

2022



Tomáš Středa, Ivana Jovanović,
Natálie Březinová Belcredi, Tomáš Nováček,
Hana Středová, Jhonny Edison Alba Mejía, Radim Cerkal

TESTOVÁNÍ VITALITY SEMEN POLNÍCH PLODIN

METODIKA PRO APLIKOVANÝ VÝZKUM



Mendelova univerzita v Brně

Tomáš Středa, Ivana Jovanović,
Natálie Březinová Belcredi, Tomáš Nováček,
Hana Středová, Jhonny Edison Alba Mejía,
Radim Cerkal

TESTOVÁNÍ VITALITY SEMEN POLNÍCH PLODIN

METODIKA PRO APLIKOVANÝ VÝZKUM

2022

Oponenti

Ing. Jana Hajzlerová, Ph.D., SOUFFLET AGRO a.s.

Ing. Barbora Dobiášová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Autorský kolektiv

doc. Ing. Tomáš Středa, Ph.D.¹ (podíl na autorství 25 %),

Ing. Ivana Jovanović¹ (podíl na autorství 25 %),

Ing. Natálie Březinová Belcredi, Ph.D.¹ (podíl na autorství 10 %),

Bc. Tomáš Nováček¹ (podíl na autorství 10 %),

doc. Ing. Hana Středová, Ph.D.² (podíl na autorství 10 %),

Ing. Jhonny Edison Alba Mejía, Ph.D.¹ (podíl na autorství 10 %),

doc. Ing. Radim Cerkal, Ph.D.¹ (podíl na autorství 10 %).

¹ Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Zemědělská 1, 613 00 Brno

² Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav aplikované a krajinné ekologie, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Kontakt: streda@mendelu.cz

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství a je výstupem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QK1910197 „Strategie minimalizace dopadu sucha na udržitelnou produkci a sladovnickou kvalitu ječmene“.

Autoři děkují prof. Ing. Oldřichu Chloupkovi, DrSc. za cenné podněty při přípravě této metodiky.

Metodika byla certifikována Sekcí osiva, sadby a zdraví rostlin Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského vydáním osvědčení č. UKZUZ 242237/2022 ze dne 20. 12. 2022.

© Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7509-859-7 (online ; pdf)

DOI: <https://doi.org/10.11118/978-80-7509-859-7>



Open Access. This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 \(CC BY-NC-ND 4.0\) International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

ABSTRAKT

Testování vitality semen polních plodin

Do popředí zájmu se v rámci adaptačních opatření na vývoj klimatu v současnosti dostává šlechtění odrůd se zvýšenou tolerancí k abiotickým stresorům. Z pohledu tolerance k suchu je významnou růstovou fází již klíčení semen a následný vývoj klíčenců. Metody hodnocení klíčení jsou navrženy především do ideálních (laboratorních) podmínek, nicméně je přínosné znát reálné projevy semen v polních podmínkách, byť simulovaných. V tomto kontextu je testována schopnost semen vyklíčit za podmínek suboptimálních až stresových – tj. vitalita semen. Existuje předpoklad, že u genotypů s vitálnějšími semeny dojde, mimo jiné, ke zvýšení tolerance k suchu. Klíčenci z vitálnějších obiliek uniknou snáze případnému suchu v počátečních fázích vegetace, vytvoří rychleji kořenový systém a budou tak tolerantnější ke stresovým podmínkám i v dalších fázích vegetace. Hodnocení parametrů vitality semen má potenciál realizace ve šlechtitelských programech. Předchozí výsledky potvrzují významný genetický základ vitality a jsou předpokladem pro využití této vlastnosti semen jako selekčního kritéria ve šlechtění.

Standardně používané metody zjišťování vitality semen jsou zpravidla založeny na binárním přístupu – typicky v podobě: naklíčeno/nenaklíčeno. S rozvojem digitální optické techniky a digitální analýzy obrazu jsou vyvíjeny a úspěšně zaváděny metody exaktnějšího, detailnějšího a automatizovaného hodnocení vitality. Metody využívají pro hodnocení digitální skener a software pro digitální analýzu obrazu. Je tak umožněno precizní fenotypování odrůdových diferencí v rychlosti nárůstu biomasy kořenů nebo klíčku u značného počtu genotypů a jedinců. Získané fytometrické (morfometrické) charakteristiky mohou být konfrontovány s vybranými kvantitativními znaky produkce.

Aktivity ve výzkumu a šlechtění na zlepšení vitality jsou prozatím velice limitované, vzhledem ke kvantitativní (polygenní) povaze dané vlastnosti a absenci vhodných metod, které jsou doporučeny mezinárodní autoritou typu ISTA (International Seed Testing Association).

Klíčová slova:

vitalita semen, klíčení semen, abiotický stres, abiotické stresory, šlechtění, sucho

ABSTRACT

Seed Vigour Testing of Field Crops

The seed quality is of increasing importance due to global climate change. In rapidly changing climatic conditions seed vigour become increasingly important seed characteristics. The most-used method of assessing the quality of seeds is testing of seed germination (realized under laboratory conditions). Laboratory testing of quality characters of seed is usually carried out in ideal conditions (optimal temperature and air humidity). This characteristic of seeds indicates the ability to germinate in ideal conditions (i.e. potential of seeds). Nevertheless, for detecting the properties of the seeds is also important to test under field conditions or in conditions close to the situation in the field. Seed vigour is the ability of seeds to germinate under stress conditions (drought, low temperatures, the lack of nutrients, saline soils, heavy metals contamination etc.). At this point comes to the fore vigour of seeds to germinate under stressful conditions. Vigorous seeds are able to withstand stressful environmental conditions at an early stage of growth. High seed vigour is a precondition for fast and homogenous field emergence and good malting quality in barley. Seed vigour tests are divided into: tests based on germination, physiological and biochemical tests and multifactor tests. Most of them are based on the principle of simulation stress conditions. In any case, the ability of repeatability and reproducibility of methods are important. Standard method that is used at this time for the seed vigour evaluation, is confined to simple physiological binary fact germinated/non-germinated. The seed vigour is a polygenic trait, with prospects of improvement by traditional breeding methods. Nevertheless, the seed vigour was due to lack of appropriate methods in breeding programs neglected in the history.

Keywords:

seed vigor, seed vigour, seed germination, abiotic stress, abiotic stressors, plant breeding, drought

OBSAH

1	Úvod	6
2	Cíl metodiky	9
3	Přehled základních metod pro testování vitality semen dle metodik ISTA	10
3.1	Testy vitality semen doporučené ISTA (International Seed Testing Association)	11
3.1.1	Test elektrické konduktivity (Electrical Conductivity Test)	11
3.1.2	Test urychleného stárnutí (Accelerated Ageing Test)	12
3.1.3	Chladový test (Cold Test)	12
3.1.4	Test řízené deteriorace (test řízeného zhoršování jakosti; Controlled Deterioration Test)	13
3.1.5	Complex Stressing Vigour Test (CSVT)	13
3.1.6	Hiltnerův test (test laboratorní vzházivosti; Brick Gravel Test; Hiltner Brick Grit Test)	14
3.1.7	Biochemická zkouška životaschopnosti (Tetrazolium Test; tetrazoliový test; rychlý test životaschopnosti)	14
4	Příklady modifikací a praktické aplikace testů vitality semen v biologických experimentech	16
4.1	Relevantní vlastní předešlé výsledky i výsledky jiných autorů	16
4.2	Příklady vlastních experimentů s aplikací metody hodnocení vitality semen	18
4.2.1	Výsledky testování vitality semen za stresu suchem – ječmen jarní	18
4.2.2	Výsledky testování vitality semen za sucha a chladu, souvislosti s tvorbou kořenového systému – pšenice ozimá	22
4.2.3	Inovace hodnocení vitality semen – využití digitální analýzy obrazu	25
4.2.4	Výsledky testování vitality semen za sucha a chladu, souvislosti s tvorbou kořenového systému – ječmen jarní	30
4.2.5	Výsledky testování vitality semen za stresových podmínek – řepka olejná	33
4.2.6	Výsledky testování vitality semen za stresových podmínek – mák setý	42
5	Novost metody	46
6	Popis uplatnění certifikované metodiky	47
7	Ekonomické aspekty	48
8	Seznam použité související literatury	49
9	Seznam publikací, které předcházely metodice	52

1 ÚVOD

Do popředí zájmu zemědělského výzkumu a šlechtění se v rámci adaptačních opatření na současné klimatické podmínky prosazuje šlechtění odrůd se zvýšenou tolerancí k abiotickým stresorům. V této souvislosti je diskutovaným tématem i rozvoj testování kvality semen za účelem zvýšení biologické hodnoty osiv. Semena o vysoké kvalitě jsou schopná klíčit při větším rozpětí faktorů prostředí než semena s nízkou vnitřní kvalitou. Biologická kvalita semen často ovlivňuje růst kořenů i nadzemní části po celou dobu vegetace (Bláha a Bradová, 2014).

Jedním z hlavních znaků definujících vnitřní kvalitu osiva je standardně laboratorní klíčivost. Tato veličina je hodnocená podle mezinárodních pravidel ISTA (International Seed Testing Association) v Evropě a AOSA (Association of Official Seed Analysts) v USA, která zaručují mezinárodní srovnání a umožňují obchod s osivem. Mezinárodně uznávané postupy jsou potom implementovány národními autoritami pro certifikační proces osiv (v České republice Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ÚKZÚZ). Metody stanovení klíčivosti jsou konstruovány tak, aby měly vysokou úroveň reprodukovatelnosti a dostatečnou míru spolehlivosti. Hodnota klíčivosti udává potenciální schopnost semen dané partie klíčit a vytvořit novou rostlinu v optimálních (laboratorních) podmínkách – to je v optimálních teplotních, vlhkostních a světelných podmínkách, prostých výskytu patogenů a škůdců. Jedná se tak o testování potenciálu semen vytvořit životaschopného jedince – klíčenec.

Z pohledu aktuálních rizik intenzity a frekvence výskytu abiotických stresorů a jejich dopadů na rostlinnou produkci jsou v Evropě dominantním problémem půdní sucho a vysoké teploty, způsobující problémy u širokého spektra polních plodin. Pro redukcí dopadů těchto abiotických faktorů lze za nejúčinnější adaptační opatření považovat šlechtění nových odrůd. Perspektivním selekčním kritériem při výběru genotypů tolerantních k některým abiotickým stresorům, je vitalita semen (Ullmannová *et al.*, 2013).

Vitalita semen je obecně definována jako schopnost semen vytvořit klíčenec v suboptimálních podmínkách a vyjadřuje stupeň tolerance osiva k nepříznivým podmínkám při klíčení a vzcházení (Pazderů, 2013). ISTA od roku 1981 definuje vitalitu semen jako přirozenou vnitřní sílu zdravých semen, zabezpečující rychlé klíčení po zasetí a jeho úspěšné dokončení za rozmanitých přírodních podmínek. Chloupek (2008) definuje vitalitu semen jako potenciál semen pro rychlé a uniformní vzejití a vývoj normálního klíčenec za širokého spektra polních podmínek. Hampton (1995) definuje vitalitu jako souhrn vlastností semen, určujících úroveň aktivity semen během klíčení a vzcházení. Vitalita není jednoduše měřitelný znak, ale je často chápána jako komplex popisující několik charakteristik, které zahrnují rychlost a uniformitu klíčení a růstu, toleranci ke stresovým podmínkám po zasetí a udržení si vitality během skladování.

Hodnocení vitality semen, probíhající v simulovaných suboptimálních podmínkách, může zvýšit vypovídací schopnost laboratorních zkoušek v komparaci s reálnými provozními podmínkami. McKenzie *et al.* (1980) a Šťastný a Pazderů (2008) uvádějí významné korelace mezi polní vzcháživostí a výsledky laboratorních zkoušek vitality. Podobně Van de Venter *et al.* (1993) prokázali, že test vitality osiva pšenice s použitím nízké teploty průkazně koreloval s polní vzcháživostí. Ghassemi-Golezani

et al. (2008) zjistili při testování vitality řepky olejné průkazný vztah mezi vitalitou semen a mrazuvzdorností. Honsová (2019) uvádí, že se ve stresových podmínkách, v závislosti na vitalitě semen máku, projeví rozdíly v kvalitě osiva. V polních pokusech se projevila vliv vitality semen máku na polní vzcházivost. Pro toleranci rostlin k suchu prokázali Bertholdsson *et al.* (2009) především význam časné vitality kořenového systému. Vitalita semen určuje také rychlost a intenzitu růstu klíčku, což souvisí s rozvojem fotosyntetického aparátu a schopností odolávat tak lépe stresovým podmínkám.

Kromě vysokého procenta klíčivosti osiva je pro pěstitele důležitá uniformita a rychlost klíčení semen, dávající předpoklad vitálního klíčence, rovnoměrně vzcházejícího a brzy zapojeného porostu bez mezer s vysokým potenciálem konkurenceschopnosti vůči plevelům. K tomu může přispět vyšší odolnost vitálních semen vůči půdní hypoxii, než je tomu u semen s nízkou vitalitou, jak uvádí Hosnedl a Honsová (2002). Rostliny ze semen s dobrou vitalitou potom rychleji zastíní povrch půdy a tím sníží ztráty vody evaporací na počátku vegetace (Spielmeyer *et al.*, 2007). Pouze u vyrovnaných porostů lze účinně ošetřovat během vegetace a dosahovat vyrovnanější jakosti sklizeného zrna. Vitalita semen tak má podle Hamptona a Coolbeara (1990) zásadní význam u plodin, kde je důležité synchronní vzcházení pro získání porostu vyrovnaného a stejnoměrně dozrávajícího. Vitalita osiva je tak obzvláště důležitá v ekologickém zemědělství, kde nemůže být nevyrovnaný porost korigován použitím morforegulátorů.

Motivací zvýšeného zájmu testování vitality pro účely šlechtění, bylo prokázání její dědivosti (Ullmannová *et al.*, 2013). U genotypů s vyšší vitalitou semen je tak možné opakovanou selekcí dojít potomstev se zvýšenou vitalitou semen s možným efektem zvýšení tolerance k suchu. Výzkum a šlechtění na zvýšení vitality jsou však komplikované, vzhledem ke kvantitativní (polygenní) povaze dané vlastnosti, navíc výrazně ovlivňované podmínkami prostředí a absencí vhodných kodifikovaných metod testování vitality semen.

Mezi hlavní vnější faktory, které se podílí na modifikování vnitřní kvality semen s vlivem na parametry klíčení, patří podmínky prostředí během finálních fází vegetace rostliny a podmínky při uskladnění. Vitalitu semen, tak ovlivňuje i provenience a stáří osiva. Vnitřní kvalita semen je před plnou zralostí negativně ovlivňována kombinací opakovaného střídání teplot s vysokými srážkovými úhrny. To koresponduje se závěry Štastného a Pazderů (2008), kteří determinovali jako hlavní faktory variability kvality osiva interakci odrůdy a podmínek prostředí během vývoje semen. Kromě abiotických podmínek prostředí formují kvalitu semen podle Hosnedla (2009) i podmínky biotické a vlivy agrotechnické.

Stárnutí semen vede k postupnému snížení jejich vitality a poté i ke ztrátě životaschopnosti (McDonald, 1999). Ztráta životaschopnosti v důsledku stárnutí semen je spojována hlavně se ztrátou integrity cytoplazmatické membrány (Senaratna *et al.*, 1988). To je spojeno s četnými buněčnými a biochemickými změnami, hlavně zhoršení syntézy RNA a proteinů a také degradace DNA (Lehner *et al.*, 2008). Degradace buněčných membrán vede k perforaci buněčných organel a je tak možné případné vyluhování asimilátů do roztoku, jehož vodivost se tak zvyšuje. Na bázi tohoto fenoménu je založena jedna z metod stanovení vitality semen tzv. konduktometrický test (Chloupek, 2008).

Poškozená semena stárnou rychleji. Průběh stárnutí závisí na rostlinném druhu, odrůdě, vnitřní kvalitě semen, látkovém složení semen a na podmínkách prostředí (Hosnedl, 1999). Ke stárnutí semen může dojít již na mateřské rostlině v období mezi dosažením maximální hmotnosti semen a opožděnou sklizní, během období s výskytem vysokých teplot a vysoké vzdušné vlhkosti, s možným výskytem porůstání semen. Při skladování za vyšší vlhkosti semen se urychluje produkce volných radikálů, které poškozují membrány semen. Během stárnutí dochází k peroxidaci lipidů, které se běžně vyskytují v membránách semen. Dochází také k degradaci DNA (McDonald, 2000), což vede k chybné transkripci a následné chybné syntéze enzymů, nutných pro počáteční fáze klíčení. Bez aktivity příslušných enzymů se nemohou hydrolyzovat zásobní látky (např. lipidy a škrob), čímž nemohou poskytnout energii pro syntézu ATP s dopadem na schopnost semen klíčit.

2 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je (i) inventarizace základních metod, nejčastěji používaných pro hodnocení vitality semen polních plodin světovou semenářskou praxí, stejně jako v rámci experimentálních studií, (ii) detailní specifikace pro standardizaci simplifikovaných postupů hodnocení vitality semen polních plodin, včetně variantních řešení, (iii) prezentace exaktní metody hodnocení vitality semen pomocí hodnocení klíčenců metodou digitální analýzy obrazu, (iv) prezentace možných postupů následného hodnocení vitality semen polních plodin, (v) uvedení příkladů úspěšné aplikace metod v zemědělském výzkumu.

Popsat tak nejen klasické metody hodnocení vitality semen, ale i modifikované postupy, které byly vyvíjeny a v posledních letech úspěšně otestovány na Mendelově univerzitě v Brně. Odbornou veřejnost a zemědělskou praxi tak informovat o možnostech využití hodnocení vitality semen za použití inovativních metod pro redukci dopadů změny klimatu na rostlinnou produkci.

3 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH METOD PRO TESTOVÁNÍ VITALITY SEMEN DLE METODIK ISTA

Za mezinárodně uznávanou autoritu v oblasti hodnocení „technické kvality osiv“, respektive semenářské hodnoty osiva, je celosvětově považována Mezinárodní asociace pro testování osiva (ISTA, International Seed Testing Association, <https://www.seedtest.org>), založená v roce 1924 v Cambridge ve Velké Británii. V současné době sdružuje přes 200 členů ve více než 70 zemích světa. Primárním smyslem vzniku a existence organizace, mající ve svém logu motto „Uniformity in seed testing“ pro „Jednotnost v kvalitě osiva po celém světě“, je vývoj a doporučování jednotného mezinárodního systému testování osiva pro možnost bezproblémového mezinárodního obchodu s osivy. ISTA tak kontinuálně vyvíjí, přizpůsobuje a zveřejňuje standardizované postupy pro odběr vzorků a testování semen a iniciuje používání těchto postupů pro hodnocení semen. Každoročně ISTA publikuje více či méně modifikovaná International Rules for Seed Testing (Mezinárodní pravidla pro zkoušení, ISTA pravidla), koordinuje mezinárodní vědecký časopis „Seed Science and Technology“ a vydává tematické příručky (pro hodnocení vitality je prozatím poslední verzi Handbook of Vigour Test Methods, 3rd Edition, 1995). Rozvoj spolehlivých metod pro testování kvality osiv, realizovaný dvaceti výbory, včetně „Vigour Committee“, představuje základní pilíř aktivit organizace.

Přestože jsou testy vitality používány v biologických experimentech cílených na identifikaci reakcí semen na stresové podmínky a v určité míře jsou realizovány osivářskou praxí (testy vitality jsou velice rozšířeny v USA – např. stresové chladové testy jsou běžně používány mnohými šlechtitelskými firmami u kukuřice), byly až na základě výstupů kongresu ISTA 2001 testy vitality zařazeny do ISTA Rules for Seed Testing. TeKrony (2001) uvádí, že testy vitality již v roce 2001 užívalo přes 62 % semenářských laboratoří ISTA, 16 % laboratoří rutinně, přičemž ISTA aktuálně ve světě registruje více než 130 akreditovaných laboratoří. Stejný autor (TeKrony, 2003) nicméně poukazuje na nutnost rigoróznějšího definování a dodržování striktních metodik pro stanovení vitality, podobně jako je tomu u testování klíčivosti semen. V České republice je vitalita osiva pouze doplňkové stanovení k základním kvalitativním parametrům osiva, které jsou stanovené vyhláškou 129/2012 Sb. (Vyhláška o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu), a jejich stanovení je povinné pro uvádění osiva do oběhu. Stanovení vitality osiva tedy není legislativně vyžadováno a nejsou tak stanoveny limity vitality osiva pro jednotlivé druhy plodin. V minulosti bylo populárním stanovení konduktivity výluhu hrachu, jako ukazatel vitality osiva, pro velmi časně výsevy zahradního hrachu. Laboratoř osiv ÚKZÚZ toto stanovení provádí na žádost dodavatele osiva. V posledních letech však o tyto i další zkoušky vitality není ze strany semenářské praxe zájem (Dobiášová a Gregorová, 2022).

Z obecného hlediska by testy pro hodnocení vitality měly splňovat požadavky na:

- poskytování relevantních výsledků z hlediska semenářské hodnoty osiva,
- objektivitu výstupů při adekvátní rychlosti jejich dosažení,
- jednoduchost realizace,
- ekonomickou nenáročnost,
- snadnou reprodukovatelnost a interpretaci výstupů,
- adekvátní souvislost s výsledky, dosaženými v reálných (polních) podmínkách.

Principiálně lze základní metody stanovení vitality semen rozdělit do několika skupin. Pro experimentální účely či v rámci podpůrného testování je možná modifikace metod dle konkrétních podmínek a požadavků. Pro účely semenářské praxe nebo obchodu s osivy, je-li definováno pro daný druh testování vitality pravidly ISTA, jako je tomu aktuálně např. u hrachu zahradního, sóji či fazolu, kde doporučila ISTA hodnocení vitality osiva pomocí měření vodivosti výluhu ze semen konduktometricky, je řešením aplikování platných metodik.

Preference při výběru konkrétní metody je potom závislá na vlastnostech testovaného materiálu, cíli hodnocení, materiálním vybavení laboratoře a dalších faktorech. Hosnedl (2002) dělí metody hodnocení vitality semen dle jejich principu na: (i) test růstu a vývinu kořínku – hodnocení kvantitativních parametrů kořínku klíčících rostlin po stanoveném časovém období, (ii) Hiltnerův test (test laboratorní vzháživosti) – klíčení v substrátu cihlové drti nebo písku v hloubce odpovídající hloubce setí, (iii) chladový test kukuřice, (iv) konduktometrický test vodivosti výluhu, (v) test urychleného stárnutí, (vi) test řízené deteriorace (stárnutí), (vii) topografický a aleuronový tetrazoliový test.

3.1 Testy vitality semen doporučené ISTA (International Seed Testing Association)

3.1.1 Test elektrické konduktivity (Electrical Conductivity Test)

Ztráta vitality semen začíná degradací buněčných membrán, přičemž dochází ke snižování syntézy ATP a respirace. Poškození membrán vede k vyluhování elektrolytů do roztoku, jehož vodivost se zvyšuje. Test konduktivity se stanovuje z elektrické vodivosti výluhu a získána hodnota se vyjadřuje v jednotkách, $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (Chloupek, 2008). Mimo luskoviny na zrno jako hrách zahradní, sóju či fazol doporučuje ISTA použití metody nově i u ředkve (Mavi *et al.*, 2014) s tím, že tato práce naznačuje, že test elektrické konduktivity může být použitelný i na jiné druhy dvouděložných.

Popis stanovení

Pro stanovení je potřeba 50 semen na jedno opakování. Opakování se realizují čtyři. Semena se před analyzováním přesně zváží a z partie semen se stanoví jejich počáteční vlhkost. Následně se analyzovaná semena dají na 24 hodin do 250 ml destilované vody při teplotě 20 °C s tolerancí ± 2 °C. Po 24 hodinách se konduktometrem změří vodivost výluhu ze semen a destilované vody tak, aby konduktivita všech připravených vzorků byla změřena během 15 minut. Získána hodnota se přepočte dle vzorce zohledňujícího hmotnost analyzovaných semen, když výsledky testu konduktivity mohou být ovlivněny velikostí semen (semena větší velikosti vyluhují více elektrolytů než semena menší, i když jsou stejné kvality). Proto jsou výsledky naměřené konduktivity finálně interpretovány v gramech. Vzorec pro přepočet konduktivity vychází z rozdílu vodivosti výluhu a destilované vody, který se následně podělí hmotností semen. Semena vitální dosahují nízké hodnoty konduktivity (dáno nízkým poškozením buněčných membrán), narozdíl od semen s nízkou vitalitou (Hampton *et al.*, 1995).

Konduktometrická metoda pro stanovení vitality není bezesbytku vhodná pro všechny druhy plodin. U některých druhů zelenin bylo zjištěno, že přítomnost

semipermeabilní membrány brání ve vyluhování elektrolytů. Některé genotypy sladké kukuřice mají vyšší náchylnost k poškození při sklizni a sušení než jiné genotypy stejného druhu, díky přítomnosti tenčího perikarpu. To může výsledky v rámci druhu zkreslovat, když úroveň mechanického poškození semen může vést k nižší přesnosti testu konduktivity při hodnocení vitality (Elias *et al.*, 2012).

3.1.2 Test urychleného stárnutí (Accelerated Ageing Test)

Test urychleného stárnutí patří do snadno realizovatelných a reprodukovatelných testů, o čemž svědčí jeho uplatnění u širokého spektra plodin. Původní doporučení ISTA pro uplatnění tohoto testu se vztahovalo na sóju, ale časem byla tato metoda aplikována i u jiných plodin (viz Tab. 1).

Popis stanovení

U testu urychleného stárnutí je potřeba vždy respektovat druhově specifické parametry testovací teploty, aplikovat doporučenou dobu vystavení vyšší teplotě a reflektovat konečnou vlhkost senescentních semen (Hampton *et al.*, 1995; Chloupek, 2008; Elias *et al.*, 2012). Pro korektní realizaci stanovení je potřeba nejdříve stanovit vlhkost partie testovaných semen, která by měla být u obilovin 10–14 %. Poté je použit plastový box, který je naplněn destilovanou vodou. Nad hladinu vody je umístěna síť, na kterou jsou naskládána semena. Semena v boxu jsou umístěna do klimaboxu s konstantní teplotou 41–45 °C s tolerancí $\pm 0,3$ °C na dobu zpravidla 72 hodin (rozdílné podle rostlinného druhu). Po této době se opět stanoví vlhkost, která by měla být u obilovin zpravidla 27–30 %. Na takto kultivovaná semena se následně aplikuje standardní test klíčivosti. Tento test by měl simulovat dlouhodobé skladování semen a ověřit následnou schopnost semen vyklíčit. Výstupem je konfrontace testu klíčivosti před urychleným stárnutím a klíčivost po urychleném stárnutí, přičemž je hodnocen počet vyklíčených semen v obou variantách. Při nižších hodnotách klíčivosti po urychleném stárnutí je očekávána horší skladovatelnost osiva.

3.1.3 Chladový test (Cold Test)

Setí do studené (výrazně suboptimální teplota půdy), převlhčené půdy (riziko hypoxie či anoxie), je spojováno s problematickým klíčením semen, nízkou a pomalou polní vzcházivostí a nevyrovnaností porostu. V konečné fázi se tento neuspokojivý stav z počátečních fází vegetace může výrazně promítnout do redukce výnosu biomasy, zejména v oblastech mírného pásma, kde se porosty jařin zakládají brzy na jaře. Chladový test byl vyvinut a je aplikován pro testování osiva za účelem simulace těchto problematických podmínek. ISTA chladový test doporučuje a aplikuje u kukuřice.

Popis stanovení

Pro realizaci pokusu jsou třeba archy standardního filtračního papíru. Na polovinu archu se nanese zemina z pole po sklizni kukuřice. Zemina musí být odebrána na podzim a musí být skladována v chladu a vlhku. Následně se musí přesít přes síto s velikostí ok 3 mm a navlhčit. Poté se umístí semena na polovinu archu, kde je zemina, do dvou řad po 25 kusech. Semena a půda se překryjí druhou polovinou filtračního papíru.

Následně se papír stočí tak, aby bylo možné jeho středem vést knot. Celý vzorek se vloží do polyetylenového sáčku tak, aby v něm nebyl knot uzavřen, a umístí se ve vertikální poloze do nádoby s destilovanou vodou tak, aby filtrační papír nebyl ponořen. Ponořen do vody musí být pouze knot kvůli nasávání vody. Testování probíhá standardně po dobu 10 dnů při teplotě 6 °C. Tento pokus je dle metodiky prováděn ve čtyřech opakováních. Při vyhodnocení se kontrolují počty normálně vyvinutých klíčenců.

3.1.4 Test řízené deteriorace (test řízeného zhoršování jakosti; Controlled Deterioration Test)

Původně byl test řízené deteriorace vyvinut za účelem identifikace osiva s nízkou semenářskou hodnotou a skladovacím potenciálem především u některých druhů zelenin. Principiálně se test řízené deteriorace (test řízeného zhoršování, degenerace) výrazně podobá testu urychleného stárnutí. Samotný test řízené deteriorace má různé modifikace s ohledem na testovaný rostlinný materiál. Níže je tak popsán jen obecný princip, bez detailní specifikace.

Popis stanovení

Semena jsou kontrolovaně a záměrně poškozována působením fyzikálních faktorů s biochemickými dopady popsány v kapitole Úvod. Poškození vnitřní kvality semen se docílí pomocí zvýšené teploty a vlhkosti, důležitým faktorem je i délka trvání působení stresorů. Nejčastěji se na testovaná semena, umístěná v polyetylenových sáčcích, působí teplotou vzduchu 40–45 °C po dobu 24–48 hodin, což záleží na druhu osiva, při současně, předem dosažené vlhkosti semen 18–21 %. Test je v podstatě založen na známé křivce přežití semen (seed survival curve – viz. např. Powell a Matthews, 2005). Po aplikaci podmínek testu byly identifikovány u vzorků semen s původně stejnou klíčivostí výrazně odlišné diference, a to jak v rámci odrůdových rozdílů, tak i v rámci srovnání partií.

3.1.5 Complex Stressing Vigour Test (CSVT)

Test pro hodnocení vitality semen CSVT byl původně vyvinut a optimalizován pro účely testování semen pšenice, následně byl modifikován pro kukuřici. Primárním cílem bylo získat pomocí testu informace o potenciálu polní vzházivosti v podmínkách stresu. Metoda byla designována na základě stresových agroekologických podmínek, vyskytujících se v Maďarsku (Szirtes *et al.*, 1981).

Popis stanovení

Namáčením semen po dobu 48 hodin při teplotě 20–25 °C a poté dalších 48 hodin při nízkých teplotách 2–5 °C dochází k navození podmínek stresu hypoxií. Proces vede k iniciaci biochemické aktivity uvnitř semen, ale v důsledku hypoxie jsou tyto procesy zpomaleny nebo úplně zastaveny. Na membránách semene dochází ke ztrátě fyziologické a biochemické aktivity, přičemž ve výsledku dojde k vyluhování obsahu buňky.

Založení experimentu se potom provádí buď s 50 semeny pšenice nebo s 25 semeny kukuřice, umístěnými mezi dvě vrstvy filtračního papíru, nebo se filtrační papír svinuje do ruličky, standardně ve čtyřech opakováních. Vzorky jsou umístěny do prostředí se

stálou teplotou 20 °C (pšenice), respektive 25 °C (kukuřice) bez přístupu světla. Po uplynulé době se zhodnotí počet normálních, abnormálních a nevyklíčených semen. Podle délky klíčenců se určí počet vysoce, průměrně a níže vitálních semen. Tato metoda se používá pro dimenzování výše výsevu v Maďarsku od roku 1982.

3.1.6 Hiltnerův test (test laboratorní vzcházivosti; Brick Gravel Test; Hiltner Brick Grit Test)

Hiltnerův test je historicky prvním definovaným testem vitality semen, popsáným již před více než 100 lety (1911). Původním záměrem testu byla identifikace klíčnicích a vzcházejících rostlin infikovaných fuzariózami (infekce a riziko přenosu tohoto patogenu osivem). Semena nakažená fuzariózou a nadto mechanicky poškozená, ztrácí během klíčení schopnost odolávat standardním nepříznivým vlivům v polních podmínkách. Test je realizován v substrátu cihlové drti nebo v písku (z důvodu jejich sterility). Semena jsou zaseta do standardní hloubky do substrátu a zkoumá se jejich vzcházivost v porovnání se standardně realizovanou zkouškou klíčivosti (Heydecker, 1972). ISTA doporučuje použití Hiltnerova testu pro kukuřici, pšenici, ječmen, oves a žito.

Popis stanovení

V experimentu se používá navlhčená cihlová drť o maximální velikosti částic 2–3 mm nebo navlhčený sterilní písek. Test se provádí při teplotě 20 °C s tolerancí ± 0.5 °C po dobu 14 dnů. Po uplynulé testovací době se spočítají klíčenci, kteří prorazili cihlovou drť a pronikli tak nad její povrch.

3.1.7 Biochemická zkouška životaschopnosti (Tetrazolium Test; tetrazoliový test; rychlý test životaschopnosti)

Princip metody spočívá v detekci živých pletiv embrya semen. Standardně je test prováděn u kukuřice, pšenice, ovsu, žita a ječmene.

Popis stanovení

Princip metody spočívá v zabarvení životaschopných pletiv do červena prostřednictvím působení činidla tetrazoliová červeň, používaného v biochemii pro měření aktivity dehydrogenáz a ve vitálním barvení k detekci živých buněk skrze redukci tetrazolia na formazan. K obarvení se tak používá 1% 2,3,5,-trifenyltetrazoliumchlorid (TTC), nebo 2,3,5-trifenyltetrazoliumbromid (TBD). Tyto látky reagují s vodíkem, který je odštěpený dehydrogenázami. Dehydrogenace neprobíhá v mrtvém pletivu, a proto u nich nedojde ke změně zbarvení.

Pro test biochemické zkoušky životaschopnosti je potřeba 100 semen, která se nechají navlhčit. Doba a podmínky procesu vlhčení se liší podle druhu, nicméně pro orientaci, podle ISTA se semena nechávají vlhčit 6–18 hodin. Následně se semena rozpůlí, nebo se vypreparuje embryo. Poté se semena nechají saturovat roztokem TTC. Doba a čas potřebný k zbarvení embrya se liší podle koncentrace TTC roztoku. Při 1% koncentraci je standardem doba 6–24 hodin při teplotě 30 °C. Po uplynutí tohoto času se zkoumají obarvené části embrya – plocha a intenzita červeně obarvených

částí – životaschopná jsou ta semena, která se obarví úplně, nebo jsou obarveny životně důležité části.

Tab. 1 Souhrn základních metod pro stanovení vitality semen popsanych a doporučených ISTA k používání

Název testu	Plodiny doporučené k testování	Omezení testu
Test elektrické konduktivity	Obecně luštěniny, standardně: Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.) Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> L.) Fazol obecný (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Bob obecný (<i>Vicia faba</i> L.) Cizrna beraní (<i>Cicer arietinum</i> L.)	U mechanicky poškozených semen dochází ke zvýšenému vyluhování látek (je potřeba je vyřadit, což je zatíženo výraznou subjektivitou).
Test urychleného stárnutí	Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> L.) Slunečnice (<i>Helianthus annuus</i> L.) Fazol obecný (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Čirok (<i>Sorghum bicolor</i> L.) Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L.) Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.) Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.)	Je nezbytné striktní respektování předepsaných postupů ISTA při provádění zkoušky z důvodů její výrazné senzitivity na modifikaci podmínek.
Chladový test	Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> L.) Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.) Čirok (<i>Sorghum bicolor</i> L.) Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.)	Limitovaná precizní standardizace metody (využití zeminy jako substrátu představuje limitující faktor z důvodu její výrazné heterogenity).
Test řízené deteriorace	Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.) Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L.) Tolice vojtěška (<i>Medicago sativa</i> L.) Jílek (<i>Lolium perenne</i> L.) Kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	Možná poměrně široká variabilita způsobů založení pokusu.
Complex Stressing Vigour Test (CSVT)	Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.) Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Diskutabilní aplikovatelnost výstupů testu v širším spektru prostředí (zemí) – test poměrně úzce agroekologicky specializovaný.
Hiltnerův test (test laboratorní vzcházivosti)	Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.) Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.) Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Oves setý (<i>Avena sativa</i> L.) Žito seté (<i>Secale cereale</i> L.)	Test značně časově náročný, vyžaduje větší prostor pro samotnou realizaci.
Biochemická zkouška životaschopnosti	Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.) Oves setý (<i>Avena sativa</i> L.) Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Žito seté (<i>Secale cereale</i> L.) Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.) Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> L.)	Test vyžaduje zkušenost při preparaci embryí, případně pūlení semen. Výsledek není závislý jen na aktivitě enzymu dehydrogenázy, ale i na dalších faktorech (poškození mrazem...), a proto je potřeba, zohlednit i intenzitu zabarvení pletiva.

4 PŘÍKLADY MODIFIKACÍ A PRAKTICKÉ APLIKACE TESTŮ VITALITY SEMEN V BIOLOGICKÝCH EXPERIMENTECH

4.1 Relevantní vlastní předešlé výsledky i výsledky jiných autorů

Je zřejmé, že mimo genetického základu (druhové a genotypové difference) má na vitalitu semen dominantní vliv průběh počasí v průběhu vegetace, zejména v její terminální fázi, respektive vliv lokality v širším slova smyslu. Chloupek *et al.* (1997) zjistili průkaznou korelaci mezi množstvím srážek, vitalitou a klíčovostí semen u osmi odrůd ječmene jarního, pěstovaného na osmi lokalitách. Nedostatek vláhy v květnu pravděpodobně způsobil vývojové vady v zrnu před opylením, což mělo za následek snížení vitality. Na variabilitě znaků se nejvyšší měrou podílela lokalita. Obdobně, Hofbauer *et al.* (2011) zjistili u žita lesního významný negativní vztah mezi teplotou vzduchu v první dekádě července a parametry klíčovosti semen. Významně negativní vliv byl zjištěn mezi relativní vzdušnou vlhkostí ve třetí dekádě května a klíčovostí semen. V experimentu Ullmannové (2013) se vyšší srážkové úhrny v červenci, respektive úhrny v červnu a červenci, tedy těsně před sklizní, projevíly snížením vitality sklizených obilek ječmene. Vyšší teploty vzduchu v dubnu až červenci vitalitu významně zvyšovaly. Vlivy hlavních faktorů na celkovou proměnlivost vitality obilek byly kvantifikovány takto: vliv lokality 32 %, ročníků 19 % a genotypů 8 %. Samarah and Alqudah (2011) studovali vliv stresu pozdního sucha (během fáze tvorby zrna) na klíčení a vitalitu semen ječmene. Sucho během fáze tvorby zrna nemělo vliv na klíčovost, ale vitalita semen byla nižší. Přinejmenším u obilnin zjištění ukazují na průkazný vliv meteorologických faktorů, teploty, srážkových úhrnů a vlhkosti vzduchu, v průběhu zrání semen na vitalitu semen.

Experimentálně bylo v agroklimatických podmínkách České republiky u pšenice prokázáno (Bláha *et al.*, 1993), že zárodečné kořeny rostliny z obilek z kukuřičné a teplejší řepařské oblasti rychleji pronikaly do půdy a podíl hmoty kořenů root:shoot byl u mladých rostlin vyšší. To naznačuje možný efekt provenience osiva (původu osiva z hlediska jeho produkce) na znaky, které je možno považovat za znaky vitality semen (rychlejší růst a vývin zárodečných kořínků). Z identického geografického regionu potvrzuje i Prokinová (2016), že vliv lokality na kvalitu osiva byl prokázán při hodnocení vitality a analyzované znaky se v rámci sedmi hodnocených lokalit v dlouhodobém hodnocení značně lišily. Výrazný vliv provenience osiva obilnin uvádí Ehrenbergerová (2014) s tím, že provenience osiva má prokazatelný vliv na jakost stejného osiva vypěstovaného v různých agroekologických podmínkách (rozdíly v parametrech 3 až 22 %). Efekt provenience tak může být větší než rozdíly odrůdové. V této souvislosti Chloupek *et al.* (2008) použili test vitality u semen ječmene jarního (7–8 odrůd ječmene, 7–8 lokalit, ze 7 let pěstování), která klíčila v podmínkách uměle navozeného vodního stresu -2 bary (tj. -0,2 MPa) a při teplotě 10 °C po dobu 4 a 7 dnů. Zjistili, že čím nižší byla vitalita semen, tím nižší byl relativní vliv provenience a vyšší vliv odrůdy a vyšší byla interakce mezi odrůdou a lokalitami. Dopad vlivu odrůdy na vitalitu semen byl vyšší ve špatných letech a vliv provenience osiva byl vyšší v dobrých letech. Vliv provenience na vitalitu semen byl u všech experimentů průkazný.

Všechna výše uvedená fakta v podobě potenciálu osiv s vyšší vitalitou podnítily Ullmannovou *et al.* k myšlence perspektiv šlechtění na vyšší vitalitu semen. To bylo ověřeno v rámci rozsáhlého experimentu se dvěma rodiči a více než stovkou dihaploidních linií ječmene jarního, vzešlých nakřížením rodičů. Ullmannová (2013), Ullmannová *et al.* (2013a) a Ullmannová *et al.* (2013b) tak uvádějí, že hodnoty vitality semen potomstev, kultivovaných v podmínkách sucha a nízké teploty (-0,2 MPa a 10 °C), se nacházely převážně mezi hodnotami vitality rodičů. Část potomstev (29 dihaploidních linií) překonala ve své výkonnosti (vitalitě semen) lepšího z obou rodičů. Naměřené hodnoty (vitalita potomstva versus vitalita rodičů) svědčí o aditivním působení genů obou rodičů ve sledovaném souboru, protože se nacházely mezi naměřenými hodnotami rodičů. Tento genetický vliv (vliv genotypu 8 %) byl vyšší, než uvádí pro výnos zrna ječmene Laiding *et al.* (2008) v rozsáhlých oficiálních pokusech v Německu (vliv genotypu 3,5 %). To opravňuje k názoru, že je vliv genotypu dostatečně vysoký pro úspěšné šlechtění na vyšší vitalitu obilek.

Bylo identifikováno několik genů souvisejících s vitalitou semen, ale jejich detekce pomocí vhodných markerů je problematická. Finch-Savage *et al.* (2016) vysvětluje, že difference ve vitalitě semen ovlivňuje i výběr mateřské rostliny, růstové podmínky jejího vývoje, fyziologická zralost semen při sklizni, vlhkost semen a teplota při uskladnění.

Pro výzkum vitality semen a možnosti jejího šlechtění je nepostradatelná dostupnost vhodných metod jejího testování. Mimo metody doporučené ISTA a představené v kapitole „Přehled základních metod pro testování vitality semen dle metodik ISTA“ jsou tak neustále hledány, vyvíjeny a optimalizovány nové metody hodnocení vitality semen, ze kterých mohou potenciálně vzejít mezinárodně uznávané a kodifikované postupy. Existují aktuální studie, které popisují ve výzkumu metody použitelné pro objektivní, replikovatelné, rychlé a nenáročné stanovení



Obr. 1 Příklad využití software pro digitální analýzu obrazu pro hodnocení vitality semen (software Vigor-S). Software analyzuje, mimo jiné, délku koleoptile, délku kořenů, poměr délky koleoptile a kořenů

Zdroj: Marcos-Filho (2015)

vitality semen, včetně možné aplikace pro fenotypování perspektivních genotypů či jedinců (Obr. 1). Z metodicky nejnovějších prací tak např. Longlong *et al.* (2021) našli za použití elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) u přirozeně stárnuoucích semen rýže vazbu mezi vitalitou, obsahem vody a impedancí semen. Práce Marcos-Filho (2015) ukazuje na souvislosti mezi obsahem chlorofylu v semeni a jeho vitalitou. Pokud nedojde k degradaci chlorofylu během zrání semen, jeho účinek se negativně projeví na vitalitě semene.

Moderní instrumentální metody pro testování vitality využívají pokročilé nástroje pro fenotypování. Anandan *et al.* (2020) použili metodu fenotypování pro ranou detekci vitality u rýže. Metoda je založená na principu softwarové analýzy digitálního obrazu. Předností metody je sofistikované zachycení, zobrazení a analýza dynamiky vývoje klíčence v raných stádiích růstu a vývinu a precizní identifikace diferencí mezi genotypy.

4.2 Příklady vlastních experimentů s aplikací metody hodnocení vitality semen

Výzkumný tým z Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně dlouhodobě (po několik dekad) využívá různé metody hodnocení vitality semen v experimentech a při šlechtitelském výzkumu. Metody nejen aplikuje, nýbrž i modifikuje a optimalizuje, případně vyvíjí. V kapitole jsou představeny některé příklady úspěšného použití metod hodnocení vitality semen pro různé cíle zkoumání. Rozšířena a akcentována je metodická část experimentů pro možnost jejich reprodukovatelnosti a využití širokou odbornou veřejností. I když se popisované metody zpravidla principiálně zabývají hodnocením částí klíčící rostliny, v experimentech použitá metodologie se liší od metodik definovaných a používaných ÚKZÚZ pro stanovení klíčivosti a životnosti semen.

4.2.1 Výsledky testování vitality semen za stresu suchem – ječmen jarní

Cílem studie bylo kvantifikovat vliv stárnutí osiva na vybrané parametry klíčení sladovnického ječmene a ověřit inhibiční efekt máčecích vod s vysokou salinitou a opakovaného použití máčecích vod na klíčení sladovnického ječmene. Semena genotypů s vyšší vitalitou by mohla inhibičnímu fenoménu či zasolení máčecích vod lépe čelit.

Materiál a metodika

Zrno ze sklizně 2016 bylo získáno ze tří agroekologicky odlišných lokalit Hradec nad Svitavou, Věřovany a Vysoká. Experimentálním materiálem bylo deset standardních komerčních odrůd ječmene, registrovaných v České republice (Bojos, Francin, KWS Amadora, KWS Irina, Laudis 550, Manta, Overture, Sebastian, Tango, Vendela). Testy (energie klíčení EK, rychlost klíčení RK a index klíčení IK; Šottníková *et al.*, 2011) proběhly po ukončení dormance v roce 2016. Zrno bylo poté uloženo ve vakuu do polyetylenových sáčků a skladováno při teplotě ~4 °C. V roce 2022 byly experimenty zopakovány. Testovaná semena byla umístěna do 90 mm plastových sterilních Petriho misek na dvě vrstvy standardního filtračního papíru (gramáž 80 g/m²), průměr



Obr. 2 Semena v Petriho miskách

Zdroj: autoři

Obr. 3: Vykličaná semena po 48 hodinách

Zdroj: autoři

kruhového výseku filtračního papíru 85 mm, a navlhčena 4 ml vody na 1 Petriho misku (ukázka z obdobného experimentu na Obr. 2). Do každé Petriho misky bylo umístěno 100 semen, experiment byl realizován ve třech opakováních. Petriho misky byly umístěny do klimaboxu, do tmy, teploty 14 °C a relativní vzdušné vlhkost 85 % ± 5 %. Vizuální hodnocení bylo provedeno po 24, 48 a 72 hod ± 1 hod. Korektně klíčící semena byla identifikována dle manuálu Psota *et al.* (1998) a v termínech hodnocení odebírána z Petriho misek (Obr. 3).

Varianty experimentu:

1. Kontrolní varianta (KO): semena byla navlhčena destilovanou vodou.
2. Varianta napouštěcí voda (SV): semena byla navlhčena vodou z podzemního vrtu, kterou komerční sladovna běžně používá k máčení sladu. Voda byla analyzována přístrojem 4510 Conductivity Meter (Jenway™). Detekován byl vysoký obsah solí, elektrická vodivost (EC) 1577 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, tj. dle klasifikace Rhoades (1992) kategorie II – mírně slaná.
3. Varianta máčecí voda 1 (NV1): testovaná semena byla navlhčena použitou vodou z první fáze máčecího procesu sladovnického ječmene.
4. Varianta máčecí voda 2 (NV2): semena byla navlhčena použitou vodou z druhé fáze máčecího procesu sladovnického ječmene.

Výsledky

Po šestiletém skladování zrna v prostředí vakua uvnitř polyetylenových sáčků při teplotě cca 4 °C bylo zopakováno hodnocení schopnosti semen klíčit (identické vzorky deseti odrůd ze tří prostředí – lokalit, hodnocení ve třech opakováních, klíčení v Petriho misce na filtračním papíru v destilované vodě, při teplotě 14 °C a relativní vzdušné vlhkost 85 % ± 5 %).

EK (průměrná hodnota ve 2016 98,8 %) byla statisticky průkazně (Mann-Whitney U test, $p = 0,014$, $n = 30$) redukována stárnutím semen (98,1 % při hodnocení ve 2022). Stejně tak byl statisticky průkazně ($p = 0,000$, $n = 30$) redukován IK (7,4 ve 2016, 4,6 ve 2022) a RK (83,4 % ve 2016, 52,1 % ve 2022, $p = 0,000$, $n = 30$).

Nebyly zjištěny statisticky průkazné korelace mezi hodnotami IK a RK v roce 2016 (průměrná hodnota 7,4 a 83,4 %) a po šestiletém skladování (4,6. a 52,1 %). Zřejmý je tak variabilní vývoj vnitřní kvality zrna během skladování s vlivem na parametry klíčení. V případě EK (průměrná hodnota 98,8 % ve 2016 a 98,1 % ve 2022) byla zjištěna statisticky průkazná korelace $r = 0,72$ u semen z lokality Vysoká ($n = 10$). To je ovlivněno přítomností vzorků s redukovanou vnitřní kvalitou v roce 2016, které logicky ovlivnily statistické hodnocení i po šestiletém skladování.

Po šestiletém skladování byla zjištěna odrůdová diference v senescenci semen s dopady na EK. Odrůda Vendela (99,2 %) se statisticky průkazně ($p \leq 0,05$) lišila v parametru EK od odrůd KWS Amadora (96,7 %) a Sebastian (97,0 %). Efekt lokality na EK byl identický jako v roce 2016.

Byla zjištěna odrůdová diference v senescenci semen s dopady na IK. Skupina odrůd Laudis 550 (4,8), Manta (4,7) a Bojos (4,7) se statisticky průkazně ($p \leq 0,05$) lišila od odrůd KWS Amadora (4,4), Sebastian (4,5) a Vendela (4,5). Rozdíly IK semen (průměrná hodnota 4,6) v závislosti na provenienci (lokalita) nebyly po šestiletém skladování průkazné.

Obdobně byla zjištěna odrůdová diference v senescenci semen s dopady na RK. Skupina odrůd Laudis 550 (55,4 %), Manta (55,1 %) a Bojos (54,7 %) se statisticky průkazně ($p \leq 0,05$) lišila od odrůd KWS Amadora (47,6 %), Sebastian (49,6 %) a Vendela (50,6 %) po šestiletém skladování. Rozdíly RK semen (průměrná hodnota 52,1 %) v závislosti na provenienci (lokalita) nebyly po šestiletém skladování průkazné.

Při použití NV1 a NV2 byl zjištěn statisticky průkazný ($p \leq 0,05$) pokles EK ve srovnání s variantami KO a SV. Hodnota EK ve variantě KO (destilovaná voda) 98,1 % byla použitím napouštěcí studniční vody (SV) redukována na 97,4 %. EK ve variantě NV1 a NV2 byla 95,7 %.

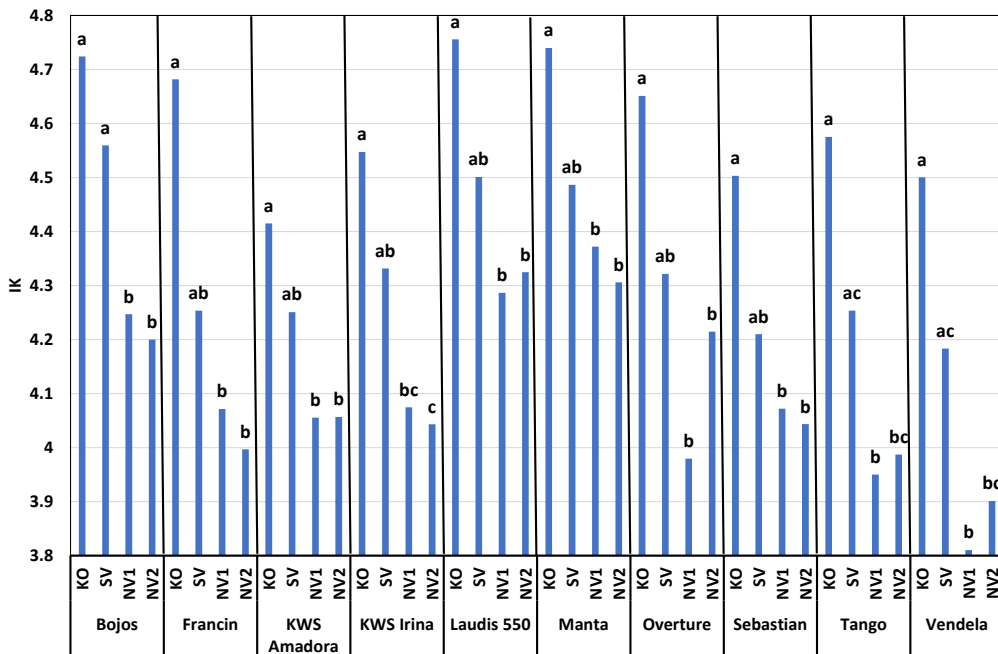
Výsledky detailního hodnocení vlivu máčecí vody na EK semen různé proveniencí (vliv lokality) ukázaly rozdílnou reakci semen. Při použití NV1 a NV2 byl zjištěn statisticky průkazný ($p \leq 0,05$) pokles EK v případě lokalit Věrovany a Hradec. V případě lokality Vysoká (lokalita s nejnižší EK) byl statisticky průkazný pokles EK zaznamenán také ve variantě SV. To ukazuje redukovanou vitalitu semen a zvýšenou senzitivitu i na mírně stresové podmínky v případě nízké EK (lokalita Vysoká).

EK semen v závislosti na použité máčecí vodě byla výrazně odrůdově specifická. Diference EK v závislosti na použité máčecí vodě nebyly statisticky průkazné ve skupině odrůd KWS Irina, Laudis 550, Overture, Sebastian a Tango (EK 97,8 % ve variantě KO). NV1 a NV2 redukovaly statisticky průkazně EK odrůd Bojos, Francin a Vendela (tj. odrůdy s vysokou EK průměrně 98,9 % v kontrolní variantě). NV2 redukovala statisticky průkazně EK odrůdy KS Amadora. NV1 redukovala statisticky průkazně EK odrůdy Manta.

Při použití SV, NV1 a NV2 byl zjištěn statisticky průkazný ($p \leq 0,05$) pokles IK ve srovnání s variantou KO. Redukce IK ve srovnání s KO (destilovaná voda, IK 4,6) byla ve variantě SV (IK 4,3) 6,5 %, ve variantě NV1 a NV2 (IK 4,1) 10,9 %. Výraznější efekt na redukci IK tak má salinita vody – varianta SV (6,5 % z 10,9 %, tj. 60 %). Aditivní účinek salinity vody a výluhu ze semen (NV1 a NV2) by tak byl výrazně redukován použitím napouštěcí vody s optimálními parametry.

Vliv použité máčecí vody na IK byl na všech lokalitách stejný – použití SV, NV1 a NV2 statisticky průkazně redukovalo IK ve srovnání s variantou KO (destilovaná voda).

Reakce IK semen v závislosti na použité máčecí vodě byla odrůdově specifická (Obr. 4). Nicméně, NV1 a NV2 redukovaly statisticky průkazně IK u všech odrůd.



Obr. 4 Vliv máčecích vod na IK – odrůdové difference. Pozn. Statisticky průkazně odlišné hodnoty jsou označeny odlišnými písmeny

RK byla také výrazně modifikována nejen senescencí semen. Ve variantě KO (destilovaná voda) byla průměrná hodnota RK napříč lokalitami a odrůdami 52,1 %. Statisticky průkazný inhibiční efekt ($p \leq 0,05$) na RK byl pozorován ve variantách SV (RK = 46,3 %, redukce ve srovnání s KO o 11,1 %), NV1 (RK = 40,2 %, redukce ve srovnání s KO o 22,8 %), stejně jako NV2 (RK = 40,6 %, redukce ve srovnání s KO o 22,1 %).

Efekt provenience (vliv lokality) na RK byl identický pro všechny tři lokality. Napříč odrůdami byl na všech lokalitách identifikován stejný trend, když varianty NV1 a NV2 se lišily od ostatních variant.

Detailní hodnocení vlivu máčecí vody na RK podle lokality a odrůdy ukázalo, že RK byla v tomto případě průkazně ovlivněna pouze použitím NV1 nebo NV2. Odrůdy Bojos (RK ve variantě KO = 54,7 %, průměrná RK ze všech variant = 48,3 %), KWS Amadora (RK ve variantě KO = 47,6 %, průměrná RK ze všech variant = 42,0 %) a KWS Irina (RK ve variantě KO = 50,6 %, průměrná RK ze všech variant = 44,2 %) neměly statisticky průkazně redukovanou RK v žádném z pozorování. To je dáno vysokou vitalitou odrůdy Bojos a nízkou vitalitou odrůd KWS Amadora a KWS Irina.

Závěr

Modifikovaná metoda hodnocení vitality semen umožnila (i) kvantifikovat vliv stárnutí osiva na vybrané parametry klíčení sladovnického ječmene. (ii) vitalitu semen otestovat v přesně definovaných laboratorních podmínkách. (iii) ověřit a kvantifikovat inhibiční efekt opakovaného použití máčecích vod na klíčení sladovnického ječmene.

4.2.2 Výsledky testování vitality semen za sucha a chladu, souvislosti s tvorbou kořenového systému – pšenice ozimá

Z mnoha vlastností rostlin pojících se s tolerancí k suchu, jsou hledány znaky, které budou podávat jasnou informaci o fenotypu jedince vystaveného podmínkám nedostatku vody. Nástrojem rostlin pro vyhnutí se stresu suchem (tzv. stress avoidance) může být tvorba velkého aktivního kořenového systému a vitalita semen. Cílem práce bylo (i) analyzovat odrůdové rozdíly ve velikosti kořenového systému při hodnocení ve třech fenologických fázích, (ii) analyzovat odrůdové rozdíly vitality semen vybraných odrůd pšenice seté v simulovaných podmínkách sucha a chladu a (iii) kvantifikovat vazbu mezi velikostí kořenového systému a vitalitou semen ve víceletém polním a laboratorním experimentu.

Materiál a metodika

Velikost kořenového systému (VKS) a vitalita semen byly hodnoceny u 14 resp. 13 ozimých genotypů pšenice seté v maloparcelovém polním pokusu na lokalitě Branišovice (jižní Morava, Česká republika, suchá lokalita) ve dvouletém experimentu ve čtyřech opakováních. VKS rostlin byla v průběhu vegetace zjišťována nedestruktivní *in situ* metodou měření elektrické kapacity (nF) dle Chloupek (1972) ve fázi sloupkování (BBCH 30) metání (BBCH 50) a plnění zrn (BBCH 75) LCR metrem při frekvenci 1 kHz. Současně byla po sklizni v laboratorních podmínkách testována vitalita semen těchto genotypů. Vitalita byla stanovena jako procento vyklíčených semen při působení stresu, tj. při chladu 10 °C za fyziologického sucha -0,5 MPa indukovaného vodným roztokem polyethylenglykolu PEG 6000. K simulaci sucha tak bylo využito nepenetrující osmotikum polyethylenglykol PEG 6000, které snižuje dostupnost vody pro rostlinu, a při tom nevstupuje do buněk a neinterferuje s metabolismem. PEG představuje ve vodě rozpustný vysokomolekulární polymer běžně využívaný k vyvolání vodního (resp. osmotického) stresu u vyšších rostlin snížením vodního potenciálu v živném médiu. K vytvoření roztoku o zvoleném vodním potenciálu (-0,5 MPa, tj. -5 barů) byla použita klasická rovnice pro výpočet koncentrace PEG (Michel a Kaufmann, 1973):

$$VP = - (1,18 \times 10^{-2}) C - (1,18 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2T$$

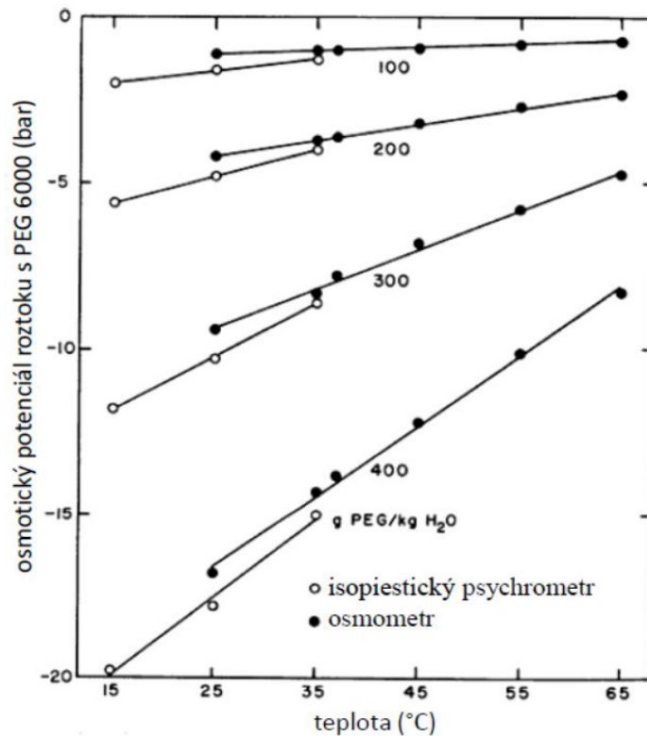
C = koncentrace PEG 6000 (g.kg⁻¹ H₂O)

T = teplota v °C (použitá teplota 10 °C)

VP = vodní potenciál (bar)

Orientační efekt teploty a koncentrace na vodní potenciál roztoku s PEG 6000 uvádí Obr. 5.

Paralelně byla založena srovnávací varianta s optimálním vodním režimem při teplotě 20 °C. Obě varianty experimentu byly umístěny do plastových laboratorních klíčidel (box s rozměry cca 400 × 300 × 120 mm se zásobním prostorem na roztok, s vyjímatelnou vodorovnou plochou na umístění vzorků a s víkem pro uzavření boxu – viz. Obr. 6). V klíčidlech byla semena uložena na standardní filtrační papír gramáže 80 g/m² mezi dvojitou vrstvou filtračního papíru, každá z testovaných variant ve třech opakováních, vždy po 50 semenech. Jako vitální byla v tomto experimentu hodnocena



Obr. 5 Efekt teploty a koncentrace na vodní potenciál roztoku s PEG 6000 měřený dvěma technikami

Zdroj: Michel and Kaufmann, 1973

semena s délkou klíčku minimálně do poloviny délky obilky a s minimálně třemi kořínky. Za vadně klíčící byli dle metodiky tohoto experimentu považováni jedinci bez primárních kořínků, případně pouze s jedním, se zkrácenou koleoptile a zahnívajícím jedincem v případě, že to nebylo způsobeno neoptimálními zkušebními podmínkami. Procento vyklíčených semen (dle metodiky experimentu) bylo hodnoceno po 14 dnech.

Výsledky

Vitalita semen ve dvouletém pozorování byla hodnocena jako procento vyklíčených semenu třinácti genotypů pšenice. Genotyp 538 nebyl v roce 2015 zahrnut do experimentu. Pro hodnocení vitality semen byly v laboratorních podmínkách navozeny stresové podmínky kombinací stresu chladem a suchem. Byl zjištěn průkazný vliv genotypu (37,3 %) a interakce genotypu s ročníkem (40,4 %) na hodnoty vitality semen. Počasí v průběhu vegetační doby neovlivnilo průkazně vitalitu semen. Nejnižší hodnoty vitality byly ve dvouletém pozorování zjištěny pro genotyp 527 a 510, statisticky průkazně nejvyšší vitalitou semen se vyznačoval genotyp 530 (Obr. 7).

Nejednoznačný je vztah vitality semen a velikosti kořenového systému. V prvním pokusném roce byla nejnižší vitalita zjištěna u genotypů s malou VKS (533 a 509),

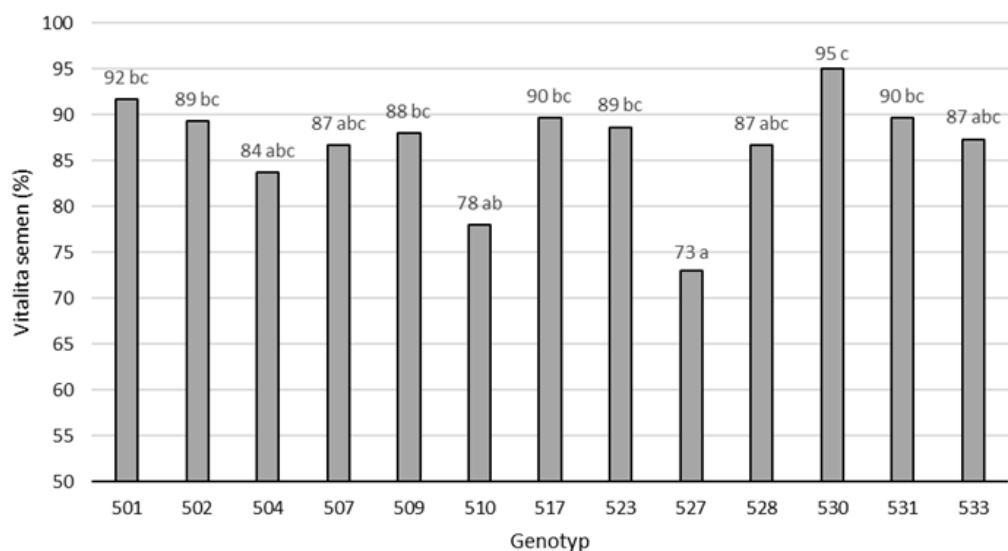


Obr. 6 Umístění vzorků na klíčovlech (vlevo), odkrytá klíčící semena na filtračním papíru – pšenice vpravo nahoře, ječmen – dole

Zdroj: autoři

ale ve druhém pokusném roce tyto genotypy poskytly nejvitálnější semena. Genotyp 527 vyznačující se vysokými hodnotami VKS ve fázi sloupkování a metání poskytl v obou letech nejméně vitální semena potomstva. Korelační analýza vztahu VKS a vitality semen nepotvrdila statisticky průkazný vztah těchto znaků.

Vztah VKS a vitality totožných rostlin, resp. vztah VKS rodičů a vitality jejich potomstva, je neprůkazný. Zajímavostí je převážně negativní vztah sledovaných znaků. Lze se domnívat, že rychlejší růst klíčku a zárodečných kořínků vitálních klíčenců nemusí souviset s velikostí kořenového systému v pozdějších fázích vývoje pšenice. V kontrastu s těmito výsledky byla zjištěna pozitivní vazba mezi VKS a vitalitou semen ječmene vyjádřenou pomocí délky a plochy kořínků a klíčku (Klimešová *et al.*, 2015).



Obr. 7 Vitalita semen (%) třinácti genotypů pšenice seté, dvouletý průměr. Pozn. statisticky průkazně odlišné páry hodnot ($p \leq 0,05$) jsou označeny rozdílnými písmeny

Závěr

Velikost kořenového systému a vitalita semen pšenice se vyznačují genotypovou proměnlivostí. Vitalita semen je průkazně ovlivněna interakcí genotypu s ročníkem a genotypem, což naznačuje možnost výběru vhodných genotypů s vyšší vitalitou na základě víceletých experimentů.

4.2.3 Inovace hodnocení vitality semen – využití digitální analýzy obrazu

Metoda vyvíjená v posledních letech na Mendelově univerzitě v Brně využívá pro hodnocení diferencí rychlosti nárůstu biomasy klíčků a primárních kořenů digitální skener a software pro fenotypování mladých rostlin. Perspektivní je zejména možnost exaktního hodnocení diferencí u velkého počtu genotypů, respektive jedinců. Metoda umožnila kvantifikovat růstové projevy klíčenců a jejich fenotypové diference v podmínkách stresu suchem a v chladu. Získané morfometrické charakteristiky byly konfrontovány s vybranými kvantitativními znaky produkce a s velikostí kořenového systému. Kvantifikována byla například pozitivní vazba mezi velikostí kořenového systému rostlin a vitalitou jejich semen. Uvedený systém koresponduje s trendy hodnocení vitality v mezinárodním kontextu.

Používaný software WinRHIZO (Régent Instruments Inc., Quebec, Kanada) je systém pro poloautomatickou analýzu obrazu navržený pro laboratorní měření a analýzu kořenů. V pokročilých verzích umí analyzovat morfologii (délka, plocha, objem, počet kořenových špiček, větvení kořenů, topologie, analýza fraktálů pomocí metody skeletonizace a další parametry), typologii a architekturu i jiných morfologických struktur rostlin. Vychází z počítačové analýzy obrazu, který se pořizuje na speciálním skeneru s možností skenování 3D objektů. Analyzované objekty se pro



Obr. 8 Ukázka digitální analýzy kořenů programem WinRHIZO

Zdroj: autoři

skenování ukládají pro skenování ve speciálních transparentních plastových miskách a software WinRHIZO následně automaticky nebo interaktivně analyzuje jejich grafické obrazy – tvary, rozměry i případné kvalitativní parametry. Vyhodnocené tvary a rozměry se zobrazují formou grafů a v numerické podobě jsou exportovány ve formě souborů, které lze dále vyhodnocovat a zobrazovat v prostředí programu MS Excel. Verze WinRHIZO Arabidopsis může analyzovat více než jeden kořenový systém. Je optimalizována pro analýzu kořenů mladých rostlin a semenáčků. Software WinRHIZO patří mezi celosvětově nejpoužívanější programy používané pro analýzu obrazu a následné hodnocení parametrů kořenového systému (Obr. 8).

Pro jednoduchou digitální analýzu obrazu byly při výzkumu kořenového systému rostlin, případně jiných struktur, použity i jiné programy, např. ROOTEDGE (National Soil Tilth Laboratory, Ames, IA, USA), NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), Delta-T SCAN (Delta-T Devices Ltd., Burwell, Cambridge, UK), RMS (Root measurement system; The University of Georgia, Athens), KS 300 rel. 3.0 (Carl Zeiss Vision, München, Germany), DART software, a jiné.

Cílem práce bylo vyhodnotit genotypové rozdíly ve vitalitě semen pšenice, a posoudit možnosti selekce na vyšší vitalitu semen, hodnocenou dle velikosti klíčku a zárodečných kořenů klíčenců *in vitro* metodou digitální analýzy obrazu.

Materiál a metodika

Hodnocena byla vitalita semen šesti genotypů pšenice ozimé (517, 527, 501, 531, 533, 509) a vybraných kříženců těchto genotypů v generaci F_4 . Maloparcelový pokus se šesti rodičovskými genotypy byl založen do parcel o ploše 1,8 m² v pěti opakováních. Výsevek činil 4 MKS.ha⁻¹. Ve fázi plné zralosti (BBCH 89) byly v každém opakování sklizeny klasy 20 reprezentativních rostlin každého rodičovského genotypu.

Rostliny kříženců byly vysety bez opakování a vybrané rostliny byly sklizeny jednotlivě. Pokusné parcely byly v obou případech založeny na suché lokalitě v nadmořské výšce 190 m. n. m. Lokalita se nachází na jižní Moravě v kukuřičné výrobní oblasti s průměrnou roční teplotou vzduchu 8,8 °C a průměrným ročním úhrnem srážek 460 mm. Půdním typem je černozem.

Testem vitality byla testována semena 40 rostlin, které vznikly dialelním křížením šesti rodičovských genotypů (501, 509, 517, 527, 531 a 533). Pro hodnocení vitality byly vybrány rostliny z potomstva genotypu 509 a 531 v pozici matky, které se v rámci předěšlých hodnocení vyznačovaly výraznými rozdíly ve vitalitě semen. Od každé rodičovské kombinace (5 rodičovských kombinací genotypu 509 v pozici matky a 5 rodičovských kombinací genotypu 531 v pozici matky) byla hodnocena semena 4 rostlin. Současně byla testována vitalita semen všech šesti rodičovských genotypů ve dvou opakováních.

Vitalita semen byla stanovena jako procento vyklíčených semen po působení kombinace simulovaných stresových podmínek – chladu při 10 °C a nedostatku vody, když bylo sucho na úrovni -0,5 MPa simulováno vodným roztokem polyethylenglykolu (PEG 6000). Navozené podmínky přibližně reflektují možné hodnoty vodního potenciálu půdního roztoku a teploty půdy při zakládání porostů ozimé pšenice v podzimních měsících.

Současně byla založena srovnávací varianta s použitím destilované vody při teplotě 10 °C. Semena byla uložena přímo na Petriho misky o průměru 90 mm (bez filtračního papíru), přičemž do každé Petriho misky bylo aplikováno 7 ml roztoku polyethylenglykolu. Petriho misky byly zvoleny pro testování vitality z důvodu nutnosti opakovaně manipulovat s klíčenci za účelem hodnocení vitality metodou digitální analýzy obrazu. Od každé rostliny bylo vybráno vždy šest zdravých, neporušených semen, které byly rovnoměrně rozprostřeny na Petriho misku (Obr. 9 vpravo).

Takto připravené misky se vzorky byly vloženy na laboratorní podnosy a ty do polyethylenových, hermeticky uzavřených obalů, aby nedocházelo k vysychání. Podnosy s miskami byly umístěny do vytemperovaného klimaboxu MEMMERT IPS 800 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo). Vitalita semen ve variantě stres suchem i ve srovnávací variantě byla hodnocena po 7 a 14 dnech. Hodnocení probíhalo pomocí digitální analýzy obrazu. Klíčící semena byla rozprostřena po ploše upraveného skeneru (Epson Perfection V 700 Photo) v tenké vrstvě adekvátního



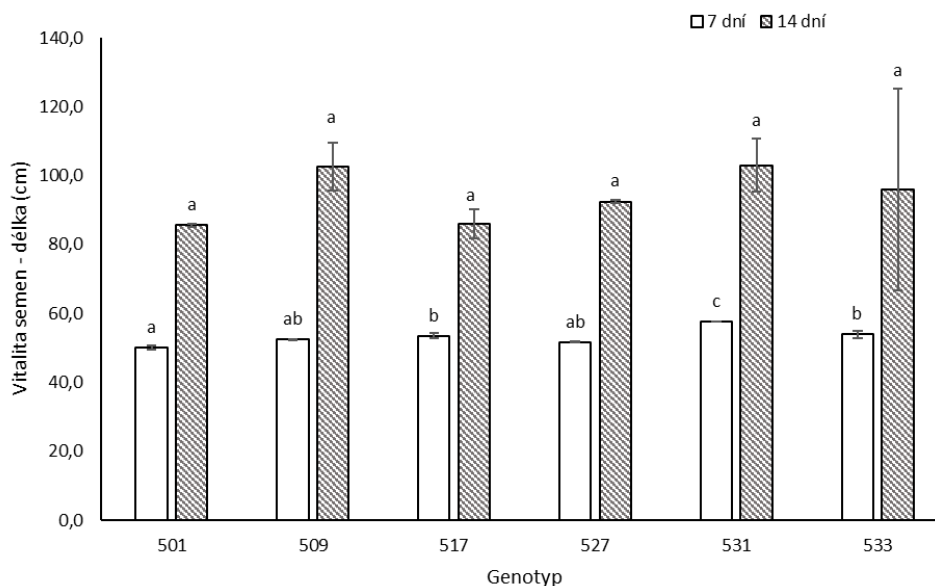
Obr. 9 Sken klíčících obilek pšenice po 7 dnech klíčení v roztoku polyethylenglykolu (vlevo), vyklíčené obilky pšenice po 14 dnech klíčení v roztoku polyethylenglykolu na Petriho miskách (vpravo)

Zdroj: autoři

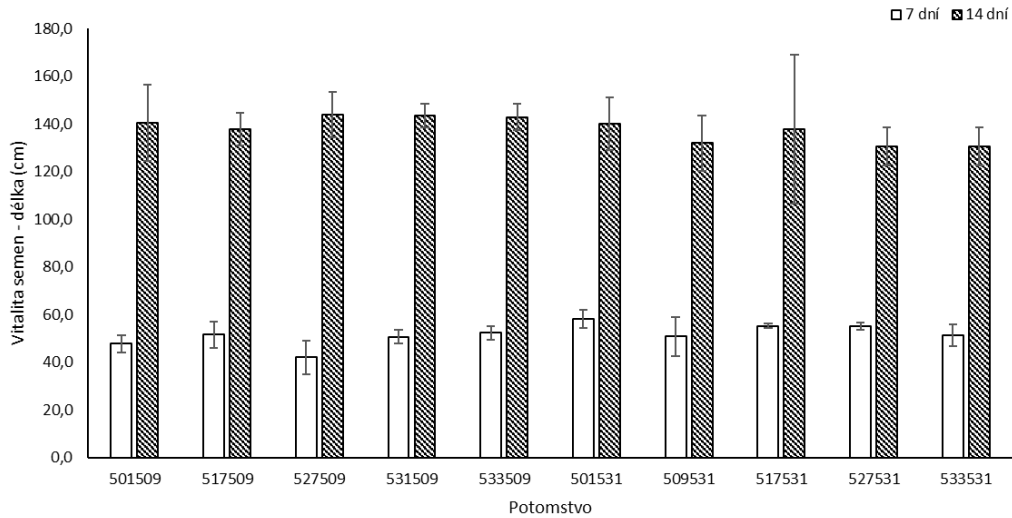
roztoku (vody nebo roztoku PEG) tak, aby se nepřekrývala (Obr. 9 vlevo). Skeny byly analyzovány programem WinRHIZO, verze basic. Jako ukazatel vitality byla hodnocena délka (cm) klíčku a zárodečných kořínků včetně započtení délky obilky.

Výsledky

Působení nízké teploty a nedostatku vody navozené osmotickým stresem iniciovalo odlišný projev vitality semen sledovaných genotypů pšenice. Průkazná genotypová variabilita byla prokázána při hodnocení vitality po 7 dnech od započetí testu. Hodnoty délky kořenů a klíčku se po 14 dnech sledování rovněž lišily, avšak díky vysoké variabilitě znaku u některých genotypů nebyly prokázány statisticky průkazné rozdíly (Obr. 10). Vyšší hodnoty vitality semen (téměř o 9 % v porovnání s průměrem souboru) byly zjištěny u genotypu 531 v obou termínech hodnocení. Nižší vitalitou semen, hodnocenou prostřednictvím intenzity nárůstu klíčku a zárodečných kořenů v podmínkách sucha a chladu, se vyznačoval genotyp 501 (hodnoty vitality 93 % průměru souboru). Pro souběžné hodnocení vitality společně s uvedenými rodičovskými genotypy (Obr. 10) bylo vybráno potomstvo (obilky F_4 generace) genotypů 509 a 531 v pozici matky. Tento výběr byl uskutečněn na základě testování vitality všech rodičů v předcházejícím experimentu (data neuvedena), kde se genotypy 509 a 531 statisticky průkazně lišily ve vitalitě semen (což bylo opětovně potvrzeno při hodnocení vitality po 7 dnech – viz Obr. 10). Cílem experimentu bylo ověřit, zda se i potomstvo uvedených mateřských genotypů bude odlišovat ve vitalitě semen při působení abiotického stresu.



Obr. 10 Vitalita semen vyjádřená jako součet délek klíčku a zárodečných kořenů (cm) hodnocená po 7 a 14 dnech od započetí testu v roztoku PEG 6000. Pozn. statistický průkazně odlišné páry hodnot ($p \leq 0,05$) jsou označeny rozdílnými písmeny. Chybové úsečky značí střední chybu průměru



Obr. 11 Vitalita semen vyjádřená jako součet délek klíčku a zárodečných kořenů (cm) hodnocená po 7 a 14 dnech od započetí testu v roztoku PEG 6000. Poslední trojčíslí číselného kódu genotypu označuje potomstvo matky 509 resp. 531. Chybové úsečky značí střední chybu průměru

Diference ve vitalitě semen potomstev testovaných v podmínkách stresu chladem i suchem nebyly statisticky průkazně rozdílné (Obr. 11), ačkoliv mírně vyšší hodnoty byly zaznamenány u potomstva genotypu 531 (54,07 cm) v porovnání s potomstvem genotypu 509 (51,80 cm) po 7 dnech. Významný vliv ($p \leq 0,05$) stresu suchem na zkrácení délky kořenů a klíčků byl pozorován u semen v roztoku PEG za chladu 10 °C (průměr genotypů 52,94 cm) v porovnání s kontrolou vystavenou pouze nízké teplotě (průměr genotypů 66,95 cm). Nicméně genotypové rozdíly potomstva nebyly významné a průkazný vliv rodiče nebyl prokázán za stresu ani ve srovnávací variantě (data neuvedena).

Přesto, že se neprojevíly genotypové rozdíly v rámci potomstva, je možné posoudit vliv rodičovského genotypu na vitalitu potomstva. Vyhodnocení podílu genotypu na fenotypu bylo provedeno výpočtem koeficientu heritability (h^2) při selekci na vysokou hodnotu znaku. V souboru rodičovských genotypů, které byly hodnoceny na vitalitu (po 7 dnech v PEG – průměrná hodnota pro všechny rodiče 53,21 cm), byl selektován genotyp s vysokou hodnotou znaku (genotyp 531), vitalita vyjádřená jako součet délky klíčku a kořínků 57,63 cm. Potomstvo genotypu 531 dosáhlo průměrné délky 54,07 cm. Ohlas (response) na selekci na vysokou hodnotu vitality a její heritabilita byly vypočteny dle vztahu:

$$R \text{ (response)} = h^2 \times S \text{ (selekční rozdíl)}$$

$$S = 57,63 - 53,21 = 4,42$$

$$R = 54,07 - 53,21 = 0,86$$

$$h^2 = R/S = 0,86 / 4,42 = 0,2$$

Na fenotypové variabilitě vitality semen (hodnocené pomocí součtu délek kořenů a klíčku 7 dní po započetí testu v PEG) se z 20 % podílí geneticky podmíněná proměnlivost. Hodnota koeficientu heritability je 0,2. Tato hodnota je nízká, avšak pro vlastnosti řízené větším počtem genů malého účinku (kvantitativní znaky) typická. Tato hodnota heritability však platí pouze pro zkoumaný soubor rostlin.

Závěr

Bylo zjištěno, že vitalita je průkazně ovlivněna interakcí genotypu s ročníkem (40,4 %) a genotypem (37,3 %). Byly zjištěny rozdíly ve vitalitě rodičovských genotypů po sedmi dnech působení stresu suchem a chladem, avšak po čtrnácti dnech již nebyly difference průkazné. Statisticky průkazný vliv rodičů na vitalitu potomstva nebyl za stresu suchem a chladem prokázán, nicméně bylo zjištěno, že genetická proměnlivost se na fenotypové variabilitě znaku vitalita podílí 20 % ($h^2 = 0,2$). Tato hodnota je nízká, nicméně typická pro selekci na vyšší vitalitu semen, podobně jako na jiné kvantitativně děděné vlastnosti.

4.2.4 Výsledky testování vitality semen za sucha a chladu, souvislosti s tvorbou kořenového systému – ječmen jarní

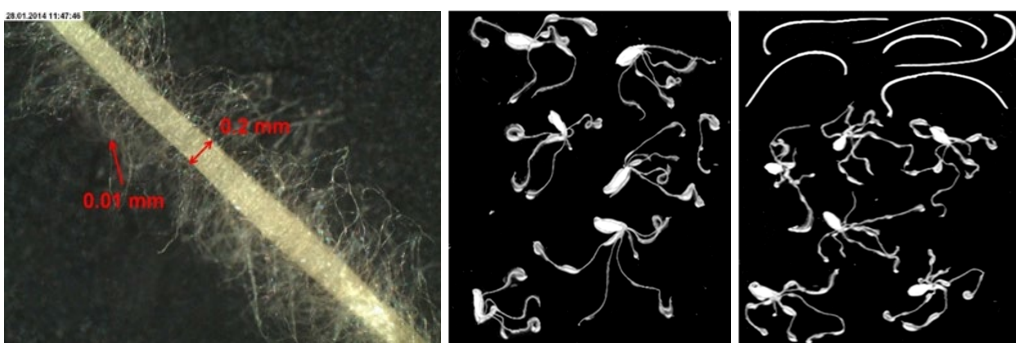
Kilogram suchých obilek pšenice (*Triticum aestivum* L.) spotřebuje při klíčení přibližně 550 ml vody, kilogram semen hrachu (*Pisum sativum* L.) 1850 ml. Po hydrataci embrya se v semeni začnou aktivovat metabolické systémy. Příjem vody se zvyšuje, když kořínek embrya prorazí osemením. Za omezených vlhkostních podmínek může hrát v tomto případě významnou roli kořenový systém rostlin. V této souvislosti je podstatné, zda je vitalita obilek v korelaci s velikostí kořenového systému. Kakhki *et al.* (2008) uvádí, že délka kořínku by mohla být používána ke specifikování intenzity růstu klíčenců, tedy pro stanovení vitality semen.

Test růstu kořínků přijatý do pravidel ISTA v roce 2012 pro řepku poskytl důkazy, že posuzuje spolehlivě míru vitality i u řady dalších druhů (bavlny, papriky, melounu, okurky). Délka kořínků může být stanovena obrazovou analýzou a výpočtem (Cheng *et al.*, 2005). Další autoři uvádějí stanovení délky klíčků, z této hodnoty je pak vypočten index vitality (Zhang *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008).

Cílem práce bylo s využitím metody digitální analýzy obrazu (i) analyzovat meziodrůdové difference ve vitalitě semen ječmene jarního (hodnocené jako morfologické a kvantitativní parametry klíčku a primárního kořenového systému klíčících semen) z prostředí s různou intenzitou stresu suchem, (ii) kvantifikovat vazbu mezi velikostí kořenového systému rostlin z kontejnerového pokusu a vitalitou sklizených semen (hodnocenou jako morfologické a kvantitativní parametry klíčku a primárních kořenů klíčících semen).

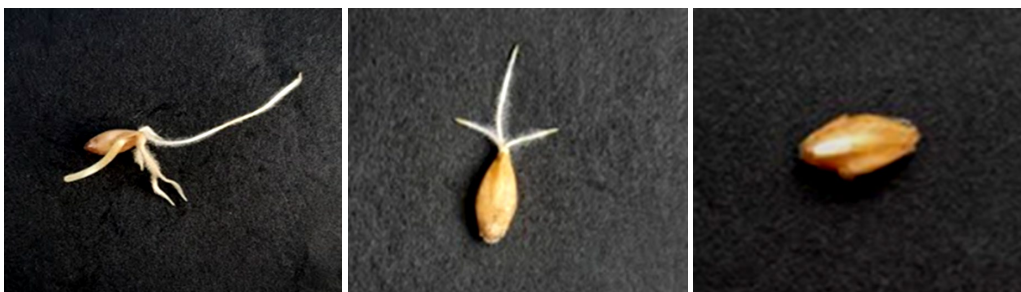
Materiál a metodika

Nakřížením čtyř komerčních odrůd ječmene jarního bylo získáno výsledných 12 kombinací potomstva. V generaci F_4 byl s vybranými kombinacemi (U2, U9, U11 a U12) založen kontejnerový pokus (objem kontejnerů 0,19 m³, substrát půda) s řízeným zavlažovacím režimem (optimálně zavlažovaná varianta; varianta na úrovni 65 % využitelné vodní kapacity tj. lehký stres půdním suchem – označeno jako varianta II; varianta



Obr. 12 Mikroskopické struktury primárního kořene – ve viditelném spektru, zvětšeno (vlevo); hodnocené primární kořeny a klíčky genotypů ječmene po sedmi dnech v klimaboxu (sken pro analýzu, negativ)

Zdroj: autoři



Obr. 13 Odlišná úroveň a kvalita klíčení semen po sedmi dnech klíčení v teplotě 10 °C a v simulovaném suchu -0,5 MPa indukovaném vodným roztokem polyethylenglykolu PEG 6000

Zdroj: autoři

na úrovni méně než 65 % využitelné vodní kapacity tj. střední stres půdním suchem – označeno jako varianta III; varianta na úrovni bodu vadnutí tj. silný stres půdním suchem – označeno jako varianta IV). V ostatních parametrech byl pokus vystaven přirozeným meteorologickým podmínkám (kontejnery umístěny ve vegetační kleci).

Po sklizni byla vitalita obilok ječmene jarního stanovena ve dvou variantách vedených v laboratorních podmínkách: (i) ve vodě při chladu 10 °C (kontrola) a (ii) v podmínkách chladu 10 °C a za sucha -0,5 MPa ve vodném roztoku polyethylenglykolu PEG 6000. Semena (vždy 6 v Petriho misce) byla po šestiměsíčním odstupu od sklizně uložena přímo na Petriho misky o průměru 90 mm (bez filtračního papíru). Realizována byla čtyři opakování. Hodnocení vitality proběhlo po 7, 11 a 18 dnech s využitím skenování klíčících obilok (Obr. 12) pomocí skeneru Epson Perfection 700 photo. Následně byl obraz (délka a plocha klíčku a kořínků) digitálně analyzován programem WinRHIZO, verze Basic (Régent Instruments Inc., Quebec, Kanada). Identicky jako v předchozích případech byla analyzována pouze normálně vyklíčená zrna dle manuálu Psota *et al.* (1998) (Obr. 13). Výsledky měření velikosti kořenového systému

během vegetace ječmene (BBCH 30, 51, 71), měřené jako elektrická kapacita kořeno-
vého systému v nF (Chloupek, 1972) přístrojem ESCORT ELC-131D LCR meter (Escort
Instruments Corporation, Taiwan) při frekvenci 1 kHz byly konfrontovány s para-
metry vitality semen, vyjádřenými jako (i) délka klíčku a kořenů, (ii) plocha klíčku
a kořenů po 7, 11 a 18 dnech a (iii) po 18 dnech jako hmotnost biomasy.

Výsledky

Ve všech třech termínech hodnocení vitality semen prostřednictvím digitální analýzy
obrazu byly zjištěny průkazné rozdíly délky klíčku a kořenů z podmínek bez stresu
suchem a se stresem suchem. Obdobně byly statisticky vysoce průkazné rozdíly v dél-
ce klíčku a kořenů zjištěny v závislosti na podmínkách prostředí kde rostly mateřské
rostliny (tj. na závlahovém režimu půdy).

Po 11 a 18 dnech byla vitalita, vyjádřená délkou klíčku a kořenů průkazně roz-
dílná v závislosti na interakci varianta závlahy × populace (tzn., že stejné populace
z různých prostředí se po 11 a 18 dnech trvání pokusu lišily ve vitalitě). Vliv interakce
závlaha půdy × stres při klíčení či jeho absence byl průkazný pouze v prvním termí-
nu hodnocení (po 7 dnech). To znamená, že semena z různých podmínek prostředí
v počátečních fázích klíčení reagovala odlišně na podmínky ovlivněné simulovaným
suchem či jeho absencí. Identické tendence byly zjištěny při hodnocení parametru
plocha klíčku a kořenů.

Hmotnost biomasy klíčku a kořenů, zjišťovaná po 18 dnech, byla průkazně ovlivněna
variantou závlahového režimu nádob, ve kterých rostly mateřské rostliny, genoty-
pem i podmínkami klíčení. Interakce varianta závlahového režimu nádob × genotyp
a genotyp × podmínky klíčení měly na vitalitu průkazný vliv. Interakce varianta závla-
hového režimu nádob × podmínky klíčení způsobila průkazné diference ve vitalitě.

Ve všech hodnocených parametrech vitality (délka, plocha a hmotnost biomasy)
byly hodnoty průkazně nejnižší ve variantě s přirozených podmínek vlhkosti půdy
v nádobě, ve které rostly mateřské rostliny. Rozdíly z ostatních variant závlahového
režimu byly neprůkazné, když nejvyšší hodnoty byly zjištěny ve variantě s optimál-
ním vlhkostním režimem.

Tab. 2 Průměrné hodnoty hodnocených znaků vitality (parametrů klíčků a primár-
ních kořenů) a statistické hodnocení jejich rozdílů ($p \leq 0,05$)

	Délka				Plocha				Hmotnost				
	Gen.	7 d.	Gen.	11 d.	Gen.	18 d.	Gen.	7 d.	Gen.	11 d.	Gen.	18 d.	Gen.
U11	45,9 ^a	U11	128,7 ^a	U12	201,9 ^a	U2	4,3 ^a	U11	11,3 ^a	U12	21,7 ^a	U12	0,302 ^a
U2	48,0 ^a	U2	136,6 ^a	U11	221,2 ^{ab}	U11	4,5 ^a	U2	11,3 ^a	U2	23,4 ^a	U2	0,320 ^{ab}
U9	55,2 ^a	U9	137,3 ^a	U9	225,9 ^{ab}	U9	4,8 ^a	U9	11,7 ^a	U11	23,7 ^a	U11	0,334 ^{bc}
U12	55,2 ^a	U12	142,6 ^a	U2	236,7 ^b	U12	4,9 ^a	U12	11,9 ^a	U9	23,8 ^a	U9	0,354 ^c

Poznámka: statisticky odlišné hodnoty jsou označeny odlišnými písmeny; Zkratky: Gen. – genotyp; 7 d. po 7 dnech, 11 d. po 11 dnech, 18 d. po 18 dnech

Tab. 3 Vztah mezi velikostí kořenového systému mateřských rostlin a parametry vitality semen jejich potomstva

Varianta závlahy:	Přirozené podmínky		Optimální závlaha		Průměr variant	
	Kontrola	Stres	Kontrola	Stres	Kontrola	Stres
VKS × délka 7 dní	0,388	0,246	0,536	0,323	0,615	0,353
VKS × délka 11 dní	0,343	0,669	0,858	0,816	0,453	0,408
VKS × délka 18 dní	0,369	0,793	0,473	0,609	0,397	0,648
VKS × délka průměr	0,373	0,732	0,756	0,676	0,526	0,555
VKS × hmotnost	-0,155	0,541	0,085	0,554	0,726	0,731

Poznámka: statisticky průkazná korelace ($p \leq 0,05$) kurzívou; statisticky vysoce průkazná korelace ($p \leq 0,01$) tučně; VKS = velikost kořenového systému

V prvních dvou termínech měření byla největší délka a plocha zjištěna u populace U12, což svědčí o vyšší vitalitě v počátečních fázích klíčení (Tab. 2). Při hodnocení napříč podmínkami nejvyšší vitalitu vykazovala populace U9 v nádobě s optimální závlahou.

V Tab. 3 jsou pomocí korelačního koeficientu charakterizována těsnost vztahu mezi velikostí kořenového systému mateřských rostlin (průměr ze tří měření v průběhu vegetace) a vybraných hodnocených ukazatelů vitality semen. Použity byly výsledky velikosti kořenového systému z kontrastních prostředí – varianta s přirozenými vláhovými podmínkami (bez doplňkové závlahy) a varianta s optimálním vlhkostním režimem. Zřejmý je zejména pozitivní (průkazný) vztah mezi velikostí kořenového systému a vitalitou (délkou klíčků a kořínků), hodnocenou v podmínkách stresu suchem (-0,5 MPa). To svědčí o pozitivní vazbě velikosti kořenového systému a vitality semen.

Závěr

Popsaná metoda využívá pro hodnocení diferencí rychlosti nárůstu biomasy klíčků a primárních kořenů digitální skener a software pro hodnocení parametrů kořenového systému. Perspektivní je zejména možnost hodnocení diferencí u velkého počtu genotypů. Získané charakteristiky byly konfrontovány s velikostí kořenového systému. Zjištěna byla pozitivní vazba mezi velikostí kořenového systému mateřských rostlin a vitalitou jejich semen.

4.2.5 Výsledky testování vitality semen za stresových podmínek – řepka olejná

Při testování vitality semen řepky olejné byly použity různé varianty a metodiky laboratorního experimentu. Modifikace se netýkaly jen úrovně simulovaných podmínek abiotického stresu (teplota a sucho), ale i použitého materiálu, na kterém probíhalo testování (filtrační papír, sterilní laboratorní písek). Variantní hodnocení vitality semen řepky olejné mělo za cíl, mimo jiné, identifikovat laboratorní metodu testování vitality u řepky olejné, nejtěsněji korelující se vzcházivostí řepky v polních podmínkách, při respektování obecných nároků a standardů pro testování vitality. Obdobná logika byla použita i v metodice Bláha a Vyvadilová (2012) s cílem umožnit již na

úrovni semen vyloučení materiálů, které nesnášejí extrémní teploty a střídání teplot při klíčení a mají malou efektivnost využití vody. Autoři tak identifikovali genotypy s nižší polní vzcházivostí a pomalejším rozvojem kořenového systému s následky pro další průběh vegetace, včetně úspěšnosti přezimování a jarní regenerace.

Materiál a metodika

V experimentu bylo použito devět liniových odrůd a jedna hybridní odrůda řepky olejné, formy ozimé. Maloparcelový polní pokus byl založen ve třech opakováních na parcelách o ploše 10 m². Pokusné parcely byly založeny na dvou agroekologicky odlišných lokalitách dle běžných zásad agrotechniky řepky olejné. V dalším roce byl experiment rozšířen a vyseto devět odrůd liniových a čtyři odrůdy hybridní na dvou lokalitách (hodnoceny byly výsledky jen z jedné lokality z důvodu poškození polního pokusu přívalovými srážkami).

a) Hodnocení vitality za stresu suchem – testování na filtračním papíru

Laboratorní pokus byl veden vždy při teplotě 20 °C ve třech variantách intenzity sucha: (i) varianta srovnávací s optimální dostupností vody pro klíčící semena s destilovanou vodou, když použití destilované vody je v biologických experimentech považováno za úzus z důvodu její snadné standardizace, (ii) varianta silného stresu suchem (-0,5 MPa), (iii) varianta velmi silného stresu suchem (-0,7 MPa). Každá z variant byla vedena ve třech opakováních, v každém po 50 semenech. Sucho bylo indukováno použitím vodného roztoku polyethylenglykolu PEG 6000. Pro dosažení osmotického potenciálu -0,5 MPa bylo spotřebováno 193 g.l⁻¹ PEG 6000 na 1000 ml destilované vody a pro osmotický potenciál -0,7 MPa bylo spotřebováno 233 g.l⁻¹ PEG 6000 na 1000 ml destilované vody.



Obr. 14 Semena řepky olejné na klíčidlech. Stav po 7 dnech ve variantě -0,5 MPa

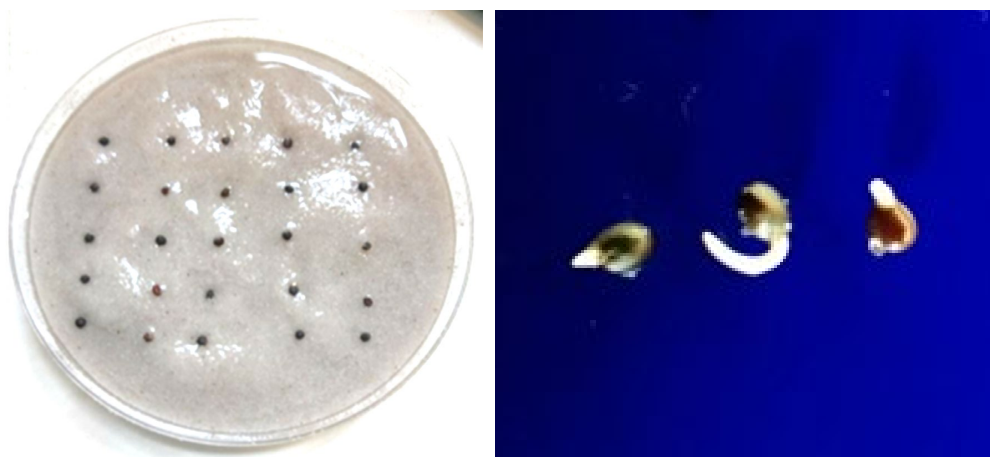
Zdroj: autoři

Osivo bylo před započítím experimentu vydezinfikováno roztokem chlornanu sodného a vody v poměru 1:9. Semena byla namočena do roztoku po dobu jedné minuty. Poté byla důkladně opláchnuta destilovanou vodou a ponechána volnému proschnutí na filtračním papíru pro rychlé a důkladné odvedení přebytečné vlhkosti a zamezení hydratace semen.

Pro testy vitality byla použita plastová klíčidla (popis klíčidel je uveden v kapitole „Výsledky testování vitality semen za sucha a chladu, souvislosti s tvorbou kořenového systému – pšenice ozimá“). Semena byla umístěna mezi dvě a dvě vrstvy standardního filtračního papíru (Obr. 14, popis uveden v kapitole „Výsledky testování vitality semen za stresu suchem – ječmen jarní“) metodu „between paper BP“ (vysvětleno podrobně níže v další kapitole). Klíčidla byla umístěna do polyethylenových sáčků pro redukci ztrát roztoku výparem a umístěna do klimaboxu s teplotou 20 °C. Vitalita byla posuzována ve třech termínech: po 7, 14 a 21 dnech. Za vitální byla považována v tomto experimentu semena s makroskopicky pozorovatelným klíčkem.

b) Hodnocení vitality za stresu suchem a vysokou teplotou – testování v křemičitém písku

V této variantě testování vitality semen bylo hodnoceno 13 odrůd řepky ozimé. V experimentu byly použity Petriho misky o průměru 90 milimetrů, ve kterých byl substrátem sterilizovaný laboratorní křemičitý písek (25 cm³ na každou Petriho misku, Obr. 15). Pro simulaci suchem byl použit roztok PEG 6000 ve dvou variantách osmotického potenciálu -0,3 MPa a -0,5 MPa. Do Petriho misek bylo na počátku experimentu aplikováno 12 ml roztoku PEG 6000, který byl v době hodnocení doplňován z důvodu ztrát roztoku vypařováním (Petriho misky byly umístěny do vytemperovaného klimaboxu při teplotě 35 °C). Každá Petriho miska obsahovala 25 semen, experiment byl veden ve čtyřech opakováních. Hodnocení proběhlo po 2, 5 a 8 dnech od založení. Vyklíčená



Obr. 15 Experiment za použití sterilního písku jako substrátu (vlevo), klíčící semena po 3 dnech v suchu -0,3 MPa při teplotě 35 °C ve sterilním písku (vpravo)

Zdroj: autoři

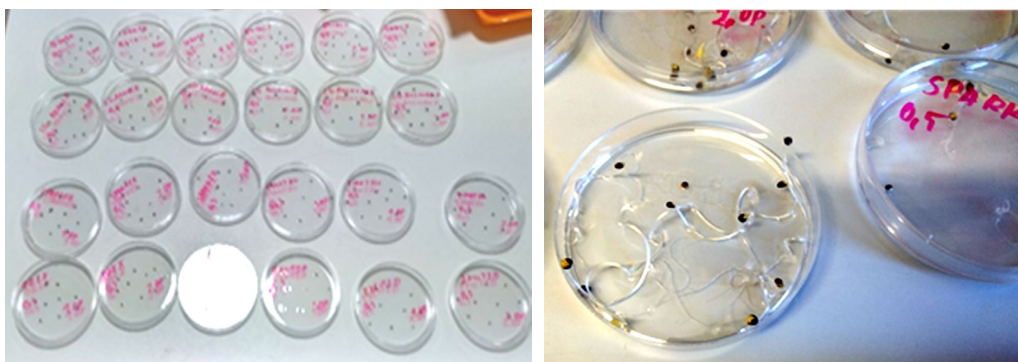
semena byla z Petriho misek odstraňována. Za vitální byla považována semena s viditelným klíčkem.

Paralelně byla vedena srovnávací varianta experimentu s použitím filtračního papíru, destilované vody a teploty 20 °C.

c) Hodnocení vitality za stresu suchem a vysokou teplotou – použití digitální analýzy obrazu

V experimentu byla pro hodnocení vitality jako délky a plochy klíčících orgánů semen řepky olejné použita digitální analýza obrazu (metoda popsána v kapitole „Inovace hodnocení vitality semen – využití digitální analýzy obrazu“).

Experiment byl veden ve dvou variantách úrovně simulovaného sucha. Do Petriho misek o průměru 90 milimetrů bez filtračního papíru bylo umístěno vždy 10 semen testovaného genotypu a aplikováno 8 ml roztoku PEG 6000 o osmotickém potenciálu -0,5 MPa nebo -0,3 MPa (Obr. 16). Pokus byl veden ve třech opakováních. Semena byla v Petriho misce umístěna tak, aby se pokud možno nedotýkala. Kvůli redukci výparu a ztráty roztoku byly Petriho misky hermeticky uzavřeny do polyethylenových sáčků a umístěny do klimaboxu při teplotě 30 °C. Po 7 a 14 dnech byla klíčící semena šetrně vyjmuta z Petriho misky pinzetou, položena na skenovací plochu skeneru Epson Perfection V 700 Photo do tenké vrstvy adekvátního roztoku, naskenována a analyzována pomocí software pro digitální analýzu obrazu WinRhizo (Régent Instruments Inc., Quebec, Kanada), verze Arabidopsis.



Obr. 16 Zakládání experimentu pro hodnocení vitality semen řepky olejné použitím metody digitální analýzy obrazu (vlevo), stav po 14 dnech klíčení v suchu -0,3 MPa při teplotě 30 °C (vpravo)

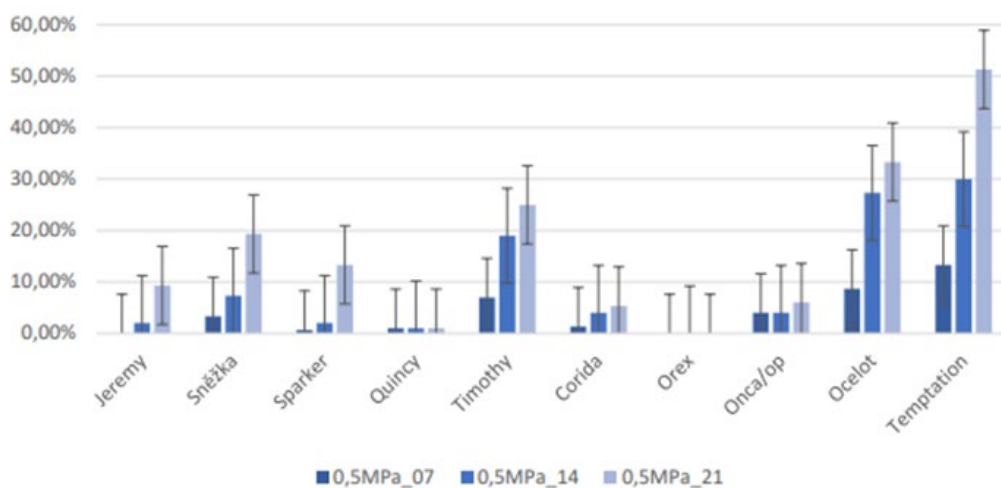
Zdroj: autoři

Výsledky

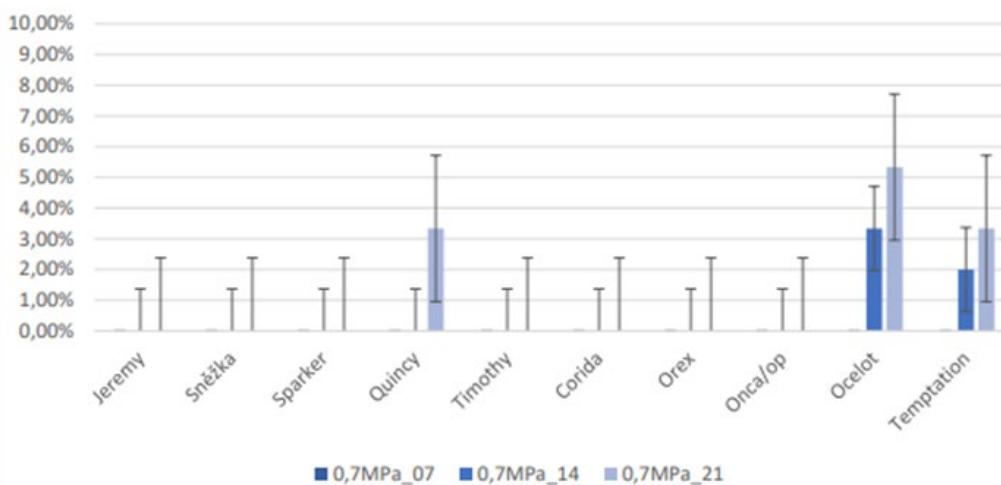
a) Hodnocení vitality za stresu suchem – testování na filtračním papíru

Hodnocení vitality semen ve variantě stresu suchem -0,5 MPa po 7 dnech experimentu bylo problematické z důvodu nízkého počtu vyklíčených semen. Reprezentativní výsledky přineslo až hodnocení po 14 a 21 dnech, kdy byly mezi odrůdami zjištěny

statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$ (Obr. 17). Stres suchem $-0,5$ MPa nejlépe tolerovala odrůda Temptation, která vykazovala po 7 dnech klíčení 13,3 %, po 14 dnech 30 % a po 21 dnech 51,3 % vyklíčených semen, považovaných v experimentu za vitální. Jedná se o jedinou hybridní odrůdu z testovaného sortimentu odrůd v tomto experimentu s deklarovaným rychlým počátečním růstem a vhodností do všech oblastí pěstování.



Obr. 17 Vitalita semen řepky za podmínek stresu suchem $-0,5$ MPa a teplotě 30 °C pro jednotlivé odrůdy ve třech termínech hodnocení (po 7, 14 a 21 dnech experimentu). Chybové úsečky znázorňují 95% konfidenční intervaly



Obr. 18 Vitalita semen řepky za podmínek stresu suchem $-0,7$ MPa a teplotě 30 °C pro jednotlivé odrůdy ve třech termínech hodnocení (po 7, 14 a 21 dnech experimentu). Chybové úsečky znázorňují 95% konfidenční intervaly

Tab. 4 Hodnoty korelačních koeficientů mezi použitými variantami hodnocení vitality semen a polní vzcházivostí

	Srov. 7	-0,5 7	-0,7 7	Srov. 14	-0,5 14	-0,7 14	Srov. 21	-0,5 21	-0,7 21	Vz. 1	Vz. 2
Srov. 7	1,000										
-0,5 7	-0,097	1,000									
-0,7 7	0,000	0,000	1,000								
Srov. 14	0,871	-0,043	0,000	1,000							
-0,5 14	0,293	0,728	0,000	0,456	1,000						
-0,7 14	0,477	0,292	0,000	0,600	0,833	1,000					
Srov. 21	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000				
-0,5 21	0,202	0,642	0,000	0,385	0,945	0,741	0,000	1,000			
-0,7 21	0,571	0,164	0,000	0,640	0,635	0,856	0,000	0,534	1,000		
Vz. 1	0,380	-0,158	0,000	0,211	-0,232	-0,094	0,000	-0,449	-0,189	1,000	
Vz. 2	-0,190	0,478	0,000	0,005	0,372	-0,017	0,000	0,431	-0,422	0,038	1,000

Pozn. statisticky průkazné ($p \leq 0,05$) hodnoty korelačních koeficientů jsou označeny tučně. Srov. 7, Srov. 14, Srov. 21 kóduje srovnávací variantu po 7, 14, 21 dnech; -0,5 7, -0,5 14, -0,5 21 kóduje vitalitu po 7, 14, 21 dnech ve variantě -0,5 MPa; -0,7 7, -0,7 14, -0,7 21 kóduje vitalitu po 7, 14, 21 dnech ve variantě -0,7 MPa; Vz. 1, Vz. 2 kóduje polní vzcházivost na lokalitě 1 a lokalitě 2

Při osmotickém potenciálu -0,7 MPa, tj. za velmi silné deficience vody, nebyly po 7 dnech klíčení zjištěny statisticky významné rozdíly mezi odrůdami, když byl zjištěn nulový počet vyklíčených semen. I po 14 i 21 dnech byla schopnost semen klíčit velmi výrazně redukována působením velmi silného stresu suchem a statistické hodnocení diferencí nebylo vypovídající (Obr. 18).

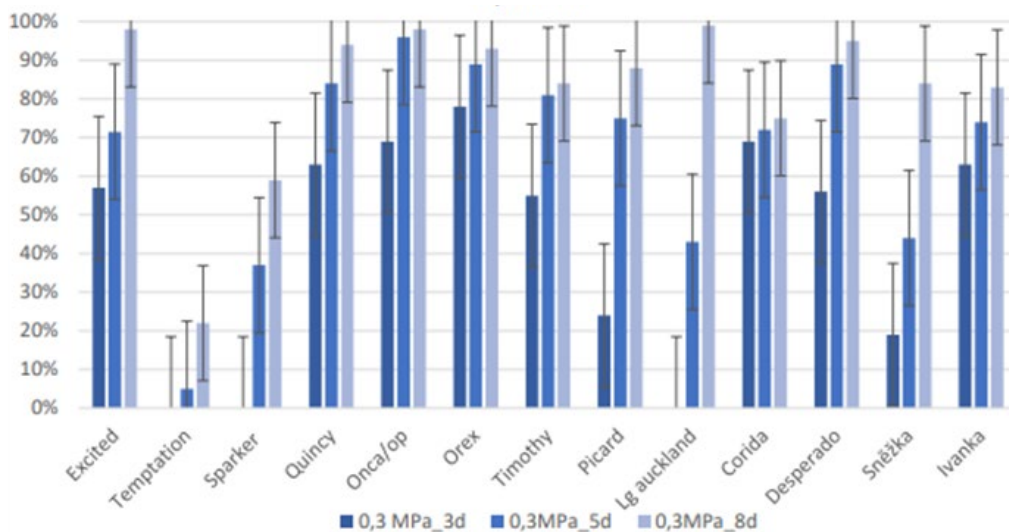
Výsledky testování vitality semen v laboratorních podmínkách při použití dvou úrovní sucha a třech termínech hodnocení byly korelovány s hodnotami polní vzcházivosti na dvou lokalitách (Tab. 4). Statisticky průkazné hodnoty korelačního koeficientu mezi použitými variantami hodnocení vitality semen a polní vzcházivostí nebyly detekovány.

b) Hodnocení vitality za stresu suchem a vysokou teplotou – testování v křemičitém písku

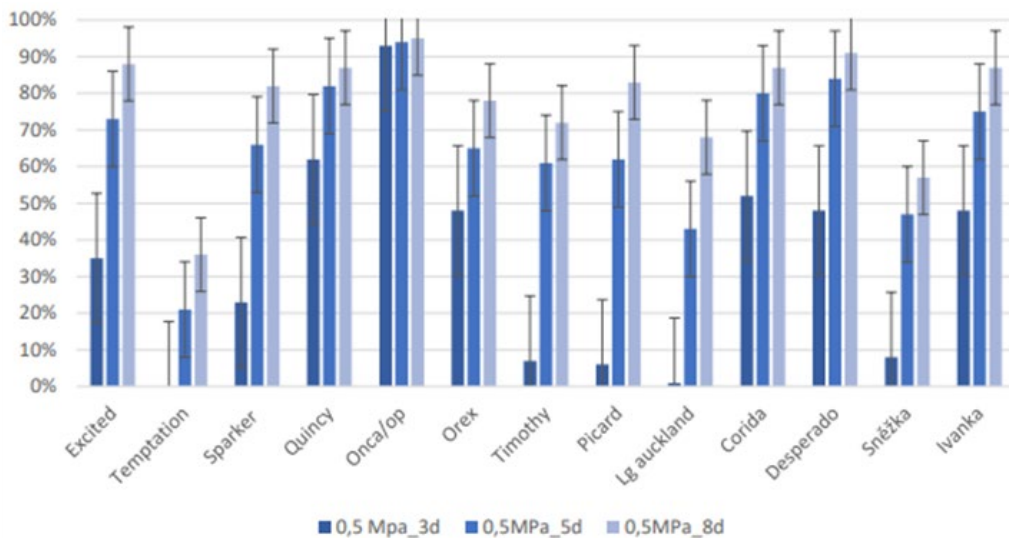
Testování vitality semen řepky olejné ve sterilním křemičitém písku bylo použito jako alternativa testu na filtračním papíru, který byl za vysoké teploty komplikován plesnivěním filtračního papíru (i přes provedenou dezinfekci semen). Kombinace vysokých teplot vzduchu (30 °C) v kombinaci s nízkou hodnotou osmotického potenciálu nebo bez indukovaného vodního deficitu ve variantě s destilovanou vodou je tak při použití filtračního papíru komplikovaná. Alternativa s použitím sterilního křemičitého písku je naopak vhodná při testování nulových nebo nízkých koncentrací osmotického potenciálu. Roztok PEG 6000 s vyšší úrovní osmotického potenciálu (-0,5 MPa) způsobuje obalení zrn písku roztokem, za vyšší teploty potom zalepení a vysychání roztoku. Možná je tak hypoxie testovaných semen a nutné je časté doplňování roztoku. V omezeném počtu případů byly identifikovány statisticky průkazné korelace mezi polní

vzcházejivosti a testem vitality semen v písku za stresu sucha a vysoké teploty použité v experimentu.

Zvýšená teplota 35 °C nevykazovala inhibiční či depresivní efekt (při srovnání s variantou s teplotou 20 °C při použití identické úrovně sucha z jiného experimentu).



Obr. 19 Vitalita semen řepky za podmínek stresu suchem -0,3 MPa a teplotě 35 °C pro jednotlivé odrůdy ve třech termínech hodnocení (po 3, 5 a 8 dnech experimentu). Chybové úsečky znázorňují 95% konfidenční intervaly



Obr. 20 Vitalita semen řepky za podmínek stresu suchem -0,5 MPa a teplotě 35 °C pro jednotlivé odrůdy ve třech termínech hodnocení (po 3, 5 a 8 dnech experimentu). Chybové úsečky znázorňují 95% konfidenční intervaly

Stres suchem -0,3 MPa způsobil u většiny genotypů redukci počtu v průměru o 10 % po osmi dnech experimentu (Obr. 19). U varianty -0,5 MPa činila redukce v průměru 21 % (Obr. 20). Nicméně, zaznamenány byly v tomto experimentu výrazné odrůdové difference, když vitalita odrůdy Temptation, nejnvýkonnější v předchozím experimentu, byla výrazně redukována použitím pokusných podmínek.

c) Hodnocení vitality za stresu suchem a vysokou teplotou – použití digitální analýzy obrazu

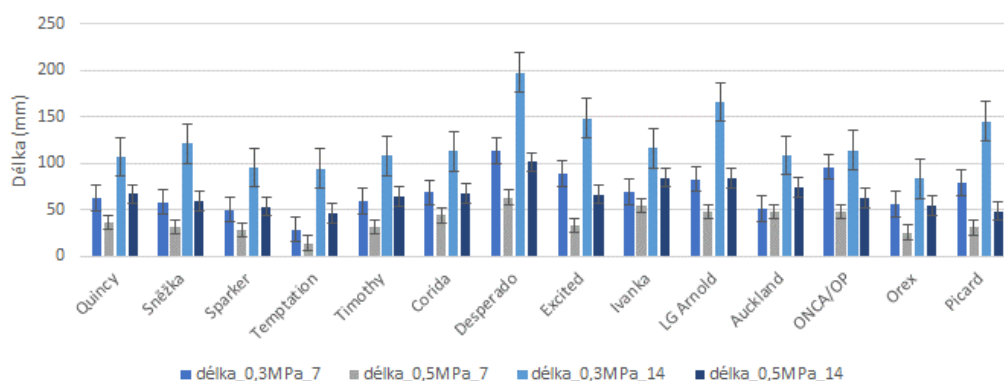
Odrůdové difference hodnot délky klíčků a kořínků byly po sedmi i čtrnácti dnech statisticky odlišné na hladině významnosti $p \leq 0,05$ pro obě varianty sucha (Obr. 21). Odrůda s nejvyššími hodnotami po sedmi dnech experimentu při osmotickém potenciálu -0,3 MPa dosáhla úrovně 113,48 mm, odrůda s nejnižšími hodnotami 28,71 mm. Při osmotickém potenciálu -0,5 MPa dosáhla identická odrůda jako při osmotickém potenciálu -0,3 MPa po sedmi dnech nejvyšší délky (62,73 mm). I v případě nejmenší délky po sedmi dnech byla u varianty -0,5 MPa identifikována stejná odrůda jako v případě varianty -0,3 MPa (13,97 mm). Po čtrnácti dnech experimentu činily rozdíly mezi odrůdami s největší a nejmenší délkou při osmotickém potenciálu -0,3 MPa 103,18 mm, a u osmotického potenciálu -0,5 MPa 55,39 mm.

Také odrůdové difference hodnot plochy hodnocených orgánů analyzované po sedmi i čtrnácti dnech experimentu byly statisticky odlišné na hladině významnosti $p \leq 0,05$ pro obě varianty sucha (Obr. 22). Odrůda s největší plochou po sedmi dnech při osmotickém potenciálu -0,3 MPa dosáhla úrovně 25,13 mm², odrůda s plochou 10,02 mm². Při osmotickém potenciálu -0,5 MPa byla po sedmi dnech dosažena nejvyšší plocha 13,11 mm², nejnižší 4,29 mm². Po čtrnácti dnech experimentu činily rozdíly mezi odrůdami s největší a nejmenší plochou při osmotickém potenciálu -0,3 MPa 15,58 mm², a u osmotického potenciálu -0,5 MPa 9,83 mm².

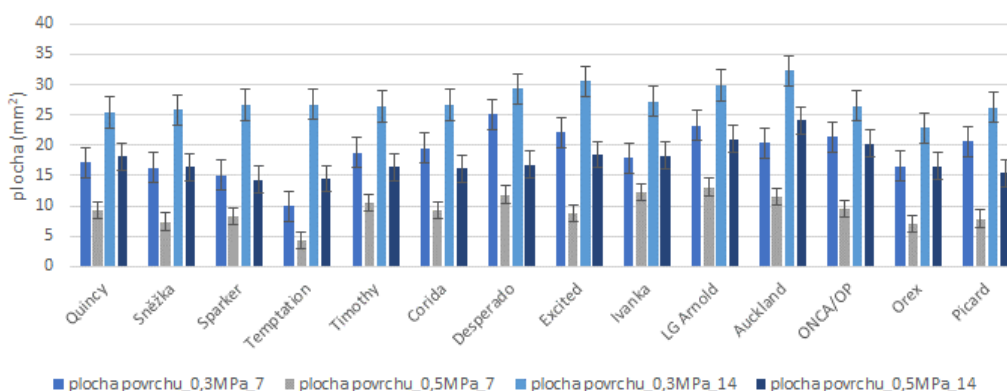
Hodnocení těsnosti vztahů mezi použitou variantou testování vitality semen a polní vzházivostí prostřednictvím korelačních koeficientů prokázalo statisticky průkazné vztahy na hladině významnosti $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (Tab. 5). Použití fyto-metrických charakteristik s využitím hodnocení digitální analýzou obrazu se tak jeví jako perspektivní postup hodnocení vitality v laboratorních podmínkách pro predikci vzházivosti genotypů v polních podmínkách.

Závěr

Experimentem s testováním vitality semen řepky olejné v podmínkách sucha bylo zjištěno, že sucho na úrovni osmotického potenciálu -0,7 MPa je limitní pro schopnost semen řepky vyklíčit. Testování vitality semen s použitím vyšších teplot (30 °C nebo 35 °C) přináší problémy s masivním rozvojem houbových patogenů a tím se zdravotním stavem testovaného biologického materiálu (rozvoj houbových chorob). Oproti tomu, použití sterilního laboratorního písku jako substrátu je problematické v případě použití vyšších koncentrací PEG 6000 pro simulaci větších intenzit sucha, kdy roztok na povrchu písku způsobuje vytvoření souvislé lepivé vrstvy s rizikem vzniku hypoxie. Pro hodnocení těsnosti vztahů testovaných metod hodnocení vitality a polní vzházivosti byla použita korelační analýza. Těsné vztahy byly zjištěny především v případě použití hodnocení povrchu klíčků a kořínků z digitálních analýz obrazu klíčenců.



Obr. 21 Vitalita semen řepky vyjádřená jako délka klíčků a kořínků za podmínek stresu suchem -0,3 MPa a -0,5 MPa a teplotě 30 °C pro jednotlivé odrůdy ve dvou termínech hodnocení (po 7 a 14 dnech experimentu). Chybové úsečky znázorňují 95% konfidenční intervaly



Obr. 22 Vitalita semen řepky vyjádřená jako plocha klíčků a kořínků za podmínek stresu suchem -0,3 MPa a -0,5 MPa a teplotě 30 °C pro jednotlivé odrůdy ve dvou termínech hodnocení (po 7 a 14 dnech experimentu). Chybové úsečky znázorňují 95% konfidenční intervaly

Tab. 5 Hodnoty korelačních koeficientů mezi použitými variantami hodnocení vitality semen pomocí digitální analýzy obrazu a polní vzcházivosti

	Délka -0,3 MPa po 7	Délka -0,5 MPa po 7	Délka -0,3 MPa po 14	Délka -0,5 MPa po 14	Povrch -0,3 MPa po 7	Povrch -0,5 MPa po 7	Povrch -0,3 MPa po 14	Povrch -0,5 MPa po 14
Vzcházení 1	0,72	0,73	0,35	0,71	0,85	0,80	0,25	0,49
Vzcházení 2	0,63	0,64	0,37	0,64	0,81	0,78	0,19	0,35

Pozn. Statisticky průkazné hodnoty korelačních koeficientů jsou označeny tučně. Vzcházení 1, Vzcházení 2 kóduje polní vzcházivost na lokalitě 1 a lokalitě 2

4.2.6 Výsledky testování vitality semen za stresových podmínek – mák setý

Motivací pro realizaci experimentu byla rostoucí frekvence výskytu epizod sucha v předjaří a na jaře, ohrožující úspěšnost založení porostů jařin, jarního máku nevyjímaje. Velice mělce setý mák je k výskytu přísušků obzvláště senzitivní, stejně jako k tvorbě krusty na povrchu půdy, zabraňující klíčení semen a vzcházení klíčenců. Mák se vyznačuje nízkou konkurenční schopností vůči plevelům a brzké a vyrovnané vzejtí a zapojení porostů tak hraje významnou roli ve výnosotvorném procesu. Vysoká vitalita semen by mohla omezit negativní dopady uvedených problematických aspektů pěstování jarních odrůd máku.

Společným jmenovatelem testů klíčivosti nebo vitality drobnosemenných plodin, mezi které mák patří, je precizní a citlivá optimalizace nastavení podmínek, když jejich nuance může výrazně ovlivnit výsledky. V tomto případě existuje předpoklad vlivu nejen pokusných podmínek v podobě teploty, vlhkosti prostředí či simulovaných (sub)optimálních vláhových podmínek, ale i použitého substrátu na kterém experiment probíhá a jeho uspořádání. Pro různé druhy rostlin a pro různé účely hodnocení jsou vhodné různé varianty použitého substrátu.

„Metoda na papíru“, označovaná TP, neboli „top of paper“ se používá při testování semen pomocí Jakobsenova klíčidla, které je použito pro fotoblastické druhy. Dále se používá v uzavřených boxech, či na Petriho miskách. Ztráty roztoku výparem a vysychání filtračního papíru lze minimalizovat uzavřením do plastových vaků. Další možností je umístění semen do boxů s řízeným režimem vlhkosti vzduchu.

Jako metoda „mezi dvěma papíry“ (BP, „between paper“) je označováno umístění semen mezi dvěma papíry. Semena se vkládají do „obálek“ (kapes) z filtračního papíru ve svislé či vodorovné poloze. Modifikací metody je vkládání semen do srolovaného filtračního papíru. Při této metodě se následně umístí do svislé polohy. Semena s filtračním papírem se opět umísťují do boxů a polyethylenových obalů, či speciálních klimatických komor.

Při použití metody „ve skládaném papíru“ (PP, „pleated paper“) se papír poskládá do harmoniky o (zpravidla) padesáti záhybech. Do záhybů se, zpravidla po dvou, vkládají testovaná semena. Pro větší rovnoměrnost vlhkostních podmínek se kolem skládaného filtračního papíru ovine hladký proužek filtračního papíru.

Metody s použitím písku a organického substrátu (dále jen substrátu) se standardně používají u rostlin, u kterých je tato metoda vyžadována dle metodik autorit pro testování osiv (ÚKZÚZ, ISTA). Alternativně, např. pro výzkumné účely, je tato metoda se substrátem používána relativně často u širokého spektra rostlinných druhů. Při použití metody „Metoda na povrch substrátu“ (TS, „top of sand“, nebo TO „top of organic growing medium“) semena vtlačí do povrchu substrátu.

Při použití metody „Metoda v substrátu“ (S, „in sand“, nebo pro organický substrát O, „in organic growing medium“) jsou semena, stejně jako u metody TS, zatlačena do povrchu substrátu. Navíc jsou však semena překryta ještě nakypřenou vrstvou substrátu. Výška substrátu je závislá na velikosti testovaných semen.

„Metoda s použitím zeminy“ je označována jako „soil“. Metodika s použitím zeminy je obdobná jako u metodiky s použitím písku, či organického substrátu. Limitujícím faktorem metody je značná heterogenita půdy, která mimo logické výsledkové odchylky prakticky znemožňuje exaktní replikaci experimentu v experimentální praxi.

„Metoda kombinující filtrační papír a písek“ (TPS, „top of paper covered with sand“) využívá výhod nasávacích schopností filtračního papíru a písku, který se režimem více blíží půdním vlastnostem. Semena se naskládají na filtrační papír a následně zasypou 20 mm suchého písku.

Při testování vitality semen máku byly použity různé varianty a metodiky laboratorního experimentu. Modifikace se netýkaly jen hodnocení vlivu úrovně simulovaných podmínek abiotického stresu (teplota a sucho), ale i použitého materiálu, na kterém probíhalo testování a jeho uspořádání (technické vedení experimentu). Variantní hodnocení vitality semen máku mělo za cíl, mimo jiné, optimalizovat metodiku testování vitality u máku tak, aby nedocházelo k nežádoucímu ovlivnění výsledků.

Materiál a metodika

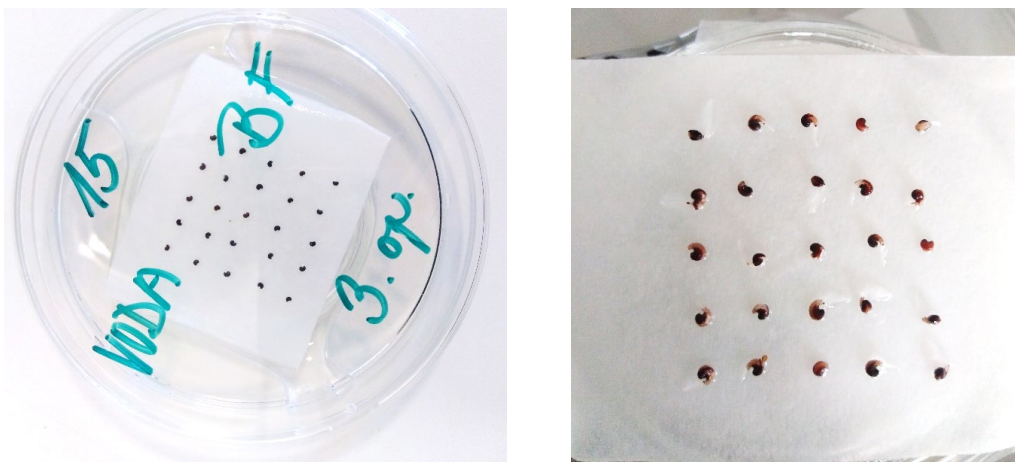
Laboratorní experiment hodnocení vitality semen máku jarního byl založen v Petriho miskách o průměru 90 mm (v každé Petriho misce 25 semen) umístěných v polyetylenových sáčkích pro omezení ztrát vody, ve tmě, ve třech opakováních, se dvěma odrůdami, ve dvou teplotních režimech (stálá teplota v klimaboxu 10 °C a stálá teplota v klimaboxu 20 °C) s relativní vzdušnou vlhkostí ~ 80 %, ve dvou variantách vlhkostního režimu (varianta kontrola – klíčení v destilované vodě, varianta stres suchem na úrovni -0,5 MPa – s použitím roztoku PEG 6000), v pěti různých metodách uložení semen v Petriho misce (popis viz níže) a při šesti termínech vizuálního hodnocení (první hodnocení dva dny od založení pokusu a poté každý následující den), když za vitální byla v tomto experimentu považována semena s makroskopicky viditelným klíčkem.

Varianty uložení semen v Petriho miskách:

1. Pruhem filtračního papíru provenience X o gramáži 80 g/m² širokým cca 50 mm a dlouhým cca 150 mm byla překryta spodní část skleněné Petriho misky s průměrem 60 mm, otočená dnem vzhůru. Přesah proužku filtračního papíru byl ohnut pod misku. Tato byla vložena do 90 mm plastové Petriho misky a vytvořila tak uvnitř „ostrov“, na který byla rozmístěna semena („metoda na papíru“). Filtrační papír byl navlhčen 8 ml destilované vody, respektive roztoku PEG 6000.
2. Pruhem filtračního papíru provenience Y o gramáži 80 g/m² širokým cca 50 mm a dlouhým cca 150 mm byla překryta spodní část skleněné Petriho misky s průměrem 60 mm, otočená dnem vzhůru. Přesah proužku filtračního papíru byl ohnut pod misku. Tato byla vložena do 90 mm plastové Petriho misky a vytvořila tak uvnitř „ostrov“, na který byla rozmístěna semena („metoda na papíru“) – Obr. 23. Filtrační papír byl navlhčen 8 ml destilované vody, respektive roztoku PEG 6000.
3. Na dno plastové Petriho misky o průměru 90 mm byla vložena jedna vrstva kruhového výseku standardního filtračního papíru o gramáži 80 g/m². Filtrační papír byl navlhčen 8 ml destilované vody, respektive roztoku PEG 6000 a byla na něj rozmístěna semena („metoda na papíru“). V této variantě semena několik hodin plovla v nadbytku vody, respektive roztoku PEG 6000, než došlo ke vstřebání filtračním papírem (Obr. 24).
4. Na dno plastové Petriho misky o průměru 90 mm byly vloženy tři vrstvy kruhového výseku standardního filtračního papíru o gramáži 80 g/m². Filtrační papír

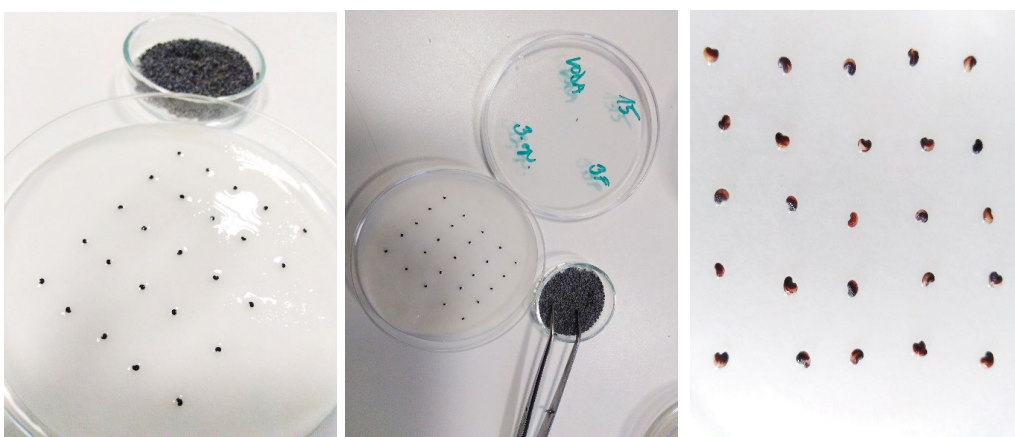
byl navlhčen 8 ml destilované vody, respektive roztoku PEG 6000 a byla na něj rozmístěna semena („metoda na papíru“).

5. Na dno plastové Petriho misky o průměru 90 mm byly vloženy dvě vrstvy kruhového výseku standardního filtračního papíru o gramáži 80 g/m². Filtrační papír byl navlhčen 8 ml destilované vody, respektive roztoku PEG 6000 a byla na něj rozmístěna semena. Poté byla semena překryta jednou vrstvou filtračního papíru („metoda mezi dvěma papíry“).



Obr. 23 Umístění semen máku v Petriho miskách ve variantě 1 a 2 – „metoda na papíru“ s vnitřním „ostrovem“

Zdroj: autoři



Obr. 24 Umístění semen máku v Petriho miskách ve variantě 3 (vlevo a uprostřed), semena máku těsně před vyklíčením (vpravo)

Zdroj: autoři

Výsledky

Analýzou datového souboru s použitím Shapiro-Wilkova testu normality bylo zjištěno, že data nemají normální rozdělení (distribuci), proto nemohla být použita klasická analýza rozptylu (ANOVA), která předpokládá a vyžaduje normální rozdělení hodnot. Pro statistické analýzy byl použit Kruskal-Wallisův test (při porovnávání více výběrových souborů), případně Mann-Whitneyův U-test (při porovnávání dvou výběrových souborů). Diference počtu vitálních semen v teplotě 10 °C a 20 °C (napříč ostatními hodnocenými faktory) byla průkazná na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Zajímavý je fakt, že za vyšší teploty klíčila semena máku hůře než za nižší teploty (Tab. 6). Dle očekávání byl statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$) identifikován i při hodnocení diferencí vitality semen v optimálních vláhových podmínkách (varianta s destilovanou vodou) ve srovnání s variantou stresu suchem -0,5 MPa. Odrůdový rozdíl nebyl statisticky průkazný, i když odrůda 1 dosahovala napříč pokusnými faktory vitality 70,7 % a odrůda 2 63,3 %. Pozitivní je zjištění, že výsledky nebyly statisticky průkazně ovlivněny použitou metodou umístění semen na filtrační papír v Petriho misce s výjimkou varianty 5 („metoda mezi dvěma papíry“), která pravděpodobně způsobovala hypoxii.

Závěr

Realizovaným experimentem byly identifikovány dominantní faktory, ovlivňující klíčení máku v optimálních a suboptimálních podmínkách. Paralelně byly otestovány různé způsoby založení experimentu s ohledem na specifika máku v podobě velikosti semen a citlivosti k některým faktorům s efektem na proces klíčení. Na základě výsledků experimentu tak je možné doporučit pro výzkumné účely experimentálně ověřenou metodologii založení testu vitality u máku a jiných drobnosemenných plodin.

Tab. 6 Průměrné hodnoty hodnocených znaků vitality semen máku

Analyzovaný parametr	%
Průměrná vitalita ve 20 °C	60,5
Průměrná vitalita v 10 °C	72,1
Průměrná vitalita v H ₂ O	91,3
Průměrná vitalita v -0,5 MPa	47,6
Průměrná vitalita odrůdy 1	70,7
Průměrná vitalita odrůdy 2	63,3
Průměrná vitalita varianta založení 1	72,1
Průměrná vitalita varianta založení 2	72,4
Průměrná vitalita varianta založení 3	72,2
Průměrná vitalita varianta založení 4	69,5
Průměrná vitalita varianta založení 5	48,9

5 NOVOST METODY

Perspektivním selekčním kritériem, které se může uplatnit při výběru genotypů tolerantních k abiotickým stresorům, může být test vitality semen, tj. schopnost semen vyklíčit za stresových podmínek. Prezentované výsledky potvrzují významné meziorůdové difference ve vitalitě semen a významný genetický základ vitality a jsou předpokladem pro využití této vlastnosti semen jako selekčního kritéria ve šlechtění.

S rozvojem digitální optické techniky a digitální analýzy obrazu jsou vyvíjeny a úspěšně zaváděny metody exaktního hodnocení vitality semen, pro precizní identifikaci a kvantifikaci diferencí a možnost automatizovaného objektivního vyhodnocování vitality. Metoda hodnocení vitality semen rozvíjená v posledních letech na Mendelově univerzitě v Brně umožnila kvantifikovat genotypové difference ve vitalitě semen, testované v podmínkách stresu suchem a v chladu. Metoda, založená na hodnocení vitality pomocí digitální analýzy obrazu s využitím software pro hodnocení morfometrických charakteristik některých rostlinných orgánů, se jeví jako perspektivní alternativa tradičních metod. Jejím prostřednictvím byla mimo jiné identifikována pozitivní vazba mezi velikostí kořenového systému mateřských rostlin a vitalitou jejich semen. S ohledem na to, že bylo prokázáno, že na větší kořenový systém lze šlechtit, lze zvýšení vitality semen s dobrou perspektivou dosáhnout tradičními šlechtitelskými metodami. V případě pozitivní vazby by se zvýšila tolerance vyšlechtěných potomstev k suchu. Vitálnější obilky mohou být schopny vyhnout se případnému suchu v době zakládání porostů, rostliny vytvoří rychleji kořenový systém a budou tak více tolerantní k suchu, porosty mohou lépe a vyrovnaně vzcházet.

6 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena především pracovníkům výzkumu a šlechtitelům, kteří mají zájem o problematiku výběru tolerantních odrůd k abiotickým stresorům a testování parametrů semen pro použití ve ztížených podmínkách. Praktické využití poznatků spočívá ve spojení popsaného know-how se znalostmi agronoma o specifických podmínkách a problémech konkrétního zemědělského podniku a jednotlivých pozemků v kombinaci s průběhem počasí. Jsou popsány, a tudíž i uplatnitelné, také zjednodušené postupy pro použití metod v jednoduchých laboratorních podmínkách.

Metodika bude v tištěné formě dána zdarma k dispozici a šířena na odborných seminářích a prezentacích. Bude k dispozici pracovníkům v zemědělském poradenství. V elektronické podobě bude zveřejněna na webových stránkách Mendelovy univerzity v Brně, spolu s publikacemi autorů, a na webových stránkách www.agronavigator.cz. Získané poznatky budou šířeny i další vhodnou formou (prezentace, výuka, příručky pro zemědělské poradce).

Pro pěstitele, šlechtitele nebo pracovníky v poradenství se zájmem o problematiku lze doporučit přímou spolupráci s autory metodiky.

Metoda je jako doplňkový nástroj selekce používána v projektu NAZV QK1910197 „Strategie minimalizace dopadu sucha na udržitelnou produkci a sladovnickou kvalitu ječmene“.

7 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Hodnocení vitality semen má potenciál realizace především ve šlechtitelských programech, případně ve sladařské praxi. Uplatnění popsaných zjednodušených postupů testování vitality semen nevyžaduje nové investiční náklady.

Existuje předpoklad, že u genotypů s vitálnějšími semeny dojde, mimo jiné, ke zvýšení tolerance k suchu. Klíčenci z vitálnějších obilek uniknou snáze případnému suchu v počátečních fázích vegetace, vytvoří rychleji kořenový systém a budou tak tolerantnější ke stresovým podmínkám i v dalších fázích vegetace.

Ekonomický benefit tak spočívá v produkci a používání semen genotypů s vyšší přidanou hodnotou, kvalitou, schopností poskytnout životaschopné jedince i v suboptimálních podmínkách. Nepřímo se přínos výběru a šlechtění odrůd ploidin se zvýšenou tolerancí ke stresorům projeví zvýšenými výnosy a jejich stabilitou v podmínkách zvýšené variability srážek a růstu teplot.

Přínos adaptabilních odrůd nelze věrohodně vypočítat, ale pouhá redukce ztrát na výnosech v důsledku sucha v posledních letech o 1 % představuje v ČR benefit ve výši desítek miliónů korun.

8 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ANANDAN, A., MAHENDER, A., SAH, R. P., SOSE, L. K., SUBUDHI, H., MEHER, J., REDDY, J. N., ALI, J. Non-destructive phenotyping for early seedling vigor in direct-seeded rice. *Plant Methods*, 16(1): 127.
- BERTHOLDSSON, N. O., KOLODINSKA BRANTESTAM, A. 2009. A century of Nordic barley breeding – Effects of early vigour root and shoot growth, straw length, harvest index and grain weight. *European Journal of Agronomy*, 30(4): 266–274.
- BLÁHA, L., BRADOVÁ, J. 2014. Význam vztahu kořenů a nadzemní části rostlin a jeho využití. In: *Příspěvky k problematice zemědělského pokusnictví*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, pp. 49–62.
- BLÁHA, L., KUČERA, V., KOSTKANOVÁ, E., MALÝ, J. 1993. Vliv provenience na vlastnosti osiva, růst a výnos ozimé pšenice. *Rostlinná Výroba*, 39: 687–700.
- BLÁHA, L., VYVADILOVÁ, M. Metodika testování vlastností semen a klíčnicích rostlin na odolnost vůči fyzikálním stresorům pro selekci genetických zdrojů řepky ozimé. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2012, 15 s.
- CAO, D.-D., HU, J., HUANG, X.-X., WANG, X.-J., GUAN, Y.-J., WANG, Z.-F. 2008. Relationships between changes of kernel nutritive components and seed vigor during development stages of F₁ seeds of sh₂ sweet corn. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 9(12): 964–968.
- DOBIÁŠOVÁ, B., GREGOROVÁ, V. 2022. Situace v oblasti zájmu o testování vitality osiv semenářskou praxí v ČR [ústní sdělení]. BRNO, 1.12.2022.
- EHRENBERGEROVÁ, J. 2014. *Odrůdy, osivo a sadba*. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
- ELIAS, S.G., COPELAND, L. O., MCDONALD, M. B., BAALBAKI, R. Z. 2012. *Seed testing: principles and practices*. Michigan State University Press, East Lansing.
- FINCH-SAVAGE, W. E., BASSEL, G. W. 2016. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. *Journal of Experimental Botany*, 67(3): 567–591.
- GHASSEMI-GOLEZANI, K., KHOMARI, S., VALIZADEH, M., ALYARI, H. 2008. Effects of seed vigour and the duration of cold acclimation on freezing tolerance of winter oilseed rape. *Seed Science and Technology*, 36(3): 767–775.
- HAMPTON, J. G. 1995. Methods of viability and vigor testing: a critical appraisal. In: *Seed Quality. Basic Mechanisms and Agriculture Implementations*. Food Products Press, pp. 81–118.
- HAMPTON, J. G., COOLBEAR, P. 1990. Potential versus actual seed performance – Can vigour testing provide an answer? *Seed Science and Technology*, 18: 215–228.
- HEYDECKER, W. 1972. Vigour. In: ROBERTS, E. H. (Ed.). *Viability of Seeds*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 209–252. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-5685-8_8 [cit. 2022-05-16].
- HOFBAUER, J., VEJRAŽKA, K., STŘEDA, T. 2011. Ročníkové vlivy na kvalitativní parametry osiva žita lesního (*Secale cereale*, var. *multicaule*). In: *6th Scientific and Technical Seminar on Seed and Seedlings*. Praha, Czech University Life Sciences Prague, pp. 120–125.
- HONSOVA, H. 2019. Poppy seed vigor in relation to field emergence and yield. In: *14th Scientific and Technical Seminar on Seed and Seedlings*. Praha, pp. 24–31.
- HOSNEDL, V. 2009. Cereals seed quality, its evaluation and importance for using of varieties yield potential. In: *9th Scientific and Technical Seminar on Seed and Seedlings*. Praha, pp. 49–54.
- HOSNEDL, V. 2002. Biologické vlastnosti semen a sadby. In: HOUBA, M., HOSNEDL, V. (Eds.). *Osivo a sadba*. Nakladatelství Ing. Martin Sedláček, pp. 18–53.
- HOSNEDL, V. 1999. Stárnutí a vitalita osiva. In: *Sborník referátů Osivo a sadba*. ČZU, Praha, pp. 77–81.

- HOSNEDL, V., HONSOVÁ, H. 2002. Barley seed sensitivity to water stress at germination stage. *Plant, Soil and Environment*, 48(7): 293–297.
- CHENG, H.-Y., ZHENG, G.-H., WANG, X.-F., LIU, Y., YAN, Y.-T., LIN, J. 2005. Possible Involvement of K^+/Na^+ in Assessing the Seed Vigor Index. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(8): 935–941.
- CHLOUPEK, O. 2008. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Academia, Praha.
- CHLOUPEK, O. 1972. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum*, 14: 227–230.
- CHLOUPEK, O., EHRENBERGEROVÁ, J., ŠEVČÍK, R., PAŘÍZEK, P. 1997. Genetic and non-genetic factors affecting germination and vitality in spring barley seed. *Plant Breeding*, 116(2): 186–188.
- KAKHKI, H. R. T., KAZEMI, M., TAVAKOLI, H. 2008. Analysis of seed size effect on seedling characteristics of different types of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(7): 666–671.
- KLIMEŠOVÁ, J., VINTRLÍKOVÁ, E., STŘEDA, T. 2015. Vitalita semen a velikost kořenového systému jako nástroj pro únik a toleranci suchu. In: *Osivo a sadba. XII. Odborný a vědecký seminář*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, pp. 71–76.
- L Aidig, F., DROBEK, T., MEYER, U. 2008. Genotypic and environmental variability for cultivars from 30 different crops in German official variety trials. *Plant Breeding*, 127(6): 541–547.
- LEHNER, A., MAMADOU, N., POELS, P., COME, D., BAILLY, C., CORBINEAU, F. 2008. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, 47(3): 555–565.
- LONGLONG, F., TIANGANG, H., BOXIAO, W., BENHUA, Z. 2021. Assessment of rice seed vigour using selected frequencies of electrical impedance spectroscopy. *Biosystems engineering*, 209: 53–63.
- MARCOS-FILHO, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, 72(4): 363–374.
- MAVI, K., MAVI, F., DEMIR, I., MATTHEWS, S. 2014. Electrical conductivity of seed soak water predicts seedling emergence and seed storage potential in commercial seed lots of radish. *Seed Science and Technology*, 42(1): 76–86.
- MCDONALD, M. B. 2000. Seed priming. In: *Seed Technology and its Biological Basis*. CRC Press, USA, pp. 287–325.
- MCDONALD, M. B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27(1): 177–237.
- MCKENZIE, K. S., RUTGER, J. N., PETERSON, M. L. 1980. Relation of seedling-vigor to semidwarfism, early maturity, and pubescence in closely related rice lines. *Crop Science*, 20(2): 169–172.
- MICHEL, B. E., KAUFMANN, M. R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5): 914–916.
- PAZDERŮ, K. 2013. Vitalita jako základní vlastnost osiva pro založení optimálních porostů. In: *Sója 2013*. 20.–22. 8. 2013, Skalička, Sloveč, Řisuty. České Budějovice, Kurent s.r.o., pp. 4–7.
- POWELL, A. A., MATTHEWS, S. 2005. Towards the validation of the controlled deterioration vigor test for small seeded vegetables. *Seed Testing International*, 129: 21–23.
- PROKINOVÁ, E. 2016. Význam ošetření osiva obilnin. *Agromanuál*, 9–10: 32–35.
- PSOTA, V., ŠUSTA, J., KOSAR, K. 1998. Homogenita a modifikace sladu II. Klíčení zrna, chuť piva. *Kvasný Průmysl*, 44(5): 126–129.
- RHOADES, J. D., KANDIAH, A., MASHALI, A. M. 1992. *The use of saline waters for crop production*. FAO irrigation and drainage paper, FAO, Rome, 48.

- SAMARAH, N., ALQUDAH, A. 2011. Effects of late-terminal drought stress on seed germination and vigor of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 57(1): 27–32.
- SENARATNA, T., GUSSE, J. F., MCKERSIE, B. 1988. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean seed axes. *Physiologia Plantarum*, 73(1): 85–91.
- SPIELMEYER, W., HYLES, J., JOAQUIM, P., AZANZA, F., BONNETT, D., ELLIS, M. E., MOORE, C., RICHARDS R. A. A QTL. 2007. on chromosome 6A in bread wheat (*Triticum aestivum*) is associated with longer coleoptiles, greater seedling vigour and final plant height. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 59–66.
- SZIRTES, J., BARLA-SZABO, G. 1981. A method for the determination of vigor in winter wheat seeds. *Novenytermeles*, 30(6): 493–500.
- ŠOTTNÍKOVÁ, V., PSOTA, V., GREGOR, T., SACHAMBULA, L. 2011. Germination dynamics during post harvest maturation of malting barley. *Kvasný Průmysl*, 57(7–8): 242–245.
- ŠŤASTNÝ, J., PAZDERŮ, K. 2008. Evaluation of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seed quality and seed quality stability in relation to varieties and environmental conditions. *Journal of Agrobiology*, 25(2): 153–161.
- TEKRONY, D. M. 2003. Precision is an essential component in seed vigour testing. *Seed Science and Technology*, 31(2): 435–447.
- TEKRONY, D. M., ISTA 2001. Seed Vigour Survey 2000. *ISTA News Bull*, 122: 14–16.
- ÚKZÚZ. 2021. *Metodika zkoušení osiva a sadby*. Edice 2021. ÚKZÚZ, Odbor osiva a sadby, Praha.
- ULLMANNOVÁ, K. 2013. *Genetická kontrola vitality obiliek ječmene*. Doktorská disertační práce. Brno, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta.
- ULLMANNOVÁ, K., STŘEDA, T., CHLOUPEK, O. 2013a. Use of barley seed vigour to discriminate drought and cold tolerance in crop years with high seed vigour and low trait variation. *Plant Breeding*, 132(3): 295–298.
- ULLMANNOVÁ, K., STŘEDA, T., CHLOUPEK, O. 2013b. Hodnocení vitality semen souboru dihaploidních linií sladovnického ječmene. Seed vigour evaluation of malting barley double-haploid lines. In: *Osivo a sadba. XI. odborný a vědecký seminář*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, pp. 35–41.
- VAN DE VENTER, H. A., BARLA-SZABO, G., YBEMA, S. G. 1993. A study of single and multiple stress seed vigour tests for undeteriorated seed lots of wheat. *Seed Science and Technology*, 21(1): 117–125.
- ZHANG, S., HU, J., ZHANG, Y., XIE, X. J., KNAPP A. 2007. Seed priming with brassinolide improves lucerne (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth in relation to physiological changes under salinity stress. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(8): 811–815.

9 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- BODNER, G., ULLMANNOVÁ, K., STŘEDA, T. 2013. Prospects of selection for barley seed vigour as a precondition for stand emergence under dry condition. *Kvasný průmysl*, 59(9): 238–241.
- CHLOUPEK, O., BOTH, Z., DOSTÁL, V., HRSTKOVÁ, P., STŘEDA, T., BETSCHE, T., HRUŠKOVÁ, M., HORÁKOVÁ, V. 2008. Better bread from vigorous grain? *Czech Journal of Food Sciences*, 26(6): 402–412.
- JOVANOVIĆ, I., ALBA MEJÍA, J. E., PSOTA, V., STŘEDA, T. 2021. Seed vigour effected by total polyphenols content. In: *MendelNet 2021: Proceedings of 28th International PhD Students Conference*. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, pp. 43–48.
- JOVANOVIĆ, I., ALBA MEJÍA, J. E., STŘEDA, T. 2020. Polyphenols content and seed vigor interaction in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *MendelNet 2020: Proceedings of International PhD Students Conference*. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, pp. 38–43.
- JOVANOVIĆ, I., BUCKOVÁ, P., KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T. 2019. Vitalita semen pšenice v podmínkách sucha a chladu. *Úroda*, 67(12): 133–138.
- KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T., PROCHÁZKOVÁ, P. 2017. Vitalita semen a velikost kořenového systému pšenice pro větší toleranci k suchu. In: *Osivo a sadba. XIII. Národní odborný a vědecký seminář*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, pp. 73–77.
- KLIMEŠOVÁ, J., ŠMARDOVÁ, M., LAZAROVÁ, E. 2017. Does the root system size and seed vigour affect the drought tolerance of wheat? In: *MendelNet 2017: Proceedings of International PhD Students Conference*. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, pp. 81–85.
- KLIMEŠOVÁ, J., VINTRLÍKOVÁ, E., STŘEDA, T. 2015. Vitalita semen a velikost kořenového systému jako nástroj pro únik a toleranci suchu. In: *Osivo a sadba. XII. odborný a vědecký seminář*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, pp. 71–76.
- LAZAROVÁ, E., KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T. 2016. Seed vigour and root system size as a attribute for drought escape and tolerance. In: *MendelNet 2016: Proceedings of International PhD Students Conference*. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, 2016, 102–105.
- LAZAROVÁ, E., ŠMARDOVÁ, M., KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T. 2019. Vitalita semen – potenciál pro rychlé a uniformní vzejití a vývoj rostlin. In: *Osivo a sadba*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 2019, 50–54.
- STŘEDA, T., VINTRLÍKOVÁ, E. 2016. Adaptační opatření pro zmírnění dopadů sucha – vitalita semen a kořenového systému. In: *Rostliny v podmínkách stresu – Abiotické stresory*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 2016, 148–163.
- ULLMANNOVÁ, K., STŘEDA, T., CHLOUPEK, O. 2013. Use of barley seed vigour to discriminate drought and cold tolerance in crop years with high seed vigour and low trait variation. *Plant Breeding*, 2013, 132, 3, 295–298.
- VINTRLÍKOVÁ, E., KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T. 2015. Adaptation strategies to climate change – the seed vigour. In: *Towards Climatic Services: Conference Proceedings*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Nitra, Slovenská republika, 2015, 1–3.
- VINTRLÍKOVÁ, E., KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T. 2015. Possibility of selection for higher seed vigour of barley. In: *MendelNet 2015: Proceedings of International PhD Students Conference*. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, 2015, 99–102.
- VINTRLÍKOVÁ, E., STŘEDA, T. 2014. Possibility of selection for higher seed vigour of barley. In: *MendelNet 2014: Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, 2014, 115–118.

POZNÁMKY

Název: Testování vitality semen polních plodin

Autoři: doc. Ing. Tomáš Středa, Ph.D., Ing. Ivana Jovanović,
Ing. Natálie Březinová Belcredi, Ph.D., Bc. Tomáš Nováček,
doc. Ing. Hana Středová, Ph.D., Ing. Jhonny Edison Alba Mejía, Ph.D.,
doc. Ing. Radim Cerkal, Ph.D.

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2022

Počet stran: 54 s.

ISBN 978-80-7509-859-7 (online ; pdf)

DOI: <https://doi.org/10.11118/978-80-7509-859-7>

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.

Za věcnou a jazykovou správnost díla odpovídají autoři.

Metodika je poskytována bezplatně.