviny. Publikované údaje z meziplodinových pokusů s leguminózami a obilninami ukázaly, že díky konkurenčním interakcím a komplementárnímu získávání dusíku mohou obilniny získat více než proporcionální podíl půdních zdrojů dusíku (Jensen et al. 2020). Kromě toho může kořen luskoviny stimulovat mikrobiální mineralizaci a zvýšit množství dostupného dusíku v půdě (Tortorella et al. 2013).

Cílem pokusu bylo ověřit vliv současného pěstování vybraných odrůd pšenice jarní samostatně nebo v kombinaci společně s hrachem nebo bobem na výnos zrna.

## **Materiál a metody**

Pšenice jarní (*Triticum aestivum* L.), odrůdy Alicia, Toccata a Hystrix byly pěstovány v systému intercropping s hrachem nebo bobem. Polní pokus byl realizován v letech 2020-2022 ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v.v.i. na certifikovaném ekologickém pozemku. Půdní typ je černozem, hlinito-jílovitá půda. Průměrný roční úhrn srážek = 513 mm; průměrná roční teplota vzduchu = 8,4 °C. Předplodinou byla v letech 2020 a 2021 pšenice dvouzrnka, v roce 2022 hrách. Průměrné měsíční teploty, srážky a dlouhodobé měsíční průměry jsou uvedeny na Obr. 1. Pro pěstování pšenice jarní byly vybrány následující odrůdy: pšenice jarní typu E – Alicia, typu B – Toccata a typu C - Hystrix. Odrůdy pšenice byly pěstovány samostatně, ve vzájemných kombinacích odrůd a v kombinaci s leguminózou – hrách (odrůda Eso) a bob (odrůda Merkur). Výsevek pšenice byl 4 mil. klíčivých semen, u hrachu a bobu výsevek představoval 30 % běžného výsevku z důvodu snížení konkurence proti jarní pšenici, která byla hlavní plodinou v pokusu. Před počátkem pokusu byla půda na podzim zorána do 20 cm a před setím připravena kombinátorem do hloubky 3-4 cm. kombinátorem. Setí pokusu proběhlo 6. 4. 2020, 31.3. 2021 a 30.3. 2022. Jarní pšenice a luskoviny byly sklizeny 18.7. 2020, 16.8. 2021 a 27. 7. 2022. Předplodinou pro roky 2020 a 2021 byla pšenice dvouzrnka, pro rok 2022 hrách. Obsah NO<sub>3</sub>-N před počátkem pokusu v půdách ve vrstvě 0-30 cm byl 23,3 kg N/ha v roce 2020, 12,6 kg N/ha v roce 2021 a 79.0 kg N/ha v roce 2022.

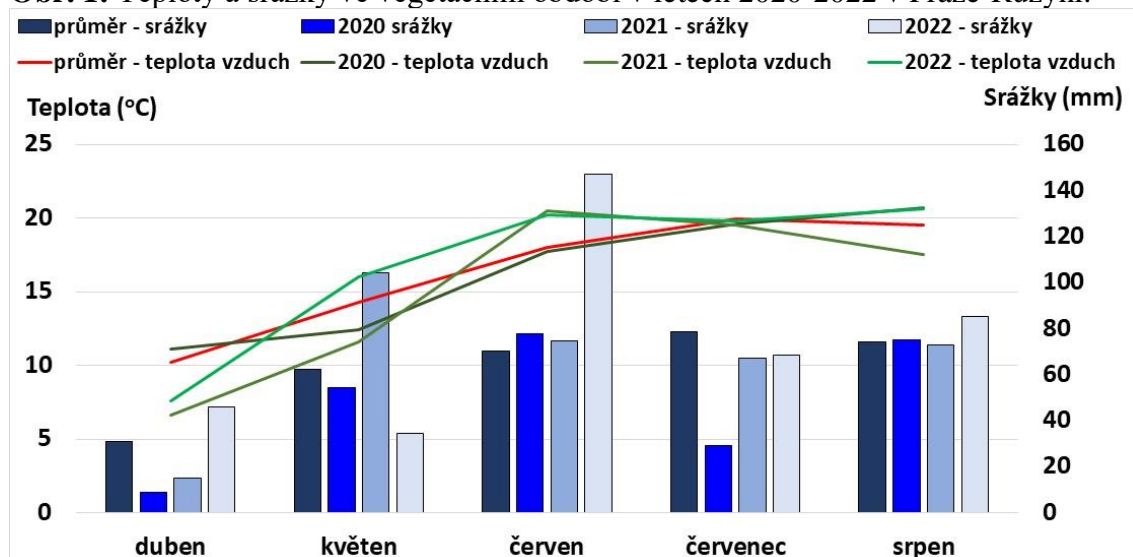
## **Výsledky a diskuze**

### **Průběh počasí v letech 2020 a 2021**

Počasí v roce 2020 bylo charakterizováno suchým a teplým dubnem, kdy průměrná teplota byla 11 °C a srážky 9 mm. Následoval srážkově průměrný, ale chladnější květen, průměrný červen a následoval sušší červenec. Rok 2021 byl charakteristický suchým, ale chladným dubnem, kdy následoval srážkově nadprůměrný (104 mm) chladnější květen (oba měsíce v průměru o 2-4 °C méně v porovnání s víceletým průměrem), nadprůměrné teploty v červnu a nižší teploty a vyšší srážky na počátku srpna. V roce 2022 byl chladný duben s nadprůměrnými srážkami, naopak květen byl srážkově podprůměrný s vysokými teplotami. Zvláště třetí dekáda června byla srážkově nadprůměrná, kdy napršelo celkem 114 mm (Obr. 1). Tyto podmínky měly vliv na výnos pšenice jarní v každém sledovaném roce.

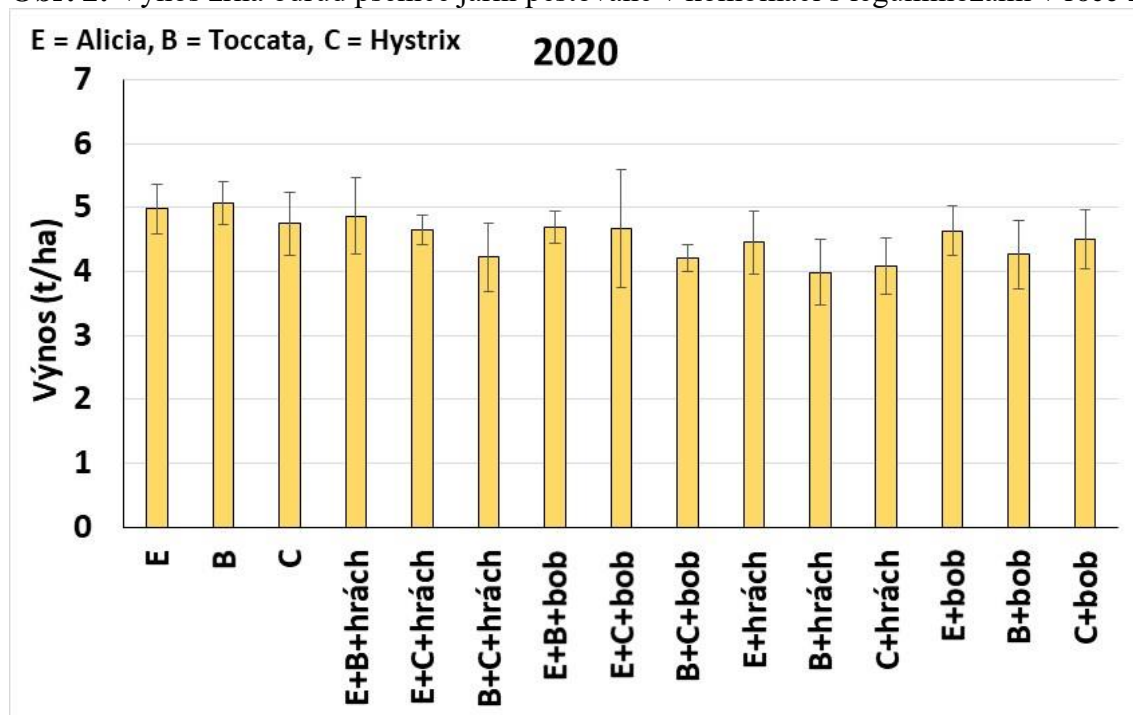


**Obr. 1:** Teploty a srážky ve vegetačním období v letech 2020-2022 v Praze-Ruzyni.



Vyšších výnosů dosáhly v roce 2020 samostatně pěstované odrůdy, a to 4,75 t/ha u odrůdy Hystrix, 4,98 t/ha u odrůdy Alicia a 5,08 t/ha u odrůdy Toccata, než při pěstování v kombinaci s leguminózami. Kombinace odrůd pšenice s hrachem dosáhly v průměru vyšší výnos než s bobem. Kombinace odrůd Toccata a Hystrix s hrachem nebo bobem dosáhly vždy nižší výnos v porovnání s kombinací s odrůdou Alicia. Výnos pšenice ať již ve směsi dvou pšenice nebo pouze jedné odrůdy ve směsi v hrachem nebo bobem většinou příliš nelišil. Vzhledem k určité variabilitě výsledků lze ale konstatovat, že směsi s hrachem nebo bobem snižovaly výnos pšenice zhruba o 0,7-0,8 t/ha v porovnání s pěstováním pšenice bez leguminóz.

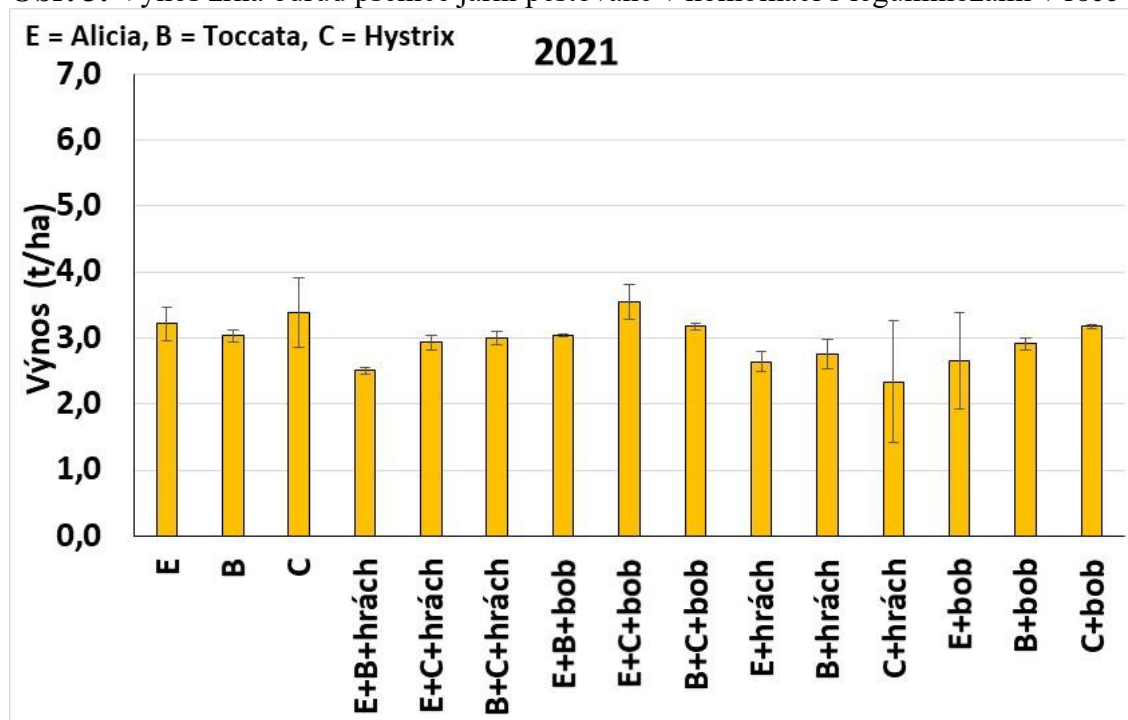
**Obr. 2:** Výnos zrna odrůd pšenice jarní pěstované v kombinaci s leguminózami v roce 2020



V roce 2021 byly zjištěny celkově nejnižší výnosy zrna pšenice jarní ze všech třech sledovaných let. Výnos byl ovlivněn chladným jarem, kdy na počátku růstu rostlin byly v dubnu nízké srážky, které pak naopak byly vystrídány nadprůměrnými srážkami v květnu. Růst rostlin byl opožděn a sklizeň proběhla až 16.8. 2021. V těchto podmínkách se více osvědčila kombinace odrůd pšenice s bobem, která dala v průměru srovnatelný výnos (3,25 t/ha) jako

samostatně pěstované odrůdy pšenice (3,20 t/ha). Kombinace s hrachem snížila výnos zrna v průměru o 0,4-0,6 t/ha.

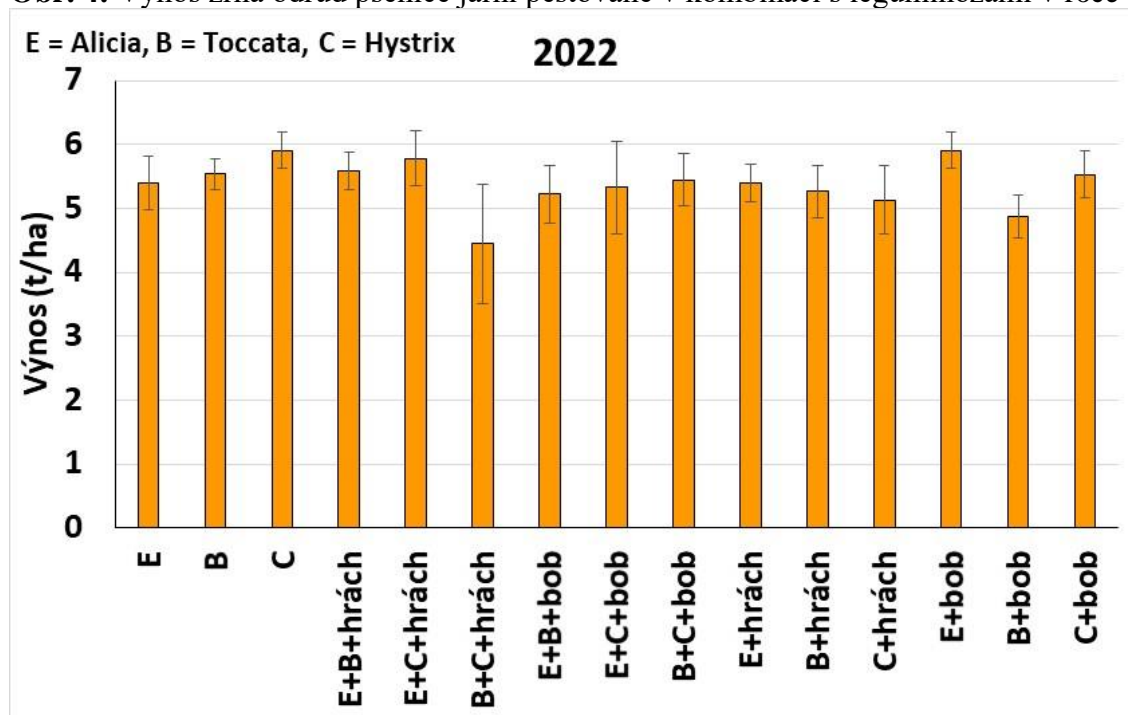
**Obr. 3:** Výnos zrna odrůd pšenice jarní pěstované v kombinaci s leguminózami v roce 2021



Výnos v roce 2022 byl v průměru nejvyšší ze všech sledovaných let, kdy celkový průměrný výnos dosáhl 5,4 t/ha. Samostatně pěstované pšenice dosáhly výnos mezi 5,4-5,9 t/ha, kombinace odrůd s hrachem 5,3 t/ha a s bobem 5,3-5,4 t/ha. Celkový trend se výnosově podobal roku 2020, kdy zvláště kombinace společně pěstované odrůdy Toccata, Hystrix a hrachu dala nejnižší výnos. Celkově byly výnosy pšenice ovlivněny jak počasím, tak i obsahem dusíku v půdě, kdy v prvních dvou letech byl před počátkem pokusu obsah nitrátů v půdě 21,3, respektive 12,6 kg N/ha, zatímco po předplodině hrachu byl obsah nitrátů vysoký (79 kg N/ha). V kombinaci s příznivým průběhem počasí pak v roce 2022 mohly být dosaženy nejvyšší výnosy odrůd pšenice. Celkově ale současné pěstování pšenice s leguminózami dalo mírně nižší výnos v porovnání se samostatně pěstovanou pšenicí. Není vyloučeno, že i přes snížené výsevky hrách a bob do určité míry růstu pšenice konkurovaly. V pokusu byla hodnocena také kvalita získané produkce, vzhledem k nedokončeným laboratorním analýzám za rok 2022 nejsou tyto výsledky zahrnuty do tohoto příspěvku.

Výnos pšenice v jednotlivých letech byl variabilní, kdy byl ovlivněn omezenými zdroji dusíku, což konstatovali například Vrignon-Brenas et al. (2018), Poudel et al. (2002) nebo Doltra et al. (2011). Do půdy nebyla aplikována žádná minerální dusíkatá hnojiva, pouze v roce 2022 byl předplodinou hrách, což vedlo k celkově nejvyšším výnosům. Současně byl ovlivněn i příznivějším a méně příznivým počasím. Výsledky zatím nepotvrdily možné využití dusíku pocházejícího z biologické fixace N, jak uvádí Liu et al. (2022). Přitom dusík biologicky fixovaný z atmosféry by pro systém intercroppingu mohl být považován za možný mechanismus získávání dusíku pro pěstování obilnin v ekologickém zemědělství (Zang et al. 2015, Tsialtas et al. 2018).



**Obr. 4:** Výnos zrna odrůd pšenice jarní pěstované v kombinaci s leguminózami v roce 2022

### Závěr

Ve tříletém polním pokusu byla pěstovaná pšenice jarní v systému intercropping s hrachem a bobem. V průměru vyšší výnos byl zjištěn u pšenice pěstované samostatně. Varianty pěstování různých kombinací odrůd pšenice jarní s hrachem nebo bobem daly mírně nižší výnos. Na výnosech se projevil i vliv ročníku, kdy v příznivějších letech 2020 a 2022 byly dosaženy celkově vyšší výnosy, v roce 2022 pravděpodobně i díky zlepšující předplodině (hrách). Z kombinací odrůd pšenice jarní s leguminózami se v příznivějších letech 2020 a 2022 lépe projevila kombinace odrůd Alicia a Toccata spolu s hrachem. Výnos v jednotlivých letech byl ovlivněn počasím, kdy zvláště v roce 2021 bylo chladné jaro s vysokými srážkami v květnu, což zpozdilo růst a vývoj rostlin. Nejvyšší celkový výnos zrna byl zjištěn v roce 2022, kdy bylo příznivé počasí a předplodinou byl hrách, po kterém v půdě zůstalo více dusíku.

### Poděkování

Výzkum byl podpořen projektem QK191910046

### Literatura

- Chapagain T., Riseman A. (2014). Barley-pea intercropping: Effects on land productivity, carbon and nitrogen transformations. *Field Crops, Research*, 166, 18-25.
- Doltra J., Lægdsmand M., Olesen J.E. (2011). Cereal yield and quality as affected by nitrogen availability in organic and conventional arable crop rotations: a combined modeling and experimental approach. *European Journal of Agronomy*, 34, 83-95.
- Jensen, E.S., Carlsson, G., Hauggaard-Nielsen, H. (2020). Intercropping of grain legumes and cereals improves the use of soil N resources and reduces the requirement for synthetic fertilizer N: A global-scale analysis. *Agronomy for Sustainable Development* 40: 5.
- Liu, R., Zhou, G.P., Chang, D.N., Gao, S.J., Han, M., Zhang, J.D., Sun, X.F., Cao, W.D. (2022). Transfer characteristics of nitrogen fixed by leguminous green manure crops when

- intercropped with maize in northwestern China. *Journal of Integrative Agriculture*, 21, 1177-1187.
- Poudel D.D., Horwath W.R., Lanini W.T., Temple S.R., van Bruggen A.H.C. (2002). Comparison of soil N availability and leaching potential, crop yields and weeds in organic, low-input and conventional farming systems in northern California. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 90, 125-137.
- Šarūnaitė L., Deveikytė I., Kadžiulienė Ž. (2010). Intercropping spring wheat with grain legume in an organic crop rotation. *Žemdirbystė = Agriculture*, 97, 51–58.
- Tortorella D. Scalise A., Pristieri A., Petrovičová B., Monti M., Gelsomino A. (2013). Chemical and biological responses in a Mediterranean sandy clay loam soil under grain legume-barley intercropping. *Agrochimica*, 57, N. 1.
- Tsialtas I.T., Baxevanos D., Vlachostergios D.N., Dordas C., Lithourgidis A. (2018). Cultivar complementarity for symbiotic nitrogen fixation and water use efficiency in pea-oat intercrops and its effect on forage yield and quality. *Field Crops Research*, 226, 28-37
- Vrignon-Brenas, S., Celette, F., Piquet-Pissaloux, A., Corre-Hellou, G., David, C. (2018). Intercropping of white clover with organic wheat to improve the trade-off between wheat yield, protein content and the provision of ecological services by white clover. *Field Crops Research*, 224, 160-169.
- Yao X., Y Li Y., L Liao L., G Sun G., S Ye S. (2019). Enhancement of nutrient absorption and interspecific nitrogen transfer in a *Eucalyptus urophylla* × *eucalyptus grandis* and *Dalbergia odorifera* mixed plantation. *Forest Ecology and Management*, 449, 117465.
- Zang H., Yang X., Feng X., Qian X., Hu Y., Ren C., Zeng Z. (2015): Rhizodeposition of nitrogen and carbon by mungbean (*Vigna radiata* L.) and its contribution to intercropped oats (*Avena nuda* L.). *PLoS ONE*, 10, e0121132.

**Kontakt:**

Ing. Gabriela Mühlbachová, Ph.D.  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
161 06 Praha 6 – Ruzyně  
E-mail: [muhlbachova@vurv.cz](mailto:muhlbachova@vurv.cz)

## Využití nanočástic v primingu osiva zelí hlávkového

The use of nanoparticles in the priming of cabbage seeds

Hakalová E.<sup>1</sup>, Pečenka J.<sup>1</sup>, Tekielska D.<sup>1</sup>, Čechová J.<sup>1</sup>, Eichmeier A.<sup>1</sup>, Aust R.<sup>2</sup>,  
Bytešníková Z.<sup>1</sup>, Richtera L.<sup>1</sup>, Baránek M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>MORAVOSEED CZ, a.s.

### Abstrakt

Cílem předkládané studie bylo ověřit účinek nanomateriálů (NMs) s antimikrobiální aktivitou na vybrané charakteristiky osiva zelí hlávkového metodou primingu. Celkem bylo hodnoceno 5 druhů NMs, 4 z nich byly NMs s nosičem na bázi uhlíku, pátým byly měděné nanočástice. Vliv NMs byl testován na 3 šaržích osiva s vysokou (93%), střední (73%) a sníženou (69%) klíčivostí. Osivo bylo primováno NMs o koncentracích odpovídajících 50 mg kovu na litr primovacího roztoku. U ošetřeného osiva byly sledovány parametry procenta klíčivosti, energie a rychlosti klíčení, u klíčících rostlin byla měřena délka kořenů, stonků a hmotnost rostlin. Pozitivní vliv nanoprimumu byl vyhodnocen pro aplikaci materiálu rGO\_Cu<sub>2</sub> na osivo s vysokým procentem klíčivosti, rGO\_Zn<sub>3</sub> u osiv se střední klíčivostí a nanočástic Cu\_NPs\_57 u osiva se sníženou klíčivostí.

**Klíčová slova:** nanomateriály, klíčivost, měď, zinek

### Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effect of nanomaterials (NMs) on cabbage seed using the priming method. A total of 5 types of NMs were evaluated. The effect of NMs was tested on 3 batches of seeds with high (93%), medium (73%) and reduced (69%) germination level. The seeds were primed with NMs at concentrations corresponding to 50 mg of metal per litre of priming solution. For the treated seed, parameters of germination percentage, energy and germination rate were monitored, the length of roots, stems and plant weight were measured for germinated plants. The positive effect of nanoprimum was evaluated for rGO\_Cu<sub>2</sub>, rGO\_Zn<sub>3</sub> and Cu\_NPs\_57 and material to seeds with a high percentage, medium and reduced germination respectively.

**Keywords:** nanomaterials, germination, copper, zinc

### Úvod

Kvalitní osivo představuje základní faktor ovlivňující tvorbu výnosu zemědělských plodin. Rychlé klíčení semen a vzejití embrya je zásadní pro vývoj rostliny a je považováno za důležitý agronomický znak. Obecně platí, že semena skladovaná po delší dobu v suchých podmínkách na vzduchu trpí určitým stupněm znehodnocení a jsou náchylná k oxidativnímu poškození v důsledku kumulativního nárůstu reaktivních forem kyslíku (ROS) a poklesu antioxidačního potenciálu buněk, což vede ke stárnutí semen a ztrátě schopnosti klíčení v důsledku biochemického poškození (Guha et al., 2018; Kumar et al., 2015; Dragicevic et al., 2013). S nízkou klíčivostí se však mohou potýkat také osiva z čerstvých sklizní. Ke zlepšení klíčivosti osiva a růstu klíčících rostlin je používán především priming osiva s případnou aplikací podpůrných látek. Primingem se rozumí řízený příjem vody osivem vedoucí ke zvýšené klíčivosti, vyrovnanější vzházivosti, vyššímu výnosu nebo zlepšení odolnosti vůči abiotickým a biotickým stresorům (George, 2009).

Spojením primingu a nanočástic, zejména esenciálních mikroprvků jako mangan, měď, zinek, železo či různých forem uhlíku, byla vytvořena inovativní technologie, která pomáhá zlepšit klíčení semen, jejich růst a výnos plodin tím, že poskytuje rostlinám vyšší odolnost vůči různým typům stresorů (Guha et al., 2018; Mahakham et al., 2017). Použití nanomateriálů umožňuje rozvoj elektronové výměny, a tím lepší schopnost povrchové reakce spojené s různými

složkami rostlinných buněk a pletiv. Jedná se například o indukci tvorby nanopórů ve výhoncích zvyšující schopnost vstřebávání vody, aktivaci genů zapojených do obranných reakcí rostlin nebo indukci hydrolýzy škrobu stimulací amylázy, což vede k přerušení dormance semen a podpoře klíčení osiva (Nile et al., 2022). Metody nanoprimingu nabízí možnost využití menšího množství účinné látky, což v konečném důsledku vede ke snížení nákladů, a také k nižší zátěži životního prostředí. Vzhledem k téměř neomezeným možnostem syntézy nanomateriálů v ohledu na obsažené prvky, jejich koncentraci, tvar či použitý nosič představuje použití nanoprimingu v osivářství perspektivní nástroj k dosažení požadovaných semenářských i biologických hodnot osiva. Účinky jednotlivých materiálů se však mohou lišit v závislosti na použité plodině, stáří a kvalitě osiva či samotné metodě aplikace.

Cílem této studie bylo vyhodnotit potenciál měďnatých a zinečnatých nanomateriálů se silnou antimikrobiální aktivitou pro použití v nanoprimingu osiva a určit jejich vliv na vybrané parametry osiva s vysokým, středním a sníženým procentem klíčivosti.

## Materiál a metody

### *Rostlinný materiál*

Přínosy použití nanoprimingu v osivářství byly hodnoceny pro tři kategorie osiva s rozdílným procentem klíčivosti. Na základě tohoto požadavku byly společností MORAVOSEED CZ, a.s. dodány tři odrůdy zelí, zahrnující šarže s vysokou (93 %), střední (73 %) a sníženou (69 %) klíčivostí. Osivo bylo povrchově desinfikováno ponořením do roztoku 1% chlornanu sodného po dobu 2 min, třikrát opláchnuto sterilní vodou a usušeno na filtračním papíru při pokojové teplotě v odtahovém boxu. Výchozí klíčivost použitého osiva byla na začátku experimentu ověřena na suchém osivu dle metodiky ISTA (2014).

### *Nanopriming*

K ošetření osiva byly vybrány čtyři nanomateriály (NMs) na bázi mědi lišící se v použitém nosiči a jeden na bázi zinku (Tabulka 1). Syntéza NMs proběhla na Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně. NMs byly před použitím naředěny sterilní vodou na hodnotu 50 mg.l<sup>-1</sup> k dosažení shodné koncentrace prvků v testovaných roztocích. Vliv použití NMs na vybrané parametry osiva a klíčících rostlin byl srovnáván s ošetřením osiva sterilní vodou. Nanopriming osiva proběhl formou máčení navážek osiva za stálého míchání (150 rpm) při teplotě 22 °C v disperzích jednotlivých NMs nebo vodě po dobu 2,5 h. K ošetření byl použit objemový poměr osiva k primovacímu roztoku 1:4. Po ošetření bylo osivo usušeno na filtračním papíře, umístěno do nakličovacích boxů a pěstováno při 22 °C a osmi-hodinové světelné periodě. Jednotlivé varianty byly založeny po 50 semenech ve třech opakováních.

Tabulka 1: Charakteristika použitých nanomateriálů

Označení nanomateriálu	nosič	Výchozí obsah prvku
GO_Cu1	Oxid grafenu	Měď 521 mg.l <sup>-1</sup>
rGO_Cu2	Redukovaný oxid grafenu	Měď 2828 mg.l <sup>-1</sup>
Biochar_Cu1	Aktivní uhlí	Měď 1166 mg.l <sup>-1</sup>
Cu_NPs_57	Bez nosiče	Měď 746 mg.l <sup>-1</sup>
rGO_Zn3	Redukovaný oxid grafenu	Zinek 2240 mg.l <sup>-1</sup>

*Hodnocené parametry*

Vhodnost vybraných NMs k ošetření osiva zelí hlávkového byla posuzována z hlediska jejich vlivu na klíčivost osiva, energii a rychlost klíčení, délku kořene a stonku klíčících rostlin a váhu semenáčku. Zpracování získaných dat proběhlo v programu Statistica v. 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornie, USA).

**Výsledky***Vliv nanoprímingu na parametry osiva*

Vhodnost použití nanoprímingu z hlediska vlivu na osivo byla hodnocena prostřednictvím parametrů procenta klíčivosti, energie klíčení a rychlosti klíčení. Statisticky průkazně vyšší procento klíčivosti v porovnání se suchou a máčenou kontrolou nebylo vyhodnoceno pro žádnou testovanou skupinu. U kategorie osiva s vysokou vstupní klíčivostí (93%), bylo oproti máčené kontrole pozorováno mírné zvýšení procenta klíčivosti při použití všech NMs, ovšem pouze v desetinách až jednotkách procent (Tabulka 2). Překvapivých výsledků bylo dosaženo u osiva se sníženou vstupní klíčivostí (69%), kdy samotné použití sterilní vody snížilo klíčivost testované odrůdy oproti kontrole bez použití primingu o téměř 20 %. Mírné zvýšení procenta klíčivosti bylo pozorováno jen u varianty ošetření materiálem rGO\_Zn3, kdy z průměrné hodnoty 66 % u neošetřené kontroly došlo k navýšení na 67,33 %. Tato varianta vykazovala také vyšší energii klíčení (50,67 %) a rychlost klíčení (76 %) v porovnání s kontrolními variantami. U osiva se střední hodnotou klíčivosti (73 %) byl jako u jediné skupiny pozorován pozitivní vliv primingu na procento klíčivosti při použití sterilní vody. Použitím NMs však k navýšení tohoto efektu nedošlo. Mírné zvýšení hodnot v porovnání s máčenou kontrolou bylo zaznamenáno jen u rychlosti klíčení při aplikaci Biochar\_Cu1, a to o 2,1 %.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty vybraných charakteristik osiva zelí po aplikaci nanoprímingu

Vstupní klíčivost	varianta ošetření						
	kontrol a suchá	kontrol a máčená	rGO_Cu 2	GO_Cu 1	Biochar_Cu 1	rGO_Zn 3	Cu_NPs_5 7
<b>klíčivost [%]</b>							
vysoká (93 %)	96,67	95,33	98,67	98,00	96,00	96,00	96,67
střední (73 %)	84,67	93,33	87,33	87,33	88,00	88,00	85,33
snížená (69 %)	66,00	46,67	58,00	66,00	56,67	67,33	62,00
<b>energie klíčení [%]</b>							
vysoká (93 %)	94,67	90,00	94,67	96,67	95,33	94,67	92,67
střední (73 %)	83,33	90,67	83,33	83,33	87,33	84,00	82,67
snížená (69 %)	48,00	32,00	24,00	40,67	33,33	50,67	40,67
<b>rychlost klíčení [%]</b>							
vysoká (93 %)	97,93	94,41	96,60	98,64	99,31	98,61	97,20
střední (73 %)	98,42	97,14	93,98	95,42	99,24	96,18	96,88
snížená (69 %)	72,72	70,59	41,86	64,89	60,24	76,00	66,30

*Vliv nanoprímingu na parametry klíčících rostlin*

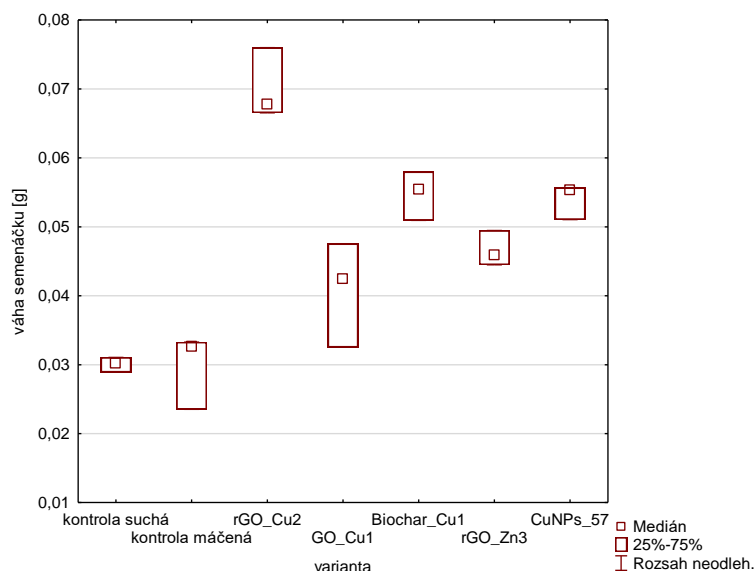
V případě klíčících rostlin zelí nebyl u osiva s vysokou vstupní klíčivostí prokázán rozdíl mezi kontrolami a variantami ošetření NMs u délky kořene ani délky stonku (Tabulka 3). Nejvyšší průměrná délka kořene byla zaznamenána u varianty ošetření rGO\_Cu2 (54,23 mm) a nejnižší u GO\_Cu1 (41,33 mm). Naproti tomu u parametru délky stonku varianta rGO\_Cu2 zahrnovala

nejnižší hodnoty (7,01 mm). Nejdelší stonky byly naměřeny u suché kontroly a ošetření Cu\_NPs\_57 (průměrná hodnota 8,85 mm).

Tabulka 3: Průměrné hodnoty vybraných charakteristik klíčnicích rostlin zelí po aplikaci nanoprimingu

Vstupní klíčivost	varianta ošetření						
	kontrola suchá	kontrola máčená	rGO_Cu2	GO_Cu1	Biochar_Cu1	rGO_Zn3	Cu_NPs_57
<b>délka kořene semenáčku [mm]</b>							
vysoká (93 %)	46,93	45,12	54,23	41,33	49,58	46,23	46,93
střední (73 %)	23,67	28,04	25,99	26,98	27,61	20,40	25,67
snížená (69 %)	19,69	4,55	6,65	11,69	13,05	8,13	17,27
<b>délka stonku semenáčku [mm]</b>							
vysoká (93 %)	8,85	8,49	7,01	7,33	8,47	8,25	8,85
střední (73 %)	9,99	11,21	12,27	11,39	12,44	11,43	8,68
snížená (69 %)	6,71	3,14	3,95	4,65	4,19	5,42	5,56
<b>váha semenáčku [g]</b>							
vysoká (93 %)	0,0301	0,0298	0,0701	0,0408	0,0548	0,0466	0,0540
střední (73 %)	0,0535	0,0536	0,0571	0,0585	0,0545	0,0615	0,0567
snížená (69 %)	0,0352	0,0199	0,0282	0,0296	0,0368	0,0252	0,0367

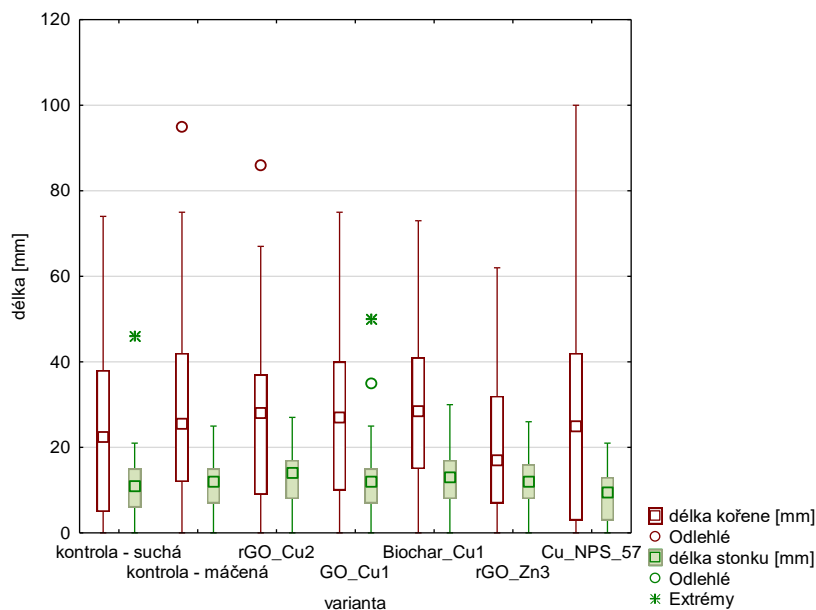
Přestože ošetření rGO\_Cu2 představovalo variantu s nejkratšími stonky, průměrná váha semenáčku u tohoto ošetření (0,0701 g) byla průkazně vyšší než váha suché a máčené kontroly i ošetření GO\_Cu1 a rGO\_Zn3 (Graf 1).



Graf 1: Průměrná váha semenáčeků z osiva zelí hlávkového ošetřeného NMs a kontrol v kategorii vysoké vstupní klíčivosti.

Efekt použití NMs byl pozorován pouze u osiva se střední hodnotou klíčivosti (Graf 2). Při použití Cu\_NPs\_57 byly naměřeny průkazně kratší stonky klíčnicích rostlin (průměrná hodnota 8,68 mm) než u variant rGO\_Cu2 (12,27 mm) a Biochar\_Cu1 (12,44 mm). Na délku kořene ani váhu semenáčeků však aplikace žádného z NMs průkazný vliv neměla. Přestože varianta

rGO\_Zn3 dosahovala nejnižší průměrnou délku kořenů (20,4 mm) a stonky o průměrné délce 11,43 mm, byla u tohoto ošetření zjištěna nejvyšší průměrná hmotnost semenáčků (0,0615 g, Tabulka 3).



Graf 2: Délky kořene a stonku klíčnicích rostlin zelí hlávkového se vstupní klíčivostí 73 %

V kategorii osiva se sníženou klíčivostí byly naměřeny nejdelší kořeny u varianty suché kontroly (průměrná hodnota 19,69 mm) a Cu\_NPs\_57 (průměrná hodnota 17,27 mm). Nejmenší průměrné délky kořene byly zaznamenány u primingu osiva za použití čisté sterilní vody (4,55 mm) a aplikace rGO\_Cu2 (6,65 mm). Průměrné délky stonku klíčnicích rostlin se pohybovaly v rozmezí 3,14 – 6,71 mm, kdy nejkratší stonky byly naměřeny u máčené kontroly a nejdelší stonky u varianty suché kontroly. Z variant ošetření NMs byly nejdelší stonky zaznamenány při použití Cu\_NPs\_57 (5,56 mm) a nejkratší u rGO\_Cu2 (3,95 mm). Průkazně rozdílné hodnoty délky kořene a stonku byly vyhodnoceny jen mezi sledovanými kontrolami. Těmto výsledkům odpovídala i váha semenáčků, kdy nejnižší průměrná hmotnost náležela variantě máčené kontroly (0,0199 g) a nejvyšší ošetření Biochar\_Cu1 (0,0368 g) a Cu\_NPs\_57 (0,0367 g).

## Diskuze

Nanotechnologie je prezentována jako perspektivní nástroj dodávání mikroprvků pro zlepšení klíčivosti, růstu a výnosu polních plodin či jejich ochrany před abiotickými a biotickými stresory. Nanomateriály spojující antimikrobiální vlastnosti s podporou růstu rostlin tak představují ekonomicky zajímavý přístup v předset'ovém ošetření osiva. Výsledky dosažené v této studii bohužel neprokázaly benefiční účinek použitých antimikrobiálních NMs u osiva zelí hlávkového v ohledu dosažení vyššího procenta klíčivosti. Vzhledem k pozitivním výsledkům metody nanoprimingu uváděným pro velké množství zeleninových druhů včetně brukvovitých rostlin (Nile et al., 2022), mohl být nízký vliv použitých NMs na procento klíčivosti způsoben použitými prvky NMs, jejich koncentrací v primovacím roztoku, kombinací s nosičem nebo zvolenou dobou ošetření.

Měď i zinek představují mikroprvky nezbytné pro správný vývoj rostlin a jsou v nanoprimingu osiva zelenin úspěšně používány (Hong et al., 2016; Nair a Chung, 2015; Patlolla et al., 2012). Jejich koncentrace 50 mg.l<sup>-1</sup> byla zvolena na základě pozitivních výsledků dosažených pro měďnaté a zinečnaté nanomateriály ve studii Bayat et al. (2022) testované na osivu pšenice a

lnu, kdy vyšší koncentrace těchto prvků (100 a 150 mg.l<sup>-1</sup>) v NMs vedly k nižšímu procentu klíčivosti u obou plodin. Negativní vliv vysokých koncentrací NMs uvádí také Maity et al. (2018) u nanoprimingu čiroku a cizrny, kdy aplikace dávky 1000 mg mědi i zinku na kilogram osiva průkazně snížila jejich klíčivost. Na druhou stranu aktivita NMs je spojována nejen s koncentrací jejich kovových částí, ale i s formou výchozích prekurzorů, velikostí vytvořených nanočástic a jejich uvolňováním z nosiče. Stejně koncentrované roztoky obsahující různé typy NMs tak mohou vést k odlišným účinkům.

Překvapivý výsledek byl obdrženo u osiva se sníženou klíčivostí, kdy použití vody ve variantě máčené kontroly vedlo ke snížení procenta klíčivosti o 20 %. Výsledky studií hydroprimingu uvádějí pouze pozitivní vliv na procento klíčivosti, a to i u rok starého osiva řepky (Day, 2022). Za sníženou klíčivost mohly pravděpodobně pěstební podmínky pokusu, kdy vysoká vlhkost a umístění ve skládaném filtračním papíru způsobily uhnutí osiva nebo radikuly klíčící rostliny.

Použití testovaných NMs nevedlo sice k zásadnímu zlepšení klíčících vlastností u žádné ze tří skupin osiva, ovšem jejich vliv byl následně pozorován u klíčících rostlin. Z hlediska délky kořenů, které mohou rostlinám poskytovat výhodu v období sucha, byl u osiva s vysokou klíčivostí vyhodnocen pozitivní vliv aplikace rGO\_Cu<sub>2</sub>. Tento efekt mohl být způsoben schopností oxidu grafenu proniknout semennými obaly a zlepšit tak příjem vody semenem (Kim et al., 2020). Podobného výsledku prodloužení kořenů klíčících rostlin po použití NMs s oxidem grafenu dosáhli například Zhang et al. (2015) a Jiao et al. (2016) u rostlin rajčat a tabáku. Weng et al. (2020) však upozorňuje, že materiály na bázi grafenu mají odlišný účinek v závislosti na jeho koncentraci, fyzikálně-chemických parametrech a na druhu testovaných rostlin. Rozdílnost v reakci rostlin byla pozorována i v naší studii, kdy u osiva se střední klíčivostí vedla aplikace částic rGO\_Cu<sub>2</sub> ke kratším kořenům.

Z výsledků této studie lze jako benefiční faktor použití NMs na osivo zeli uvést spíše samotný mikroprvek, než jeho způsob navázání na uhlíkový nosič. Obsah mědi v rostlině je obecně zmiňován zejména s jejím výskytem v nadzemních částech rostliny a v chloroplastech (Richter, 2004), při katalýze enzymatických procesů rostlin a syntéze RNA (Verma et al., 2011). Zvýšení enzymatické aktivity a fotosyntetické činnosti rostliny prostřednictvím příjmu mědi jako mikronutrientu z měďnatých NMs tak může mít v konečném důsledku vliv na vyšší tvorbu nadzemní biomasy. Obdobně jako měď je i význam zinku popisován ve spojitosti s katalytickou funkcí metabolických procesů v rostlině, fotosyntézou, integritou buněčných membrán a vlivem na obsah chlorofylu v pletivech (Rudani et al., 2018).

Vliv použitého nosiče měďnatých NMs byl pozorován jen u osiva se sníženou vstupní klíčivostí. V rámci 10 denního experimentu byl růst kořenů a stonků zeli pravděpodobně stimulován čistými částicemi mědi (Cu\_NPs\_57), které nebyly navázány na žádný uhlíkový nosič. Jejich rychlejší dostupnost mohla hrát roli v podpoře růstu klíčících rostlin u osiva se sníženou klíčivostí. V případě odhalení příčiny snížené klíčivosti osiv z čerstvých sklizní se metoda nanoprimingu jeví jako jedna z perspektivních cest řešení tohoto problému, a to cílenou aplikací podpůrného mikroprvku u fyziologických příčin poklesu klíčivosti nebo aplikací prvku s antimikrobiálním účinkem u biotických stresorů.

Z hlediska biotických stresorů je jako výhodnější prezentováno použití NMs s uhlíkovými nosiči než volné částice mědi. Postupné uvolňování mědi z těchto materiálů vede k výraznějšímu antimikrobiálnímu účinku a jejich použití v osivářství může mít v době vysokého tlaku chorob větší přínosy pro klíčící rostliny než čisté měďnaté nanočástice. Volné nanočástice mají také tendenci se shlukovat a aglomerace volných nanočástic je jednou z příčin snižování jejich biologického účinku, jak popisují Alswat et al. (2017), Li et al. (2017), Ocoy et al. (2013) nebo Sarkar et al. (2012).

Výsledky této studie poukazují na perspektivu použití NMs v osivářství pro dosažení kvalitnějších klíčících rostlin, ale také upozorňují na problematiku volby účinného



nanomateriálu s ohledem na charakteristiku vstupního osiva a nízkou dostupnost referencí v literatuře vzhledem k téměř neomezeným možnostem syntézy různých typů NMs.

## Závěr

Na základě zjištěných výsledků lze pro aplikaci zvolených nanomateriálů v osivářství vyvodit následující doporučení:

- a) U osiva s vysokým procentem vstupní klíčivosti, kde není požadavek na jeho další zvyšování, se jeví jako perspektivní ošetření nanomateriálem rGO\_Cu<sub>2</sub>, které vedlo k vytvoření klíčících rostlin s dlouhými kořeny, krátkými stonky a vysokou hmotností.
- b) Aplikací nanoprímingu na osivo se střední klíčivostí se procento klíčivosti osiva průkazně nezvýšilo, ale při ošetření nanomateriálem rGO\_Zn<sub>3</sub> lze dosáhnout rostlin sice s kratšími kořeny, ale pravděpodobně pevnějšími pletivy vzhledem ke krátkým stonkům a vysoké hmotnosti semenáčků.
- c) U osiva se sníženou klíčivostí se jeví jako vhodné použití nanomateriálu rGO\_Zn<sub>3</sub>, čímž se procento klíčivosti mírně zvýší. S ohledem na klíčící rostliny lze doporučit ošetření Cu\_NPs\_57, které vedlo k větším semenáčkům z hlediska délky kořenů, stonků i celkové hmotnosti.

## Poděkování

Príspevek vznikl za podpory projektu CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002334 Výzkumná infrastruktura pro mladé vědce. Výzkum proběhl za podpory projektu NAZV číslo QK22010031 - Využití inovativního potenciálu nanotechnologií pro zvýšení rentability vybraných oblastí zemědělské produkce.

## Literatura

- ALSWAT, A. A.; M. B. AHMAD a T. A. SALEH Preparation and characterization of zeolite/zinc oxide-copper oxide nanocomposite: Antibacterial activities. *Colloid and Interface Science Communications*, 2017/01/01/ 2017, 16, 19-24.
- BAYAT, M.; M. ZARGAR; K. M.-S. MURTAZOVA; M. R. NAKHAEV, et al. Ameliorating seed germination and seedling growth of nano-primed wheat and flax seeds using seven biogenic metal-based nanoparticles. *Agronomy*, 2022, 12(4), 811.
- DAY, S. Impact of seed priming on germination performance of fresh and aged seeds of canola. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 2022, 6(1), 37-40.
- DRAGICEVIC, V.; M. SPASIC; M. SIMIC; Z. DUMANOVIC, et al. Stimulative influence of germination and growth of maize seedlings originating from aged seeds by 2,4-d potencies. *Homeopathy*, Jul 2013, 102(3), 179-186.
- GEORGE, R. A. T. Vegetable seed production. Edtion ed.: CABI, 2009. ISBN 1845935217.
- GUHA, T.; K. V. G. RAVIKUMAR; A. MUKHERJEE; A. MUKHERJEE, et al. Nanopríming with zero valent iron (nzvi) enhances germination and growth in aromatic rice cultivar (oryza sativa cv. Gobindabhog 1.). *Plant Physiol Biochem*, Jun 2018, 127, 403-413.
- HONG, J.; L. WANG; Y. SUN; L. ZHAO, et al. Foliar applied nanoscale and microscale ceo<sub>2</sub> and cuo alter cucumber (cucumis sativus) fruit quality. *Science of the Total Environment*, 2016/09/01/ 2016, 563-564, 904-911.
- ISTA. Metodika zkoušení sadby a osiva. 2014. 1. vydání. 303 s. Platné od 01.06.2014.
- JEEVAN KUMAR, S. P.; S. RAJENDRA PRASAD; R. BANERJEE a C. THAMMINENI Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*, 2015, 116(4), 663-668.
- JIAO, J.; C. YUAN; J. WANG; Z. XIA, et al. The role of graphene oxide on tobacco root growth and its preliminary mechanism. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2016, 16(12), 12449-12454.
- KIM, M. J.; W. KIM a H. CHUNG Effects of silver-graphene oxide on seed germination and early growth of crop species. *PeerJ*, 2020, 8, e8387.

- LI, Y.; D. YANG a J. CUI Graphene oxide loaded with copper oxide nanoparticles as an antibacterial agent against pseudomonas syringae pv. Tomato. RSC Advances, 2017, 7(62), 38853-38860.
- MAHAKHAM, W.; A. K. SARMAH; S. MAENSIRI a P. THEERAKULPISUT Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. Scientific Reports, 2017/08/15 2017, 7(1), 8263.
- MAITY, A., NATARAJAN, N., PASTOR, M., VITAY, D, et al. Nanoparticles influence seed germination traits and seed pathogen infection rate in forage sorghum (*Sorghum bicolor*) and cowpea (*Vigna unguiculata*). Indian Journal of Experimental Biology. 2018, 56, 363-372.
- NAIR, P. M. G. a I. M. CHUNG A mechanistic study on the toxic effect of copper oxide nanoparticles in soybean (glycine max l.) root development and lignification of root cells. Biological Trace Element Research, 2014/12/01 2014, 162(1), 342-352.
- NILE, S. H.; M. THIRUVENGADAM; Y. WANG; R. SAMYNATHAN, et al. Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture—recent developments and future perspectives. Journal of Nanobiotechnology, 2022/06/03 2022, 20(1), 254.
- OCISOY, I.; M. L. PARET; M. A. OCISOY; S. KUNWAR, et al. Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against xanthomonas perforans. ACS Nano, 2013, 7(10), 8972-8980.
- PATLOLLA, A. K.; A. BERRY; L. MAY a P. B. TCHOUNWOU Genotoxicity of silver nanoparticles in vicia faba: A pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2012, 9(5), 1649-1662.
- RICHTER, R. Měď. Multimediální učební texty z výživy rostlin. 2004. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/vyziva\\_rostlin/html/biogenni\\_prvky/cu.htm](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/cu.htm).
- RUDANI, K., PATEL, V. a PRAJAPATI, K. The importance of zinc in plant growth – a review. International Research Journal of Natural and Applied Sciences. 2018, 5(2), 38-48.
- SARKAR, S.; E. GUIBAL; F. QUIGNARD a A. K. SENGUPTA Polymer-supported metals and metal oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. Journal of Nanoparticle Research, 2012/01/25 2012, 14(2), 715.
- VERMA, J.P, SINGH, V. a YADAV, J. Effect of Copper Sulphate on Seed Germination, Plant Growth and Peroxidase Activity of Mung Bean (*Vigna radiata*). International Journal of Botany. 2011, 7(2), 200-204.
- WENG, Y.; Y. YOU; Q. LU; A. ZHONG, et al. Graphene oxide exposure suppresses nitrate uptake by roots of wheat seedlings. Environmental Pollution, 2020/07/01/ 2020, 262, 114224.
- ZHANG, M.; B. GAO; J. CHEN a Y. LI Effects of graphene on seed germination and seedling growth. Journal of Nanoparticle Research, 2015/02/06 2015, 17(2), 78.

**Kontakt:**

Pečenka Jakub, Ing.

Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta

Valtická 337, 691 44 lednice

+420 519 367 307, [jakub.pecenka@mendelu.cz](mailto:jakub.pecenka@mendelu.cz)

## Vliv vodní eroze na půdní respiraci a obsah mikrobiální biomasy

Effect of water erosion on soil respiration and microbial biomass content

Plisková, J.<sup>1,2</sup>, Boturová, K.<sup>1</sup>, Pospíšilová, L.<sup>1</sup>, Menšík, L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, VS Jevíčko

### Abstrakt

V katastrálním území Bošovice (2019-2022) byly sledovány změny biologických parametrů půdy na erozních, akumulčních a kontrolních plochách. Hodnocena byla bazální respirace půdy, množství mikrobiální biomasy a obsah a kvalita půdní organické hmoty. Transformace půdních vlastností vlivem eroze a korelační vztahy byly hodnoceny pomocí více faktorové analýzy ANOVA v transektu: *kontrola – eroze – akumulace*. Klasifikace půd v sledovaném transektu byla provedena dle platného Taxonomického systému půd ČR. Množství mikrobiální biomasy bylo stanoveno fumigačně-extrakční metodou. Bazální respirace půdy byla stanovena dle ISO 16072. Základní půdní vlastnosti byly stanoveny standardními metodami. Zjištěné výsledky dokládají značnou heterogenitu půdy a variabilitu sledovaných parametrů – obsah organického uhlíku, mikrobiální biomasa a bazální respirace půdy ve vybraném transektu. Statisticky průkazné rozdíly ( $p=0,05$ ) u sledovaných parametrů nebyly zjištěny.

**Klíčová slova:** biologické parametry půdy; eroze; černozem

### Abstract

In the cadastre Bošovice (2019-2022) we followed changes in soil biological parameters such as basal soil respiration, microbial biomass content, and content and quality of soil organic matter. Eroded, accumulated and control sites were compared. The transformation of soil properties was evaluated using multifactorial analysis. Soils were classified according to the Taxonomic classification system of the Czech Republic. Microbial biomass was determined by the fumigation-extraction method. Basal soil respiration was determined according to ISO 16072. Basic soil properties were determined by standard analytical methods. Obtained results showed no statistically significant differences ( $p=0,05$ ) within the studied transect (control, erosion, accumulation sites). In conclusion, soil organic matter content and quality, basal soil respiration and amount of microbial biomass are highly variable.

**Keywords:** soil biological parameters; erosion; Chernozem

### Úvod

Vodní a větrná eroze redistribuje půdní částice z horních svahů do nižších poloh v krajině a představuje vážný environmentální problém nejen v Evropě, ale i ve světě (Žížala et al., 2021; Pimentel et al., 1995). Je to spojeno zejména s udržitelností zemědělství (ekologickou funkcí) a produkční kapacitou zemědělství (schopnost produkce) (Svoray & Atkinson, 2013; Wang et al., 2016). V potaz se musí brát i další faktory jako je klimatická změna, využití půdy, intenzita obdělávání a mnoho dalších (Svoray & Atkinson, 2013; Vanmaercke et al., 2011). V 90. letech 20. století byla problematika redistribuce (eroze a akumulace) podrobně studována a bylo zjištěno, že při smyvu půdy, může být každoročně nenávratně ztraceno až 10 milionů ha světové zemědělské půdy, což činí zhruba jednu jejich třetinu (Lindstrom et al., 1992; LOBB et al., 1995; Žížala et al., 2021; Ellerbrock et al., 2016; Pimentel et al., 1995). Půdám, které jsou intenzivně obdělávány se proto věnuje velká pozornost a jsou doporučeny postupy hospodaření, které zamezují erozi a chrání půdu (Ellerbrock et al., 2016; Li et al., 2017; Wright et al., 2007). Jedním z negativních důsledků eroze je transport značného množství materiálu, tj. odnos z horní části svahu (konvexní plocha) a jeho akumulace v nižších polohách

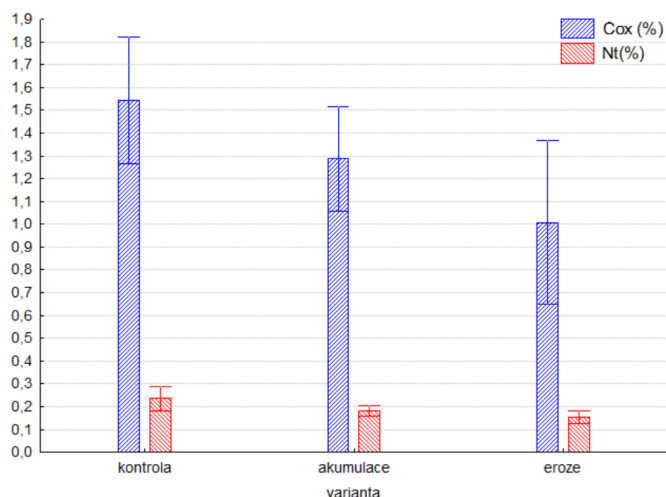
svahu (konkavní svah) v topologicky složitých krajinách (Lindstrom et al., 1992; Papiernik et al., 2007; J. H. Zhang et al., 2009). S tím jsou úzce spojeny i změny půdních vlastností. Je snahou zamezit vysoké erozi a akumulaci různými agrotechnickými způsoby, např. pomocí interakce sklonů a zpracováním půdy, směrem orby, zatravněním (Wang et al., 2015, 2016; Wildemeersch et al., 2014). V důsledku smyvu rovněž klesá mocnost ornice (humusového horizontu), obsah a zásoba organického uhlíku, což zásadně ovlivňuje produktivitu půdy. Dalším problémem je ovlivňování biogeochemických cyklů látek a života v půdě (Doetterl et al., 2016; Quinton et al., 2010; Van Oost et al., 2007; Žižala et al., 2021). Cílem výzkumu je stanovit a porovnat vlastnosti půdy na erodovaných, akumulovaných a kontrole a poukázat na jejich transformaci.

### **Materiál a metody**

Výzkumná plocha se nachází v katastrálním území Bošovice (okres Vyškov). Monitoring byl prováděn v letech 2019 až 2022. Klimatická oblast pro tuto lokalitu byla určena jako T2 – teplá, mírně suchá. Průměrné hodnoty srážek se pohybují mezi 500 až 600 mm, průměrná roční teplota vzduchu je 8,8°C (Quitt, 1972). Půdní typ u kontroly byl klasifikován jako černozem karbonátová, antropická. Na erodované ploše byla klasifikována regozem karbonátová a na akumulované ploše byla klasifikována koluvizem karbonátová (Němeček a kol., 2011). Půdní vzorky byly odebrány z orníčního Ap horizontu 0-10 cm. Půdní reakce byla stanovena potenciometrickou metodou: 50 ml 0,2 mol KCl (InoLab pH 730, WTW, Německo). Obsah organického uhlíku (Cox) byl stanoven oxidimetrickou titrací podle (Nelson, Sommers 1996). Frakcionace humusových látek byla provedena krátkou frakcionací (Kononova, 1963). Postup: obsah HK a FK (= součet HL) byl extrahován z 5 g vzorku půdy se 100 ml 0,1 M roztoku NaOH a 0,1 M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1:1, obj./obj.). Uhlík v HL, HK byl stanoven metodou oxidimetrické titrace. Obsah FK byl vypočten jako rozdíl mezi HL a HK. Celkový obsah dusíku (Nt) byl stanoven dle Kjeldahla (Zbiral a kol., 2022). Množství mikrobiální biomasy bylo stanoveno fumigačně-extrakční metodou dle Vance et al. (1987). Bazální respirace půdy byla stanovena dle ISO 16072. Statistické analýzy (popisná statistika, t-test, ANOVA) včetně grafických výstupů budou zpracovány v programu STATISTICA 14 (TIBCO Software Inc.).

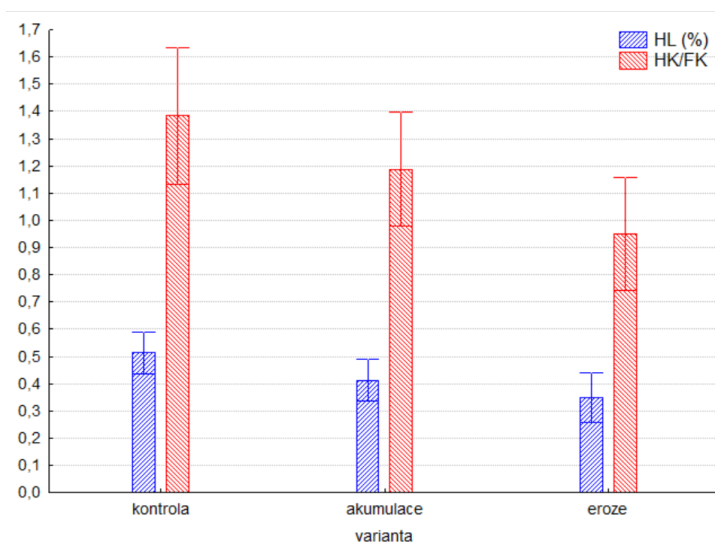
### **Výsledky**

Na erozních, akumulacích a kontrolních plochách jsou hodnoceny a porovnány tyto parametry – obsah organického uhlíku (Cox), celkový dusík (Nt), obsah humusových látek (HL) a poměr fulkovyselin a huminokyselin (HK/FK), bazální respirace půdy (BRP) a množství mikrobiální biomasy (Cmic). U všech sledovaných parametrů byla zjištěna vysoká/velká variabilita. Celkový obsah organického uhlíku je vyšší u variant kontrola a akumulace v porovnání s erozí. Rozdíly nejsou statisticky významné – viz graf 1. Varianta eroze je tak díky odnosu degradována a poškozena. Varianta kontrola s nejvyšším obsahem celkového uhlíku se statisticky významně neliší od ostatních variant. U obsahu dusíku (Nt) nebyly zjištěny průkazné rozdíly mezi variantami – viz graf 1.



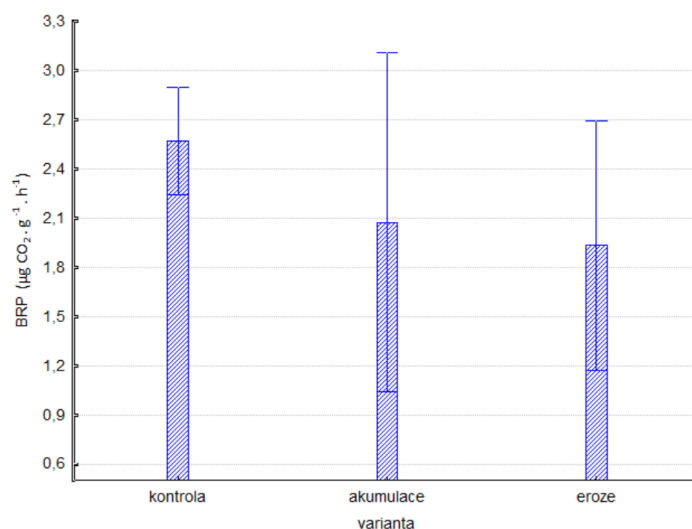
Graf 1 Průměrný obsah Cox (%) a Nt (%) ve variantách kontrola, akumulace a eroze v letech 2019 až 2022

Podobná situace je u obsahu HL, kdy na erodované půdě klesá celkový obsah HL. Rozdíly jsou statisticky nevýznamné. Rovněž poměr HK/FK je staticky neprůkazný u těchto variant – viz graf 2.



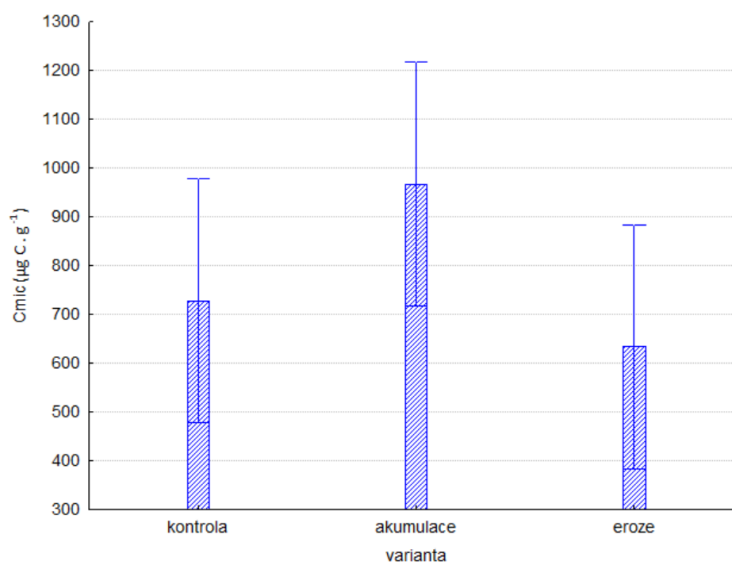
Graf 2 Obsah HL a poměr HK/FK ve variantách kontrola, akumulace a eroze v letech 2019 až 2022

Na grafu 3 je dokumentována bazální respirace půdy. Vysoká variabilita je na variantě akumulace (značí ji úsečky). Mezi sledovanými variantami není významný rozdíl, přes to, že varianta kontrola je vyšší než ostatní varianty (akumulace, eroze).



Graf 3 Obsah BRP ( $\mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) ve variantách kontrola, akumulace a eroze v letech 2019 až 2022

Na grafu 4 je uveden obsah mikrobiálního uhlíku (Cmic). Nejvyšší obsah byl zaznamenán u varianty akumulace. Varianta eroze je díky odnosu půdy ochuzena o mikrobiální uhlík. Varianta akumulace má vyšší obsah Cmic v porovnání s ostatními variantami (kontrola a eroze) avšak se nejedná o významný rozdíl mezi variantami.



Graf 4 Obsah Cmic ( $\mu\text{g C} \cdot \text{g}^{-1}$ ) ve variantách kontrola, akumulace a eroze v letech 2019 až 2022

## Diskuze

Čtyřleté sledování vlivu vodní eroze na vlastnosti černozemí na lokalitě Bošovice (okres Vyškov) mělo za cíl porovnat erodované a akumulované plochy s kontrolou. Byly zjištěny změny v množství a kvalitě HL, u množství mikrobiální biomasy a v půdní respiraci. Erodaná půda je tak značně biologicky poškozena a ochuzena. Akumulovaná plocha se liší od kontroly hlavně nižším obsahem mikrobiální biomasy. Lze tedy konstatovat, že vodní eroze negativně ovlivňuje mikrobiální biomasu a půdní respiraci. Rovněž Zhang et al. (2019) uvádějí, že erodované půdy mají nižší obsah organického uhlíku v porovnání s kontrolou a akumulací, což potvrzuje i naše sledování. Dle Xiao et al. (2017) je mikrobiální aktivita přímo závislá na obsahu přístupného dusíku. Dále uvádějí, že množství mikrobiální biomasy nemusí vždy souviset s intenzitou mikrobiální respirace. Rovněž konstatují, že na konvexní části svahu je největší množství mikrobiální biomasy a nejméně biomasy je v místě silného projevu eroze,

což potvrzuje i náš výzkum. De Ploey a Poesona (1985) uvádějí, že s činností mikroorganismů souvisí i stabilita půdních agregátů další půdní vlastnosti. Tyto mohou být negativně ovlivněny erozí (De Ploey a Poesona, 1985 in: Cantón a kol., 2009). Dle nich jsou tak agronomicky cenné agregáty, s vysokým obsahem půdní organické hmoty, rozplaveny a organický uhlík rychleji mineralizuje (Cantón a kol., 2009).

### Závěr

Výsledky výzkumu ukazují vysokou variabilitu sledovaných parametrů na daných variantách. Negativní dopad eroze na biologické parametry půdy jsou však patrné. Bez dodržování protierozních opatření není možné intenzivně/trvale hospodařit na erodovaných půdách. Eroze dále narušují zemědělskou jistotu - výnos. Ochuzení půdy je zásadní a je důležité tuto skutečnost dále sledovat. I přes to, že nebyla prokázána žádná statisticky významná ztráta, je důležité si uvědomit, že vodní eroze napomáhá ke ztrátě produktivity půd i její schopnosti plnit svoji funkci v ekosystému, která je v diskuzi potvrzena. Z tohoto důvodu jsou v rámci pravidel DZES doporučeny takové agrotechnické postupy, které půdy chrání před erozí (např. zatravnění, setí po vrstevnici, důlkování apod.).

### Poděkování

Práce je vypracována s podporou projektů Země QK1810233 „Kvantifikace dopadů hospodaření na erozi, kvalitu půd a výnosy pěstovaných plodin s návrhem pěstebních technologií šetrných k životnímu prostředí“ NAZVA ISTA QK21010124 „Půdní organická hmota – hodnocení vybraných indikátorů kvality“ a projektu RO-0418 (MZe, ČR).

### Literatura

- Cantón, y. A kol., 2009. Aggregate stability in range sandy loam soils relationships with runoff and erosion. *Catena* [online]. 77(3), 192-199. [cit. 2022-04-18]. Issn 03418162. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2008.12.011>
- doetterl, s., berhe, a. A., nadeu, e., wang, z., sommer, m., & fiener, p. (2016). Erosion, deposition and soil carbon: a review of process-level controls, experimental tools and models to address c cycling in dynamic landscapes. *Earth-science reviews*, 154, 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2015.12.005>
- Ellerbrock, r. H., gerke, h. H., & deumlich, d. (2016). Soil organic matter composition along a slope in an erosion-affected arable landscape in north east germany. *Soil and tillage research*, 156, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.still.2015.08.014>
- Kononova, m.m., bělčikova, n.p.: uskorenyj metod opredelenia sostava gumusa mineralnyh počv. In.: kononova, m.m. organičeskoje veščestvo počvy. Moskva, 1963, pp.228-234
- Li, z., nie, x., he, j., chang, x., liu, c., liu, l., & sun, l. (2017). Zonal characteristics of sediment-bound organic carbon loss during water erosion: a case study of four typical loess soils in shaanxi province. *Catena*, 156(may), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.05.001>
- Lindstrom, m. J., nelson, w. W., & schumacher, t. E. (1992). Quantifying tillage erosion rates due to moldboard plowing. *Soil and tillage research*, 24(3), 243–255. [https://doi.org/10.1016/0167-1987\(92\)90090-x](https://doi.org/10.1016/0167-1987(92)90090-x)
- Lobb, d. A., kachanoski, r. G., & miller, m. H. (1995). Tillage translocation and tillage erosion on shoulder slope landscape positions measured using cs-137 as a tracer. *Canadian journal of soil science*, 75(2), 211–218. <https://doi.org/10.4141/cjss95-029>
- Nelson d.w., sommers l.e. (1996). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: sparks dl et al. (ed) methods of soil analysis. Part 3. Pp 961–1010.
- Němeček j., mühlhanslová m., macků j., vokoun j., vavříček d., novák p. A kol., 2011: taxonomický klasifikační systém půd české republiky. Čzu praha, praha, 93 s. Isbn 978-80-213-2155-7
- Papiernik, s. K., lindstrom, m. J., schumacher, t. E., schumacher, j. A., malo, d. D., & lobb, d. A. (2007). Characterization of soil profiles in a landscape affected by long-term tillage. *Soil and tillage research*, 93(2), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.still.2006.05.007>
- Pimentel, d., harvey, c., resosudarmo, p., sinclair, k., kurz, d., mcneair, m., ... & blair, r.

- (1995). Environmentální a ekonomické náklady eroze půdy a přínosy pro ochranu. *Science*, 267 (5201), 1117–1123.
- Quinton, j. N., govers, g., van oost, k., & bardgett, r. D. (2010). The impact of agricultural soil erosion on biogeochemical cycling. *Nature geoscience*, 3(5, si), 311–314.  
<https://doi.org/10.1038/ngeo838>
- Quitt e. (1971): klimatické oblasti československa. *Studia geographica* 16. Brno: čsav-gu, 80.
- Svoray, t., & atkinson, p. M. (2013). Geoinformatics and water-erosion processes. *Geomorphology*, 183, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2012.10.001>
- Van oost, k., quine, t. A., govers, g., de gryze, s., six, j., harden, j. W., ritchie, j. C., mccarty, g. W., heckrath, g., kosmas, c., giraldez, j. V, da silva, j. R. M., & merckx, r. (2007). The impact of agricultural soil erosion on the global carbon cycle. *Science*, 318(5850), 626–629.  
<https://doi.org/10.1126/science.1145724>
- Vance, e. D., brookes, p. C., jenkinson, d. S., 1987: an extraction method for measuring soil microbial biomass-c. *Soil biology and biochemistry* 19: 703–707. [cit. 2022-04-10]. Issn 0038-0717.  
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vanmaercke, m., poesen, j., verstraeten, g., de vente, j., & ocakoglu, f. (2011). Sediment yield in europe: spatial patterns and scale dependency. *Geomorphology*, 130(3–4), 142–161.  
<https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2011.03.010>
- Wang, y., zhang, j. H., & zhang, z. H. (2015). Influences of intensive tillage on water-stable aggregate distribution on a steep hillslope. *Soil and tillage research*, 151, 82–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.still.2015.03.003>
- Wang, y., zhang, j. H., zhang, z. H., & jia, l. Z. (2016). Impact of tillage erosion on water erosion in a hilly landscape. *Science of the total environment*, 551–552(9), 522–532.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.045>
- Wildemeersch, j. C. J., vermag, j., cornelis, w. M., diaz, j., gabriels, d., & ruiz, m. E. (2014). Tillage erosion and controlling factors in traditional farming systems in pinar del río, cuba. *Catena*, 121, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.05.027>
- Wright, a. L., dou, f., & hons, f. M. (2007). Soil organic c and n distribution for wheat cropping systems after 20 years of conservation tillage in central texas. *Agriculture, ecosystems and environment*, 121(4), 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.11.011>
- Xiao, haibing a kol., 2017. Soil erosion-related dynamics of soil bacterial communities and microbial respiration. *Applied soil ecology* [online]. 119, 205–213. [cit. 2022-04-18]. Issn 09291393.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.018>
- Zbiral, j., malý, s. A kol. 2022. Analýza půd iii: jednotné pracovní postupy. Vydání čtvrté, rozšířené a přepracované. Brno: ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Isbn 978-80-7401-211-2.
- zhang, j. H., su, z. A., & nie, x. J. (2009). An investigation of soil translocation and erosion by conservation hoeing tillage on steep lands using a magnetic tracer. *Soil and tillage research*, 105(2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.still.2009.07.006>
- Zhang, x., li, z., nie, x., huang, m., wang, d., xiao, h., liu, c., peng, h., jiang, j., & zeng, g. (2019). The role of dissolved organic matter in soil organic carbon stability under water erosion. *Ecological indicators*, 102(march), 724–733. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.03.038>
- Žížala, d., juřicová, a., kapička, j., & novotný, i. (2021). The potential risk of combined effects of water and tillage erosion on the agricultural landscape in czechia. *Journal of maps*, 17(2), 428–438. <https://doi.org/10.1080/17445647.2021.1942251>

**Kontaktní adresa:**

Ing. Jana Plisková  
Mendelova univerzita v Brně  
Agronomická fakulta  
Zemědělská 1  
613 00 Brno  
e-mail: [xplisko2@mendelu.cz](mailto:xplisko2@mendelu.cz)



## Porovnání kvantitativních a kvalitativních ukazatelů vybraných odrůd čiroku pro silážní účely pěstovaných na dvou půdně odlišných stanovištích

Comparison of quantitative and qualitative indicators of selected varieties of sorghum for silage purposes grown on two soil-different localities

Porčová L., Rábek M., Řiháček M., Frantová N., Elzner P., Smutný V.

*Mendelova univerzita v Brně*

### Abstrakt

Tento příspěvek porovnává produkci nadzemní biomasy v suché hmotě a nutriční ukazatele vybraných odrůd čiroku se suchovzdorným hybridem kukuřice z pohledu silážní využitelnosti ve výživě skotu. Experiment probíhal v hospodářských letech 2021 a 2022 na dvou půdně odlišných lokalitách s rozdílnou dostupností půdní vláhy. V roce 2021 dosáhla kukuřice na sledovaných stanovištích průměrného výnosu suché nadzemní biomasy  $19,22 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ , odrůdy čiroku dosahovaly průměrných výnosů suché nadzemní biomasy v rozmezí  $14,48\text{--}31,49 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Obdobný nebo vyšší výnos suché hmoty vůči kukuřici dosáhlo na jedné z lokalit všech 7 testovaných odrůd čiroku. V roce 2022 byl průměrný výnos suché hmoty u kukuřice  $20,06 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ , u čiroku se pohyboval průměrný výnos suché hmoty v rozmezí  $7,87\text{--}21,80 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Srovnatelný výnos s kukuřicí byl v roce 2022 zaznamenán pouze u jedné odrůdy čiroku.

**Klíčová slova:** čirok, kukuřice, siláž, výnos suché nadzemní biomasy, nutriční hodnota

### Abstract

This contribution compares the aboveground biomass production in dry matter and the nutritional indicators of selected varieties of sorghum with a drought-resistant maize hybrid from the perspective of silage applicability in cattle nutrition. The experiment was conducted at two localities with different soil types and different availability of soil moisture in the years 2021 and 2022. Maize achieved an average yield of dry above-ground biomass (DAGB) of  $19.22 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  at the experimental localities; sorghum varieties achieved average yields of DAGB in the range of  $14.48\text{--}31.49 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  in year 2021. All 7 tested varieties of sorghum achieved a similar or higher yield of DAGB compared to maize at one of the locality. In 2022, the yield of DAGB for maize was  $20.06 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ , and the yield of DAGB of sorghum was  $7.87\text{--}21.80 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ . A comparable yield with maize was recorded for only one variety of sorghum in year 2022.

**Keywords:** sorghum, maize, silage, yield of dry above-ground biomass, quality of yield

### Úvod

Nedílnou součástí krmné dávky pro skot v intenzivní živočišné výrobě je kukuřičná siláž. Díky množství hybridů s rozmanitým FAO je možné dnes už vybrat vhodný hybrid prakticky pro každou výrobní oblast České republiky. Nicméně, srážkové i teplotní poměry patří k základním faktorům tvorby výnosu polních plodin. V posledních letech se stále častěji vyskytuje meteorologické i půdní sucho, které působí na výnos plodin velmi negativně. Čirok jakožto subtropická plodina se ve velké míře pěstuje v zemích se suchým klimatem, ale jeho obliba bude pravděpodobně vzhledem k měnícímu se klimatu stoupat i u českých zemědělců. Proto je už nyní potřeba věnovat pozornost výběru odrůd čiroku, které by byly po kvantitativní i kvalitativní stránce vhodné k výrobě čirokové siláže, která by mohla doplnit krmnou dávku a částečně nahradit kukuřičnou siláž, zejména v suchých letech, kdy nebude možné vyrobit dostatečné množství kvalitní kukuřičné siláže. Tento příspěvek hodnotí produkci nadzemní

biomasy v suchém stavu a nutriční ukazatele u 7 odrůd čiroku a jednoho suchovzdorného hybridu kukuřice pěstovaných na půdně odlišných pozemcích Polní pokusné stanice Žabčice, Mendelovy univerzity v Brně, které se nacházejí ve velmi suché a teplé klimatické oblasti jižní Moravy.

## **Materiál a metody**

### *Charakteristika zájmové oblasti*

Zájmová oblast leží v oblasti jižní Moravy, v okrese Brno-venkov. Areál spadá do Dyjsko-svrateckého úvalu. Jedná se o kukuřičnou výrobní oblast s průměrným ročním úhrnem srážek 491 mm a průměrnou roční teplotou 10,3 °C. Suchost klimatu zvyšují časté větry. Do oblasti zasahuje srážkový stín. Pozemky jsou rovinaté, bez ohrožení vodní erozí, s nadmořskou výškou cca 190 m n. m.

### *Charakteristika stanovišť*

Pro porovnání výnosu suché nadzemní biomasy různých odrůd čiroku vhodných k silážování a silážní kukuřice byly v letech 2021 a 2022 založeny maloparcelní polní pokusy na dvou stanovištích, na lokalitě Nosislav a Unkovice.

Stanoviště Nosislav (GPS souřadnice pokusu 49°01'28.7"N, 16°37'07.8"E) se vyznačuje dobrou dostupností podzemní vody, z pedologického hlediska se jedná o půdní typ fluvizem glejová (vzniklá z nivních sedimentů řeky Svatky), půda je jílovito-hlinitá. V roce 2021 byl předplodinou ječmen jarní, v roce 2022 kukuřice na zrno.

Stanoviště Unkovice (GPS souřadnice pokusu 49°01'13.0"N, 16°35'28.2"E) je sušší stanoviště, reprezentované lehčí hlinitou nevododržnou půdou na šterkopískovém podloží (černozem arenická). V obou letech byla předplodinou pšenice ozimá.

### *Technologie založení porostů a skladba odrůd*

Ve sledovaných letech byla na obou stanovištích po sklizni předplodin provedena podmítka talířovým podmítačem, následovaná středně hlubokou orbou v podzimním období. V jarním období byla provedena vícenásobná předsetřová příprava pomocí smykových bran (březen, duben, květen), z důvodu udržení pozemku v bezplevelném stavu.

K vyhodnocení výnosu suché nadzemní biomasy a nutričních ukazatelů čiroku bylo vybráno 7 odrůd vhodných k silážování z portfolia firem KWS OSIVA s.r.o. a SEED SERVICE s.r.o.: KWS Freya, KWS Sole, KWS Tarzan, Latte, Nutri Honey, Pampa Triunfo XLT BMR a Ruzrok. Odrůdy čiroku byly vysety pneumatickým přesně secím strojem HALDRUP SP-35 do hloubky 0,03 m, na vzdálenost řádků 0,45 m, Výsevok byl 245 000 semen.ha<sup>-1</sup>. Výsev v jednotlivých letech proběhl v první dekádě června, následně byl pozemek zaválen Cambridge válci. Rovněž byla provedena aplikace preemergentního herbicidu (Gardoprim Plus Gold 500 SC) v dávce 2,0 l.ha<sup>-1</sup>. Pro kukuřici byl zvolen hybrid společnosti Syngenta, SY Orpheus (FAO 370). Jedná se o suchovzdorný hybrid typu Artesian. Kukuřice byla vyseta ve třetí dekádě dubna stejným secím strojem do hloubky 0,08 m, při meziřádkové vzdálenosti 0,75 m a výsevku 80 000 semen.ha<sup>-1</sup>.

### *Sklizeň*

Čirok pro silážování je žádoucí sklízet při obsahu sušiny nad 28 % (Hermuth et al., 2012), ideálně ve fázi mléčné až voskové zralosti semen. Z hlediska optimálního průběhu fermentačního procesu by měl být obsah sušiny v biomase do 35 % (Šuk et al., 1998).

Aby byla nadzemní biomasa sklizena při optimálním obsahu sušiny, byl od druhé poloviny srpna prováděn opakovaný týdenní monitoring obsahu sušiny u jednotlivých odrůd čiroku. Při dosažení optimálního obsahu sušiny v nadzemní biomase (čirok cca 28 %, kukuřice cca 33 %) byla prováděna ruční sklizeň, kdy byly rostliny ručně odsekány cca 0,01 m nad povrchem půdy. Sklízňová plocha činila pro čirok 2,25 m<sup>2</sup> (5 x 0,45 m), ve třech opakováních. Sklizená hmota

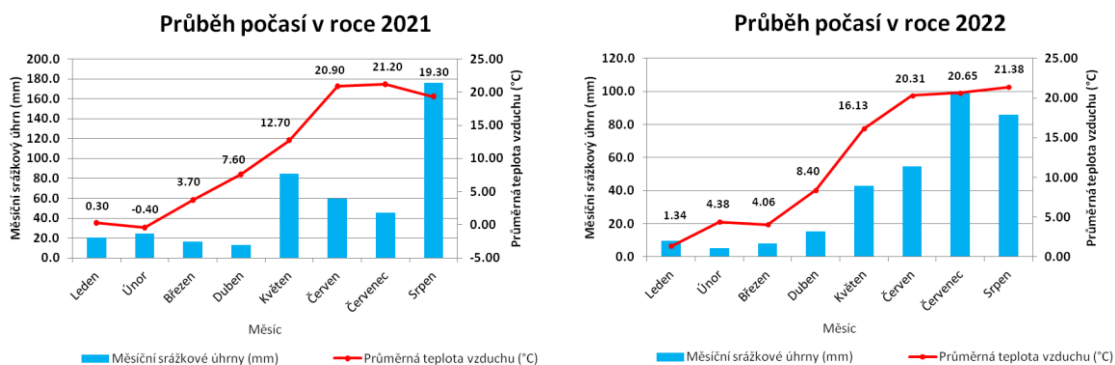
byla následně zvážena, podrcena a zhomogenizována. Následně byly odebrány vzorky biomasy ke stanovení sušiny a ke kvalitativním rozborům. Sušení proběhlo v laboratorní horkovzdušné sušárně VENTICELL. Vzorky na obsah sušiny byly předsušeny při teplotě 65 °C 24 hodin a následně dosušeny při 105 °C po dobu 4 hodin. Vzorky ke stanovení kvalitativních parametrů byly sušeny při teplotě 65 °C do fáze zdánlivé sušiny. Obdobným způsobem byla sklizena také kukuřice, velikost sklizňové parcely činila 3,75 m<sup>2</sup> (5 x 0,75 m). Následný výnos suché hmoty v t.ha<sup>-1</sup> byl u čiroku přepočtený na 28% sušinu, u kukuřice na 33% sušinu.

### Zpracování experimentálních dat

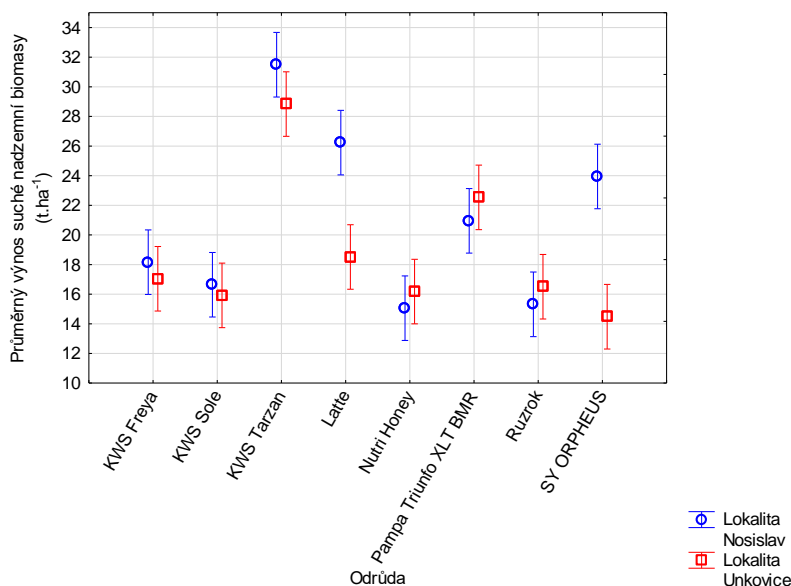
Získaná data výnosu suché hmoty byla statisticky zpracována analýzou rozptylu s následným testováním rozdílů středních hodnot pomocí Tukeyova testu v programu Statistica 14. Rozdíly ve výnosech jednotlivých odrůd čiroku a kukuřice byly graficky znázorněny pomocí grafů s intervaly spolehlivosti (při hladině významnosti P <0,05). Získaná data z kvalitativních rozborů byla zpracována formou sloupcových grafů v tabulkovém editoru MS Excel.

### Výsledky a diskuze

Z výsledků analýzy rozptylu byl zjištěn průkazný vliv ročníku, lokality a odrůdy. Důvod vlivu ročníku na výnos lze hledat v průběhu teplot vzduchu, úhrnu srážek ve vegetačním období a jejich rozložení. Průběh počasí v pokusných letech uvádí obr. č. 1. V roce 2021 byla průměrná teplota vzduchu v období duben-srpen 16,34 °C a celkový srážkový úhrn 379,0 mm. V roce 2022 byla průměrná teplota vzduchu v období duben-srpen vyšší (17,37 °C), přičemž celkový úhrn srážek byl nižší (297,6 mm). Meziroční rozdíl úhrnu srážek činil 81,4 mm.

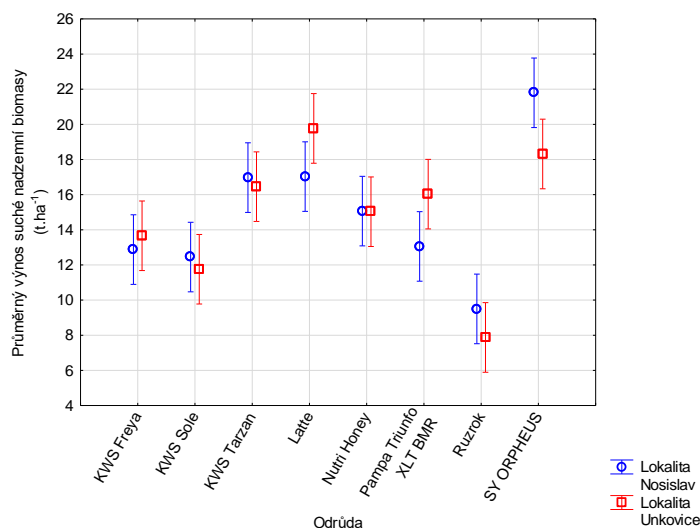


Obr. č. 1: Průběh počasí na lokalitách Nosislav a Unkovice v letech 2021 a 2022



Obr. č. 2: Průměrný výnos suché nadzemní hmoty čiroku a kukuřice na lokalitě Nosislav a Unkovice v roce 2021

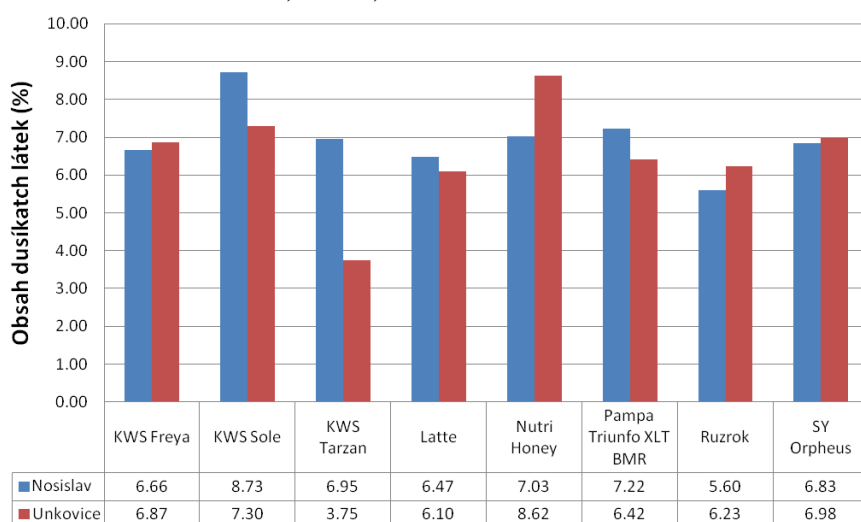
Vliv lokality na výnos suché nadzemní biomasy (DAGB) jednotlivých odrůd v roce 2021 vyjadřuje obr. č. 2. Nejvyššího průměrného výnosu DAGB dosáhla odrůda čiroku KWS Tarzan ( $31,49 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) na lokalitě Nosislav, což je stanoviště s dobrou dostupností podzemní vody, který tak překonal výnos kukuřice ( $23,95 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Odrůdu KWS Tarzan předurčuje k vysokým výnosům habitus rostliny, protože dorůstá do výšky 3,5–5 m. Vysoký výnos zaznamenali např. Povolný a Hampl (2015) v Uherském ostrohu ( $22,9 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Zmíněná odrůda měla nejvyšší průměrný výnos na obou lokalitách. Nejnižší výnos byl zaznamenán u odrůdy Nutri Honey ( $15,06 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). U odrůdy čiroku Latte a rovněž také u kukuřice byl zjištěn signifikantní vliv lokality na výnos suché hmoty. Na sušším stanovišti Unkovice byl průměrný výnos DAGB kukuřice  $14,48 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Důvodem je pravděpodobně nízký úhrn srážek v době vegetativního vývinu kukuřice (Lauer, 2012). Všech 7 zkoušených odrůd čiroku dosáhlo podobného, nebo vyššího výnosu. Nejvýnosnější byly odrůdy KWS Tarzan ( $28,84 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) a Pampa Triunfo XLT BMR ( $22,54 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ).



Obr. č. 3: Průměrný výnos suché nadzemní hmoty čiroku a kukuřice na lokalitě Nosislav a Unkovice v roce 2022

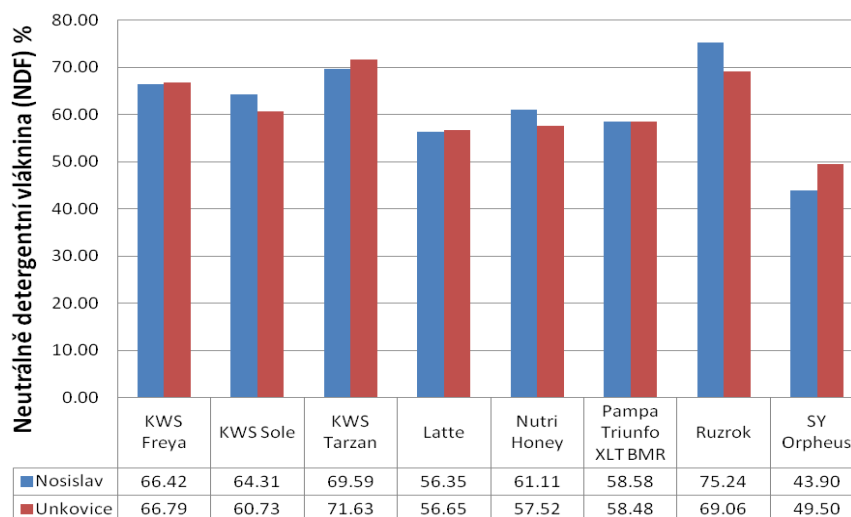
Vliv lokality na průměrný výnos DAGB kukuřice a čiroku v roce 2022 prezentuje obr. č. 3. Nejvyšší průměrný výnos DAGB byl zaznamenán na lokalitě Nosislav u kukuřice, který činil 21,80 t.ha<sup>-1</sup>. Rovněž byl u kukuřice zjištěn nejvyšší rozdíl ve výnosu suché hmoty v rámci lokality pěstování. Žádná ze zkoušených odrůd čiroku na lokalitě Nosislav nepřekonalala výnos kukuřice. Nejvyšší průměrný výnos na lokalitě Nosislav byl zaznamenán u odrůdy Latte (17,03 t.ha<sup>-1</sup>), která však měla průměrný výnos o 4,77 t.ha<sup>-1</sup> nižší než kukuřice. Na lokalitě Unkovice byl průměrný výnos DAGB u kukuřice nižší (18,32 t.ha<sup>-1</sup>). Srovnatelný výnos byl zaznamenán pouze u jedné odrůdy a tou byla odrůda Latte, u které byl průměrný výnos DAGB 19,77 t.ha<sup>-1</sup>. U odrůd Latte a Pampa Triunfo XLT BMR lze sledovat nejvyšší rozdíly ve výnosech suché hmoty, vyšších hodnot však oproti ostatním dosáhly obě odrůdy na lokalitě Unkovice.

V roce 2021 byl u kukuřice a zkoušených odrůd čiroku rovněž proveden rozbor obsahu živin v suché nadzemní biomase. Hodnoty obsahu dusíkatých látek (NL) graficky prezentuje obr. č. 4. U kukuřice byl průměrný obsah NL na lokalitě Nosislav 6,83 %, na lokalitě Unkovice 6,98 %. Biomasa čiroku v porovnání s kukuřicí vykazovala vyšší obsah dusíkatých látek u odrůd KWS Sole a Nutri Honey u obou lokalit. U odrůdy KWS Tarzan byl zjištěn nejvyšší rozdíl v obsahu NL mezi lokalitami, a to 3,2 %.



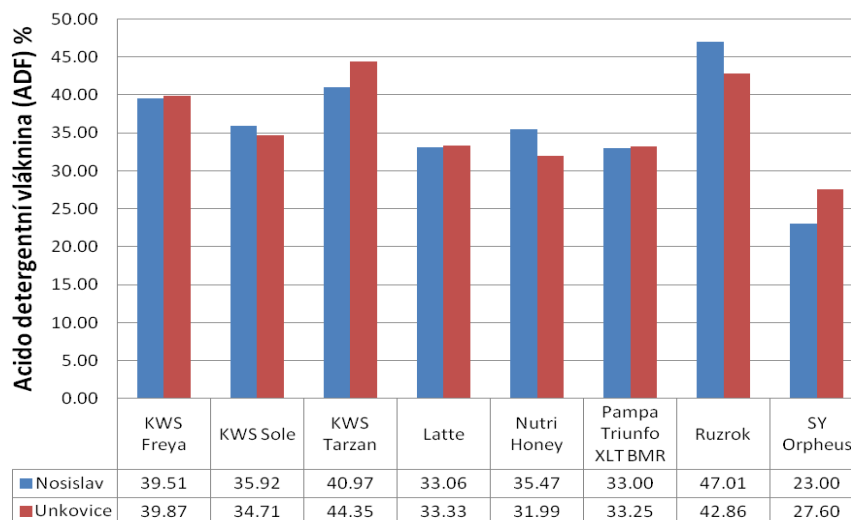
Obr. č. 4: Obsah dusíkatých látek v suché nadzemní hmotě kukuřice a čiroku na stanovištích Nosislav a Unkovice v roce 2021

Celkový obsah vlákniny v krmivu představuje obsah neutrálně detergentní vlákniny (NDF) Zahrnuje všechny složky buněčné stěny, tedy hemicelulózu, celulózu a lignin. Mezi obsahem NDF u kukuřice a čiroku jsou patrné značné rozdíly, jak je vidět na obr. č. 5. U kukuřice na lokalitě Nosislav byl obsah NDF 43,90 %, na lokalitě Unkovice 49,50 %. Celkově byl vyšší obsah NDF u čiroku. Na lokalitě Nosislav byl nejvyšší podíl NDF zaznamenán u odrůdy Ruzrok (75,24 %), na lokalitě Unkovice u odrůdy KWS Tarzan (71,63 %). Výzkumy dokladují, že se po zařazení zhruba 10 kg čiroku do krmné dávky se díky vysokému obsahu NDF zvyšuje počet bachorových mikroorganismů (Kljak et al., 2017).



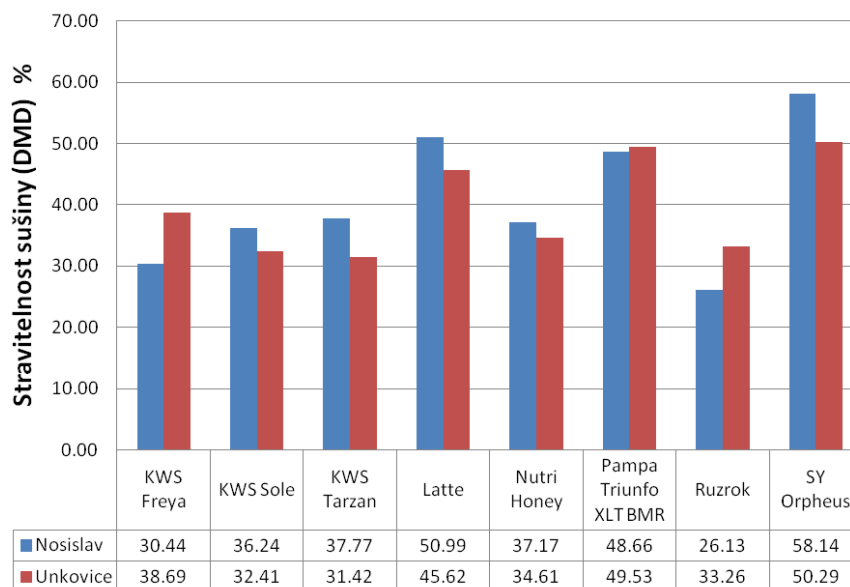
Obr. č. 5: Obsah neutrálně detergentní vlákniny v suché nadzemní hmotě kukuřice a čiroku na stanovištích Nosislav a Unkovice v roce 2021

Dalším zkoumaným kvalitativním parametrem byl obsah acidodetergentní vlákniny (ADF). Její obsah v krmivu je důležitý kvůli udržení optimálního poměru strukturální vlákniny, která je současně vysoce stravitelná. Výsledky graficky znázorňuje obr. č. 6. Hodnoty ADF se u kukuřice a čiroku lišily. U kukuřice na stanovišti Nosislav byl obsah ADF 23,00 %, na lokalitě Unkovice 27,60 %. Tyto výsledky korespondují s výsledky práce autorů Petry a Patience (2020). U čiroku se hodnoty ADF obecně pohybují v rozpětí od 30 do 40 %. Čirok vykazoval u některých odrůd v porovnání s kukuřicí téměř dvojnásobný obsah ADF. K těmto výsledkům došli např. Hedayati-Firoozabadi et al. (2020). Na lokalitě Nosislav byl zjištěn nejvyšší obsah ADF u odrůdy Ruzrok (47,01 %), na lokalitě Unkovice u odrůdy KWS Tarzan (44,35 %).



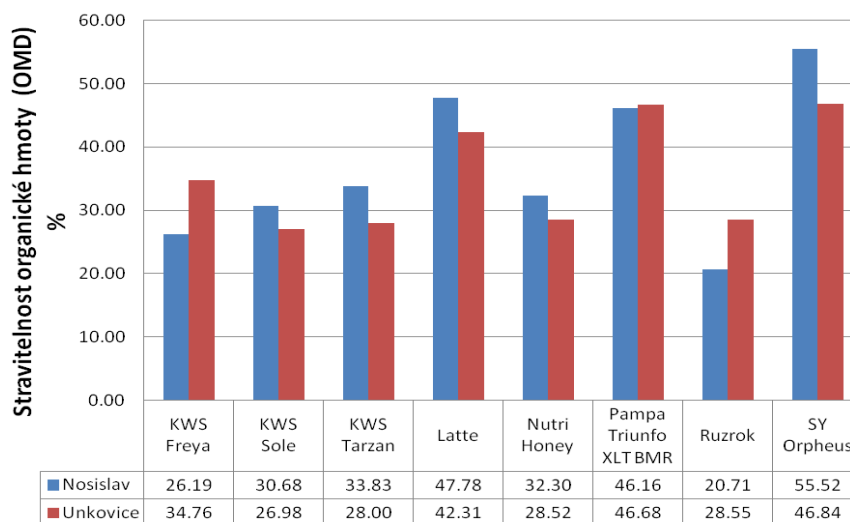
Obr. č. 6: Obsah acidodetergentní vlákniny v suché nadzemní hmotě kukuřice a čiroku na stanovištích Nosislav a Unkovice v roce 2021

Procentuální stravitelnost sušiny (DMD) znázorňuje obr. č. 7. Hodnoty byly u kukuřice a čiroku v případě odrůd Latte a Pampa Triunfo XLT BMR srovnatelné. U ostatních odrůd byly hodnoty nižší o více jak 10 %. U kukuřice na lokalitě Nosislav dosahovala hodnota DMD 58,14 %, na lokalitě Unkovice pak 50,29 %. Podle autorů Ayasan et al. (2020) se DMD v kukuřici pohybuje kolem 51,57 %. Nejvyšší obsah DMD na lokalitě Nosislav vykazovala odrůda Latte (50,99 %), na lokalitě Unkovice odrůda Pampa Triunfo XLT BMR (49,53 %).



Obr. č. 7: Procentuální stravitelnost sušiny v suché nadzemní hmotě kukuřice a čiroku na stanovištích Nosislav a Unkovice v roce 2021

Posledním hodnoceným parametrem byla procentuální stravitelnost organické hmoty (OMD). Výsledky stanovení znázorňuje obr. č. 8. I u tohoto parametru byl zjištěn obdobný trend jako u DMD. U kukuřice byla OMD na lokalitě Nosislav 55,52 %, na lokalitě Unkovice 46,84 %. U čiroku vykazovala nejvyšší hodnotu OMD na lokalitě Nosislav opět odrůda Latte (47,78 %), na lokalitě Unkovice opět odrůda Pampa Triunfo XLT BMR (46,68 %).



Obr. č. 8: Procentuální stravitelnost organické hmoty v suché nadzemní hmotě kukuřice a čiroku na stanovištích Nosislav a Unkovice v roce 2021

## Závěr

V posledních letech se dostává do popředí pěstování plodin, které i při nižší spotřebě vody dosahují optimálních hektarových výnosů. Čirok tyto požadavky splňuje, navíc dosahuje uspokojivého výnosu i při nízkých ekonomických vstupech. Průměrný výnos DAGB se v letech 2021 a 2022 u čiroku pohyboval mezi 7,87 a 31,49 t.ha<sup>-1</sup>, přičemž medián byl 16,48 t.ha<sup>-1</sup>. Z výsledků analýzy rozptylu byl zjištěn průkazný vliv ročníku, lokality a odrůdy. Výnosově nejstabilnější byla odrůda Nutri Honey (15,03–16,18 t.ha<sup>-1</sup>). V roce 2021 byla na obou

lokality nejvýnosnější odrůda KWS Tarzan, která dosahovala průměrného výnosu DAGB 31,49 t.ha<sup>-1</sup> na lokalitě Nosislav a 28,84 t.ha<sup>-1</sup> na lokalitě Unkovice. V roce 2022 byla na obou lokalitách nejvýnosnější odrůda Latte, která na lokalitě Nosislav dosáhla průměrného výnosu DAGB 17,03 t.ha<sup>-1</sup> a 19,77 t.ha<sup>-1</sup> na lokalitě Unkovice. V sušších letech má čirok potenciál dosáhnout stejného, nebo vyššího výnosu suché nadzemní biomasy než kukuřice. Z nutričního hlediska má čirok podobný obsah dusíkatých látek, vyšší obsah neutrálně detergentní i acidodetergentní vlákniny. Některé odrůdy mají srovnatelnou stravitelnost sušiny i organické hmoty jako kukuřice. Čirok se z našich prozatímních výsledků jeví jako perspektivní plodina, která by mohla vhodně doplnit krmnou dávku ve výživě skotu.

## Dedikace

Príspevek vznikl za podpory projektu MendelFarm – Integrovaná ochrana rostlin v podniku hospodařícím v suchých podmínkách, který je financovaný z dotačního programu 9.f.m. Ministerstva zemědělství „Demonstrační farmy“.

## Literatura

- Ayasan T., Cetinkaya N., Aykant S., Celik C. 2020. Nutrient contents and in vitro digestibility of different parts of corn plant. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 50(2):302–309. DOI: 10.4314/sajas.v50i2.13.
- Hedayati-Firoozabadi A., Kazemeini S. A., Pirasteh-Anosheh H., Ghadiri H., Pessarakli M. 2020. Forage yield and quality as affected by salt stress in different ratios of *Sorghum bicolor* – *Bassia indica* intercropping. DOI: 10.1080/01904167.2020.1783301.
- Hermuth J., Janovská D., Stražil Z., Ust'ak S., Hýsek J., 2012. Čirok obecný - *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH: možnosti využití v podmínkách České republiky: metodika pro praxi. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-7427-093-2.
- Kljak K, Pino F, Heinrichs A. J. 2017. Effect of forage to concentrate ratio with sorghum silage as a source of forage on rumen fermentation, N balance, and purine derivative excretion in limit-fed dairy heifers. *J Dairy Sci.* 100(1):213–223. DOI: 10.3168/jds.2016-11383.
- Lauer J., 2012. The Effects of Drought and Poor Corn Pollination on Corn. *Field Crops*, 28.493–95. Dostupné na: <http://corn.agronomy.wisc.edu/AA/pdfs/A095.pdf>.
- Petry A. L., Patience J. F. 2020. Xylanase supplementation in corn-based swine diets: a review with emphasis on potential mechanism of action. *Journal of Animal Science*, vol. 98, no. 11. DOI: 10.1093/jas/skaa318.
- Povolný M., Hampl B. 2015. Výsledky zkoušek užitné hodnoty ze sklizně 2014. Čirok. Brno: ÚKZÚZ, Národní odrůdový úřad. Dostupné na: [http://eagri.cz/public/web/file/399243/ZUH\\_Cirok\\_2014.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/399243/ZUH_Cirok_2014.pdf).
- Šuk J., Balík J., Jakobe P., Jambor V., Kohout V., Loučka R., Táborský V., Vrzal J., 1998. Kukuřice. VP AGRO, Kněževes. ISBN 80- 86153-99-1.

## Poděkování

Děkujeme všem kolegům z Polní pokusné stanice Žabčice, za založení a vedení pokusů. Realizace pokusu proběhla ve spolupráci s firmami SEED SERVICE s.r.o. a KWS OSIVA s.r.o.

## Kontaktní adresa:

Ing. Lenka Porčová, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně, Ústav agrosystémů a bioklimatologie

Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

[lenka.porcova@mendelu.cz](mailto:lenka.porcova@mendelu.cz), +420 775 409 097



## Změny vybraných vlastností fluvizemě glejové v monokultuře ječmene jarního (*hordeum vulgare L.*)

Changes of selected soil properties Gleyic Fluvisol Clayic in monoculture of spring barley (*Hordeum vulgare L.*)

Pospíšilová L.<sup>1</sup>, Dryšlová T.<sup>1</sup>, Plisková, J.<sup>1</sup>, Prudil, J.<sup>1,2</sup>, Ryant, P.<sup>1</sup>, Smutný V.<sup>1</sup>, Rábek, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko

### Abstrakt

V průběhu let 2017-2020 byl hodnocen vliv monokulturního hospodaření a různého způsobu zapravení slámy na biologické ukazatele půdy a kvalitu humusových látek. Dlouhodobý stacionární polní pokus je veden na pokusné stanici Mendelovy univerzity v Žabčicích. Obsah mikrobiální biomasy byl stanoven fumigačně-extrakční metodou. Obsah humusových látek byl stanoven metodou krátké frakcionace. Výsledky ukazují, že při zapravení slámy se snižuje množství mikrobiální biomasy a klesá stupeň humifikace. V půdě tak zůstává více organických látek a procesy mineralizace i humifikace jsou pomalejší. Při odvozu slámy roste aktivita mikroorganismů a stupeň humifikace, což vede k poklesu obsahu organických látek v půdě. Odvoz posklizňových zbytků tak akceleruje mineralizační a dehumifikační procesy, které vedou k dehumifikaci a poklesu půdní úrodnosti. Je dokumentováno, že při monokulturním pěstování jarního ječmene, příznivě působí varianta se zapravením či pálením slámy.

**Klíčová slova:** monokultura ječmene jarního, hospodaření se slámou

### Abstract

During let 2017-2020 we evaluated the effect of monoculture farming and straw management on soil biological parameters and humic substances quality. A long-term stationary field experiment is carried out on experimental stationery of Mendel university in Brno. The amount of microbial biomass was determined by the fumigation-extraction method. Humic substances content was determined by the short fractionation method. Results showed that straw incorporation caused a decrease in the amount and activity of soil biota. This results in lower humification degree and higher humic substances content. Mineralization and humification processes are slower. When the straw is harvested, microbial activity is higher and mineralization and humification are more intense. We documented that the anthropic effect is positive or negative depending on the crop rotation system and straw management. We concluded that during monoculture farming straw incorporating or burning leads to higher humic substances content and quality.

**Klíčová slova:** monoculture of spring barely, straw management

### Úvod

Dehumifikace a úbytek organické hmoty má negativní vliv na produkční i ekologické funkce půdy. Problém souvisí jak s půdně-klimatickými faktory, tak i se změnou klimatu obecně, a je často umocněn nevhodným způsobem hospodaření. Jedná se zejména o monokulturní způsob hospodaření a nedostatečnou aplikaci organických hnojiv. I když humusové látky, tj. organické látky, které prošly procesem humifikace a jsou relativně odolné vůči rozkladu rovněž mohou být degradovatelné v procese ko-metabolismu, pokud lehce dostupné organické látky chybí. Podle Rejšek a Vácha (2018) může dehumifikaci akcelarovat i změna půdně ekologických

podmínek a klimatu. Autoři uvádí, že změna vodního režimu (sucho) urychluje mineralizační procesy a rozklad organických látek. Rovněž způsob hospodaření a agrotechnická opatření mají zásadní vliv na zásoby organického uhlíku a kvalitu humusových látek (HL). Optimální osevní postup, doplňování zásob organických látek, půdoochranné technologie, vhodná agrotechnika a hnojení zajišťují stabilitu agroekosystému (Banwart a kol., 2015). Naopak mezi negativní antropogenní vlivy řadíme monokulturní způsob hospodaření, který je spojen s únavou a degradací půdy. Ukazují to zejména stacionární polní pokusy, které dokumentují konkrétní dopady, jako je zhoršení fyzikálních, chemických a biologických vlastností půdy, což vede v konečném důsledku ke snížení produkční schopnosti půdy (Krejčíř, 1996; Křen a kol., 2015). Antropický vliv tak může být jak pozitivní, tak negativní a je zřejmé, že osevní postup a hospodaření s posklizňovými zbytky ovlivňuje jak mikrobiální aktivitu, tak i obsah organických látek a živin v půdě. Neoddělitelnou součástí organické hmoty je půdní biota. Při jejím hodnocení se podle Šimek a kol. (2019) používají tři parametry – *abundance* (četnost, tj. počet jedinců určitého druhu nebo taxonomické skupin); – *diverzita* (druhovú rozmanitost společenstva); – *biomasa* (hmotnost organismů v jednotce půdy). Hodnoty uvedených parametrů bývají u zdravých půd vysoké. U degradovaných půd hodnoty klesají anebo jsou redukovány. Jedná se o dynamické parametry, proměnlivé jak v prostoru, tak v čase. Jsou přímo ovlivněny půdně-ekologickými podmínkami, klimatem, rostlinným pokryvem, způsobem hospodaření a erozí. Tyto parametry charakterizují okamžitý stav dané lokality, proto je téměř nemožné různá data mezi sebou porovnávat (Šimek a kol., 2019). Sledování uvedených parametrů na polním pokusné stanici v Žabčicích dává možnost získat v této oblasti výzkumu důležité informace. Lze předpokládat, že množství a kvalita humusových látek a mikrobiální biomasa jsou přímo ovlivněny způsobem zapravení posklizňových zbytků.

Cílem práce bylo v průběhu let 2017-2020 sledovat vliv monokulturního hospodaření na množství mikrobiální biomasy a na obsah a kvalitu humusových látek.

### **Materiál a metody**

Dlouhodobé stacionární pokusy v Žabčicích jsou založeny metodou dělených dílců, jejichž velikost je 5,3 m x 7 m. Je zde sledováno více antropogenních vlivů na půdu (např. rozdílné osevní postupy, aplikace různých dávek minerálního dusíku, hospodaření s posklizňovými zbytky, zapravení slámy, různé způsoby zpracování půdy apod.). Odběry půdních vzorků (0-10 cm) byly prováděny v létě po sklizni v průběhu let 2017-2020. Byly použity tyto metody stanovení: celkový obsah dusíku ( $N_t$ ) by stanoven podle Kjeldahla (Zbiral a kol., 2011); obsah organického uhlíku ( $C_{org}$ ) – oxidimetrická titrace (Nelson and Sommers, 1996); kvalita humusu – krátká frakcionace (Kononova a Bělčíkova, 1963, In: Pospíšilová a kol., 2016). Stupeň humifikace (SH) byl vypočítán jako poměr obsahu HK/Corg \* 100 (%). Ke stanovení mikrobiální biomasy ( $C_{mic}$ ) byla použita fumigačně-extraktní metoda, tj. půdní vzorky byly ošetřeny chloroformem, který narušil buněčné stěny mikroorganismů. Následně se v extraktech fumigovaných a nefumigovaných půd stanoví koncentrace uhlíku ( $C_{mic}$ ). Z jejich rozdílu se následně stanoví množství mikrobiální aktivity (Vance a kol., 1987). Ke statistickému vyhodnocení dat byl využit program Statistica 14.0 (TIBCO, Inc.).

### **Výsledky a diskuse**

Fluvizem glejová na lokalitě Žabčice představuje půdu střední bonity s obsahem humusu do 2,5 %. Jedná se o zrnitostně těžkou, jílovitohlinitou půdu. Aktivní půdní reakce je slabě kyselá a výměnná půdní reakce je kyselá. Na vybrané variantě monokultury ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) je hodnocen celkový obsah organického uhlíku a dusíku a poměr C/N.

Výsledky jsou dokumentovány v grafu 1. Patrný je vyšší obsah organického uhlíku ( $C_{org}$ ) na variantě pálená sláma. Rozdíly jsou statisticky průkazné. Celkový obsah dusíku ( $N_t$ ) nevykazuje průkazné rozdíly u sledovaných variant. Vyšší hodnoty jsou patrné u sklizené slámy. Poměr C/N je menší než 8, což hodnotíme jako dostatečnou zásobu dusíku pro půdní mikroorganismy. Nižší hodnoty poměru C/N byly na variantě sklizená sláma (5,7). Na variantě se zapravenou slámou jsou hodnoty kolem 7 a při pálení slámy jsou kolem 8. Podobné výsledky uvádějí Xiao et al. (2017), kteří konstatují, že mikrobiální biomasa a aktivita je přímo závislá na obsahu přístupného dusíku a poměru C/N. Celkový obsah humusových látek (HL), huminových kyselin (HK), fulvokyselin (FK) je uveden v grafu 2. Celkový obsah HL a HK nevykazuje průkazné rozdíly u sledovaných variant. Průkazně odlišný je obsah FK, který je vyšší u zapravené slámy. Znamená to, že postupně v průběhu humifikace dochází k tvorbě humusových látek typu fulvokyselin, které jsou často považovány za předstupeň tvorby huminových kyselin (Stevenson, 1994). Stupeň humifikace (SH) je uveden v grafu 3. Rozdíly mezi variantami se sklizenou, zapravenou a pálenou slámou jsou průkazné. Nejvyšší SH je zaznamenán při odvozu slámy (25 %). Z uvedeného vyplývá, že více nehumifikovaných látek je po zapravení slámy nebo při jejím pálení v porovnání s variantou se sklizenou slámou. Množství mikrobiální biomasy ( $C_{mic}$ ) dokumentuje graf 4. Průměrné hodnoty v případě zapravení slámy a pálení slámy jsou nižší než  $450 \mu\text{g C g}^{-1}$ . Rozdíly mezi variantami s různým managementem slámy jsou průkazné. K přesnějšímu hodnocení biologických parametrů je zapotřebí další výzkum aktivity půdních mikroorganismů (bazální respirace, substrátem aktivovaná respirace) a stanovení druhové rozmanitosti půdních mikroorganismů. Množství mikrobiální biomasy nemusí vždy přímo souviset s půdní respirací. Jak uvádějí Xiao et al. (2017) a Merlo et al. (2022), může to souviset s půdně-ekologickými podmínkami dané lokality, agronomickými zásahy nebo s termínem odběru a počasím během odběru půdních vzorků. V každém případě množství mikrobiální biomasy je důležitým ukazatelem kvality půdy. Tvorba mikrobiální biomasy indikuje, že vytvořenou energii využívají na udržení buněčné stability, na svůj růst a reprodukci. V opačném případě se půda stává zdrojem uhlíku, který ve formě  $\text{CO}_2$  mikroorganismy uvolňují v procesu dýchání do atmosféry.

## Závěr

Výsledky výzkumu ukazují, že monokulturní hospodaření má vliv na biologické vlastnosti půdy a půdní biotu. Způsob hospodaření s posklizňovými zbytky patří rovněž k důležitým faktorům ovlivňujícím půdně-ekologické vlastnosti, množství biomasy a její aktivitu. Je zapotřebí provést další výzkum aktivity mikrobiálního společenstva a identifikace druhové rozmanitosti.

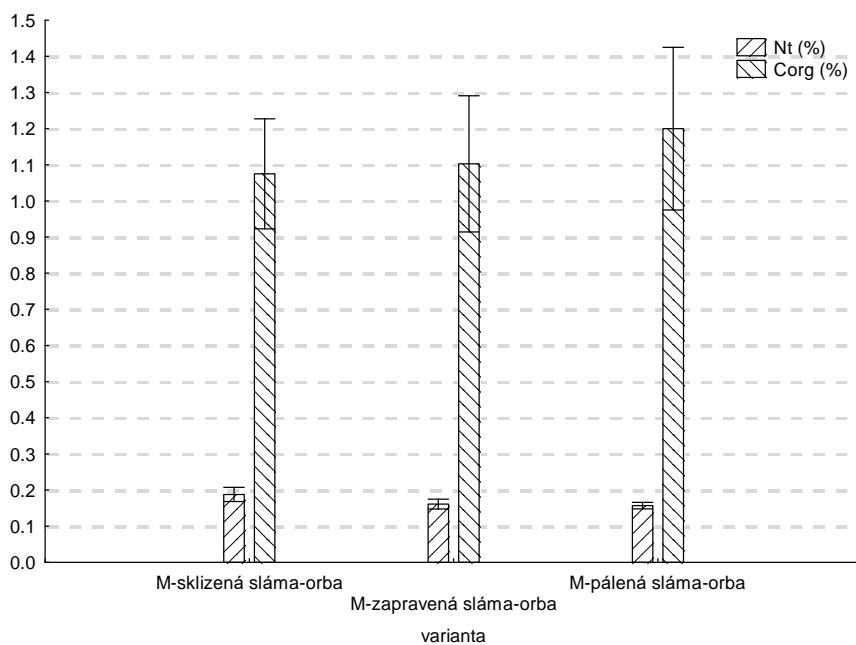
## Použitá literatura

- Banwart A. S., Noellemeyer E., Milne E. 2015. The Global Challenge for Soil Carbon. Science, Management and Policy for Multiple benefits SCOPE Series volume 71: 1-10.
- Krejčíř J., 1996: Koncepce a metodika dlouhodobého stacionárního polního pokusu v Žabčicích a problematika jeho hodnocení. In Sborník Význam a perspektivy dlouhodobých polních pokusů v České republice, s. 43
- Křen J., Neudert L., Procházková B., Smutný V., Hůla J. 2015. Obecná produkce rostlinná. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-325-7.
- Kononova, M. M., Belchikova, N. P. 1963. Organiceskoje vescestvo povy (Soil organic matter). Moscow, AN SSSR, 228-234. (In Russian).
- Merlo, M. N. Et al. 2022. Microbiological Properties in Cropping Systems and Their Relationship with Water Erosion in the Brazilian Cerrado. *Water* [online]. 14(4). ISSN 2073-4441. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w14040614>

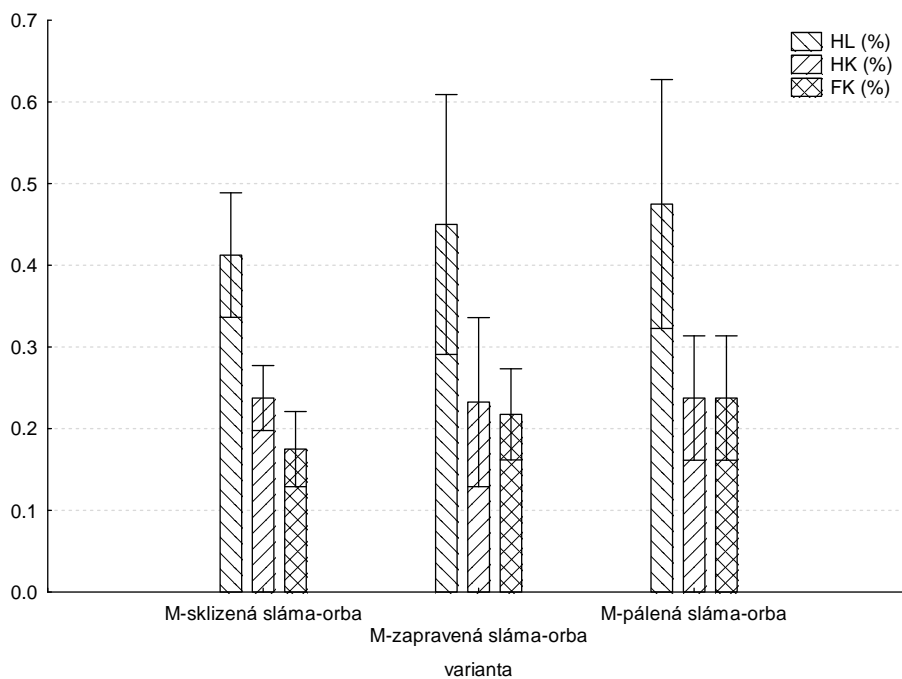
- Nelson, D. W., Sommers, L. E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Sparks DL (Ed.). *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Madison: Soil Science Society of America. 961-1010.
- Pospíšilová, L., Vlček, V., Hybler, V., Hábová, M., Jandák, J. 2016. Standardní analytické metody a kritéria hodnocení fyzikálních, agrochemických, biologických a hygienických parametrů půd. *Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeliannae Brunensis IX*. Brno. 123 s. ISBN 978-80-7375-438-4.
- Rejšek, K., Vácha, R. 2018. *Nauka o půdě*. Olomouc: Agriprint, s.r.o. ISBN 978-80-87091-82-1.
- Stevenson F.J. 1994. *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 496 p.
- Šimek, M. a kol. 2019. *Živá půda*. Praha: Academia. ISBN isbn978-80-200-2976-8.
- Zbírál J., Malý S., Váňa M. a kol. 2011. *Analýza půd III. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ*. Brno, Národní referenční laboratoř. 3. přepracované a rozšířené vydání. ISBN 978-80-7401-044-6.
- XIAO, Haibing a kol., 2017. Soil erosion-related dynamics of soil bacterial communities and microbial respiration. *Applied Soil Ecology* [online]. 119, 205-213. ISSN 09291393. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.018>

### **Dedikace**

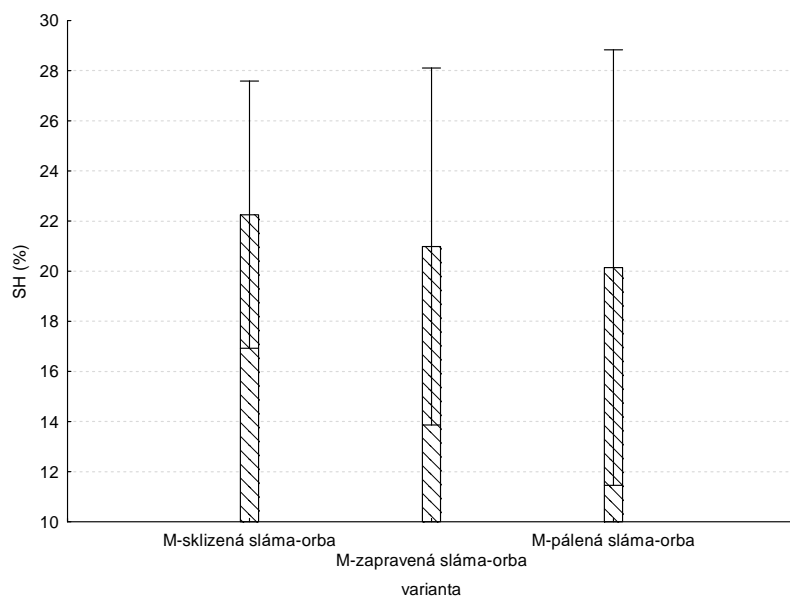
Práce vznikla s podporou projektů QK21010124 “Půdní organická hmota – indikátory kvality” a QK1810186 „Zlepšení stability půdní struktury a zvýšení infiltrace pomocí agrotechnických postupů“. Dále s podporou projektu MZE-RO1722.



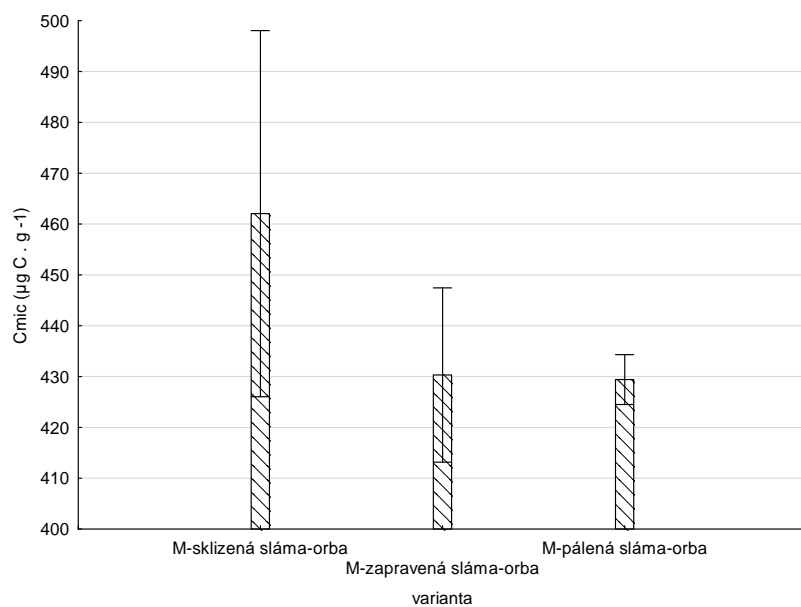
Graf 1. Průměrné hodnoty obsahu organického uhlíku a dusíku



Graf 2. Průměrné hodnoty obsahu HL, HK a FK na sledovaných variantách pokusu



Graf 3. Stupeň humifikace na sledovaných variantách pokusu



Graf 4. Obsah mikrobiální biomasy na sledovaných variantách pokusu

**Kontaktní adresa:**

Doc. Lubica Pospíšilová  
Mendelova univerzita v Brně  
Zemědělská 1  
613 00 Brno  
Tel. 608 242 827  
e-mail: lubica.pospisilova@mendelu.cz

## Výnos plodin po aplikaci digestátu

### Crop yield after digestate application

Prudil J.<sup>1,2</sup>, Badalíková B.<sup>1</sup>, Pospíšilová L.<sup>2</sup>, Sedlák L.<sup>2</sup>, Šedová L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko

<sup>2</sup>Mendelova univerzita v Brně

#### Abstrakt

V letech 2018–2020 byl sledován výnos vybraných plodin po aplikaci digestátu. Současně byly hodnoceny i některé vybrané fyzikální vlastnosti půdy. Na sledované lokalitě Velešovice byly založeny tři varianty pro odběry půdních vzorků a hodnocení výnosu, a sice: varianta 1 (kontrolní) – bez aplikace digestátu, varianta 2 – digestát v dávce 20 t/ha pouze v roce 2019, varianta 3 – digestát v dávce 20 t/ha každoročně. Během sledovaných let bylo dosahováno vyšších výnosů u variant hnojených digestátem. Současně nebyla potvrzena hypotéza, že aplikace digestátu má negativní vliv na fyzikální vlastnosti půdy. V rámci sledování objemové hmotnosti redukované (Ohr) půdy a měření penetrometrického odporu (MPa) nebyly překročeny agroekologické limity u těchto parametrů. Aplikovaný digestát pozitivně ovlivnil půdní vlhkost, což se projevilo i na zlepšení půdní struktury.

**Klíčová slova:** digestát, výnos plodin, fyzikální vlastnosti půdy, zhutnění půdy, vlhkost půdy

#### Abstract

During the period 2018–2020, the crop yield of selected crops after digestate application was evaluated. At the same time, some selected soil physical properties were studied. Three variants were selected for soil sampling and crop yield evaluation: variant 1 (control) - no application of digestate, variant 2 - digestate application at a rate of 20 t/ha every other year, and variant 3 - digestate application at a rate of 20 t/ha annually. During the monitoring period, higher crop yields were recorded for the variants fertilised with digestate. Also, no negative effect of digestate application on the soil's physical properties was found. The results of the reduced bulk density (Ohr) and pedocompaction (MPa) confirmed that no agroecological limits were overstepped. The applied digestate positively influenced soil moisture, which led to the improvement of soil structure.

**Keywords:** digestate, crop yield, soil physical properties, soil compaction, soil moisture

#### Úvod

V současnosti jsme svědky enormního nárůstu cen minerálních hnojiv. Kvalitních statkových hnojiv je dlouhodobě obrovský nedostatek. Z tohoto důvodu je zcela nezbytné hledat alternativní způsoby, jak poskytnout našim polím dostatečné množství živin. Z hlediska cílů *Zelené dohody* pro Evropu je žádoucí využívat metod cirkulárního hospodaření. A právě zde nachází své uplatnění digestát. Používání digestátu ke hnojení znamená pro zemědělce finanční úsporu z hlediska náhrady minerálních hnojiv (Štěpánek, 2020). Digestát je totiž z hlediska složení předurčen k hnojivým účelům, neboť je bohatým zdrojem přístupných živin, zejména dusíku (4–7 kg/m<sup>3</sup>), draslíku a fosforu (Albuquerque et al., 2012). Mimo to obsahuje žádoucí prekursory huminových látek (Marada et al., 2008). Na druhé straně obsahuje značné množství organických látek. Nicméně princip jeho vzniku, kdy veškeré rozložitelné organické látky jsou přeměněny v průběhu anaerobní fermentace za vzniku bioplynu, naznačuje fakt, že organické látky přítomné v digestátu nebudou dobře využitelné půdními mikroorganismy (Tambone et al. 2009, 2013; Marcato et al. 2009). Z tohoto důvodu je nezbytné po aplikaci digestátu současně dodat i živou organickou hmotu, čímž eliminujeme případné degradační procesy půdy. Přídavek slámy, kompostu či jiného snadno rozložitelného organického materiálu stimuluje mikrobiální činnost a vede ke správnému průběhu mineralizačních a humifikačních procesů

(Makadi et al, 2008; Insam et al, 2015). Digestát je tedy bezesporu vhodnou alternativou pro doplnění živin do půdy. Pokud chceme, aby nám digestát v půdě dobře sloužil, je zapotřebí odborně zvládnout proces jeho výroby a aplikace. Stejně jako jakékoliv jiné půdní přídatky je vždy nutné posuzovat možnosti aplikace pro konkrétní lokalitu s ohledem na všechny půdní vlastnosti a způsob využití (Duffková et al., 2016).

Cílem tohoto příspěvku je zhodnocení vlivu digestátu na výnos pěstovaných plodin a na vybrané fyzikální vlastnosti půdy.

### Materiál a metody

Odběry půdních vzorků a hodnocení výnosu pěstovaných plodin probíhalo na lokalitě Velešovice na pozemcích Zemědělského družstva Rakovec. Stanoviště se nachází v bramborářské výrobní oblasti. Půdní typ zde reprezentuje černozem karbonátová. Půdy jsou zde klasifikovány jako středně těžké, jílovitohlinité. Nadmořská výška je 228 m, dlouhodobý srážkový normál je 493 mm, průměrná roční teplota je 7,2 °C. Hodnocení pokus probíhalo mezi roky 2018-2020.

Pokus byl rozdělen na 3 varianty – viz. tab. 1

**Tab. 1** – Varianty pokusu

Varianta	Dávka digestátu (t/ha)
<b>Varianta 1</b>	kontrolní – bez aplikace digestátu
<b>Varianta 2</b>	20 t/ha pouze v roce 2019
<b>Varianta 3</b>	20 t/ha každý rok

Digestát, který pocházel z kukuřičné siláže, byl aplikován pomocí hadicového aplikátoru vždy z jara. Bezprostředně po aplikaci byl zapraven do půdy pomocí disků. Osevní sled byl následující: pšenice ozimá, žito ozimé a pšenice ozimá.

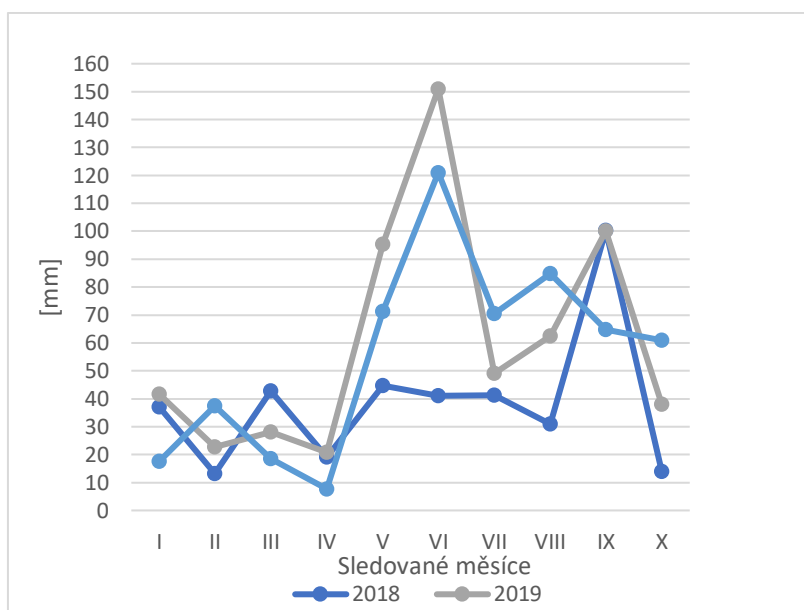
Pedokompakce byla měřena s pomocí elektronického penetrometru Eijkelkamp. Penetrometrický odpor (MPa) byl měřen ve 3 variantách po 15 opakováních. Současně byly odebrány půdní vzorky pro zjištění půdní vlhkosti (hmotnostní %), jež byla stanovena gravimetricky. Kopeckého válečky byly použity na odběr neporušených půdních vzorků. Odběr probíhal ze třech hloubek, a sice 0-0,10; 0,10-0,20; 0,20-0,30 m. Z odebraných vzorků byly hodnoceny vybrané fyzikální vlastnosti půdy, a to objemová hmotnost redukovaná (Ohr) či půdní struktura, která byla vyjádřena jako koeficient strukturnosti (KS). Odběr půdních vzorků i penetrometrická měření probíhala v pravidelných termínech, a to během jarního a podzimního vegetačního období před zpracováním půdy. Ke zpracování dat byl využit program Statistica 14.0 (TIBCO, Inc.).

### Výsledky a diskuse

Černozem karbonátová na lokalitě Velešovice představuje půdu střední bonity, s obsahem humusu do 3,0 %. Jedná se o zrnitostně středně těžkou, jílovitohlinitou půdu. Aktivní půdní reakce je neutrální a výměnná půdní reakce je slabě zásaditá. Na vybrané lokalitě je hodnocen celkový výnos pěstovaných plodin za sledované období. Mimo jiné jsou řešeny další vybrané fyzikální vlastnosti půdy, jako je objemová hmotnost redukovaná (Ohr), penetrometrické odpor (MPa), půdní vlhkost (hmotnostní %) či půdní struktura (KS). Výše uvedené je řešeno s ohledem na průběh srážek za sledované období – viz. graf 1. Výsledky vztahující se k výnosům pěstovaných a vybraných fyzikálních charakteristik jsou dokumentovány v grafech 2-6.

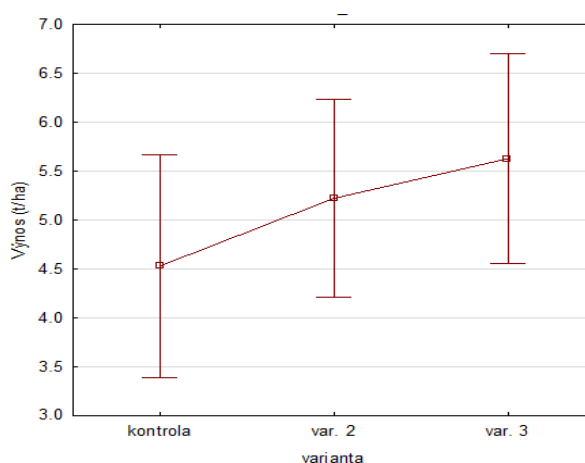


V grafu 1 je uveden průběh dešťových srážek za ledované období. Rok 2018 byl srážkově velmi podprůměrný zejména v období od května do srpna, což se mohlo promítnout ve výsledcích našeho měření. Roky 2019 a 2020 byly srážkově mírně nadprůměrné.



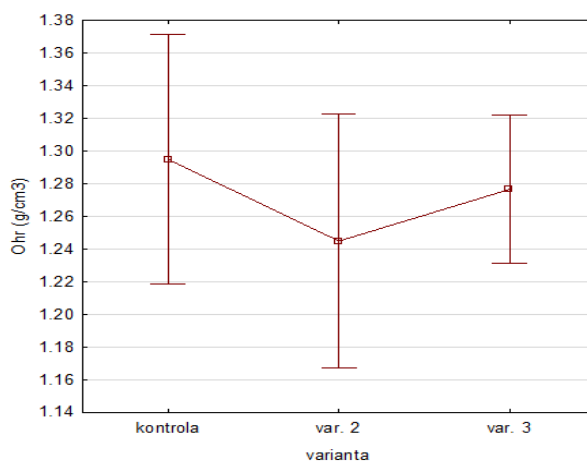
Graf 1 – Meteorologické údaje za ledované období, Velešovice

V grafu 2 jsou uvedeny průměrné výsledky, za sledované období 2018–2020, vztahující se k výnosům jednotlivých plodin (t/ha) na vybraných variantách pokusu. Patrný je trend v nárůstu výnosu u variant hnojených digestátem oproti variantě kontrolní. Tato skutečnost je zapříčiněna dodáním většího množství přístupných živin z digestátu. V roce 2018 bylo dosaženo v průměru o 0,75 t/ha vyššího výnosu u varianty 2, tedy s aplikací digestátu v dávce 20 t/ha pouze v roce 2019, oproti variantě nehnojené digestátem – kontrolní. Digestát aplikovaný každoročně, tedy varianta 3, dosahoval až o 1,2 t/ha vyšších výnosů oproti kontrolní variantě. Rozdíly jsou statisticky průkazné.



Graf 2 – Průměrné hodnoty výnosu (t/ha) u vybraných plodin za sledované období

Výsledky vztahující se k průměrným hodnotám objemové hmotnosti redukované (Ohr) uvádí graf 3. Úvodní hypotéza byla následující: „Varianty hnojené digestátem budou vykazovat vyšších hodnot Ohr a penetrometrického odporu.“ Tato hypotéza nebyla potvrzena. Z výsledků je patrné, že aplikace digestátu neměla průkazný negativní vliv na vývoj hodnoty objemové hmotnosti redukované. Nejvyšších hodnot Ohr bylo naměřeno u varianty kontrolní – bez aplikace digestátu. Varianty hnojené digestátem dosahovaly obecně nižších hodnot. Digestát se projevil pozitivně při aplikaci jednou za dva roky. V tomto případě došlo ke snížení Ohr o 0,04 g/cm<sup>3</sup> oproti variantě kontrolní. Při každoroční aplikaci digestátu, varianta 3, již docházelo k mírnému navýšení zmíněné hodnoty. Výsledky Ohr byly následně porovnány s hodnocením půdní ulehlosti (tab. 2) dle Lhotský a kol., (1984). Na základě těchto výsledků je nutno podotknout, že v žádném ze sledovaných let nedošlo k překročení agroekologických limitů pro půdní ulehlost, která je pro půdy jílovitohlinité 1,40 g/cm<sup>3</sup>.

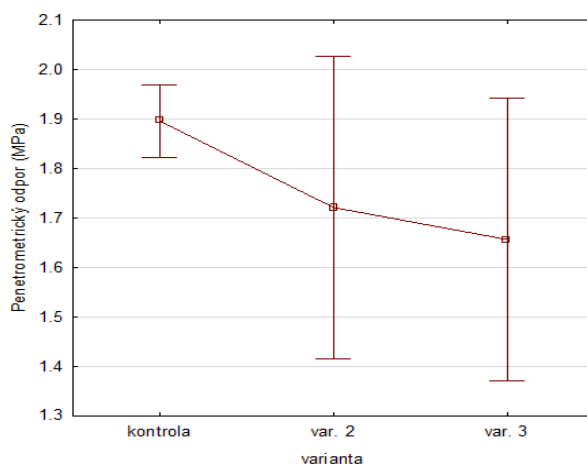


Graf 3 – Průměrné hodnoty objemové hmotnosti redukované (Ohr)

Tab. 2 – Kritická hodnota objemové hmotnosti redukované (Lhotský a kol., 1984, upraveno)

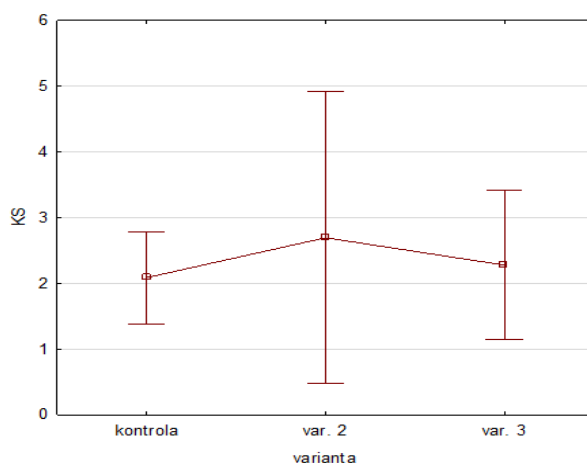
Půdní druh	Ohr kritická
J	1,35
JV/JH	1,40
H	1,45
PH	1,55

Podobně jako Ohr, podávají výsledky penetrometrického odporu, informace o míře pedokompakce. Výsledky, kterých bylo dosaženo na základě penetrometrického měření, uvádí graf 4. Ani v tomto případě nebyla potvrzena hypotéza uvedená výše. Nejvyšší průměrná míra utužení byla naměřena u varianty kontrolní, a to 1,9 MPa, což je téměř o 0,2 MPa více, než u varianty 2 a o 0,24 MPa více, než oproti variantě 3. Četnost aplikace digestátu tedy vedla k pozitivnímu ovlivnění výsledného penetrometrického odporu, a tudíž ke zmírnění výsledného utužení.



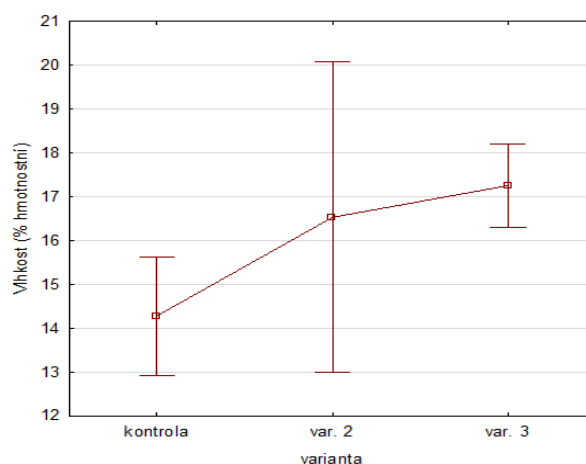
Graf 4 – Průměrné hodnoty penetrometrického odporu (MPa)

Výsledky vztahující se k vývoji půdní struktury jsou uvedeny v grafu 5. Půdní struktura byla hodnocena jako koeficient strukturnosti (KS). Ze zjištěných výsledků je patrné, že digestát měl pozitivní vliv na vývoj této hodnoty. Nejlepší struktura byla zaznamenána u varianty 2, tedy s aplikací digestátu pouze v roce 2019. Zde dosahoval koeficient strukturnosti hodnotu 2,85. U varianty s aplikací digestátu každoročně došlo k mírnému zhoršení půdní struktury (KS 2,35), stále však byla hodnocena lépe, než varianta kontrolní (KS 2,09), bez aplikace digestátu. Na základě zjištěných výsledků není možné potvrdit negativní vliv digestátu na vývoj půdní struktury, jak někteří autoři upozorňují.



Graf 5 – Průměrné hodnoty koeficientu strukturnosti (KS)

Průměrné výsledky půdní vlhkosti (% hmotnostní) jsou uvedeny v grafu 6. Půdní vlhkost závisí nejenom na celkové meteorologické situaci, ale i na jednotlivých variantách pokusu. Z příloženého grafu je patrné, že vlhkost půdy byla mezi sledovanými roky obecně vyšší u variant hnojených digestátem. Varianta s digestátem aplikovaným každoročně vykazovala až o 3 hmotnostní % vyšší vlhkost než varianta kontrolní. Pravděpodobně je tento aspekt zapříčiněn tím, že digestát podporuje infiltrační schopnost vody do půdního prostředí, čímž dochází ke snadnějšímu vsakování vody do půdy.



Graf 6 – Průměrné hodnoty půdní vlhkosti (% hmotnostní)

### Závěr

Výsledky, kterých bylo dosaženo mezi lety 2018–2020, nepotvrzují úvodní hypotézu, a sice – „vyšší četnost aplikace digestátu zpříčiní negativní vývoj vybraných fyzikálních vlastností půdy.“ Bylo zjištěno, že s rostoucí četností aplikace digestátu nedocházelo ke zvyšování penetrometrického odporu (MPa), naopak nejvyšších hodnot bylo naměřeno u varianty kontrolní. Objemová hmotnost redukovaná (Ohr) prakticky kopírovala trend vývoje penetrometrického odporu. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u varianty kontrolní. Mezi variantami s digestátem se hodnota Ohr příliš nelišila, avšak pro optimální vývoj objemové hmotnosti, a tedy utužení půdy, se jeví nejefektivněji aplikace jednou za dva roky. Za sledované roky však nedošlo k překročení agroekologického limitu pro půdní ulehlost dle Lhotského a kol. Varianty, které byly hnojeny digestátem, vykazovaly vyšších hodnot půdní vlhkosti, a tedy lepšího vodního režimu a půdní struktury než půdy kontrolní. Vyšší četnost aplikace digestátu měla pozitivní vliv i na celkové výnosy pěstovaných plodin.

### Použitá literatura

- Alburquerque, Jose & Fuente, Carlos & Campoy, Mc & L, Carrasco & I, Najera & C, Baixauli & Caravaca, Fuensanta & Roldán, Antonio & J, Cegarra & Bernal, Maria. (2012). Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *European Journal of Agronomy*. 43. 119-128. 10.1016/j.eja.2012.06.001.
- Duffková, R., Mühlbachová, G., a kol. (2016). Metodický postup pro efektivní užití digestátu ze zemědělských bioplynových stanic. Certifikovaná metodika.
- Insam H., Gómez-Brandón, M. Ascher, J. 2015: Manure-base biogas fermentation residues – Friend or foe of soil fertility? *Soil Biology & Biochemistry*, 84: 1-14.
- Makadi, M., Tomocsik, a., Eichler-loeberman, B., Schiemenz, K. (2008): Nutrient cycling by usány residuem of bioenergy production – Effects of biogas-digestate on plant and soil parameters. *Ceresů Research communications*, vol. 36, p. 1807-1810. ISSN 0133-3720.
- Marada, P. et al. (2008): Příručka pro nakládání s digestátem a fugátem [online]. [cit. 11.10.2022]. Dostupný na [www: https://eagri.cz/public/web/file/32326/ETAPA\\_IV\\_Metodika\\_digestt\\_FV.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/32326/ETAPA_IV_Metodika_digestt_FV.pdf)
- Marcato-Romain, Claire-Emmanuelle & Mohtar, Rabi & Revel, Jean-Claude & Pouech, Philippe & Hafidi, Mohamed & Guiresse, Maritxu. (2009). Impact of anaerobic digestion on organic matter quality in pig slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63. 260-266. 10.1016/j.ibiod.2008.10.001.

- Štěpánek, P. (2020): Nová strategie výroby a používání minerálních hnojiv [online]. [cit. 11.10.2022]. Dostupný na [www: https://www.agromanual.cz/cz/clanky/vyziva-a-stimulace/legislativa-67/nova-strategie-vyroby-a-pouzivani-mineralnich-hnojiv](https://www.agromanual.cz/cz/clanky/vyziva-a-stimulace/legislativa-67/nova-strategie-vyroby-a-pouzivani-mineralnich-hnojiv)
- Tambone, Fulvia & Adani, Fabrizio & Gigliotti, Giovanni & Volpe, Daniela & Claudio, Fabbri & Provenzano, Maria. (2013). Organic matter characterization during the anaerobic digestion of different biomasses by means of CPMAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Biomass and Bioenergy*. 48. 111–120. 10.1016/j.biombioe.2012.11.006.
- Tambone, Fulvia & Genevini, Pierluigi & D'Imporzano, Giuliana & Adani, Fabrizio. (2009). Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource technology*. 100. 3140-2. 10.1016/j.biortech.2009.02.012.

### **Dedikace**

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1722 a České národní agentury pro zemědělský výzkum – projekt č. QK 21010124 „Půdní organická hmota – hodnocení parametrů kvality.“



Obr. 1 – Aplikace digestátu



Obr. 2 – Měření půdního utužení pomocí elektronického penetrometru.

**Kontaktní adresa:**

Ing. Jakub Prudil  
Zemědělský výzkum, spol. s r.o.  
Zahradní 1, 664 41 Troubsko  
tel.: +420 547 138 822  
e-mail: [prudil@vupt.cz](mailto:prudil@vupt.cz)

## Obohacování krmiv pro včely o induktory imunitní reakce

Enrichment of bee food with immune response inducers

Rost M.<sup>1</sup>, Beneš K.<sup>1</sup>, Hoštičková I.<sup>2</sup>, Žáková H.<sup>2</sup>, Javůrková P.<sup>2</sup>, Zahradník V.<sup>2</sup>, Čurn V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Retorta s.r.o., Boršov nad Vltavou; <sup>2</sup>Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

### Abstrakt

Úbytek přirozeného prostředí a biodiverzity rostlinných zdrojů je spolu s působením biotických a abiotických stresorů jednou z hlavních příčin vysokých úhynů včely medonosné. V této souvislosti je pozornost věnována nejen studiu významu složek přirozené stravy včel, včelího mikrobiomu, ale i studiu detoxikačním mechanismů a možnosti jejich stimulace. Na problematiku obohacování včelího krmiva látkami stimulujícími detoxikační mechanismy, studium exprese cytochromů jako klíčových enzymů v procesu odbourávání xenobiotik a na sledování změn ve spektru pozitivních mikroorganismů byla zaměřena tato studie.

**Klíčová slova:** cytochrom P450, genová exprese, kyselina kumarová, molekulární detekce mikroorganismů

### Abstract

The loss of the natural environment and biodiversity of plant resources, together with the action of biotic and abiotic stressors, is one of the main causes of high mortality of honey bees. In this context, attention is paid not only to the study of the importance of the components of the bees' natural diet, the bee microbiome, but also to the study of detoxification mechanisms and the possibility of their stimulation. The enrichment of bee feed with substances stimulating detoxification mechanisms, the study of the expression of genes for cytochromes as key enzymes in the process of breakdown xenobiotics and the monitoring of changes in the spectrum of positive microorganisms was addressed in this study.

**Keywords:** cytochrome P450, gene expression, coumaric acid, molecular detection microorganisms

### Úvod

Včela medonosná přirozeně opyluje velké množství rostlinných druhů, a včelí snůška je tak velmi různorodá a nutričně vyvážená. Výživový stav včelstva je základním předpokladem pro produktivní včelstvo, odolné vůči stresovým faktorům (Brodtschneider a Crailsheim 2010). Naproti tomu v podmínkách intenzivního zemědělství se setkáváme s úbytkem krajinných prvků bohatých na nektarodárné a pyłodárné rostliny a naopak s rozsáhlými plochami monokultur, které včelám neposkytují potřebné živiny v průběhu celého vegetačního období. Rozmanitost flóry v dosahu včelstev je tak jedním z předpokladů pro zdravé a produktivní včelstvo (Evans et al. 2018). Ve výživě včel hraje podstatnou roli přírodní strava včel a fytochemikálie v ní obsažené. Sacharidy z nektaru a medu jsou základním zdrojem energie, oproti tomu je pyl jediným zdrojem bílkovin, lipidů, vitamínů a minerálů, nezbytných pro vývoj plodu a dospělých včel (Degrandi-Hoffman et al. 2008). Současné studie, porovnávající vliv medu a cukerné stravy, potvrzují význam přirozené stravy pro správnou funkci organismu včel (Wheeler a Robinson 2014; Mao et al. 2013) právě s ohledem na obsah fytochemikálií. Ty jsou představovány chemicky rozmanitými organickými sloučeninami, jako jsou např. alkaloidy, terpenoidy, fenoly, organické kyseliny a aminy. Pozornost je věnována zejména kyselině *p*-kumarové, která je obsažena v pylových zrnech a stimuluje geny pro detoxikační enzymy ve



všech fázích detoxikačního systému. Flavonol kvercetin, známý pro své antioxidační účinky, a kyselina *p*-kumarová zvyšují toleranci včel vůči pesticidům ze skupiny pyretroidů. Podáním kyseliny *p*-kumarové byla také zvýšena exprese genů pro antimikrobiální peptidy, jež mají klíčovou funkci při imunitní reakci na mikrobiální infekci (Johnson et al. 2012).

Tolerance a odbourávání chemických látek jsou umožněny především enzymy, které zprostředkovávají inaktivaci nebo rychlou eliminaci xenobiotik (Wink 2018). Hlavní skupiny enzymů, které zprostředkovávají odbourávání xenobiotik, jsou cytochromy P450, karboxyl/cholinesterázy, glutathion-S-transferázy a transportní proteiny (Gong a Diao 2017). V genomu včely je ale oproti jiným druhům hmyzu silně redukovaný počet detoxikačních genů. Včela *Apis mellifera* je vybavena pouze 46 geny pro P450, 10 pro GTS a 24 geny pro CCE. Navzdory redukovanému počtu detoxikačních genů není ale včela medonosná výrazně citlivější k pesticidům v porovnání s jinými druhy hmyzu (Hardstone a Scott 2010).

Částečné nahrazování přirozené stravy včel cukernými směsmi, případně bílkovinným krmivem je běžnou praxí řady včelařů. Přirozená strava včel však není pouze zdrojem základních živin, ale také prospěšných mikroorganismů (Dharampal et al. 2019; Raymann a Moran 2018) a fytochemikálií, které značně ovlivňují expresi genů spojených s imunitou a rezistencí vůči pesticidům a dalším toxickým xenobiotikům (Liao et al. 2017; Palmer-Young et al. 2017). Schopnost těchto látek indukovat expresi genů kódujících detoxikační a imunitní enzymy zřejmě umožňuje včelám rychle reagovat na toxická xenobiotika a další stresory, s kterými se setkává, a zčásti tak kompenzovat redukované množství těchto genů v genomu. Přidávání fytochemikálií do cukerné stravy by tak mohl být jedním ze způsobů, jak posílit zdravotní stav včelstev (Liao et al. 2017). Jak již bylo zmíněno jednou z významných fytochemikálií je kyselina *p*-kumarová (Mitton et al. 2019). Tato kyselina je v přírodě poměrně rozšířená. Nachází se v arašídách, rajčatech, mrkvi, bazalce a česneku ale i jiných potravinářsky využívaných rostlinách. Zároveň je tato kyselina součástí pylu a stává se tak složkou medu, a tedy součástí jak bílkovinné, tak sacharidové složky včelí potravy. V pylu pak tato kyselina hraje jednu z detoxifikačních rolí vedoucí k regulaci imunitní odezvy a detoxifikačních procesů (Mao et al. 2013; Mao et al. 2015). V nízkých koncentracích je to neškodná látka, její zastoupení je ovšem výrazně ovlivněno výskytem pylodárných rostlin v okolí včelnice. Pokud je včelí pastva v dosahu včel zastoupena chudší druhovou základnou, dost často to může vést k nižšímu titru této koncentrace v plástovém pylu, což může negativně ovlivnit jak rozvoj včelího plodu v průběhu předjaří, jara, ale i léta. Stejně tak její nižší výskyt v medných zásobách, zejména v zásobách podaných včelařem, které jsou buď založené na rafinovaném řepném cukru (sacharóza) anebo na invertním sirupu (glukózo-fruktózový sirup) pak může negativně ovlivnit vitalitu a dlouhověkost zimní generace včel. I přes pozitiva invertního sirupu (jedná se o směs glukózy a fruktózy, tudíž včely nemusí vynakládat energii na rozštěpení sacharózy z řepného cukru pomocí enzymu invertáza), umělá krmiva neobsahují pyl. Tato studie byla zaměřena na sledování vlivu fytochemikálií na expresi genů pro cytochromy P450, přípravu krmiva obohaceného o kyselinu *p*-kumarovou a sledování přítomnosti pozitivních mikroorganismů v úlovém prostředí. Studie je součástí rozsáhlejšího projektu, kdy na tuto pilotní studii navazuje sledování vlivu příkrmu aditivovaným krmivem na vitalitu včelstva a jeho přezimování.

## **Materiál a metody**

*Vliv fenolických látek na expresi genů pro cytochromy u včel intoxikovaných pesticidem thiacloprid:* Sledování bylo provedeno v klíčkovém experimentu, do pokusu bylo zařazeno 6 skupin dělnic, každá skupina byla založena ve 3 opakováních (tripletech) v každé kličce bylo 40 dospělých dělnic včely medonosné. Každá klička byla krmena cukerným roztokem 50% w/v ad libitum. Pokusné skupiny byly kontrola = cukerný roztok; cukerný roztok + imunostimulační



látka; cukerný roztok + thiacloprid 30; cukerný roztok + thiacloprid 60; thiacloprid 30; thiacloprid 60. Denně byla monitorována spotřeba krmiva a úmrtnost včel po dobu 14 dní. Po 14 dnech bylo z každé klíčky odebráno několik včel na analýzy exprese a kvantifikace. RNA byla izolována pomocí TRI Reagentu (Ambion) ze 100 mg tkáně rozdrcené v třecí misce s kapalným dusíkem a dále byla zbavena zbytkové DNA pomocí kitu DNA-freeTMKit (Ambion) podle doporučení výrobce. Vzorky RNA byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80°C. Následně byla pomocí přístroje Biospec Nano (Shimadzu) spektrofotometricky (OD260) změřena koncentrace a kvalita (poměr OD260/280 a OD260/230) získané RNA, která byla naředěna na jednotnou koncentraci 50 ng/μl. cDNA byla nasyntetizována pomocí kitu Standart Reverse Transcription System (Promega) postupem doporučeným výrobcem a skladována při -20°C. Kvantitativní PCR (qPCR) byla provedena s použitím Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) v 96-jamkové destičce za podmínek doporučených výrobcem a to ve třech technických opakováních pro každý vzorek. Relativní exprese genu byla vypočtena podle metody  $\Delta\Delta\text{CT}$  - threshold cycle (Livak, Schmittgen, 2001). Jako referenční gen byl použit Am Rp49.

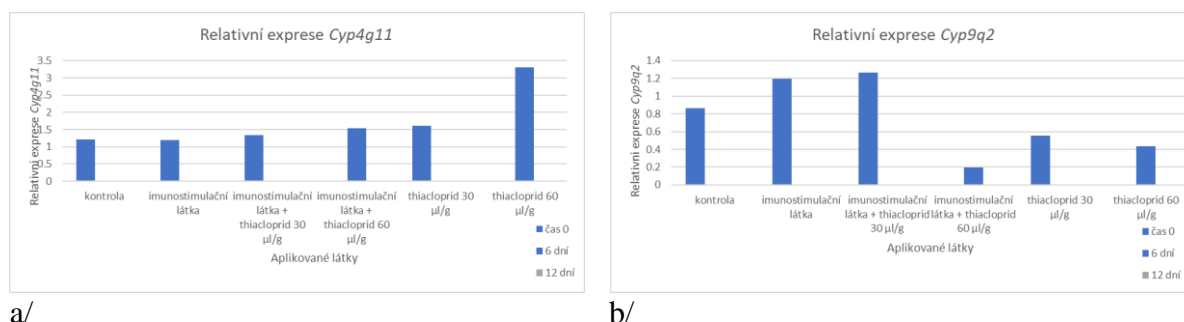
*Příprava krmiva obohaceného kyselinou p-kumarovou:* Krmivo bylo připraveno dle následujícího postupu: smíchat 4,9 ml 96% ethanolu a 19,7 ml demineralizové vody (výsledná koncentrace ethanolu 20 %). Roztok s ethanolem zahřát na 48°C. Poté za stálého míchání přidat 98,5 mg kyseliny p-kumarové, vypnout ohřev a míchat do úplného rozpuštění (do 5 minut). Následně ještě vlažný roztok vmíchat do 1L invertního sirupu. Míchání v sirupu nechat běžet do doby, než bude směs homogenní. Celkově se k 1L invertního sirupu přidává 24,6 ml roztoku 20% ethanolu obsahujícím 98,5 mg kyseliny p-kumarové. Výsledný roztok má objem 1024,6 ml s koncentrací kyseliny 0,096 mg/ml, což je výrazně méně než je maximální rozpustnost ve vodě (1 mg/ml) a tudíž nemůže dojít při nízkých teplotách k vykrystalizování přidané kyseliny p-kumarové z invertního sirupu.

*Izolace DNA a PCR analýza:* Izolace DNA ze vzorků mikroorganismů byla provedena dle metodiky Harju et al. (2004). Kolonie odebrané z pevného media byly kultivovány v mikrocentrifugační zkumavce v tekutém YPD mediu 24 hodin při 30 °C. Buněčný pelet byl resuspendován ve 200 μl lyzačního pufru [2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)]. Mikrozkumavky byly umístěny do mrazáku (-80 °C) na 10 minut a poté byly přeneseny do termobloku (95 °C) na 1 minutu. Tento krok byl zopakován a následně bylo přidáno 200 μl chloroformu. Vzorky byly 2 minuty vortexovány a 3 minuty centrifugovány (14 000 rpm) při pokojové teplotě. Vodná fáze byla přenesena do mikrozkumavek obsahujících 400 μl ledového 100% etanolu. Vzorky byly inkubovány 20 minut v -20 °C, následně centrifugovány (14 000 rpm) 5 minut při pokojové teplotě a supernatant byl odstraněn. Pelet byl promyt v 500 μl 70% etanolu, usušen při pokojové teplotě a resuspendován ve 25 μl TE pufru. DNA byla naředěna na koncentraci 50 ng/μl. V PCR reakci byly použity primery pro *Zygosachcaromyces rouxi*, *Z. mellis* a *Z. favi* (Harrison et al. 2011; Javůrková 2021) a primery pro ITS region a β-tubulin pro detekci hub r. *Talaromyces* (Zahradník, experimentální data; Gardes and Bruns 1993; White et al. 1990; Glass and Donaldson 1995). PCR produkty byly následně sekvenovány. Složení reakční směsi pro PCR: 12,5 μl GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 μl forward primer, 1 μl reverse primer, 1 μl templátové DNA a 9,5 μl PCR vody. PCR reakce probíhala za těchto podmínek: 94 °C 2 minuty, 35 x (94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72°C 30 s) a 72 °C 3 minuty. Separace amplikonů proběhla na 1% agarosovém gelu (5 min při 40V a 1hod a 25 min při 120V). Gel byl obarven ethidium bromidem a vizualizace proběhla pod UV. Výsledky byly zaznamenány pomocí programu GeneSys a Geneious 8.1.9.

## Výsledky

### Vliv fenolických látek na expresi genů pro cytochromy

Relativní exprese genu *Cyp4g11* po přidání samotných fenolických látek do potravy ve srovnání s kontrolními vzorky nezměnila. Po přidání fenolických látek a thiaclopridu byla relativní exprese tohoto genu srovnatelná s kontrolními vzorky. Po přidání nižší dávky thiaclopridu do potravy byla relativní exprese tohoto genu po 14ti dnech také srovnatelná s kontrolou. Po přidání vyšší dávky thiaclopridu byla relativní exprese genu *Cyp4g11* v porovnání s kontrolou téměř 3x vyšší (Obr. 1a).



Obr. 1: Relativní exprese genů pro cytochromy u včel v klíčkovém experimentu.

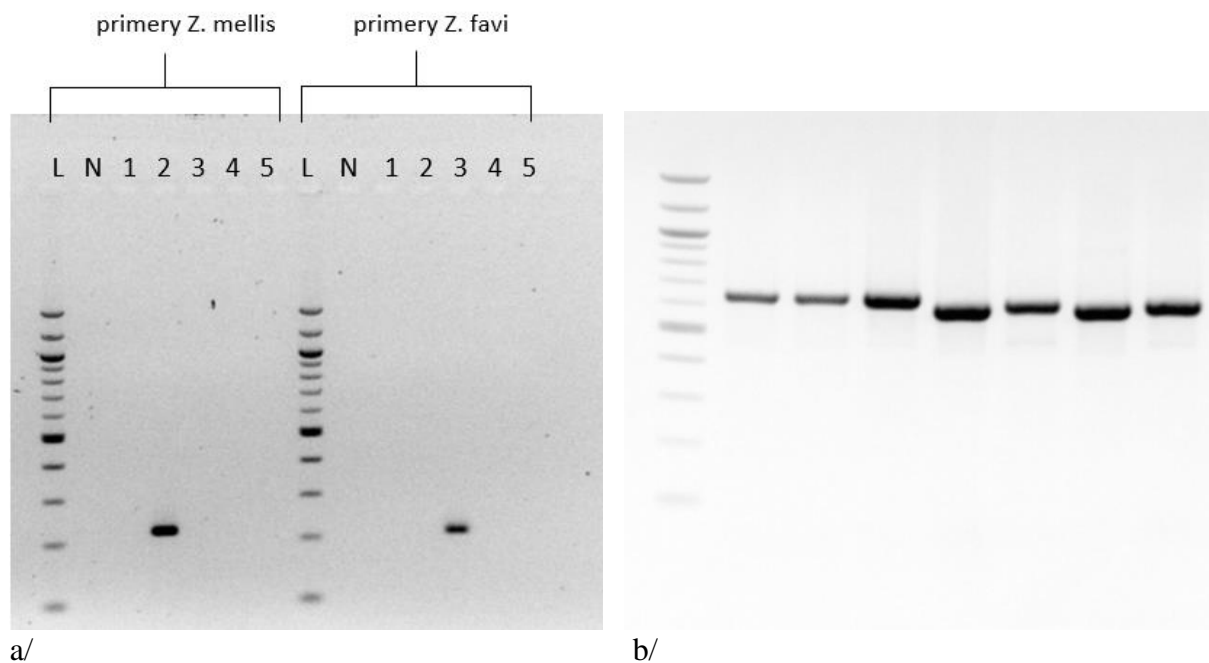
Relativní exprese genu *Cyp9q2* byla 14 dní po přidání samotných fenolických látek do potravy včel lehce zvýšená. Při přidání fenolických látek zároveň s nižší dávkou thiaclopridu byla relativní exprese tohoto genu také lehce zvýšená. Při přidání vyšší dávky thiaclopridu a fenolických látek byla relativní exprese tohoto genu 5x nižší v porovnání s kontrolou. Při přidání samotného thiaclopridu v obou koncentracích do potravy včel byla relativní exprese genu *Cyp9q2* přibližně poloviční v porovnání s kontrolním vzorkem včel (Obr. 1b).

### Příprava krmiva obohaceného kyselinou *p*-kumarovou

Krmivo s kyselinou *p*-kumarovou bylo podáváno v pokusných včelnicích v polovině července a opakovaně v polovině září. Před zakrmením a po cca 3 týdnech po zakrmení byly odebrány vzorky plástů (s plodem, pylem) a vzorky včel. Další odběr je plánován na jaro r. 2023. Odebrané vzorky budou použity pro sledování změn ve spektru pozitivních mikroorganismů ve včelstvu a pro analýzy enzymové aktivity vybraných enzymů spojených s detoxikačními mechanismy. Krmivo bylo přijímáno včelami naprosto bez problému, nebyl rozdíl mezi příjmem samotného invertního cukru a krmiva (invertu) aditivovaného kyselinou *p*-kumarovou.

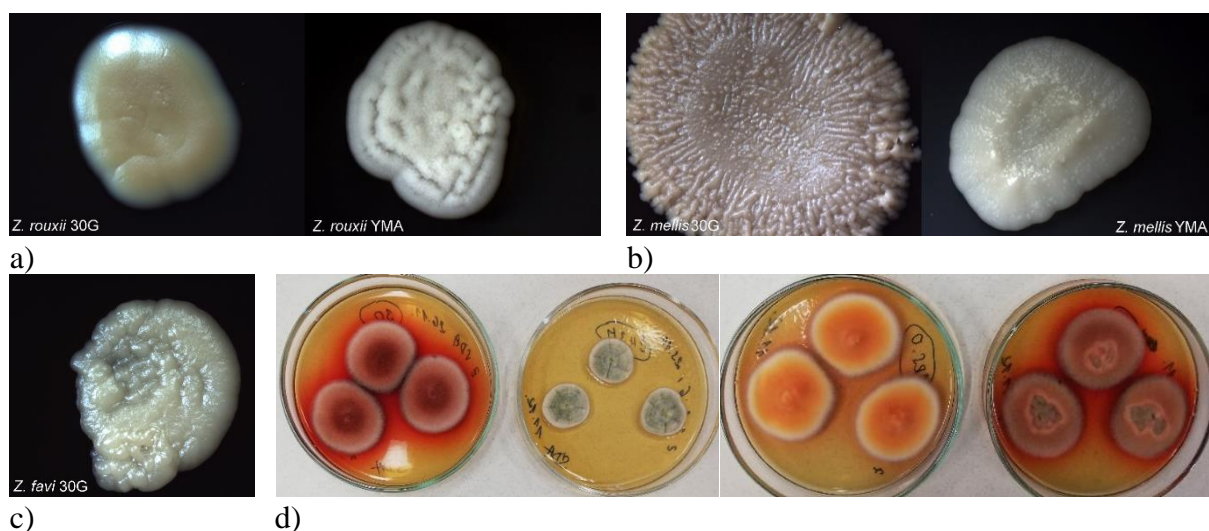
### Analýza mikroorganismů

Molekulární charakterizace kvasinek byla založena na sekvenování úseků ITS a D1/D2. charakterizace hub pak na základě sekvenování úseků ITS a genu pro  $\beta$ -tubulin. Ze včel byly izolovány kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii*, v rouskovém pylu *Z. mellis* a z pylu *Z. favi*. Na základě získaných sekvencí byly navrženy specifické primery pro detekci jednotlivých druhů na základě PCR analýzy bez sekvenování. Na Obr. 2a je ukázka specifity nově navržených primerů a detekce druhů *Z. mellis* a *Z. favi*. Na Obr. 2b je ukázka výsledků PCR analýzy ITS regionů vláknitých hub. Na Obr. 3 je ukázka kultur kvasinek a hub, které byly izolovány v rámci této studie.



Obr. 2: Výsledky PCR analýzy kvasinek a vláknitých hub – a) test specifickosti nově navržených primerů pro specifickou detekci kvasinek; b) amplifikace ITS regionu vláknitých hub r. *Talaromyces*.

a) L: 100 bp ladder, N: negativní kontrola, 1: *Zygosaccharomyces rouxii*, 2: *Z. mellis*, 3: *Z. favi*, 4: *Z. bailii*, 5: *Saccharomyces cerevisiae*



Obr. 3: Charakter kultur kvasinek (a – *Z. rouxii*, b – *Z. mellis*, c – *Z. favi*) a vláknitých hub (d – kmeny *Talaromyces purpurogenus*).

## Diskuze

Pomocí RT-qPCR byla analyzována exprese genů pro cytochromy P450. Tyto enzymy hrají významnou úlohu v procesu detoxikace a mj. jsou zodpovědné za detoxikační dráhu neonicotinoidů (Iwasa et al. 2004). Genová exprese byla analyzována po 14 dnech experimentu. V předchozích studiích (Mao et al. 2011; Manjon et al. 2018), včely byly krmeny jednou pesticidem na začátku experimentu a poté úmrtnost a genová exprese byly analyzovány ihned

po podání pesticidu. V této studii byly včely podrobeny dlouhodobé expozici testovaným látkám. Výsledky naznačují odlišné chování sledovaných genů. To by mohlo naznačovat, že ke zvýšení exprese pravděpodobně došlo na začátku experimentu a vysvětlení této problematiky by však mohla poskytnout kvantifikace příslušných proteinů.

Význam přirozené stravy možnosti suplementace krmiva kyselinou *p*-kumarovou a vliv fotochemikálií na vitalitu včel zmiňuje řada prací (Vočadlová et al. 2020; Mao et al. 2013; Mitton et al. 2019; Liao et al. 2017; Mao et al. 2015). Řešení, které jsme zvolili v této studii je založeno na přimíchávání nízké (a především bezpečné) koncentrace kyseliny *p*-kumarové do krmiva. Přestože se může zdát, že se jedná o velmi malé množství, je nutné si uvědomit, že ani v přírodě se nevyskytuje velké a koncentrované množství této kyseliny, ale její obsah se liší dle lokality a rostliny, ze které pyl pochází. V průběhu života včelí dělnice přijímá potravu, která obsahuje dávku kyseliny *p*-kumarové na úrovni 400-600  $\mu\text{M}$  (hodnota se týká medu - nižší hodnoty a pylu - vyšší hodnoty). Suplementace byla založena na dodání kyseliny *p*-kumarové v titru, který odpovídá průměrné koncentraci v plástovém pylu, tedy 600  $\mu\text{M}$ .

Ve studiích na bezžihadlových včelách druhu *Scaptotrigona depilis* byla demonstrována závislost plodu včely na přítomnosti kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* (Menezes et al. 2015). Podle autorů studie mohou sloužit kvasinky jako zdroj sterolů, které jsou nezbytné pro syntézu hormonů pro svlékání a vývoj plodu. V přírodních podmínkách je ale symbiotický vztah často udržován dalšími mikrobiálními interakcemi (Paludo et al. 2019, 2019). Ve vztahu této včely a kvasinky poukázali autoři na dva další druhy hub, kvasinky rodu *Candida* a vláknité houby rodu *Monascus*, které syntézou těkavých látek stimulují (*Candida*), nebo naopak inhibují (*Monascus*) růst kvasinky tak, aby byla zajištěna mikrobiální rovnováha a udržen vzájemně prospěšný vztah (Paludo et al. 2019). I to byl důvod, proč jsme se v této studii zaměřili na kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* a vláknité houby rodu *Talaromyces*. Z plástového pylu se podařilo izolovat řadu morfologicky velmi variabilních kmenů *Talaromyces purpurogenus* a jedná se o první úspěšnou izolaci tohoto druhu u včely *Apis mellifera*. V medu a plástovém pylu se poměrně často vyskytují i osmotolerantní kvasinky. Vazbu těchto konkrétních druhů *Zygosaccharomyces* na med a plástový pyl lze díky jejich vysoké osmotoleranci odůvodnit právě tím, že med i plástový pyl se vyznačují nízkou aktivitou vody. Vzhledem k adaptaci vybraných druhů *Zygosaccharomyces* na prostředí s vysokým obsahem cukru je tedy pro ně toto prostředí optimální (Čadež et al. 2015). Výskyt kvasinky druhu *Z. mellis* je nejčastěji ve včelím prostředí asociován s medem (Bovo et al. 2018) a plástovým pylem (Detry et al. 2020). Druh *Z. mellis* byl nicméně izolován i z rousků (Sinpoo et al. 2017) a ovarii i střev včelích matek (Yun et al. 2019). V této studii byl druh *Z. mellis* izolovaný z pylu. Jedná o první úspěšnou izolaci *Z. mellis* z pylu, výskyt *Z. mellis* v pylu doposud nebyl publikován. Poměrně nový druh *Z. favi* byl kromě medu izolován také z plástového pylu (Detry et al. 2020; Čadež et al. 2015). V této práci byl druh *Z. favi* izolován z rousků a pylu. Izolace *Z. favi* z rousků poukazuje na pravděpodobnost, že tato kvasinka je v nezralém produktu již od počátku a pravděpodobně přetrvává i během procesu zrání plástového pylu. Díky své podobnosti s druhem *Z. mellis* byl také druh *Z. rouxii* izolován z medu (Bovo et al. 2018) a plástového pylu (Detry et al. 2020). Dále byl druh *Z. rouxii* izolován z trávicího ústrojí dospělých včel, zejména ze žaludku (Detry et al. 2020) a medného váčku (Batra et al. 1973). *Z. rouxii* jsme izolovali ze střev larev. Oproti předchozím zmíněným druhům *Zygosaccharomyces* je ve střevech larev výskyt právě *Z. rouxii* patrně nejvíce pravděpodobný, vzhledem k jeho dřívější izolaci v jiných studiích z prostředí larev i dospělých včel. Izolované kmeny byly determinované i na základě sekvenování vybraných úseků DNA. Oficiálním DNA barcodem pro identifikaci hub je ITS, úsek rDNA (Snosch et al. 2012). V této práci determinace kmenů pouze na základě ITS nebyly

vždy jednoznačné, a proto bylo přistoupeno i k analýze úseku D1/D2 (u kvasinek) a genu pro tubulin u vláknitých hub.

## Závěr

V rámci této studie byla sledována exprese genů pro cytochromy P450. Vzhledem k ne zcela jasnému trendu v úrovni exprese v reakci na ošetření včel byl proveden pokus přímo ve včelnicích a včelstva byla zakrmena krmivem – invertním cukrem aditivovaným kyselinou p-kumarovou. V rámci pokusu byly odebírány vzorky, a po přezimování bude vyhodnocen jak efekt aditivace krmiva, tak i úroveň aktivity detoxikačních enzymů. Významná část studie se věnovala izolaci a molekulární identifikaci kvasinek a vláknitých hub asociovaných se včelami. Podařilo se poprvé izolovat jak houby rodu *Talaromyces*, tak i *Z. mellis* a *Z. favi* z pylu. Rovněž byly navrženy specifické primery pro PCR detekci kvasinek.

## Literatura

- Batra, L. R. et al. (1973). The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 49:13–44.
- Bovo, S. et al. (2018). Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature. *PLoS One*. 13(10): e0205575.
- Brodshneider, R., Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41:278–294.
- Čadež, N. et al. (2015). *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *Antonie Van Leeuwenhoe*, 107(3):645–654.
- Degrandi-Hoffman, G., Wardell, G., Ahumana-Segura, F., Rinderer, T., Danka, R., Pettis, J. (2008). Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *J Apic Res Bee World* 47:265–270.
- Detry, R. et al. (2020). Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. *Microorganisms*. 8(11):1789.
- Dharampal, P. S., Carlson, C., Currie, C. R., Steffan, S. A. (2019). Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proc R Soc B* 286:20182894.
- Evans, E., Smart, M., Cariveau, D., Spivak, M. (2018). Wild, native bees and managed honey bees benefit from similar agricultural land uses. *Agric Ecosyst Environ* 268:162–170.
- Gong, Y., Diao, Q. (2017). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26:1–12.
- Hardstone, M. C., Scott, J. G. (2010). Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Manag Sci* 66:1171–1180.
- Harju, S. et al. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*. 4:8.
- Iwasa, T.; Motoyama, N.; Ambrose, J.T.; Roe, R.M. (2004). Mechanism for the Differential Toxicity of Neonicotinoid Insecticides in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot*. 23:371–378.
- Johnson, R. M., Mao, W., Pollock, H. S., Niu, G., Schuler, M. A., May, R. (2012). Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS One* 7:1–9.
- Liao LH, Wu WY, Berenbaum MR. (2017). Impacts of Dietary Phytochemicals in the Presence and Absence of Pesticides on Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects*. 14:8(1):22.
- Manjon, C.; Troczka, B.J.; Zaworra, M.; Beadle, K.; Randall, E.; Hertlein, G.; Kumar, S.S.; Nauen, R. (2018). Unravelling the Molecular Determinants of Bee Sensitivity to Neonicotinoid Insecticides. *Curr. Biol*. 28:1137–1143.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28:110(22):8842-6.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. (2015). Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. *Insect Mol Biol* 2015;24:582–588.
- Mao, W.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. (2011). CYP9Q-Mediated Detoxification of Acaricides in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 12657–12662

- Menezes, C. et al. (2015). A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*. 25(21):2851–2855.
- Mitton, G., Szawarski, N., Mitton, F., Iglesias, A., Eguaras, M., Ruffinengo, S., Maggi, M. (2019). Impacts of dietary supplementation with p-coumaric acid and indole-3-acetic acid on survival and biochemical response of honey bees treated with tau-fluvalinate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 189.
- Palmer-Young, E. C., Tozkar, C. O., Schwarz, R. S. (2017). Nectar and pollen phytochemicals stimulate honey bee (Hymenoptera: Apidae) immunity to viral infection. *J Econ Entomol* 110:1959–1972.
- Paludo, C. R., Menezes, C., Silva-Junior, E. A. (2018). Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Sci. Rep.* 8:1122.
- Paludo, C. R., Pishchany, G., Andrade-Dominguez, A. (2019). Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PLoS One* 14:1–12.
- Raymann, K., Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci* 26:1–8.
- Sinpoo, C. et al. (2017). Dynamics of fungal communities in corbicular pollen and bee bread. *Chiang Mai Journal of Science*. 44(4):1244–1256.
- Snosch, C. L. et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(16):6241–6246.
- Vočadlova K., Rost M., Čurn V. (2020). Loss of natural habitat and inadequate bee nutrition – possible causes affecting efficiency of detoxication of xenobiotics and bee mortality. *Veterinářství* 70(8):486-489.
- Wheeler, M. M., Robinson, G. E. (2014). Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Sci Rep* 4:5726.
- Wink, M. (2018). Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol* 9:1–9.
- Yun, J.-H. et al. (2019). Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Scientific reports*. 8(1).

## Poděkování

Tuto studii podpořilo Ministerstvo zemědělství ČR (projekt QK1910356) a Grantová agentura Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 080/2022/Z).

## Kontaktní adresa:

Michael Rost

Katedra genetiky a biotechnologií, Fakulta zemědělská a technologická, JU v ČB

Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice

[rost@fzt.jcu.cz](mailto:rost@fzt.jcu.cz), 387772937

## Výnosy zrna ozimé pšenice a obsah bílkovin v zrna při různých technologiích zpracování půdy

Winter wheat grain yield and protein content in grain at different soil tillage systems

Růžek P., Kusá H., Vavera R., Dvořáček V.

*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Prague, Czech Republic*

### Abstrakt

V dlouhodobém polním pokusu (od r. 1995) na stanovišti v Praze-Ruzyni (řepařská výrobní oblast; 340 m n. m.; roční úhm srážek 497 mm; průměrná roční teplota 9,6°C; hnědozem na spraši) byl v letech 2006-21 zjišťován vliv různého zpracování půdy (O=orba, M=minimalizace, BZ=bez zpracování) a hnojení dusíkatými hnojivými (LAV, DAM, UREA<sup>stabil</sup>) na výnos zrna, obsah N-látek v zrna a odběr dusíku zrnem ozimé pšenice. Ve sledovaném období byl zjištěn významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi technologiemi zpracování půdy pouze ve výnosu zrna a odběru dusíku zrnem u nehnojené kontrolní varianty, kde výnosy na O a M (5,55 a 5,50 t/ha po řepce, 8,02 a 7,97 t/ha po hrachu) byly průkazně vyšší než na BZ (4,37 a 6,76 t/ha po řepce a hrachu), ale u variant hnojených dusíkem nebyly rozdíly mezi zpracováním půdy ani použitými hnojivými statisticky průkazné.

**Klíčová slova:** ozimá pšenice, orba, minimalizace, půda bez zpracování, hnojení dusíkem

### Abstract

The effect of different tillage (ploughing, minimum tillage, no-till) and nitrate fertilization (calcareous ammonium nitrate, urea-ammonium nitrate solution, UREA<sup>stabil</sup> = urea with urease inhibitor) on grain yield, protein content in grain and nitrogen uptake by grain of winter wheat was observed in long-term field experiment (founded in 1995) at the station in Prague-Ruzyně (beet production area, annual precip. 497 mm, annual aver. temperature 9.6°C) in the years 2006-21. In the monitored period, a significant difference ( $P < 0.05$ ) between tillage technologies was found only in grain yield and nitrogen uptake by grain in the unfertilized control variant, where the yields on ploughing and minimum tillage (5.55 and 5.50 t/ha after rape, 8.02 and 7.97 t/ha after peas) were significantly higher than on no-till (4.37 and 6.76 t/ha after rapeseed and peas), but there were no differences between tillage and applied fertilizers for nitrogen-fertilized variants statistically significant.

**Keywords:** winter wheat, ploughing, minimum tillage, no-till, nitrogen fertilization

### Úvod

Při předpokládaných změnách klimatu a v návaznosti na Zelenou dohodu EU se zvyšuje význam používání konzervačních technologií zpracování půdy, které zlepšují zadržování vody, uhlíku a živin v půdě. Machado et al. (2007) uvádí, že použití bezorebných, resp. minimalizačních technologií je přínosné z hlediska ekonomického, stability půdních agregátů, omezení eroze půdy, zadržování vody v půdě, zvýšení obsahu organické hmoty. Konzervační způsoby zpracování půdy zvyšují zásobu vody v půdě díky lepší infiltraci a omezení výparu a v závislosti na půdním typu a klimatických podmínkách mohou vést k vyšším i nižším výnosům plodin ve srovnání s konvenčními postupy (Lampurlanés et al., 2001). V důsledku menšího provzdušnění půdy při nižší intenzitě jejího zpracování dochází k pomalejšímu a méně intenzivnímu uvolňování živin z organických vazeb než po konvenčním zpracování půdy. Navíc zde bývá větší imobilizace dusíku v návaznosti na množství posklizňových zbytků a jejich kvalitu včetně poměru C:N. K dosažení stejného výnosu je zpravidla třeba zvýšit celkovou dávku dusíku kvůli jeho vyšší imobilizaci půdní organickou hmotou, denitrifikací a nižší mineralizací, jak potvrzují i Sprague a Triplett (1986). Proto je u bezorebného zpracování



půdy účinnost malých dávek dusíku ve srovnání s orbou většinou nižší a při dávkách N nižších než optimálních se dosahuje u půdoochranných technologií nižších výnosů než u orby. Při hnojení dusíkem na povrch půdy s posklizňovými zbytky a vyšší schopností imobilizace N jsou vhodnější rychle rozpustná hnojiva s formami dusíku dobře pohyblivými v půdě, který se po srážkách snadno dostává ke kořenům rostlin.

### **Materiál a metody**

Dlouhodobý pokus s různými technologiemi zpracování půdy byl založen v roce 1995 na stanovišti v Praze-Ruzyni (GPS 50,09N, 14,20E; řepařská výrobní oblast; 340 m n. m.; roční úhrn srážek 497 mm, průměrná roční teplota 9,6°C dle průměru let 1991-2020; hnědozem na spraši). Porovnávány byly tři intenzity zpracování půdy: konvenční s orbou do 0,22 m (O), minimalizace = mělké zpracování půdy radličkou do 0,1 m (M) a půda bez zpracování s posklizňovými zbytky na povrchu (BZ). Osevní postup byl hrách - ozimá pšenice - ozimá řepka - ozimá pšenice. Na podzim byla na základě výsledků rozborů půd na celém pozemku aplikována fosforečná, draselná a hořečnatá hnojiva (amofos, kamex nebo draselná sůl, kieserit). Dusíkatá hnojiva byla k ozimé pšenici aplikována na jaře v dávkách stanovených na základě obsahu N<sub>min</sub> v půdě do hloubky 0,9 m po zimě a dle předplodiny (většinou 120-130 kg N/ha po hrachu, 140-150 kg N/ha po řepce), rozdělené na dvě až tři dílčí dávky, přičemž první regenerační činila vždy 60 kg N/ha. Prezentované období 2006-21 zahrnuje 8x pšenici pěstovanou po řepce a 8x po hrachu. Testované varianty hnojení: nehnojená kontrola, ledek amonný s vápencem (LAV), LAV + kapalné hnojivo DAM, močovina s inhibitorem ureázy NBPT (hnojivo UREA<sup>stabil</sup>, v grafech značeno Us).

Výsledky byly hodnoceny metodou T-test s hladinou významnosti  $P < 0,05$  a  $P < 0,01$ .

### **Výsledky**

Po hrachu byly vždy dosaženy významně vyšší výnosy zrna (a odběr dusíku zrnem) než po ozimé řepce (grafy 1 a 3). Ve sledovaném období byl zjištěn významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi technologiemi zpracování půdy pouze ve výnosu zrna a následně odběru dusíku zrnem u nehnojené kontrolní varianty, kde výnosy na O a M (5,55 a 5,50 t/ha po řepce, 8,02 a 7,97 t/ha po hrachu) byly průkazně vyšší než na BZ (4,37 a 6,76 t/ha po řepce a hrachu), ale u variant hnojených dusíkem nebyly rozdíly statisticky průkazné. V rámci jednotlivých systémů zpracování půdy byly u hnojených variant dosaženy významně ( $P < 0,01$ ) vyšší výnosy zrna než u kontroly bez hnojení dusíkem, a to o 21 – 39% po hrachu a o 45 – 77 % po řepce, přičemž nejmenší vliv mělo hnojení na orbě a největší na nezpracované půdě. Mezi různými hnojivy nebyl v průměru celého sledovaného období zjištěn statisticky významný rozdíl, především v důsledku velkých meziročních rozdílů. Ty byly způsobeny odlišnými povětrnostními podmínkami – např. úhrnem srážek (od jarní aplikace hnojiv do sklizně dosahoval 162 – 370 mm, za celou vegetaci 278 – 505 mm) a zejména jejich rozložením během vegetace. Působení různých forem dusíku z aplikovaných hnojiv (nitratová, amonná, amidická v kombinaci s inhibitorem ureázy) závisí na tom, kdy po aplikaci přišly efektivní srážky.

Různá zásoba a dostupnost živin v půdě po různých předplodinách se projevila rozdílnou výnosovou hladinou, ale v kvalitě zrna byly rozdíly podstatně nižší. Obsah bílkovin v zrně pšenice po hrachu byl o 0,2 – 0,5 % vyšší než po řepce, což bylo mimo jiné v důsledku vyšších výnosů po hrachu a tzv. zředovacího efektu. Hnojení dusíkem významně zvýšilo obsah N-látek v zrně po řepce i hrachu. Jak vyplývá z grafu 2, po řepce byly zjištěny vyšší obsahy bílkovin v zrně po hnojení UREA<sup>stabil</sup> a LAV než u DAMu, zatímco po hrachu nebyly zjištěny mezi hnojivy významnější rozdíly. Také zpracování půdy nemělo na tomto stanovišti podstatný vliv na obsah bílkovin v zrně.

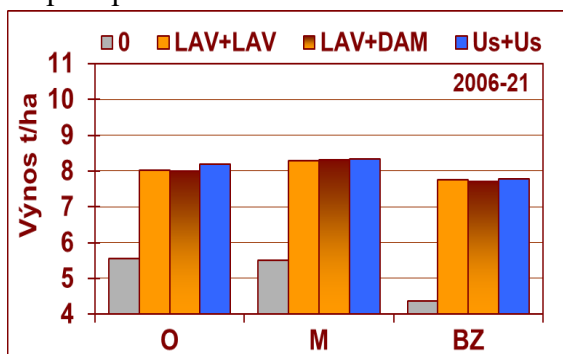


Odběr dusíku zrnem byl obdobně jako u výnosů zrna vyšší u orby a minimalizace než na půdě bez zpracování (graf 3). Po řepce byl odběr N vyšší po hnojení UREA<sup>stabil</sup> a LAV než po hnojení DAM, po hrachu byly rozdíly mezi hnojivy v průměru sledovaných let minimální.

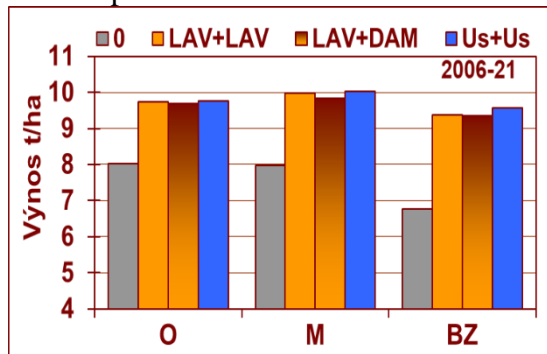
Spotřeba dusíku na produkci 1 t zrna ozimé pšenice byla u nehnojných variant obdobná u všech technologií zpracování půdy a pohybovala se od 15,6 do 17 kg N/t zrna (graf 4). U hnojených variant byla průměrná spotřeba dusíku na 1 t zrna u orby 22,2 kg N po řepce a 22,5 kg N po hrachu, u minimalizace 22 a 21,9 kg N a na půdě bez zpracování 20,8 a 20,9 kg N na 1 t zrna.

**Graf 1. Výnos zrna oz. pšenice po různém zpracování půdy a předplodině (Ruzyně 2006-21)**

A: po řepce

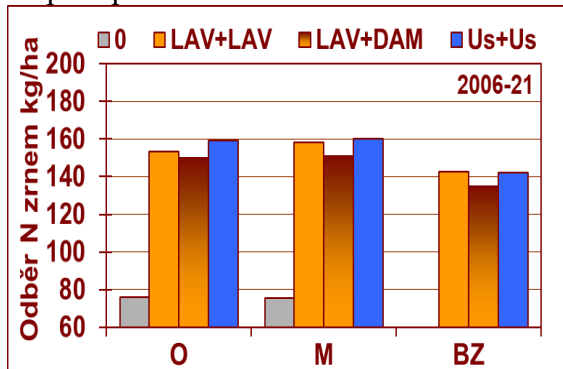


B: po hrachu

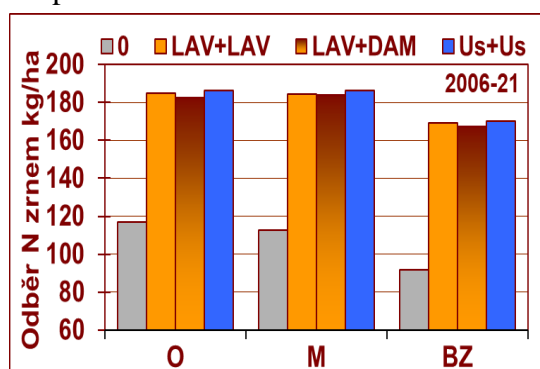


**Graf 2. Obsah N-látek v zrně ozimé pšenice po různém zpracování půdy a předplodině (Ruzyně 2006-21)**

A: po řepce

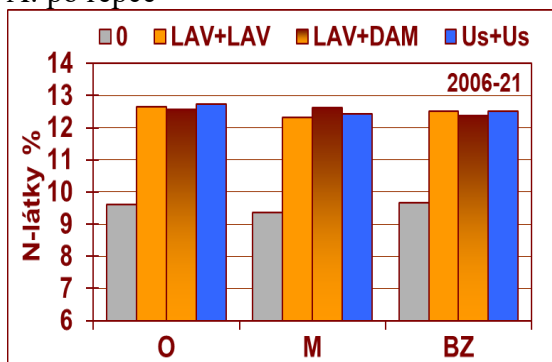


B: po hrachu

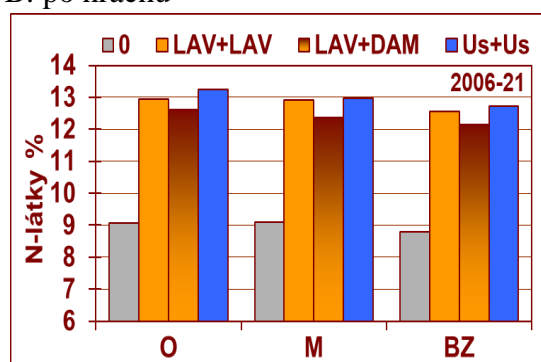


**Graf 3. Odběr dusíku zrnem ozimé pšenice po různém zpracování půdy a předplodině (Ruzyně 2006-21)**

A: po řepce

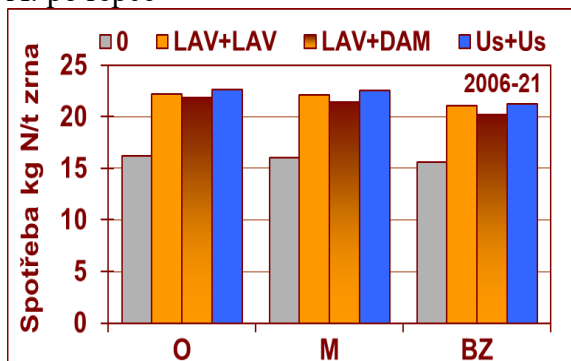


B: po hrachu

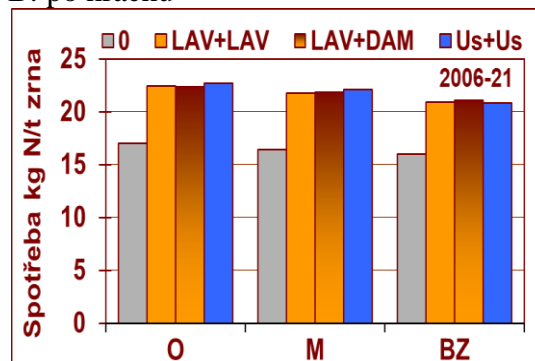


**Graf 4. Spotřeba dusíku na produkci 1t zrna ozimé pšenice po různém zpracování půdy a předplodině (Ruzyně 2006-21)**

A: po řepce



B: po hrachu



## Diskuze

Z víceletých výnosových výsledků dosažených v letech 2006-21 s různým zpracováním půdy (orba, minimalizace, bez zpracování) vyplývá, že bez hnojení dusíkem byly nejnižší výnosy zrna ozimé pšenice dosaženy na půdě bez zpracování. U této technologie byl zjištěn i nejnižší celkový odběr dusíku zrnem a slámou (68 kg N/ha po řepce a 108 kg N/ha po hrachu), který byl u minimalizace 88 a 131 kg N/ha a největší u orby 90 a 136 kg N/ha. To potvrzuje v odborné literatuře citované výsledky o menším uvolnění živin z půdy bez zpracování a významném vlivu předplodiny. Výnosům polních plodin po různém zpracování půdy bylo věnováno mnoho studií, ale dosažené výsledky jsou často protichůdné kvůli odlišným půdně-klimatickým podmínkám, pěstovaným plodinám a různé intenzitě zpracování půdy. Někteří autoři popsali při použití konzervačních technologií stejné nebo dokonce vyšší výnosy než na orané půdě, ale častěji je popisován jejich negativní dopad na výnos v závislosti na době, po níž jsou konzervační technologie používány, typu rostlin a půdně-klimatických podmínkách.

S nižší intenzitou zpracování půdy klesá mineralizace živin z půdní organické hmoty. Nejnižší mineralizace probíhá v nezpracovávané půdě, kde Haruna and Nkongolo (2020) našli v jarním období o 40 % méně nitrátového dusíku než na půdě konvenčně zpracovávané s orbou, což připsali nejen menšímu provzdušnění půdy, ale i její nižší teplotě.

K rozdílům ve výnosech zrna kromě různé dostupnosti živin pro rostliny přispívá i odlišná vlhkost půdy v jednotlivých systémech zpracování půdy. Posklizňové zbytky na povrchu

nezpracované půdy omezující výpar a lepší infiltrace vody do půdy vedly k nejvyšší vlhkosti půdy. Ačkoli výnosy zrna ozimé pšenice byly ve všech letech, s výjimkou 2017 a 2019 na půdě bez zpracování nejnižší, v sušších letech (2015, 2016, 2018) byly zjištěny ve srovnání s orbou a minimalizací menší rozdíly (0,1 – 0,2 t zrna/ha) v důsledku lepší dostupnosti vody pro rostliny u této technologie. Nejvyšší vlhkost u nezpracované půdy popsali i Copec et al. (2015), kteří porovnávali pět různých intenzit zpracování půdy, přičemž obsah vody v půdě klesal s intenzitou jejího zpracování. Vyšší obsah vody v půdě se projevil vyššími výnosy zrna ozimé pšenice na nezpracované půdě než na konvenční variantě s podmítkou, orbou a předseťovou přípravou, a to jak ve srážkově průměrném roce, tak i nadnormálním. Naopak Jug et al. (2011) zjistili nejvyšší meziročníkovou stabilitu u konvenčního zpracování půdy s orbou nebo při mělkém zpracování disky, kde byly dosahovány nejvyšší výnosy, stejně jako v našem dlouhodobém pokusu na stanovišti v Ruzyni. Šíp et al. (2013) konstatovali, že vliv půdně klimatických podmínek, odrůdy a intenzity vstupů měl významnější vliv na výnos i kvalitativní ukazatele zrna 13 odrůd ozimé pšenice než způsob zpracování půdy. Při vysoké intenzitě vstupů dosáhli vyššího obsahu bílkovin a mokrého lepku v zrně u konvenčního zpracování půdy než na minimalizaci, kde byly naopak vyšší výnosy (o 4,6% v průměru souboru odrůd). Naopak Yousefian et al. (2021) ve vlhčích klimatických podmínkách zjistili výrazný vliv zpracování půdy na výnos a obsah bílkovin v zrně pšenice, které klesaly v pořadí konvenční zpracování půdy > minimalizace > půda bez zpracování.

Významnější rozdíly ve výnosech zrna a jeho kvalitě nebyly zjištěny mezi použitými hnojivy, jen po ozimé řepce byl nižší obsah bílkovin v zrně pšenice po přihnojení kapalným hnojivem DAM. Průkazně se ve srovnání s běžně používaným hnojivem LAV neprojevovalo zvýšením výnosů a obsahem bílkovin v zrně ve většině let ani přihnojení pšenice močovinou s inhibitorem ureázy (UREA<sup>stabil</sup>) u bezorebných technologií zpracování půdy s větším množstvím rostlinných zbytků na povrchu a v povrchové vrstvě půdy. Nepřeměnná močovina je po srážkách dobře pohyblivá v půdě, což by mělo přispět k lepšímu transportu dusíku přes povrchovou vrstvu půdy ke kořenům rostlin. Watson (2005) uvádí, že největší prospěch při používání inhibitorů ureázy nastává mimo jiné právě u půd, které vykazují vysokou aktivitu enzymu ureázy vzhledem k redukované kultivaci nebo při akumulaci půdní organické hmoty a pokud existuje šance, že se močovina po povrchové aplikaci dostane s vodou do půdního profilu. Účinnost dusíku z aplikovaných hnojiv je závislá na časnosti a množství srážek po hnojení a dobrém zdravotním stavu rostlin. Právě nedostatek srážek po pozdním přihnojení ozimé pšenice je zejména v sušších a teplejších oblastech častou příčinou nízkého využití dusíku z hnojiv rostlinami. Lépe působí dobře rozpustná tuhá hnojiva nebo kapalná, u kterých je však nutné zabránit popálení porostu, zejména klasů a praporcových listů.

## Závěr

Ve víceletém polním pokusu (2006-21) s různými technologiemi zpracování půdy na stanovišti v Ruzyni byl zjištěn významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) pouze ve výnosu zrna a odběru dusíku zrnem u nehnojené kontrolní varianty, kde výnosy po orbě a minimalizaci (5,55 a 5,50 t/ha po řepce, 8,02 a 7,97 t/ha po hrachu) byly průkazně vyšší než na půdě bez zpracování (4,37 a 6,76 t/ha po řepce a hrachu), ale u variant hnojených dusíkem nebyly rozdíly mezi zpracováním půdy ani použitými hnojivy statisticky průkazné. Po aplikaci dusíkatých hnojiv v celkové dávce 120 – 150 kg N/ha byly dosaženy významně ( $P < 0,01$ ) vyšší výnosy zrna než u nehnojené kontroly, a to o 21 – 39% po předplodině hrachu a o 45 – 77 % po řepce, přičemž nejmenší vliv mělo hnojení na orbě a největší na nezpracované půdě. Po předplodině řepce byly zjištěny vyšší obsahy bílkovin v zrně po hnojení UREA<sup>stabil</sup> a LAV než u DAMu, zatímco po hrachu nebyly zjištěny mezi hnojivy významnější rozdíly. U hnojených variant byla průměrná spotřeba dusíku na 1 t zrna u orby 22,2 kg N po řepce a 22,5 kg N po hrachu, u minimalizace 22 a 21,9 kg N a na půdě bez zpracování 20,8 a 20,9 kg N na 1 t zrna.

## Literatura

- Copec, K., Filipovic, D., Husnjak, S., Kovacev, I., Kosutic, S. 2015. Effects of tillage systems on soil water content and yield in maize and winter wheat production. *Plant Soil Environ.* 61(5): 213-219
- Haruna, S. I., Nkongolo, N.V. 2020. Influence of Cover Crop, Tillage, and Crop Rotation Management on Soil Nutrients. *Agriculture* 10 (6): 225. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060225>
- Jug I., Jug D., Sabo M., Stipešević B., Stošić M. 2011. Winter wheat yield and yield components as affected by soil tillage systems. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 1–7
- Lampurlanés J., Angás P., Cantero-Martínez C. 2001. Root growth, soil water content and yield of barley under different tillage systems on two soils in semiarid conditions. *Field Crops Research*, 69: 27–40
- Machado, S., Petrie, S., Rhinhart, K., Qu, A. 2007. Long-term continuous cropping in the Pacific Northwest: Tillage and fertilizer effects on winter wheat, spring wheat, and spring barley production. *Soil and Tillage Research* 94: 473-481.
- Sprague G.B., Triplett M.A. 1986. No-tillage and surface-tillage agriculture. John Wiley and Sons, Canada. 467 s. ISBN 0 471-88410-3.
- Šíp, V., Chrpová, J., Vavera, R., Kusá, H., Růžek, P. 2013. Winter wheat yield and quality related to tillage practice, input level and environmental conditions. *Soil & Tillage Research* 132: 77-85
- Yousefian, M., Shahbazi, F., Hamidian, K. 2021. Crop Yield and Physicochemical Properties of Wheat Grains as Affected by Tillage Systems. *Sustainability* 2021, 13, 4781. <https://doi.org/10.3390/su13094781>
- Watson, C. 2005. Urease Inhibitors. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers: 16 s.

## Poděkování

Publikované výsledky byly získány za finanční podpory MZe ČR (RO0418).

## Kontaktní adresa:

Ing. Pavel Růžek, CSc.  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6  
605 233 484, [ruzek@vurv.cz](mailto:ruzek@vurv.cz)

## Aluviální půdy a změny jejich vlastností jako důsledek klimatické změny

### Alluvial soils and changes in their properties as a consequence of climate change

Sedlák L.<sup>1</sup>, Prudil J.<sup>1,2</sup>, Pospíšilová L.<sup>1</sup>, Vlček V.<sup>1</sup>, Šedová L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Troubsko

#### Abstrakt

Dlouhé periody sucha, vzrůstající průměrná roční teplota, krupobití, eroze půdy po prudkých deštích, záplavy, a mnohé další jsou důsledky klimatické změny. Aluviální půdy jsou významně těmito změnami zasaženy. Tyto půdy jsou často využívány jako orné půdy, trvale travní porosty i jako lesní půdy, z tohoto důvodu je zcela nezbytné sledovat změny jejich vlastností. Jejich pedogeneze, produkční schopnost a kvalita je spojena s povahou přineseného materiálu, typickými periodickými záplavami a charakteristickým vodním režimem. Cílem výzkumu bylo porovnat vlastnosti fluvizemí při různém způsobu hospodaření a v podmínkách měnícího se klimatu. Vybrány byly lokality Ivaň (lužní les), Žabčice (orná půda) a Lednice (lužní les). Byly sledovány základní chemické, fyzikální a hydrofyzikální vlastnosti (půdní reakce, obsah organického uhlíku, obsah humusových látek a jejich kvalita, huminové kyseliny, množství srážek, půdní vlhkost a hladiny podzemní vody). Zjištěné výsledky dokládají statisticky průkazné rozdíly ( $p=0,05$ ) půdních vlastností vlivem změny klimatu. Závěrem jsou doporučena opatření, která mají vyřešit negativní dopad změny klimatu na půdní vlastnosti.

**Klíčová slova:** fluvizemě, klimatická změna

#### Abstract

Long dry spells, increasing average annual air temperature, hailstorms, and soil erosion after torrential rains and floods are the main consequences of climate change. Alluvial soils are highly affected by these negative changes. Most of these soils are used as arable soils, permanent grassland, or forest soils. Their pedogenesis, productivity and quality depend on the character of alluvial material, periodical floods, and typical water regimes. The aim of the research was to compare the chemical, physical and hydrophysical properties (e.g. soil reaction, organic carbon content, humic substances content and quality, amount of precipitations, soil moisture and underground water level) of Fluvisols under different land use. The studied localities were as follows: Ivaň (floodplain forest), Žabčice (arable soil), and Lednice (floodplain forest). The results showed statistically significant differences ( $p=0.05$ ) in soil properties due to climate change. Finally, improving measures are recommended.

**Keywords:** alluvial soils, climate change

#### Úvod

Změna klimatu a globální oteplování má řadu důsledků pro fluviální půdy. Z důvodu změny množství a rozdělení srážek v průběhu roku se mění evapotranspirace, půdní vlhkost, teplota a tím vodní, vzdušní a tepelný režim těchto půd (Goudie, 2006). Změny uvedených režimů půd se odrážejí v intenzitě půdotvorných pochodů (mineralizace a humifikace), což ovlivňuje rostliny i celý ekosystém. Dalším významným faktorem, ovlivňujícím vlastnosti fluvizemí, je vyrovnaní toků řek a pravidelných inundací. Nový materiál tak není pravidelně přinášěn a dochází ke změnám v charakteru půdotvorného procesu. Pires et al. (2018) uvádějí, že vlivem klimatické změny se snižuje biodiverzita stability celého ekosystému. I když biologická

rozmanitost dokáže do určité míry utlumit negativní účinky změny klimatu, může dojít ke změně mechanismů, které určují vztah mezi biologickou rozmanitostí a funkcemi systému, anebo dokonce ke zhroucení či zániku systému. Cílem našeho výzkumu bylo zkoumat a porovnat vlastnosti fluvizemí v lužním lese (lokality Ivaň a Lednice) a na orné půdě (Žabčice). Dle Němečka a kol. (2011) byla na lokalitě Ivaň klasifikována fluvizem modální. Na lokalitě Lednice byla klasifikována fluvizem glejová a na lokalitě Žabčice byla rovněž klasifikována fluvizem glejová. Hlavní hypotézou výzkumu je, že různý způsob hospodaření a změna klimatu, společně s odstraněním periodických inundací po vyrovnání toku řek, vede k diferenciaci půdních vlastností fluvizemí.

## **Materiál a metody**

Byly využity standardní analytické metody dle Zbírala a kol. (2022) a Pospíšilová a Vlček (2015). Aktivní a výměnná půdní reakce byla stanovena potenciometricky. Obsah organického uhlíku byl stanoven oxidimetrickou titrací a obsah humusových látek byl stanoven metodou krátké frakcionace. Byla využita jednofaktorová analýza variance, která byla doplněna Fisherovým testem ( $p=0,5$ ). Byl využit program STATISTICA 14.0 (TIBCO Software Inc.) Dále na lokalitě Lednice byla sledována hladina podzemní vody (HPV), vlhkost (gravimetricky) a srážky. Monitoring na této lokalitě probíhá od března 2019 doposud. Hladina podzemní vody je měřena ruční hladinoměrem s akustickou signalizací GE10.

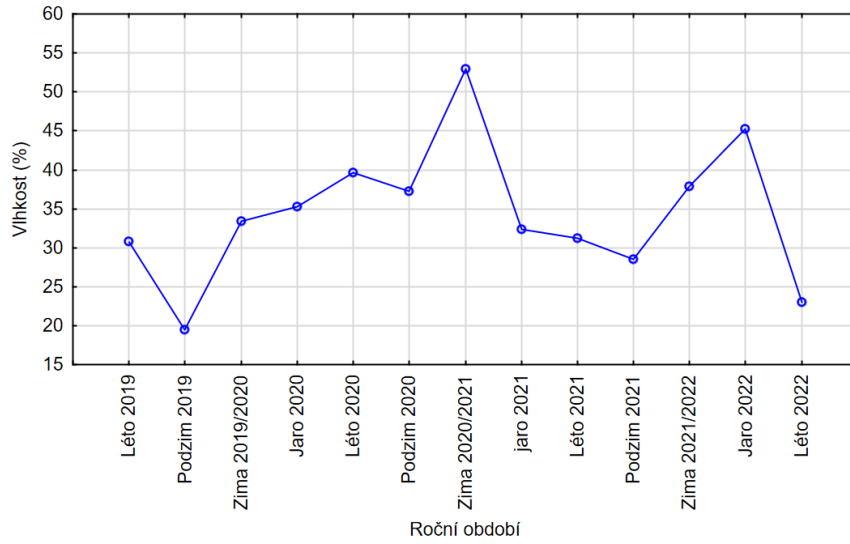
## **Výsledky**

Fluvizem modální (Ivaň, lužní les) obsahuje 48,22 % jílnatých částic a patří mezi půdy těžké. Má vysoký obsah organického uhlíku (2,85 %) a humusu (4,91 %). Organo-minerální (Ah) horizont hodnotíme jako vysoko humózní horizont. Poměr HK/FK je 0,96 a jedná se humátně-fulvátní typ se střední kvalitou humusových látek. Aktivní pH (pH/H<sub>2</sub>O) je 7,00, což je slabě neutrální pH a výměnné pH (pH/KCl) je 6,20, což je slabě kyselé pH. HPV je nedosažena a nachází se v hloubce větší než 2 metry.

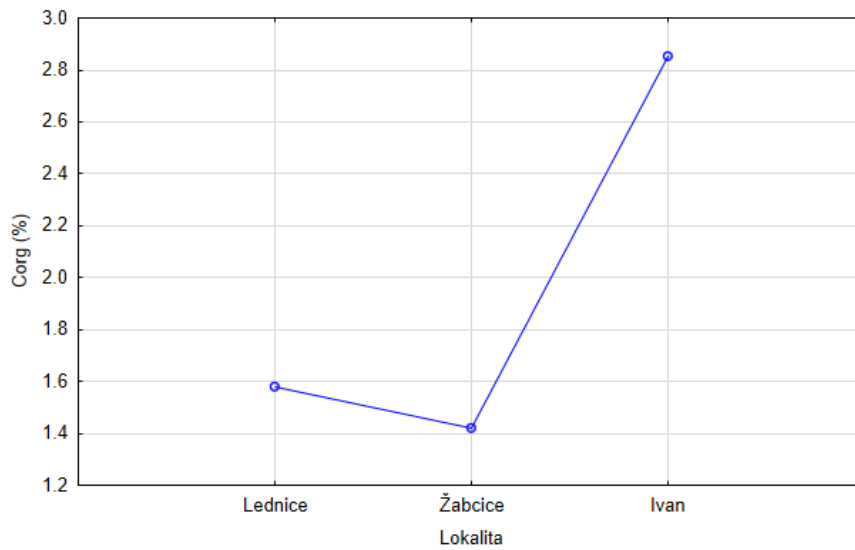
Fluvizem glejová (lokality Žabčice, orná půda) představuje dle textury jílovitohlinitou, těžkou půdu s obsahem jílnatých částic 52,44 %. Má střední obsah organického uhlíku (1,48 %) a humusu (2,56 %). Poměr HK/FK je 1,13 a jedná se fulvátně-humátní typ s vysokou kvalitou humusových látek. Aktivní pH (pH/H<sub>2</sub>O) je 6,60, což je slabě kyselé pH a výměnné pH (pH/KCl) je 5,60, což je slabě kyselé pH. Ornice na lokalitě Žabčice je silně utužená.

Fluvizem glejová (lokality Lednice na Moravě, lužní les) je půda zrnitostně těžká s obsahem jílnatých částic 46,12 %. Aktivní pH (pH/H<sub>2</sub>O) je 3,80, což je silně kyselé pH a výměnné pH (pH/KCl) je 5,60, což je kyselé pH. Jedná se o lesní půdu se středním obsahem uhlíku (1,58 %) a se středním obsahem humusu (2,72 %). Hladina podzemní vody se pohybuje v hloubce od 70 do 150 cm. Na obr. 1 jsou dokumentovány hodnoty půdní vlhkosti, která jsou vyhodnocovány pravidelně měsíčně od roku 2019. Pokud vezmeme v úvahu srážky, lze říct, že nejvyšších hodnot bylo dosaženo v létě 2020 (46 mm). Nejméně to bylo 9 mm v zimě 2021/2022 (zde ale musíme vzít v úvahu, že se jednalo o sníh). A např. na podzim 2021 byly srážky 13,49 mm.

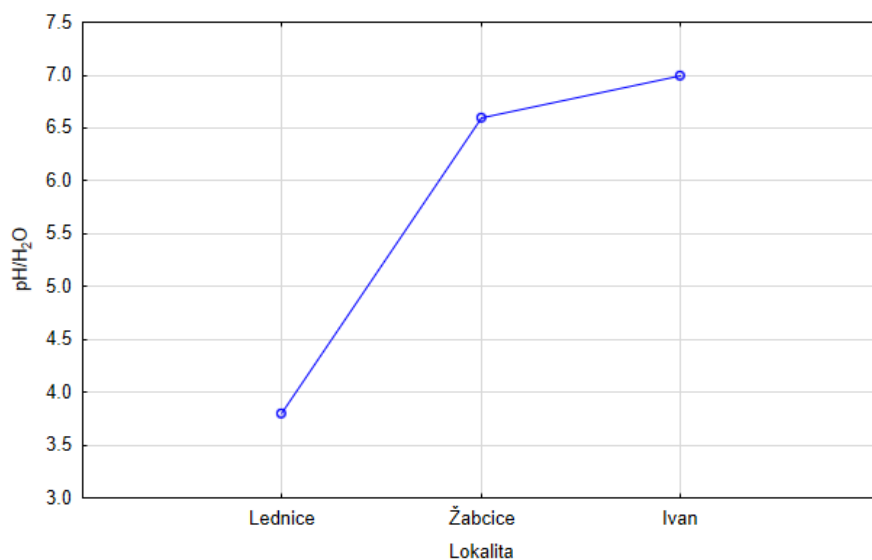
Z dat uvedených výše je patrné, že dochází k poklesu organického uhlíku a okyselování půdy, což je důsledek nejen hospodaření na půdě, ale i klimatické změny. Porovnání obsahu organického uhlíku (Corg) na sledovaných lokalitách je vyobrazeno na obr. 2. Statisticky průkazně vyšší obsah Corg je na lokalitě Ivaň (lužní les). Průkazně nejnižší hodnota je u fluvizemě glejové (Žabčice). Změny půdní reakce jsou vyobrazeny na obr. 3 a byly zjištěny statisticky průkazně rozdíly mezi lokalitami. Fluvizem glejová (Lednice) má aktivní půdní reakci (pH/H<sub>2</sub>O) silně kyselou a fluvizem modální (Ivaň) má neutrální aktivní reakci. Na obr. 4 je uvedena výměnná půdní reakce (pH/KCl). Podobně jako u aktivní půdní reakce je fluvizem glejová (Lednice) s kyselou výměnnou reakcí a fluvizem modální (Ivaň) je slabě kyselá.



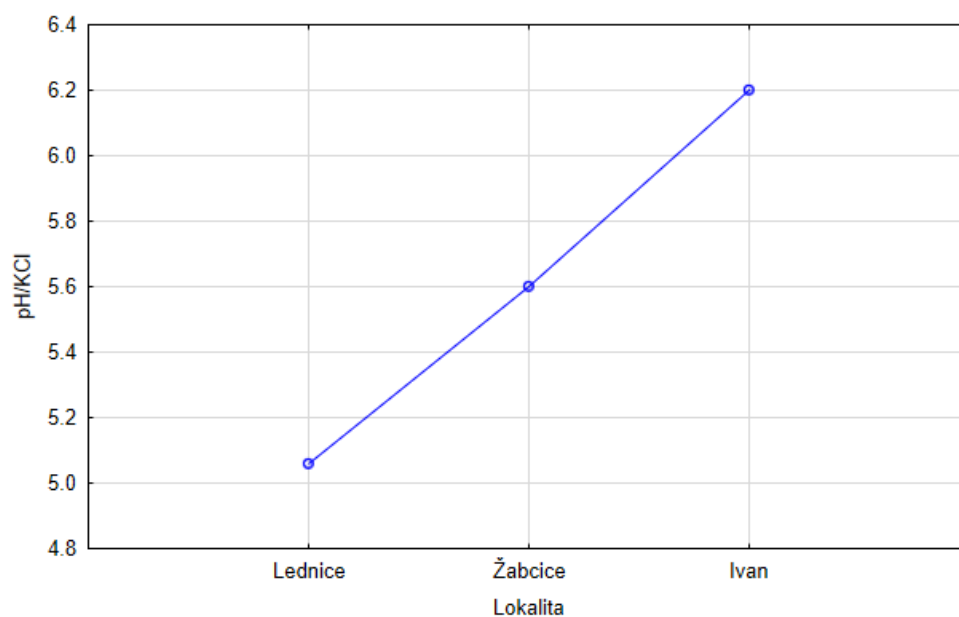
Obr. 1. Průměrná vlhkost za dané roční období na lokalitě Lednice



Obr. 2. Průměrný obsah organického uhlíku na sledovaných lokalitách



Obr. 3. Průměrná hodnota aktivní půdní reakce na sledovaných lokalitách



Obr. 4. Průměrná hodnota výměnné půdní reakce na sledovaných lokalitách

## Diskuze

Všechny tři lokality jsou antropogenně ovlivněny člověkem, ať už se jedná o lužní les nebo ornou půdu. Jak uvádí Prax (1991) či Kloupar (2002), mnohé lužní louky byly rozorány a rekultivovány na ornou půdu. Z důvodu ochrany vodních zdrojů platí zákaz hnojení a hospodaření na těchto půdách je obtížné kvůli zhoršenému vodnímu režimu. Vodní režim půd výrazně ovlivňuje stabilitu ekosystému. Můžeme konstatovat, že sledované parametry u orné i lesní půdy jsou výrazně ovlivněné nejen lidskou činností, ale i změnou klimatu, tj. množstvím a rozdělením srážek v průběhu roku.



## **Závěr**

Klimatická změna má výrazný vliv na aluviální půdy (fluvizemě). Změna vodního, vzdušného a tepelného režimu půdy má za následek zrychlení mineralizace, orná půda sekvestruje méně organického uhlíku, okyseluje se a dochází k narušení stability ekosystému.

## **Poděkování**

Výzkum byl podpořen z projektu MZE Země NAZV QK 2180021 – „Kvantifikace dopadů hospodaření na erozi, kvalitu půd a výnosy pěstovaných plodin s návrhem pěstebních technologií šetrných k životnímu prostředí“ a za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1722. Poděkování patří také diplomantům za zpracování a analýzu vzorků.

## Literatura

- Goudie, A S. 2006. Global warming and fluvial geomorphology, *Geomorphology*, Volume 79, Issues 3–4. Pages 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2006.06.023>.
- Kloupar, M. 2002. Personal report.
- Němeček, J. 2011. Taxonomický klasifikační systém půd České republiky. 2. uprav. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita. ISBN 978-80-213-2155-7.
- Pires, A. P. F., et al. 2018. Interactive effects of climate change and biodiversity loss on ecosystem functioning. *Ecology*, Volume 99, Issue 5. Pages 1203–1213. <https://doi.org/10.1002/ecy.2202>
- Pospíšilová, L., Vlček, V. 2015. Chemické, biologické a fyzikální ukazatele kvality/zdraví půdy. 2. vyd. Mendelova univerzita v Brně, 86 s. VIII. ISBN 978-80-7509-244-1.
- Prax, A. 1991. The hydrophysical properties of the soil and changes in them. In M. Penka, M.Vyskot, E. Klimo and F. Vašíček: Floodplain forest ecosystem II. Academia, Prague pp. 145–168.
- Zbíral, J., Malý, S. a kol. 2022. Analýza půd III: jednotné pracovní postupy. Vydání čtvrté, rozšířené a přepracované. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. ISBN 978-80-7401-211-2.

## Kontakt:

Ing. Luboš Sedlák  
Agronomická fakulta Mendelovy univerzity v Brně  
Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno  
+420 545 133 057; xsedlak@mendelu.cz

## Výnos a rentabilita pěstování kukuřice na siláž s podseвовými plodinami

Yield and profitability of silage maize growing with inter-seeding cover crops

Smutný V., Rábek M., Dryšlová T., Neudert L., Elzner P.

*Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta*

### Abstrakt

Cílem výzkumu bylo ověření možnosti pěstování kukuřice s různými podseвовými plodinami na výnos biomasy na siláž a příspěvek na úhradu jako ekonomický ukazatel. Dvouleté výsledky ukázaly vliv ročníku na výnos nadzemní hmoty kukuřice a rozdíly mezi jednotlivými podseвовými plodinami. Vyšší výnosy byly u varianty s jíllem vytrvalým, jetelem plazivým a žitem ozimým. U ostatních variant s podsevom byly výnosy nižší v porovnání s technologií pěstování kukuřice bez podsevom. V roce 2021 byly zaznamenány nižší výnosy nadzemní hmoty kukuřice u všech variant s podsevom. V roce 2021, kdy byla produkce podseवových plodin vyšší, byly výnosy kukuřice na siláž s podseвовými plodinami nižší v porovnání s klasickou technologií bez podsevomů.

**Klíčová slova:** podseवové plodiny, výnos nadzemní hmoty kukuřice, příspěvek na úhradu

### Abstract

The aim of the research was to verify the possibility of growing maize with different inter-seeding cover crops for the yield of silage biomass and the gross margin as an economic indicator. The two-year results showed the influence of the year on the yield and various inter-seeding cover crops of the above-ground biomass of maize. Higher yields were obtained in the variant with perennial ryegrass, creeping clover and winter rye. For the other variants with inter-seeding cover crops, the yields were lower compared to the maize cultivation technology without cover crops. In 2021, when cover crop production was higher, silage maize yields with cover crops were lower compared to conventional technology without cover crops.

**Keywords:** inter-seeding cover crops, yield of above-ground biomass, gross margin

### Úvod

Kukuřice je významnou plodinou v České republice, která je pěstovaná jak na siláž (krmení pro dobytek a zdroj biomasy pro bioplynové stanice). Zároveň se rozšiřuje pěstování zrnové kukuřice do výše položených výrobních oblastí. Vzhledem k tomu, že kukuřice má pomalý počáteční růst, resp. doba do zapojení porostu je dlouhá, jedná se o plodinu velmi zranitelnou vodní erozí. Proto je třeba rozvíjet nové přístupy v oblasti půdoochranných technologií. Většina stávajících půdoochranných technologií je založena na dostatečném množství rostlinných zbytků z předplodiny (sláma) či meziplodiny, které pokrývají povrch půdy. Půdoochranné technologie s využitím meziplodin byly v našich podmínkách úspěšně rozpracovány posledních letech (např. pásové zpracování půdy) s dostatečným protierozním efektem a uspokojivým výnosovým potenciálem. Nevýhodou je však častá potřeba totálního herbicidu glyfosátu, používaného k umrtvení „živého mulče“. Využití podseवových plodin je odlišný přístup, který je založený na výsevu různých druhů plodin mezi řádky kukuřice až po jejím vzejití. Význam a přínos podsevomů v kukuřici je široký. Jedná se o zdroj organické hmoty s předpokladem zlepšení strukturního stavu půdy (McDaniel et al., 2014). Dále redukuje erozi půdy (Panagos et

al., 2015), eliminují neproduktivní výpar z povrchu půdy (Nichols, 2015), omezují vyplavování živin do podzemních vod a některé druhy poutají vzdušný dusík (Dabney et al., 2010).

## Materiál a metody

V maloparcelním polním pokusu byl vyhodnocen systém pěstování kukuřice s různými podsevovými plodinami, které byly vysety do prostoru mezi řádky, v porovnání s běžným způsobem pěstování kukuřice bez využití podsevů. Varianty s podešvovými plodinami (celkem 7) jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Druhy podsevových plodin (použité odrůdy a výsevek)

Druh podsevu	Odrůda	Výsevek* (kg.ha <sup>-1</sup> )	Cena osiva (Kč.kg <sup>-1</sup> )	Cena osiva (Kč.ha <sup>-1</sup> )	Variabilní náklady na pěstební technologii včetně ceny za osivo podsevů (Kč.ha <sup>-1</sup> )
1 - bez podsevu	x	x	x	x	22334
2 - jilek mnohokvětý	Porubka	12,6	40	504	22838
3 - jilek vytrvalý	Double	12,6	60	756	23090
4 - jetel inkarnát	Kardinál	10,5	57	599	22933
5 - jetel plazivý	Klondike	3,8	135	513	22847
6 - vikev panonská	Dětenická panonská	33,6	40	1344	23678
7 - žito ozimé	SU Santini	63	15	945	23279
8 - svazanka vratičolistá	Boratus	5	140	700	23034

\*výsevek na hektar, kdy je podsev vysetý na ploše 0,42 ha

Maloparcelní polní pokus byl založen na pozemcích Polní pokusné stanice Mendelovy univerzity v Žabčicích (jižní Morava, cca 30 km od Brna; GPS 49°01'28.7"N, 16°37'07.8"E). Pokusné plochy se nacházejí v kukuřičné výrobní oblasti, v nadmořské výšce 180 m s průměrným ročním úhrnem srážek 491 mm a s průměrnou roční teplotou 10,3 °C. Na stanovišti je hlinitojílovitá půda fluvizemního typu. Kukuřice byla pěstována po obilninách (v roce 2020 po pšenici ozimé, v roce 2021 po ječmeni jarním). Na podzim byla provedena orba, na jaře předseťová příprava půdy se zapravením močoviny v dávce dusíku 120 kg.ha<sup>-1</sup>. V pokusu byl vysetý hybrid Walterinio KWS (FAO 280). Setí proběhlo 16. 4. 2020 a 15. 4. 2021 secím strojem KINZE 3500. Výsevek byl 80 tis. semen.ha<sup>-1</sup>. Ve fázi třetího až čtvrtého listu kukuřice (13. 5. 2020 a 21. 5. 2021) byly vysety jednotlivé varianty podsevových plodin multifunkčním 4-řádkovým experimentálním strojem společnosti P&L.

Jedním přejezdem po pozemku byly provedeny čtyři agrotechnické zásahy:

- 1) plečkování o šířce 320 mm v prostoru mezi řádky,
- 2) výsev podsevových plodin,
- 3) přihnojení dusíkem (DAM 390 v dávce dusíku 40 kg.ha<sup>-1</sup>),
- 4) pásová aplikace herbicidu nad řádky kukuřice (Laudis 1,5 l + Aspect PRO 1,5 l.ha<sup>-1</sup>).

Výsledně 58 % plochy bylo ošetřeno herbicidem a 42 % bylo plečkováno a zároveň oseto podsevovými plodinami. U varianty 1 (bez podsevu) bylo provedeno pouze plečkování a přihnojení dusíkatým hnojivem DAM 390; ale herbicidní ošetření bylo provedeno celoplošně. V mléčně-voskové zralosti byla provedena ruční sklizeň nadzemní hmoty kukuřice. Z každého opakování bylo sklizeno 10 rostlin v řádku za sebou. Rostliny byly odříznuty cca 10 cm nad

zemí, poté byly zváženy a byl odebrán průměrný vzorek na stanovení sušiny. Ve výsledcích je prezentován výnos nadzemní hmoty přepočtený na 33% sušinu. Získané dvouleté výsledky produkce biomasy kukuřice byly zpracovány ve statistickém programu Statistica 12.0 (StatSoft software Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) pomocí analýzy rozptylu s následným testováním rozdílů středních hodnot pomocí Fisherova testu.

Pro ekonomické vyhodnocení jednotlivých variant podsevů byly použity tři ekonomické ukazatele, a to variabilní náklady, tržby a příspěvek na úhradu. Variabilní náklady byly vypočteny na základě nákladů na pěstební technologii popsanou výše (náklady na osivo kukuřice a podsevů, minerální hnojiva, pesticidy a mechanizační polní práce). K výpočtu nákladů na materiální vstupy (osiva, hnojiva a pesticidy) byly využity ceníky distributorů v regionu jižní Moravy pro rok 2021. Náklady na mechanizační polní práce byly vypočteny na základě ekonomických normativů strojů, které jsou součástí „Normativů pro poradenství“ Výzkumného ústavu zemědělské techniky, v.v.i., <https://www.vuzt.cz/databaze-a-programy/normativy-pro-poradenstvi/>. Tržby byly vypočítány vynásobením dosažených výnosů nadzemní biomasy cenou produkce (800 Kč.t<sup>-1</sup> hmoty při 33% sušině).

Příspěvek na úhradu (PÚ) byl vypočítán rozdílem mezi dosaženými tržbami a variabilními náklady. PÚ je v praxi používán jako ekonomický ukazatel efektivity hospodaření a vyjadřuje souhrn prostředků, které je možno použít na úhradu fixních nákladů a případný přebytek představuje zisk.

## Výsledky a diskuze

Tab. 2: Výnos nadzemní hmoty, tržby a příspěvek na úhradu v roce 2020 a 2021

Druh podsevu	rok 2020					rok 2021				
	Výnos nadzemní hmoty při 33 % sušiny (t.ha <sup>-1</sup> )	Průkaznost (0,05)	Tržby (Kč.ha <sup>-1</sup> )	Příspěvek na úhradu (Kč.ha <sup>-1</sup> )	Příspěvek na úhradu (% , bez podsevu = 100 %)	Výnos nadzemní hmoty při 33 % sušiny (t.ha <sup>-1</sup> )	Průkaznost (0,05)	Tržby (Kč.ha <sup>-1</sup> )	Příspěvek na úhradu (Kč.ha <sup>-1</sup> )	Příspěvek na úhradu (% , bez podsevu = 100 %)
1 - bez podsevu	69,9	ab	55948	33614	100	69,3	b	55460	33126	100
2 - jilek mnohokvětý	64,6	a	51641	28803	86	63,1	ab	50485	27647	83
3 - jilek vytrvalý	76,1	c	60856	37766	112	66,5	ab	53184	30094	91
4 - jetel inkarnát	66,5	a	53224	30291	90	61,8	a	49407	26474	80
5 - jetel plazivý	73,3	b	58676	35829	107	63,7	ab	50956	28109	85
6 - vikev panonská	69,8	ab	55841	32163	96	64,9	ab	51949	28271	85
7 - žito ozimé	71,6	ab	57262	33983	101	59,3	a	47431	24152	73
8 - svazenka vratičolistá	69,9	ab	55926	32892	98	60,5	a	48376	25342	77

Náklady na pěstební technologii bez podsevu byly 22.334 Kč.ha<sup>-1</sup>, což byly nejnižší náklady v porovnání s variantami s podsevem. Zde se projeví náklady na osivo podsevů v rozmezí

504-1.344 Kč.ha<sup>-1</sup>. Celkové variabilní náklady pak byly ve výši 22.838 Kč.ha<sup>-1</sup> (varianta 2 – jílky mnohokvětý) – 23. 678 Kč.ha<sup>-1</sup> (varianta 6 – vikev panonská).

V roce 2020 byl u kontrolní varianty bez podsevu výnos 69,9 t.ha<sup>-1</sup>. Vyšší výnosy byly u varianty s jílky vytrvalým (76,1 t.ha<sup>-1</sup>), jetelem plazivým (73,3 t.ha<sup>-1</sup>) a žitem ozimým (71,6 t.ha<sup>-1</sup>). U ostatních variant s podsevy byly výnosy nižší v porovnání s technologií pěstování kukuřice bez podsevu. V roce 2021 byly zaznamenány nižší výnosy nadzemní hmoty kukuřice u všech variant s podsevy. Tento pokles výnosu lze dát do souvislosti s odlišnými povětrnostními podmínkami v období vegetace jednotlivých ročníků. Z tab. 3 je patrné, že v obou letech byl květen chladnější než normál, ale v roce 2021 byly v tomto měsíci srážky nadnormální, kdežto podnormální v roce 2020. Příznivé vláhové poměry v roce 2021 měly pozitivní vliv na dobré vzejití podsevů, poté v červnu kladně působily vyšší teploty na další růst podsevových plodin. Výsledkem je produkce biomasy podsevů 1,03 t.ha<sup>-1</sup> v roce 2021 a 0,58 t.ha<sup>-1</sup> v roce 2020. Vyšší produkce biomasy podsevů se mohla negativně odrazit ve snížení výnosů silážní hmoty kukuřice. Také Constantin et al. (2015) a Tribouillois et al. (2018) uvádějí, že srážky po výsevu jsou zcela zásadní pro úspěšné založení porostů podsevů. V relaci s poklesem výnosu byly také hodnoty příspěvku na úhradu, které v roce 2021 byly ve výši 77 – 91 % v porovnání s klasickou technologií pěstování kukuřice bez podsevu.

Tab. 3: Průběh povětrnostních podmínek ve vegetační období (Žabčice, 2020 a 2021)

Průměrná teplota vzduchu (°C)								
Měsíc	2020				2021			
	Skutečnost (°C)	Normál (°C)	Rozdíl (°C)	Hodnocení dle WMO	Skutečnost (°C)	Normál (°C)	Rozdíl (°C)	Hodnocení dle WMO
Květen	13,0	14,6	-1,6	<i>podnormální</i>	12,7	15,6	-2,9	<i>silně podnormální</i>
Červen	18,3	17,7	0,6	<i>normální</i>	20,9	19,2	1,7	<i>nadnormální</i>
Červenec	19,9	19,3	0,6	<i>normální</i>	21,2	20,9	0,3	<i>normální</i>
Srpen	21,3	18,6	2,7	<i>mimořádně nadnormální</i>	18,0	20,6	-2,6	<i>silně podnormální</i>
Září	13,9	14,7	-0,8	<i>normální</i>	15,6	14,7	0,9	<i>normální</i>
Úhrn srážek (mm)								
Měsíc	2020				2021			
	Skutečnost (mm)	Normál (mm)	% oproti normálu	Hodnocení dle WMO	Skutečnost (mm)	Normál (mm)	% oproti normálu	Hodnocení dle WMO
Květen	76,4	62,8	122	<i>normální</i>	84,8	52,2	162	<i>nadnormální</i>
Červen	128,6	68,6	188	<i>mimořádně nadnormální</i>	59,8	61,7	97	<i>normální</i>
Červenec	44,0	57,1	77	<i>normální</i>	45,6	68,9	66	<i>normální</i>
Srpen	97,6	54,3	180	<i>nadnormální</i>	175,8	61,1	288	<i>mimořádně nadnormální</i>
Září	87,2	35,5	246	<i>silně nadnormální</i>	22,0	35,5	62	<i>normální</i>

## **Závěr**

Z dvouletých výsledků vyplynulo, že výnos kukuřice na siláž při pěstování s podsevovými plodinami je ovlivněný průběhem ročníku a také použitými podsevovými plodinami. V roce 2021, kdy byly příznivé podmínky pro produkci podsevových plodin, byly výnosy biomasy kukuřice nižší v porovnání s pěstováním kukuřice bez podsevu. Tyto výnosové výsledky se také negativně odrazily do výše příspěvků na úhradu. Přesto může být pěstování kukuřice s podsevy perspektivní, především z důvodu snížení spotřeby herbicidů (částečné náhrady použití herbicidů mechanickými zásahy), ale i zvýšení biodiverzity v porostu kukuřice.

## **Dedikace**

Příspěvek vznikl za finanční podpory projektem NAZV č. QK1910334 „Inovace šetrných systémů pěstování kukuřice s využitím podsevových plodin k omezení degradace půdy a zlepšení hospodaření s vodou v podmínkách měnícího se klimatu“.

## Použitá literatura

- Constantin J., Durr C., Tribouillois H., Justes E. 2015. Catch crop emergence success depends on weather and soil seedbed conditions in interaction with sowing date: A simulation study using the SIMPLE emergence model. *Field Crops Research*, 176, 22–33.
- Dabney S. M., Delgado J. A., Meisinger J. J., Schomberg H. H., Liebig M. A., Kaspar T., Reeves W. 2010. Using cover crops and cropping systems for nitrogen management. In J. A. Delgado & R. F. Follett (Eds.), *Advances in nitrogen management for water quality* (pp. 230–281). Ankeny, IA: Soil Water Conservation Society.
- McDaniel M. D., Tiemann L. K., Grandy A. S. 2014. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. *Ecological Applications*, 24, 560–570.
- Nichols R. 2015. A hedge against drought: Why healthy soil is ‘water in the bank’. Washington, DC: USDA-Natural Resources Conservation Service. Retrieved from <https://www.usda.gov/media/blog/2015/05/12/hedge-against-drought-why-healthy-soil-water-bank>
- Panagos P., Borrelli P., Meusburger K., Alewell C., Lugato E., Montanarella L. 2015. Estimating the soil erosion cover management factor at the European scale. *Land Use Policy*, 28, 38–50.
- Tribouillois H., Constantin J., Justes E. 2018. Analysis and modeling of cover crop emergence: Accuracy of a static model and the dynamics of STICS soil-crop model. *European Journal Agronomy*, 93, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2017.12.004>

## Kontaktní adresa:

doc. Ing. Vladimír Smutný, Ph.D.  
Mendelova univerzita v Brně  
Agronomická fakulta  
Ústav agrosystémů a bioklimatologie  
Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno  
smutny@mendelu.cz, +420 545 133 116



## Slunečnice topinambur jako netradiční plodina do bioplynových stanic

Jerusalem artichoke sunflower as a non-traditional crop for biogas plants

Svobodová A.<sup>1</sup>; Kasal P. <sup>1</sup>; Rusín J.<sup>2</sup>; Bouchalová M.<sup>2</sup>, Wojnarová P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

<sup>2</sup> VŠB-Technická univerzita Ostrava

### Abstrakt

Slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) je původní rostlina z Jižní Ameriky, která je v zemích původu využívána pro konzumní hlízy. Specifikum této rostliny není jen v produkci hlíz, ale díky velkému množství nadzemní biomasy může být využita jako energetická plodina. Slunečnice topinambur je nenáročná plodina na pěstování a vyžaduje minimální počet agrotechnických zásahů. Rostliny dosahují výšky 2,0 - 3,0 m a výnos nadzemního materiálu se pohybuje v rozmezí 20,0 - 70,0 t/ha. Zároveň se jedná o plodinu, která má samoobnovitelné schopnosti. Na pozemku bez výsadby vydrží i několik let, zejména pokud sklízíme jen nadzemní část. Laboratorní testy produkce bioplynu a methanu z čerstvé natě topinamburu potvrdily dostatečně vysoké produkce plynu blízké se produkcí z čerstvé kukuřice.

**Klíčová slova:** slunečnice topinambur, bioplyn, energetické využití

### Abstract

Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) is a native plant from South America, which is used for edible tubers in its countries of origin. The specificity of this plant is not only in the production of tubers, but thanks to the large amount of above-ground biomass it can be used as an energy crop. Jerusalem artichoke sunflower is an undemanding crop to grow and requires a minimum number of agrotechnical interventions. The plants reach a height of 2.0 - 3.0 m and the yield of above-ground material ranges from 20.0 - 70.0 t/ha. At the same time, it is a crop that has self-regenerating abilities. It can last for several years on the plot without planting, especially if we harvest only the above-ground part. Laboratory tests of biogas and methane production from fresh Jerusalem artichokes confirmed sufficiently high gas production approaching the production from fresh corn.

**Key words:** Jerusalem artichoke, biogas, methane, energy use

### Úvod

Anaerobní digesce jakožto anaerobní proces zahrnující degradaci organického materiálu mikroorganismy za podmínek bez přístupu vzdušného kyslíku, vede k produkci bioplynu obsahujícího zejména metan a oxid uhličitý. Obnovitelný zdroj energie, například rostlinná hmota, je procesem přeměněn na plynné biopalivo, které lze využít k výrobě tepelné a elektrické energie nebo např. pro pohon vozidel. Dalším produktem procesu je biologicky stabilizovaná hmota – digestát. Digestátem se rozumí tekutý nebo tuhý materiál, který prošel anaerobní fermentací, je odplyněný, a lze ho využívat například jako hnojivo s různými poměry rychle a pomalu využitelných organických a minerálních živin. Biozplynování odpadů a nezkrmitelných zbytků ze zemědělství, bioodpadů z průmyslu, biofrakce komunálního odpadu, zahuštěných čistírenských kalů se v posledních letech stala jedním z nejatraktivnějších způsobů získávání obnovitelné energie (Scarlat et al., 2018). Anaerobní digesce můžeme rozdělit na systémy mokré, polosuché a suché. Nejčastěji se používají mokré “vyhňovací“ systémy využívající vertikální míchanou tankovou nádrž s různými typy míchadel v závislosti na charakteru převládajících surovin. Bioplyn se zpracovává spalováním zejména v kogeneračních jednotkách vyrábějících tepelnou energii spolu s elektrickou energií.

Digestát je skladován a ve stanovenou roční dobu využíván jako hnojivo pro pěstování surovin pro bioplynovou stanici nebo pro jiné rostliny. Obsahuje vysoký podíl organických látek v sušině, ale tyto látky se v půdě rozkládají velmi pozvolna (Babička et al., 2010). Digestát bývá ojediněle mechanicky separován na tuhou frakci zvanou separát digestátu a tekutou frakci zvanou fugát. Separát má v půdě spíše kypřící funkci a pozvolna poskytuje organické živiny. Může být použit i jako surovina pro výrobu komerčních hnojiv (komposty, sušené výrobky), pěstebních substrátů, alternativních paliv, nebo jako stelivo. Fugát slouží k dodání živin zejména na bázi kyslíku a fosforu.

V poslední době jsou hledány alternativní plodiny a zároveň se upírá pozornost ke správnému načasování sklizně, která má zcela zásadní dopad na konečný obsah živin a strukturu plodin, tím pádem i na kvalitu siláže a reálně dosaženou produkci bioplynu (Amon et al., 2006). Za perspektivní plodiny kromě kukuřice, která dnes představuje zhruba 76 % vstupního materiálu bioplynových stanic, jsou považovány čirok, žito nebo cukrová řepa (Vítěz, et al. 2013). Vhodnou alternativní plodinou může být slunečnice topinambur. Topinambur má možnost širokého uplatnění nejen v potravinářství a krmivářství, ale vzhledem k množství kvalitní biomasy i jako energetická plodina. Výnos čerstvé nadzemní hmoty topinamburu se pohybuje na úrovni 25,0 – 70,0 t/ha v závislosti na odrůdě. Sušina nadzemní biomasy se pohybuje na úrovni 7,0 – 25,0 t/ha. Emmerling a Barton (2007) provedli srovnávací studii, která se zaměřila na výtěžnost a složení bioplynu. Srovnávací studie mezi laboratorní stanicí a provozní stanicí v praxi ukázala, že výsledky laboratorních experimentů jsou reálné a přenositelné do praxe. Výnosy bioplynu a konečné množství metanu byly mnohem vyšší u topinamburu ve srovnání s jinými energetickými plodinami. Průměrná výtěžnost bioplynu byla  $1,222 \pm 0,041 \text{ Nm}^3$  z kilogramu organické sušiny (VS) a střední výtěžnost methanu vůči teoretickému maximu byla  $74,5 \pm 2,5 \%$ . Oba parametry tedy byly výrazně vyšší ve srovnání s ostatními zemědělskými kofermenty.

## **Materiál a metody**

V letech 2021 a 2022 byla testována nadzemní hmota slunečnice topinamburu s ohledem na využití jako alternativního substrátu v bioplynových stanicích. Ve dvou po sobě jdoucích termínech byly odebrány vzorky natě topinamburu na pokusných pozemcích Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, pro provedení technické a chemické analýzy a pro stanovení produkce bioplynu a methanu vsádkovými testy jednostupňové anaerobní digesce. Tyto testy jsou označovány jako BMP (Biochemical Methane Potential Test). Testy byly provedeny za mezofilních podmínek (40 °C) bez míchání a s dobou zdržení 40 dnů. Vzorek inokula (digestátu), respektive anaerobně fermentující suspenze ze zemědělské bioplynové stanice, byl pro každý z dílčích BMP testů zajištěn v den začátku daného testu. Materiál byl odebrán z 1. fermentoru bioplynové stanice Pustějov II (Zemspol Studénka a.s., Moravskoslezský kraj) zpracovávající zejména kukuřičnou siláž s hovězí kejdou. Inokulum v teplém stavu (30-35 °C) bylo transportováno a ihned upraveno do konzistence potřebné pro BMP test. Úprava spočívala ve snížení obsahu celkové sušiny (TS) z cca 10 % hm. k 7 % hm. pomocí šnekového mlýnku RM Gastro TS-32 s maticí s otvory Ø 3 mm. Množství inokula v testu: v každém reaktoru vždy 800 g. Vzorky slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus*) byly vždy tvořeny natí, tedy celou nadzemní částí rostliny. Vzorky pocházely z experimentálního pěstování (VS Valečov, hon Malý mezník). Zde byly pěstovány 4 odrůdy (SKARLET, ZLATA, KARIN, RÚT). Proběhly 2 odběry vzorku (sklizně), konkrétně dne 20.7.2021 a 6.9.2021. Odběr byl vždy proveden z pole se standardní dávkou dusíkatého minerálního hnojiva (100 kg N/ha). Každý vzorek byl tvořen hmotou 1-5 kusů rostliny (dle obsahu vlhkosti). Vzorky byly následující den předány k analýzám a BMP testu digesce. Množství předané pro analýzy a test: jeden vzorek vždy cca 1-3 kg. Množství substrátu:

v každém reaktoru přibližně 50,0 g vlhkého vzorku (suspenze). Referenční substrát: mikrokrytalická celulóza čistá (MCC),  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Hodnota pH-H<sub>2</sub>O byla stanovena potenciometricky ve vodné suspenzi substrátu s použitím přístroje WTW 340i se sondou SenTix 41 pH inokula bylo stanoveno bez přídavku vody. Pět podvzorků substrátu a inokula o hmotnosti  $10 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$  bylo použito pro stanovení obsahu celkové sušiny (Total Solids, TS, sušením při 105 °C ve vzdušné atmosféře do konstantní hmotnosti; 2.0 % RSD). Stanovení bylo provedeno pomocí sušících vah KERN DLB 160 3A s halogenovou lampou.

Dalších 5 podvzorků (1-2 g) bylo určeno pro stanovení obsahu organických látek (organické sušiny) jako ztráta žíháním celkové sušiny (Volatile Solids in TS, VS<sub>TS</sub>, žíháním při 550 °C v atmosféře O<sub>2</sub> do konstantní hmotnosti; 5,0 % RSD). Použit byl termogravimetrický analyzátor LECO TGA 701. Další podvzorky (2-3 g) byly určeny ke stanovení objemové hmotnosti, respektive materiálové hustoty sušiny. V dalších podvzorcích (1-2 g) byly chemicky stanoveny obsahy makroprvků (C, H, N a S). K tomu byl použit elementární analyzátor LECO Truspec CHN 628 + S 628, přičemž obsah kyslíku byl dopočten.

Diskontinuální mezofilní anaerobní testy digesce – testy biochemického methanového potenciálu (BMP) byly provedeny bez míchání suspenze v reaktorech. Použity byly skleněné láhvé reaktory objemu 1 l se zábrusem 45/40 mm. Reaktory byly uzavřeny skleněnými plynoměrnými byretami objemu 1,2 l. Postup měření principiálně vycházel z normy ČSN EN ISO 11734, avšak při použití volumetrické metody měření produkce bioplynu s použitím plynoměrných byret dle německé normy VDI 4630. Reaktory byly umístěny ve vodní lázni při teplotě  $40 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ . Plynoměrné byrety byly umístěny při teplotě laboratoře (20-23 °C). Celá aparatura byla umístěna v digestoři. Přepočtení objemu plynu na normální podmínky vycházel z teploty laboratoře a místního barometrického tlaku. V každém testu byly vždy dva reaktory použity pro měření endogenní produkce bioplynu a methanu (produkce z inokula) a vždy dva reaktory pro konkrétní vzorek substrátu. Doporučené využití tří reaktorů pro stejný vzorek nemohlo být z kapacitních důvodů provedeno. V průběhu 40 dnů byla ráno v pracovních dnech kontrolována a zapisována teplota vodní lázně, teplota bioplynu, barometrický tlak a přírůstek objemu bioplynu. Při dostatečném objemu bioplynu v byretě (> 150 ml) bylo měřeno složení tohoto plynu. Používán byl přenosný analyzátor Biogas5000 (Geotechnical Instruments Ltd., UK). Přístroj měří pomocí duálních infračervených senzorů CH<sub>4</sub> (0-70 %  $\pm$  0,5 %) a CO<sub>2</sub> (0-60 %  $\pm$  0,5 %) a elektrochemických senzorů O<sub>2</sub> (0-25 %  $\pm$  1,0 %), H<sub>2</sub> (0-2000 ppm  $\pm$  2,0 % FS) a H<sub>2</sub>S (0-5000 ppm  $\pm$  2,0 % FS). Chybějící data o objemu a složení bioplynu z víkendů byla lineárně interpolována. Obsah H<sub>2</sub> byl měřen pro doložení nízkého zatížení inokula kyselinami z rozkladu organických látek substrátu. Obsah H<sub>2</sub>S byl měřen pro detekování možné inhibice sulfanem nebo sulfidy. Parametry pH, TS a VS<sub>TS</sub> byly stanoveny v inokulu a v substrátu, a také v digestátu po ukončení testu. Teoretická produkce bioplynu a methanu byla vypočtena z prvkového složení sušiny dle Buswellovy formule modifikované Richardsem pro případ, kdy uvolněný amoniak je rozpuštěn v suspenzi a ihned kompenzován uhličitánem vytvořeným z digesce produkovaného CO<sub>2</sub> (Richards, et al., cit. 2022).

## Výsledky a diskuze

Na obrázku 1 jsou vzorky topinamburu po sklizni v době květu, před úpravou mletím pro BMP test I. Na obrázku 2 jsou vzorky pro test II. Vzorky pro oba testy vypadaly podobně, avšak pro první sklizeň byly méně vzrostlé a bez květu.



Obrázek 1: Vzorky nadzemních částí topinamburu po sklizni dne 20.7.2021



Obrázek 2: Vzorky nadzemních částí topinamburu po sklizni dne 6.9.2021

V tabulce 1 jsou uvedeny parametry vzorků topinamburu, očkovacích suspenzí a referenčního substrátu pro dva BMP testy. Obsah celkové sušiny natě topinamburu se v červenci pohyboval mezi 11 a 14 % hm., v září mezi 16 a 26 % hm. Obsah organické hmoty v celkové sušině mezi sklizněmi vzrostl od 83 % k 90 % hm. Obsah uhlíku v celkové sušině – prekursoru methanu vzrostl od 41 ke 45 %. Obsah dusíku naopak poklesl od 4 %<sub>TS</sub> ke 2 %<sub>TS</sub>.

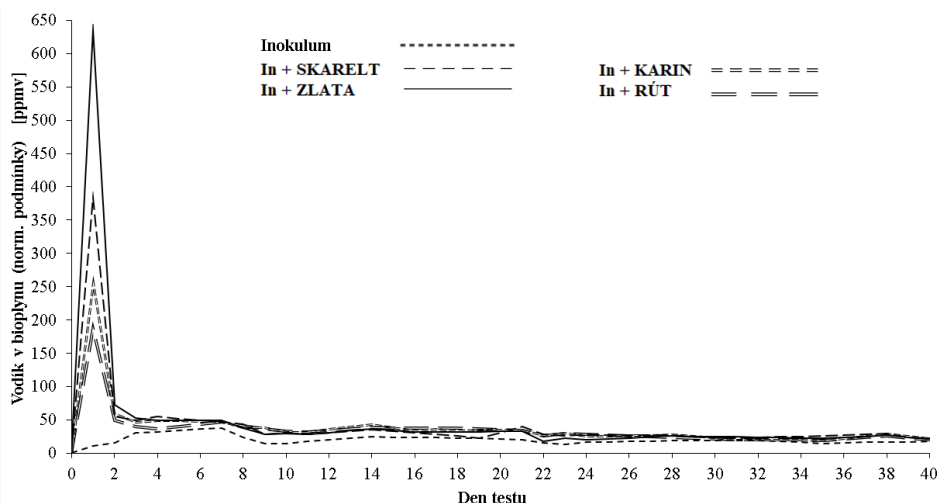
Tabulka 1 Parametry vzorků topinamburu, očkovacích suspenzí a referenčního substrátu

Vzorek	Kyselost	Celková sušina	Ztráta žiháním sušiny	Objemová hmotnost		Uhlík	Vodík	Dusík	Síra	Kyslík	Poměr
	pH	TS	V <sub>TS</sub>	ρ <sub>TS</sub>	ρ <sub>actual</sub>	C <sub>TS</sub>	H <sub>TS</sub>	N <sub>TS</sub>	S <sub>TS</sub>	O <sub>TS</sub>	C:N
	-	%	% <sub>TS</sub>	kg m <sup>-3</sup>	kg m <sup>-3</sup>	% <sub>TS</sub>					-
MCC *	5,75	95,23	99,50	1644	1566	44,47	6,53	0,00	0,00	49,00	-
<b>Test I (topinambur sklizen 20.7.2021)</b>											
Inokulum	7,78	6,73	71,10	1615	1041	39,15	5,17	3,71	0,63	24,84	11
SKARLET	5,92	11,79	83,10	1574	1068	41,53	5,46	3,60	0,15	34,40	12
ZLATA	5,37	13,89	84,55	1560	1078	41,68	5,45	3,53	0,16	35,26	12
KARIN	5,55	11,35	83,47	1570	1065	41,62	5,40	3,73	0,12	33,76	11
RÚT	5,54	12,30	83,07	1612	1075	41,09	5,58	3,90	0,15	33,63	11
<b>Test II (topinambur sklizen 6.9.2021)</b>											

Inokulum	7,70	6,40	72,56	1610	1039	39,65	5,27	3,86	0,52	24,87	10
SKARLET	6,28	17,39	88,96	1535	1093	43,91	5,97	1,92	0,11	38,21	23
ZLATA	6,48	26,19	90,58	1523	1137	44,72	6,14	1,86	0,19	39,03	24
KARIN	6,20	16,71	87,76	1550	1092	43,05	5,95	2,02	0,15	37,77	21
RÚT	6,21	17,28	88,45	1569	1098	43,96	5,76	1,96	0,14	37,89	22

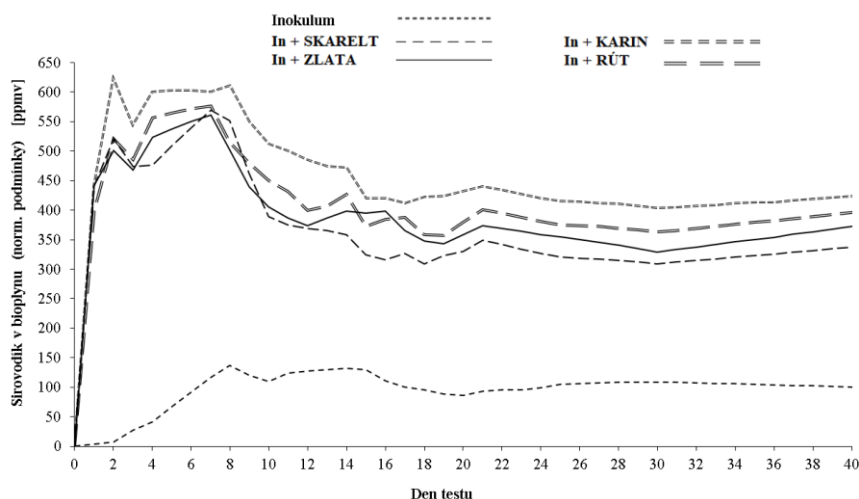
\* MCC – mikrokrytalická celulóza – referenční substrát

Na obrázku 3 je uveden typický průběh koncentrace vodíku v bioplynu v průběhu BMP testu. Konkrétně jde o test II se vzorky topinamburu ze září. V průběhu obou testů digesce topinamburu byl obsah  $H_2$  relativně nízký, pohyboval se mezi 50-100 ppm. Pouze v prvních dvou dnech testu II obsah  $H_2$  dosáhl 200-650 ppm, ale poté rychle poklesl. Procesy nebyly významně inhibovány příliš rychlým okyselením suspenze ani koncentrováním rozpuštěného vodíku.



**Obrázek 3:** Průběh koncentrace  $H_2$  v surovém bioplynu bez zavzdušnění (Test II)

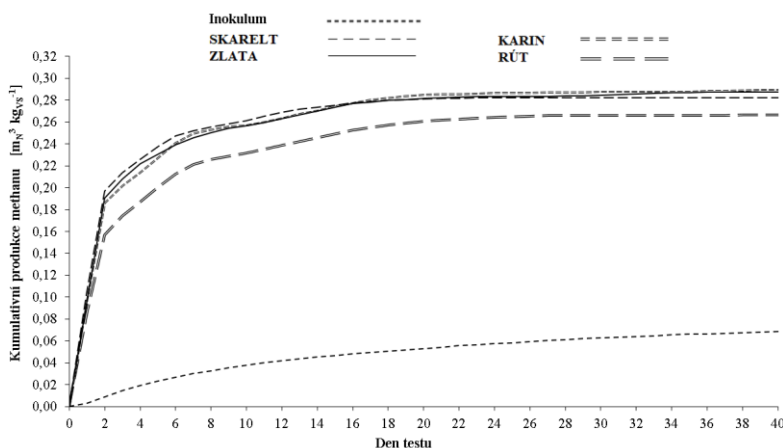
Na obrázku 4 je uveden průběh koncentrace sulfanu v bioplynu.  $H_2S$  vzniká rozkladem zejména sirných organických látek a může brzdit tvorbu methanu. Obsah  $H_2S$  v bioplynu byl v průběhu obou testů na úrovni běžné pro anaerobní digesci rostlinné biomasy, většinou nepřekročil 300 ppm. Pouze v testu I byl obsah  $H_2S$  vyšší a zpočátku přesáhl 600 ppm. Inhibice sulfanem se zřejmě částečně uplatnila, ale její vliv nebyl příliš významný.



**Obrázek 4:** Průběh koncentrace  $H_2S$  v surovém bioplynu bez zavzdušnění (Test I)

Průběh odplyňování organické sušiny inokula a organické sušiny jednotlivých substrátů je uveden v grafu na obrázku 5. Jedná se o průběh testu II. V obou testech byly tyto průběhy velmi

podobné, v prvních 4 dnech byla rychlost produkce bioplynu nebo methanu velmi vysoká, poté se zpomalila. V obou testech byl přírůstek objemu plynu ve 40. dnu zanedbatelný.



**Obrázek 5:** Kumulativní produkce CH<sub>4</sub> z organické sušiny inokula a z organické sušiny jednotlivých substrátů (Test II)

Nať slunečnice topinambur z letní sklizně před květem (20.7.2021, Test I) poskytla měrnou produkci bioplynu 0,475 – 0,532 mN<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup> vs<sup>-1</sup>, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena u odrůdy KARIN. V případě natě sklizené z kraje podzimu v době květu (6.9.2021, Test II) byly naměřeny pouze mírně vyšší měrné produkce bioplynu, v rozmezí 0,508 – 0,553 mN<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup>. Nejvyšší produkci bioplynu opět poskytla odrůda KARIN.

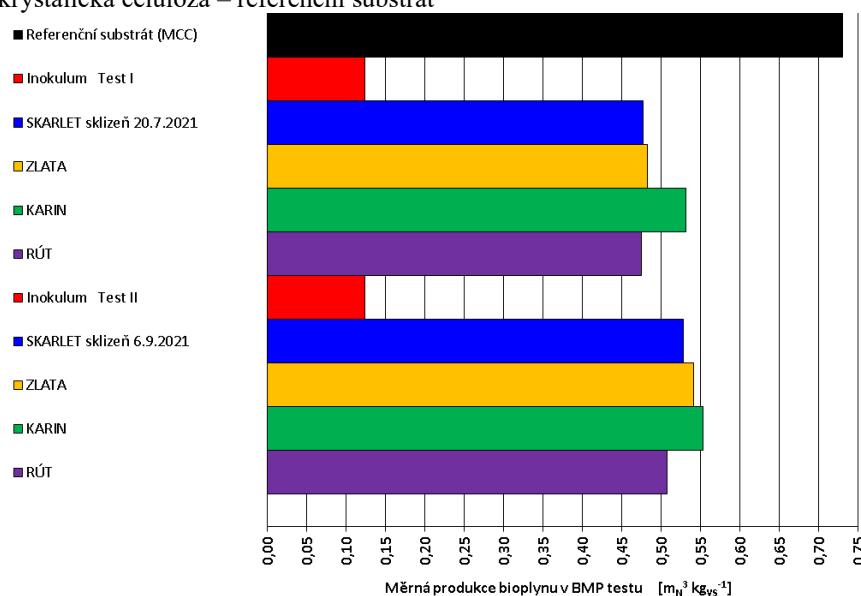
Porovnáním v testech dosažených produkcí methanu s produkcemi methanu zjištěnými teoretickým výpočtem dle prvkového složení organické sušiny (dle Buswellovy formule modifikované Richardsem) byl zjištěn průměrný výtěžek methanu v testu 54-59 %. V případě referenčního substrátu tato hodnota činila 89 %, což znamená, že testy proběhly nedaleko optimálních podmínek. Nedokonalost byla způsobena zejména absencí míchání. Nať topinamburu vždy obsahovala lignocelulózové podíly, jejichž kompletnější anaerobní rozklad by vyžadoval delší dobu procesu než 40 dnů.

V následující tabulce 2 jsou uvedeny výsledky BMP testů v podobě naměřené produkce bioplynu a methanu, respektive i obsahu methanu v bioplynu. Produkce jsou vztaženy k hmotnostní jednotce organické sušiny materiálu. Na pravé straně tabulky jsou uvedeny teoretické maximální produkce bioplynu a methanu vypočtené z prvkového složení organické sušiny materiálu. Námi naměřené produkce bioplynu z natě topinamburu jsou výrazně vyšší, než hodnoty uváděné Škodou (Škoda a kol., 2010). Pravděpodobně je to způsobeno především rozdílnou kvalitou inokula (digestát versus čistírenský kal) a dobou trvání testu (40 versus 25 dnů). Výsledky Škody také potvrzují domněnku, že z pohledu produkce bioplynu je nevhodnější částí topinamburu podzemní část rostliny. Toto zjištění by bylo vhodné ověřit. Měrnou produkci bioplynu v BMP testu I a II znázorňuje graf na obrázku 6. V obou případech sklizně se nejvyšší produkcí vyznačovala odrůda KARIN.

**Tabulka 2:** Naměřené a teoretické produkce bioplynu a methanu z natě topinamburu

Substrát	Měrná produkce bioplynu	Měrná produkce methanu	Obsah CH <sub>4</sub> v bioplynu	Teoretická produkce bioplynu	Praktický výtěžek	Teoretická produkce methanu	Praktický výtěžek
	mN <sup>3</sup> kgvs <sup>-1</sup>	mN <sup>3</sup> kgvs <sup>-1</sup>	% obj.	mN <sup>3</sup> kgvs <sup>-1</sup>	%	mN <sup>3</sup> kgvs <sup>-1</sup>	%
MCC *	0,7313	0,3726	51	0,839	87	0,4196	89
<b>Test I (topinambur sklizen 20.7.2021)</b>							
Inokulum	0,124	0,069	55,8	1,039	12	0,566	12
SKARLET	0,477	0,263	55	0,942	51	0,484	54
ZLATA	0,483	0,266	55	0,930	52	0,474	56
KARIN	0,532	0,286	53,7	0,940	57	0,483	59
RÚT	0,475	0,264	55,6	0,933	51	0,484	54
<b>Test II (topinambur sklizen 6.9.2021)</b>							
Inokulum	0,124	0,068	55,1	1,031	12	0,564	12
SKARLET	0,529	0,282	53,3	0,931	57	0,490	58
ZLATA	0,541	0,288	53,1	0,931	58	0,492	58
KARIN	0,553	0,289	52,3	0,925	60	0,488	59
RÚT	0,508	0,266	52,4	0,938	54	0,487	55
<b>Průměr dvou testů</b>							
Inokulum	0,124	0,068	55,45	1,02	12	0,565	12
SKARLET	0,503	0,277	54,15	0,936	54	0,487	56
ZLATA	0,512	0,277	54,05	0,930	55	0,483	57
KARIN	0,532	0,287	53,0	0,932	58,5	0,485	59
RÚT	0,491	0,265	54,0	0,935	52,5	0,485	54

\* MCC – mikrokryсталická celulóza – referenční substrát



**Obrázek 6:** Měrná produkce bioplynu

## Závěr

Všechny čtyři testované odrůdy slunečnice topinambur poskytly v laboratorním mezofilním testu v průměru produkci bioplynu blízkou hodnotě 0,5 mN<sup>3</sup> kgvs<sup>-1</sup>. Výtěžek methanu během 40 dnů digesce dosáhl v průměru 55 % teoretického maxima. Obsah methanu v bioplynu činil průměrně 55 % obj. Organická hmota topinamburu je tedy natolik kvalitní, aby bylo možno s ní počítat pro zpracování v bioplynových stanicích. V sušině topinamburu je oproti kukuřici vyšší obsah minerálních látek, což může teoreticky pomáhat stabilitě anaerobního procesu. Nemělo by docházet ke zvýšenému zanášení fermentorů, neboť minerální podíl vzorků



topinambur nebyl významně tvořen znečištěním hlínou. Po orientačním porovnání dat topinamburu s produkcemi bioplynu a methanu z různých vzorků kukuřičné hmoty (především siláže), které byly dosud na řešitelském pracovišti testovány, lze na slunečnice topinambur hodnotit jako velmi kvalitní substrát pro výrobu bioplynu, zvláště, pokud bude sklizena v období květu a hned silážována. Obdobím sklizně byla nejméně ovlivněna produkce methanu z odrůdy ZLATA

### Poděkování

Pěstební pokus vznikl na základě institucionální podpory v rámci „Dlouhodobého koncepčního rozvoje výzkumné organizace (DKRVO) 2018 - 2022“ schválené usnesením vlády ČR ze dne 8. února 2017 č. 107 s číslem MZE-RO1622.

Experimentální výsledky produkce bioplynu byly získány s využitím velké výzkumné infrastruktury ENREGAT podporované MŠMT, č. projektu LM2018098.

### Literatura

- Amon, T., Kryvoruchko, V., Hopfner-Sixt, K., Amon, B., Ramusch, M., Milovanovic, D., Bodiroza, V., Sapik, R., Zima, J., Machmuller, A., Zollitsch, W., Knaus, W., Friedel, J., Hrbek, R., Potsch, E., Gruber, L., Steinwidder, A., Pfundtner, E., Wagentristsl, H. (2006): Optimierung der Methanerzeugung aus Energiepflanzen mit dem Methanenergiewertsystem. – Project Final report. Within Programlinie. Energiesysteme der Zukunft of the Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie.
- Babička, L., Kožnarová, V., Poustková, I., Pulkrábek, J., & Kouřimská, L. (2010). Digestát-hnojivo pro cukrovku. *Listy Cukrovarnické a Řepářské*, 126 (3).
- Emmerling, C., & Barton, J. (2007). Anaerobní spoludigestace topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) a vlastnosti zbylého bioplynového hnoje. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 53 (6), 683-690.
- Scarlat, N., Dallemand, JF, & Fahl, F. (2018). Bioplyn: Vývoj a perspektivy v Evropě. *Obnovitelná energie*, 129, 457-472.
- GEORGE, R. A. T. (2011): Tropical vegetable production. 240 p. Wallingford: CABI. ISBN 978-1-84596-753-9.
- Vítěz, T., Geršl, M., Mareček, J., Kudělka, J., & Krčálová, E. (2013). Mineralogicko-chemická charakteristika fermentačních zbytků při výrobě bioplynu a možnosti jejich využití pro zlepšení vlastností půd.
- Weiland, P. (2010). Výroba bioplynu: současný stav a perspektivy. *Applied microbiology and biotechnology*, 85 (4), 849-860.
- Wohlt, J. E., Frobish, R. A., Davis, C. L., Bryant, M. P., & Mackie, R. I. (1990). Thermophilic methane production from dairy cattle waste. *Biological wastes*, 32(3), 193-207.
- Škoda, Adam, Záborská, Jana, Pokorná, Dana, Dohányos, Michal: Topinambur hlíznatý jako substrát pro bioplynové stanice. *Biom.cz* [online]. 2010-07-21 [cit. 2022-10-13]. Dostupné z WWW: <<https://biom.cz/cz/odborne-clanky/topinambur-hliznaty-jako-substrat-pro-bioplynove-stance>>. ISSN: 1801-2655.

### Kontaktní adresa:

Ing. Andrea Svobodová, Ph.D.  
Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.  
Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod  
728126290, [svobodova@vubhb.cz](mailto:svobodova@vubhb.cz)



## Porovnanie obsahu éterického oleja v plodoch a ihličí borievky obyčajnej

### Comparison of essential oil content in juniper berries and needles

Vargová V., Kováčiková Z., Pangyová E., Baxa S., Dimitrov F.

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum

#### Abstrakt

Cieľom výskumu bolo preskúmať pôdnoklimatické podmienky na obsah éterického oleja v plodoch a ihličí borievky obyčajnej (*Juniperus communis* L.). Sledované boli výskumné lokality s rôznou nadmorskou výškou: Kišovce (667 m n. m.), Ostrá hora (568 m n. m.), Horné Lazy (470 m n. m.), Iliáš (440 m n. m.) a Selčianske sedlo (749 m n. m.). Na väčšine lokalít sa pôda vyznačovala neutrálnou pôdnou reakciou s vysokým obsahom humusu a dusíka (N), nízkym až veľmi nízkym obsahom fosforu (P), dobrým až vysokým obsahom draslíka (K) a veľmi vysokým obsahom horčíka (Mg). Pôdna reakcia na lokalite Selčianske sedlo bola kyslá. Obsah éterických olejov v plodoch bol vyšší v roku 2020. Pohyboval sa od 1,1 % na lokalite Iliáš do 2,2 % na lokalite Ostrá hora. Obsah éterického oleja v mladom ihličí bol vyšší ako v starom ihličí. Jeho najvyšší obsah bol nameraný na lokalite Ostrá hora.

**Kľúčové slová:** *Juniperus communis* L., nadmorská výška, pôda, éterický olej, plody, ihličie

#### Abstract

The aim of the research was to review soil and climatic conditions as well as on essential oil content in the Juniper berries (*Juniperus communis* L.) was found. The following research sites with different altitude were monitored: Kišovce (667 m a.s.l.), Ostrá hora (568 m a.s.l.), Horné Lazy (470 m a.s.l.), Iliáš (440 m a.s.l.) and Selčianske sedlo (749 m a.s.l.). In most locations, the soil was characterized by a neutral soil reaction, with a high content of humus and nitrogen (N), a low to very low content of phosphorus (P), a good to a high content of potassium (K) and a very high content of magnesium (Mg). The soil acidity was very high at the Selčianske sedlo. The content of essential oils in berries was higher in 2020. It ranged from 1.1 % in the locality of Iliáš to 2.2 % in the locality Ostrá hora. The content of essential oil in young needles was higher than in old needles. Its highest content was measured at the Ostrá hora site.

**Keywords:** *Juniperus communis* L., altitude, soil characteristics, essential oil, berries, needles

#### Úvod

V našich podmienkach sa borievka obyčajná (*Juniperus communis* L.) najčastejšie nachádza na ťažko prístupných lokalitách. Borievky rastú v širokej ekologickej amplitúde, čiže v rôznych nadmorských výškach s rôznymi pôdnymi typmi (Cooper *et al.*, 2012). Vyskytuje sa tam, kde je dostatok svetla, je nenáročná na pôdu a vlhu. Thomas *et al.* (2007) uvádza, že uprednostňuje suché pôdy, kamenisté podložie a vlhké podmienky obýva zriedkavo. Je to málo konkurenčný ihličnatý vždyzelený ker s tvrdými, pichľavými ihlicami v trojpočetných praslenoch. Plody borievky obyčajnej sa používajú na výrobu destilátov, likérov, sirupov a iných produktov. Ďalej sa borievka využíva v kozmetickom, potravinárskom a farmaceutickom priemysle na získavanie éterických olejov. Zloženie éterického oleja z plodov borievok je veľmi variabilné, je závislé od zemepisného pôvodu rastlín, od pôdnoklimatických podmienok, štádia zrelosti, veku rastliny, spôsobu ošetrovania. Rovnako je rôznorodá aj výt'ážnosť oleja získaného z plodov borievky. Množstvo oleja získaného destiláciou vodnou parou sa pohybuje od 0,5 % hmot. až do 3,8 % hmot. (Falasca *et al.*, 2016; Angioni *et al.*, 2003; Zheljazkova *et al.*, 2018). Aj

Šalomon a Petruška (2017) uvádzajú, že podmienky biotopov a vývojové štádiá rastlín majú vplyv na kvalitatívne zloženie a množstvo éterických olejov. Éterický olej nesie zodpovednosť za typickú arómu a chuť borievok. Cieľom príspevku je porovnanie lokality, pôdnoklimatických podmienok na obsah éterického oleja v plodoch a ihličí borievky obyčajnej.

## Materiál a metódy

V období rokov 2020 – 2021 sme hodnotili lokality s výskytom borievky obyčajnej v rôznych pôdnoklimatických podmienkach a nadmorských výškach: Kišovce (667 m), Ostrá hora (568 m), Horné Lazy (470 m), Iliáš (440 m) a Selčianske sedlo (749 m). Odoberali sme pôdne vzorky v jesennom období (október) z hĺbky 0 – 150 mm. Z nich sme stanovili pH v KCl, C<sub>ox</sub>, N, P, K a Mg (podľa Vyhlášky MPRV SR Zz. č. 151/2016). V júni sme zozbierali vzorky ihličia, ktoré sme selektovali podľa veku na mladé a staré ihličie. V októbri sme realizovali zber plodov borievky, ktoré sme vyčistili a odovzdali do laboratória VÚP. V ňom sme stanovovali obsah a analýzu éterických olejov. Obsah bol stanovený hydrodestiláciou vodnou parou na zariadení na stanovenie silíc (k 25 g plodov, ihličia bolo pridané 150 cm<sup>3</sup> destilovanej vody a hydrodestilácia bola vykonaná v priebehu 1 hod). Na analýzu éterického oleja sme použili zariadenie GC- Agilent technologies 6890N a MS- agilent technologies 5973 s nasledovnými podmienkami: Kolona HPINNOWAX agilent technologies rozmery: 30 m x 0,25 mm x 0.5 mikrometra; Nosný plyn: Helium tlak 85,5 kPa; Konštantný prietok: 1,5 ml/min; Teplotný program: 40 °C, 1 min, 5 °C/min do 250 °C; 250 °C, 2 min; Injektor: Split 10:1, Teplota injektora: 250 °C; Detektor: MSD; ionizácia: EI 70 eV; Scan mód, hmotnostný rozsah: 29 – 250 m/z; Solvent delay: 2,5 min; Teplota MS zdroja 230 °C. Knižnica na identifikáciu píkov NIST14. Z výsledkov rozborov pôdných vzoriek a rozborov éterických olejov v ihličí a plodoch borievky sme určili štatistickú významnosť rozdielu jednotlivých lokalít metódou analýzy rozptylu ANOVA pomocou Tukeyovho testu na hladine významnosti 0,05.

## Výsledky a diskusia

Monitorované lokality sa nachádzajú v nadmorskej výške od 440 m do 749 m nad morom. Dané lokality zaradujeme do mierne teplej agroklimatickej oblasti, okrsku M7 - mierne teplého silne vlhkého vrchovinového a M2 - mierne teplého, mierne vlhkého, so studenou zimou, dolinového) a do chladnej agroklimatickej oblasti, okrskov C1 - mierne chladného, veľmi vlhkého. Do okrsku M7, s dlhodobým ročným úhrnom zrážok 795 mm a priemernou ročnou teplotou vzduchu 8,1 °C, patria lokality Iliáš a Horné Lazy. Agroklimatický okrsk M2 charakterizuje lokalitu Ostrá hora. Lokality Kišovce a Selčianske sedlo zaradujeme do okrsku C1, s dlhodobým ročným úhrnom zrážok 955 mm a teplotou v júli  $\geq 12$  °C až  $< 16$  °C. Charakteristika lokalít je uvedená v tabuľke 1.

Lokalita Kišovce mala neutrálnu pôdnu reakciu (pH 6,81) so stredným obsahom humusu a dusíka (Tab. 2). Zásoba prijateľného fosforu v pôde bola nízka, s vyhovujúcim obsahom prijateľného draslíka (240,61 mg.kg<sup>-1</sup>) a horčíka (324,02 mg.kg<sup>-1</sup>). Aj ďalšia lokalita Ostrá hora mala neutrálnu pôdnu reakciu (pH 6,70). Obsah humusu v pôde bol vysoký (48,17 g.kg<sup>-1</sup> Cox) a rovnako aj zásoba dusíka bola vysoká. Pri zásobe fosforu sme zaznamenali jeho nízky obsah a dobrý obsah prijateľného draslíka. Zaevidovali sme vyhovujúcu zásobu horčíka.

**Tab 1** Charakteristika lokalít

Lokalita	Nadm. výška	Okres	Agroklimatická oblasť, okrskov	R /mm/	T /°C/	Pôdny typ	Pôdny druh
Kišovce	667 m	Poprad	chladná oblasť, okrskov C1	656	6,2	kambizem	ílovitohlinité

<b>Ostrá hora</b>	568 m	Spišská Nová Ves	mierne teplá oblasť, M2	639	6,0	kambizem	ílovitohlinité
<b>Horné Lazy</b>	470 m	Banská Bystrica	mierne teplá oblasť, M7	855	8,5	rendzina	hlinitý
<b>Iliaš</b>	440 m	Banská Bystrica	mierne teplá oblasť, M7	855	8,5	rendziny	hlinitý
<b>Selčianske sedlo</b>	749 m	Banská Bystrica	chladná oblasť, okrsk C1	900	7,5	rendziny	hlinitý

T – priemerná ročná teplota, R – ročný úhrn zrážok

Lokalita Horné Lazy vykazovala neutrálnu pôdnu reakciu, s vysokým obsahom humusu ( $45,70 \text{ g.kg}^{-1} \text{ C}_{\text{ox}}$ ) a dusíka. Zásoba prijateľného fosforu v pôde bola nízka, s vysokým obsahom draslíka a s veľmi vysokým obsahom prijateľného horčíka ( $1400,61 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Iliáš je lokalita s neutrálnou pôdnou reakciou (pH 6,87), s vysokým obsahom humusu ( $49,11 \text{ g.kg}^{-1} \text{ C}_{\text{ox}}$ ) a dusíka ( $3,46 \text{ g.kg}^{-1}$ ). V pôde bola nízka zásoba fosforu. Obsah draslíka bol vysoký, s veľmi vysokým obsahom prijateľného horčíka ( $1168,18 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Kyslá pôdna reakcia bola zistená na lokalite Selčianske sedlo, kde bol obsah humusu ( $38,75 \text{ g.kg}^{-1}$ ) a dusíka ( $3,09 \text{ g.kg}^{-1}$ ) vysoký a obsah fosforu bol nízky. V pôde bola dobrá zásoba draslíka a horčíka. Naše pôdy sú dobre zásobené horčíkom čo potvrdzujú aj naše zistenia (Kobza *et al.*, 2010). Vysoký obsah humusu, prijateľného dusíka, draslíka a horčíka v pôde súvisí s pasením zvierat, čím sa zvyšujú zásoby živín v pôde. Vplyvom zrážok, teploty, pôdneho typu a pôdnej reakcie sa môže meniť aj dostupnosť živín v pôde (Maathuis, 2009).

**Tab 2** Pôdne vlastnosti lokalít

Lokalita	pH/KCl	Cox g.kg <sup>-1</sup>	N g.kg <sup>-1</sup>	P mg.kg <sup>-1</sup>	K mg.kg <sup>-1</sup>	Mg mg.kg <sup>-1</sup>
Kišovce	6,81 <sup>b</sup>	28,18 <sup>a</sup>	2,55 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a</sup>	240,61 <sup>a</sup>	324,02 <sup>a</sup>
Ostrá hora	6,70 <sup>b</sup>	48,17 <sup>a</sup>	5,03 <sup>a</sup>	2,03 <sup>a</sup>	244,36 <sup>a</sup>	270,33 <sup>a</sup>
Horné Lazy	6,88 <sup>b</sup>	45,70 <sup>a</sup>	3,71 <sup>a</sup>	1,45 <sup>a</sup>	216,68 <sup>a</sup>	1400,61 <sup>b</sup>
Iliáš	6,87 <sup>b</sup>	49,11 <sup>a</sup>	3,46 <sup>a</sup>	2,70 <sup>a</sup>	261,80 <sup>a</sup>	1168,18 <sup>b</sup>
Selčianske sedlo	5,46 <sup>a</sup>	38,75 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup>	0,75 <sup>a</sup>	170,27 <sup>a</sup>	188,42 <sup>a</sup>
F-ratio	59,89	0,69	1,72	2,32	0,49	37,48
P-value	0,0000	0,6221	0,2500	0,1566	0,7440	0,0001

Rozdielne indexy znamenajú štatisticky preukazné rozdiely medzi úrovňami faktorov (Tukey t-test, P = 0,05).

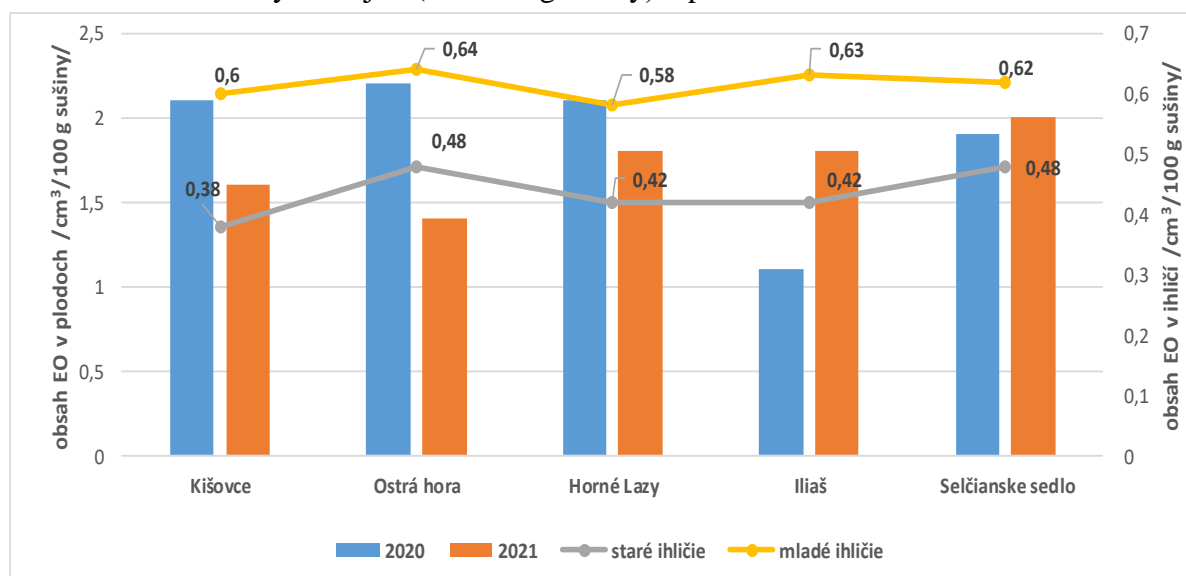
Obsah éterického oleja (EO) v plodoch borievok nazbieraných v roku 2020 osciloval od 1,1 – 2,2 cm<sup>3</sup>/100 g plodov a bol vyšší ako v roku 2021, okrem lokality Iliáš. Takmer vyrovnaný obsah bol zistený na lokalite Selčianske sedlo (Tab. 3). Najvýraznejší nárast obsahu éterického oleja (o 63,60 %) bol stanovený v borievkach z lokality Iliáš. Lokalita Ostrá hora prezentovala pokles EO o 0,8 cm<sup>3</sup>/100 g plodov, čo predstavuje takmer 36 %-né zníženie obsahu EO v roku 2021. Najnižší nameraný obsah éterického oleja v roku 2021 bol na lokalite Ostrá hora (1,4) a najvyšší bol na lokalite Selčianske sedlo (2,0 cm<sup>3</sup>/100 g plodov). K podobným výsledkom dospeli aj Salamon a Petruška (2017), ktorí na lokalite Chrámec zistili obsah éterického oleja 0,9 – 1,6 %. Éterický olej z plodov borievky je väčšinou tvorený monoterpenmi (asi 58%), hlavne  $\alpha$ -pinénom,  $\beta$ -myrcénom a sabinénom (Duke *et al.*, 2002). Získaný éterický olej mali svetlú farbu s výraznou borievkovou arómou.

**Tab 3** Porovnanie obsahu éterických olejov ( $\text{cm}^3/100$  g plodov) v plodoch borievky

Lokalita	2020	2021
Kišovce	2,1	1,6
Ostrá hora	2,2	1,4
Horné Lazy	2,1	1,8
Iliaš	1,1	1,8
Selčianske sedlo	1,9	2,0

V roku 2021 boli v mesiaci jún zozbierané vzorky ihličia, ktoré boli selektované na základe veku, na staré a mladé ihličie. Obsahy éterických olejov (EO) v sušine v mladom ihličí (0,58 – 0,64 %) boli vyššie ako v starom ihličí (0,38 – 0,48 %). Najnižší obsah EO v mladom ihličí sme stanovili na lokalite Horné Lazy (0,58 %) a v starom na lokalite Kišovce (0,38 %). Na lokalite Ostrá hora sme zaznamenali maximálny obsah éterického oleja v mladom (0,64 %) aj v starom ihličí (0,48 %). Rozdiel medzi nimi bol najnižší, len 0,16 %. Ďalšie lokality evidovali väčší rozdiel EO medzi mladým a starým ihličím, a to 0,21 – 0,22 %. Maximálny rozdiel bol nameraný na lokalite Kišovce (Graf 1). Na stanovišti Iliaš mladé ihličie obsahovalo o polovicu viac éterického oleja ako staré ihličie. Pri hodnotení obsahu EO v mladom a starom ihličí borievky sme zistili rozdiely. Ich obsah je závislý na sušine, mladé ihličie obsahuje viac vody ako staré. V mladom ihličí obsah vody oscilloval od 61 do 66g/100 g, zatiaľ čo staré ihličie obsahovalo o 21 % menej vody ako mladé.

**Graf 1** Obsah éterických olejov ( $\text{cm}^3/100$  g sušiny) v plodoch a ihličí *J. communis* L.



Chémiu borievkového oleja (chemotypy) preskúmal Lawrence už v roku 1987. V éterických olejoch získaných hydrodestiláciou sa identifikovali terpény. Kvalitatívnym a semikvantitatívnym porovnaním profilov terpénov sa zistilo, že terpény humulene, trans

geraniol, caryophyllene oxid a 2-bornene sa vo vyššej miere vyskytujú v starom ihličí. Iné terpény, ako camphene, linaool, copaene, sa v prevažnej miere nachádzali v mladom ihličí (Tab. 4).

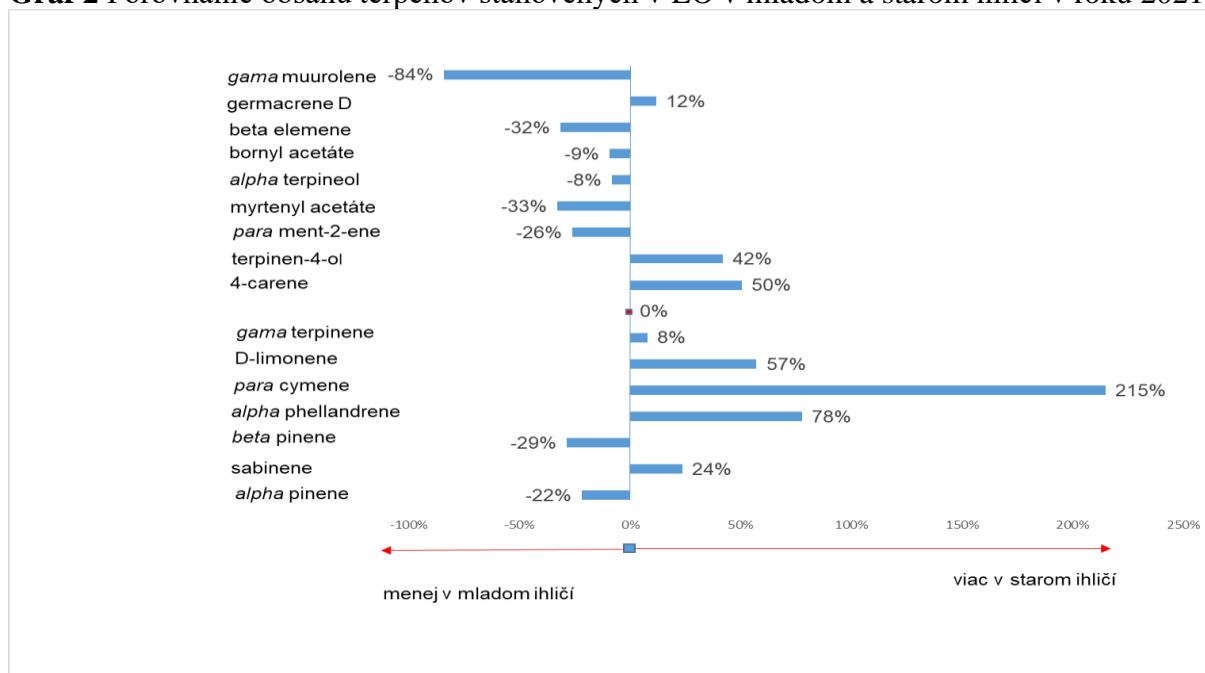
**Tab 4** Profil terpénov v éterickom oleji v mladom a starom ihličí *J. communis* L.

Lokalita	Ostrá hora		Horné Lazy		Kišovce		Iliaš		Selce	
	mladé	staré	mladé	staré	mladé	staré	mladé	staré	mladé	staré
<b>Monoterpeny</b>	(rel. %)									
<i>alpha</i> -pinene	21,18	13,15	36,11	16,68	33,05	34,04	24,41	28,64	17,54	10,56
camphene			0,29		0,28		0,22	0,20	0,14	
sabinene	17,87	21,21	7,86	21,39	13,06	7,99	12,28	8,35	13,05	20,28
2 bornene						1,01	0,11	0,10		0,15
<i>beta</i> -pinene	1,35	1,09	2,42	1,11	2,76	1,89	1,96	2,08	1,40	0,88
myrcene	3,86	4,14	3,14	3,80	3,81	3,97	3,87	3,74	3,30	3,80
<i>para</i> -cymene	0,55	1,44	0,32	1,49	0,20	1,18	0,39	0,41	1,00	3,23
D-limonene	2,58	3,26	1,77	3,01	2,17	4,53	4,30	7,27	2,88	3,45
<b>Oxidované monoterpény</b>	(rel. %)									
linaool					0,15		0,30	0,22	0,17	
terpinen-4-ol	15,18	16,05	7,33	16,36	5,08	8,83	8,60	8,4	11,19	17,65
<i>cis</i> piperitol	0,93	0,24	0,43	0,25			0,17	0,14	0,23	0,38
<b>Sesquiterpeny</b>	(rel. %)									
copaene	0,17		0,20		0,22		0,19	0,13	0,38	0,15
<i>beta</i> -elemene	0,24		0,45		0,60		0,38		0,29	
humulene		1,80			0,33	3,46		0,87	0,46	1,55
germacrene D		0,58	0,75	1,34	1,73	1,65	2,24	1,78	0,79	1,15
germacrene B	1,17		1,31	1,99		0,92	1,64	1,60	0,40	0,25
<b>Oxidované sesquiterpeny</b>	(rel. %)									
trans geranylgeraniol			0,23	0,33		0,10				0,13
spathulenol		0,65		0,41	0,48	0,55	0,30	0,80	0,13	1,06
caryophyllene oxid						0,96		0,13		

Výrazný rozdiel sa zistil najmä v obsahu *para*-cymene, ktorého obsah bol vyšší o 215 % v starom ihličí. Z literárnych údajov vyplýva, že terpén *para*-cymene vzniká degradačnými procesmi iných terpénov, preto je jeho obsah vyšší v starom ihličí. S tým súhlasia aj nami získané výsledky. Odlišnosti v obsahu iných terpénov v oboch druhoch ihličia nie sú tak výrazné. V tabuľke 4 je uvedený profil terpénov v éterickom oleji v mladom a starom ihličí. Rozdiely v zložení terpénov v éterickom oleji v mladom a starom ihličí poukazuje graf 2. V mladom ihličí bol vyšší obsah *alpha*-pinenu ako v starom ihličí. Najvyššiu hodnotu sme namerali na lokalite Horné Lazy (36,11 %). Aj ďalšie terpény (sabinene a terpinen, germacrene D) boli vo vyššom množstve na tejto lokalite, ale v starom ihličí. Majoritné terpény prítomné

v ihličí sa nachádzajú v majoritných množstvách aj v éterickom oleji z plodov borievok. V EO z ihličia bol stanovený piperitol, ktorý nebol stanovený v profile terpenov v éterickom oleji z plodov borievok.

**Graf 2** Porovnanie obsahu terpenov stanovených v EO v mladom a starom ihličí v roku 2021



## Záver

Rôzne pôdnoklimatické podmienky a nadmorská výška vplývali na obsah éterického oleja v plodoch a ihličí borievky obyčajnej (*J. communis* L.). Lokality sa nachádzali v mierne teplej a chladnej agroklimatickej oblasti v nadmorskej výške od 440 – 749 m n.m. Pôdy boli charakteristické neutrálnou (Kišovce, Ostrá hora, Iliáš, Horné Lazy) a kyslou pôdnou reakciou (Selčianske sedlo, pH 5,46), s vysokým obsahom humusu, dusíka, nízkym až veľmi nízkym obsahom prijateľného fosforu, s dobrým až vysokým obsahom draslíka a vysokým až veľmi vysokým obsahom horčíka. Najvyššia zásoba horčíka bola zistená na lokalitách Horné Lazy a Iliáš. V plodoch je výrazne vyšší obsah éterického oleja ako v ihličí, pričom nezáleží na veku ihličia. Obsah éterických olejov v plodoch borievky bol v roku 2020 väčší, s maximálnymi hodnotami na lokalite Ostrá hora (2,2 %). Mladé ihličie obsahovalo viac éterického oleja ako staré ihličie. Na lokalite Ostrá hora bol evidovaný jeho maximálny obsah v mladom (0,48 %) aj starom ihličí (0,64 %).

## Pod'akovanie

Tento príspevok bol spracovaný vďaka podpore projektu APVV-19-0471 „Využitie potenciálu borievky (*Juniperus communis* L.) v potravinárskom priemysle“.

## Literatura

- Angioni, A. - Barra, A. - Russo, M.T. - Coroneo, V. - Dessi, S. - Cabras, P. (2003): Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 3073-3078.
- Cooper, F. - Stone, R.E. - McEvoy, P. - Wilkins, T. - Reid, N. (2012): The conservation status of juniper formations in Ireland. 1st Edition, *Irish Wildlife Manuals*, 2012, 63, p. 1-224.
- Duke, J. A. - Bogenschultz-Godwin M. J. - DuCellier, J. - Duke, P. A. - Handbo (2002): *Book of Medicinal Herbs*. 2nd ed. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press, 2002.
- Falasca, A. - Caprari, C. - Felice, V. - Fortini, P. - Saviano, G. - Zollo, F. - Iorizzi, M. (2016): GC-MS analysis of the essential oils of *Juniperus communis* L. berries growing wild in the Molise region: Seasonal variability and in vitro antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 69, p.166-175. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.07.026>
- Kobza, J. *et al.* (2010): Aktuálny stav a vývoj obsahu fosforu, draslíka a horčíka v poľnohospodárskych pôdach Slovenska. In *Agrochémia*, 50 (1), 2010, p. 3-8.
- Lawrence, B. M. (1987): Progress in essential oils-Juniper berry oil. *Flavours and Fragrances*, 1987, 12, p. 59-61.
- Maathuis, F. (2009): Physiological function of mineral macronutrients. In *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12 (3), p. 250-258.
- Šalamon I. - Petruška P. (2017): Quality of juniper essential oil (*Oleum Juniperi*) in the South slovakia and its curative and industrial utilization. *Indian J. Pharmaceut. Edu. and Res.*, 2017, 51, vol. 3, p 136-140.
- Thomas, P.A. - El-Barghathi, M. - Polwart, A. (2007): Biological flora of the british isles: *Juniperus communis* L. *J. Ecol.*, 95(6): 1404-1440. Ward LK. (2010). Variation in ripening years of seed cones of *Juniperus communis* L., *Watsonia*, 2010, 28 (1), p. 11-9.
- Zheljzskova, Valtcho D. - Kacaniova, M. - Dinchevad, I. - Radoukovae, T. - Semerdjievaf, I. B. - Astatkieg, T. -, Sclegelh, V. (2018): Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the galbuli of six juniper species. *Industrial Crops & Products*, 2018, 124, p. 449–458.

## Kontakty:

Ing. Vladimíra Vargová, PhD.

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva

Mládežnícka 36, Banská Bystrica 974 21

+421 48 31 00 6865 +421 911278051, [vladimira.vargova@nppc.sk](mailto:vladimira.vargova@nppc.sk)





## Biodiverzita trávneho spoločenstva

### Biodiversity of the grassland community

Vargová V., Kováčiková Z.

*Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum*

#### Abstrakt

Účelom tejto štúdie bolo zistiť vplyv rôznej intenzity hnojenia na diverzitu aluviálnej lúky. V západnej časti Zvolenskej kotliny bol založený poľný experiment v nadmorskej výške 350 m. Pokus pozostával zo 6 variantov hnojenia: nehnojený variant, PK variant, varianty s hnojením 50, 100, 150 a 200 kg N.ha<sup>-1</sup>. Sledované obdobie bolo za roky 2019 a 2020. Trávny porast bol využívaný trikrát. Floristické zloženie porastu sme hodnotili pred každou kosbou. Z botanického hľadiska na hnojených variantoch prevládali trávy. Variant PK mal vyššie zastúpenie bylín a leguminóz, najmä v druhej kosbe. Vyššiu hodnotu diverzity mal kontrolný nehnojený variant. Hnojené varianty mali nižšiu diverzitu. Kontrolný variant dosiahol hodnotu indexu vyrovnanosti najvyššiu, čiže porast mal najvyrovnanejší.

**Kľúčové slová:** trávny porast, hnojenie, floristické zloženie, Shannonov index diverzity

#### Abstract

The purpose of this study was to determine the impact of different fertilization on the diversity of alluvial meadow. The first field experiment was established in the western part of the Zvolenská kotlina basin at 350 m a.s.l. The experiment consisted of 6 treatments of fertilization: unfertilized grassland, PK fertilized grassland and grasslands fertilized with 50, 100, 150 and 200 kg N.ha<sup>-1</sup>. The monitored periods were 2019 and 2020. Grasslands were cut three times. We evaluated the botanical composition of the stand before each mowing. Considering botanical composition the fertilized treatments were dominated by grasses. The treatment PK had higher representation of herbs and legumes, especially in the second cut. They higher value of diversity had control non-fertilized treatment. Fertilized treatments had lower diversity. The control treatment reached the highest value of the balance index, i.e. the grasslands was the most balanced.

**Keywords:** grassland, fertilisation, botanical composition, Shannon diversity index

#### Úvod

Trávne porasty sú zdrojom tradičných rastlinných druhov, prírodného bohatstva krajiny a svojou rôznorodosťou predstavujú najvyššiu diverzitu rastlinných druhov na poľnohospodárskej pôde. Medzi najrozmanitejšie ekosystémy patria poloprírodné trávne porasty. Môžu mať až 80 druhov rastlín na meter štvorcový (Habel *et al.*, 2013; Vickery *et al.*, 2001). Rastliny majú kľúčovú úlohu v ekosystémovej vyrovnanosti a preto sú nevyhnutné pre udržateľnosť životného prostredia. Okrem tejto hodnoty predstavujú rastliny pre človeka ekonomickú a kultúrnu hodnotu, pretože nám dávajú jedlo, krmivo pre zvieratá, vláknu a aj farmaceutické výrobky (Martins a Oliveira, 2016). Druhové zloženie trávnych porastov je výsledkom pôsobenia interakcií všetkých ekologických faktorov v ekosystéme a zároveň spôsobu a intenzity využívania. Dôležitým faktorom zodpovedným za zmeny v rastlinných spoločenstvách sú zmeny vo využívaní pôdy a zlepšovaní poľnohospodárskych systémov, ktoré majú výrazný vplyv na vegetáciu (Kacki a Hegedúšová, 2019). Floristická diverzita zohráva dôležitú úlohu pri stabilite a produkcii trávneho ekosystému a predstavuje celkovú rozmanitosť druhov žijúcich na konkrétnom stanovišti. Prostredie bohatšie na živiny nemusí ovplyvňovať

rozmanitosť druhov. Pri vyššej zásobe živín v pôde, druhové bohatstvo rastlín obvykle klesá. Diverzita trávnych druhov sa mení v závislosti od aktuálnych podmienok prostredia, ktorým je vystavená ďalšia existencia či zánik druhov. Vysoká diverzita je zvyčajne spojená s relatívne nízkou produktivitou, ktorá je odrazom zásoby prístupných živín na stanovišti a aj od spôsobu obhospodarovania trávneho porastu. Najvýznamnejšími ekologickými faktormi pôsobiacimi na druhové zloženie, produkciu a kvalitu krmu trávnych porastov sú vodný a živinový režim. Hnojenie zvyšuje produkciu využiteľnej biomasy všetkých druhov v poraste. Produkcia sušiny trávneho porastu je závislá od distribúcie a spôsobu využitia asimilátov medzi nadzemnou a podzemnou časťou trávneho porastu, pričom je potrebné zohľadniť úbytok sušiny v procese respirácie (Vozár a Jančovič, 2014). Cieľom príspevku bolo zhodnotenie vplyvu rozdielnej intenzity hnojenia na diverzitu trávneho porastu.

## Materiál a metódy

Pokus bol založený na stanovišti vo Veľkej Lúke v roku 1961 blokovou metódou v štyroch opakovaníach s veľkosťou pokusnej parcely 32 m<sup>2</sup> v západnej časti Zvolenskej kotliny v nadmorskej výške 350 m. V príspevku uvádzame výsledky za roky 2019 a 2020. Dlhodobý priemer zrážok za vegetáciu je 430 mm a za rok 780 mm. Priemerná denná teplota vzduchu za rok je 9,6 °C a za vegetáciu 16,5 °C. Pôdny typ je fluvizem. Trávny porast bol z fytoecologického hľadiska charakterizovaný ako zväz *Alopecurion pratensis*.

**Tab. 1** Varianty pokusu

Varianty/ dodané živiny	K0N	PK	N50PK	N100PK	N150PK	N200PK
<b>N</b>	0	0	50	100	150	200
<b>P</b>	0	22	7,5	15	22,5	30
<b>K</b>	0	41,5	20	40	60	80

Experiment je tvorený šiestimi variantami s rôznou úrovňou hnojenia (Tab. 1). Na začiatku vegetačného obdobia bol v celej dávke aplikovaný fosfor (superfosfát 19 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), draslík (draselná soľ 60 % KCl) a 65 % dusíka (LAD 27 % N) z celkového množstva. Druhá dávka N bola dodaná po prvej kosbe. Porasty sa využívali tromi kosbami: 1. kosba – začiatok klasenia prevládajúcich druhov tráv, 2. kosba – 6 až 8 týždňov po 1. kosbe, 3. kosba – 8 až 10 týždňov po predchádzajúcej. Pred každou kosbou sme robili floristickú analýzu metódou projektívnej dominancie podľa Malocha (1953) na určenie všetkých rastlinných druhov prítomných v poraste. Podľa Shannonovho indexu sme vypočítali diverzitu a vyrovnanosť trávnych porastov (Begon, Harper a Townsend, 1997).

*Shannonov index diverzity* (Begon, Harper a Townsend, 1997):

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

H – index diverzity, S – celkový počet druhov v snímke,  $P_i$  – podiel  $i$ -teho druhu na snímke

*Shannonov index vyrovnanosti* (Begon, Harper a Townsend, 1997):

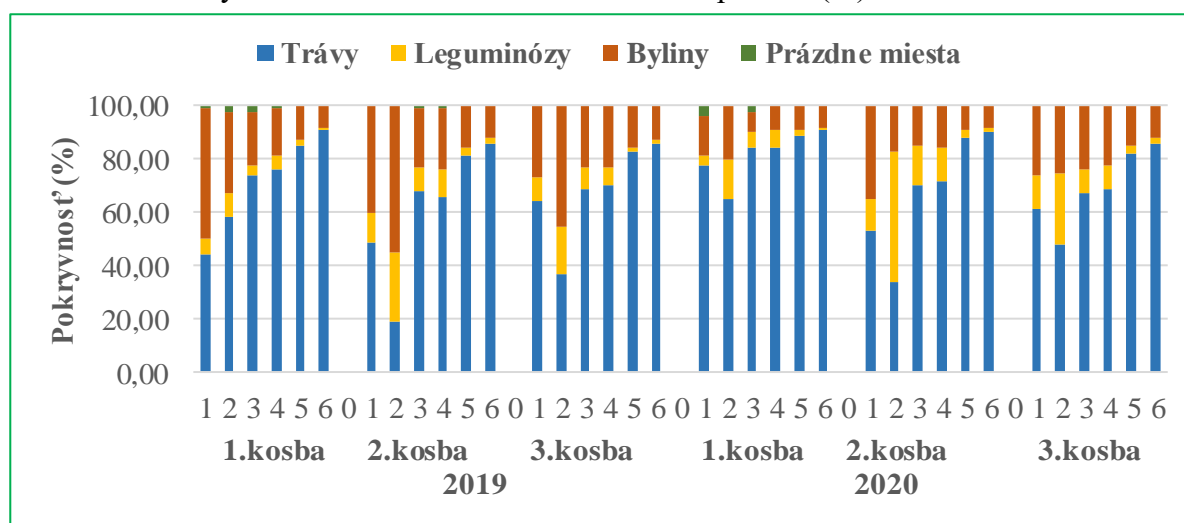
$$J = \frac{- \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i}{\ln S}$$

J – index vyrovnanosti, S – celkový počet druhov v snímke,  $P_i$  – podiel  $i$ -teho druhu na snímke

## Výsledky a diskusia

Hodnotenie stavu travinno-bylinnej vegetácie je možné aj prostredníctvom funkčných vlastností vegetácie. Za jednu z možností považujeme využitie ekologických a socio-ekonomických funkcií vegetácie. Trávny porast spĺňa v krajine rôzne funkcie a prináša množstvo benefitov. Za najvýznamnejšiu považujeme druhovú diverzitu, keďže od druhového zloženia sa odvíjajú funkcie vegetácie (Klimantová, 2016). Druhová diverzita je ukazovateľom štruktúry trávnych porastov vyjadrujúcim počet mimoprodukčných vlastností druhov, ktoré spoločensvo vytvára (Klimeš, 2000). Floristické zloženie trávnych porastov nie je v priebehu rokov stabilné, mení sa v závislosti od ekologických faktorov, z nich možno čiastočne ovplyvňovať živinový a vodný režim stanovišťa alebo pôdnu reakciu (Mrkvička *et al.*, 2002). Pokryvnosť botanického zloženia porastov je uvedené na obrázku 1. V prvej kosbe sme zaznamenali vysoký podiel tráv na hnojených variantoch, s najvyšším podielom na variante N200PK (obr. 1). Z trávnych druhov v poraste dominovala *Anthoxanthum odoratum* L. a *Alopecurus pratensis* L. Podiel leguminóz bol nízky a najvyšší (9 %) bol na variante PK s dominanciou *Trifolium pratense* L. Kontrolný variant prezentoval najväčší podiel bylín, až 49 %. Z nich prevládali *Leontodon hispidus* L. a *Taraxacum officinale* auct. non Weber. V druhej kosbe stúpol podiel bylín a mierne klesol podiel tráv. Dominovali trávy: *Arrhenatherum elatius* L., *Agrostis stolonifera* L. a *Alopecurus pratensis* L. Bylinné druhy v poraste prezentovali *Leontodon hispidus* L. a *Plantago lanceolata* L. Pokryvnosť leguminóz stúpla o 15 % na variante PK. Ku konci vegetačného obdobia sa zastúpenie bylín a leguminóz znížilo a vzrástol podiel trávnych druhov. Minimálny podiel tráv (37 %) s najvyšším podielom leguminóz a bylín (45 %) sme zistili na variante PK. Varianty hnojené vyššími dávkami dusíka (N150PK, N200PK) sa prezentovali vyšším zastúpením tráv (83 – 85 %) s dominantnými druhmi *Arrhenatherum elatius* L., *Agrostis stolonifera* L. a *Trisetum flavescens* (L.) P. Beauv.

**Obrázok 1** Pokryvnosť botanického zloženia trávneho porastu (%) na lokalite Veľká Lúka



1- K0N, 2- PK, 3- N50PK, 4- N100PK, 5- N150PK, 6- N200PK

V roku 2020 sa v prvej kosbe zvýšil podiel tráv na nehnojenom a PK hnojenom variante (Obr. 1). Z trávnych druhov v poraste dominovali rovnaké druhy ako v predchádzajúcom roku. Najvyšší podiel (91 %) bol na variante N200PK. Na PK variante dosiahli leguminózy najvyššie zastúpenie 15 % s dominanciou *Trifolium pratense* L. a 20 %-ným podielom bylín. V druhej

kosbe výraznejšie stúplo zastúpenie leguminóz na variantoch PK, N50PK a N100PK. Podiel tráv mierne klesol, ale nie tak ako v predchádzajúcom roku. Najvyššie zastúpenie leguminóz (49 %) bolo na variante PK. Dominovali trávy: *Arrhenatherum elatius* L., *Alopecurus pratensis* L. a *Agrostis stolonifera* L. Bylinné druhy v poraste prezentovali *Leontodon hispidus* L. a *Plantago lanceolata* L. Pokryvnosť bylín sa v tretej kosbe zvýšila na hnojených variantoch a PK variante, kde sme zaznamenali aj najvyšší podiel leguminóz (27 %). Varianty N150PK a N200PK mali obdobný podiel tráv ako v predchádzajúcom roku. Najviac bylín (26 %) sa zaznamenalo na kontrolnom variante, z nich dominovali *Leontodon hispidus* L. a *Plantago lanceolata* L.

Na základe pokryvnosti rastlinných druhov sme vypočítali Shannonov index druhovej diverzity (H) a vyrovnanosti (J). Výsledky sú uvedené v tabuľkách 2 a 3. Index diverzity sa v prvej kosbe 2019 pohyboval od 2,32 – 2,85, v druhej od 2,29 – 2,88 a v tretej kosbe od 1,99 – 2,61 (Tab. 2). Najnižšia hodnota (2,19) bola zaznamenaná na variante N200PK s najvyššou dávkou hnojenia. Variant bez hnojenia mal vyššiu priemernú hodnotu diverzity (2,72) ako hnojené varianty. Na variante N50PK bola zistená najvyššia hodnota diverzity, 2,78. V roku 2020 sa hodnoty Shannonova indexu diverzity v prvej kosbe znížili takmer na všetkých variantoch pri porovnaní s rokom 2019. Hodnoty oscillovali od 2,29 na variante N150PK do 2,63 na variante N100PK. V druhej kosbe nastal mierny pokles hodnôt diverzity na hnojených variantoch a v tretej kosbe sme zaznamenali mierny nárast hodnoty indexu diverzity. Varianty N50PK a N100PK hnojené dávkou dusíka 50 kg a 100 kg.ha<sup>-1</sup> dosiahli vyššie hodnoty diverzity ako varianty N150PK a N200PK. Najvyššia hodnota (2,81) bola zistená na variante K0N. Rovnako ako v predchádzajúcom roku, aj v tomto sme najnižšiu hodnotu indexu diverzity zaznamenali na variante N200PK (2,18), čo je o 22 % menej oproti kontrolnému variantu. Varianty PK, N50PK a N100PK dosiahli zníženie indexu H len o 9 – 12 %.

**Tab. 2** Shannonov index diverzity (H)

Rok	Kosba	Varianty					
		K0N	PK	N50PK	N100PK	N150PK	N200PK
2019	1	2,56	2,50	2,85	2,73	2,78	2,32
	2	2,85	2,38	2,88	2,76	2,63	2,29
	3	2,73	2,15	2,61	2,56	2,28	1,99
<b>Priemerná hodnota</b>		<b>2,72</b>	<b>2,35</b>	<b>2,78</b>	<b>2,69</b>	<b>2,56</b>	<b>2,19</b>
2020	1	2,58	2,47	2,34	2,62	2,29	2,33
	2	2,87	2,26	2,62	2,34	2,39	2,09
	3	2,97	2,68	2,69	2,54	2,34	2,12
<b>Priemerná hodnota</b>		<b>2,81</b>	<b>2,47</b>	<b>2,55</b>	<b>2,50</b>	<b>2,31</b>	<b>2,18</b>

Varianty v roku 2019 boli menej vyrovnané ako v roku 2020. Hodnoty indexu vyrovnanosti (J) v prvej kosbe 2019 oscillovali od 0,72 do 0,87 (Tab. 3). Kontrolný variant (K0N) dosiahol najvyššiu priemernú hodnotu indexu vyrovnanosti (0,85), to znamená, že porast bol najvyrovnanejší. Jurko (1990) uvádza, že čím sa hodnoty indexu vyrovnanosti (J) viac blížila k 1, tým je spoločenstvo vyrovnanejšie. Najnižšia hodnota (0,72) bola zistená na variante N200PK v druhej kosbe, kedy bol porast najmenej vyrovnaný. V roku 2020 sa zvýšili hodnoty vyrovnanosti na kontrolnom variante a variante s PK hnojením. Hodnoty J sa v prvej kosbe pohybovali od 0,78 (N200PK) do 0,91 (N100PK). Najvyššiu priemernú hodnotu indexu vyrovnanosti sme zaznamenali na nehnojenom variante (0,88) a najnižšiu hodnotu indexu na variante s najvyššou dávkou hnojenia (N200PK). Pri porovnaní rokov 2019 a 2020 sme zistili

rovnakú situáciu ako pri indexe diverzity. Kontrolný, nehnojený variant dosiahol vyšší index vyrovnanosti.

**Tab. 3** Shanonov index vyrovnanosti (J)

Rok	Kosba	Varianty					
		K0N	PK	N50PK	N100PK	N150PK	N200PK
2019	1	0,80	0,77	0,87	0,83	0,84	0,72
	2	0,86	0,80	0,84	0,87	0,80	0,72
	3	0,89	0,70	0,80	0,82	0,75	0,75
<b>Priemerná hodnota</b>		<b>0,85</b>	<b>0,75</b>	<b>0,84</b>	<b>0,84</b>	<b>0,80</b>	<b>0,70</b>
2020	1	0,86	0,89	0,81	0,91	0,81	0,78
	2	0,88	0,74	0,81	0,77	0,72	0,68
	3	0,89	0,80	0,86	0,82	0,75	0,68
<b>Priemerná hodnota</b>		<b>0,88</b>	<b>0,81</b>	<b>0,83</b>	<b>0,83</b>	<b>0,76</b>	<b>0,71</b>

## Záver

Príspevok prezentuje druhovú diverzitu rastlinného spoločenstva aluviálnej lúky v období rokov 2019 - 2020. Z botanického hľadiska bola najvyššia pokryvnosť trávnych druhov na hnojených variantoch, najmä *Arrhenatherum elatius* L., *Agrostis stolonifera* L. a *Alopecurus pratensis* L. Na variante s fosforečno-draselným hnojením bolo zastúpenie leguminóz a bylín najvyššie. Maximálna hodnota Shanonova indexu diverzity sa zistila na kontrolnom variante (2,81). Varianty s vyššími dávkami hnojenia dosiahli nižšie hodnoty indexu diverzity. Rovnaké výsledky sme zaznamenali aj pri vyrovnanosti, kedy najvyrovnanejší porast bol na nehnojenom variante (0,88). Najmenej vyrovnaný porast sa zistil na variante s dávkou dusíka 200 kg.ha<sup>-1</sup>, fosforu 30 kg.ha<sup>-1</sup> a draslíka 80 kg.ha<sup>-1</sup>. Nižšie dávky dusíka, fosforu a draslíka ovplyvňovali diverzitu menej ako ich vyššie dávky.

## PodĎakovanie

Tento príspevok bol spracovaný z výsledkov riešenia Rezortného projektu výskumu a vývoja (RPVaV) „Multifunkčné hospodárenie na rôznych typoch trávnych porastov“.

## Literatura

- Begon, M. - Harper, J.L. - Townsend, C. R. (1997): Ekologie - jedinci, populace a spoločenstva. Olomouc: Vydavatelství University Palackého. 1997, 949 s. ISBN 80-7067-695-7
- Habel, J. CH. *et al.* (2013): European grassland ecosystems: threatened hotspots of biodiversity. In *Biodiversity and Conservation*, 2013, 22.10: 2131-2138.
- Jurko, A. (1990): Ekologické a socioekonomické hodnotenie vegetácie. Bratislava: Príroda, 1990, 183 s. ISBN 80-07-00391-6
- Kacki, Z. - Hegedúšová, K. (2019): Plant community responses to changes in management. In *Biologia*, 74, 4, 2019, pp. 335-337 <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00228-9>
- Klimantová, A. (2016): Hodnotenie vybraných ekologických a socioekonomických vlastností vegetácie trávnych porastov katastrálneho územia obce Hodruša-Hámre. In *Ekologické štúdie*, 2016, roč. 7, č. 1, s. 46-53.

- Klimeš, F. (2000): Dynamics of species richness of floodplain meadows. In *Rostlinná výroba*, 2000, roč. 46, č. 5, p. 198-208.
- Maloch, M. (1953): Krmovinárstvo II. Bratislava : SPN, 1953, 616s.
- Mrkvička, J. - Veselá, M. (2002): The influence of long-term fertilization on species diversity and yield potential of permanent meadow stand. In *Rostlinná výroba*, 2002, roč. 48, č. 2, s. 69 – 75.
- Martins-Loução, M.A. - Gaio-Oliveira, G. (2017): New Challenges to Promote Botany's Practice Using Botanic Gardens: The Case Study of the Lisbon Botanic Garden. In *Plant Biodiversity: Monitoring, Assessment and Conservation*, 2017, pp.1-17
- Vickery, J. A., *et al.* (2001): The management of lowland neutral grasslands in Britain: effects of agricultural practices on birds and their food resources. In *Journal of Applied Ecology*, 2001, 38.3, pp. 647-664.
- Vozár, E. - Jančovič, J. (2014): Ošetrovanie travných porostů. In Skládanka, J. *et al.* Pícninářství. Brno : MU, 2014, s. 225-245. ISBN 978-80-7509-111-6

**Kontakt:**

Ing. Vladimíra Vargová, Ph.D.

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva

Mládežnícka 36, Banská Bystrica 974 21

+421 48 31 00 6865 +421 911278051, [vladimira.vargova@nppc.sk](mailto:vladimira.vargova@nppc.sk)

## Unifikace půdního pokryvu vlivem plošné vodní eroze

Unification of soil cover due to sheet erosion

Vlček V.<sup>1</sup>, Lukas V.<sup>1</sup>, Dvořáčková H.<sup>1</sup>, Sedlák L.<sup>1</sup>, Badalíková B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta

<sup>2</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Troubsko

### Abstrakt

Práce hodnotí klasifikaci půd vzniklých na erozně-akumulačních plochách černozemních a kambizemních oblastí. V případě taxonomického klasifikačního systému půd ČR postupně dochází na erozních plochách bez ohledu na původní půdní typ (kterým byla kambizem nebo černozem), k tvorbě regozemě, na akumulacích plochách pak k tvorbě koluvizemě. U všech variant (bez ohledu na původní půdu) lze pozorovat podobné chování živin na erozně akumulacích plochách. Uvedenou skutečnost potvrzují i výsledky klasifikace WRB 2014. Tento jev v budoucnu pravděpodobně povede k určité unifikaci půdních typů, které se ale budou lišit erodovaným/akumulovaným materiálem či potenciální úrodností, což by měla do budoucna reflektovat jednak klasifikace půdy, jednak bonitace půdy.

**Klíčová slova:** černozem, kambizem, regozem, koluvizem, klasifikace půdy

### Abstract

The paper evaluates the soil classification formed on the erosion or accumulation surfaces of Chernozems and Cambisols areas. According the Taxonomic classification system of the soils of the Czech Republic: on erosion surfaces are formed Regosols (regardless of the original soil type Cambisols or Chernozems), and Colluvizems on accumulation surfaces. This fact was confirming by the results of the WRB 2014 classification system. For all variants (regardless of the original soil), a similar conduct of nutrients can be observed on the erosion and accumulation surfaces. In the future, this phenomenon will probably lead to a certain unification of soil types on erosion and accumulation areas. However, it will differ in terms of eroded/accumulated material or potential fertility, which should be reflected in both soil classification and soil assessment in the future.

**Keywords:** Chernozems, Cambisols, Regosols, Colluvic, soil classification

### Úvod

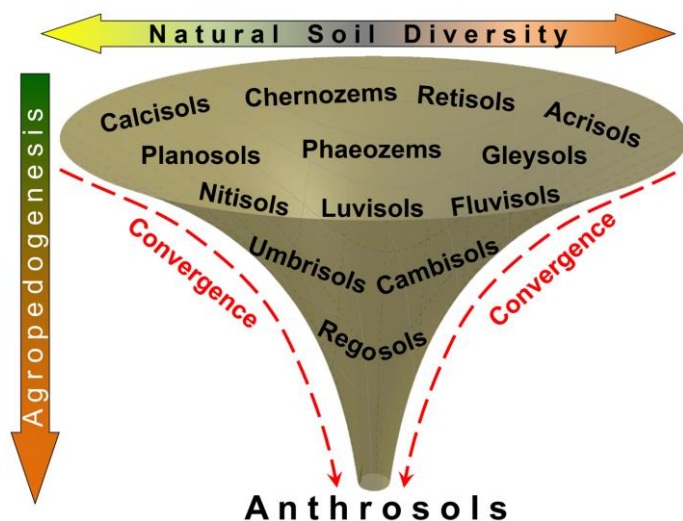
Za jeden z největších problémů s kterými se potýkají zemědělské půdy v ČR, je považována vodní eroze. V České republice tvoří kriticky ohrožené, velmi silně ohrožené a silně ohrožené půdy (tj. půdy, které mají přípustnou hodnotu faktoru ochranného vlivu vegetace  $C_p < 0,1$ ) asi 18 % zemědělského půdního fondu (ZPF), tedy zhruba 750 000 ha, více nebo méně se týká ale zhruba 50 % ZPF. Problémy spojené s vodní erozí se zvýšily zejména v souvislosti s tvorbou velkých půdních bloků v 50 a 60 letech minulého století a mizením stabilizačních prvků v krajině (protierozní meze, polní cesty, a obecně prvky tzv. kostry ekologické stability-KES). Za další podstatný negativní vliv je pokládáno používání těžších a větších strojů, rozsáhlejší používání minerálních hnojiv, vynechávání aplikace statkových hnojiv a víceletých pícnin z osevních postupů zejména od 90. let 20. století apod.

Vliv vodní eroze na změnu některých půdních vlastností je sice obecně znám, vybrané uvádíme v tabulce 1.

**Tabulka 1: Vliv vodní eroze na některé půdní vlastnosti**

	citace
Pokles obsahu půdní organické hmoty a změna zrnitosti	Lisetskii et al. 2015 Sandor a Homburg 2017 Homburg a Sandor 2011 Ayoubi et al. 2012 Khormali et al. 2009
Změna fyzikálních vlastností (pokles pórovitosti, infiltrace apod.)	Carducci et al. 2017 Holthusen et al. 2018 Lipiec et al. 2012 Ponge et al. 2013
Pokles mocnosti půdního profilu	Ayoubi et al. 2012 Lal 2001
Ztráta živin, změny poměru živin	Lisetskii et al. 2015 Sandor a Homburg 2017
pokles biodiverzity a mikrobiální aktivity	Lal 2009 Zhang et al. 2017

Lidská aktivita v agrosystémech se od počátku 20. století co do intenzity projevuje stále silněji a začíná být problémem zejména v kontextu dalších půdotvorných faktorů (Liu a kol., 2009; Kuzyakov a Zamanian 2019). Důvodem je zejména fakt, že lidé využívají v agrosystémech prakticky pouze jednu z funkcí půdy – produkci biomasy, pro kterou sice optimalizují ostatní půdní vlastnosti. Protože však většina plodin má obdobné požadavky, rozsah výsledných hodnot má poměrně úzké variační rozpětí.



**Obrázek 1:** Koncepční schéma sbíhavosti (konvergence) půdních vlastností agropedogenezí. Původně přirozené půdy se vlivem rostlinné výroby a degradací mění. Výsledkem bude pouze několik málo půdních typů (v extrému až Anthrosols) s velmi malým rozsahem půdních vlastností (In: Kuzyakov a Zamanian, 2019).

V rámci TKSP tak dochází vlivem vodní eroze k tvorbě smytých (erodovaných) znaků na erozních plochách, respektive tvorbě akumulčních znaků na bázi svahu. Vznikají tak například erodované či akumulované černozemě, kambizemě či jiné půdní typy. Další erozí a akumulací dochází, ale k výraznější unifikaci, kdy konečným výsledkem eroze je pouze půdní typ regozem (případně jiná půda skupiny leptosolů) na erozních plochách a koluvizem při akumulaci více



než 50 cm materiálu v podsvahové poloze, nebo půdní typy se znaky akumulace na místech původních půdních typů při prezenci méně než 50 cm akumulovaného materiálu.

Černozemě patří mezi nejúrodnější půdní typy ČR, přičemž klasifikačně má jít o hlubokohumózní půdy tzn. s více než 30 cm, zpravidla ale s více než 40 cm černického horizontu, vyvinuté z karbonátových sedimentů (TKSP, 2011). Jde o sorpčně nasycené půdy, s obsahem humusu zpravidla 2,0–4,5 %. Kambizemě patří zase mezi naše nejčastější (45 % ZPF) půdy. Konceptně jde o půdy s výrazným kambickým hnědým diagnostickým horizontem (v minulosti se nazývaly hnědé půdy, dle současné klasifikace TKSP jako kambizemě). Setkáváme se u nich s největší pestrostí substrátů (z hlediska zrnitosti, vrstevnatosti, trofismu, klimatu, vegetace). Koncept WRB je v tomto případě více konkrétní pro specifické půdní vlastnosti a tím i výrazně užší než koncept TKSP. Ve WRB se vyskytují požadavky na mocnost horizontu Cambic nebo Chernic respektive požadavky na jejich konkrétní barvu, obsahy látek apod.

V případě klasifikace WRB je konečným produktem eroze referenční půdní skupina Regosols, neboli půda, která „zbude“ po ztrátě většiny diagnostických znaků původních horizontů či materiálů viz obr. 1. V české půdní klasifikaci by ono hrdlo lahve tvořily kromě regozemě (erodované plochy) a koluvizemě (akumulační plochy) pravděpodobně i půdní typy skupiny Leptosols (hlavně litozem a ranker) na erozních plochách. Důvodem tohoto „širšího hrdla“ je jiná koncepce obou klasifikačních systémů. Ve WRB půdní jednotka koluvizem samostatně neexistuje, a najdeme ji pouze ve formě doplňkového, resp. hlavního klasifikátora jednotlivých referenčních půdních skupin. Oba klasifikační systémy, ale i tak, ukazují na stejný problém – unifikaci půd na erozně-akumulačních plochách.

Pro účely šetření bylo vybráno několik pozemků ovlivněných vodní erozí na původních černozemích (lokalita Bošovice 1, Bošovice 2 a Hrušky) a dvě plochy na původních kambizemích (lokalita Jihlava a Zástřizly). V této práci jsme se pokusili odpovědět na otázku, jak se mění některé půdní vlastnosti a klasifikace půdy vlivem plošné vodní eroze na erozních a akumulačních plochách.

### **Materiál a metody**

Bylo vytipováno několik lokalit, kde byl proveden podrobný pedologický průzkum pro určení změn v půdní klasifikaci vlivem vodní eroze.

*Plochu Bošovice* tvoří půdní blok 4701 s celkovou výměrou 120 ha, při průměrné sklonitosti 6,65°. Dle LPIS je u tohoto pozemku uváděno 61,23 ha jako erozně neohrožených, 54,73 ha jako mírně ohrožených a 3,88 ha jako silně ohrožených. *Plochu Hrušky* tvoří půdní blok 2001 s celkovou výměrou 50,42 ha, při průměrné sklonitosti 5,98°. Dle LPIS je u tohoto pozemku uváděno 24,65 ha jako erozně neohrožených; 24,91 ha jako mírně ohrožených a 0,86 ha jako silně ohrožených. *Plochu Záhnašovice* tvoří půdní blok 3001 s celkovou výměrou 28,05 ha, při průměrné sklonitosti 6,48°. LPIS u tohoto pozemku je vedený jako rozpracovaný, proto neexistují data výměr erozní ohroženosti. *Plochu Jihlava* tvoří půdní blok 2803/7 s celkovou výměrou 17,45 ha, při průměrné sklonitosti 6,27° přičemž 13,22 ha je uváděno jako silně erozně ohrožených.

Vzorky byly odebírány z ornice (0,00–0,15 m) v průběhu let 2019–2021. Obsah přístupného fosforu, draslíku, hořčíku a vápníku byl stanoven na spektrofotometru metodou podle Melicha III (vyjádřeno v mg na 1 kg půdy) a obsah celkového dusíku mineralizací, destilační metodou dle Kjeldahla (vyjádřen v %).

## Výsledky a diskuze

Práce se zaměřila zejména na změny v klasifikaci půdy dle Taxonomického klasifikačního systému půd ČR (aktualizace 2011), dále jen TKSP (Tab. 2) a dle Světové referenční báze pro půdní zdroje 2014 (aktualizované vydání 2015), dále jen WRB.

**Tabulka 2: Lokality z pohledu klasifikace TKSP**

Plocha	Původní plochy	Erodované plochy	Akumulované plochy
Bošovice 1	černozezem karbonátová	regozem karbonátová	černozezem akumulovaná až koluvizem karbonátová
Bošovice 2	černozezem karbonátová	regozem karbonátová	koluvizem karbonátová, oglejená,
Hrušky	černozezem pelická karbonátová	regozem pelická karbonátová	koluvizem pelická karbonátová
Zástřizly	kambizem vyluhovaná, pelická	regozem pelická, mezobazická	koluvizem pelická, eubazická
Jihlava	kambizem arenická	kambizem arenická erodovaná	kambizem arenická akumulovaná

Při plošné vodní erozi dochází prokazatelně ke změně klasifikovaných půd. Bez ohledu na původní půdní pokryv (černozezem či kambizem) došlo na erozních plochách ke změně na půdní typ regozem. V případě prezence zbytku kambického horizontu (lokality Jihlava) můžeme stále ještě klasifikovat jako kambizem varieta „erodovaná“. Pokračující vodní erozí dojde, ale i zde, ke změně na půdní typ regozem. Na akumulčních plochách došlo v konečném důsledku (opět bez ohledu na původní půdní pokryv) k tvorbě půdního typu koluvizem, s ohledem na zdrojový materiál, ale s proměnlivými vlastnostmi. Na plochách, kde je prozatím méně než 50 cm akumulovaného materiálu (Jihlava a Bošovice 1) je možné klasifikačně zařadit ještě jako původní půdu (černozezem, kambizem) a varietu „akumulovaná“. Pokračující akumulací dojde i zde na změně na koluvizem.

Z pohledu světové klasifikace WRB (shrnuté v tabulce č.3) dochází k vyšší unifikaci na úrovni obou erozně-akumulčních ploch. Při „dostatečné“ erozně-akumulční činnosti tak vzniká Referenční půdní skupina Regosols na obou plochách. Klasifikačním rozdílem je jen hlavní klasifikátor Colluvic.

**Tabulka 3: Lokality dle klasifikace WRB**

Lokalita	Původní plochy	Erodované plochy	Akumulované plochy
Bošovice 1	Haplic Kastanozems (Loamic, Aric)	Amphi-someric Kastanozem (Loamic)	Colluvic Regosols Loamic
Bošovice 2	Haplic Chernozem Amphi-Siltic)	Hypereutric Regosols (Loamic, Ochric)	Hypereutric Calcaric Colluvic Regosols (Loamic)
Hrušky	Haplic Kastanozems Loamic	Hypereutric Regosols (Loamic, Ochric)	Hypereutric Colluvic Regosols (Loamic, Profundihumic)
Zástřizly	Eutric Calcaric Cambisols (Clayic)	Eutric Regosols (Clayic).	Colluvic Regosols (Loamic, Profundihumic)
Jihlava	Cambisols (Loamic, Aric)	Cambisols (Loamic, Aric)	Cambisols (Loamic, Aric, Colluvic)

Poměrně zajímavé je chování jednotlivých živin, (shrnuté v Tabulce 4) na erozních a akumulčních plochách. Ve všech případech (bez ohledu na oblast) je na akumulčních

plochách více přístupného draslíku, fosforu a celkového dusíku než na plochách eroze. To odpovídá zjištěním o pohybu dusíku (Brtnický et al. 2017), draslíku nebo fosforu (Hua et al. 2020). V případě hořčíku je situace přesně opačná: vyšší obsahy byly vždy na erozních plochách, menší na akumulacích opět bez ohledu na oblast.

U výměnného vápníku byla situace poněkud složitější – v černozemních oblastech byly vyšší obsahy vždy na erozních plochách a nižší na akumulaci. U původních kambizemí přesně naopak. Důvodem je eroze buď do karbonátového materiálu (černozemní oblasti) nebo do kyselého materiálu (v kambizemní oblasti), která znamená odhalování materiálu bohatého nebo naopak chudého na vápník.

**Tabulka 4: Obsahy živin v ornici (0–15 cm) erozně-akumulačních ploch**

	živina	B1	B2	H	Z	J
Erozní plochy	K (mg/kg)	192	148	223	280	203
	Mg (mg/kg)	265	560	723	311	201
	P (mg/kg)	120	24	11	161	204
	Ca (mg/kg)	12 039	22 886	24 478	2 617	1 903
	Nt (%)	0,17	0,14	0,19	0,21	0,19
Akumulační plochy	K (mg/kg)	213	285	624	306	246
	Mg (mg/kg)	213	367	334	247	131
	P (mg/kg)	150	78	133	180	233
	Ca (mg/kg)	9346	12 016	15 540	3 050	2 178
	Nt (%)	0,18	0,19	0,23	0,22	0,21

B1=Bošovice 1; B2=Bošovice 2; H=Hrušky; Z=Zástřizly; J=Jihlava.

### Závěr

Z výsledků je patrné, že ač se půdy na intaktních plochách mohou značně klasifikačně značně lišit, na erodovaných nebo akumulovaných plochách dochází ke značné unifikaci. Na erozních plochách vzniká dle TKSP půdní typ regozem, na akumulacích pak koluvizem, bez ohledu na původní půdu. Výsledný produkt eroze či akumulace se, ale bude kvalitativně lišit dle kvality erodované půdy a půdotvorném substrátu. V konečném důsledku eroze a akumulace lze v klasifikaci WRB hovořit o ještě větší unifikaci, kdy na erozních i akumulacích vzniká Referenční půdní skupina Regosols.

Z hlediska pohybu základních živin v rámci svahu, můžeme konstatovat že:

- Obsahy vápníku, draslíku, dusíku a fosforu jsou vyšší na akumulacích částech svahů, výjimku tvoří obsahy vápníku při erozi karbonátového substrátu, kde jsou vyšší obsahy na erozních plochách ve srovnání s akumulacemi.
- Obsah hořčíku je vždy vyšší na erozních plochách, menší na akumulacích opět bez ohledu na oblast.

U výměnného vápníku byla situace poněkud složitější – v černozemních oblastech byly vyšší obsahy vždy na erozních plochách a nižší na akumulaci. U původních kambizemí přesně naopak. Důvodem je eroze buď do karbonátového materiálu (černozemní oblasti) nebo do kyselého materiálu (v kambizemní oblasti), která znamená odhalování materiálu bohatého nebo naopak chudého na vápník.

### Použitá literatura

Ayoubi S., Mokhtari Karchegani P., Mosaddegh M.R., Honarjoo N.: Soil aggregation and organic carbon as affected by topography and land use change in western Iran, *Soil Tillage Res.*, 121, 18–26, <https://doi.org/10.1016/j.still.2012.01.011>, 2012.

- Brtnický M., Hladký J., Elbl J., Dvořáčková H., Kynický J.: Impact of water erosion on total nitrogen content. 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017. DOI: 10.5593/sgem2017/32/S13.039.
- Carducci C.E., Zinn Y.L., Rossoni D.F., Heck R.J., Oliveira G.C.: Visual analysis and X-ray computed tomography for assessing the spatial variability of soil structure in a cultivated Oxisol, *Soil Tillage Res.*, 173, 15–23, <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.03.006>, 2017.
- Holthusen D., Brandt A.A., Reichert J.M., Horn R.: Soil porosity, permeability and static and dynamic strength parameters under native forest/grassland compared to no-tillage cropping, *Soil Tillage Res.*, 177, 113–124, <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.12.003>, 2018.
- Homburg J.A., Sandor J.A.: Anthropogenic effects on soil quality of ancient agricultural systems of the American Southwest, *Catena*, 85, 144–154, <https://doi.org/10.1016/j.catena.2010.08.005>, 2011.
- Hua D., Li J., Xu Y.: Influence of topographical factors on spatial distribution characteristics of soil nutrients in Qinba Mountain Area. 2nd International Conference on Oil & Gas Engineering and Geological Sciences, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 558 (2020) 032025. doi:10.1088/1755-1315/558/3/032025
- Khormali F., Ajami M., Ayoubi S., Srinivasarao C., Wani S.P.: Role of deforestation and hillslope position on soil quality attributes of loess-derived soils in Golestan province, Iran, *Agric. Ecosyst. Environ.*, 134, 178–189, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.06.017>, 2009.
- Kuzyakov Y., Zamanian K.: Reviews and syntheses: Agropedogenesis – humankind as the sixth soil-forming factor and attractors of agricultural soil degradation. *Biogeosciences*, 16, 4783–4803, 2019. <https://doi.org/10.5194/bg-16-4783-2019>
- Lal R.: Soil degradation by erosion, *Land Degrad. Dev.*, 12, 519–539, <https://doi.org/10.1002/ldr.472>, 2001.
- Lal R.: Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition, *Food Secur.*, 1, 45–57, <https://doi.org/10.1007/s12571-009-0009-z>, 2009.
- Lipiec J., Horn R., Pietrusiewicz J., Siczek A.: Effects of soil compaction on root elongation and anatomy of different cereal plant species, *Soil Tillage Res.*, 121, 74–81, <https://doi.org/10.1016/j.still.2012.01.013>, 2012.
- Lisetskii F., Stolba V.F., Marinina O.: Indicators of agricultural soil genesis under varying conditions of land use, *Steppe Crimea, Geoderma*, 239–240, 304–316, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.11.006>, 2015.
- Liu X., Zhang W., Zhang M., Ficklin D., Wang F.: Spatio-temporal variations of soil nutrients influenced by an altered land tenure system in China, *Geoderma*, 152, 23–34, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.05.022>, 2019.
- Ponge J., Peres G., Guernion M., Ruiz-Camacho N., Cortet J. et al.: The impact of agricultural practices on soil biota: A regional study, *Soil Biol. Biochem.*, 67, 271–284, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.026>, 2013.
- Sandor J.A. Homburg J.A.: Anthropogenic Soil Change in Ancient and Traditional Agricultural Fields in Arid to Semiarid Regions of the Americas, *J. Ethnobiol.*, 37, 196–217, <https://doi.org/10.2993/0278-0771-37.2.196>, 2017.
- Zhang Y., Zhao W., Fu L.: Soil macropore characteristics following conversion of native desert soils to irrigated croplands in a desert-oasis ecotone, Northwest China, *Soil Tillage Res.*, 168, 176–186, <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.01.004>, 2017.

### Poděkování

Práce vznikla s podporou projektu Ministerstva zemědělství České republiky NAZV ZEMĚ č. QK 1810233.

### Kontaktní adresa:

Ing. Vítězslav Vlček, Ph.D.  
Mendelova univerzita v Brně, AF, ÚAPMV  
Zemědělská 1, 613 00 Brno  
e-mail: [xvlcek1@mendelu.cz](mailto:xvlcek1@mendelu.cz)  
telefon: 545 133 063

## Testování atraktivity rozebíratelných hnízdišť pro samotářské včely rodu *Osmia*

Testing the attractiveness of demountable nesting sites for solitary bees of the genus *Osmia*

Votavová Alena

Zemědělský výzkum, s.r.o., Troubsko

### Abstrakt

Samotářské včely rodu zednice (*Osmia* sp.) se zejména v zahraničí hojně využívají pro opylování sadů. Jejich použití je poměrně nenáročné a spočívá zejména ve vytvoření vhodných míst k zahnízdění a dodání kokonů. Pro opakované použití jsou vhodná rozebíratelná hnízdiště, ze kterých lze kokony na podzim vyjmout a uskladnit v chladu. Zde jsme testovali 4 typy rozebíratelných hnízdišť ze tří typů materiálů (dřevo, plast, MDF). Hnízdiště z MDF desky se ukázalo jako vysoce atraktivní pro zednici rohatou a bylo obsazeno všech 100 dutin. Dřevěné hnízdiště od firmy Mauerbienenzucht bylo obsazeno jen slabě a ostatní hnízdiště nebyla obsazena vůbec.

**Klíčová slova:** zednice, hnízdiště, MDF deska

### Abstract

Solitary bees of the genus *Osmia* are widely used for pollination of orchards, especially abroad. Their use is relatively undemanding and mainly consists in creating suitable places for nesting and delivering cocoons. Demountable nesting boxes are suitable for repeated use: the cocoons can be removed in autumn and stored in the cold. Here we tested 4 types of demountable nesting boxes made of three types of materials (wood, plastic, MDF). The MDF board nest proved to be highly attractive to the horned mason bee and all 100 cavities were occupied. The wooden nest box from the company Mauerbienenzucht was occupied only weakly and the other nest boxes were not occupied at all.

**Keywords:** mason bee, nest, MDF board

### Úvod

Samotářské včely se podílí na opylování mnoha zemědělských plodin. V jarních měsících se jedná zejména o včely pískorypky (Andrenidae) a ploskočelky (Halictidae), které hnízdí v zemi a zednice (Megachilidae), které hnízdí nad zemí v horizontálních dutinách. Pro využití v sadech jsou nejvhodnější dva druhy, zednice rezavá (*Osmia bicornis*) a zednice rohatá (*Osmia cornuta*). Zednice rohatá hnízdí již od konce března, zatímco zednice rezavá až od druhé poloviny března. Z přezimovaných kokonů se vykousou dospělci, kteří se páří, a samice následně zakládají hnízda v dutinách o průměru 6-9 mm. Hnízdo sestává z jednotlivých plodových komůrek oddělených hliněnými přepážkami. Do každé komůrky samička nanosí pyl a na něj naklade vajíčko. Následně komůrku uzavře. V každé komůrce se tak vyvíjí jeden jedinec. Poslední komůrky zůstávají prázdné, jako ochrana před parazity. Celá dutina je uzavřena silnou hliněnou zátkou. O larvy se samička dále nestará a hyne během několika týdnů. Larvy se na počátku léta přemění na prepupy a na konci léta se zakuklí. Nejpozději v říjnu se líhnou dospělci, kteří však zůstávají uzavřeni v kokonu až do jara.

Zednice ochotně hnízdí v rákosových stéblech, hliněných stěnách, papírových a dřevěných dutinách. Nevýhodou těchto hnízdišť je nemožnost regulace parazitů v dokončených hnízdech. Vhodnější řešení je použít koncept rozebíratelných hnízdišť. Jedná se o sadu destiček se žlábků,

keré při přiložení k sobě vytvoří hnízdní dutinu. Tento koncept umožňuje vyjmout kokony z hnízd na konci sezóny a zazimovat mimo hnízda pro použití v dalším roce. Výhodou je regulace výskytu parazitů a prevence plísní (Šlachta et al., 2021). Tato hnízdiště lze zakoupit u nás i v zahraničí. Zde jsme testovali atraktivitu 4 typů hnízdišť. Tři byly zakoupeny v zahraničí a jedno bylo vyrobeno na zakázku.

### **Materiál a metody**

V roce 2021 jsme zakoupili 2 typy hnízdišť pro zednici rohatou u německé společnosti WAB-Mauerbienenzucht ([www.mauerbienen-shop.com](http://www.mauerbienen-shop.com)). Jedno dřevěné rozebíratelné, které tvořilo 54 dutin o délce 160 mm, s kruhovým průměrem 9 mm a jedno rozebíratelné z MDF desky (dřevovláknitá deska), které tvořilo 100 dutin o délce 160, s půlkruhovitým průměrem 9 mm. Dále byla na stanoviště umístěna rozebíratelná dřevěná hnízdiště vyrobená na zakázku, která poskytovala 152 dutin o délce 220 mm, s půlkruhovitým průměrem 9 mm.

Testovali jsme také umělohmotné hnízdiště pro zednici rohatou zakoupené u polské společnosti BioDar ([www.shop.biodar.com.pl](http://www.shop.biodar.com.pl)) se 400 čtvercovými dutinami o délce 14 cm a rozměrech 8 x 8 mm, které bylo zavěšeno na strom asi 4 m od prvního stanoviště.

Umělohmotné hnízdiště i hnízdiště z MDF desek bylo v zadní části uzavřeno výrobcem. Dřevěná hnízdiště od firmy Mauerbienenzucht a naše dřevěná hnízdiště vyrobená na zakázku byla vzadu uzavřena přilepením silného kartónu.

Stanoviště se nacházelo ve starém meruňkovém sadu v Brně - Starém Lískovci. Stanoviště bylo v předchozích 4 letech využíváno pro výzkum a chov zednice rohaté. Na jaře bylo na stanoviště umístěno 50 kokonů zednice rohaté a několik papírových dutin osídlených v předchozím roce (Obr. 1).

Osídlení bylo vyhodnoceno v srpnu.



Obr. 1. Umístění 3 typů rozebíratelných hnízdišť. Uprostřed hnízdiště z MDF desky a dřeva od firmy Mauerbienenzucht, nahoře a dole dřevěné hnízdiště vyrobené na zakázku.

## Výsledky

V dřevěném hnízdišti od společnosti Mauerbienenzucht bylo zavíčkováno 9 dutin, ale při rozebrání se ukázalo, že 3 zavíčkované dutiny byly prázdné a nebyl v nich nanesen ani pyl. Ve zbylých 6 dutinách se nacházelo 18 kokonů. Hnízdiště z MDF desek bylo obsazeno ze 100 %, ale mnoho buněk s pylem zplesnivělo. V srpnu se v něm nacházelo 403 kokonů.

Dřevěná hnízdiště vyrobená na zakázku nebyla obsazena vůbec.

Také umělohmotné hnízdiště zakoupené u společnosti BioDar zůstalo zcela prázdné.

Všechny kokony v hnízdištích patřily zednici rohaté.

## Diskuze

Zednice patří mezi hojné druhy a mezi nejčastější obyvatele hmyzích hotelů. Je známo, že pro úspěšné osídlení musí hnízdiště splňovat některé parametry (Hopfenmüller and Stanglerová, 2022). Při jejich nedodržení se snižuje jejich atraktivita. Hnízdní dutiny musí být vzadu uzavřeny, musí mít vhodný průměr, ve vstupní části musí být hladce seříznuty a také uvnitř musí být hladké, aby si včely neporanily křídla. Dále k sobě musí destičky těsně přiléhat. Horizontální umístění a orientace stanoviště hraje pak také důležitou roli. Všechny tyto parametry byly v našem experimentu dodrženy. Oba zahraniční výrobci hnízdišť jsou zároveň komerční producenti kokonů zednic, lze tedy předpokládat, že jejich výrobky jsou osvědčené v praxi a jsou pro zednice atraktivní. Naše na zakázku vyrobené hnízdiště bylo úspěšně používáno v předchozích letech.

Výsledky našeho pokusu naznačují, že i když jsou doporučené parametry dodrženy, může hrát materiál hnízdiště velkou roli pro zvýšení atraktivity. Ačkoliv nebyl experiment proveden v dostatečném počtu opakování, stoprocentní obsazení dutin z MDF desky oproti ostatním materiálům poskytuje působivý výsledek. Oproti dřevěným deskám má MDF deska hladší strukturu a připomíná spíše strukturu zednicemi oblíbených papírových dutin. Je možné, že právě tento parametr přispěl k vysoké atraktivitě hnízdiště. Zplesnivění velké části pylu v dutinách bylo velmi pravděpodobně způsobeno velmi deštivým jarem. Navíc byly z hnízdiště v průběhu hnízdění odebírány vzorky pylu v rámci paralelního výzkumu, což zřejmě vedlo k vniknutí vlhkosti do dutin. Při vhodném zacházení (důsledná ochrana před povětrnostními vlivy a neotevírání dutin během hnízdění) bude tento materiál zřejmě vhodný i pro opakované použití a mohl by tak sloužit jako zajímavá alternativa dřeva pro výrobu rozebíratelných hnízdišť do sadů.

## Závěr

V našem experimentu jsme testovali 4 typy hnízdišť pro samotářské včely rodu *Osmia* ze tří materiálů (plast, dřevo, MDF). Ačkoliv experiment nebyl proveden v průkazném počtu opakování, pilotní výsledky naznačují, že MDF deska by mohla být vysoce atraktivní materiál pro výrobu rozebíratelných hnízdišť pro podporu samotářských včel v sadech.

## Poděkování

Výsledku bylo dosaženo díky institucionální podpoře MZE-RO1722.

## **Literatura**

- Hopfenmüller, S., Stanglerová, E., 2022. Jak zachránit včely. Nakladatelství Kazda, s. r. o. 1. vydání. ISBN: 978-80-7670-069-7
- Šlachta, M., Erban, T., Votavová, A., Cudlín, O., Cudlín, P., Halešová, T., 2021. Metodika podpory populací samotářských včel v agroekosystémech. Certifikovaná metodika ISBN 978-80-88000-33-4

## **Kontakt:**

Mgr. Alena Votavová, Ph.D.  
Zemědělský výzkum, s.r.o.  
Zahradní 1, Troubsko  
547138809, votavova@vupt.cz



## Hodnocení obsahu dusíkatých látek a bílkovin v semenech vybraných odrůd olejného lnu a konopí setého

Evaluation of the content of proteins in the seeds of selected varieties of flax and hemp

Jarošová M.<sup>1</sup>, Bárta J.<sup>1</sup>, Bártová V.<sup>1</sup>, Lorenc F.<sup>1</sup>, Bjelková M.<sup>3</sup>, Kyselka J.<sup>2</sup>, Filip V.<sup>2</sup>, Stupková A.<sup>1</sup>, Smetana P.<sup>1</sup>, Kadlec J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

<sup>2</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

<sup>3</sup>Agritec Plant Research, s.r.o. Šumperk

### Abstrakt

Len setý olejný a konopí seté patří mezi hospodářské plodiny s významným uplatněním v různých oblastech průmyslu, včetně potravinářství a krmivářství. Pro účely výživy jsou využívána semena obou plodin, která se vyznačují vysokou nutriční hodnotou, především díky obsahu kvalitních bílkovin a tuků. V rámci této studie byly stanoveny, u třech vybraných odrůd obou plodin ve dvou ročnících, hodnoty pro vybrané parametry v podobě obsahu tuku v sušině (28,3-40,8 %) obsahu popelovin (3,1-5,5 %), vody (7,4-9,8 %), dusíkatých látek (20,7-29,0 %), bílkovin (6,9-13,0 %) a ostatních látek (27,6-34,3 %). Byla porovnána rovněž spektra bílkovin mezi sledovanými variantami. Na základě výsledků byly zjištěny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) u většiny sledovaných parametrů mezi plodinami i jednotlivými odrůdami, včetně vlivu ročníku. V rámci použitých metod separace a vizualizace bílkovin nebyly pozorovány významné kvalitativní rozdíly albuminových (<15 kDa) a globulinových (kyselé: 39-42 kDa, bazické: 16-20 kDa) bílkovinných spekter mezi plodinami a odrůdami. Tato práce potvrzuje, že hodnoty sledovaných parametrů a jejich rozdíly mohou být určeny plodinou, odrůdou, ale také ročníkem.

**Klíčová slova:** len setý, konopí seté, bílkoviny, dusíkaté látky

### Abstract

Flax and hemp are considered significantly applicable crops in various industries, including the food and feed industries. Seeds of both crops, which possess a high nutritional quality especially determined by the presence of quality proteins and fats, can be used in nutrition. Within this study were assessed the values for the three varieties of both crops and two years for the parameters such as fat content in dry matter (28.3-40.8%) ash content (3.1-5.5%), moisture (7.4-9.8%), crude protein content (20.7-29.0%), protein content (6.9-13.0%) and other compounds (27.6-34.3%). There were compared the protein spectra between the observed varieties. Based on the observed results, significant differences ( $p < 0.05$ ) within most observed parameters between the crops and varieties, including the effect of the year, were observed. Within the used method of the separation and visualization of proteins, significant qualitative differences of albumin (<15 kDa) and globulin (acidic: 39-42 kDa, basic: 16-20 kDa) protein spectra between the crops and varieties were not observed. This study confirmed that the values of the observed parameters can be determined by crop, variety, and year factor.

**Key words:** flaxseed, hemp, protein, crude protein

### Úvod

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) a konopí seté (*Cannabis sativa* L.) se řadí mezi tradiční zemědělské plodiny. Obě plodiny spojuje využití v několika výrobních oblastech: krmivářství, potravinářství, farmacie, v kosmetickém průmyslu i stavebnictví (Allaby et al., 2005; Farinová et al., 2020). Vedlejší

produkt po lisování oleje ve formě výlisků je v současnosti využíván jako krmivo pro hospodářská zvířata, zejména prasata, drůbež a ryby (Dozłowska et al., 2021).

Semena lnu patří mezi potraviny vyznačující se vysokou nutriční hodnotou s pozitivním vlivem na lidské zdraví. Tyto vlastnosti jsou ovlivněny jak celkovým chemickým složením lněného semene (Tab. 1), tak i výživovými hodnotami a biologickými aktivitami jednotlivých komponentů a dílčích látek. Z hlediska výživové hodnoty je přínosný zejména vysoký obsah nenasycených mastných kyselin ve lněném oleji (Bloedon & Szapary, 2004). Bílkoviny lněného semene vykazují vysokou hodnotu díky obsahu esenciálních aminokyselin. Limitující aminokyselinou je lysin (Kaur et al., 2017). Vlákna, jež je hojně zastoupena jak ve formě nerozpustné, a v menší míře rozpustné, rovněž dotváří vysokou nutriční hodnotu (Singh et al., 2011). Celkovou kvalitu doplňují také významné biologické aktivity látek obsažených ve lněném semenu, jež vykazují například alfa-linolenová mastná kyselina, lignany a další fenolové látky, ale také komponenty rozpustné vlákniny (Goyal et al., 2014). Zastoupení aminokyselin ve lněných bílkovinách a jejich nutriční hodnota jsou srovnatelné se sojovými bílkovinami (Kajla et al., 2015). Bylo zjištěno, že obsah aminokyselin lněných bílkovin, zůstává stabilní i v případě tepelné úpravy semen a odvozených produktů, například při zpracování extruzí (Giacomino et al., 2013). Hlavní bílkovinou frakci představuje globulin (linin), jehož zastoupení činí až 58 % obsahu celkových bílkovin, v menší míře (až 42 %) je pak obsažen albumin (conlinin) (Oomah & Mazza et al., 1993). Globuliny lněného semene patří do skupin 11-12S zásobních globulinů a jsou zastoupeny vysokomolekulárními bílkovinami o velikosti 252-298 kDa (Wu et al., 2019) jež se skládají z několika polypeptidů o velikosti 10-50 kDa (Nwachukwu & Aluko, 2018).

Semena konopí setého vykazují zajímavý nutriční profil, protože obsahují velké množství vlákniny, tuku a bílkovin. Z hlediska mastných kyselin obsahují významné množství linolové kyseliny, která tvoří více než polovinu celkových mastných kyselin a 16 %  $\alpha$ -linolenové kyseliny (Alonso-Esteban et al., 2020). V současné době je zvýšená konzumace konopných semen a odvozených potravinových produktů, zejména mezi vegany. Zatímco celá konopná semena mohou být konzumována jako potravina, primárně se používají jako surovina pro vývoj dalších produktů, jako je olej, mouka z konopných výlisků a protein. Konopný protein a konopná mouka z výlisků jsou vedlejší produkty získané při lisování oleje a lze je použít jako alternativu k sójovým přísadám (Zajac et al., 2019). Na trhu jsou běžně dostupná loupáná konopná semena, která jsou označována jako funkční potravina (Alonso-Esteban et al., 2020). Bílkoviny konopného semene se vyznačují vysokou kvalitou, díky zastoupení všech esenciálních aminokyselin v nutričně významném množství a díky struktuře proteinů, která je podobná proteinům v krevní plazmě, je dobře stravitelná a využitelná v lidském těle (Horská, 2007). Hlavními limitujícími aminokyselinami jsou lysin a tryptofan. Bílkoviny v konopném semeni jsou majoritně zastoupeny dvěma globulárními frakcemi. Jedná se o albuminovou proteinovou frakci a globulinovou frakci. Majoritní globulinová frakce je zastoupena proteinem edestinem (65-82 % celkových bílkovin). Albuminová frakce zaujímá 13-35 % celkových bílkovin a zbylou část z celkových bílkovin (5 %) tvoří  $\beta$ -konglycinin (Farinon et al., 2020; Pavlovič et al., 2019). Edestin je hexamer o velikosti 300 kDa složený ze šesti identických podjednotek, z nichž každá je tvořena kyselou a bazickou podjednotkou s molekulovou hmotností 33 a 20 kDa, které jsou vzájemně spojeny disulfidovou vazbou (Tang et al., 2006).

Cílem této práce bylo porovnání vybraných parametrů, zejména obsahu makronutrientů v podobě bílkovin a tuků, v semenech sledovaných plodin a jejich odrůd, včetně zjištění vlivu ročníku na tyto parametry. U uvedených variant byla rovněž identifikována a porovnána spektra bílkovin.

**Tab. 1:** Chemické složení semene lnu a konopí setého (upraveno podle Morris, 2007; Kajla et al., 2014; Alonso-Esteban, 2022; Callaway, 2004; Callaway & Pate, 2009)

Složka	Množství [g] na 100 g čerstvých semen lnu	Množství [g] na 100 g čerstvých semen konopí
	setého	setého
Vlhkost	6,5-7,7	6-6,5
Tuky	37-41	25-36
dusíkaté látky	20	21-28
Popeloviny	2,4-3,4	5-5,6
cukry	1,0	1,0
celková vláknina	28-29	27-36
z toho rozpustná vláknina	6-12	5,4-6
z toho nerozpustná vláknina	17-23	22,2

## Materiál a metody

Rostlinný materiál byl získán od společnosti AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk a byl vypěstován na pokusných pozemcích ve Vikýřovicích v letech 2019 a 2020. Jednalo se o vzorky semen tří odrůd lnu setého a tří odrůd konopí setého. Zkoumané odrůdy lnu byly: Agriol (žlutosemenná odrůda s nízkým obsahem  $\alpha$ -linolenové kyseliny), Libra (hnědosemenná odrůda s vysokým obsahem  $\alpha$ -linolenové kyseliny) a Raciol (žlutosemenná odrůda se středním obsahem  $\alpha$ -linolenové kyseliny). Odrůdy konopí setého byly následující: dvoudomá odrůda Finola a dvě jednodomé odrůdy Santhica 27 a USO 31. Semena všech odrůd byla namleta na nožovém mlýnu (Grindomix GM 200, Retsch, Německo) při výkonu 10 000 ot./min. po dobu 1 min.

**Obsah sušiny** byl stanoven gravimetricky vysušením 1 g v sušárně při 105°C po dobu 3 hodin. **Obsah tuku** byl stanoven pomocí přístroje XT10 (Ankom, USA) za použití rozpouštědla petroletheru, podle manuálu uvedeného výrobcem. **Obsah popelovin** byl stanoven vázkově vyžiháním vzorku v muflové peci při teplotě 550°C po dobu 6 hod.

Pro zjištění **obsahu dusíkatých látek** byla využita modifikovaná Dumasova metoda pomocí analyzátoru dusíku Rapid N Cube (Elementar, Německo), přičemž koeficient pro výpočet dusíkatých látek měl standardně používanou hodnotu 6,25. Před stanovením **obsahu bílkovin** byla provedena na ledu 4hodinová extrakce bílkovin ze vzorku (50 mg/1 ml pufru) pomocí pufru složeného z: 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS. Následovala centrifugace při 4°C, 10 000x g po dobu 10 minut a poté byl odebrán supernatant. Obsah bílkovin byl stanoven spektrofotometricky metodou BCA za použití kitu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Metoda využívá kyseliny bicinchoninové (BCA), reakce je založena na alkalické redukci měďnatého iontu na měďný pomocí proteinu a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku purpurového zbarvení. **Obsah ostatních látek** byl stanoven dopočtem do 100 % (Zbývající % podíl po odečtení obsahu vody, tuku, dusíkatých látek a popelovin).

Extrakce bílkovin pro elektroforézu **SDS-PAGE** probíhala následujícím postupem: 50 mg vzorku bylo extrahováno v 1 ml extrakčního pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS + 5% 2-merkaptioethanolu) na ledu po dobu 4 hod. Po centrifugaci při 4°C, 10 000x g po dobu 10 minut byl odebrán supernatant a smíchan v poměru 4:1 s nanášecím pufrem obsahujícím 2-merkaptioethanol, povařen (3 min). Připravené vzorky byly nanášeny na gel o objemu 10  $\mu$ l a separovány systémem diskontinuální deskové denaturační elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SE 600, Hoefer, USA) - 4% zaostřovací gel (pH 6,8) a 11% separační gel (pH 8,8) - v prostředí Trisglycinového pufru (Laemmli, 1970). Po separaci byl gel obarven

roztokem barviva Coomassie Blue. Po odbarvení byly gely digitalizovány pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA). Pro určení molekulové hmotnosti byl použit hmotnostní standard s rozpětím 10 – 310 kDa Tricolor xtra (Roth, Německo). Uvedené analýzy byly prováděny vždy ve třech opakování. Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu STATISTICA CZ, verze 12 (StatSoft, Inc.). Sledované parametry byly mezi lnem a konopím porovnány pomocí nepárového dvouvýběrového t-testu. Hodnoty jednotlivých parametrů mezi odrůdami lnu a konopí byly porovnány pomocí Fisherova LSD testu. Všechna statistická hodnocení byla prováděna na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## Výsledky a diskuze

Základní složení semen vybraných odrůd je uvedeno v tabulce 2. Na základě statistického hodnocení jsou zřejmé statisticky významné rozdíly u sledovaných parametrů (obsah tuku v sušině, popelovin, vody a ostatních látek) mezi lnem a konopím ( $p < 0,05$ ). Zatímco obsah tuků převažoval v obou letech u lnu, obsah popelovin byl naopak v průměru o 1 % vyšší v případě konopí. Z odrůd lnu dosahovala nejvyššího obsahu tuku v obou sledovaných letech hnědosemenná odrůda Libra. U odrůd konopí se obsah tuku pohyboval v obou letech od 28,29 do 31,33 % v sušině. Z obsahu vody překročily hranici 9 % odrůdy lnu Raciol a Agriol. Důvodem byla bohatost ročníku na srážky, docházelo k poléháním porostu a následně obtížné sklizni. Obsah ostatních látek, který zahrnuje zejména sacharidický podíl (nerozpustná a rozpustná vlákna), který odpovídá údajům z literatury uvedených v tab. 1.

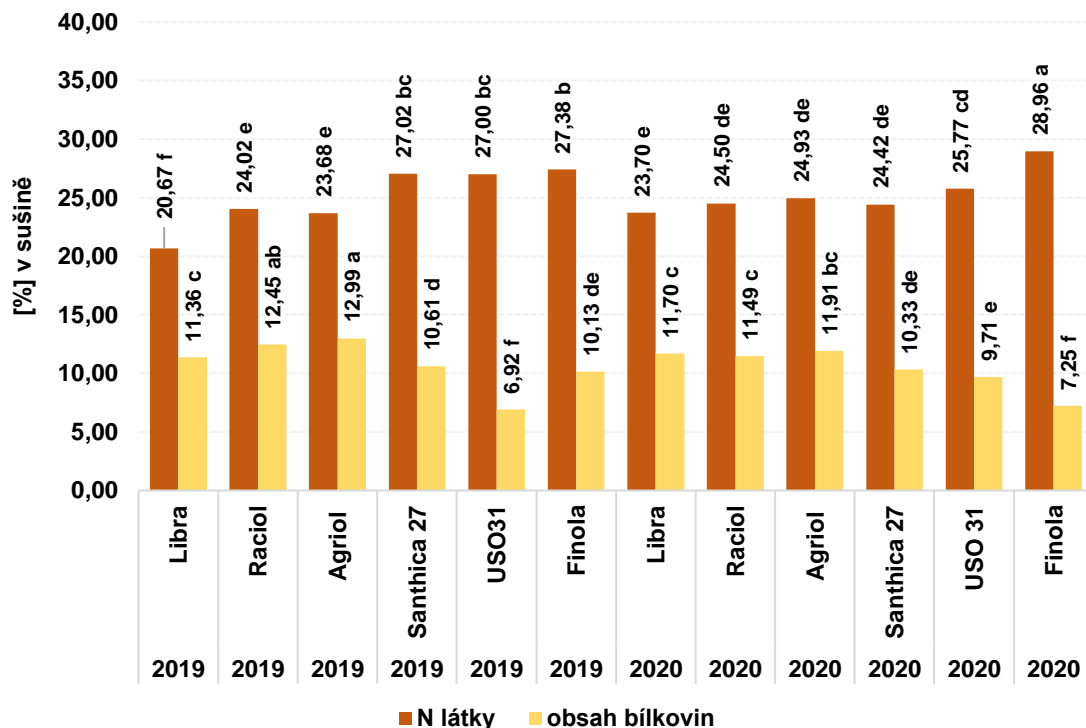
**Tab. 2:** Základní vybrané parametry stanovené u odrůd lnu a konopí setého

rok	druh	odrůda	Obsah tuku [%]	Popeloviny [%]	Obsah vody [%]	Obsah ostatních látek [%]
2019	Len	Libra	40,82 a	3,60 h	7,36 a	27,55 e
	Len	Raciol	35,12 b	3,30 i	8,03 c	29,52 fg
	Len	Agriol	35,44 b	3,07 j	8,04 c	29,77 fg
	Konopí	Santhica 27	28,63 ef	4,71 b	8,17 cd	31,46 bcd
	Konopí	USO31	29,47 de	4,03 e	8,38 d	31,12 bcd
	Konopí	Finola	31,33 c	4,27 d	7,75 b	29,26 efg
2020	Len	Libra	35,19 b	3,85 g	8,89 e	28,37 eg
	Len	Raciol	30,25 d	3,99 ef	9,54 f	31,72 bc
	Len	Agriol	31,49 c	3,92 fg	9,76 f	29,90 cd
	Konopí	Santhica 27	28,29 f	4,59 c	8,38 d	34,32 a
	Konopí	USO 31	29,87 d	4,25 d	8,16 cd	31,95 b
	Konopí	Finola	28,90 ef	5,48 a	7,70 b	28,97 eg

Kromě obsahu vody jsou hodnoty uvedené v % sušiny. Rozdílná písmena u hodnot ve sloupcích indikují statisticky významný rozdíl (Fisher LSD test,  $p < 0,05$ ).

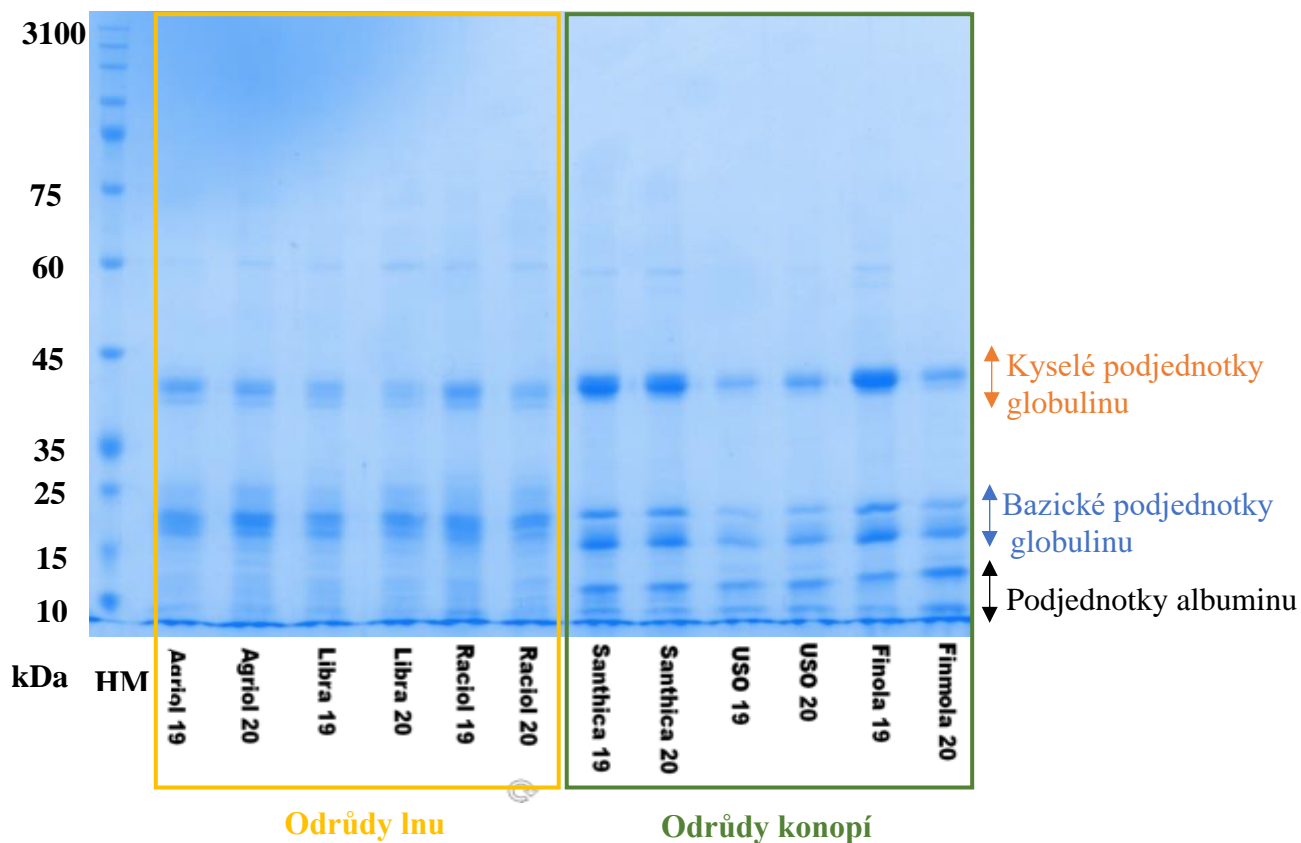
Bílkoviny obsažené v semenech lnu a konopí byly kvantifikovány metodou BCA proteinového testu (spektrofotometricky) a modifikovanou Dumasovo metodou (spalování vzorkové hmoty), která stanovuje veškerý plynný N, který je přepočítán koeficientem 6,25 na protein. Jelikož Dumasova metoda zahrnuje veškeré dusíkaté látky (NL) oproti metodě BCA stanovující čisté bílkoviny extrahované pufrem, byl obsah dusíkatých látek vyšší (obr. 1). Maurotti a kol. (2021)

ve své práci uvádí obsah bílkovin v konopném semeni 14,11 % stanovený metodou BCA, což je ve srovnání s výsledky v obr. 1 vyšší obsah. Námi stanovené hodnoty bílkovin v konopném semeni se pohybují od 6,92 do 10,61 %. Rozdíl lze vysvětlit použitým extrakčním pufrem, který se standardně používá, ale nevyextrahuje zřejmě veškeré bílkoviny. Obsah dusíkatých látek v semenech konopí setého odpovídá literárním údajům (viz tab. 1), přičemž u lněných semen jsou hodnoty u vybraných odrůd vyšší o 3-5 % oproti literatuře (Callaway, 2004).



**Obr. 1:** Obsah dusíkatých látek a extrahovaných bílkovin u odrůd lnu a konopí setého. Rozdílná písmena u hodnot ve sloupcích indikují statisticky významný rozdíl (Fisher LSD test,  $p < 0,05$ ).

Z obr. 2 lze pozorovat, že bílkovinné spektrum se mezi odrůdami neliší. Jsou však patrné rozdíly v intenzitě bílkovinných podjednotek ovlivněné rokem sklizně u odrůd lnu a konopí. Nejvýraznější rozdíl v intenzitě pruhů je u globulinové frakce u odrůdy konopí Finola a u odrůdu lnu Raciol. Významné zóny výskytu bílkovin se vyskytují v oblasti kolem 39–41 kDa (kyselé podjednotky) a 17–20 kDa (bazické podjednotky), které dle odborné literatury odpovídají podjednotkám lininu (globulin) (Ayad, 2010). Konopné bílkoviny jsou nejvíce zastoupeny globuliny v oblasti 40–42 kDa (kyselé podjednotky) a 16–20 kDa (bazické podjednotky). Pruhy v oblasti s nižší MW (pod 15 kDa) představují podjednotky albumin (Malomo & Aluko, 2015).



**Obr. 2:** Bílkovinné profily odrůd lnu a konopí setého  
 HM – hmotnostní marker, 19 – rok pěstování 2019, 20 – rok pěstování 2020

Semena lnu a konopí jsou nejen zdrojem polynenasycených mastných kyselin (linolové a  $\alpha$ -linolenové kyseliny), které jsou v rámci lidské výživy přijímány v nedostatečném množství. Bílkoviny lnu i konopí se vyznačují vysokou kvalitou, díky zastoupení esenciálních aminokyselin v nutričně významném množství (Kaur et al., 2017; Wang et al., 2008). Bílkoviny konopí kromě toho neobsahují inhibitory trypsinu, které se nachází například v sóje a považují se za antinutriční faktor (Tan-Wilson & Wilson, 1986). Lněné semeno obsahuje antinutriční látky, mezi které patří inhibitory proteas, kyanogenní glykosidy, dipeptid linatin a kadmium. Nicméně u uvedených látek, nebylo dosud v rámci klinických studií prokázáno antinutriční působení vedoucí k omezení dostupnosti či vstřebávání esenciálních živin, případně zdravotních komplikací souvisejících s konzumací lněných semen (Shim et al., 2014; Dzuvor et al., 2018).

### Závěr

Ve sledovaných parametrech zahrnujících obsah tuku v sušině, obsah popelovin, vody, dusíkatých látek, bílkovin a ostatních látek byly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi lnem a konopím, stejně tak i ve většině případů mezi jednotlivými odrůdami lnu i konopí. V případě lnu byl v roce 2019 i 2020 pozorován výrazně vyšší obsah tuků (přibližně 5 %) a mírně vyšší obsah popelovin u odrůdy Libra oproti odrůdám Raciol a Agriol. Výrazný rozsah (téměř 5 %) byl také zaznamenán v obsahu ostatních látek u odrůd konopí v roce 2020. Vliv ročníku s možným vlivem hnojení se projevil v obsahu extrahovaných bílkovin v konopném semeni, zejména u odrůd USO 31 a Finola. Vizualizace proteinových spekter pomocí SDS-PAGE naznačila možnou vyšší intenzitu výskytu frakce kyselé podjednotky globulinu u konopné odrůdy Santhica (2019 a 2020) a Finola (2019). Na základě uvedených výsledků bylo možné pozorovat rozdíly ve všech parametrech nejen mezi sledovanými plodinami, ale i odrůdami. Ve

vybraných parametrech byl rovněž zjištěn také vliv ročníku. Nicméně, rozdíly v obsahu extrahovaných bílkovin nedosahují v reálném měřítku vysokých hodnot. Z hlediska obsahu a následného příjmu bílkovin lnu a konopí nemusí být tedy prvořadým kritériem výběr odrůdy. Naopak, výběr odrůdy může být klíčový v souvislosti s variabilitou obsahu mastných kyselin v závislosti na odrůdě a ročníku.

### Dedikace

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného projektu MZe NAZV QK1910302.

### Použitá literatura

- Allaby, R. G., Peterson, G. W., Merriwether, D. A., & Fu, Y.-B. (2005). Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(1), 58-65.
- Alonso-Esteban, J. I., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., Torija-Isasa, E., Sánchez-Mata, M. C., & Guil-Guerrero, J. L. (2020). Hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties: fatty acid profiles and upgrading of  $\gamma$ -linolenic acid-containing hemp seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122.
- Alonso-Esteban, J. I., Pinela, J., Ćirić, A., Calhella, R.C., Soković, M., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Torija-Isasa, E., Sánchez-Mata, M.d.C. (2022). Chemical composition and biological activities of whole and dehulled hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Food Chemistry*. 374, ISSN 0308-8146
- Ayad A. A. (2010): Characterization and properties of flaxseed protein fractions. Ph.D. thesis, McGill University, Montreal, 151.
- Bloedon, L. T., & Szapary, P. O. (2004). Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Nutrition Reviews*, 62(1), 18-27.
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 140, 65-72. ISSN 14-2336.
- Callaway, J.C., Pate, D.W. (2009.) Hempseed Oil. *Gourmet Health Spec. Oils*, 185–213.
- Droźłowska, E., Bartkowiak, A., Trocer, P., Kostek, M., Tarnowiecka-Kuca, A., Łopusiewicz, Ł. (2021). Formulation and Evaluation of Spray-Dried Reconstituted Flaxseed Oil-in-Water Emulsions Based on Flaxseed Oil Cake Extract as Emulsifying and Stabilizing Agent. *Foods*. 256 (10).
- Dzuvor, C. K. O., Taylor, J. T., Acquah, C., Pan, S., & Agyei, D. (2018). Bioprocessing of Functional Ingredients from Flaxseed. *Molecules*, 23(10), 2444.
- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., Merendino, N. (2020). The Seed of Industrial Hemp(*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients*, 12(7), ISSN 2072-6643.
- Giacomino, S., Peñas, E., Ferreyra, V., Pellegrino, N., Fourninier, M., Apro, N., Carrión, M.O., Frias, J. (2013) Extruded Flaxseed Meal Enhances the Nutritional Quality of Cereal-based Products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 131–136.
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., & Sihag, M. (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1633-1653.
- Horská, I. (2007). Agent for substitution of blood plasma and a method of its production. United States. Patent US20070196526A1.
- Kajla, P., Sharma, A., & Sood, D. R. (2015). Flaxseed a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1857-1871.
- Kaur, M., Kaur, R., & Gill, B. S. (2017). Mineral and amino acid contents of different flaxseed cultivars in relation to its selected functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 500-511.



- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Malomo, S.A., Aluko, R.E. (2015). Srovnávací studie strukturních a funkčních vlastností frakcí albuminu a globulinu izolovaného konopného semene (*Cannabis sativa* L.). *Food Hydrocolloids*, 43, 743 – 752.
- Maurotti, S., Mare, R., Pujia, R., Ferro, Y., Mazza, E.; Romeo, S., Pujia, A., Montalcini, T. (2021). Hemp Seeds in Post-Arthroplasty Rehabilitation: A Pilot Clinical Study and an In Vitro Investigation. *Nutrients* 2021, 13, 4330.
- Morris, D. H. (2007). *Flax: A Health and Nutrition Primer*. Flax Council of Canada.
- Nwachukwu, I. D., Aluko, R. E. (2018). Physicochemical and emulsification properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*) albumin and globulin fractions. *Food Chemistry*, 255, 216-225.
- Oomah, B. D., Mazza, G. (1993). Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry*, 48(2), 109-114.
- Pavlovič, R., Panseri, S., Giupponi, L., Leoni, V., Citti, C., Cattaneo, C., Cavaletto, M., Giorgi, A. (2019). Fytochemická a ekologická analýza dvou odrůd konopí (*Canabis sativa* L.) pěstovaných v horském prostředí italských Alp. *Přední. Plant Sci.*, 10, 1265.
- Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 38(1), 5-20.
- Singh, K. K., Mridula, D., Rehal, J., & Barnwal, P. (2011). Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 210-222.
- Tan-Wilson, A. L., & Wilson, K. A. (1986). Relevance of Multiple Soybean Trypsin Inhibitor Forms to Nutritional Quality. In M. Friedman (Ed.), *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods* (pp. 391-411). Boston, MA: Springer US.
- Tang, C.-H., Ten, Z., Wang, X.-S., Yang, X.-Q. (2006). Fyzikálně-chemické a funkční vlastnosti proteinového izolátu konopí (*Canabis sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8945-8950.
- Wang, X.-S.; Tang, C.-H.; Yang, X.-Q.; Gao, W.-R. (2008). Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*, 107, 11-18,
- Wu, S., Wang, X., Qi, W., Guo, Q. (2019). Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 184-193.
- Zajac, M., Guzik, P., Kulawik, P., Tkaczewska, J., Florkiewicz, A., Migdał, W. (2019) The quality of pork loaves with the addition of hemp seeds, de-hulled hemp seeds, hemp protein and hemp flour. *LWT-Food Science and Technology*, 105, pp. 190-199.

**Kontaktní adresa:**

Ing. Markéta Jarošová  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zemědělská a technologická – katedra rostlinné výroby  
Na Sádkách 1780  
370 05 České Budějovice  
email: jarosovam@fzt.jcu.cz



## Kvalita vybraných hybridů kukuřic

### Quality of selected maize hybrids

Loučka R.<sup>1</sup>, Jančík F.<sup>1</sup>, Koukolová V.<sup>1</sup>, Kubelková P.<sup>1</sup>, Tyrolová Y.<sup>1</sup>, Výborná A.<sup>1</sup>, Jambor V.<sup>2</sup>, Synková H.<sup>2</sup>, Malá S.<sup>2</sup>, Nedělník J.<sup>3</sup>, Lang J.<sup>3</sup>, Homolka P.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves; <sup>2</sup>NutriVet s.r.o. Pohořelice; <sup>3</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko; <sup>4</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze

#### Abstrakt

Cílem práce bylo porovnat rozdíly ve stanovení živin přenosným spektrometrem AgriNIR a chemicky u 4 hybridů kukuřice, pěstovaných ve dvou lokalitách v letech 2018 až 2021. Nutriční hodnoty stanovené spektrometrem byly, ve srovnání s chemickou analýzou, nižší u obsahu sušiny (36,0 vs. 37,1 %), NDF (39,7 vs. 44,8 % v sušině) a N-látek (6,52 vs. 7,95 % v sušině) a vyšší u obsahu škrobu (35,6 vs. 29,4 % v sušině). U těchto parametrů je nutné AgriNIR spektrometr podle získaných hodnot kalibrovat a ve výzkumu pokračovat. Statisticky významné rozdíly mezi lokalitami byly v obsahu NDF, N-látek a popelovin. Rozdíly mezi hybridy nebyly žádné, a naopak mezi jednotlivými roky byly rozdíly u všech stanovovaných živin.

**Klíčová slova:** spektrometr AgriNIR; chemické analýzy; kalibrace; lokality; rok pěstování

#### Abstract

The aim of this work was to compare the differences in the determination of nutrients by portable near-infrared reflectance (NIR) spectrometer and chemically in 4 maize hybrids grown in two localities in 2018 to 2021. The nutritional values determined by the spectrometer were, compared to the chemical analysis, lower for the content of dry matter (36.0 vs. 37.1%), NDF (39.7 vs. 44.8% in dry matter) and N-substances (6.52 vs. 7.95% in dry matter) and higher in starch content (35.6 vs. 29.4% in dry matter). For these parameters, it is necessary to calibrate the AgriNIR spectrometer according to the obtained values and continue the research. There were statistically significant differences between sites in the content of NDF, N-substances and ash. There were no differences between the hybrids, and on the contrary, there were differences between the individual years for all determined nutrients.

**Keywords:** AgriNIR spectrometer; chemical analyses; calibration; locations; year of cultivation

#### Úvod

V poslední době se již i v praxi stále častěji používají přenosné spektrometry, které měří hodnoty u čerstvých rostlin, resp. v původní sušině. Výsledky výzkumu v této oblasti prezentuje např. Evangelista et al. (2021). Podle autorů je ve stájích použití NIR prostřednictvím vhodných kalibrací rychlou a přesnou analytickou technikou s vysokým potenciálním přínosem. To potvrzuje i studie Monteiro et al. (2021), která se zabývá celým přehledem použití metod precizního farmaření (PLF).

Sílicí tlak na vyšší produkci a zároveň i vyšší nutriční hodnotu kukuřice seté (*Zea mays* L.) nutí pěstitele každoročně vypěstovat, sklídit, konzervovat a uskladnit potřebné množství kukuřice. Hodně záleží na tom, jaký hybrid je použit. Barrière et al. (2003) a Gruber et al. (2018), zdůrazňují, jak je důležitá strategie šlechtění hybridů. Při doporučení hybridu pro danou oblast a cíl pěstování je nutné si dobře určit priority. Není třeba zdůrazňovat, že závěry je možné dělat

až po několika letech pěstování hybridů, protože na výše uvedené ukazatele má významný vliv především vývoj počasí ve vegetačním období. Významný vliv počasí ve vybraných letech na výnos a výživnou hodnotu kukuřice byl zaznamenán v mnoha studiích (Taube et. al., 2020). Cílem studie bylo porovnat rozdíly ve stanovení živin spektrometrem NIR a chemicky

## Materiál a metody

Pokus proběhl ve dvou lokalitách (Praha a Troubsko) a trval 4 roky (2018 až 2021). Byly testovány 4 hybridy DKC (DEKALB), odstupňované podle čísla FAO, od 240 do 270 (číslo FAO vyjadřuje ranost). Všechny 4 testované hybridy patří do skupiny raných hybridů a mají typ zrna semiflint. Agrotechnika byla v obou lokalitách po všechny 4 roky téměř stejná. Hybridy byly v každé lokalitě sklizeny ve stejný den. Vzorky (4 od každého hybridu) byly následně odeslány do laboratoře NutriVet s.r.o. do Pohořelic. V laboratoři nejprve 3x změřili základní obsahy sušiny a živin (škrobu, NDF, hrubého proteinu a popelovin) s použitím přenosného AgriNIR spektrometru (Dinamica Generale® product). Následně byly obsahy živin stanoveny chemicky (CHEM) podle metod Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005).

Pro hodnocení výsledků byl použit program Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), vícefaktorové analýzy ANOVA.

## Výsledky

Hlavní výsledek, tedy rozdíl mezi stanovením AgriNIR a chemickou analýzou je v tabulce 1. Nutriční hodnoty stanovené spektrometrem byly, ve srovnání s chemickou analýzou, nižší u obsahu sušiny (36,0 vs. 37,1 %), NDF (39,7 vs. 44,8 % v sušině) a N-látek (6,52 vs. 7,95 % v sušině) a vyšší u obsahu škrobu (35,6 vs. 29,4 % v sušině).

Tab. 1: Obsah sušiny a živin mezi stanovením AgriNIR a chemickou analýzou

	AgriNIR	CHEM	SEM	P-value
Sušina %	36,0	37,1	0,35	0,027
sm. odch.	3,48	4,23		
Škrob % s.	35,6	29,4	0,35	<0,001
sm. odch.	2,90	4,75		
NDF % s.	39,7	44,8	0,31	<0,001
sm. odch.	2,71	4,22		
N-látky % s.	6,52	7,97	0,07	<0,001
sm. odch.	0,74	0,80		
Popeloviny % s.	3,78	3,81	0,05	0,565
sm. odch.	0,56	0,50		

Vedlejšími výsledky jsou rozdíly mezi lokalitami (Tab. 2), jednotlivými hybridy (Tab. 3) a jednotlivými roky pěstování vybraných hybridů kukuřice (Tab. 4). Statisticky významné rozdíly mezi lokalitami (Praha vs. Troubsko) byly v obsahu NDF (41,8 vs. 42,7 % sušiny), N-látek (7,35 vs. 7,15 % sušiny) a popelovin (3,55 vs. 4,04 % sušiny). Rozdíly mezi hybridy nebyly žádné, a naopak mezi jednotlivými roky byly rozdíly u obsahu sušiny i všech stanovených živin. Nejvyšší obsah sušiny a škrobu byl v roce 2019, nejvyšší obsah NDF a N-látek byl v roce 2018.

Tab. 2: Obsah sušiny a živin v lokalitách Praha a Troubsko

	Praha	Troubsko	SEM	P-value
Sušina %	36,1	36,9	0,34	0,093
sm. odch.	2,43	4,94		
Škrob % s.	32,1	32,9	0,34	0,084
sm. odch.	3,95	5,89		
NDF % s.	41,8	42,7	0,31	0,043
sm. odch.	4,07	4,60		
N-látky % s.	7,35	7,14	0,07	0,031
sm. odch.	1,00	1,09		
Popeloviny % s.	3,55	4,04	0,04	<0,001
sm. odch.	0,53	0,40		

Tab. 3: Obsah sušiny a živin u jednotlivých hybridů

	DKC 3450	DKC 3568	DKC 3575	DKC 3872	SEM	P-value
Sušina %	36,4	36,9	36,3	36,5	0,49	0,829
sm. odch.	4,20	4,49	3,21	3,66		
Škrob % s.	31,9	32,0	33,0	33,2	0,49	0,146
sm. odch.	5,36	5,42	4,38	4,82		
NDF % s.	42,7	42,6	41,7	42,1	0,44	0,324
sm. odch.	4,47	4,04	4,45	4,47		
N-látky % s.	7,34	7,19	7,30	7,14	0,10	0,402
sm. odch.	1,05	1,06	1,06	1,06		
Popeloviny % s.	3,70	3,85	3,81	3,82	0,07	0,366
sm. odch.	0,51	0,57	0,49	0,54		

Tab. 4: Obsah sušiny a živin v jednotlivých letech pokusu

	2018	2019	2020	2021	SEM	P-value
Sušina %	35,7	39,7	34,0	36,7	0,41	<0,001
sm. odch.	2,65	5,37	1,94	2,17		
Škrob % s.	29,1	33,9	33,8	33,4	0,38	<0,001
sm. odch.	6,65	3,02	3,58	4,45		
NDF % s.	45,4	41,7	40,5	41,5	0,32	<0,001
sm. odch.	5,06	3,81	3,97	2,61		
N-látky % s.	7,51	7,12	7,42	6,93	0,08	<0,001
sm. odch.	1,24	1,44	0,65	0,48		
Popeloviny % s.	3,91	3,72	3,99	3,57	0,06	<0,001
sm. odch.	0,44	0,42	0,49	0,65		

## Diskuze

Podle chemického složení, resp. vybraných ukazatelů výživné hodnoty kukuřičných hybridů v pokuse nebyly mezi vybranými hybridy statisticky významné rozdíly. Významné rozdíly však byly zjištěny jak mezi metodami stanovení (NIR vs. chemické analýzy), tak mezi jednotlivými roky pěstování hybridů. Spektrometr AgriNIR je třeba co nejdříve kalibrovat tak, aby se hodnoty jím naměřené přiblížily hodnotám analyzovaným chemicky v laboratoři. Dokud se nepodaří sladit výsledky NIR s výsledky chemických analýz, tak podle hodnot, zjištěných

spektrometrem AgriNIR, se zatím nedoporučuje vypočítávat výživnou hodnotu pro účely sestavení směsné krmné dávky (TMR), ani dělat odhad produkce mléka na hektar nebo na tunu sušiny. Výsledky z přístrojů AgriNIR jsou však vhodné použít pro hodnocení variability mezi hybridy, variability výživných látek a k praktickým úpravám TMR, vypočítaným podle skutečných chemických analýz, pokud se využije korelace, která se pro jednotlivé živiny pohybuje mezi 0,32 až 0,74.

Analýza rostlin kukuřice bezprostředně při sklizni je nezbytná pro kontrolu složení a zralosti rostliny pro optimalizaci kvality siláže. U kukuřice použili Marchesini et al (2018) 2 verze přenosného (on-situ) poliSPECNIR spektrometru a laboratorní přístroj NIR (FOSS NIRSystems 5000 scanning monochromator, FOSS, Silver Spring, MD) k porovnání s chemickou analýzou. S ohledem na velkou rozmanitost mezi přístroji a silnou nehomogenitou řezanky kukuřice, získaný kalibrační přenos byl uspokojivý pro většinu parametrů, s výjimkou škrobu a celkových cukrů. To se shoduje s našimi výsledky: nutriční hodnoty stanovené spektrometrem AgriNIR byly také vyšší u obsahu škrobu (cukry u kukuřice nebyly stanoveny). Do pokusu byly hybridy vybrány na základě konzultace s osiváři, kteří hybridy firmy DEKALB prodávají, a tudíž mají zkušenosti s jejich uplatněním. Podle firemních prospektů DEKALB hybrid s nejnižším FAO (DKC3872) měl v pokusech z roku 2016 obsah škrobu v sušině 37,1 % a stravitelnost NDF 56,4 %, zatímco hybrid s nejvyšším číslem FAO (DKC3575) měl ve stejných pokusech obsah škrobu v sušině 35,7 % a stravitelnost NDF 55,4 %. Rozdíly mezi nimi byly v těchto ukazatelích tedy minimální. Srovnatelné byly hybridy i z pohledu jejich doporučené sklizňové sušiny (35,5 %) a dosahovaného výnosu sušiny celých rostlin (23,7 t/ha). Námi dosažené výsledky odpovídají výsledkům, deklarovaným firemními prospekty DEKALB. Rozdíly mezi hybridy nejsou ve sledovaných ukazatelích, ale v jejich vlastnostech. Výběr hybridu kukuřice představuje praktický nástroj ovlivňující výnos a kvalitu píce. Hakl et al. (2017) vyhodnotili 63 genotypů kukuřice v 11 lokalitách po dobu 7 let podle výnosu sušiny, obsahu sušiny, škrobu a NDF a NDFD. Při standardizované rostlinné DM byly všechny testované faktory významné a umožňovaly interpretaci 70 a 60% z celkového počtu kolísání výnosu a kvality celých rostlin. Průměrné příspěvky genotypu, lokality a roku bylo 30, 7, respektive 5%.

Největší rozdíly v obsahu sušiny a živin byly mezi jednotlivými roky pokusu. Podle portálu info.chmi.cz v roce 2018 spadlo ve vegetačním období málo srážek, rok 2019 byl průměrný a v roce 2020 přšelo nejvíc za deset let. Ve vegetačním období let 2018 a 2019 přšelo méně, než je průměr let 1981 až 2010. V roce 2020 naopak napršelo, kromě července, více než ve sledovaných letech 2018 a 2019, i než je průměr let 1981 a 2010. Obdobné to bylo u teplot, rok 2018 byl nejteplejší, rok 2020 nejchladnější. Kromě měsíce května v letech 2019 a 2020 byly ve všech měsících vegetačního období všech let teploty nad normativním průměrem let 1981 až 2010. V teplejším a zároveň i sušším roce 2020 byly proti roku 2018 (s vyšším množstvím srážek) vyšší hodnoty v obsahu škrobu.

Interakce mezi čtyřmi hybridy (DKC 3450, DKC 3568, DKC 3575 a DKC 3872), roky testace (2018 až 2021) a dvěma metodami stanovení sušiny a živin (NIR vs. chemie) ukazují na to, že nejvyšší vliv na rozdíly měly metody stanovení a rok testace, naopak minimální vliv měla varianta použitého hybridu a částečně i lokalita.

Z výše uvedeného, zejména z výsledků NIR a chemických analýz, vyplývá, že spektrometr AgriNIR je nutné co nejdříve kalibrovat. Cílem je ještě více se přiblížit k hodnotám, zjištěných chemickou analýzou.

## Závěr

Mezi mnoha technologiemi tzv. precizního chovu hospodářských zvířat je nepochybně jedním z nejslibnějších využití spektrometrů AgriNIR na řízení krmení dojnic. Recenzovaná literatura ukázala, že použití NIRS prostřednictvím vhodných kalibrací je rychlá a přesná analytická technika. Problematika použití NIR v zemědělství je nejen velmi aktuální a diskutované téma, ale rychle se přístroje NIR využívají v zemědělské praxi na farmách, ačkoliv přesnost takového stanovení živin ještě zdaleka nedosahuje přesnosti chemickou analýzou živinových hodnot. To dokazují i výsledky této studie. Originalita tohoto příspěvku je především v hodnocení vlivu obou rozdílných metod. Z rozdílů mezi výsledky ze spektrometru AgriNIR a chemických analýz, vyplývá, že spektrometr AgriNIR je nutné co nejdříve kalibrovat. Kvalita vybraných hybridů kukuřic byla v pokuse, který trval 4 roky, srovnatelná. Významné rozdíly v sušině i v obsahu živin byly mezi jednotlivými roky.

## Literatura

- AOAC. Official methods of analysis. 18th Ed. Gaithersburg. USA: Association of Official Analytical Chemists. AOAC International. 2005.
- Barrière Y, Guillet C, Goffner D, Pichon M. Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. *Animal Research*, 2003 May-June;52:193-228.
- Evangelista C, Basiricò L, Bernabucci U. An Overview on the Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) on Farms for the Management of Dairy Cows. *Agriculture* 2021 March 30;11:296.
- Gruber L, Terler G, Knaus W. Nutrient composition, ruminal degradability and whole tract digestibility of whole crop maize silage from nine current varieties. *Arch. Anim. Nutr.* 2018 Feb 20;72:121-137.
- Hakl J., Loučka R., Jirmanová J, Jambor V. Influence of Genotype, Site, and Year on Maize Nutritive Value - Yield Relationships. *Scientia Agric. Bohemica*, 2017;48:47–53.
- Marchesini, G; Serva, L; Garbin, E; Mirisola, M.; Andrighetto, I. Near-infrared calibration transfer for undried whole maize plant between laboratory and on-site spectrometers. *Ital. J. Anim. Sci.* 2018, 7, 17, 66-72.
- Monteiro A, Santos S, Gonçalves P. Precision Agriculture for Crop and Livestock Farming—Brief Review. *Animals*. 2021 Aug 9;11:2345.
- Taube F, Vogeler I, Kluß C, Herrmann A, Hasler M, Rath J, Loges R, Malish CS. Yield Progress in Forage Maize in NW Europe-Breeding Progress or Climate Change Effects? *Frontiers in Plant Sci.* 2020 Aug 18;11:1214.

## Dedikace

Příspěvek vzniknul díky podpory projektu NAZV QK1810137.

## Kontakt

Ing. Radko Loučka, CSc.  
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.  
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves  
Telefon 731650836, e-mail: loucka.radko@vuzv.cz



## Možnosti stanovení sekundárních metabolitů

### Options for the determination of secondary metabolites

<sup>1</sup>Pluháčková Helena, <sup>1</sup>Sedlaříková Eva, <sup>2</sup>Kudláčková Barbora, <sup>1</sup>Bradáčová Marta

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Ústavu analytické chemie akademie věd České republiky

#### Abstrakt

Rostlinné sekundární metabolity mají velké uplatnění v oblasti lidského zdraví a výživy. Při stanovení sekundárních metabolitů v kmínu kořeném se sleduje především množství silice v něm obsažené a procentuální zastoupení karvonu a limonenu. Stanovení silic bylo provedeno dvěma různými metodami. Blízkou infračervenou spektrofotometrií a referenční metodou destilací vodní parou s následnou analýzou složení silic pomocí plynové chromatografie. Z dosažených výsledků vyplývá, že mezi metodami stanovené obsahu silic nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Obsah silic kmínu byl v rozmezí od 7,26 do 34,22 ml/kg. Práce upozorňuje na možnost využití rychlé nedestruktivní metody kvalitativních parametrů pomocí FT-NIR spektroskopie v oblasti potravinářství.

**Klíčová slova:** silice, kmín kořený, destilace vodní parou, FT-NIR

#### Abstract

Plant secondary metabolites have great applications in human health and nutrition. In the determination of secondary metabolites in cumin root, the amount of essential oil contained in it and the percentage of carvone and limonene are mainly monitored. The determination of essential oils was carried out by two different methods. Near-infrared spectrophotometry and a reference method by steam distillation followed by analysis of essential oil composition by gas chromatography. The results obtained show that no statistically significant differences were found between the methods for determining the essential oil content. The essential oil content of cumin ranged from 7.26 to 34.22 ml/kg. The work highlights the possibility of using a rapid non-destructive method of quality parameters by FT-NIR spectroscopy in the food industry.

**Keywords:** essential oil, caraway, steam distillation, FT-NIR

#### Úvod

Celé lidstvo je závislé na rostlinách jako zdroji sacharidů, bílkovin, vitamínů a potravy. Rostliny jsou studovány pro své důležité složky a nutriční faktory již více než desetiletí. Rozmanitá skupina organických sloučenin, které rostliny produkují za účelem usnadnění interakce s biotickým prostředím a vytvoření obranného mechanismu, se nazývá rostlinné sekundární metabolity [1-3]. Produkce těchto metabolitů je velmi nízká (méně než 1 % sušiny) a značně závisí na fyziologickém a vývojovém stadiu rostliny [4,5]. Rostlinné přírodní produkty byly po celou historii lidstva důležitou součástí medicíny. V posledních letech se používání rostlinných léčiv neustále zvyšuje po celém světě [6]. S touto rostoucí poptávkou rostou i obavy o bezpečnost a účinnost rostlinných léčiv. Ačkoli se zdá, že potenciál léčivých rostlin je téměř neomezený, existuje několik zásadních překážek [7]. Na rozdíl od standardizovaných farmaceutických léčivých přípravků s jednou látkou se rostlinná léčiva skládají z komplexních směsí s více sloučeninami odpovědnými za terapeutickou aktivitu, což ztěžuje standardizaci [8]. Problém dále komplikuje skutečnost, že rostliny jsou na rozdíl od syntetických léčiv živé organismy s přirozenou biologickou variabilitou [9]. To, že rostlinný materiál pochází ze

stejného druhu, nemusí nutně znamenat, že chemický obsah bude identický. Tato nedostatečná reprodukovatelnost může být způsobena dvěma hlavními faktory, genetickou variabilitou a rozdíly v podmínkách pěstování.

Kromě toho jsou rostliny cenným zdrojem široké škály sekundárních metabolitů, které se používají jako léčiva, agrochemikálie, koření, aromata, barviva a biopesticidy. Rozvíjející se komerční význam sekundárních metabolitů vedl v posledních letech k většímu zájmu o sekundární metabolismus, zejména o možnost změny produkce bioaktivních rostlinných metabolitů [10]. Sekundární metabolity se dělí na dusíkaté sloučeniny (alkaloidy, neproteinové aminokyseliny, aminy, alkaloidy, kyanogenní glykosidy a glukosinoláty) a nedusíkaté sloučeniny (monoterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny, seskviterpeny, saponiny, flavonoidy, steroidy a kumariny).

Sekundárními metabolity v rostlinách kmínu kořeného jsou tzv. esenciální oleje neboli silice. Silice jsou přítomny v celé rostlině kmínu a dodávají kmínu jeho typické aroma. Jejich největší koncentrace je v jeho nažkách. Ze silic kmínu kořeného tvoří 95 % složky karvon a limonen, zbylých 5 % tvoří cca 30 různých látek, které jsou obsaženy ve stopovém množství. Díky vysokému podílu limonenu a karvonu se kvalita kmínu hodnotí jejich poměrem. Obsah silic je podmíněn geneticky a dalšími jinými faktory, které ovlivňují obsah silic jako jsou například povětrnostní podmínky, území, kde je kmín pěstován a podmínky pěstování. Celkový obsah silic roste se zvyšující zralostí rostliny a klesá s delší dobou skladování. Odrůdy, které jsou pěstované v ČR se od ostatních odrůd liší poměrem karvonu ku limonenu a celkovým obsahem silic [11].

## **Materiál a metody**

V této práci byly sledovány vzorky kmínu kořeného české a finské proveniencí. Obsah silic byl stanoven pomocí blízké infračervené spektroskopie a destilace vodní parou.

### **FT-NIR spektrometrie**

Spektra vzorků byla naměřena na přístroji Nicolet Magna FT-NIR spectrometer 550, firmy Thermo Fisher Scientific Inc., USA s detektorem InGaAs, dělič paprsků (beamsplitter) CaF<sub>2</sub>. Spektrální data byla sbírána v rozmezí 11 500–4000 cm<sup>-1</sup> při rozlišení 8 cm<sup>-1</sup>, počtu skenů 64 in reflectance mode (v režimu odrazu). Každý vzorek byl měřen třikrát v rotační kyvetě na integrační sféře (integration sphere) přístroje pomocí programu Omnic 8.

### **Destilace vodní parou**

Při stanovení obsahu silic v kmínu kořeném se postupovalo dle Českého lékopisu 2017 [12]. Těsně před destilací byly vzorky kmínu kořeného namlety. Dále bylo naváženo 30 gramů vzorku kmínu a kvantitativně pomocí nálevky převeden do destilační baňky. Ke vzorku bylo přidáno 200 ml destilované vody. Od dosažení bodu varu byl vzorek destilován po dobu 90 minut.

### **Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie byla prováděna na chromatografu Trace GC s plamenově ionizačním detektorem (GC – FID). Separace vzorku silice kmínu kořeného byla provedena na koloně DB – 5MS o rozměrech 30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm.



Dosažené výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu STATISTICA 12. Byla využita metoda dvoufaktorové analýzy variance a následného testování pomocí LSD Fisherova testu při hladině významnosti  $p=0,05$ .

## Výsledky

V této práci byly sledovány vzorky kmínu kořenného ze dvou odlišných proveniencí. Byly sledovány tři různé vzorky kmínu z Česka, pod označením CR1, CR2 a CR3 a tři různé vzorky z Finska pod označením F1, F2 a F3.

Z dosažených výsledků analýzy variance pro obsah silic v náhodných vzorcích kmínu kořenného z Finska a Česka vyplývá, že v metodách stanovení pomocí metody FT-NIR spektrometrie a referenční metodě destilace vodní parou nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Oproti tomu rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly rozdíly statisticky velmi vysoce průkazné. Obsahu složek silice kmínu kořenného karvon a limonen byl zjištěn statisticky velmi vysoce průkazný rozdíl mezi použitými metodami stanovení, ale nebyly zjištěny průkazné rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Vzájemná interakce obou sledovaných faktorů nebyla statisticky průkazná jak u obsahu silic, tak u složek silice.

Tab.1 Průměrný obsah silic kmínu kořenného a složek silice karvon a limonen ze dvou odlišných proveniencí (Finsko a Česká republika)

Metoda stanovení	Vzorek	Obsah silic (ml/kg)	Karvon (%)	Limonen (%)
FT-NIR	F1	29,38 cd	59,97 e	40,03 a
	F2	33,08 d	58,68 cde	41,32 abc
	F3	30,33 cd	58,88 de	41,12 ab
	CR1	7,26 a	60,54 e	39,46 a
	CR2	14,40 ab	57,03 bcde	42,97 abcd
	CR3	22,13 bc	60,05 e	39,96 a
Destilace vodní parou	F1	34,22 d	53,53 ab	46,47 de
	F2	30,59 cd	55,58 abcd	44,42 bcde
	F3	32,62 d	54,65 abc	45,36 cde
	CR1	7,75 a	55,28 abcd	44,73 bcde
	CR2	15,35 ab	52,00 a	48,00 e
	CR3	21,62 bc	55,25 abcd	44,76 bcde

Pozn.: Průměrné hodnoty označené odlišnými písmeny ve sloupcích se od sebe statisticky významně liší při  $p=0,05$

Průměrný obsah silic sledovaných ve vzorcích kmínu kořenného z proveniencí Finsko a Česká republika znázorňuje tab. 1. Statisticky byl zjištěn průkazně nejvyšší obsah silic ve vzorcích z Finska, konkrétně u vzorku F1 stanovené destilací vodní parou (34,22 ml/kg), tyto vzorky se však průkazně nelišily od vzorků F2 a F3 stanovené destilací vodní parou, ale také F1, F2 a F3 stanovené FT-NIR spektrometrií. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že vzorky z Finska měly v průměru statisticky průkazně vyšší obsah silic než vzorky z České republiky. Obecně je známo, že ve Finsku se pěstují z velké části odrůdy dvouleté kmínu kořenného, zatímco z České republiky jsou dvouleté odrůdy, ale i odrůdy se zkrácenou vegetační dobou, které vykazují nižší obsah silic.

Průměrné hodnoty celkového obsahu silic v kmínu kořenném byly zjištěny 14,75 ml/kg v kmínu z České republiky ze stanovení FT-NIR spektrometrie i destilace vodní parou, 31,70 ml/kg silice ve vzorcích z Finska ze stanovení FT-NIR spektrometrie i destilace vodní parou. Průměrné výsledky FT-NIR spektrometru byly 22,76 ml/kg a pomocí destilací vodní parou byl

průměrný obsah silic 23,69 ml/kg. Samotné stanovení obsahu silic různými metodami se statisticky průkazně neliší, zatímco obsah silic mezi vzorky z Finska a České republiky prokazují výrazný rozdíl.

Z hlediska podílu složek silice karvon a limonen, které jsou zobrazeny také v tab. 1, byl statisticky průkazně nejvyšší obsah karvonu zjištěn ve vzorcích CR1 stanovené FT-NIR spektroskopií (60,54 %). Oproti tomu byl nejnižší obsah karvonu zjištěn ve vzorcích CR2 stanoveném FT-NIR spektroskopií (52,00 %), proto byl v těchto vzorcích zjištěn statisticky průkazně nejvyšší obsah limonenu (48,00 %).

Průměrné hodnoty karvonu ze stanovení kmínu kořeného FT-NIR spektroskopií byly 59,19 %, a průměrné hodnoty destilace vodní parou s následným stanovením na plynové chromatografii byly 54,18 %. Průměrné hodnoty karvonu v českých vzorcích z obou stanovení byly 56,69 % a průměrný obsah ve finských vzorcích z obou stanovení byly 56,88 %. Průměrně byl nejvyšší obsah karvonu stanoven v českých vzorcích stanovený FT-NIR spektroskopií a nejnižší stanovený obsah byl ve vzorcích českých stanovený destilací vodní parou s následným stanovením na plynové chromatografii.

## Diskuze

Český lékopis z roku 2017 definuje kmínový plod jako celou usušenou nažku druhu *Carum carvi L.*, která obsahuje minimálně 30ml/kg silice a kmínovou silici definuje jako silici získanou ze suchých plodů *Carum carvi L.* Destilací vodní parou, jejíž vlastnosti jsou, že je to čirá bezbarvá nebo žlutá kapalina. Do normy lékopisu, která stanovuje 30ml/kg silice, by bylo možné považovat pouze vzorky F1, F2 a F3 stanovené destilací vodní parou.

V přehledu odrůd kmínu kořeného 2022 je zmíněn procentuální zastoupení silic, karvonu a limonenu v jednotlivých odrůdách. Podíl karvonu se pohybuje v rozmezí od 47,7 % do 59,9 %. Nejmenší podíl karvonu má odrůda jarní Lesix a nejvyšší procento má odrůda dvouletá Prochan [13]. Ve srovnání s výsledky experimentální části se všechny hodnoty pohybují v rozmezí českých odrůd.

V článku *The Essential Oil Content in Caraway Species* z roku 2003 bylo prováděno stanovení obsahu silic v různých druzích kmínu [14]. Jako metoda extrakce silice kmínu byla použita parní destilace a jako alternativní metoda byla použita superkritická fluidní extrakce. Vyextrahovaná silice byla analyzována na plynové chromatografii, pro určení složek karvonu a limonenu. Procentuální obsah karvonu se pohyboval v rozmezí od 26,34 do 83,21 %. V porovnání s výsledky, které byly získány v této bakalářské práci by všechny vzorky vyhovovaly.

Venskutonis ve svém článku *Characterization of caraway (Carum carvi L.) cultivated in Lithuania (1999)* uvádí, že obsah karvonu se pohyboval v rozmezí 45,7 – 59,7 % a obsah limonenu v rozmezí 38,2 – 52,3 % [15]. Ve srovnání s výsledky získanými v této bakalářské práci můžeme říct, že ne všechny vzorky odpovídají výše uvedenému rozmezí obsahu karvonu a limonenu. Vzorky F1, CR1 a CR2 stanovené FT-NIR spektrometrií mají vyšší procento karvonu než výsledky ve článku.

Článek *Essential Oil Composition of Cymbopogon winterianus and Carum carvi and Their Antimicrobial Activities* uvádí, že silice získané z kmínu kořeného mají silnější protiplísňové a antimikrobiální účinky než silice získané z citronely [16]. Tyto silice se mohou využívat proti půdním patogenům, proti mykotoxinům a proti houbám, které kazí potraviny. Silice citronely, latinsky *Cymbopogon winterianus*, obsahují jako dominantní složky citronellal a geraniol, mezi vedlejší složky patří například limonen, který je obsažen ve větším množství i v kmínu kořeném. V kmínu kořeném jsou dvě dominantní složky silice, a to karvon a limonen. Tyto dvě složky jsou obsaženy, v kmínové silici v 46,62 % karvonu a 45,49 % limonenu. V této práci

byly zjištěn obsah karvonu v rozmezí od 52,00 % do 60,54 % a limonenu v rozmezí od 39,46 % do 48 %.

## Závěr

Dosažené výsledky stanovení silic ve vzorcích kmínu kořenného v této práci byly hodnoceny dvěma způsoby. Prvním posuzovaným faktorem bylo porovnání metod stanovení silic v kmínu kořenném. Výsledek porovnání metod stanovení obsahu silic je významný a je zřejmé, že kalibrační model vytvořený pro FT – NIR je srovnatelný s referenční metodou a nebyly mezi nimi zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Výhodou FT-NIR spektrometrie je její rychlost a nedestruktivnost materiálu. Metoda destilace vodní parou s následnou analýzou silice plynovou chromatografií je spolehlivější, avšak je tato metoda destruktivní a časově náročnější.

Druhou posuzovanou hodnotou byl vliv oblasti pěstování na obsah silic a obsah složek silic ve vzorcích kmínu kořenného. Vzorky kmínu kořenného z různých proveniencí Česko a Finsko, vykazovaly statisticky průkazně vyšší obsah silic vzorky z Finska stejně tak procentuální podíl složky silice karvon byl vyšší ve vzorcích z Finska. Bylo by zajímavé, kdybychom byli schopni určit, zda byly Finské vzorky dvouletého charakteru a České vzorky byly pravděpodobně se zkrácenou vegetační dobou, protože na Moravě, odkud vzorky pocházely je častější setí odrůd kmínu se zkrácenou vegetační dobou (APRIM, LESIX).

## Poděkování

Príspevek byl podpořen z projektu QK21010083 „Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům“.

## Literatura

- Wink M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;75:225–233.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*. 2002;1:13–25.
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2014;118:1–16.
- Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 2001;411:843–847.
- Oksman–Caldenteyl KM, Inze D. Plant cell factories in the post–genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 2004;9:9.
- Mosihuzzaman M. Herbal medicine in healthcare—an overview. *Natural Product Communications*. 2012;7:807–812.
- Cordell GA. Biodiversity and drug discovery—a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 2000;55:463–480.
- Schmidt BM, Ribnicky DM, Lipsky PE, Raskin I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nature Chemical Biology*. 2007;3:360–366.
- Shaw D, Graeme L, Pierre D, Elizabeth W, Kelvin C. Pharmacovigilance of herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;140:513–518.
- Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 2004;45:1–22.

- Fojtová, J et al. 2003: Determination of Essential Oil Content in Caraway Species (*Carum carvi* L.) by Means of Supercritical Fluid Extraction. *Plant, soil and environment. Plant, Soil and Environment*. 49(6), 277-282. ISSN 1214-1178.
- ČESKÝ LÉKOPIS 2017: *Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph.B. MMXVII)*. 2017. 4. díl., Evropská část. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0500-7.
- Věštník kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, 2021: Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15.06 2021. [online] Ročník XX [cit. 2022.02.20] Dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/696683/Olejninny\\_2022.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/696683/Olejninny_2022.pdf)
- Kocourková, B et al. 2003: The essential oil content in caraway species (*Carum Carvi* L.). *Horticultural Science*. 30(2), 73-79. ISSN 1805-9333. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/3818-HORTSCI>
- Venskutonis, R., D. Kvietkauskienė, E. Bylaite a A. Siuliauskas., 1999: Characterization of caraway (*Carum carvi* L.) cultivated in Lithuania [1999] [online]. [cit. 07.04.2022]. ISSN 0208-2519 Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=LT2000000009>
- SIMIC, A et al. 2008: Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their anti-microbial activities. *Pharmaceutical Biology*. 46(6), 437-441. ISSN 1388-0209. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/13880200802055917>

### **Kontakt**

Ing. Helena Pluháčková, Ph.D.  
Mendelova univerzita v Brně  
Zemědělská 1665/1, Brno 61300  
+420777576166, [helena.pluhackova@mendelu.cz](mailto:helena.pluhackova@mendelu.cz)

## Stanovení obsahu glukosinolátů v zelené hmotě hořčic

Determination of the content of glucosinolates in the green mass of mustard

Rychlá A.<sup>1</sup>, Endlová L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.; <sup>2</sup>OSEVA PRO s.r.o., VÚO Opava

### Abstrakt

Cílem práce bylo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovit obsah glukosinolátů v čerstvé nadzemní biomase vybraných genotypů hořčice bílé, sareptské a černé. Realizované analýzy slouží k výběru potenciaálně vhodných genotypů s vysokým biofumigačním účinkem a pro stanovení kvalitativních parametrů produkce nadzemní biomasy. Data byla zpracována a vyhodnocena pro potřeby tvorby core kolekcí vybraných materiálů, využitelných ve šlechtitelském procesu.

**Klíčová slova:** Kapalinová chromatografie, nadzemní biomasa, biofumigace, šlechtění

### Abstract

The aim of the work was to determine the content of glucosinolates in the fresh above-ground biomass of selected genotypes of white, sarepta and black mustard using high-performance liquid chromatography. The performed analyzes serve to select potentially suitable genotypes with a high biofumigation effect and to determine the qualitative parameters of aboveground biomass production. The data was processed and evaluated for the needs of creating core collections of selected materials that can be used in the breeding process.

**Keywords:** Liquid chromatography, aboveground biomass, biofumigation, breeding

### Úvod

Moderní zemědělská praxe v současnosti kloubí požadavky na kvalitní a vysoký výnos produkce s aktuálními nároky na šetrné a udržitelné hospodaření v zemědělské krajině. Hledají se efektivní a bezpečná řešení, jak dosáhnout obou těchto cílů současně. Do většího popředí zájmu se dostává problematika produkce a využití meziplovin, jakožto zdroje biomasy k zlepšení biologického stavu půdy. Meziploviny představují důležitou součást střídání plodin a ekologie, mají pozitivní vliv na úrodnost půdy, eliminaci eroze a omezení ztráty živin (Joelsson, Kyllmar, 2002). Skupina hořčic, reprezentovaná v našem případě genovými zdroji druhů *Sinapis alba*, *Brassica juncea* a *Brassica nigra*, je charakteristická vysokým obsahem glukosinolátů (GSL) v celém těle rostlin, včetně semen. Jejich obsah umožňuje výrobu stolních hořčic, pomletím semen, jejich smícháním s vodou, octem a dochucovadly (Prugar, 2008). Glukosinoláty jsou rostlinné sekundární metabolity vyskytující se především v dvouděložných brukvovitých rostlinách, jejich primárním úkolem je odpuzovat býložravé škůdce (Griffiths, 2001). Do skupiny glukosinolátů spadá velká řada látek, které se liší ve struktuře i fyziologické funkci. Z našeho pohledu je zajímavá skupina glukosinolátů, z nichž hydrolýzou vznikají bioaktivní isothiokyanáty. Ty jsou známy jak pozitivními (antimikrobiální, antibakteriální, fungicidní), tak negativními účinky (vazba jodu) (Zukalová, 2003). Jsou také zkoumány jako možní chemopreventivní zástupci pro konkrétní druhy lidské rakoviny, jelikož brání rozvoji nádorů (Zhang, 1994). Těkavé izothiokyanáty vzniklé štěpením allyl a butenyl glukosinolátů z posklizňových zbytků řepky nabízí významný potenciál pro očištění – biofumigaci půdy bez použití syntetických pesticidů pro likvidaci škodlivých organismů, hlavně chorob (Vašák a kol., 2000). Přesný termín „biofumigace“ původně vytvořil J.A. Kirkegaard, aby popsal proces

růstu a zapravování vybraných brukvovitých nebo příbuzných druhů do půdy, což vede k uvolnění isothiokyanátové sloučeniny hydrolýzou glukosinolátových sloučenin obsažených v rostlinných tkáních (Kirkegaard et al., 1993). Glukosinoláty jsou v rostlinných tělech prostorově odděleny od enzymu myrosinázy, teprve při porušení pletiv dojde ke spuštění štěpné reakce a vzniku isothiokyanátů s vysokou biocidní aktivitou (Manici, 1997). Z výše uvedeného je patrný požadavek na mechanické zpracování rostlin (řezání, válení) před vlastním zapravením do půdy.

V ČR je v zemědělské praxi nejčastěji využívána hořčice bílá (*Sinapis alba*), jako nejběžnější brukvovitá meziplodina. Je charakteristická rychlým vývojem a vysokými přírůstky nadzemní biomasy, vysokou plasticitou, především k termínu setí. Některé genotypy jsou charakterizovány jako nematocidní, eliminují zamoření půdy háďátkem řepným (Zehnálek, 2022). Odrůdy hořčice bílé dělíme na semenné – hlavní produkci je semeno pro potravinářské účely, a pícní – k produkci biomasy (zelené hnojení, píče, vymrzající mulč). Hořčice sareptská (*Brassica juncea*) je u nás pěstována jen ve velmi omezené míře a to k produkci semen. Ta se používají v potravinářském průmyslu pro výrobu speciálních druhů hořčic (např. krémžská). Plodina je v posledních letech více testována z pohledu možného využití, jako zdroje nadzemní biomasy. Hořčice sareptská má také rychlý růst, celkové množství vyprodukované biomasy úzce souvisí s konkrétním genotypem. Existují materiály, které bychom mohli charakterizovat jako pícní, tedy vhodné k produkci nadzemní biomasy, srovnatelné s výnosy u hořčice bílé. Hořčice černá (*Brassica nigra*) se v praxi v ČR nepěstuje. Je to minoritní plodina, pocházející z jižních oblastí Evropy a Asie. Rostliny jsou mohutné a velmi silně větví. Hořčice černá dobře snáší sucho, a proto může být vhodnou alternativou pro sušší oblasti. Ač má pomalejší start vývoje, je schopna vyprodukovat dostatečné množství nadzemní biomasy. Zraje nejdříve ze všech uvedených druhů a má silné sklony k vypadávaní semen. Z důvodu eliminace rizika zaplevelení pozemku jejími semeny je nutné ukončit vegetaci včas. Při použití pozdějších termínů setí vzrůstá nebezpečí poškození mladých rostlin dřepčíky.

Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity je zaměřen na uchování nejvyšších genotypů vybraných zemědělských druhů. V kolekcích jsou uloženy materiály domácího původu, zahraniční odrůdy, cenný šlechtitelský materiál a položky ze sběrových expedic. Je snahou kurátorů kolekcí, zařazovat materiály s dostatečnou genetickou vzdáleností, tedy materiály morfologicky jedinečné a mezi položkami dostatečně odlišné. Díky tomu je možné sestavovat core kolekce plodin na základě specifických požadavků řešitelů. Kromě realizace základního polního hodnocení (morfologie, fenologické charakteristiky, výnosové parametry), jsou položky popisovány i z pohledu kvalitativních parametrů produkce. Jen dobře zhodnocená položka může být efektivně využita pro potřeby šlechtění, což je hlavním úkolem Národního programu.

V rámci hodnocení kvalitativních parametrů produkce genových zdrojů z Národního programu se používá běžně metoda spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou instrumentací (FT-NIRS). Je to metoda rychlá, v případě semen nedestruktivní, časově a finančně nenáročná. Její využití je ale závislé na vytvoření přesných kalibračních modelů, které rutinnímu stanovení předcházejí. Je potřebné přesnými metodami změřit dostatečné množství vzorků a z naměřených hodnot sestavit odpovídající křivky. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je vhodnou metodou pro přesné stanovení obsahu jednotlivých zájmových druhů glukosinolátů v rostlinných pletivech. Pletiva jsou při analýze destruována, je proto potřeba realizovat analýzy bezodkladně po odběru vzorků. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metodou založenou na separaci zájmových látek pomocí kapalné mobilní fáze (Štulík, 1990).

## Materiál a metody

S ohledem na cíl práce bylo vytipováno z kolekcí Národního programu celkem 80 položek hořčic s odlišnými parametry produkce nadzemní biomasy, lišícími se v morfologických znacích, s odlišnými fenologickými charakteristikami. V letech 2021 - 2022 byly s těmito materiály založeny maloparcelní pokusy. Položky byly vysety do parcel 1,25 x 3 m, v jednom opakování (29.3.2021; 23.3.2022). Pokusy byly standardně ošetřovány herbicidy a insekticidy, fungicidní ošetření nebylo použito. V rámci jednotlivých druhů bylo na základě popisných charakteristik položek do core kolekcí vybráno celkem 40 genotypů hořčice bílé, 20 genotypů hořčice sareptské a 20 genotypů hořčice černé. Odběr vzorků listů byl realizován ve fázi BBCH 19 (6 a více listů vyvinuto) a to 8.-10.6.2021; 24.-26.5.2022. Z každé parcely bylo odebráno 5 zdravých, nepoškozených listů, každý z jiné rostliny a byl vytvořen směsný vzorek. Vzorky byly odebírány časně ráno a ihned transportovány do laboratoře k vlastní analýze. V následující tabulce je uveden seznam analyzovaných materiálů.

Tab.1 Seznam analyzovaných materiálů podle ECN (Evidenční číslo národní) a názvu položky

ECN hořčice bílá	název	ECN hořčice sareptská	název	ECN hořčice černá	název
15005	Warta	15007	Sarepta Spota	1500600001	Alsaska
1500500099	Severka	1500700002	Bulharska	1500600004	Hneda
1500500119	Polka	1500700005	Domo	1500600006	Primus
1500500120	ABA	1500700029	Vittasso	1500600007	Rumunska
1500500121	King	1500700064	Mike Giant	1500600008	Sizaja
1500500122	Amog	1500700074	Ao Ooba	1500600022	Junius
1500500123	Chacha	1500700093	Opaleska	1500600023	RCAT 040343
1500500124	Ultra	1500700096	Oportuna	1500600030	Lu De No 2
1500500125	Admiral	1500700097	Raketa	1500600031	Dirk
1500500126	Andromeda	1500700098	AC Vulcan	1500600032	BGRC 34253
1500500127	Veto	15007	Brons	1500600002	Balkan
1500500128	Condor	15007	Energy	1500600009	BRSCHW 22531
1500500129	Atlet	15007	Goldfix	1500600010	BRSCHW 22533
1500500130	Thorney	15007	Goldperf	1500600011	BRSCHW 22537
1500500131	Viscount	15007	Minaret	1500600012	BRSCHW 22530
1500500132	Agent	15007	Terminator	1500600013	BRSCHW 22538
1500500133	Maxi	15007	Terrafit	1500600014	BRSCHW 22539
1500500134	Mega	15007	Terraplus	1500600016	N 26A95
1500500135	Swing	15007	Terratop	1500600017	N 13A95
1500500136	Protect	15007	Zanagawa s.	1500600018	N 28A94
15005	AC Pennant				
15005	Achilles				
15005	Architect				
15005	Bonus				
15005	Classic				
15005	Cratos				

ECN hořčice bílá	název
15005	Flenal
15005	Iris
15005	Ludique
15005	Merigue
15005	Octopus
15005	Olga
15005	Otava
15005	Rumba
15005	Sabon
15005	Sigma
15005	Torpedo
15005	Ultimo
15005	Venice
15005	Vitaro

Vzorky zelené hmoty byly analyzovány bezprostředně po odběru. Před samotnou analýzou byly nůžkami nastříhány plochy bez žilnatiny. Pracovní postup stanovení obsahu glukosinolátů v zelené hmotě metodou HPLC zahrnuje úpravu vzorků zelené hmoty, extrakci glukosinolátů 70 % methanolem na termostatické lázni při 80 °C a jejich enzymatickou desulfataci na iontoměničích. K enzymatické desulfaci byl použit 0,2% roztok sulfatázy typ H-1. Separace glukosinolátů byla provedena na koloně s reverzní fází za použití gradientové eluce a detekce v UV oblasti. Ke kvantitativnímu stanovení glukosinolátů v zelené hmotě byla použita metoda vnitřního standardu (vnitřním standardem byl monohydrát sinigrinu v koncentraci 40 mmol/l). Vzorky byly připraveny duplicitně s vnitřním standardem a bez přítomnosti vnitřního standardu. Pro identifikaci ostatních glukosinolátů v zelené hmotě hořčic byl použit jako standard glucotropaeolinu a sinalbinu.

## Výsledky

V jednotlivých vzorcích zelené hmoty byl stanoven celkový obsah glukosinolátů a obsah nejvýznamnějších druhů glukosinolátů. Stanovené obsahy jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.



**Tab.2: Obsahy nejvýznamnějších glukosinolátů v zelené hmotě testovaných genotypů v roce 2021**

Zelená hmota	Obsah glukosinolátů [μmol/g vz. při vlhkosti 9 %] v roce 2021			
	Sinigrin	Sinalbin	Glucotropaeolin	Celkový obsah GSL
Hořčice bílá	-	6,65 - 42,92	2,65 - 11,28	14,28 - 47,41
Hořčice sareptská	16,76 - 118,41	-	-	16,76 - 118,92
Hořčice černá	1,90 - 108,81	-	-	1,97 - 108,81

**Tab.3: Obsahy nejvýznamnějších glukosinolátů v zelené hmotě testovaných genotypů v roce 2022**

Zelená hmota	Obsah glukosinolátů [μmol/g vz. při vlhkosti 9 %] v roce 2022			
	Sinigrin	Sinalbin	Glucotropaeolin	Celkový obsah GSL
Hořčice bílá	-	17,71, - 65,11	1,54 - 17,91	23,78 - 72,09
Hořčice sareptská	11,81 - 73,93	-	-	11,81 - 73,93
Hořčice černá	7,99 - 36,75	-	-	7,99 - 36,75

Následující tabulka (Tab.4) uvádí průměrné celkové obsahy glukosinolátů v testovaných letech 2021-2022. V tabulce 5 jsou uvedeny naměřené minimální a maximální obsahy glukosinolátů ve vzorcích v obou pokusných letech.

**Tab.4 Průměrný obsah celkových glukosinolátů v testovaných vzorcích za oba pokusné ročníky**

Zelená hmota	Průměr celkového obsahu glukosinolátů [μmol/g vz. při vlhkosti 9 %] v letech 2021-2022
Hořčice bílá (n = 40)	38,95
Hořčice sareptská (n = 20)	48,99
Hořčice černá (n = 20)	21,08

**Tab.5 Minimální a maximální celkové obsahy glukosinolátů v testovaných vzorcích v letech 2021-2022**

Zelená hmota	Celkový obsah glukosinolátů [μmol/g vz. při vlhkosti 9 %]			
	Min. 2021	Max. 2021	Min. 2022	Max. 2022
Hořčice bílá	14,28	47,41	23,78	72,09
Hořčice sareptská	16,76	118,92	11,81	73,93
Hořčice černá	1,97	108,81	7,99	36,75

Mezi jednotlivými testovanými genotypy existovaly významné rozdíly v obsahu celkových i podílu jednotlivých glukosinolátů. Mezi genotypy hořčice bílé obsahovala největší množství těchto látek odrůda Sabon (72,10 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %), současně měla i největší obsah sinalbinu (65,11 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %). Naopak nejmenší obsah celkových glukosinolátů byl naměřen u odrůdy Warta (14,28 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %). Nejvyšší obsah glukosinolátů mezi genotypy hořčice sareptské byl stanoven u odrůdy Vittasso (118,92 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %), naopak nejmenší u materiálu Zanagawa s. (11,81 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %). U hořčice černé byl maximální obsah stanoven u položky Alsaska (108,81 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %) a minimální u materiálu Primus (1,90 μmol/g vz. při vlhkosti 9%).

## Diskuze

V testovaných vzorcích byly stanoveny obsahy majoritních glukosinolátů. U hořčice bílé převažovaly sinalbin a glucotropaeolin. V pracích Popova a kol. (2014) je jako majoritní druh GSL v biomase hořčice bílé zmiňován sinalbin a sinigrin. Námi realizované analýzy stanovily jako druhý nejvýznamnější obsah glucotropaeolinu v množství 1,54 - 17,91 μmol/g vz. při vlhkosti 9 %. Tento rozdíl mohl být způsoben odrůdou, růstovým prostředím, zemědělskou praxí nebo jinými faktory.

V případě hořčice sareptské a černé převažuje glukosinolát sinigrin. Maria a kol. (2002) potvrzují majoritní přítomnost sinigrinu ve hmotě *Brassica juncea*. Autoři uvádějí, že čistý izolát sinigrinu z *Brassica juncea* účinně působí proti *Penicillium expansum* a může tak úspěšně nahradit chemickou ochranu.

Mezi jednotlivými položkami kolekcí existovaly velké rozdíly v obsahu glukosinolátů. Odrůda hořčice bílé – Warta- obsahovala nejmenší množství glukosinolátů v zelené biomase z testovaných odrůd. Tyto výsledky korespondují s autory Pięta a kol. (2014), kteří uvádějí, že tato odrůda byla vyšlechtěna jako materiál s nízkým obsahem kyseliny erukové a glukosinolátů v semeni.

## Závěr

Bylo otestováno celkem 80 genotypů tří druhů hořčic, u nichž byl stanoven celkový obsah glukosinolátů v zelené hmotě a jejich skladba. Ta se výrazně lišila mezi druhy. Hořčice bílá obsahuje majoritně sinalbin a menší podíl glucotropaeolinu. Naopak hořčice sareptská a černá obsahovaly dominantně sinigrin. Významné rozdíly byly pozorovány i v obsahu glukosinolátů

v zelené hmotě jednotlivých genotypů. Rozdíly byly natolik významné, že zhodnocení tohoto parametru pro všechny položky kolekce Národního programu by mohlo významně přispět ke zhodnocení kolekce, především s ohledem na využití specifických materiálů ve šlechtitelském procesu.

## Literatura

- Griffiths, D., Deighton, N., Birch, N.A.E., et al., 2001. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species: *Phytochemistry*, 57, 5, 693-700
- Joelsson A., Kyllmar K., 2002. Implementation of bestmanagement practices in agriculture: modelling and monitoring of impacts on nitrogen leaching: *Water Science and Technology*, 45 (9): 43–50
- Kirkegaard, J.A., Gardner, P.A., Desmarchelier, J.M., Angus, J.F. 1993. Biofumigation - using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. *Proceedings of the 9th Australian Research Assembly on Brassicas* pp 77-8. N. Wratten and RJ Mailer eds.
- Manici, L.M., Lazzeri, L., Palmieri, S. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2768-73.
- Maria, M., Leoni, O., Lori, R., Cembali, T. 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears: *Plant Pathol.* ,51, 231–236
- Piętka, T., Krzymański, J., Krótka, K., Bartkowiak-Broda, I. 2014. Double low white mustard (*Sinapis alba* L.syn. *Brassica hirta*) is a source of protein and oil: *Rośliny o leiste – o ilseed c rops*, 35: 21-35.
- Popova, I. E., Morra, M. J. 2014. Sinigrin and sinalbin quantification in mustard seed using high performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry: *Journal of Food Composition and Analysis*, 35 , 120–126. 10.1016/j.jfca.2014.04.011.
- Prugar J., 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČZV, s. 327
- Štulík, K., Pacáková, V. 1990. *High Performance Liquid Chromatography*: Praha, SPN
- Vašák, J. a kol. 2000. *Řepka*. Agrospoj, Praha.
- Zehnálek, P. 2022. Seznam doporučených odrůd, přehled odrůd: ÚKZÚZ Brno, s. 56
- Zhang, Y. S.; Talalay, P. 1994. *Cancer Research* 54, 1976 (1994).
- Zukalová, H., Výmola, J., 2003. *Glukosinoláty a krmivářství*: Praha, ČZU v Praze, Katedra rostlinné výroby AF. 194 s.

## **Poděkování**

Prezentované výsledky byly získány na základě řešení projektů MZe ČR 206553/2011-17253 "Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity", QK1910225 a institucionální podpory MZE-RO1822.

## **Kontaktní adresa:**

Ing. Andrea Rychlá  
OSEVA vývoj a výzkum s.r.o  
Purkyňova 10; 764 01 Opava  
776259111, [rychla@oseva.cz](mailto:rychla@oseva.cz)

## Reformulace bezlepkového sýrového pečiva

### The reformulation of gluten-free cheese bread

Rysová J., Laknerová I.

*Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.*

#### Abstrakt

Bylo připraveno sýrové bezlepkové pečivo určené pro rychlé občerstvení. Původní recept obsahoval jako základní surovinu tapiokovou mouku s vysokým podílem škrobu. V rámci reformulací byla tato mouka nahrazena moukami z přirozeně bezlepkových cereálií, ořechů a luštěnin. Při 28% - 100% náhradě tapiokové mouky vznikly zcela nové produkty, které se velmi odlišovaly od původního pečiva. Reformulací vzrostl obsah bílkovin a vlákniny, ale zcela se změnil charakter textury i chuť pečiva. Receptury byly proto upraveny tak, aby vyhověly sensorickým i nutričním požadavkům. Po úpravě se obsah bílkovin zvýšil o cca 21-37 % a vlákniny o 151-185 % proti původní receptuře.

**Klíčová slova:** bezlepkové sýrové pečivo, bílkoviny, vláknina, úprava receptury.

#### Abstract

Gluten-free cheese bakery products suitable for fast food were prepared. The original recipe contained tapioca flour with a high proportion of starch as the basic ingredient. As part of the reformulations, this flour was replaced by flours from naturally gluten-free cereals, nuts or legumes. Completely new products very different from the original cheese bread were created by 28 % to 100 % replacement of tapioca flour. The reformulation increased the protein and fiber content, but completely changed the character of the texture and the taste of the pastry. The recipes were therefore modified to meet sensory and nutritional requirements. After the final modification of the recipe, the protein content increased by approx. 21-37% and the fiber content increased by 151-185% compared to the original recipe.

**Key words:** pao, cheese bread, proteins, fiber, recipe modification

#### Úvod

V české populaci je řada osob, které trpí intolerancí lepku nebo jiných pšeničných bílkovin. Nejvýznamnější je celiakie, autoimunitní onemocnění potvrzené již u 1 % populace. Do stejné skupiny onemocnění patří i glutenová ataxie a dermatitis herpetiformis. Alergie na bílkoviny pšenice je méně častá, je zprostředkována IgE protilátkami, podobně jako tzv. „pekařské astma“. Neceliakální glutenová senzitivita je relativně nově rozpoznané onemocnění se širokým spektrem nespecifických příznaků. Pacienti s intolerancí lepku jsou odkázáni na dodržování bezlepkové diety, u celiakie je tato dieta doživotní. (Sapone a kol. 2012).

Potravinářské výrobky mohou být podle Nařízení 828/2014 označeny slovy „bez lepku“, pokud obsahují méně než 20 mg lepku/kg výrobku ve stavu určeném k prodeji. Cereálie obsahující lepek jsou nahrazovány přirozeně bezlepkovými plodinami a škroby. Bezlepkové potraviny mohou být deficitní na obsah bílkovin, vlákniny a minoritních látek. Proto se stávají předmětem reformulací. Princip reformulací spočívá ve snížení energetické hodnoty výrobků, snížení obsahu tuku nebo náhradě nutričně nevýhodných tuků, snížení obsahu přidaného cukru a obsahu soli v potravinách. Současně by mělo dojít k obohacení potravin o nedostatkové složky.

Sortiment bezlepkových surovin i hotových výrobků se za posledních cca 20 let značně rozšířil, ale oblast rychlého občerstvení zatím nabízí omezený výběr bezlepkových pokrmů bezpečných pro osoby s bezlepkovou dietou a tato skutečnost omezuje možnosti jejich stravování na cestách mimo domov. Proto byla vybrána relativně jednoduchá receptura na sýrové kuličky/bochánky, které je možné vyrobit chlazené nebo mražené do zásoby a v provozovně rychlého občerstvení upécti nebo ohřát.

Slaný sýrový „chléb“ „pao de queijo“ (dále také jen pao) je původem z Brazílie. Základní surovinou je kyselý tapiokový škrob nebo gari, aromatický sýr, mléko, vejce a sůl. Gari je fermentovaná instantní krupice s mírně kyselou chutí. Obsahuje 70,5 % škrobu a 0,44 % bílkovin (Panghal a kol. 2021). Výsledkem jsou pečené kuličky ze škrobovo - sýrového těsta, v teplém stavu gelovité až polotekuté konzistence, s chutí použitého sýra. Podávají se v teplém stavu k snídani nebo jako snack či produkt rychlého občerstvení v průběhu dne. Těsto na pao je možné zamrazit a prodávat jako polotovar v bloku nebo formované v kuličkách. Mrazit je možné i upečené pao (Mac Donnachaidh 2021, Cavalcante a kol. 2019, Saranraj a kol. 2019). Základní produkt může být různě modifikován pro průmyslovou výrobu a ochucován. Nutriční složení pao de queijo se mění v závislosti na použitých surovinách. Obvykle výrobky obsahují 26-42 % vody, 3,7-7,7 % bílkovin, 34-54 % sacharidů, 8-25 % tuků a 1,2-2,7 % popela (Teixeira a kol. 2020, Cavalcante a kol. 2019). Vzhledem k tomu, že hlavní surovinou je prakticky škrob, obsahuje pao velmi málo vlákniny. Proto byly testovány přísady kukuřičné mouky (Nassef a Hazef 2020), mouky z luštěnin (Cavalcante a kol. 2016), fruktooligosacharidů (Rodriguez-Sandoval a kol. 2014), guarové gumy a xanthanu (Zapata a kol. 2018, Papalia kol. 2015), celozrnné amarantové mouky (Dos Reis Lemos a kol. 2012), chia semínek (Costa Silva a kol.) s cílem zvýšit obsah vlákniny a bílkovin, popřípadě optimalizovat vlastnosti těsta pro průmyslovou výrobu. Sýrový chléb obsahuje kromě sacharidů také poměrně vysokou dávku tuku. Alexandre a kol. (2020) nahrazovali část tuku přísady 2-6 % polydextrózy, používán byl i koncentrát mléčných bílkovin (Clareto a kol. 2006).

### **Materiál a metody stanovení**

Veškeré suroviny pro přípravu sýrového pečiva byly zakoupeny v maloobchodní síti, rezistentní kukuřičný škrob Hi Maize pochází od firmy Rej, s.r.o. Bylo vyzkoušeno využití polotučného tvarohu, bryndzy 48 %, Eidamu 30 %, sýra Gran Moravia 32 % a Cheddaru s 50 % tuku v sušíně.

Obsah sušiny byl stanoven sušením při 105 °C, obsah bílkovin podle Kjeldahla (Nx6,25), obsah popela žiháním při 545 °C, obsah tuků po kyselé hydrolyze extrakcí chloroformem, obsah vlákniny AOAC enzymaticko-gravimetrickou metodou s využitím kitu firmy Merck. Výsledky jsou průměrem dvou paralelních stanovení.

Senzorické hodnocení I probíhalo za účasti 16, resp. hodnocení II za účasti 14 školených osob. Vzorky byly hodnoceny v teplém stavu. Byla použita stupnicová metoda s grafickou stupnicí (úsečka 100 mm). Data byla zpracována v statistickém softwaru STATVYD verze 2.0 beta. Součástí statistického vyhodnocení je Shapiro-Wilkův test normality (na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ ) a test odlehlosti výsledků podle Dean-Dixona ( $Q_{krit} = 0,329$  ( $n = 16$ ),  $Q_{krit} = 0,3349$  ( $n = 14$ )) na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  pro senzorické hodnocení I a  $Q_{krit} = 0,338$  ( $n = 15$ ),  $Q_{krit} = 0,3349$  ( $n = 14$ )  $Q_{krit} = 0,361$  ( $n = 13$ ),  $Q_{krit} (n = 12) = 0,376$  pro senzorické hodnocení II. V případě pořadového testu byl použit Friedmanův test (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ).

Tradiční postup přípravy sýrových kuliček: škrob, mouka a sůl se zalijí vroucí směsí mléka a oleje. Po zamíchání se ponechá spařená surovina vychladnout. Do vychlazené směsi se vmíchá vejce a postupně se do směsi zapracuje i strouhaný sýr. Vzniká polotuhé dosti lepivé těsto, ze kterého se ručně tvarují kuličky o průměru cca 3 cm. Kuličky se pečou v troubě při teplotě 175 °C po dobu 20 minut.

### **Výsledky a diskuse**

Receptury byly voleny tak, aby bylo možné ověřit modelově jednotlivé skupiny základních surovin. Vznikl tak soubor surovin, které lze navzájem zaměňovat. Ze skupiny tří tapiokových surovin je velmi dobře použitelná mouka (škrob) a gari, tapiokové perly příliš vhodné nejsou.

Bramborový škrob jako domácí surovina může tapioku nahradit, zejména v kombinaci s přirozeně bezlepkovými moukami. Nutriční hodnota v tomto případě zůstane přibližně stejná. Mouka z lepkavé rýže je pro pao velmi vhodná, mouka ze standardní rýže poskytuje pečivo horší jakosti. Podobně jako bezlepková ovesná mouka budou použitelné mouky z dalších přirozeně bezlepkových cereálií, mouky luštěninové nebo mouky z ořechů a jiných semen. Při využití mouky z olejnatých semen je třeba úměrně snížit dávku oleje v receptuře. Dávku soli je možné také upravit podle charakteru sýra. Ochucení sušenými houbami, bylinami nebo kořením je otázkou osobních preferencí. Nutriční hodnocení vzorků je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1. Základní složení (údaje v g/100 g vzorku)

kód	Základní suroviny	NT (%)	sušina	tuk	bílkovina	TDF	Pozn.
1	tapioka - mouka	-	65,6	18,1	8,7	1,0	Kontrolní
2	ovesná mouka celoz./gari	80,0	64,2	13,7	13,7	3,6	
3	rýže/ovesná celoz. mouka	100,0	66,7	14,1	11,1	1,3	Rýžová mouka není příliš vhodná
4	lepkavá rýže/tapioka m.	80,0	66,2	13,9	11,9	1,2	
5	sójová m./tapioka –m./gari	63,3	65,9	14,3	18,9	4,2	
6	hi maize/tapioka mouka	60,0	68,7	20,4	8,6	12,0	
7	č. čočka/tapioka - mouka	60,0	-	-	-	-	Neanalyzováno, uvolňoval se tuk
8	hi maize/tapiok. perly	60,0	65,0	14,8	8,3	ne	Tapiokové perly nevhodné
9	červená čočka/gari	51,7	64,9	13,2	12,9	5,2	
10	bramborový škrob	100,0	65,3	16,8	6,5	ne	Předpoklad minimální obsah TDF
11	gari/lískový protein	28,0	62,1	10,4	11,0	4,9	
12	gari/ovesná celoz./bryndza	80,0	65,5	17,6	11,0	4,4	

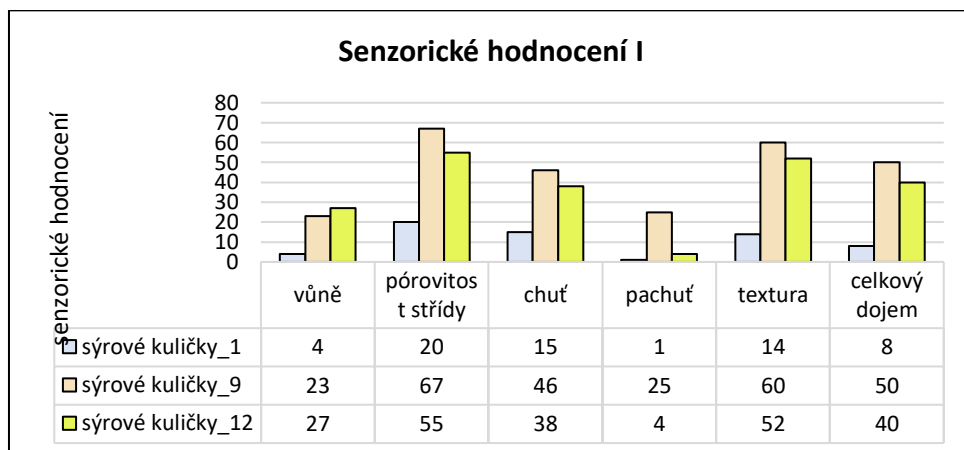
NT=náhrada tapiokové mouky, gari nebo perel

Vzorek 7 nebyl analyzován, protože při pečení se uvolnilo z těsta větší množství tuku. Pečivo 7 bylo přitom chutné, ale bude třeba upravit podíl sýra a oleje v receptuře. Receptury 1, 8 a 10 jsou postaveny na vyšších dávkách škrobu, tato skutečnost se projevila především v nižším obsahu bílkovin. Ve vzorcích 6 a 8 předpokládali vysoký obsah vlákniny daný využitím rezistentního kukuřičného škrobu, který se v organismu chová jako vláknina. Ve vzorku 10 s bramborovým škrobem vláknina ani stanovena nebyla, její obsah by byl podobně jako u kontrolního vzorku minimální. Zdrojem bílkovin jsou u všech vzorků vejce, sýry a mléko, ale v tab. 3 je vidět významný nárůst obsahu bílkovin v pečivu s přidávkou luštěninových mouk nebo lískového proteinu. Obsah tuku je možné regulovat vhodně zvolenou kombinací řepkového oleje a sýra, současně je třeba zohlednit i obsah tuku v sójové nebo ovesné mouce. Texturu pečiva by bylo možné dále vylepšit přidávkou modifikovaných škrobů nebo jiných hydrokoloidů.

Na senzoricou analýzu byl vybrán kontrolní vzorek 1, dále vzorek 9 s moukou z červené čočky a vzorek 12 s celozrnnou ovesnou moukou. Vzorky byly vybírány podle obsahu bílkovin, vlákniny a v předběžném hodnocení i podle chuti. Výsledky prvního senzorickeho hodnocení (I) vybraných vzorků jsou uvedeny na obrázku 1 a v tabulce 2. Jak je zřejmé z výsledků hodnocení, nejlépe byl hodnocen kontrolní vzorek (1). V pořadovém testu byl prokázán statistický rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorkem 9, resp. 12. Největší problémy byly nalezeny v kvalitě střídy a textuře pečiva. Střída byla hodnocena jako výrazně drobivější a méně pružná na rozdíl od gelovité konzistence původního pečiva. Méně příznivé hodnocení chuti a vyšší intenzita pachuti byly zřejmě způsobeny výběrem chuťově výraznějších surovin, jako je čočková mouka a zejména bryndza. Reformulací receptury vznikly tedy nové produkty, které

jsou sice nutričně výhodnější, ale svým charakterem se příliš vzdálily od původního pečiva.

Na základě výsledků sensorického hodnocení I byla receptura vzorků znovu upravena, aby se vzorky svými vlastnostmi více blížily původnímu produktu. Znamenalo to snížit podíl mouky ve prospěch tapiokového škrobu a nahradit část bryndzy jiným sýrem. Výsledkem jsou vzorky s gelovito-tažnou střídkou v teplém stavu, které současně vydrží i opakovaný ohřev v mikrovlnné troubě. Jejich nutriční složení je uvedeno v tabulce 3.



Obr. 1 Sensorické hodnocení sýrového pečiva (I) s testováním odlehlosti výsledků dle Dean-Dixonova testu (s využitím stupnic 0 – 100 bodů: vůně, chuť, celkový dojem 0 = vynikající, 100 = velmi špatný; intenzita pachuti 0 = nepřítomna, 100 = velmi silná; pórovitost střídy 0 = pórovitá, 100 = kompaktní, hutná; textura 0 = pružná, gelovitá, 100 = drobná)

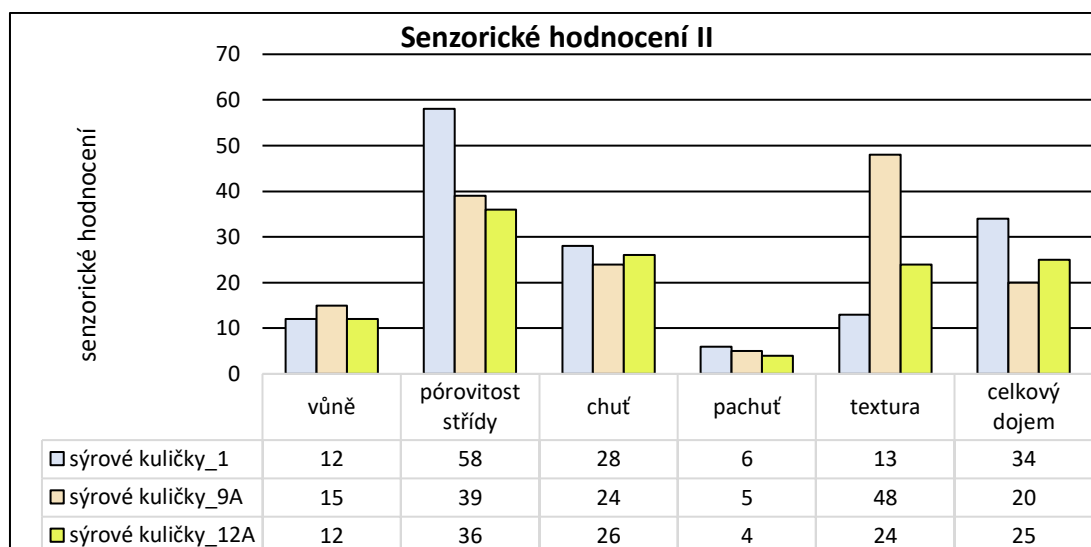
Tab. 2 Výsledky pořadového testu dle Friedmana (FR = 15,57; Qkrit = 6,14;  $\alpha = 0,05$ )

Vzorek	1	9	12
suma	16	33	35
pořadí	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

Tab. 3 Základní složení –upravené receptury (údaje v g/100 g vzorku)

kód	NT (%)	tuk	bílkovina	TDF	Pozn.
9A	40,8	13,6	11,9	2,9	tapioka –mouka, čočka, rýžová mouka
12-A	68,0	17,1	10,5	2,5	tapioka, rezist. škrob, ovesná mouka





Obr. 2 Senzorické hodnocení sýrového pečiva (II) připraveného podle upravených receptur s testováním odlehlosti výsledků dle Dean-Dixonova testu (s využitím stupnic 0 – 100 bodů: vůně, chuť, celkový dojem 0 = vynikající, 100 = velmi špatný; intenzita pachuti 0 = nepřítomna, 100 = velmi silná; pórovitost střídy 0 = pórovitá, 100 = kompaktní, hutná; textura 0 = pružná, gelovitá, 100 = drobná)

Tabulka 4 Výsledky pořadového testu dle Friedmana (FR = 1,85; Qkrit = 6,00;  $\alpha$  = 0,05)

Vzorek	1	9A	12A
suma pořadí	28	22	28
Konečné pořadí	2-3	1	2-3

Senzorické hodnocení II pečiva připraveného podle nových receptur je uvedeno na obrázku 2. V porovnání s obrázkem 1 je zřejmé, že se vyrovnala úroveň hodnocení vůně, chuti a intenzity pachuti. Střída pečiva získala větší pórovitost, textura je hodnocena jako více gelovitá, i když větší drobnost u vzorku 9A přetrvala. Celková přijatelnost vzorků je hodnocena po úpravě podstatně lépe, všechny tři vzorky jsou hodnoceny na podobné úrovni. Výsledky pořadového testu (tab. 4) této skutečnosti také odpovídají, mezi vzorky nebyl nalezen u sledovaných vlastností statisticky významný rozdíl.

### Závěr

Receptury na sýrové pečivo jsou určeny pro osoby, které dodržují bezlepkovou dietu, ale současně může produkty konzumovat i většinová populace. Receptury jsou využitelné v provozovnách rychlého občerstvení, restauracích a zařízeních nabízejících snídaňové menu. Náhrada škrobu v pečivu z 28 -100 % zvýšila obsah vlákniny a bílkovin, ale zcela změnila u některých receptur charakter sýrového pečiva. Po úpravě receptury bylo připraveno pečivo s přijatelným sensorickým hodnocením a zvýšenou nutriční hodnotou proti kontrolnímu vzorku. V praxi se ukázalo, že reformulace potravin naráží na určité hranice, kdy výrobek už není pro konzumenta přijatelný po stránce chuti a textury.

### Dedikace

Práce byla provedena v rámci řešení projektu výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ, grant MŠMT: LM2018100 a za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpory MZ E-RO0318.

## Literatura

- Cavalcante R.B.M., Morgano M.A., Damasceno Silva K.J., Moura Rocha M., Da Mota Araújo M.A., dos Reis Moreira-Araújo R.S.(2016): Cheese bread enriched with biofortified cowpea flour, *Ciência e Agrotecnologia*, 40(1): 97-103.
- Cavalcante R.B.M., Ferro M.L.R., De Sousa Machado R., Dias, T., de Castro Ferreira T.A.P.(2019): Determined and declared centesimal composition of frozen cheese breads of different brands, *Revista Desafios – v. 6, Especial*.
- Clareto S.S., Nelson D.L., Guimaraes-Pereira A.J.(2006): Influence of a Protein Concentrate Used as a Fat Substitute on the Quality of Cheese Bread, *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, 49 (6): 1019-1025.
- Costa Silva A. R., Cavalcante –Cavassani I., Dias de Amorim A., Aguiar Moraes E., da Silva E.M.(2018): Chia Seed Addition to Cheese Bread Contributed to the Increase in the Omega-3 Fatty Acid Concentration without Changing the Physico-chemical and Sensory Characteristics, *J. Food Nutr. Res.*, 6(6): 393-399.
- Dos Reis Lemos A., Capriles V. D., Pinto e Silva M.E.M., Areas J.A.G.(2012): Effect of incorporation of amaranth on the physical properties and nutritional value of cheese bread, *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 32(3):427-431.
- Mac Donnchaidh S.: 10 Best Street Foods In Brazil. Přístup září 2022  
<https://cs.hotels.com/go/brazil/street-foods-brazil>
- NARÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům.
- Nassef S.L., Hazef H.H.(2020): Improving the Nutritive Value and Quality Parameters of Gluten Free Bread by Using Natural and Economical Ingredients, *Am. J. Food Sci. Technol.*, 8(6): 257-262.
- Panghal A., Munezero C., Sharma P., Chhikara N. (2021): Cassava toxicity, detoxification and its food applications: a review, *Toxin Reviews*, 40 (1): 1-16.
- Papalia I. S., Londero P.M.G., Katsuda M.S., Rosa C.S.(2015): Development of cheese bread with the addition of guar gum and xanthan gum as a substitute for partial fat, *Int. J. Food Res. J.*, 22 (5): 2050-2056.
- Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 828/2014 ze dne 30. července 2014 o požadavcích na poskytování informací o nepřítomnosti či sníženém obsahu lepku v potravinách spotřebitelům
- Rodriguez – Sandoval E., Landi Franco C.M., Manjarres-Pinzon K. (2014): Effect of fructooligosaccharides on the physicochemical properties of sour cassava starch and baking quality of gluten-free cheese bread, *Starch/Stärke*, 66: 678–684.
- Sapone A., Bai J. C., Ciacci C., Dolinsek J., Green P. H. R., Hadjivassiliou M., Kaukinen K., Rostami, K., Sanders D. S., Schumann M., Ullrich R., Villalta D., Volta U., Catassi C., Fasano A. (2012): Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification, *BMC Medicine*, 10:13.
- Saranraj P., Behera S. S., Ray R.C.(2019): Traditional Foods From Tropical Root and Tuber Crops: Innovations and Challenges. In *Innovations in Traditional Foods*, Elsevier 2019 Edited by: Charis M. Galanakis
- Teixeira C. S., da Rocha Neves G.S., de Oliveira T.F., Caliari M., Soares M.(2020): Brazilian cheese bread rolls from fermented and native waxy maize starch, *Ciência e Agrotecnologia*, 44: e012920.
- Zapata F., Zapata E., Rodr E., Sandoval E. R. (2018): Influence of guar gum on the baking quality of gluten-free cheese bread made using frozen and chilled dough, *Int.J. Food Sci. Technol.*, 54(2):313-324.

## Kontaktní adresa:

Ing. Jana Rysová  
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.  
Radiová 7, Praha 10, 102 00, Hostivař  
Tel. 296 792 389; [j.rysova@vupp.cz](mailto:j.rysova@vupp.cz)

## Aktivita inhibitorů trypsinu u vybraných odrůd sóji

Trypsin inhibitor activity of selected soybean varieties

Stupková A., Bárta J., Jarošová M., Bártová V., Švajner J.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*

### Abstrakt

V příspěvku byla hodnocena aktivita inhibitorů trypsinu (TIA) u 9 vybraných odrůd sóji luštinaté (*Glycine max* (L.) Merrill) a to velmi raných – Abelina, Adessa, Ambella, Marzena, Mayrika, Merlin, Royka a raných – Aurelina a Silesia. V rámci hodnocených odrůd byla zjištěna statisticky průkazná variabilita v TIA, kdy nejnižší úroveň této aktivity byla zjištěna u odrůdy Silesia, u které bylo množství inhibitoru trypsinu 29,77 TIU/mg sušiny. Naopak nejvyšší úroveň aktivity byla zaznamenána u odrůdy Adessa a to 58,61 TIU/mg sušiny.

**Klíčová slova:** antinutriční látky, TIA, luskoviny

### Abstract

In the paper the activity of trypsin inhibitor in 9 selected soybean varieties (*Glycine max* (L.) Merrill) was evaluated. Very early varieties Abelina, Adessa, Ambella, Marzena, Mayrika, Merlin, Royka and early varieties Aurelina and Silesia were evaluated. Statistically significant difference of TIA was found in this collection of varieties. The lowest level of TIA was detected in the variety Silesia (29.77 TIU/mg dry matter) and the highest level of TIA was detected in the variety Adessa (58.61 TIU/mg dry matter).

**Keywords:** anti-nutritional factors, TIA, legumes

### Úvod

Sója luštinatá (*Glycine max* (L.) Merrill) je považována za jednu z nejstarších kulturních plodin a pochází z jihovýchodní Asie. Zájem o pěstování sóji je ve střední Evropě stále větší, a i když se jedná o teplomilnou rostlinu díky šlechtění nových odrůd, které jsou relativně chladuvzdorné a méně náročné na počet slunečných dnů, je možné měnit její nároky na pěstování i v podmínkách ČR. V seznamu odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. 6. 2022 bylo zapsáno 21 odrůd sóji, z nichž 5 (Abaca, ES Collector, Marquise, Pripjat, Sully) bylo zapsáno v roce 2022. V roce 2022 došlo v porovnání s rokem předešlým dle ČSÚ k nárůstu osevní plochy sóji o 8 859 ha na 28 538 ha (data jsou ke dni 31. 5. 2022). Pěstitelům v ČR jsou k dispozici také odrůdy zapsané ve Společném katalogu odrůd zemědělských plodin, který je vydáván v Úředním věstníku Evropské unie.

Sója je díky svému složení často vyzdvihována před ostatními luštěninami, a to zejména díky vysokému podílu bílkovin. V semenech sóji je 33–42 % bílkovin v závislosti na odrůdě, u geneticky modifikovaných je uváděno až 50 % (Nishinari et al. 2014). Bílkoviny sóji mají vysokou biologickou hodnotu s vysokým podílem aminokyselin, z nichž nejvýznamnější je glycin. Chybějí ale esenciální aminokyseliny methionin, cystein a tryptofan, a proto nejsou sójové bílkoviny označovány jako plnohodnotné. Dalším faktorem určujícím kvalitu bílkovin je stravitelnost, která je u sójových bílkovin porovnatelná se stravitelností bílkovin mléka nebo masa (Kaar-Lilienthal et al. 2006, Dostálová 2017). Dále semena obsahují vysoký obsah tuku, nejčastěji je uváděno rozmezí 15–23 %. Složení sójových tuků (olejů) je z hlediska výživy velice příznivé vzhledem k vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin (esenciální kyselina linolová představuje asi 50 % a alfa-linolenová představuje do 11 %). Mohou být také zdrojem fosfolipidů, zejména lecitinu a obsahují také významné množství rostlinných sterolů, které zabraňují vstřebávání cholesterolu z jiné stravy. V sójových tucích se totiž cholesterol

prakticky nevyskytuje (Almeida-Chuffa et al. 2014). Sacharidy představují ve složení sóji asi 30 %, přičemž významný podíl tvoří vláknina, a asi 5 % tvoří nestravitelné oligosacharidy, které mohou způsobovat nadýmání. Dále sója obsahuje minerální látky (vápník, hořčík, draslík, sodík, železo), jejich využitelnost je ale nižší vzhledem k vazbě na kyselinu fytovou, šťavelovou a vlákninu. Z hlediska výživy jsou významnými složkami ještě fytoestrogeny a fytosteroly (Dostálová 2017).

Sója obsahuje ale i méně pozitivní, tzv. antinutriční látky. Mezi antinutriční látky bílkovinné povahy patří inhibitory enzymů, zejména proteas, a lektiny. Inhibitory proteas, zejména trypsinové inhibitory, snižují stravitelnost bílkovin, a z tohoto důvodu není vhodné konzumovat luštěniny v syrovém stavu. Vzhledem k tomu, že se ve většině případů jedná o látky termolabilní, lze je jednoduše odstranit tepelnou úpravou (Nu & Laue 2016).

Sójové boby je tedy možné zpracovat na různé potravinové výrobky, nebo jako krmivo pro hospodářská zvířata. Zjednodušeně lze technologické procesy úpravy sóji pro využití v potravinářství rozdělit dle toho, zda zahrnovaly nebo nezahrnovaly fermentaci. Mezi ty nefermentované patří např. sójové mouky, vločky, krupice, koncentráty a izoláty sójových bílkovin, tofu, sójové oleje nebo sójové nápoje. Mezi ty fermentované patří např. tempeh, zakysané sójové výrobky nebo sójová omáčka. Při použití sóji do krmných směsí existují 3 základní druhy výrobků, a to sójový extrahovaný šrot, plnotučný sójový šrot nebo vločky a částečně odtučněný šrot nebo vločky (Dostálová 2017).

Cílem příspěvku je zhodnotit variabilitu v aktivitě inhibitorů trypsinu (TIA - Trypsin inhibitor activity) u 9 vybraných odrůd sóji, s ohledem na jejich vypěstování v okrajové oblasti pěstování, respektive nad doporučovanou nadmořskou výšku pro pěstování.

## **Materiál a metody**

Vzorky semen odrůd sóji luštinaté (*Glycine max* (L.), Merrill) byly získány z poloprovozního polního pokusu založeného na pozemku Rodinné farmy Janota na Lhenicku v nadmořské výšce 541 m. Jednalo se o následující odrůdy: od společnosti Saatbau Česká republika, s.r.o. byly hodnoceny odrůdy Abelina (velmi raná, 000), Adessa (velmi raná, 0000-), Ambella (velmi raná, 0000), Merlin (velmi raná, 000+), Aurelina (velmi raná, 000) a od společnosti ZIA Prograins, s.r.o. se jednalo o odrůdy Marzena (velmi raná, 000), Mayrika (velmi raná, 000), Royka (velmi raná, 000) a Silesia (raná, 00 (0)).

Vstupním materiálem pro analýzy byla mouka připravená mletím semen zmíněných odrůd sóji pomocí nožového mlýnu Grindomix GD200 (Retsch, Německo) při 10 000 ot./min. po dobu 1 minuty. Z takto připraveného 1g mouky byl z vázkového rozdílu před a po sušení při 100 °C po dobu 3 h stanoven obsah sušiny v %.

Příprava vzorků pro stanovení inhibitorů trypsinu u vybraných druhů sóji byla provedena dle modifikovaného postupu optimalizované metodiky pro stanovení inhibitorů trypsinu u hrachu (Horáček 2008), kdy modifikace spočívala zejména v zohlednění vyššího obsahu tuku u sóji oproti hrachu při výpočtu množství inhibitoru trypsinu. Prvním krokem bylo odtučnění pomocí acetonu po dobu 24 h, kdy poměr vzorek/aceton byl 1:25. Po odmaštění byly vzorky vysušeny volně na vzduchu a vázkovým rozdílem byl stanoven obsah tuku. Extrakce vzorků byla provedena pufrům o složení: 0,01M glycin + 0,01M NaCl + 0,01M močovina + 0,01M EDTA + 0,1M NaOH s úpravou reakce na pH 11.

Enzymová reakce byla připravena do objemu 200 µl. K přípravě umělého substrátu byl použit N $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, Sigma Aldrich) a Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich) v poměru 40:1 rozpuštěných v pufru (50mM Tris + 20 mM CaCl $_2$ .6H $_2$ O pH 8,2). Enzym trypsin byl použit ve formě lyofilizovaného prášku z hovězího pankreatu (Sigma Aldrich) a standardně rozpuštěn v 1 mM HCl v poměru 4:100. Takto připravený umělý substrát i trypsin byly vytemperovány na 37 °C a celková doba enzymové

reakce byla přesně 600 s. Po uplynutí této doby byla do reakce přidána 30% octová kyselina, která enzymovou reakci zastavila. Reakce byla vyhodnocena na destičkovém spektrofotometru (xMark™, Bio-Rad) při  $\lambda=410$  nm.

Výpočet množství inhibitoru trypsinu byl proveden v jednotkách TIU, definovaných jako pokles absorbance  $A_{410}$  za 10 minut o 0,01 na 1 mg stanovované sušiny, tedy:

$$TIA=(A_0-A)/0,01p*0,2/5*10/0,605$$

( $A_0$  - absorbance reakčního standardu,  $A$  - absorbance vzorků,  $p$  – množství vzorku v testu v mg, 0,2/5 – korekce na objem proti standardnímu stanovení, 10/605 – korekce na délku optické dráhy v jamkách mikrotitrační destičky při objemu 200  $\mu$ l).

Statistické vyhodnocení dat (Tukey HDS test) bylo provedeno pomocí software STATISTICA 12 (StatSoft USA).

## Výsledky a diskuze

U hodnocených odrůd sóji byl stanoven obsah sušiny, který se pohyboval od 94 do 97,4 %. Po odtučnění acetonem bylo stanoveno množství tuku v sušině, které se v rámci hodnocených odrůd sóji pohybovalo od 13 do 20 % (viz tabulka 1). Toto rozpětí odpovídá obsahu tuku uváděnému v odborné literatuře a pro účel jednoduchého odmaštění vzorku pro následné stanovení aktivity inhibitorů trypsinu se zdá jako optimální. Dle modifikované metodiky Horáček (2008) která byla navržena pro hrách, byla aktivita inhibitorů trypsinu u 9 hodnocených odrůd sóji detekována u všech odrůd (viz tabulka 1). Nejnížší úroveň této aktivity byla zjištěna u odrůdy Silesia, u které bylo množství inhibitoru trypsinu 29,77 TIU/mg sušiny. Naopak nejvyšší úroveň aktivity byla zaznamenána u odrůdy Adessa a to 58,61 TIU/mg sušiny. Tyto výsledky potvrzují, že je obsah TIA u sóji, obdobně jako u hrachu, do značné míry ovlivněn odrůdou. U hrachu se jeho množství nejčastěji pohybuje od 2 do 7 TIU/mg sušiny (jednotek inhibitoru trypsinu) (Wang et al., 1998, Tyrolová 2012). Pro srovnání u sójových bobů se tato hodnota pohybuje běžně okolo 50 TIU/mg sušiny, což potvrzují i prezentované výsledky u odrůdy Abelina (51,35 TIU/mg sušiny), Ambella (49,39 TIU/mg sušiny) a Merlin (47,83 TIU/mg sušiny).

Bílkoviny jsou nejcennější výživovou složkou, obzvláště pak esenciální aminokyseliny, které si žádný živočišný organismus neumí sám vyrobit a musí je přijímat v potravě. Luskoviny jsou jedním z hlavních zdrojů, protože jejich suchá semena obsahují 20 (hrách, fazol) - až 40 % (sója, lupina) bílkovin. Nejhodnotnější bílkoviny z nich má sója luštinatá, která je svým složením nejvíce podobná plnohodnotným bílkovinám živočišného původu. Pro krmení hospodářských zvířat se používá ve formě extrahovaných šrotů nebo pokrutin (Montgomery 2003, Peterová 2005).

Mezi antinutriční látky bílkovinné povahy patří inhibitory trypsinu, které zhoršují stravitelnost bílkovin. Jedná se však o termolabilní látky, což v praxi znamená, že se jich je možné zbavit dostatečnou tepelnou úpravou. Ke snížení aktivity inhibitorů trypsinu dochází rovněž při klíčení (Satya et al. 2010).

Sójové inhibitory trypsinu (STI) byly popsány jako malé molekuly proteinů, které inhibují aktivitu trypsinu. Aktivita inhibitoru trypsinu je přisuzována dvěma polypeptidům, kterými jsou Kunitzovy inhibitory proteas (KTI) a Bowman-Birk inhibitory trypsinu (diPietro et al. 1989, Kumar et al. 2018).

Díky stoupající poptávce se plochy se sójou v ČR neustále zvyšují a STI se dostávají do popředí zájmu. Inhibitory trypsinu jsou přítomny v celé řadě potravin a obecně jsou z hlediska výživy vnímány spíše negativně. Je třeba si ale uvědomit, že se jedná o přirozené složky potravin

rostlinného původu a rostliny si je vyvinuly pro svou vlastní obranu proti vnějším vlivům (hmyzu, ptákům, býložravcům atp.).

Řada studií poukazuje na to, že se STI mohou mít i pozitivní účinky a využití. Například Zhang et al. (2022) ve své studii získali STI pomocí jednoduchých technik (srážení pH a vysolování síranem amonným) z koloidní odpadní vody ze sójové syrovátky. Takto získaný STI vykazoval vysokou čistotu, stabilitu a vynikající inhibiční aktivitu srovnatelnou s komerčně dostupnými trypsinovými inhibitory (Sigma T9128, Sigma T9777) a jeho využití lze spatřovat v biomedicíně, ve funkčních potravinách nebo při výrobě obalových materiálů.

Sója vypěstovaná v ČR se z velké části spotřebuje jako krmivo, a proto je při šlechtění nových odrůd kladen důraz i na nízký obsah inhibitorů trypsinu.

**Tabulka 1: Stanovení sušiny, tuku a aktivita inhibitorů trypsinu u hodnocených odrůd sóji**

Odrůda	Sušina (%)	% tuku v sušině po odtučnění acetonem	TIU/mg sušiny
Abelina	97,40 ± 2,18 a	19,99 ± 1,79 a	51,35 ± 2,88 b
Adessa	95,83 ± 0,16 ab	15,65 ± 0,32 bcd	58,61 ± 3,97 a
Ambella	95,83 ± 0,13 ab	16,10 ± 0,48 bc	49,39 ± 5,60 b
Aurelina	94,09 ± 0,21 b	13,46 ± 0,64 d	33,36 ± 4,30 d
Marzena	95,12 ± 2,16 ab	14,61 ± 2,18 cd	41,82 ± 1,52 c
Mayrika	94,09 ± 0,11 b	13,40 ± 0,35 d	43,49 ± 2,08 c
Merlin	95,92 ± 0,10 ab	17,37 ± 0,46 b	47,83 ± 1,97 b
Royka	96,00 ± 0,08 ab	15,52 ± 0,35 bcd	31,19 ± 3,21 d
Silesia	94,01 ± 0,12 b	13,41 ± 0,22 d	29,77 ± 2,50 d

Neshodná písmena označují průkazný rozdíl založený na Tukey HSD testu ( $P < 0,05$ )

V současné době působí v ČR řada společností, které mají k dispozici technologie pro kompletní zpracování sóji. Tento komplexní přístup zahrnuje zpracování sóji až po finální produkty. Jedná se zejména o vysoce kvalitní krmiva bohaté na dusíkaté látky a mastné kyseliny a oleje k potravinářskému, nebo technickému využití. Z hlediska výživy je nutné sledovat kvalitu sóji, tak i výrobků z ní vyrobených. Množství inhibitorů trypsinu je jedním z důležitých parametrů, kdy je kladen důraz na co nejnižší úroveň jejich aktivity. Vhodným výběrem odrůdy a technologického zpracování lze dosáhnout výrazného snížení inhibitorů trypsinu do 5 mg/g, nebo jejich úplného odstranění.

## Závěr

Aktivita inhibitorů trypsinu byla detekována u všech vybraných odrůd sóji luštinaté se statisticky průkaznou variabilitou mezi jednotlivými odrůdami. Nejnižší úroveň této aktivity byla zjištěna u odrůdy Silesia, u které bylo množství inhibitoru trypsinu 29,77 TIU/mg sušiny. Naopak nejvyšší úroveň aktivity byla zaznamenána u odrůdy Adessa a to 58,61 TIU/mg sušiny. Výsledky potvrzují, že je obsah TIA u sóji do značné míry ovlivněn odrůdou a použitá metodika měření pro stanovení inhibitorů trypsinu původně navržená pro hrách se jeví jako vhodná i pro sóju.

## Literatura

- DiPietro C.M., Liener I.E. (1989): Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 37: 39–44.
- Dostálová R. (2017): Sója a výrobky ze sóji. Sdružení českých spotřebitelů. 22 p., ISBN 978-80-87719-57-2
- Horáček J. (2008): Optimalizovaná metodika pro stanovení inhibitorů trypsinu u hrachu (*Pisivum sativum* L.), Agritec plant research, Šumperk. ISBN: 978-80-903868-3-9.
- Chuffa Almeida L.G., Vieira F.R., Silva D.A.F., Franco D.M. (2014): Soybean Seed Oil: Nutritional Composition, Healthy Benefits and Commercial Applications, 1-54 p.
- Karr-Lilienthal L. K., Bauer L. L., Utterback P. L., Zinn K. E., Frazier R. L., Parsons C. M., Fahey G. C. (2006): Chemical composition and nutritional quality of soybean meals prepared by extrudes/expeller processing for use in poultry diets. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 (21): 8108-8114.
- Kumar V., Rani A., Shuaib M., Mittal P. (2018): Comparative Assessment of Trypsin Inhibitor vis-à-vis Kunitz Trypsin Inhibitor and Bowman-Birk Inhibitor Activities in Soybean. *Food Analytical Methods*, 11: 2431–2437.
- Montgomery K.S. (2003): Soy protein. *The journal of Perinatal Education*, 12(3): 42-45.
- Nishinari K., Fang Y., Guo S., Phillips G.O. (2014): Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39: 301-318.
- Nu M.A.T., Laue A. (2016): Anti-nutritional factors in soy proteins – the view of the nutritionist. *Project: Alternative protein for young animals*, 31(8): 7-8.
- Peterová J. (2005): Pěstování sóji v ČR a srovnání se světem. Sborník z konference Perspektivy sóji v ČR, 24-28 p.
- Satya S., Kaushik G., Naik S. N. (2010): Processing of food legumes: a boon to human nutrition. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3: 183-195.
- Tyrolová Y. (2012): Silážování hrach. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha. 28 p.
- Wang Z. S., Goetsch A. L. (1998): Intake and digestion by Holstein steers consuming diets based on litter harvested after different numbers of broiler growing periods or with molasses addition before deep-stacking. *Journal of Animal Science*, 76(3): 880-887.
- Zhang Y., Zhang Y., Ying Z., Li W., Li H., Liu X. (2022): Trypsin Inhibitor from Soybean Whey Wastewater: Isolation, Purification and Stability. *Applied Sciences*, 12/10084: 1-13.

## **Poděkování**

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného projektu: GAJU 080/2022/Z  
Hodnocení zemědělských a potravinářských surovin z pohledu genetické diverzity a obsahu biologicky aktivních látek a stopových prvků

### **Kontaktní adresa:**

Ing. Adéla Stupková, Ph.D.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
Fakulta zemědělská a technologická  
Studentská 1668, 370 05, České Budějovice  
stupkova@fzt.jcu.cz



## Stanovení ztráty půdy větrnou erozí pro podporu návrhů optimálních opatření k ochraně půdy před větrnou erozí

Determining soil loss through wind erosion to support the design of optimal measures to protect soil against wind erosion

Kučera J.<sup>1,2</sup>, Podhrázská J.<sup>1,2</sup>, Papaj V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i., Praha

<sup>2</sup>Mendelova univerzita v Brně

### Abstrakt

Cílem článku je zprostředkování informací o nových poznatcích v problematice větrné eroze v podmínkách České republiky s akcentem na návrhy adaptačních opatření v souvislosti se změnou klimatu. Článek odkazuje na aktuální metodický návod k zakládání a údržbě adaptabilních větrolamů, k výběru vhodné druhové skladby v nepříznivých podmínkách a jejich optimálního prostorového a funkčního umístění v síti krajiny. Rovněž poskytuje informace o metodách stanovení erozní ohroženosti území a provádění návrhů ochranných opatření pomocí nově vyvinutých softwarových nástrojů, určených především projektantům pozemkových úprav, popřípadě zpracovatelům dalších krajinytvorných opatření. Současně jsou publikovány odkazy na aktuálně dostupné datové podklady využitelné v prostředí geoinformačních systémů. Dále je představen nový projekt (QK21010191), který je zaměřen na hodnocení projevů větrné eroze prostřednictvím stanovení ztráty půdy větrnou erozí v t/ha/rok pro území ČR. Hodnocení ztráty půdy je založeno na využití metody pomocí rovnice Woodruff-Chepil (WEQ - Wind erosion equation), která komplexně posuzuje všechny vlivy na proces větrné eroze. Výstupem rovnice je stanovení ztráty půdy vyjádřené v t/ha za rok.

**Klíčová slova:** větrolam, návrhy opatření, zemědělská půda, ochrana půdy

### Abstract

The aim of the article is to provide information on new findings in the issue of wind erosion in the conditions of the Czech Republic with an emphasis on proposals for adaptation measures in connection with climate change. The article refers to the current selection of methodological instructions for the establishment and maintenance of adaptable windbreaks, to suitable species compositions in adverse conditions and their optimal spatial and functional location in the landscape network. It also provides information on the methods of determining the erosion risk of the territory and the implementation of proposals for protective measures using newly developed software tools, intended primarily for land development planners or developers of other landscape-forming measures. The article contains links to currently available data sources that can be used in the environment of geoinformation systems. Furthermore, a new project (QK21010191) is presented, which is focused on the evaluation of the manifestations of wind erosion through the determination of soil losses due to wind erosion in t/ha/year for the territory of the Czech Republic. The assessment of soil loss is based on the use of the method using the Woodruff-Chepil equation (WEQ - Wind erosion theory), which comprehensively assesses all influences on the wind erosion process. The output of the equation is the determination of soil loss expressed in t/ha per year.

**Keywords:** windbreak, proposals for measures, agricultural land, soil protection

### Úvod

O probíhající klimatické změně již v dnešní době pochybuje jen málokdo. Že se jedná o závažný problém si uvědomujeme například v obdobích sucha, která se v posledních letech objevují čím dál častěji i v ČR. V zemědělství se klimatická změna projevuje zejména dopady extrémních projevů počasí. Častěji, než v minulosti se vyskytují přívalové deště a intenzivnější a delší sucha. Vyšší četnost extrémních jevů počasí nepříznivě ovlivňuje podmínky pro zemědělské plodiny (Fallon a Betts 2010). I když roční úhrny srážek neklesají, mění se jejich časová distribuce způsobem, který není pro některé zemědělské plodiny vyhovující (Trnka et al. 2014, Středová et al. 2021). Nejvyšší nárůst teplot je v letním období, nejnižší pak na jaře a na podzim

(Střešík et al. 2014). V letním období se zvyšuje počet tropických dnů (nad 30 °C). Vyšší teploty v zimním období mají vliv na začátek a konec vegetačního období. Je velice pravděpodobné, že k nárůstu teplot bude docházet i v budoucnu (Štěpánek et al. 2016).

Podle aktuálních informací je větrnou erozí v ČR potenciálně ohroženo 25,34 % výměry orné půdy (Zelená zpráva 2020). To podle databáze LPIS představuje plochu větší než 569 tis. ha. Větrnou erozí jsou ohroženy především nejúrodnější oblasti ČR (Jižní Morava, Polabí) v nížinách, které jsou zemědělsky intenzivně využívány a významně se podílejí na zajištění potravinové soběstačnosti a bezpečnosti ČR. I z tohoto důvodu význam větrné eroze a potřeba snižování negativních dopadů na zemědělskou produkci roste čím dál více.

V současné době neexistuje datový podklad vyjadřující ztrátu půdy působením větrné eroze v t/ha/rok. V současné době je pro území ČR využívána datová vrstva vyjadřující potenciální ohroženost větrnou erozí na podkladu půdně-klimatických faktorů (kategorie 1 (nejméně ohrožená) až 6 (nejvíce ohrožená)) publikované v Doležal a kol 2017, Podhrázská a kol 2021 a Středová et al. 2021). Stanovením ztráty půdy větrnou erozí v t/ha/rok se v podmínkách ČR zabýval Vrána (1978), Pasák (1966). Ke stanovení ztráty půdy v podmínkách ČR využil rovnici WEQ sestavenou Woodruff-Chepil (1965). Rovnice WEQ byla dále upravována do podoby tzv. Revised Wind Erosion Equation (RWEQ) dle Fryreara et al. (2000). Pro území Evropy byla nejaktuálnější aplikace rovnice RWEQ publikována Borrelli et al. (2014).

## **Materiál a metody**

Průkopníkem výzkumu větrné eroze v českých zemích byl doc. Vlastimil Pasák, který formuloval závislosti intenzity větrné eroze na půdně klimatických faktorech a na základě experimentů ve větrném tunelu vypracoval rovnice, určující tyto závislosti. Zastřešujícím metodickým podkladem pro problematiku eroze půdy v České republice je řada metodik kolektivu autorů pod vedením prof. Janečka. V současnosti je platná metodika Janeček a kol. (2012) „Ochrana zemědělské půdy před erozí“. Tato metodika však fenomén větrné eroze řeší jen jako součást širšího komplexu řešení rizika eroze, a to prostřednictvím stručné samostatné kapitoly zabývající se výpočtem erodovatelnosti půdy větrem a typy opatření proti větrné erozi. S větrnou erozí v metodické a metodologické rovině v podmínkách České republiky pracuje podrobněji následující pětice certifikovaných metodik, kdy každá přistupuje k této problematice z jiné perspektivy. Těžištěm je problematika opatření proti větrné erozi, jmenovitě otázka větrolamů.

Metodika „Optimalizace funkcí větrolamů v zemědělské krajině“ (Podhrázská a kol., 2008) je zaměřena na optimalizaci konstrukce větrolamů, jejich optimální druhové skladby, péče a situování směru a zapojení v síti. Důležité jsou také návrhy na jejich doplnění, rekonstrukci a obnovy tak, aby působily integrovaně. Návrh sítě větrolamů je nutno podpořit objektivními hledisky, odůvodňujícími směr a způsob výsadby, doporučené parametry (délka, výška, šířka) větrolamů a jejich prostorové rozložení v krajině. Návrhu by měla předcházet analýza erozních rizik v území, hodnocení účinnosti stávajících prvků protierozní ochrany a hodnocení účinnosti navrhovaných opatření. Za tímto účelem byl v metodice vypracován postup, umožňující analýzu území z hlediska ohroženosti pozemků větrnou erozí a následný návrh na optimální uspořádání sítě větrolamů včetně návodu na rekonstrukci a obnovu stávajících.

Cílem metodiky „Hodnocení účinnosti trvalých vegetačních bariér v ochraně proti větrné erozi“ (Podhrázská a kol. 2011) je stanovit a popsat metody a postupy pro určení propustnosti (porozity) trvalých vegetačních bariér. Metodika umožňuje určit míru snížení rychlosti vzdušných mas protékajících bariérami a tím určit jejich účinnost proti škodlivým účinkům větrné eroze. Metodika se zabývá zejména porozitou větrolamů a modely k predikci větrných podmínek (WAsP - Wind Atlas Analysis and Application Program a WEng - WAsP Engineering).

Text „Metodiky hodnocení účinnosti a realizace větrolamů v krajině jako nástroj pro ochranu půdy ohrožené větrnou erozí“ (Khel a kol., 2017) se věnuje problematice větrné eroze v České republice a možnostem hodnocení, či návrhu opatření ke zmírnění jejích negativních dopadů na půdu. Metodika je členěna na dvě části – část teoretickou a metodickou. Svým způsobem navazuje na předchozí metodické postupy v hodnocení erozních rizik a efektivity větrolamů, je však soustředěna více na lesnickou problematiku vymezení rizikových oblastí a návrhu nových prvků ochrany proti větrné erozi. Je zde provedeno vymezení přírodních lesních oblastí a navržen výběr vhodných dřevin podle charakteru skupin lesních typů (SLT). Praktická část metodiky poskytuje návod na převod BPEJ na SLT a podrobně popisuje návrhové složení větrolamů dle SLT.

Cílem certifikovaná metodiky „Řízení rizika větrné eroze“ (Doležal a kol., 2017) je analyzovat, vyhodnotit a popsat možnosti zmírnění rizika větrné eroze v podmínkách České republiky na zemědělsky obdělávaných pozemcích. Zaměřuje se především na definici postupů hodnocení rizika větrné eroze na základě analýzy procesu větrné eroze a analýzy jednotlivých faktorů; definování oblastí potenciálních závažných projevů větrné eroze a navrhování postupů řízení rizika opatřeními v pozemkových úpravách; využití regionalizace území ohrožených větrnou erozí na základě nových poznatků výzkumu pro proces vyhodnocení a řízení rizika zejména s ohledem na vyhodnocení vlivu klimatických činitelů; postup analýzy, definice a hodnocení míry rizika; popis důsledků a možnosti řízení rizika v procesu pozemkových úprav; popis metody stanovení vlivu trvalých vegetačních bariér na snížení rizika eroze a poznatky a zkušenosti s projektováním těchto prvků v rámci pozemkových úprav obsažený v praktické části metodiky.

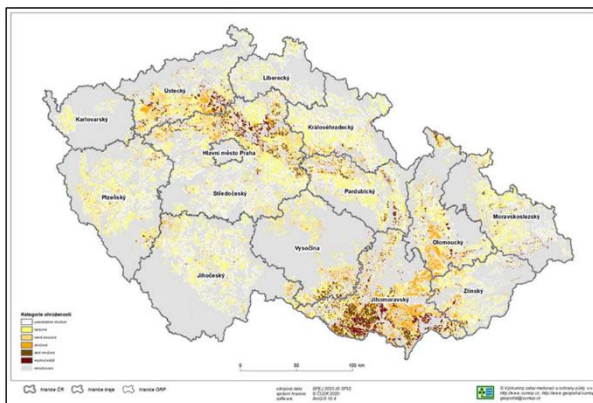
Hodnocení ztráty půdy v nově řešeném projektu QK21010191 bude založeno na využití metody pomocí rovnice Woodruff-Chepil (WEQ - Wind erosion equation) která komplexně posuzuje všechny vlivy na proces větrné eroze. Výstupem rovnice je stanovení ztráty půdy vyjádřené v t/ha za rok. Jedná se jednu z nejpoužívanějších rovnic ve světě. Faktory rovnice budou upraveny pro podmínky ČR – zejména stanovení faktoru erodibility (I) a klimatického faktoru (C) analýzou klimatických dat a půdních vlastností (množství erodovatelných částic, zrnitostní frakce, obsahu uhličitanu vápenatého – CaCO<sub>3</sub> a obsah organické hmoty Cox).

## Výsledky a diskuse

Poznatky z předchozích výzkumů větrné eroze rozpracovává aktuální metodika: Zakládání a údržba větrolamů ve zhoršených pedoklimatických podmínkách (Podhrázká et al. 2021).

V materiálu jsou zprostředkovány informace o nových poznacích v problematice větrné eroze s akcentem na návrhy adaptačních opatření v souvislosti se změnou klimatu. Metodika nově poskytuje návody k zakládání a údržbě adaptabilních větrolamů, k výběru vhodné druhové skladby v nepříznivých podmínkách a jejich optimálního prostorového a funkčního umístění v síti krajiny. Rovněž poskytuje informace o metodách stanovení erozní ohroženosti území a provádění návrhů ochranných opatření pomocí nově vyvinutých softwarových nástrojů (model WEM, modul větrná eroze v AtlasDMT), určených především projektantům pozemkových úprav, popřípadě zpracovatelům dalších krajinotvorných opatření. Erozní ohroženost zemědělských půd ČR je nyní nově hodnocena podle specializované mapy, certifikované MZe: „Ohroženost zemědělské půdy větrnou erozí se zohledněním vlivu trvalých vegetačních prvků“ (číslo osvědčení: 2021 MZe-66471/2021-11120) viz obr 1., kde je zohledněn vliv ochranných zón existujících vegetačních bariér.

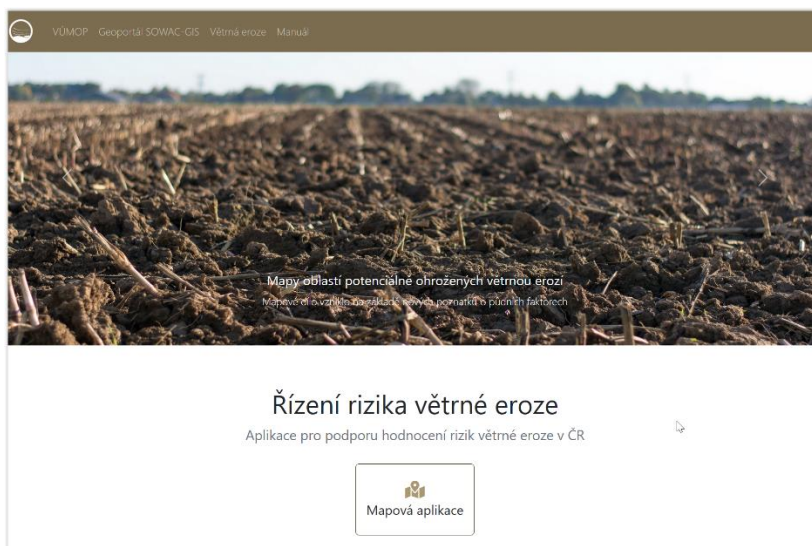
Odkaz: <https://knihovna.vumop.cz/records/22f3504c-3469-4eae-856b-5ea5c765e6b3>



**Obr. 1** Potenciální ohroženost zemědělské půdy větrnou erozí vyjádřená v kategoriích erozní ohroženosti

Webová aplikace je dostupná z: <https://vetrnaeroze.vumop.cz>

Hlavním přínosem modulu WEM (Obr. 2) je proto zpřístupnění všech relevantních a aktuálních podkladů pro hodnocení rizika větrné eroze v ČR. Dalším důležitým přínosem je zpracování v podobě mapové aplikace, která je uživatelsky přívětivá a jednoduchá. Třetím důležitým přínosem je možnost modelování větrolamů a jejich účinnosti, která pomůže najít vhodná řešení ochrany proti větrné erozi v konkrétních podmínkách. Právě na oblast rozhodování o výběru vhodných opatření na zmírnění negativních dopadů větrné eroze je zaměřen i prezentovaný model WEM. Jedná se o automatizovaný interaktivní webový mapový nástroj, který na základě půdních vlastností, klimatických charakteristik, větrných podmínek a vybraných parametrů zemědělských pozemků a větrolamů dokáže vyhodnotit ohroženost zájmového území z pohledu větrné eroze. Model WEM analyzuje území jak na úrovni jednotlivých pozemků a větrolamů, tak i na úrovni vyšších územních celků (krajů, ČR). Na úrovni vyšších územních celků, nebo celé ČR modul WEM umožňuje jednoznačně identifikovat oblasti podle míry rizika větrné eroze. K tomuto účelu obsahuje aktuální mapové podklady jednotlivých faktorů, které větrnou erozi zásadně ovlivňují, ale umožňuje i jejich syntézu pro jednodušší použití a interpretaci. To uživatelům poskytuje nezbytné podklady při rozhodování, na kterou oblast zacílit protierozní opatření např. v rámci pozemkových úprav, protože realizace protierozních opatření v nejvíce ohrožených oblastech přináší největší míru snížení rizika. V detailním pohledu modul umožňuje analyzovat důvody ohroženosti konkrétního pozemku a modelovat vliv některých opatření na jeho ohroženost větrnou erozí. Uživatel tak může zjistit, jestli jsou hlavním důvodem zvýšeného rizika půdní faktory a klimatické charakteristiky, nebo třeba délka a orientace pozemku vůči převládajícím erozně nebezpečným větrům. Modul WEM dále umožňuje modelovat vliv větrolamů o různých parametrech na erozní ohroženost pozemků. Uživatel tak může posoudit, jaký vliv na zvýšení ochrany pozemku bude mít realizace jednoho nebo více větrolamů.



**Obr. 2** Úvodní stránka se vstupem do mapové aplikace

**Aktuální vrstvy rizika větrné eroze**, které jsou obsažené v modelu WEM (Windbreak Efficiency Model) jsou součástí Územně analytických podkladů (ÚAP), které poskytuje Ministerstvo zemědělství (MZe) podle §26 stavebního zákona 183/2006 Sb., jako nástroj územního plánování, jehož cílem je průběžně monitorovat stav a vývoj území. Vyhláška č. 500/2006 Sb., o územně analytických podkladech, územně plánovací dokumentaci a způsobu evidence územně plánovací činnosti, dále v příloze č. 1 definuje seznam tzv. Datové báze územně analytických podkladů.

Větrná eroze je zde obsažena v jevu č.: 42a plochy vodní a větrné eroze.

Data ÚAP z resortu MZe: <https://www.agrigis.cz/data/download/download.html>

### **Nové přístupy k problematice větrné eroze v ČR:**

Hlavními výstupy projektu QK21010191 jsou: mapa půdního faktoru erodibility pro potřeby rovnice WEQ, mapa klimatického faktoru C pro potřeby rovnice WEQ, prostorové vymezení převládajících směrů větrů pro potřeby větrné eroze, vytvoření mapy faktoru L - délky pozemku a stanovení ztráty půdy větrnou erozí v t/ha/rok pro území ČR. Výsledky projektu budou dostupné na geoportálu VÚMOP a portálu <https://www.agrigis.cz> resortu MZe.

### **Závěr**

Problematika větrné eroze je velice komplikovaná a komplexní. Faktory, na kterých je závislá se mění v prostoru a čase. Pro běžného uživatele je prakticky nemožné získat a vyhodnotit všechny faktory, které jsou pro posouzení rizika větrné eroze relevantní (půdní faktory, klimatické charakteristiky, vlastnosti pozemků a vegetačních bariér).

Aktuální podoba hodnocení rizika větrné eroze v ČR, která je implementována v modulu WEM, je výsledkem více než 20 let výzkumu a vývoje v této oblasti ve Výzkumném ústavu meliorací a ochrany půdy, v.v.i. a spolupracujících subjektech (ČHMÚ, MENDELU, aj.). Vychází z aktuálních poznatků problematiky ve světě. Aplikuje je na specifické podmínky ČR, zejména v oblasti podrobnosti a dostupnosti relevantních dat (BPEJ, klimatická data ČHMÚ, LPIS, databáze větrných bariér). Data větrné eroze jsou pravidelně aktualizována a poskytována jako součást Územně analytických podkladů (ÚAP) podle stavebního zákona, pro potřeby územního plánování. Viz nepovinné informace. Webová aplikaci poskytuje informace o nových poznacích a postupech v problematice větrné eroze. Webová aplikace umožňuje využít automatizované a interaktivní nástroje. Tyto nástroje na základě půdních vlastností, klimatických charakteristik, větrných podmínek a vybraných parametrů větrolamů dokáží vyhodnotit ohroženost zájmového území z pohledu větrné eroze. Webová aplikace je určena širší skupině uživatelů, zejména odborné veřejnosti a projektantům pozemkových úprav. Na základě posouzení ohrožených území je možné definovat prioritní oblasti, kde je účelné navrhovat a postupně realizovat ochranná opatření. Výsledky hodnocení slouží k posouzení možnosti návrhu opatření ke zmírnění rizika větrné eroze ve vybraných územích. Základem je vždy vyhodnocení míry rizika pro posuzované území při uvažování vlivu současného stavu a při postupném zapojení všech navrhovaných opatření.

Výstupy řešení projektu QK21010191 přispějí k naplnění cíle programu zlepšením pozice ČR v ochraně životního prostředí a zvýšením konkurenceschopnosti. Konceptním řešením oblasti, vytipováním nejrizikovějších území z hlediska potřeb adaptace a ochrany před nepříznivými dopady klimatických činitelů (vítr, sucho), bude umožněno efektivní, ekonomicky i administrativně méně náročné řízení rozhodovacích procesů. Výsledky umožní plánování sledu investic zaměřených na snížení a omezení dopadů klimatické změny na životní prostředí a krajinu. Implementace výsledků projektu do procesu KoPÚ bude zajištěna prostřednictvím certifikačního garanta (Státní pozemkový úřad). Další uplatnění je uvažováno ve státní správě (MZe, MŽP), samosprávě (aktualizované územně analytické podklady). Ze strany MZe lze

vidět uplatnitelnost výsledků zejména v zemědělské praxi a také právě v oblasti poskytování aktuálních územně analytických podkladů.

## Literatura

- Borrelli, P., et al. (2016): Towards a pan-European assessment of land susceptibility to wind erosion. *Land Degradation & Development*, 27(4): 1093-1105, DOI: 10.1002/ldr.2318.
- Doležal, P., a kol., (2017): Řízení rizika větrné eroze. Certifikovaná metodika. Brno: VÚMOP, v.v.i.. Certifikační orgán: SPU, číslo osvědčení:2/2017 SPU/O.
- Falloon, P., Betts, R. (2010): Climate impacts on European agriculture and water management in the context of adaptation and mitigation—the importance of an integrated approach. *Science of the total environment*, 408(23), 5667-5687.
- Fryrear, D.W. et al. (2000): Revised wind erosion equation. *Ann. Arid. Zone* 2001, 40, 265–279.
- Janeček, M. a kol. (2012): Ochrana zemědělské půdy před erozí, metodika, Česká zemědělská univerzita Praha, Praha, 113 s., ISBN 978-80-87415-42-9.
- Pasák, V. (1966): Struktura půdy a větrná eroze. *Vědecké práce VÚMOP Praha*, s. 73–82.
- Podhrázká J., a kol., (2008): Optimalizace funkcí větrolamů v zemědělské krajině. VÚMOP, v.v.i.: Brno. Číslo jednací 17161/08-13070.
- Podhrázká J. a kol., (2011): Potenciální ohroženost zemědělské půdy větrnou erozí. Certifikovaná metodika, VÚMOP, v.v.i.
- Podhrázká, J., a kol. (2021): Zakládání a údržba větrolamů ve zhoršených pedoklimatických podmínkách. Certifikovaná metodika. Brno: VÚMOP, v.v.i.. Certifikační orgán: SPU, Číslo osvědčení:1/2022SPU/O
- Středová, H. et al. (2021): The road map to classify the potential risk of wind erosion. *ISPRS INT. J. GEO-INF.* 2021, 10, 269.
- Střešík J., et al. (2014): Increase of annual and seasonal air temperatures in the Czech Republic during 1961-2010. In: Rožnovský J. a Litschmann T. (Eds.). *Mendel and Bioclimatology. Conference proceedings*, Brno, 3rd-5rd Sep. 2014 [CD]. Brno: 2014. ISBN 978-80-210-6983-1.
- Štěpánek P., et al. (2016): Projection of drought-inducing climate conditions in the Czech Republic according to Euro-CORDEX models. *Clim Res* 70: 179-193.
- Trnka, M., et al. (2014): Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. *Nature Clim Change* 4, 637–643. <https://doi.org/10.1038/nclimate2242>
- Khel, T. a kol. (2017): Metodika hodnocení účinnosti a realizace větrolamů v krajině jako nástroj pro ochranu půdy ohrožené větrnou erozí. certifikovaná metodika č. 9/14130/mze-2017, 111 s. VÚMOP, v.v.i. ISBN 978-80-87361-70-2.
- Vrána, K. (1978): Stanovení intenzity větrné eroze v podmínkách ČSSR. Kandidátská dizertační práce. Praha: ČVU v Praze, 101 s.
- Woodruff, N. P., F. H. Siddoway. (1965): A Wind Erosion Equation. *Soil Science Society of America, Proceedings*, 29, 602-608.

## Poděkování

článek vznikl za podpory projektu NAZV QK21010191, QK1710197 a MZE č. RO0218

## Kontaktní adresa:

Ing. Josef Kučera

Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i.,

oddělení pozemkových úprav a využití krajiny

Lidická 25/27, Brno 602 00

Mob.+420 541 126 275

e-mail: [kucera.josef@vumop.cz](mailto:kucera.josef@vumop.cz)



*Název publikace:* **Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin  
a zpracování produktů**

*Druh publikace:* **Vědecká příloha časopisu Úroda 12/2022**

*Autoři publikace:* **Kolektiv autorů dle obsahu**

*Editoři:* **Ing. Barbora Badalíková  
Ing. Jakub Prudil**

*Náklad:* **5. 500 výtisků**

*Forma:* **flash disk**

*Vydal:* **Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko  
Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko  
a Úroda 12/2022**

---

**ISSN 0139-6013**