NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE
A POTRAVINÁRSKE CENTRUM
VÝSKUMNÝ ÚSTAV RASTLINNEJ
VÝROBY

VYUŽITIE SUPERABSORPČNÝCH POLYMÉROV (SAP) V SYSTÉMOCH PESTOVANIA RASTLÍN

Metodická príručka
pre testovanie osiva ošetreného SAP
v laboratórnych a poľných podmienkach

Mgr. Marcela Gubišová, PhD., Ing. Katarína Hrčková,
Mgr. Katarína Ondreičková, PhD., Ing. Jozef Gubiš, PhD.

2022

VYUŽITIE SUPERABSORPČNÝCH POLYMÉROV (SAP) V SYSTÉMOCH PESTOVANIA RASTLÍN

Metodická príručka
pre testovanie osiva ošetreného SAP
v laboratórnych a poľných podmienkach

Autori:
Mgr. Marcela Gubišová, PhD.
Ing. Katarína Hrčková
Mgr. Katarína Ondreičková, PhD.
Ing. Jozef Gubiš, PhD.

Autori fotografií: Ing. Katarína Hrčková, Mgr. Katarína Ondreičková, PhD., Ing. Jozef Gubiš, PhD.

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou

Vydal: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby

Rok vydania: 2022

Počet strán: 29

Obsah

ÚVOD **3**

Inovatívne prístupy využívania SAP 3

1. TESTOVANIE OSIVA OŠETRENÉHO SUPERABSORPČNÝMI POLYMÉRMI V KONTROLOVANÝCH PODMIENKACH **5**

1.1. Laboratórne testy klíčivosti semien na filtračnom papieri 5

1.1.1. Test klíčivosti v štandardných vlhkostných podmienkach 5

1.1.2. Test klíčivosti v stresových podmienkach – navodenie stresu zo sucha 5

1.2. Laboratórne testy vzchádzavosti rastlín v substráte 7

1.2.1. Test vzchádzavosti v štandardných vlhkostných podmienkach 7

1.2.2. Test vzchádzavosti v stresových podmienkach – navodenie stresu zo sucha 7

1.3. Ďalšie parametre hodnotenia klíčivosti/vzchádzavosti semien 8

2. TESTOVANIE OSIVA OŠETRENÉHO SUPERABSORPČNÝMI POLYMÉRMI V POĽNÝCH PODMIENKACH **9**

2.1. Maloparcelové pokusy 9

2.1.2. Zakladanie a vedenie maloparcelových pokusov 9

2.1.2. Hodnotenie maloparcelových pokusov 12

2.1.3. Obrazová analýza klíčiacich rastlín 15

2.2. Poloprevádzkové a prevádzkové poľné pokusy 17

3. TESTOVANIE VPLYVU APLIKÁCIE SAP NA PÔDNY MIKROBIÓM **18**

3.1. Odber rizosférnych vzoriek 19

3.2. Izolácia metagenomickej DNA 21

3.3. Polymerázová reťazová reakcia (PCR) 21

3.4. Agarózová elektroforéza 23

3.5. Purifikácia PCR produktov 23

3.6. Kapilárna elektroforéza 23

3.7. Štatistické vyhodnotenie výsledkov 24

4. ZÁVER **27**

5. UPLATNENIE METODIKY **28**

6. POUŽITÁ LITERATÚRA **28**

7. PUBLIKÁCIE, KTORÉ PREDCHÁDZALI METODICKEJ PRÍRUČKE **29**

ÚVOD

Poľnohospodárska výroba je každoročne vystavovaná nepriaznivým klimatickým podmienkam, najmä suchu, ktoré má negatívny efekt na úrodu poľnohospodárskych plodín. Suchom rôznej intenzity je v určitých obdobiach roka zasiahnutých až 90 % územia Slovenska. Extrémne suchá sú pozorované najmä v letnom období, kedy spôsobujú vädnutie a spomalený vývin rastlín, predčasné dozrievanie porastov, opadávanie plodov, tvorbu prísušku a prasklín v pôde. V ostatných rokoch však poľnohospodárom spôsobuje sucho problémy už na jar. Podľa údajov SHMÚ bolo v r. 2020 pozorované extrémne sucho už v apríli, kedy nasýtenie povrchovej vrstvy pôdy kleslo pod 50 % a spôsobilo problémy pri vzchádzaní jarných plodín, ale i raste ozimín. Podobne tomu bolo v r. 2021, kedy bolo v jarnom období pozorované sucho najmä na prelome marca a apríla. V r. 2022 nastúpilo už na začiatku marca veľmi významné sucho, pričom výrazné až extrémne pôdne sucho zasiahlo 18,7 % územia Slovenska.

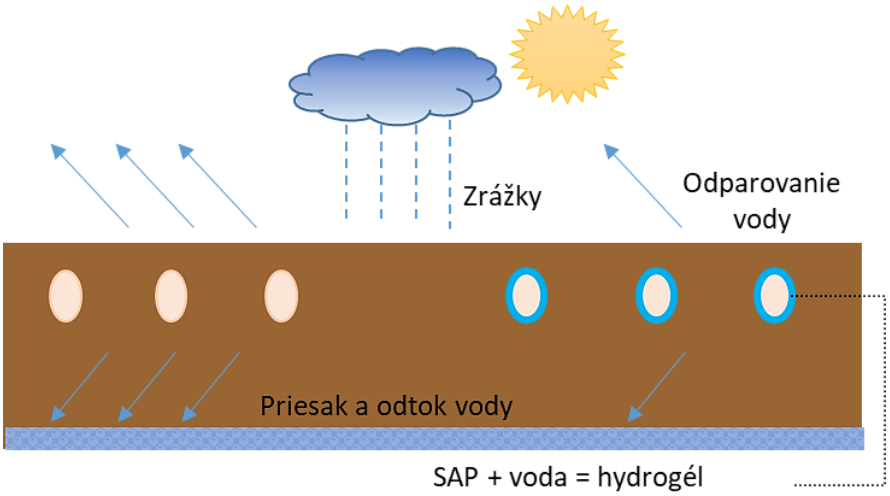
Súčasná zmena klímy s opakujúcimi sa obdobiami sucha predstavuje pre poľnohospodárske plodiny abiotický stres, ktorý znižuje vzchádzavosť, rast a výkonnosť rastlín. Preto je nutné hľadať progresívne agrotechnické postupy pre zlepšenie dostupnosti vody pre rastliny. Jedným z inovatívnych prístupov, môže byť využívanie superabsorpčných polymérov (SAP). SAP sú definované ako hydrogély tvoriace trojrozmernú polymérnu sieť, ktorá na základe chemických väzieb absorbuje vodu a v nej rozpustené látky v objeme 300 až 500-násobku svojej hmotnosti a tak zadržiava vodu v pôde.

Aplikácia SAP ako hydrogélu do pôdy sa začala v 80. rokoch 20. storočia a odvtedy sa testovalo niekoľko typov polymérov (polyakrylamid, polyakrylát, škrob, celulóza, alginát alebo iné polysacharidy) na zlepšenie schopnosti zadržiavania vody a ich biologickej odbúrateľnosti. Najčastejšie sa však v praxi zvyknú používať syntetické polyméry vo forme granúl alebo rôzne hrubo mletých práškov aplikovaných väčšinou priamo do pôdy, kde zlepšujú zadržiavanie vody, ktorá by inak z krajiny odtiekla, a tak umožňujú využitie väčšieho množstva vody rastlinami. Spolu s vodou sú polymérom absorbované aj živiny, ktoré sú neskôr postupne uvoľňované. Efektivita aplikácie SAP do pôdy je samozrejme závislá na jeho type a množstve, ale najmä na fyzikálno-chemických vlastnostiach pôdy. Najlepšie výsledky sa dosahujú na ľahkých piesočnatých pôdach.

Inovatívne prístupy využívania SAP

Na Slovensku bola firmou PeWaS, s.r.o. vyvinutá inovatívna technológia aplikácie SAP priamo na osivo (Aquaholder®Seed). SAP sa aplikuje pomocou kvapalnej suspenzie, ktorá na povrchu semien dokáže vytvoriť veľmi tenký a homogénny film. Z hľadiska vplyvu na osivo je množstvo takto aplikovaného SAP optimálne a zároveň aj ekonomicky únosné. Po styku s pôdnou vlhkosťou vytvorí na povrchu semien hydrogél, ktorý slúži ako mikrorezervoár vody pre klíčiace rastliny (obr. 1), z ktorého je voda spätne uvoľňovaná semenu podľa jeho potrieb na základe rozdielov osmotických tlakov. Absorpčná schopnosť polyméru maximalizuje využitie prírodných zrážok, resp. umožňuje znižovať dávkovanie vlahy formou umelých závlah.

Aj pri technológii obaľovania semien sa overovalo využitie prírodných polymérov, zatiaľ sa však využívajú syntetické polyméry kvôli ich vyhovujúcim chemickým vlastnostiam. K superabsorpčným polymérom je pri ich aplikácii, či už na osivo alebo do pôdy, možné pridať ďalšie substancie (biopesticídy, hnojivá, mykorízne huby alebo baktérie) podporujúce zdravie a rast rastlín.



Obr. 1: Semená ošetrené Aquaholderom vytvárajú po kontakte s pôdnou vlhkosťou hydrogélovú vrstvu

Na pracovisku NPPC – Výskumný ústav rastlinnej výroby v spolupráci s firmou PeWaS, s.r.o. overujeme možnosti využitia technológie obaľovania semien SAP ako inovatívneho riešenia dopadov sucha na klíčenie semien a rast juvenilných rastlín poľnohospodársky významných plodín. Osivo je ošetrené superabsorpčným polymérom Aquaholder®Seed, ktorý je možné aplikovať na osivo neošetrené alebo ako ďalšia vrstva na akékoľvek moridlo (obr. 2).

Obr. 2: Rôzne varianty ošetrenia semien kukurice siatej a pšenice letnej f. ozimná bez moridla/s moridlom a SAP (dolný rad)

Účelom obaľovania osív je podpora vývoja poľnohospodárskych plodín v prvých, pre vegetáciu kritických, fázach rastu najmä v suchých a polosuchých klimatických podmienkach a v pôdach neschopných zadržiavať vlahu, kde môže SAP slúžiť ako poistka v prípade neočakávaného sucha po výseve. V prípade deficitu vlahy pri klíčení, môže Aquaholder aplikovaný na osivo zlepšiť klíčenie semien a podporiť rast klíčnych rastlín.

V laboratórnych experimentoch NPPC je overovaný vplyv ošetrovania osiva SAP na klíčivosť semien a rast klíčnych rastlín v podmienkach stresu zo sucha, ako aj na účinnosť moridiel v ochrane klíčnych rastlín pred hubovými patogénmi. V poloprevádzkových a maloparcelových poľných pokusoch je sledovaný vplyv ošetrenia osiva na úrodotvorné parametre významných poľnohospodárskych plodín a využitím sofistikovaných metód molekulárnej biológie jeho vplyv na mikrobiálnu diverzitu v rizosfére, t.j. v tenkej vrstve pôdy obklopujúcej korene s najväčšou mikrobiálnou aktivitou.

1. TESTOVANIE OSIVA OŠETRENÉHO SUPERABSORPČNÝMI POLYMÉRMI V KONTROLOVANÝCH PODMIENKACH

Prvým krokom pre hodnotenia ošetrenia osiva SAP sú testy klíčivosti semien a vzchádzavosti rastlín v laboratórnych podmienkach v štandardných vlhkostných podmienkach a pri nedostatku vody, resp. navodení stresu zo sucha. Vypracované pracovné postupy zahŕňajú laboratórne testy klíčivosti semien na filtračnom papieri a laboratórne testy vzchádzavosti rastlín v substráte. Jednotlivé popisované postupy sú aplikovateľné pre osivo kapusty repkovej pravej a obilnín – pšenice letnej f. ozimná a jačmeňa jarného.

1.1. Laboratórne testy klíčivosti semien na filtračnom papieri

Pracovné postupy vychádzajú z Metodiky skúšania osiva a sadiva (ÚKSUP, 1999). V tomto prípade sa semená ukladajú medzi dve vrstvy dostatočne vlhkého filtračného papiera a kultivujú v uzavretých plastikových vreckách v tme pri teplote 20 °C v počte min. 100 ks semien na variant. Klíčivosť semien sa hodnotí na 4. a 7. deň. Aby možné sledovať klíčenie na dennej báze a hodnotiť aj ďalšie sledované znaky bola metodika modifikovaná nasledovnými spôsobmi:

1.1.1. Test klíčivosti v štandardných vlhkostných podmienkach

Semená sa nakličujú v Petriho miskách na vrstve sterilného filtračného papiera navlhčeného vodou. Pre nakličovanie odporúčame Petriho misky s priemerom 90 mm a výškou min. 15 mm. Filtračný papier je navlhčený sterilnou destilovanou vodou v objeme 4 ml pre obilniny a 3 ml pre kapustu repkovú pravú. Odporúčaný počet nakličovaných semien na misku je 25 ks pre obilniny a 30 ks pre kapustu repkovú pravú. Petriho misky sú po naložení semien uzatvorené parafilmom, aby sa zabránilo nadmernému odparovaniu vody. Semená sa kultivujú v tme pri teplote 20 °C. Klíčivosť semien sa hodnotí na 4. a 7. deň, resp. denne pre hodnotenie rýchlosti klíčenia.

Pri kontrole a ošetrených variantoch hodnotíme:

- počet vyklíčených rastlín
- počet abnormálnych rastlín
- počet nevyklíčených semien

1.1.2. Test klíčivosti v stresových podmienkach – navodenie stresu zo sucha

Stres zo sucha môžeme v laboratórnych podmienkach navodiť rôznym spôsobom:

a) znížením aplikovaného množstva vody

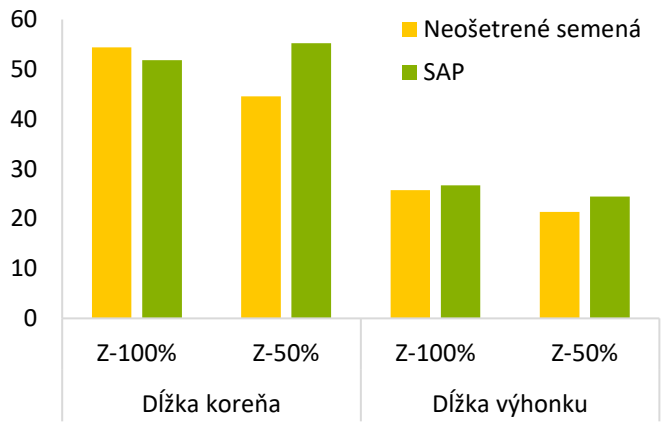
Do Petriho misky sa pridá podľa druhu semien 4 resp. 3 ml vody ako kontrolný variant a pre stresové varianty znížime obsah vody na 50 a 25 %.

b) pridaním osmotických činidiel, ktoré znižujú príjem vody rastlinnými pletivami. Ako osmotické činidlá je možné využiť PEG (polyetylénglykol 6000) a manitol. Na základe našich experimentov odporúčame použitie 15 %-ného roztoku PEG, alebo alternatívne 200 mMol roztoku manitolu.

Semená kultivujeme ako je uvedené v bode 1.1.1. Klíčivosť hodnotíme na 4. a 7. deň, resp. denne pre hodnotenie rýchlosti klíčenia. Rýchlosť klíčenia a rastu klíčencov je možné hodnotiť aj na základe merania dĺžky koreňov a výhonkov klíčiacich rastlín, kedy je možné najlepšie vyhodnotiť vplyv ošetrenia semien na rýchlosť klíčenia a prvej fázy rastu sledovaných rastlín (obr. 3 a 4).

Hodnotené parametre:

- počet vyklíčených rastlín
- počet abnormálnych rastlín
- počet nevyklíčených semien
- priemerná dĺžka koreňov
- priemerná dĺžka výhonkov



Obr. 3: Ukážka spracovania výsledkov hodnotenia: Rozdiel v dĺžke koreňa a výhonku [mm] kapusty repkovej pravej pri nakličovaní semien na filtračnom papieri (7. deň) neošetrených a ošetrených Aquaholderom pri plnej (Z- 100%) a polovičnej dávke vody (Z- 50%).

Obr. 4: Fotodokumentácia pokusu: Klíčenie semien kapusty repkovej pravej pri polovičnej dávke vody, vľavo – semená neošetrené, vpravo – semená ošetrené Aquaholderom.

1.2. Laboratórne testy vzchádzavosti rastlín v substráte

Tieto postupy hodnotia vzchádzavosť semien a rast klíčnych rastlín v nádobových experimentoch v kontrolovaných podmienkach. Nádoby odporúčanej veľkosti podľa rastlinného druhu sú naplnené záhradníckym substrátom (napr. Klasmann TS 3 standard s ílom predhnojený 1,5 kg.m-3 NPK v pomere 14:16:18), alebo optimálne zmesou záhradníckeho substrátu, ornice a piesku v pomere 2:1:1.

1.2.1. Test vzchádzavosti v štandardných vlhkostných podmienkach

Pre semená kapusty repkovej pravej odporúčame plastové poháre, resp. iné nádoby s objemom 300 ml (obr. 5). Do jednej nádoby vysievame po 25 – 30 semien do hĺbky 12 mm. Pri obilninách odporúčame použitie 500 ml plastových pohárov, pričom do jednej nádoby vysievame po 25 – 40 semien do hĺbky 15 mm. Odporúčaná vlhkosť substrátu pri výseve je 23 – 25 %. Nádoby po vysiatí semien zakryjeme bielou netkanou textíliou, aby sa zabránilo nadmernému odparovaniu vody a tým boli udržané stabilné vlhkostné pomery. Semená kultivujeme pri 16 h osvetlení a teplote 20°C (noc)/24°C (deň). Počet vzídených rastlín hodnotíme na 4 a 7 deň, resp. denne pre hodnotenie rýchlosti klíčenia.

Hodnotené parametre:

- počet vyklíčených rastlín
- počet abnormálnych rastlín
- počet nevyklíčených semien

1.2.2. Test vzchádzavosti v stresových podmienkach – navodenie stresu zo sucha

Postupujeme podobne ako v bode 1.2.1., avšak do jednej nádoby vysievame po 25 semien. Za kontrolný variant je považovaný substrát s vlhkosťou 23 %. Pre navodenie stresu zo sucha používame variant s iniciačnou vlhkosťou substrátu 13 %. Počet vzídených rastlín hodnotíme na 4 a 7 deň, resp. denne pre hodnotenie rýchlosti klíčenia.

Hodnotené parametre:

- počet vyklíčených rastlín
- počet abnormálnych rastlín
- počet nevyklíčených semien
- priemerná výška rastlín

Po ukončení experimentu možno ďalej hodnotiť:

- priemerná dĺžka koreňového systému
- hmotnosť čerstvej nadzemnej biomasy
- obsah sušiny v pletivách
- obsah vody v pletivách

1.3. Ďalšie parametre hodnotenia klíčivosti/vzchádzavosti semien

Pri hodnotení klíčenia/vzchádzania na dennej báze môžeme z výsledkov experimentov prepočítať ďalšie parametre:

- MGT – priemerný čas klíčenia/vzchádzania (deň) - ukazovateľ rýchlosti vzchádzania za sledovaný časový interval.

$$MGT = \Sigma(Gt*Dt)/ \Sigma Dt$$

- Rýchlosť klíčenia/vzchádzania (%) – pomer počtu vzídených rastlín v jednotlivých dňoch k celkovému počtu vzídených rastlín na konci monitorovaného obdobia.

$$SG = G_t/G_f*100$$

- Relatívna rýchlosť klíčenia/vzchádzania (%)

$$RSG = SG_{tr}/SG_c*100$$

- GI – Index klíčivosti/vzchádzavosti – ukazovateľ, ktorý kombinuje časovú charakteristiku a zároveň aj početnosť. Všeobecne platí, že čím vyššiu má hodnotu, tým viac rastlín vzchádza a vzchádzajú rýchlejšie.

$$GI = \Sigma(Gt/Dt)$$

Gt – počet vyklíčených semien (vzídených rastlín) v dni *t*
Gf – celkový počet vyklíčených semien
SGtr – rýchlosť klíčenia ošetrených semien
SGc – rýchlosť klíčenia kontrolnej vzorky
Dt – počet dní (pre deň hodnotenia *t*)

Obr. 5: Testovanie vzchádzavosti rôznych variantov ošetrenia SAP pri osive kapusty repkovej pravej

2. TESTOVANIE OSIVA OŠETRENÉHO SUPERABSORPČNÝMI POLYMÉRMI V POĽNÝCH PODMIENKACH

Ďalším spôsobom testovania a hodnotenia vplyvu SAP na osivo sú poľné pokusy v prirodzených podmienkach vybranej pokusnej lokality. Podľa veľkosti a spôsobu vedenia sa delia na tzv. maloparcelové a polopreváďzkové.

2.1. Maloparcelové pokusy

Zakladajú sa na výskumných ústavoch, univerzitách a iných špecializovaných pracoviskách. Vyžadujú špeciálnu mechanizáciu, odlišnú od bežnej poľnohospodárskej techniky. Zároveň vyžadujú personál so skúsenosťami a zručnosťami pri zakladaní, vedení, ošetrovaní a hodnotení pokusov.

2.1.2. Zakladanie a vedenie maloparcelových pokusov

Základnou jednotkou v poľnom pokuse je variant. Ku kontrolnému variantu sa porovnávajú testované varianty. V rámci maloparcelových pokusov sa väčšinou zaraďuje vyšší počet pokusných variantov, ktoré môžu byť zamerané na rôznu problematiku v oblasti SAP – rôzne koncentrácie SAP, účinok prídavných látok k SAPu, obmeny v technológii aplikácie SAP na osivo a iné. Bez ohľadu na zameranie variantov odporúčame zaradiť vždy minimálne štyri opakovania z každého variantu. Tento počet opakovaní je už dostatočný na pokrytie variability pôdno-ekologických podmienok pokusnej lokality. Väčšinou postačuje aj pri výskyte nepredvídateľných negatívnych okolností počas vegetačného obdobia. Z nich sa najčastejšie vyskytuje poškodenie parciel ozimín hlodavcami počas zimy.

Ak je pozemok vyrovnaný, potom usporiadanie pokusu do veľkej miery závisí od dostupnej mechanizácie. V NPPC sa osvedčilo používanie blokovej metódy, ktorá je následne kompatibilná so štatistickými metódami (ANOVA) pre vyhodnotenie získaných údajov. Obdĺžnikové parcely sú v tomto prípade usporiadané vedľa seba v bloku, ktorý predstavuje jedno opakovanie. Bloky opakovaní sú usporiadané nad sebou a spolu tvoria dizajn pokusu. Vzdialenosti medzi nimi treba voliť tak, aby sejba, ošetrovanie a zber prebehli s minimom prejazdov strojov a bol dostatok miesta na otáčanie a prácu mechanizácie (obr. 6).

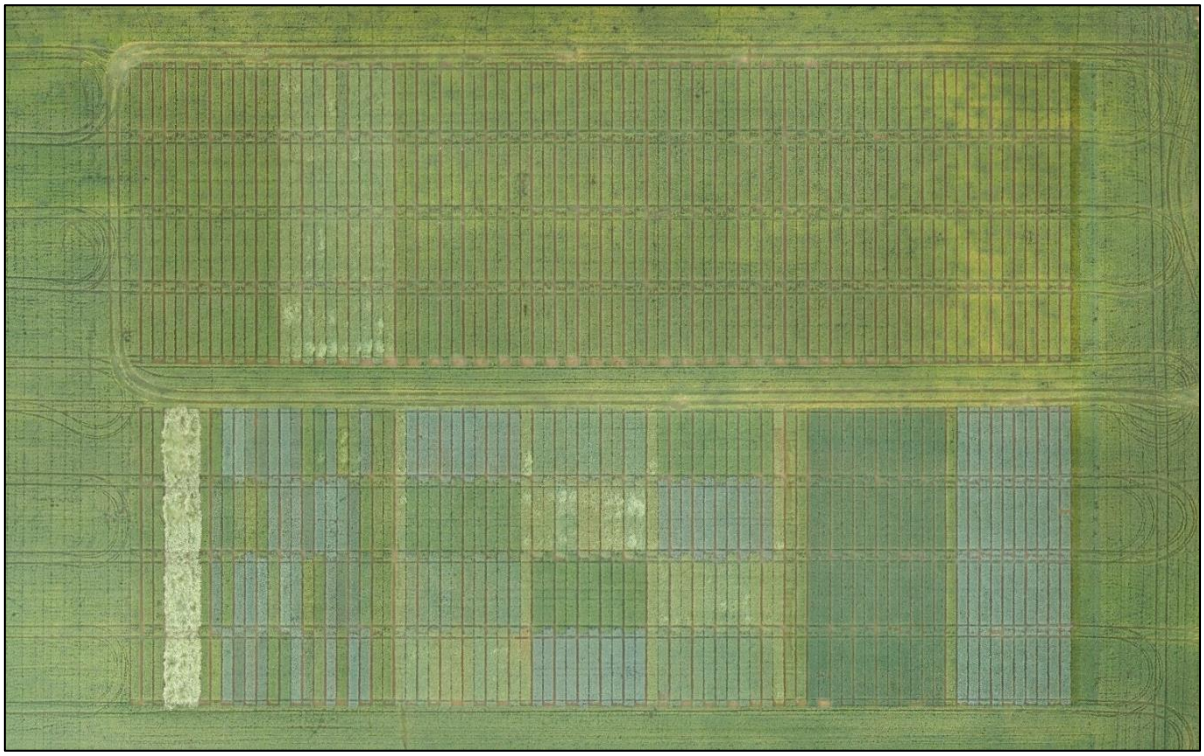
Bez ohľadu na zameranie ošetrenia SAP je veľmi dôležité eliminovať okrajový efekt, ktorý by mohol skresliť výsledky pokusu. Parcely sa preto v rámci bloku ukladajú vedľa seba čo najbližšie. Toto zabezpečuje uniformitu svetelných, vlhkostných, teplotných a iných podmienok v rámci celého plodinového bloku, resp. pokusu, ktorý potom navonok vystupuje ako súvislý porast. Obilniny (pšenica letná forma ozimná a jačmeň jarný) sa oddeľujú sa vynechaním jedného riadka, čo prestavuje cestičku širokú 25 cm. Širokoriadkové plodiny (kukurica siata, cukrová repa a slnečnica ročná) netreba nijako špeciálne oddeľovať, túto funkciu plní práve široký spon pestovania.

Na začiatok a koniec radu testovacích parciel je potrebné zaradiť tzv. izolačné alebo nulové parcely rovnakej plodiny (napríklad kontrolu bez ošetrenia). Pravdepodobne budú vykazovať prepad alebo naopak skokový prírastok úrody a zmenu v morfológii či početnosti rastlín, nakoľko budú vystavené iným podmienkam ako parcely vo vnútri bloku. Celý maloparcelový pokus je potrebné dokola obsiať ochranným pásom (obsevom) tej istej plodiny v rovnakom termíne sejby. Korene väčšiny poľných plodín rastú do šírky 0,5 – 1,0 m od stebla, preto by šírka ochranného pásu tento poznatok mala rešpektovať. Avšak v praxi sa nám osvedčilo vysievať oveľa širší ochranný pás najmä z hľadiska väčších

živočíšnych škodcov (zajace, diviačia a srnčia zver), ktoré dokáže zachytiť a eliminovať tak poškodenie parciel.

Odporúčané rozmery základnej parcely v režime maloparcelových pokusov:

- Kapusta repková pravá: 1,25 m x 8 m (zberová plocha: 10 m^2)
- Pšenica ozimná f. letná: 1,25 m x 8 m (zberová plocha: 10 m^2)
- Jačmeň jarný: 1,25 m x 8 m (zberová plocha: 10 m^2)
- Kukurica siata: 3 m x 7 m (zberová plocha: 21 m^2)
- Cukrová repa: 3 m x 10 m (zberová plocha: 30 m^2)



Obr. 6: Letecký pohľad na dva maloparcelové pokusy s ozimnou pšenicou v mierke 1:520, Borovce, 2020

Súčasťou poľného pokusu je prevádzkový denník, ktorý obsahuje základné údaje o dizajne a prevádzke pokusu, údaje o pokusných variantoch a ošetrovaní rastlín:

- cieľová plodina
- GPS súradnice pokusnej lokality
- usporiadanie pokusu – počet variantov a ich popis, počet opakovaní, celkový počet parciel
- veľkosť pokusu – rozmery parcely, počet riadkov na parcele
- pôdny druh a pôdny typ
- spracovanie pôdy – druh operácie, dátum, hĺbka spracovania pôdy
- predplodina
- sejba a zber – dátum
- výsevok a názov odrody alebo hybridu
- výživa a hnojenie – dátum, názov a dávka aplikovaného hnojiva, prepočet na čisté živiny
- ochrana rastlín – dátum, názov a dávka aplikovaného prostriedku, škodlivý činiteľ

Zakladanie a vedenie maloparcelových pokusov so SAP prebieha v rámci NPPC na Výskumnom pracovisku VÚRV v Borovciach v súlade s pravidlami GEP a miestnymi podmienkami. Všetky agrotechnické operácie, ktoré sa na pokuse vykonajú, sú vždy rovnaké na celej pokusnej ploche vrátane obsevu, aby sa zabezpečila homogenita podmienok. Analogicky sa postupuje aj pri aplikácii hnojív a prípravkov na ochranu rastlín. Predsejbové hnojenie sa volí na základe predchádzajúceho agrochemického rozboru pôdy. Výsevok, hĺbka aj termín sejby je rovnaký pre všetky varianty. Taktiež odroda musí byť vždy rovnaká pre kontrolný variant a všetky testovacie varianty.

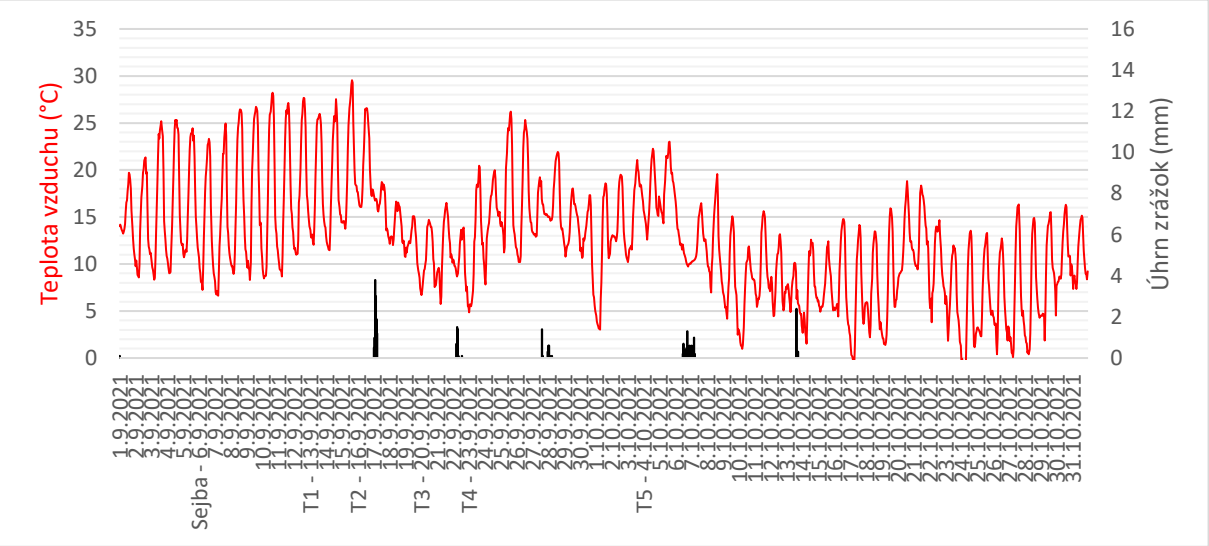
Dôležitou súčasťou pokusného denníka sú meteorologické údaje. Meteorologická stanica by mala byť lokalizovaná čo najbližšie k pokusu. NPPC v rámci svojej pokusnej lokality využíva údaje z vlastnej stanice v dennom, prípadne aj hodinovom kroku. Detailnejší prehľad parametrov odporúčame pre obdobie pred sejbou a mesiac až dva mesiace po sejbe (obr. 7). Toto obdobie je z hľadiska testovania kľúčové pre všetky plodiny. V neskorších fázach vegetačného obdobia postačuje aj denný prehľad priemerných hodnôt (obr. 8).

Základné meteorologické parametre:

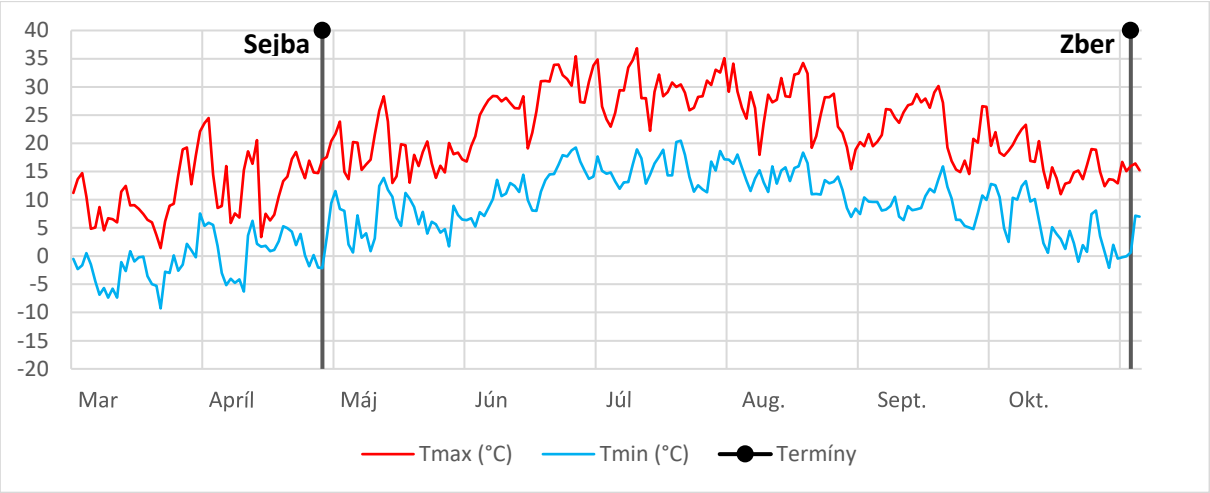
- minimálna a maximálna teplota vzduchu
- priemerná teplota vzduchu
- úhrn zrážok

Doplnkové meteorologické parametre:

- vlhkosť vzduchu
- rýchlosť vetra
- intenzita slnečného žiarenia alebo PAR
- teplota pôdy
- vlhkosť pôdy



Obr. 7: Ukážka grafu priemernej teploty vzduchu a úhrnu zrážok v hodinovom kroku pre monitoring vzchádzania kapusty repkovej pravej, Borovce, 2021



Obr. 8: Ukážka grafu minimálnej a maximálnej teploty vzduchu v dennom kroku, kukurica siata, Borovce, 2021

2.1.2. Hodnotenie maloparcelových pokusov

Do prevádzkového denníka je potrebné zaznamenávať fenologické pozorovania, ktoré popisujú rast a vývoj rastlín. Obzvlášť dôležité je obdobie po sejbe a monitoring vzchádzania.

Základné fenologické pozorovania:

- začiatok vzchádzania
- 50% vzídených rastlín
- koniec vzchádzania
- začiatok kvitnutia
- koniec kvitnutia
- dĺžka vegetačného obdobia

Druhovo špecifické fenologické pozorovania:

- začiatok odnožovania – pri obilninách
- steblovanie – pri obilninách
- klasenie – pri obilninách
- butonizácia – pri slnečnici ročnej

Záver úvodnej časti prevádzkového denníka tvorí záznam všetkých termínov návštev a kontrol pokusu a zároveň prehľad znakov, ktoré sa hodnotia počas vegetačného obdobia. Na základe našich skúseností je prínos ošetrenia SAP najvýraznejší a ľahko detekovateľný na rôznych úrovniach rastlinného organizmu v období klíčenia a vzchádzania a podľa podmienok pretrváva približne do dvoch mesiacov po sejbe. Pokiaľ sú porasty v nasledujúcich rastových fázach ošetrované rovnako ako kontrola, prínos a výhody SAP veľmi často zanikajú. Finálne prírastky na úrode potom môžu aj nemusia byť prítomné. Preto aj hodnotenie plodín v pokusoch sa zameriava najmä na ranné fázy.

Základné sledované znaky aplikovateľné na všetky plodiny:

- inventarizácia porastov po vzídení – počet rastlín na jednotku plochy, poľná vzchádzavosť
- hmotnosť sušiny nadzemnej biomasy, koreňov, výška rastlín a hodnotenie vývoja 10 dní po kompletnom vzídení
- hmotnosť sušiny nadzemnej biomasy, koreňov, výška rastlín a hodnotenie vývoja 20 dní po kompletnom vzídení
- výška rastlín v čase zberu
- hmotnosť tisíc semien
- úroda hlavného produktu

Ďalšie hodnotené znaky pre kukuricu siatu:

- výška rastlín na 60. deň po sejbe
- počet rastlín pred zberom na jednotku plochy
- počet šúľkov pred zberom na jednotku plochy
- počet sterilných rastlín pred zberom na jednotku plochy
- počet radov zŕn (ks)
- počet zŕn v rade (ks)

Ďalšie hodnotené znaky pre obilniny:

- počet odnoží na rastline
- počet klasov na jednotku plochy

Ďalšie hodnotené znaky pre cukrovú repu a kapustu repkovú pravú:

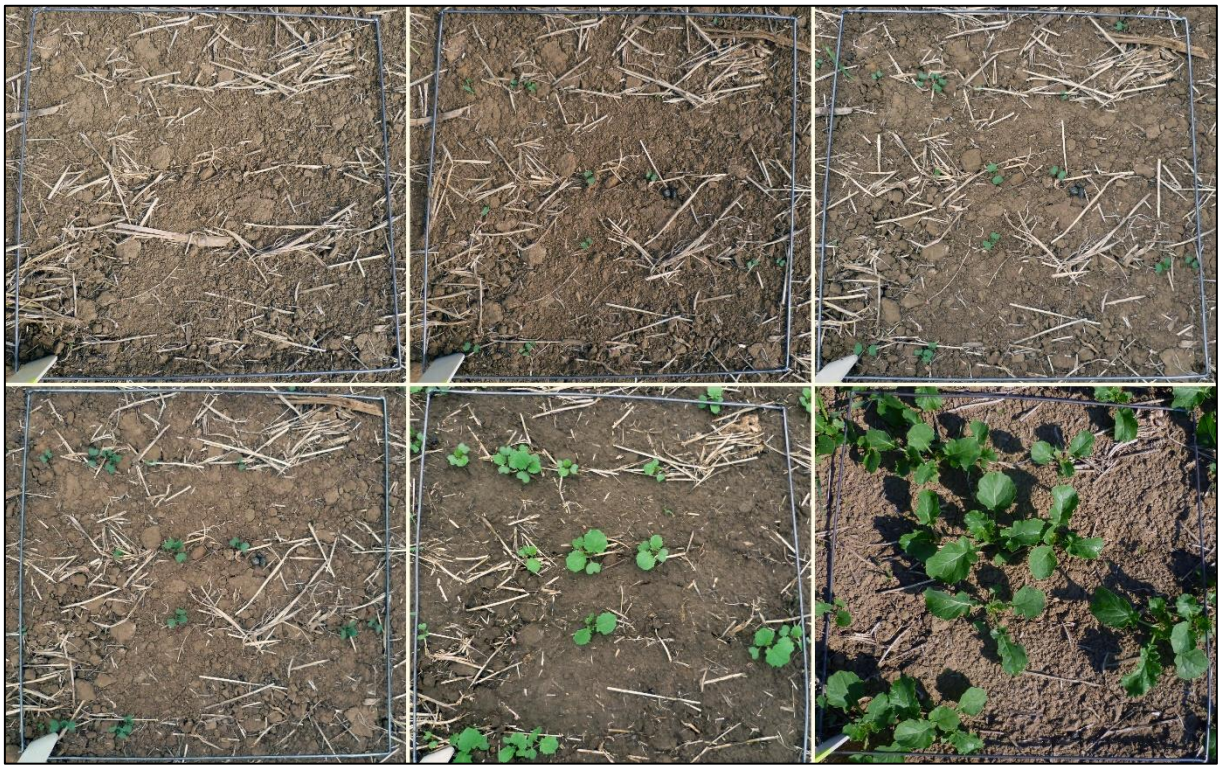
- počet listov na rastline 60 dní po sejbe

Doplnkové znaky pre oziminy:

- počet prezimovaných rastlín na jednotku plochy
- redukcia rastlín vyzimovaním

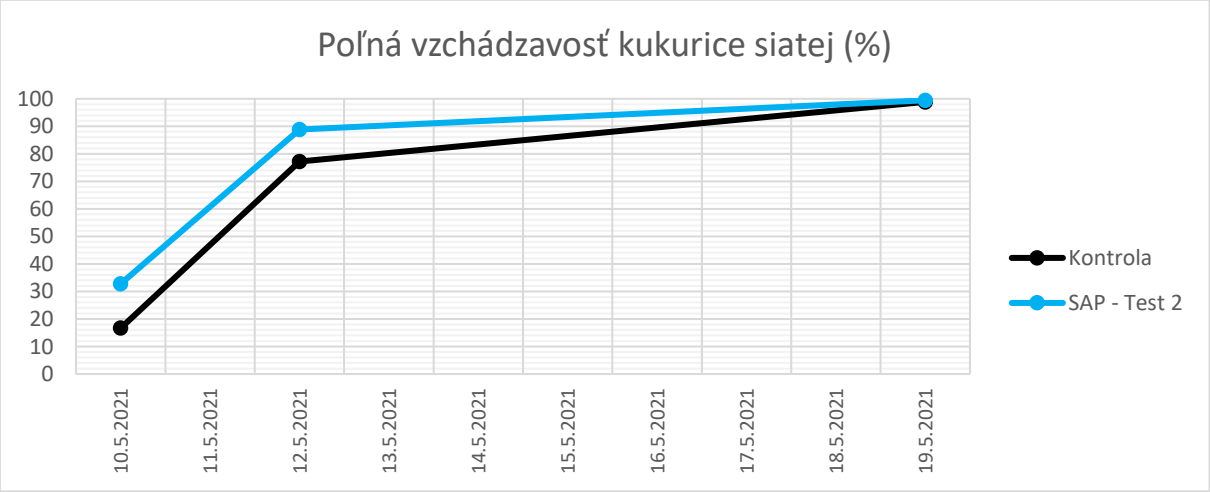
Inventarizácia porastov a monitoring vzchádzania v úvode vegetácie je najdôležitejšie a zároveň najprácnejšie obdobie. Vyžaduje si častejšie návštevy porastov, aby bolo možné identifikovať a kvantifikovať čo najviac zmien na rastlinách, ktoré aplikácia SAP na osivo spôsobuje. Porasty je potrebné kontrolovať v pravidelných intervaloch. Počet rastlín sa hodnotí v strednej časti parcelky vždy na rovnakom mieste, ktoré sa označí kolíkom (začiatok a koniec). Väčšie plastové koly treba po ukončení série hodnotení vybrať. V praxi sa nám však na tento účel osvedčilo používanie drevených lekárskych paličiek označených reflexnou farbou. Po ukončení monitoringu môžu ostať v pôde, pretože počas jedného roka sa v pôde rozložia. Zároveň svojím malým rozmerom nepriťahujú pozornosť zajacov, ktoré si potom zvyknú v okolí kolíkov značkovať teritórium a vyžierať vzídené rastliny, čím znehodnocujú výsledky pokusu.

Vzídené rastliny sa pri širokoriadkových plodinách počítajú na dĺžke 2 – 3 m aspoň na dvoch riadkoch. Pri priaznivých podmienkach tieto obyčajne vzchádzajú v kratšom časovom úseku v jednej kompaktnej vlne a vyžadujú 3 – 4 termíny hodnotenia. Obilniny a kapusta repková pravá sa počítajú pomocou drôteného štvorca s hranou 0,5 m a vyžadujú približne 4 – 5 termínov hodnotenia, niekedy dokonca aj viac (obr. 9).



Obr. 9: Monitoring vzchádzania kapusty repkovej pravej, Borovce, 2017

Výsledky hodnotenia sa skontrolujú a odstránia sa prípadné chyby. Na predbežné spracovanie a jednoduchú vizualizáciu postačuje program Excel (obr. 10). Na ďalšie spracovanie údajov matematicko-štatistickými metódami (T-test, One way ANOVA, HSD-Tukey test, korelačnú analýzu a iné) odporúčame štatistický program STATGRAPHICS Centurion XVI.



Obr. 10: Spracovanie výsledkov monitoringu vzchádzania kapusty kukurice siatej, Borovce, 2021

2.1.3. Obrazová analýza klíčiacich rastlín

Pri niektorých plodinách je na posúdenie veľkosti koreňovej sústavy klíčiacich rastlín možné použiť dvojrozmernú obrazovú analýzu pomocou ImageJ a jeho pluginu SmartRoot (Lobet, 2011). Tento nástroj efektívne eliminuje subjektivitu a prípadné chyby manuálneho merania spôsobené ľudským faktorom. Pomocou algoritmov a vzorcov počíta aj doplnkové parametre koreňovej sústavy, ktoré by v praxi nebolo možné získať manuálnym meraním. Táto metóda je invazívna, to znamená, že vzorka odobratých rastlín už nepokračuje ďalej v raste. Je vhodná najmä pre jačmeň a pšenicu, pretože ich korene sú pomerne pevné a ľahko sa s nimi manipuluje, s malým rizikom, že by došlo k stratám počas spracovania a prípravy vzoriek. Hraničné je použitie pre kukuricu siatu, ktorá má krehké a lámavé korene. V tomto prípade je dôležité zvážiť aktuálne vlastnosti pôdy na pokusnej lokalite. V ľahších pôdach a relatívne suchších podmienkach je použitie možné. V ťažších alebo vo veľmi vlhkých pôdach však nie je možné získať kompletnú a nepoškodenú koreňovú sústavu kukurice siatej. Cukrová repa, slnečnica ročná a kapusta repková pravá majú veľmi jemné a krehké korene a preto pre ne táto metóda na identifikáciu zmien spôsobených SAP nie je vhodná.

Hodnotené parametre na úrovni koreňového systému:

- makroskopická dĺžka
- makroskopický povrch
- makroskopický objem
- priemerná hrúbka
- počet koreňov
- architektúra koreňového systému
- hmotnosť sušiny koreňov

Hodnotené parametre na úrovni stebla:

- dĺžka stebla
- hmotnosť sušiny stebla

Vzhľadom na časovú náročnosť spracovania vzoriek sa odber rastlinného materiálu realizuje na malých rastlinách veľmi skoro po sejbe. Ideálne, keď sú klíčiace rastliny ešte pod povrchom pôdy. Čím neskôr sa odber vykoná, tým väčšia je šanca, že koreňový systém bude už príliš prerastený a nepodarí sa ho extrahovať celý. Toto časové okno zároveň pokrýva ranné obdobie, kedy sa ešte iné znaky nehodnotia a pritom vplyv SAPu je už zrejmý.

Odporúčané termíny odberu rastlinného materiálu:

- pšenica letná f. ozimná: BBCH 09 (max BBCH 10)
- jačmeň jarný: BBCH 09 (max BBCH 10)
- kukurica siata: BBCH 07

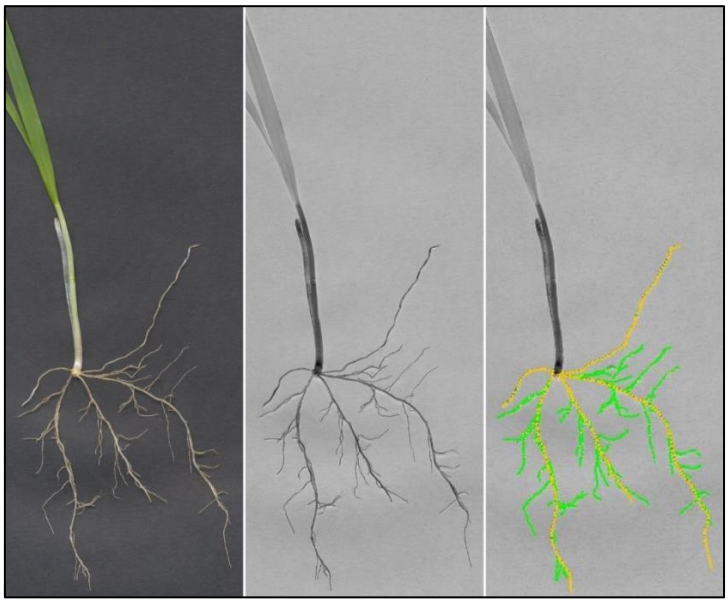
Spôsob odberu vzoriek: Pomocou lopatky je potrebné vybrať z pôdy celú rastlinu, otriasť od hliny, ak je to možné a vložiť do uzatvoriteľného plastového vrecka. Zasypať trochou vlhkej, najemno nadrolenej pôdy, aby sa čo najviac znížilo riziko vyschnutia koreňov. Vytlačiť prebytočný vzduch, uzavrieť a uložiť

mimo dosah priameho slnečného žiarenia a dopraviť do laboratória. Na tento účel je mimoriadne vhodná prenosná chladnička.

Spracovanie vzorky: Čo najskôr po odbere nad sitkom premyť vlažnou vodou a vyčistiť od zvyškov hliny a nečistôt. Jemne vysušiť papierovou utierkou tak, aby zo vzoriek nekvapkala voda. Korene však musia ostať vlhké, aby nezačali vysychať.

Skenovanie: Čo najrýchlejšie od premytia. Je možné použiť obyčajný kancelársky skener s režimom farebného obrázka. Odporúčame zvoliť aspoň 600 DPI. Výstupom spracovania vzorky je obrázok vo formáte „.jpg“ (obr. 11). Každý musí mať mierku, aby neskôr bolo možné spraviť kalibráciu pred rozborom. Ako pozadie je vhodný matný čierny papier alebo výkres, nakoľko korene sú svetlé a treba ich snímať s kontrastným pozadím pre správne fungovanie softvéru. Fotografie nie sú vhodné. Je možné skenovať celé rastliny aj so steblom. Občasné prekríženie koreňov alebo stebiel nie je problém. Veko skenera treba priklopiť, aby bol rastlinný materiál vyrovnaný a netvoril vlny, čo by vytváralo chybu. Následne sa rastliny rozdelia na steblo a koreňovú časť, vysušia v sušičke pri teplote 60°C a odvážia pre informáciu o sušine.

Obr. 11: Snímky klíčiacich rastlín jarného jačmeňa (vľavo) a kukurice siatej (vpravo)



Obr. 12: Naskenovaný obraz. Spracovanie do odtieňov šedej v ImageJ. Využitie pluginu SmartRoot

Na obrazovú analýzu takto získaných snímkov odporúčame využiť program ImageJ a jeho plugin SmartRoot. Oba softvéry sú voľne stiahnuteľné. Pre korektný postup analýzy je najprv primárny obraz invertovaný do odtieňov šedej. Pre označené korene algoritmus vypočíta základné parametre a ak je to potrebné, tak umožňuje vytvoriť aj ich vzájomnú hierarchiu, pričom farebne rozlišuje jednotlivé rády (obr. 12). Systém je semi-automatický a dovoľuje kontrolu a zmenu užívateľovi ak nesúhlasí s automatickým návrhom systému.

2.2. Poloprevádzkové a prevádzkové poľné pokusy

Tento typ poľných pokusov predstavuje poslednú fázu testovania SAP. Zakladajú sa priamo na družstvách a farmách štandardnými poľnohospodárskymi strojmi, ktoré zvolený podnik bežne používa. V tejto fáze testovania je už pokusných členov málo – obyčajne sa základnému kontrolnému variantu porovnáva len jeden alebo dva testované varianty, ktoré v predchádzajúcich etapách vykazovali najlepšie výsledky. Testované varianty sa vysievajú na šírku niekoľkých prejazdov sejačky. Úvrate, okraje a zvyšok parcely sa oseje kontrolným variantom. Hranice variantov sa označia kolmi. Je vhodné osadiť značku aj na okraji pozemku v súvislosti s nejakým významným krajinným prvkom (stromy, kry, kanál, most a pod.) pre ľahšiu orientáciu v teréne keď rastliny vyrastú.

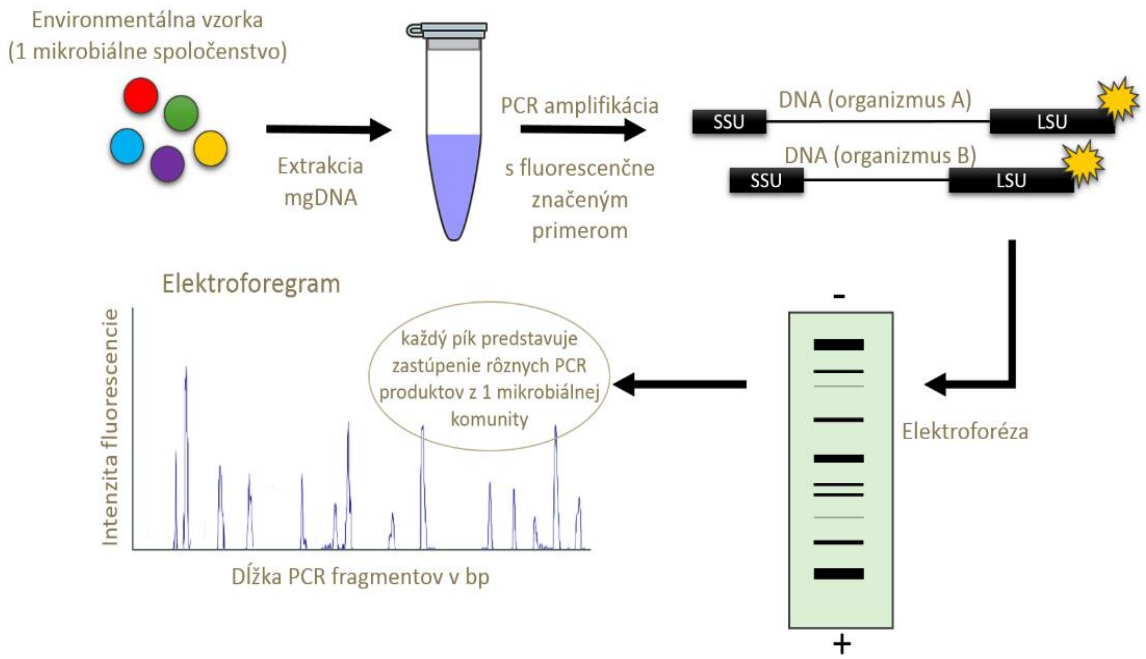
V poloprevádzkových a prevádzkových pokusoch (obr. 13) je možné sledovať a hodnotiť rovnaké znaky ako aj v maloparcelových. Na detailnejšie hodnotenie porastov agronómom väčšinou nie je veľký priestor z hľadiska času ani personálnych kapacít. V priebehu rokov sa však osvedčila spolupráca výskumu s praxou. Družstvá na svojom pozemku zabezpečujú výsev, prevádzku a zber pokusov s rôznymi plodinami a NPPC sa stará o hodnotenie rastlín a odber vzoriek počas vegetácie. Kľúčom k úspechu v tejto fáze je najmä komunikácia medzi oboma skupinami.

Obr. 13: Poloprevádzkové pokusy s kukuricou siatou a kapustou repkovou pravou

3. TESTOVANIE VPLYVU APLIKÁCIE SAP NA PÔDNY MIKROBIÓM

Keďže v súčasnosti je nevyhnutné, aby akákoľvek aplikácia superabsorpčných polymérov do pôdy, príp. na osivo, bola z biologického hľadiska nezávadná, je potrebné venovať aj tejto časti náležitú pozornosť. Na štúdium dopadu aplikácie SAP do pôdy na životné prostredie je možné využiť metódy molekulárnej biológie detegujúce zmeny v spoločenstve rizosférnych mikroorganizmov.

Na rýchly skríning mikrobiálnej diverzity sa často využíva metóda ARISA (Automated ribosomal intergenic spacer analysis) s použitím univerzálnych primerov pre baktérie a huby (obr. 14). Princípom metódy ARISA je určenie dĺžky ITS (Internal transcribed spacer) oblasti, ktorá je amplifikovaná pomocou PCR. Ako templát v PCR je použitá extrahovaná DNA z evironmentálnych vzoriek. Použité primery sú fluorescenčne značené a amplifikujú vysoko variabilné sekvencie, ktoré sa vyskytujú pri baktériách aj hubách. Pomocou metódy ARISA je možné charakterizovať bakteriálne spoločenstvá, kedy je pomocou PCR amplifikovaná ITS oblasť medzi génmi 16S rDNA a 23S rDNA (B-ARISA). Pri identifikácii hubových spoločenstiev (F-ARISA) sú amplifikované dve ITS oblasti medzi génmi 18S rDNA– 5,8S rDNA (ITS1) a medzi 5,8S rDNA– 28S rDNA (ITS2) čiže táto oblasť obsahuje dve ITS oblasti a 5.8S rDNA gén (ITS1-5,8S-ITS2). Dáta získané metódou ARISA umožňujú odhadnúť zloženie spoločenstva, kde každý pík predstavuje jednu OTU jednotku (Operational taxonomic unit) a môže reprezentovať špecifický druh alebo taxón.



Obr. 14: Schematický záznam jednotlivých krokov ARISA analýzy použitím fluorescenčne značených primerov.

3.1. Odber rizosférnych vzoriek

Na testovanie účinku SAP v pôde je najvhodnejšie analyzovať mikrobiálnu diverzitu v rizosfére, čo je tenká vrstva pôdy na koreňoch rastlín s najväčšou mikrobiálnou aktivitou v porovnaní s okolitou pôdou niekoľko centimetrov od koreňov.

Materiál (obr. 15):

- 50 ml skúmavky alebo uzatvárateľné vrecká,
- etanol,
- papierové utierky,
- odberová malá lopatka/lyžica, príp. pinzeta
- laboratórne rukavice (voliteľné),
- fixka na popisovanie

Obr. 15: Pomôcky potrebné k odberu rizosférnych vzoriek.

Poznámky k samotnému odberu:

- Jeden variant vo viacerých opakovaniach je možné odoberať kontinuálne bez potreby premytia nástrojov etanolom.
- Pri prechode z jedného variantu do druhého je potrebné odberovú lopatku/lyžicu a ruky premyť etanolom a utrieť papierovou vreckovkou do sucha.
- Vždy sa odoberá kontrolný variant bez ošetrenia ako prvý.
- Vzorky po odbere je potrebné uchovávať v chladničke v tmavom obale a zabezpečiť izoláciu DNA čo najskôr
- Označenie skúmaviek je ľubovoľné, len je potrebné si zapísať vysvetlenie, ktoré vzorky k akému variantu a opakovaniu prislúchajú.

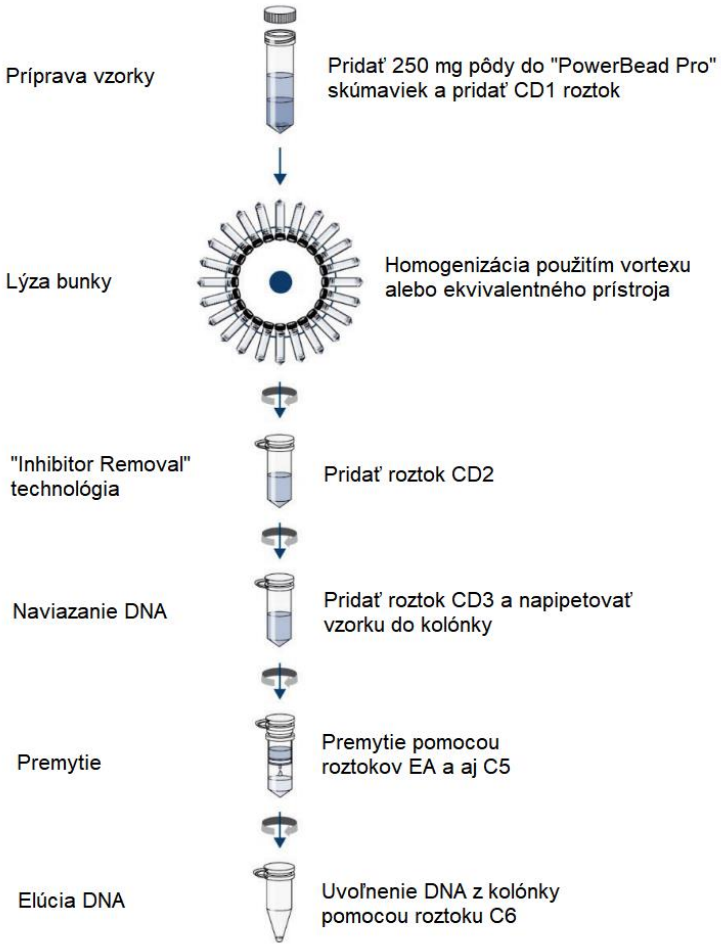
Postup (obr. 16):

- Z jednej odberovej parcelky (1 variant/1 opakovanie) sa odoberajú 3 nezávislé vzorky náhodne rozmiestnené, ktoré sa vložia do 1 skúmavky a premiešajú. Za 1 variant bude toľko samostatných skúmaviek, koľko je opakovaní.
- Vzorky sa odoberajú do hĺbky koreňov, pričom sa lopatkou vyhĺbi jamka a rastlina sa vyberie z pôdy. Hlina z koreňov sa strasie do skúmavky spolu s časťou koreňového systému.
- Z jednej parcelky je potrebné odobrať aspoň polovicu 50 ml skúmavky, t.j. súhrnne z troch nezávislých odberov v rámci 1 parcelky.
- Pri prechode z jedného variantu do druhého je potrebné odberovú lopatku/lyžicu a ruky premyť etanolom a utrieť papierovou vreckovkou do sucha.
- Po odbere vzorky uložiť na +4°C na tmavé miesto a izolovať DNA čo najskôr.

Obr. 16: Fotografie zachytávajúce odber rizosférnych vzoriek v poľných podmienkach.

3.2. Izolácia metagenomickej DNA

Metagenomická DNA (mgDNA) predstavuje všetku DNA, ktorú sa podarilo vyextrahovať z environmentálnych vzoriek (v našom prípade rizosféra). Pri izolácii DNA z pôdy/rizosféry je najvhodnejšie použiť niektorý komerčný kit vzhľadom na prítomnosť kontaminujúcich látok v pôde, ktoré sa pri bežnej izolácii ťažko odstraňujú. Najlepšie skúsenosti máme s komerčným kitom DNeasy PowerSoil Pro Kit od firmy Qiagen. Je dôležité sa držať postupu izolácie podľa priloženého protokolu, ktorý je vždy súčasťou kitu. Schematický záznam postupu izolácie mgDNA pomocou tohto kitu je znázornený na obr. 17.



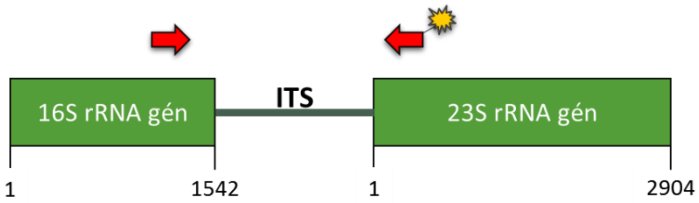
Obr. 17: Grafická schéma postupu izolácie mgDNA pomocou kitu DNeasy PowerSoil Pro Kit od firmy Qiagen.

3.3. Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Pri ARISA metóde dochádza k amplifikácii ribozomálnej intergénovej oblasti (internal transcribed spacer, ITS), ktorá sa nachádza pri baktériách medzi génmi kódujúcimi 16S rRNA a 23S rRNA. Pri hubách medzi génmi kódujúcimi 18S rRNA a 28S rRNA sa nachádzajú 2 ITS oblasti, ktoré sú vzájomne oddelené 5,8S rRNA génom. Tu dochádza k amplifikácii ITS1-5,8S-ITS2 oblasti.

Sekvencie a pozícia primerov (obr. 18) amplifikujúcich ITS oblasť pri baktériách (Cardinale et al., 2004):

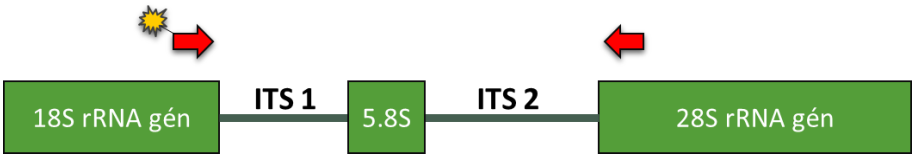
- forward primer ITSF: 5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'
- reverse primer **ITSReub**: 5'-GCCAAGGCATCCACC-3', primer je na 5‘ konci fluorescenčne značený pomocou FAM



Obr. 18: Pozícia páru primerov (červené šípky) amplifikujúcich ITS oblasť pri baktériách. Reverse primer je fluorescenčne značený. Veľkosť rRNA génov pre 16S a 23S zodpovedá veľkosti pri *E. coli*. Primery sú komplementárne k pozícii 1423 až 1443 na 16S rRNA a 36 až 23 na 23S rRNA pri *E. coli*.

Sekvencie a pozícia primerov (obr. 19) amplifikujúcich ITS1-5,8S-ITS2 oblasť pri hubách (Sequerra et al., 1997):

- forward primer 2234C: 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3', primer je na 5‘ konci fluorescenčne značený pomocou FAM
- reverse primer **3126T**: 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT -3'



Obr. 19: Pozícia páru primerov (červené šípky) amplifikujúcich ITS1-5,8S-ITS2 oblasť pri hubách. Forward primer je fluorescenčne značený. Primery použité k amplifikácii tejto oblasti predstavujú „consensus“ sekvencie nachádzajúce sa na 3‘ konci 18S génu a na 5‘ konci 28S génu pri rôznych organizmoch.

Zloženie reakčnej zmesi na PCR (finálny objem 25 µl):

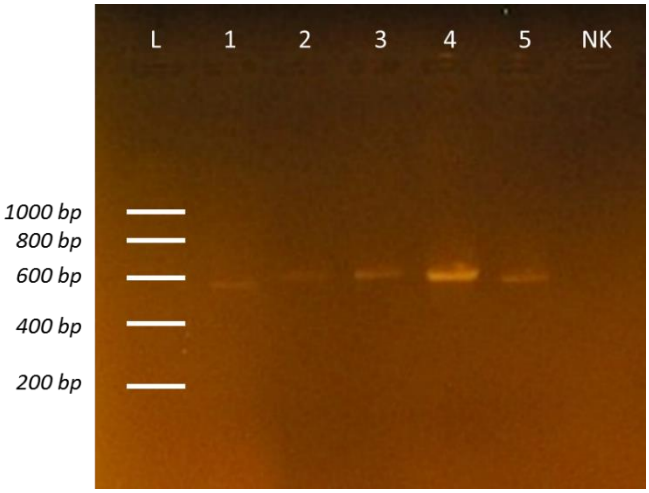
1 × PCR pufor
1,5 mM Mg^{2+}
0,25 µM forward primer
0,25 µM reverse primer
0,2 mM dNTP
1 U Taq DNA polymeráza
1 µl DNA extraktu z pôdy (cca 20 ng/µl)

PCR program:

Počiatočná denaturácia	95˚C	3 min	
Denaturácia	94˚C	45 s	35 cyklov
Anelácia	60˚C	1 min	35 cyklov
Polymerizácia	72˚C	2 min	35 cyklov
Konečná polymerizácia	72˚C	10 min	
Chladenie	4˚C	-	

3.4. Agarózová elektroforéza

Na vizualizáciu PCR produktu (obr. 20) je vhodné použiť 1 % agarózový gél v 0,5 × TBE tlmivom roztoku (90 mmol/dm^3 Tris – HCl, pH 8,0; 90 mmol/dm^3 H_3BO_3; 2 mmol/dm^3 EDTA; pH 8,0). Vzorku DNA (5 – 10 µl) zmiešať s 2 µl nanášacieho pufru a naniesť do gélu, do ktorého bol pridaný ako interkalačné činidlo etídium bromid (0,5 µg/ml) prípadne GoldView (4 µl/100 ml gélu). Separácia vzoriek prebieha v horizontálnej aparatúre GNA – 200 (Pharmacia Biotech) pri 2 – 4 V/cm dĺžky gélu. DNA fragmenty sú detegované na UV lampe pri 254 nm.



Obr. 20: Agarózová elektroforéza zobrazujúca variabilnú dĺžku ITS1-5,8S-ITS2 oblasti pri 5 rozličných hubách amplifikovaných pomocou primerov 2234C a 3126T. Dráha s označením L - ladder, 1 - *Ramularia* collo-cygni, 2 - *Drechslera tritici-repentis*, 3 - *Cochliobolus sativus*, 4 - *Pyrenophora teres*, 5 - *Fusarium graminearum*, NK - egatívna kontrola.

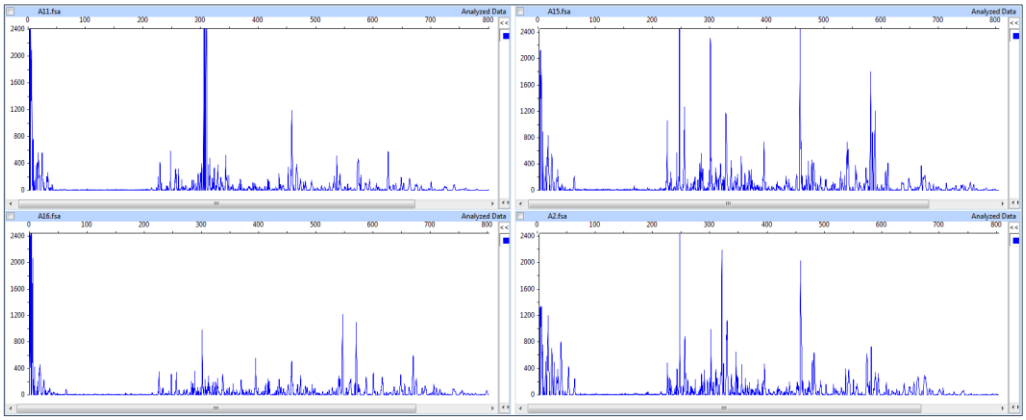
3.5. Purifikácia PCR produktov

Na prečistenie PCR produktu sa k reakčnej zmesi pridá 1/10 objemu PCR zmesi 3M octanu sodného (pH 5,2) a 3 × objem 96% etanolu. Zmes je potrebné silno vortexovať a uložiť na 20 min pri -80°C. Nasleduje centrifugácia 20 min pri 13 500 rpm. Odstrániť supernatant a k peletu pridať 70% etanol o objeme 250 µl. Centrifugácia vzorky 5 min pri maximálnych otáčkach. Po centrifugácii opatrne odstániť supernatant a po usušení peletu DNA rozpustiť v sterilnej vode.

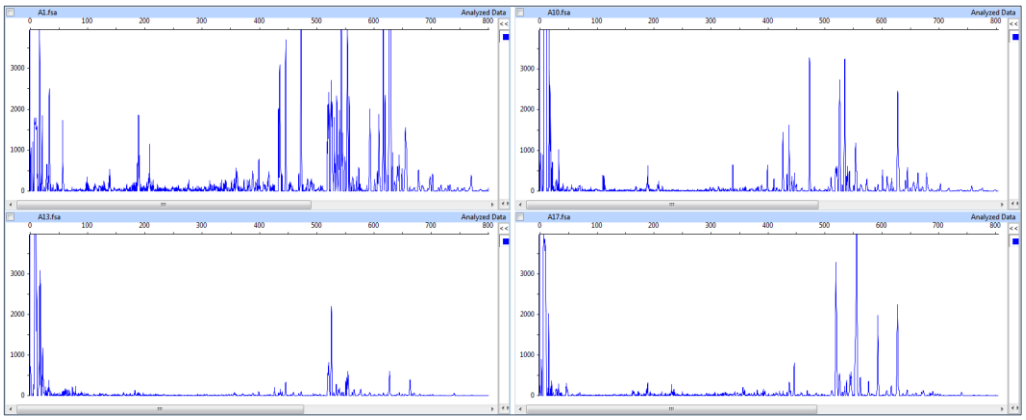
3.6. Kapilárna elektroforéza

PCR produkty sú analyzované pomocou kapilárnej elektroforézy použitím automatického sekvenátora ABI 3100 Prism Avant (Applied Biosystem). Separácia fragmentov prebieha v polyakrylamidovom géli za denaturačných podmienok. Veľkosti operačných taxonomických jednotiek (operational taxonomic unit, OTU) sú determinované použitím GeneMapper (Applied Biosystem). Zloženie zmesi na fragmentovú analýzu: 9 µl HiDi Formamidu; 0,1 µl štandardu LIZ 1200 a 1 µl DNA. Výsledkom kapilárnej elektroforézy je elektroforegram (obr. 21).

A.



B.

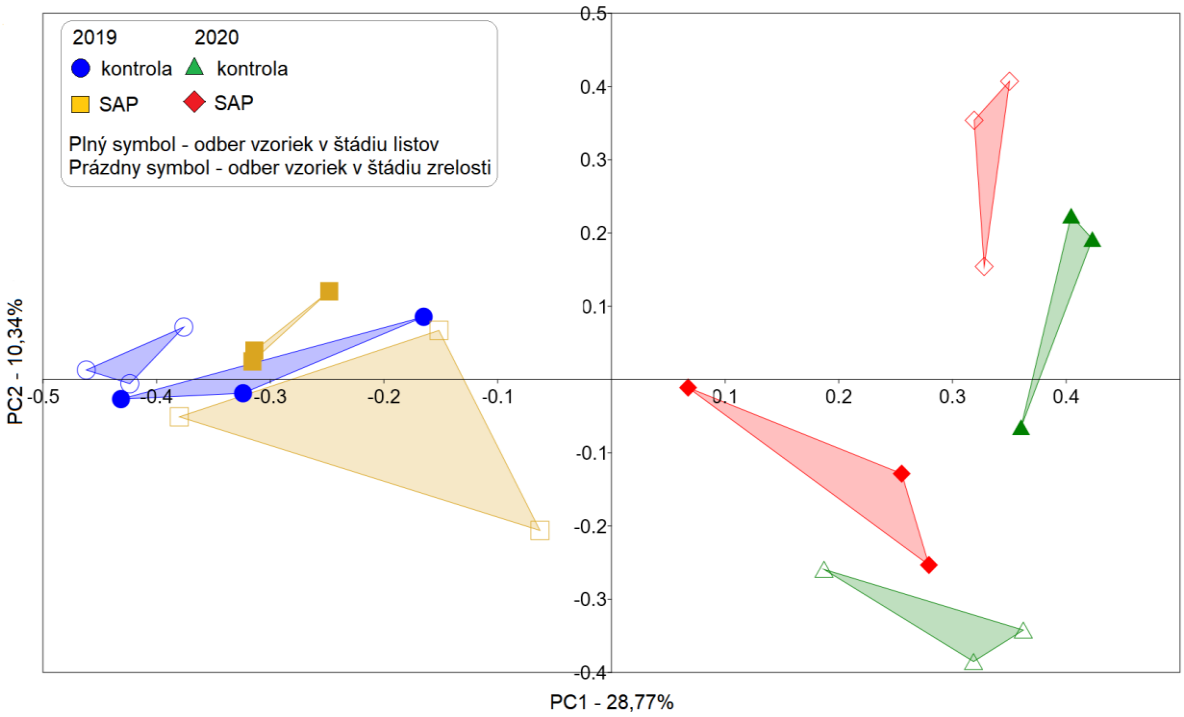


Obr. 21: Štyri rôzne ARISA profily bakteriálnych (A) a hubových (B) spoločenstiev pochádzajúcich z rizosférnych vzoriek.

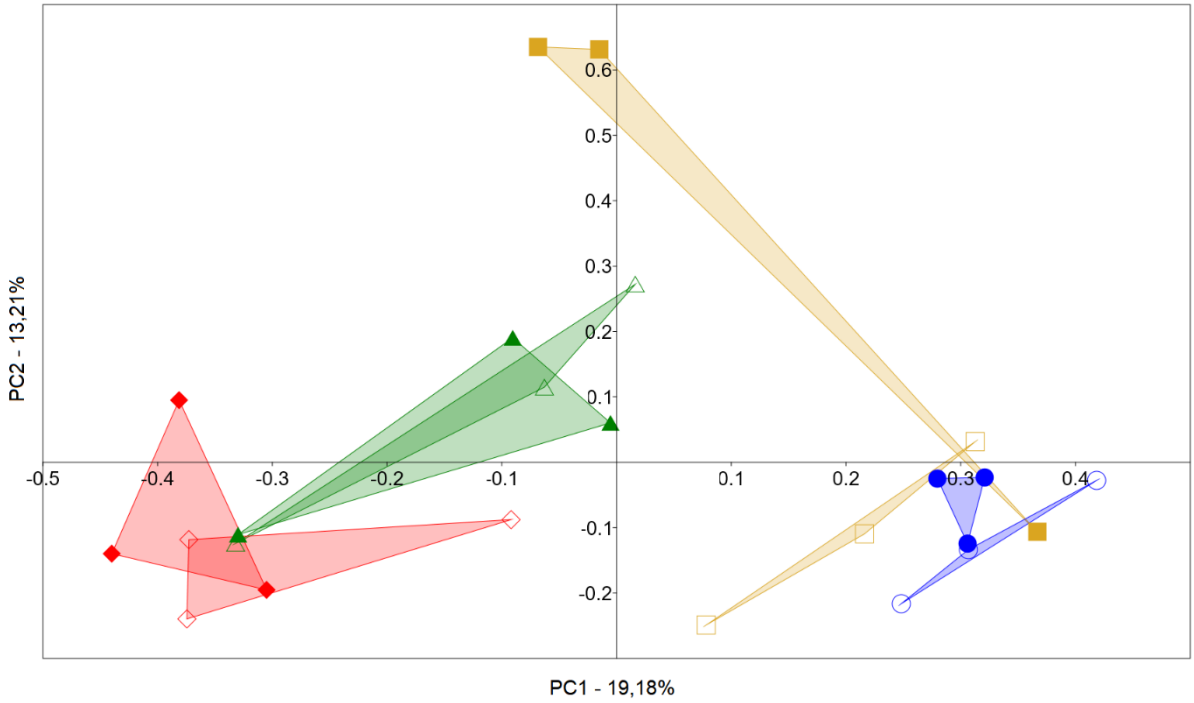
3.7. Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Vyhodnotenie výsledkov patrí medzi najdôležitejšie kroky ARISA analýzy. Pri zhodnotení podobnosti jednotlivých mikrobiálnych spoločenstiev, vznikajú rozsiahle súbory dát a musia byť použité rôzne štatistické metódy na ich vyhodnotenie. Jednou z často používaných štatistických metód pri analýzach mikrobiálnych spoločenstiev je Principal Component Analysis (PCA). PCA, čiže analýza hlavných komponentov patrí medzi metódy analýzy skrytých vzťahov. Metóda sa používa vtedy, keď premenné nemožno logicky rozdeliť do dvoch skupín na závislé a nezávislé. Cieľom je pochopiť alebo identifikovať prečo a ako sú premenné vzájomne korelované, čiže ako sa navzájom ovplyvňujú. Ak sú premenné navzájom korelované, možno rovnaký objem informácií vystihnúť menším počtom premenných – zníženie dimenzie. Tieto nové premenné sú lineárnou kombináciou pôvodných premenných a nazývajú sa hlavné komponenty (Principal Component). Výsledkom analýzy je graf, kde hodnoty na osi x a y udávajú percentuálny podiel z celkovej variability. Každá mikrobiálna komunita je reprezentovaná symbolom (číslom). Vzdialenosť medzi symbolmi udáva mieru podobnosti. Z toho vyplýva, že symboly ležiace pri sebe majú podobnú štruktúru spoločenstva ako symboly ležiace ďalej od seba. Je potrebné zdôrazniť, že os x udáva vyššie percento z celkovej variancie ako os y čo znamená, že horizontálna vzdialenosť medzi symbolmi je oveľa dôležitejšia ako vertikálna (obr. 22).

A.



B.



Obr. 22: Analýza hlavných komponentov rizosférnych vzoriek bakteriálnych (A) a hubových (B) spoločenstiev odoberaných v rokoch 2019 a 2020 z rizosféry kukurice v 2 štádiách – štádium listov a štádium zrelosti. Symbol a farba vyjadrujú typ vzorky, pričom každé ošetrenie je v troch opakovaniach.

Ďalším spôsobom ako zobraziť podobnosti medzi jednotlivými mikrobiálnymi spoločenstvami je klastrová analýza (Cluster analysis, CA) a grafické zobrazenie je vo forme dendrogramu. Všeobecne používanou metódou je hierarchická klastrová analýza, v ktorej sú klastre formované grupovaním objektov do väčších a väčších klastrov až pokiaľ všetky objekty nie sú členmi jedného klastru. Klastrovanie prebieha na základe výpočtu genetickej podobnosti. V prevažnej miere sa ako metóda kombinácie klastrov používa UPGMA metóda (Unweighted Pair – Group Method using arithmetic Averages), ktorá definuje vzdialenosť medzi dvoma klastrami ako priemer vzdialenosti medzi všetkými pármi objektov, z ktorých 1 objekt páru patrí do oboch klastrov. Medzi iné viacrozmerné analýzy, ktoré sa síce v menšej miere, ale takisto používajú na zobrazenie vzájomnej podobnosti mikrobiálnych spoločenstiev patria: Factor Analysis (FA, Faktorová analýza), Canonical Correlation Analysis (CCA), Correspondence Analysis (CA), a i. Aby však bolo možné vykonať tieto viacrozmerné štatistické analýzy, dáta musia byť najskôr prevedené do tabuľky, ktorá zobrazuje rôzne vzorky (ARISA profily) v závislosti na druhu (OTU), ktorý v tomto prípade zodpovedá výške fluorescencie.

Genetickú diverzitu môžeme hodnotiť ešte aj použitím rôznych indexov diverzity, ako napr. Gini-Simpson index (Jost, 2006):

$$1 - \lambda = \sum \left(p_i^2\right)$$

kde λ je Simpsonov index diverzity a p je pomer individuálnej výšky píku k súčtu všetkých výšok píku. Hodnoty tohto indexu sa pohybujú medzi 0 a 1. Čím bližšie sú hodnoty k číslu 1, tak je veľká pravdepodobnosť, že dva náhodne vybrané jedince prezentujú rozdielny typ skupiny.

Shannonov index diverzity (Shannon, 1948):

$$H' = -\sum (p_i)\,(\ln p_i)$$

Tento index sa bežne používa na charakterizáciu druhovej rozmanitosti v spoločenstve. Shannon index diverzity hovorí o pravdepodobnosti druhovej identity náhodne vybraného jedinca.

Pielou evenness index (Pielou, 1966), ktorý bol odvodený od Shannonovho indexu diverzity:

$$J' = H'/H'_{max}$$

kde *H´max = ln(S)*, kde *S* predstavuje celkový počet druhov. Hodnoty sa pohybujú medzi 0 a 1, čím bližšie sú k 1, tým je vyššia pravdepodobnosť vyrovnanosti spoločenstva.

4. ZÁVER

Metodická príručka popisuje postupy hodnotenia osiva ošetreného SAP v laboratórnych a poľných podmienkach s názornými ukážkami výsledkov hodnotenia.

Prvým krokom hodnotenia osiva ošetreného SAP sú testy klíčivosti semien a vzchádzavosti rastlín v laboratórnych podmienkach v štandardných vlhkostných pomeroch a pri navodení stresu zo sucha. Ten môže byť indukovaný aplikáciou zníženej dávky vody alebo prídavkom osmotických činidiel v zálievke, ako sú PEG (polyetylénglykol) alebo manitol. Porovnanie ošetreného osiva s kontrolným variantom (neošetreným osivom) umožňuje analyzovať potenciálny vplyv ošetrenia osiva superabsorpčným polymérom na klíčivosť semien/vzchádzavosť rastlín v podmienkach stresu, rýchlosť klíčenia/vzchádzania, priemerný čas klíčenia/vzchádzania, index klíčivosti/vzchádzavosti, ako aj ďalšie parametre, napr. dĺžka výhonkov (klíčkov) a koreňov, hmotnosť biomasy, podiel vody a sušiny v pletivách. Na laboratórne hodnotenia nadväzuje testovanie osiva v reálnych poľných podmienkach, či už v maloparcelových alebo prevádzkových a poloprevádzkových pokusoch so zapojením pestovateľov z praxe. Popri parametroch hodnotených v laboratórnych experimentoch, v poľných podmienkach je možné hodnotiť ďalšie parametre, ako sú základné alebo druhovo špecifické fenologické parametre a kvantitatívne a kvalitatívne parametre úrody. Zaujímavé výsledky môže priniesť i obrazová analýza rastlín v čase ich vzchádzania, ktorá umožňuje objektívne posúdiť veľkosť koreňovej sústavy klíčiacich rastlín, na ktorú môže mať aplikácia SAP na osivo zásadný vplyv. Pretože podmienky kultivácie rastlín v poľných pokusoch nevieme regulovať, významnou súčasťou poľných pokusov je monitorovanie klimatických podmienok pred a počas sezóny pestovania, ktoré významnou mierou vplývajú na prejavy rastlín.

Aplikácia akýchkoľvek syntetických látok, akou je aj uvedený SAP, do pôdy vyžaduje posúdenie ich vplyvu na životné prostredie. Na štúdium dopadu aplikácie SAP do pôdy je možné využiť metódy molekulárnej biológie detegujúce zmeny v spoločenstve mikroorganizmov (baktérií a húb) v rizosfére, t.j tenkej vrstve pôdy, ktorá je v úzkom kontakte s koreňmi rastlín. Na rýchly skríning mikrobiálnej diverzity sa často využíva metóda ARISA. Výhodou tejto metódy je schopnosť pomerne ľahko získať veľké množstvo dát. Pomocou automatického systému, ktorý je dostupný v mnohých laboratóriách je možnosť získať stovky OTU v priebehu jedného týždňa. V súčasnosti už existujú rôzne softvéry na fragmentovú analýzu, ktoré automaticky generujú výstup z elektroforézy do štandardného štatistického súboru. Kombinácia rýchlo získaných dát, automatického spracovania informácií a štatistickej analýzy robia z tejto metódy účinný nástroj na monitorovanie mikrobiálneho spoločenstva v priestore a čase. Tak ako každá iná metóda, aj ARISA má niekoľko nevýhod. DNA extrakcia, PCR a elektroforéza, ak nie sú správne prevedené, majú schopnosť zanechávať artefakty a skresľujú výsledné OTU. Tieto nevýhody, ale neplatia iba pre ARISA metódu, ale pre všetky ostatné metódy, ktoré využívajú izoláciu DNA, PCR aj elektroforézu.

5. UPLATNENIE METODIKY

Aplikácia SAP na osivo je inovatívnou metódou ošetrenia osiva, ktorej cieľom je podporiť vzchádzanie rastlín v obdobiach s nedostatkom vlahy. Vypracované pracovné postupy hodnotenia osiva ošetreného SAP zahŕňajú laboratórne testy klíčivosti semien na filtračnom papieri a vzchádzavosti rastlín v substráte, ako aj metodiku poľného hodnotenia v maloparcelových, poloprevádzkových a prevádzkových pokusoch. Jednotlivé popisované postupy sú aplikovateľné pre osivo kapusty repkovej pravej a obilnín. Metodika tiež popisuje možnosti štúdia vplyvu aplikácie SAP na pôdny ekosystém využitím molekulárnej metódy ARISA, ktorá dokáže identifikovať zmeny v spoločenstve baktérií a húb v rizosfére.

Metodická príručka je určená pre firmy zaoberajúce sa prípravou a ošetrením osiva, stredné školy a univerzity s poľnohospodárskym zameraním. Vykonanie laboratórnych experimentov pre hodnotenie klíčenia semien/vzchádzania rastlín vyžaduje len základnú laboratórnu infraštruktúru a skúsenosti. Molekulárne analýzy mikrobiálneho spoločenstva však môžu byť realizované len v laboratóriách s potrebným špecializovaným vybavením. Realizácia maloparcelových pokusov vyžaduje špeciálnu mechanizáciu, odlišnú od bežnej používanej poľnohospodárskej techniky a personál so skúsenosťami a zručnosťami pri zakladaní, vedení, ošetrovaní a hodnotení pokusov.

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P. et al. (2004): Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6147–6156.

Jost L. (2006): Entropy and diversity. Oikos 113, 2, 363–375.

Lobet G., Pagès L., Draye X. (2011): A Novel Image Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture. Plant Physiology 157, 29-39., doi:10.1104/pp.111.179895

Pielou E.C. (1966): The measurement of diversity in different types of biological collections. Journal of Theoretical Biology 13, 131–144.

Sequerra J., Marmeisse R., Valla G. et al. (1997): Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming Penicillium nodositarium inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. Mycological Research 101, 4, 465–472.

Shannon C.E. (1948): A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal 27, 3, 379–423.

ÚKSUP (1999): Metodika skúšania osiva a sadiva. Vyd: Hrdinová, H. a kol., SPU Nitra, 123 s. ISBN 80-7137-646-9.

7. PUBLIKÁCIE, KTORÉ PREDCHÁDZALI METODICKEJ PRÍRUČKE

Gubišová, M., Hudcovicová, M. Matušinský, P. et al. (2022): Superabsorbent polymer seed coating reduces leaching of fungicide but does not alter their effectiveness in suppressing pathogen infestation. Polymers (Basel) 14(1):76. doi: 10.3390/polym14010076.

Gubišová, M., Gubiš, J. (2022): Superabsorpčné polyméry môžu zmierniť dopady sucha na rastliny nielen na poliach, ale aj v záhradách a sadoch. Genofond 26/1, str. 6-7.

Hrčková, K., Gubišová M., Hudcovicová M. a kol. (2022): Podpora vzchádzania kukurice siatej pomocou superabsorpčných polymérov. Agromanuál 17/3, slovenská príloha s. 8-10.

Hrčková, K., Gubiš J., Hašana, R. a kol. (2020): Nový trend pri zakladaní porastov kukurice. Naše pole 24/4, str. 34-36.

Hrčková, K., Hašana, R. Polák Š. (2018): Pomocné látky v poľnohospodárstve (II.). Naše pole 22/11, str. 24-25.

Metodická príručka je výstupom ÚOP financovaných MPRV SR (kontrakt 342/2021/MPRVSR–220): č. 22 „Molekulárno-biologické prístupy v riešení adaptácie rastlín na klimatickú zmenu a diagnostika fytopatogénov pre ekologicky prijateľné a udržateľné poľnohospodárstvo“ a č. 75 „Superabsorpčné polyméry (SAP) a ich aplikačný potenciál v adaptácii poľnohospodárskej produkcie v podmienkach sucha“ a projektu Interreg V-A SK-CZ „Využitie superabsorpčných polymérov (SAP) ako inovačného nástroja na zmiernenie dopadov klimatickej zmeny v poľnohospodárstve“, ITMS: 304011Y185, financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja.

Piešťany **2022**