

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# ROSTLINNÁ VÝROBA

## *Plant Production*

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

6

VOLUME 46  
PRAHA  
ČERVEN 2000  
ISSN 0370-663X

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

#### Redakční rada – Editorial Board

##### Předseda – Chairman

Prof. Ing. Václav Vaněk, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)

##### Členové – Members

Prof. Dr. Márta Birkás (Agrártudományi Egyetem, Gödöllő, Hungária)  
 Ing. Helena Donátová, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)  
 Prof. Ing. Václav Fric, DrSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)  
 Doc. Ing. Václav Hosnedl, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)  
 Prof. Dr. Günter Kahnt (Institut für Pflanzenbau und Grünland, Universität Hohenheim, Stuttgart, BRD)  
 Prof. Ing. Josef Kozák, DrSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)  
 Ing. Timotej Miština, CSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Piešťany, SR)  
 Doc. Ing. Jan Moudrý, CSc. (Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ČR)  
 Prof. RNDr. Lubomír Nátr, DrSc. (Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita v Praze, ČR)  
 Dr. Peter Newbould (The Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Scotland, UK)  
 Ing. Jaromír Procházka, CSc. (Výzkumný ústav pícninářský, Troubsko u Brna, ČR)  
 Prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ČR)  
 Doc. Ing. Vlastimil Rasocha, CSc. (Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod, ČR)  
 Prof. Dr. Heinrich W. Scherer (Agrikulturchemisches Institut der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität, Bonn, BRD)  
 Doc. Ing. Ladislav Slavík, DrSc. (Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, ČR)  
 Doc. Ing. Josef Šimon, CSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně, ČR)  
 Doc. Ing. Pavel Tlustoš, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)  
 Ing. Marie Váňová, CSc. (Zemědělský výzkumný ústav, Kroměříž, ČR)  
 Prof. Ing. Karel Voříšek, CSc. (Česká zemědělská univerzita v Praze, ČR)  
 Doc. Ing. František Vrkoč, DrSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně, ČR)  
 Prof. Dr. hab. Kazimiera Zawislak (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska)  
 Prof. Ing. Josef Zimolka, CSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ČR)

##### Vedoucí redaktorka – Editor-in-Chief

RNDr. Eva Stříbrná

**Cíl a odborná náplň:** Časopis publikuje původní vědecké práce, výsledky výzkumu, studie a analýzy z oblasti rostlinné výroby, především pěstování rostlin, tvorby výnosů plodin, kvality jejich produktů, semenářství, fyziologie rostlin, agrochemie, pedologie, mikrobiologie, meliorací a agroekologie. Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences. Abstrakty z časopisu jsou zahrnuté v těchto databázích: Agricola, Agris, CAB Abstracts, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus.

**Periodicita:** Časopis vychází měsíčně (12krát ročně), ročník 46 vychází v roce 2000.

**Přijímání rukopisů:** Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: RNDr. Eva Stříbrná, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@uzpi.cz. Den doručení rukopisu do redakce je publikován jako datum přijetí k publikaci.

**Informace o předplatném:** Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 2000 je 816 Kč.

Aktuální informace najdete na URL adrese: <http://www.uzpi.cz>

**Aims and scope:** Original scientific papers, results of research, review studies and analyses from the crop production sector, particularly care of crops, crop yield formation, quality of plant products, seed production, plant physiology, agrochemistry, soil science, microbiology and agri-ecology are published in this periodical.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences. Abstracts from the journal are comprised in the databases: Agricola, Agris, CAB Abstracts, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus.

**Periodicity:** The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 46 appearing in 2000.

**Acceptance of manuscripts:** Two copies of manuscript should be addressed to: RNDr. Eva Stříbrná, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@uzpi.cz. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

**Subscription information:** Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 2000 is 195 USD (Europe), 214 USD (overseas).

Actual information are available at URL address: <http://www.uzpi.cz>

# CHLOROPHYLL AND NITROGEN CONTENT IN LEAVES OF WINTER WHEAT AT DIFFERENT GENOTYPES AND FERTILIZATION

## OBSAH CHLOROFYLU A DUSÍKA V LISTOCH OZIMNEJ PŠENICE PRI ROZDIELNYCH GENOTYPOCH A HNOJENÍ

M. Užík, A. Žofajová

*Research Institute of Plant Production, Piešťany, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** The SPAD meter readings and N leaf content were evaluated in field and pot experiments with winter wheat (*Triticum aestivum* L.) at different genotypes and N fertilization. In the field experiment in the year of 1997/1998 five winter wheat genotypes (Ilona, PS 7/95, PS 19/94, SK 678-18, SK 656-2) were evaluated at 12 fertilization variants created by four N treatments (0, 30, 60, 120 kg N.ha<sup>-1</sup>) and three P treatments (0, 20, 40 kg P.ha<sup>-1</sup>). The SPAD meter readings were taken on 3 June at growth stage (GS) 42, on 11 June at GS 46, on 16 June at GS 49, and on 7 July at GS 79. Leaves for N determination were sampled at last three terms. With the same winter wheat genotypes as those in the field experiment in which genotype SO 1441 instead of PS 7/95 was included, a pot experiment was established with two N treatments (0 and 40 mg N.kg<sup>-1</sup> of soil). Plants were grown in a growth chamber under controlled environmental conditions: 16-hour photoperiod with irradiance of 480 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> at day/night temperatures of 23/16 °C. Leaves were sampled and SPAD meter readings were taken on 28 January at GS 55, on 15 February at GS 68 and on 3 March at GS 75. Factors N fertilization, genotype, growth stage and interaction between them had significant effect on the chlorophyll (SPAD) and N content in leaves. N treatment increased SPAD values in the field experiment at the beginning of heading (N<sub>0</sub> = 50.09, N<sub>120</sub> = 54.84) as well as in the pot experiment (N<sub>0</sub> = 56.18, N<sub>40</sub> = 58.33) and also N leaf content (in the same order) (N<sub>0</sub> = 3.653%, N<sub>120</sub> = 4.440%, N<sub>0</sub> = 3.888%, N<sub>40</sub> = 4.337%). The higher N doses, the higher portion of SPAD meter readings and N leaf content in later growth stages in comparison to earlier ones. SPAD meter readings went down from GS 49 to GS 79 at N<sub>0</sub> to 49.7% (24.88/50.08), but at N<sub>120</sub> in the same growth stages only to 77.6%. N leaf content in the same order went down to 42.8% (1.563%/3.653%) and to 62.6% (2.778%/4.440%). Genotypic differences in SPAD meter readings and N leaf content were the same or higher than among N treatments. The relationships between N leaf content and SPAD values were strong both in the field and pot experiments at variability dependent on N treatments ( $r = 0.975^{**}$ ) or dependent on genotypes ( $r = 0.982^{**}$ ). Equally high correlations were between N doses on one hand and SPAD meter readings ( $r = 0.952^{**}$ ) and N leaf content ( $r = 0.937^{**}$ ) on the other hand. In the field experiment strong positive correlations were found between SPAD value and N content in grain ( $r = 0.975^{**}$ ), and also N leaf content and N content in grain ( $r = 0.846$ ). These results indicated that the above mentioned relations can be used in cultural practices and in breeding for quality and better utilization of N.

**Keywords:** winter wheat; genotypes; N fertilization; SPAD; N leaf content; correlation

**ABSTRAKT:** V poľnom a nádobovom pokuse s ozimnou pšenicou sme hodnotili obsah chlorofylu (SPAD) a obsah N v listoch v závislosti od genotypov a N hnojenia. V poľnom pokuse v roku 1997/1998 bolo hodnotených päť genotypov ozimnej pšenice (Ilona, PS 7/95, PS 19/94, SK 678-18, SK 656-2) na 12 variantoch hnojenia, ktoré boli vytvorené kombináciou štyroch hladín N hnojenia (0, 30, 60, 120 kg N.ha<sup>-1</sup>) a troch hladín P hnojenia (0, 20, 40 kg P.ha<sup>-1</sup>). Obsah chlorofylu (SPAD) bol hodnotený 3. júna v rastovom štádiu (RS) 42, 11. júna v RS 46, 16. júna v RS 49 a 7. júla v RS 79. S tým istým súborom genotypov ako v poľnom pokuse, v ktorom namiesto genotypu PS 7/95 bol zaradený genotyp SO 1441, sme založili nádobový pokus s dvoma hladinami N hnojenia (0 a 40 mg N.kg<sup>-1</sup> pôdy). Rastliny boli pestované v kontrolovaných podmienkach v rastovej komore: 16h fotoperiódou s osvetlením 480 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, teplota 23/16 °C (deň/noc). Odber listov a hodnotenie obsahu chlorofylu (SPAD) bolo 28. januára v RS 55, 15. februára v RS 68 a 3. marca v RS 75. Na obsah chlorofylu (SPAD) a obsah N v listoch mali významný vplyv sledované faktory – N hnojenie, genotyp, rastové štádiá a interakcie medzi nimi. V poľnom pokuse N hnojenie zvýšilo SPAD hodnoty na začiatku klásenia (N<sub>0</sub> = 50,09, N<sub>120</sub> = 54,84), rovnako aj v nádobovom pokuse (N<sub>0</sub> = 56,18, N<sub>40</sub> = 58,33) a tiež obsah N v listoch (v tom istom poradí) (N<sub>0</sub> = 3,653 %, N<sub>120</sub> = 4,440 %, N<sub>0</sub> = 3,888 %, N<sub>40</sub> = 4,337 %). Čím vyššia bola dávka N hnojenia, tým vyšší bol podiel obsahu chlorofylu (SPAD) a obsahu N v listoch v neskorších rastových štádiách v porovnaní so skoršími. Obsah chlorofylu (SPAD) poklesol od RS 49 do RS 79 pri N<sub>0</sub> na 49,7 % (24,88/50,08), ale pri N<sub>120</sub> v tých istých rastových štádiách iba na 77,6 %. Obsah N v listoch klesol v tom istom poradí na 42,8 % (1,563 %/3,653 %) a na 62,6 % (2,778 %/4,440 %). Rozdiely medzi genotypmi v obsahu chlorofylu (SPAD) a obsahu

N v listoch boli rovnaké, alebo vyššie ako medzi dávkami N hnojenia. V poľnom a nádobovom pokuse boli silné vzťahy medzi obsahom N v listoch a SPAD hodnotami pri variabilite podmienenej N hnojením ( $r = 0,975^{**}$ ) alebo v závislosti od genotypov ( $r = 0,982^{**}$ ). Rovnako silné korelácie boli medzi dávkami N na jednej strane a SPAD hodnotami ( $r = 0,952^{**}$ ) a obsahom N v listoch ( $r = 0,937^{**}$ ) na strane druhej. V poľnom pokuse boli pozitívne korelácie medzi SPAD hodnotami a obsahom N v zrne ( $r = 0,975^{**}$ ) a tiež medzi obsahom N v listoch a obsahom N v zrne ( $r = 0,846$ ). Získané výsledky naznačujú, že uvedené vzťahy môžu byť využité pri racionalizácii výživy a v šľachtení na kvalitu a lepšie využitie N.

**Kľúčové slová:** ozimná pšenica; genotypy; N hnojenie; SPAD; obsah N v listoch; korelácie

## INTRODUCTION

The application of N fertilizer is one of the most expensive management in plant production considering its high costs. Therefore ways of its rationalization are looked for, when N leaf content is recognized as a good indicator of plant N status. As there is a strong relation between N leaf content and chlorophyll content (Schepers et al., 1992), the latter is also regarded as an indicator of state of plant N status and a good yield predictor in winter wheat (Evans, 1983). Wider utilization of N and chlorophyll content as indicator of rationalization of fertilization and for selection was limited by high material costs and time for their analytical determination. After the development of Minolta SPAD 502 (Soil Plant Analysis Development) (Schepers et al., 1998) instrument, which measures chlorophyll content indirectly and in a very expeditious and non-destructive way, the above mentioned indicators are recommended for wider use in cultural practice for rationalization of fertilization (Sunderman et al., 1997; Shapiro, 1999), but also in breeding in selection for better N utilization (Ladha et al., 1998) eventually in selection for higher N content in grain (Užík et al., 1999). It has been the only, commercially available type of chlorophyll meter measuring chlorophyll content indirectly, by means of two sensors. For a chlorophyll meter user it is important to be conscious of the principle of measurement and the parameters that can affect the accuracy of measurement. The sensor area, the place where a part of a leaf is inserted, is only 2 x 3 mm large, which is a relatively small portion of a leaf and that is why it is necessary to avoid atypical or damaged leaves in measurements. Measurements are fast, chlorophyll meters allow storing up to 30 individual meter readings, excluding atypical measurements and calculating average. The sampling strategy for making chlorophyll readings should be tailored for each crop and leaf type (Hoel, 1998; Schepers et al., 1998). For SPAD measurement such plants should be selected that are typical, non-damaged by diseases to minimize the experimental error (Blackmer et al., 1993). In maize it is recommended to measure SPAD on a fully developed first leaf under the spike and in its centre (Peterson et al., 1993) likewise in rice (Ladha et al., 1998) and wheat (Hoel, 1998).

Apart from fertilization, the effect of variety on SPAD meter readings was detected in maize (Sunderman et al., 1997), rice (Ladha et al., 1998), wheat (Hoel, 1998) and spring barley (Užík et al., 1999). With re-

gards to high dynamics of N and chlorophyll leaf content, it is necessary to obtain more results to generalize the knowledge that would allow elaboration of the detailed instructions for use of a chlorophyll meter in cultural practice (Shapiro, 1999) and in breeding (Ladha et al., 1998).

The objective of the study was to determine the effect of levels of N fertilization, genotype and growth stage on N and SPAD meter readings in winter wheat leaves.

## MATERIAL AND METHODS

The field experiment – with five winter wheat genotypes (Ilona, PS 7/95, PS 19/94, SK 679-18, SK 656-2) tested at 12 variants of fertilization created by four N rates (0, 30, 60, 120 kg N.ha<sup>-1</sup>) and three P rates (0, 20, 40 kg P.ha<sup>-1</sup>) was established in Research and Breeding Station Víglaš-Pstruša in 1997/1998. N fertilizer in the form of ammonium nitrate (27.5%) was applied in two doses (30% in the autumn and 70% in the spring). P fertilizer was applied at the sowing in the form of superphosphate (7.9%). Besides standard observations, for selected fertilization variants SPAD meter readings were taken in the last leaves, approx. 4 to 5 cm from their tip in four terms (3 June, 11 June, 16 June and 7 July), i.e. by Zadoks et al. (1974) in growth stages (GS) 42 – flag leaf sheath extending, 46 – boots swollen, 49 – first awns visible, and 79 – late milk ripeness. Three observations were recorded, each of them as the average of 10 individual SPAD meter readings (30 leaves per plot). At the last term a similar measurement was also done in the next to last leaf. Sample of 30 leaves from the each plot for determination of N leaf content were taken independently on the leaves for SPAD meter readings. N content was only determined for the last three terms. A grain sample for determination of N content in grain was taken from three nutrition treatments (N<sub>0</sub>, N<sub>30</sub>, N<sub>60</sub>) for each genotype.

The pot experiment (with the same set of winter wheat genotypes as in the field experiment wherein genotype SO 1441 instead of PS 7/95 genotype was included) was established in a growth chamber (three replications, two N treatments 0 and 40 mg.kg<sup>-1</sup>, eight plants in a pot with 2 kg of soil). Daylight 16 hours irradiance 480 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (fluorescent tubes) at temperature day/night of 23/16 °C. SPAD meter readings were taken from the last leaves (at the basis of leaf, at

the midpoint at the leaf and at the leaf tip) in three terms (28 January, GS 55, half of inflorescence emerged; 15 February, GS 68, anthesis complete; 3 March, GS 75, middle milk ripeness), when also the leaves were taken for determination of N content. At the maturity N content was stated for an average plant sample (grain, straw) from each pot.

N content was determined by Dumas method on an analyzer CNS – 2000 of LECO Corp. company, USA. The data obtained were carried out using the computer program Statgraphics plus version 3.1. Significant differences within nutrient treatments, eventually genotypes were evaluated by Tuckey test (*HSD*). As a calculation SPAD unit, the average over observations (model M1), the average over observations and replications (model M2), the average over observations, replications and genotypes (model M3 – variability conditioned by fertilization) or the average over observations, replications and fertilization (model M3 – variability conditioned by a genotype) (Tabs. VII, VIII) were used to calculate correlation coefficients.

## RESULTS

The difference between  $N_0$  and  $N_{30}$  variants in the first term was small and non-significant, but it was significant between  $N_{30}$  and  $N_{120}$  (Tab. I). P fertilization at doses  $N_{30}$  (first and second term) and  $N_{60}$  (second term) increased SPAD values non-significantly, at  $N_{120}$  (in both terms) decreased SPAD values. In the first term (beginning of boot stage) the difference between  $N_0$  and  $N_{120}$  treatments was less than 5 SPAD units, however in the last term on 7 July (last leaf, milk ripeness) the difference was nearly 18 SPAD units (Tab. I) and differences among  $N_0$ ,  $N_{30}$  and  $N_{120}$  were significant between each other. It was caused by different dynamics

of SPAD meter readings in individual fertilization treatments. At  $N_0$  variant SPAD values decreased from 3 June to 7 July from 50.09 to 24.88, i.e. 49.67% and at  $N_{120}$  from 54.84 to 42.55, i.e. 77.58%. This different reaction was confirmed by a significant interaction term x fertilization (Tab. V). SPAD values in the next to last leaf in the time of milk ripeness were two times lower than in the last leaf. As the results show, in early terms when it is still possible to correct plant N status by fertilization there is a small difference between a non-fertilized variant (30 years) and a variant fertilized with 30 kg N.ha<sup>-1</sup> and only 5 to 6 SPAD units between both on one hand and a fertilization variant of 120 kg N.ha<sup>-1</sup> on the other hand. Differences among the  $N_0$ ,  $N_{30}$  and  $N_{120}$  fertilization treatments over all three terms were statistically significant between each other (Tab. V).

In the experiment only five genotypes were tested but differences among them in SPAD values were comparable with differences between fertilization treatments in each term. The lowest SPAD value on average over three fertilization treatments and four terms was found in Ilona variety (42.48) and the highest in SK 679-18 genotype (48.21) (Tab. II). Considering the significant interaction term x genotype (Tab. V), the given genotype classification is not unambiguous (Tab. II). Genotypes differed in dynamics of SPAD values as while in Ilona variety the SPAD values increased up till 16 June and then sharply went down, other genotypes PS 7/95 and SK 679-18 had maximum SPAD values in the first term and the others in the second and third one.

More detailed analysis of the significant interaction fertilization x genotype (Tab. V) according to terms showed a different reaction of genotypes to fertilization in SPAD values only at 7 July and only when analyzing the last leaf (Tab. II). As seen from the results (Tab. II) of 7 July at all genotypes, the higher N fertilization, the higher SPAD values, however, Ilona variety had lower

I. Chlorophyll meter readings in leaves of winter wheat genotypes according to fertilization variants (field experiment)

Fertilization variant		3. 6. 1998	11. 6. 1998		16. 6. 1998	7. 7. 1998		$\bar{x}$	
Number	N/P (kg.ha <sup>-1</sup> )		abs. $\bar{x}$	rel. %		NLL	LL	abs. $\bar{x}$	rel. %
1	0/0	50.09 a*	49.37 a	100.0	50.08 a	16.11 a	24.88 a	41.44 a	100.0
5	30/20	50.11 a	50.46 ab	102.2	–	–	–	–	–
6	30/40	50.36 a	51.04 abc	103.4	51.94 ab	17.57 ab	36.55 b	46.50 b	112.2
8	60/20	–	51.78 abc	104.9	–	–	–	–	–
9	60/40	–	52.89 abc	107.1	–	–	–	–	–
11	120/20	54.84 b	54.66 bcd	110.7	54.42 b	20.41 b	42.55 c	50.54 c	121.9
12	120/40	53.90 b	53.22 d	107.8	–	–	–	–	–
$\bar{x}$ abs.		51.86	51.91	–	52.14	18.03	34.66	46.16	–
$\bar{x}$ rel. %		100.0	100.1	–	100.5	34.8	66.8	89.0	–
SE		0.435	0.625	–	0.696	1.056	1.200	0.690	–
<i>HSD</i> <sub>(0.05)</sub>		1.703	2.769	–	3.092	3.477	3.629	2.544	–

\* in each column, average values with the same letters are not significantly different according to *HSD*<sub>(0.05)</sub> (Tukey test)

LL = last leaf

NLL = next to last leaf

II. Chlorophyll meter readings in last leaves of winter wheat genotypes (field experiment)

Genotype	3. 6. 1998	11. 6. 1998	16. 6. 1998	7. 7. 1998 LL				7. 7. 1998 NLL	$\bar{x}$ over three fertilization variants
				fertilization variant			$\bar{x}$		
				N <sub>0</sub>	N <sub>30</sub>	N <sub>120</sub>			
Ilona	52.36 b*	53.80 c	55.86 c	14.63 a	17.06 a	21.13 a	17.61 a	12.77	42.48 a
PS 7/95	51.17 ab	49.09 a	48.23 a	25.20 ab	41.38 b	48.96 b	38.51 b	21.73	45.03 ab
PS 19/94	49.50 a	50.99 ab	50.90 ab	27.41 b	45.71 b	50.23 b	41.12 b	23.16	47.51 bc
SK 679-18	54.24 c	53.30 c	53.90 bc	33.61 b	33.96 b	42.85 b	36.81 b	17.16	48.21 c
SK 656-2	52.03 b	52.40 bc	51.83 abc	23.85 ab	44.66 b	49.61 b	39.28 b	15.32	47.57 bc
$\bar{x}$	51.86	51.91	52.14	24.89	36.56	42.56	34.67	18.03	46.16
SE	0.435	0.625	1.553	2.484	2.489	2.488	1.482	1.364	0.891
HSD <sub>(0.05)</sub>	1.703	2.152	4.826	11.32	13.38	9.730	5.515	5.250	2.697

\* in each column, average values with the same letters are not significantly different according to HSD<sub>(0.05)</sub> (Tukey test)

LL = last leaf

NLL = next to last leaf

III. N content in leaves of winter wheat genotypes according to fertilization variants (field experiment)

Fertilization variant		11. 6. 1998		16. 6. 1998 abs. %	7. 7. 1998 abs. %		$\bar{x}$ from three terms (PL)	
Number	N, P (kg.ha <sup>-1</sup> )	abs. %	rel. %		LL	NLL	abs. %	rel. %
1	0/0	3.653 a*	100.0	3.558 a	1.563 a	1.123 a	2.910 a	100.0
5	30/20	3.919 ab	107.3	–	–	–	–	–
6	30/40	4.027 bc	110.2	3.847 a	2.366 b	1.737 b	3.413 b	117.3
8	60/20	4.118 bc	112.7	–	–	–	–	–
9	60/40	4.157 bcd	113.8	–	–	–	–	–
11	120/20	4.440 d	121.5	3.850 a	2.778 c	2.146 b	3.689 c	126.8
12	120/40	4.314 cd	118.1	–	–	–	–	–
$\bar{x}$ abs. %		4.090	–	3.738	2.236	1.669	3.338	–
$\bar{x}$ rel. %		100	–	91.4	54.7	40.8	81.6	–
SE		0.077	–	0.087	0.087	0.112	0.067	–
HSD <sub>(0.05)</sub>		0.343	–	0.585	0.405	0.428	0.203	–

\* in each column, average values with the same letters are not significantly different according to HSD<sub>(0.05)</sub> (Tukey test)

LL = last leaf

NLL = next to last leaf

SPAD value at N<sub>120</sub> nutrition treatment (21.13) than any other genotype at N<sub>0</sub> treatment. Also genotypes SK 679-18 with high SPAD meter readings 3 June (54.24) and with low 7 July (36.81) had different reactions in comparison to PS 19/94 genotype with the lowest SPAD value 3 June (49.50) and with the highest one 7 July (41.12).

N leaf content was determined in three terms in the last leaves and on 7 July separately for the last leaf and for the next to last leaf too (Tabs. III and IV). N leaf content was significantly affected by the term, fertilization, genotype and interaction term x N fertilization, term x genotype, but not genotype x N fertilization (Tabs. V, III and IV). Interaction genotype x N fertilization did not manifest at separate analysis neither on 11 June and nor on 7 July. Analysis of 7 July showed at significant interaction genotype x leaf (Tab. IV) and interaction N treatment x leaf (Tab. III). With increasing N doses the N content in the last leaves went up on

average over three terms from 2.910% at N<sub>0</sub> up to 3.689% at N<sub>120</sub>, i.e. to 126.7% but in the same order in the first term to 121.6%, in the second term to 109.6% but in the third term up to 177.6% (2.778/1.563) (Tab. III). The higher N doses, the lower decrease in N leaf content in a later term. While N leaf content in the third term went down in comparison to the first term, at N<sub>120</sub> only to 62.6%, but at N<sub>0</sub> up to 42.7%. P fertilization likewise in SPAD values (Tab. I) increased N leaf content at N<sub>30</sub> and N<sub>60</sub>, but decreased at N<sub>120</sub> treatment. N content in the next to last leaf was lower – 73% of the value of the last leaf, which is less than at SPAD value (Tabs. I and III).

Genotypes had different N dynamics although the interaction term x genotype was not significant probably for small number of observations (Tab. V). While in Ilona variety N leaf content in the fourth term dropped against the second term from 4.057% to 1.500%, i.e. to 36.92%, in genotype SK 656-2 from 4.068% to 2.482%,

IV. N content in leaves of winter wheat genotypes (field experiment)

Genotype	11. 6. 1998 abs. %	16. 6. 1998 abs. %	7. 7. 1998 abs. %		$\bar{x}$ abs. %
			LL	NLL	
Ilona	4.057 a*	3.753 a	1.500 a	1.737 a	3.121 a
PS 7/95	3.909 a	3.415 a	2.296 b	1.732 a	3.173 ab
PS 19/94	4.071 a	3.550 a	2.297 b	1.845 a	3.278 ab
SK 679-18	4.344 b	4.190 a	2.605 b	1.683 a	3.703 c
SK 656-2	4.068 a	3.783 a	2.482 b	1.445 a	3.412 d
$\bar{x}$	4.090	3.738	2.236	1.661	3.338
SE	0.065	0.151	0.126	0.144	0.087
HSD <sub>(0,05)</sub>	0.225	0.913	0.573	0.658	0.262

\* in each column, average values with the same letters are not significantly different according to HSD<sub>(0,05)</sub> (Tukey test)

LL = last leaf

NLL = next to last leaf

V. Mean squares values (MS) from analysis of variance of chlorophyll meter readings (SPAD) and N content in leaves of winter wheat genotypes (field experiment)

Source of variability	Degree of freedom	MS	
		SPAD	% N in leaves
A (terms)	2	1 489.5 <sup>++</sup>	13.999 <sup>++</sup>
B (fertilization)	2	311.84 <sup>++</sup>	2.339 <sup>++</sup>
C (genotype)	4	51.32 <sup>++</sup>	0.487 <sup>++</sup>
AB	4	76.03 <sup>++</sup>	0.265 <sup>+</sup>
AC	8	135.89 <sup>++</sup>	0.219 <sup>+</sup>
BC	8	21.46 <sup>++</sup>	0.076
Error	16	7.28	0.068
Total	44		

i.e. only to 61% although both genotypes had the same N leaf content on 11 July (Tab. IV), which was similar to the dynamics of SPAD values (Tab. II).

In comparable growth stages the SPAD values as well as N leaf content in the pot experiment in a growth chamber were higher (Tab. VI) than in the field experiment (Tabs. I and II). Genotype SK 679-18, which had the highest SPAD and N leaf values (Tabs. II a IV) also in the field experiment, had the highest SPAD values and N content in grain. Ilona variety had the lowest N leaf content and SPAD values (Tabs. II, IV, VI) in both experiments in the last term.

In the field experiment correlation between SPAD values and N leaf content (Tab. VII) was conditioned by the model. If variability depended on factors N fertilization x genotype x replication (M1), the correlation was medium strong ( $r = 0.644^{++}$ ), by elimination of replication as a variability source the value of correlation coefficient went up to  $r = 0.764^{++}$  and the elimination of genotype as another variability factor increased its value up to  $r = 0.975^{++}$  conditioned only by fertilization. The last correlation was highly reliable since 300 measurements were taken for each fertilization treatment (Tab. VII). Strong correlations were on

7 July in the last leaf ( $r = 0.925^{++}$ ) despite the fact that the SPAD values were very low in that period and there was a high experimental error as a result of non-uniform leaf yellowing.

The correlation between N leaf content and N dose in  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (Tab. VII) was also conditioned by more factors: N fertilization, genotype and replication. By factor elimination as a source of variability the value of correlation coefficients went up from  $r = 0.650^{++}$  through  $r = 0.755^{++}$  up to  $r = 0.952^{++}$  dependent only on N fertilization. The N content in wheat leaves was therefore a good indicator of amount of N supplied to the soil. The regression coefficient reached high values  $b = 51.8^{++}$  to  $167.9^{++}$  ( $\text{kg}\cdot\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$  per 1% N leaf content) (Tab. VII), which indicates that high accuracy is required for preparing leaf samples for N determination or leaf N determination for eventual prediction.

The correlation between SPAD values and N dose in  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (Tab. VII) at the beginning of June for five fertilization treatments which range from 0 to  $120\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  was medium strong ( $r = 0.741^{++}$ ). In other term (11 June) five fertilization treatments had similar range of N doses (0 to  $120\text{ kg}\cdot\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), although number of SPAD meter readings was higher (Tab. VII), the results for M2 model were comparable ( $r = 0.741^{++}$  and  $r = 0.592^{++}$ ), obviously due to the fact that variability conditioned by genotype was higher than variability conditioned by replication.

The values of regression coefficients varied from  $2.31^{+}$  to  $23.79^{++}$  ( $\text{kg}\cdot\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$  per SPAD unit) in M3 model, which is acceptable for prediction in range of SPAD values of approx. 5 units.

The correlations between SPAD values and N grain content (Tab. VIII) were positive from the beginning of June (beginning of a boot stage) to the time before milk ripeness (7 July) and were comparable with relations between N leaf content and N grain content (Tab. VIII), but in milk ripeness (7 July) there were positive correlations between N leaf content and N grain content, but not between SPAD values and N grain content. Weak and variable correlations were between SPAD values

## VI. N content and chlorophyll meter readings (SPAD) in last leaf of winter wheat genotypes (pot experiment)

Factor		SPAD			N in leaves (%)			N (%)	
		28. 1.	15. 2.	3. 3.	28. 1.	15. 2.	3. 3.	grain	straw
Genotype	Ilona	52.35 a*	54.40 a	31.48 a	4.421 a	3.865 a	2.058 a	2.598 a	0.688 a
	PS 19/94	56.70 c	56.27 b	35.38 b	4.408 a	4.026 a	2.245 ab	2.706 a	0.746 a
	SK 679-18	57.19 c	60.17 d	53.72 d	4.638 a	4.151 a	2.918 d	2.788 a	0.897 a
	SK 656-2	53.66 b	56.74 b	50.94 c	4.551 a	4.240 a	2.823 cd	3.275 a	0.786 a
	SO 1441	56.96 c	58.66 c	36.20 b	4.557 a	4.280 a	2.475 bc	2.905 a	0.860 a
	SE	0.263	0.274	0.670	0.079	0.140	0.081	0.165	0.052
	<i>HSD</i> <sub>(0,05)</sub>	0.928	1.050	2.507	0.349	0.557	0.378	0.780	0.261
Fertilization	N <sub>0</sub>	55.68 b	56.18 a	34.19 a	4.339 a	3.888 a	2.199 a	2.779 a	0.725 a
	N <sub>40</sub>	55.07 a	58.33 b	49.02 b	4.690 b	4.337 b	2.817 b	2.930 a	0.866 b
	SE	0.166	0.173	0.470	0.050	0.088	0.051	0.104	0.033
	<i>HSD</i> <sub>(0,05)</sub>	0.429	0.476	1.126	0.153	0.244	0.166	0.343	0.114
	$\bar{x}$	55.37	57.25	41.54	4.515	4.112	2.504	2.854	0.796

\* in each column, average values with the same letters are not significantly different according to *HSD*<sub>(0,05)</sub> (Tukey test)

 VII. Relationships among N content and chlorophyll meter readings in leaves of winter wheat genotypes and N dosage in kg.ha<sup>-1</sup> (field experiment)

Model	Dated	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	SEE
Chlorophyll meter readings in leaves (x) x % N in leaves (y)						
M1 = N(7) x G(5) x R (2)	11. 6.	30	70	0.073 <sup>+</sup>	0.644 <sup>++</sup>	0.271
M2 = N(7) x G(5)	11. 6.	60	35	0.087 <sup>+</sup>	0.764 <sup>++</sup>	0.200
M3 = N(7)	11. 6.	300	7	0.140 <sup>++</sup>	0.975 <sup>++</sup>	0.063
M2 (LL) = N(3) x G(5)	7. 7.	30	15	0.050 <sup>++</sup>	0.925 <sup>++</sup>	0.271
N content in leaves (x) x N kg.ha <sup>-1</sup> (y)						
M1 = N(7) x G(5) x R(2)	11. 6.	1	70	78.74 <sup>++</sup>	0.650 <sup>++</sup>	32.6
M2 = N(7) x G(5)	11. 6.	2	35	106.3 <sup>++</sup>	0.755 <sup>++</sup>	28.6
M3 = N(7)	11. 6.	10	7	167.9 <sup>++</sup>	0.952 <sup>++</sup>	15.2
M2 (LL) = N(3) x G(5)	7. 7.	1	15	51.8 <sup>++</sup>	0.677 <sup>++</sup>	40.28
Chlorophyll meter readings in leaves (x) x N kg.ha <sup>-1</sup> (y)						
M2 = N(5) x G(5)	3. 6.	30	25	13.73 <sup>++</sup>	0.741 <sup>++</sup>	35.09
M1 = N(7) x G(5) x R(2)	11. 6.	30	70	7.07 <sup>++</sup>	0.511 <sup>++</sup>	36.99
M2 = N(7) x G(5)	11. 6.	60	35	9.51 <sup>++</sup>	0.592 <sup>++</sup>	35.18
M3 = N(7)	11. 6.	300	7	23.79 <sup>++</sup>	0.937 <sup>++</sup>	17.43
M2 (LL) = N(3) x G(5)	7. 7.	30	15	2.31 <sup>+</sup>	0.546 <sup>+</sup>	45.88

*m* = total number of measurements of (x) variable (SPAD) or analysis number (N content in leaves) per calculation unit *n<sub>i</sub>*

*n* = extent of set for calculation *r* and *b*

LL = last leaf

NLL = next to last leaf

M1 = model with factors: fertilization (N) x genotype (G) x replication (R)

M2 = model with factors: fertilization (N) x genotype (G)

M3 = model with factor: fertilization (N)

Index at N, G, R shows number of treatments of factor

and N leaf content on one hand and grain yield on the other hand, which is not unexpected with regard to a series of factors influencing yields.

Interesting relations were between the mentioned traits in case of their variability conditioned genotypically (Tab. VIII). SPAD values as well as N leaf content had been in a positive correlation with N grain content

till milk ripeness but in the phase of milk ripeness the relations were negative. The results show, that the genotypes with high N grain content had high chlorophyll (SPAD) and N content also in leaves up to the milk ripeness and they probably were the genotypes that intensively redistributed N from leaves to grains, which was later in milk ripeness manifested in negative

VIII. Relationships among chlorophyll meter readings (SPAD) ( $x_1$ ), N content in leaves ( $x_2$ ), N content in grain ( $y_1$ ) and grain yield of winter wheat genotypes ( $y_2$ ) (field experiment)

Variable	Term	Variability conditioned by			
		genotype x fertilization ( $n = 15$ )		genotype ( $n = 5$ )	
		% N in grain ( $y_1$ )	grain yield ( $y_2$ )	% N in grain ( $y_1$ )	grain yield ( $y_2$ )
SPAD ( $x_1$ )	3. 6.	0.684 <sup>++</sup>	0.055	0.847	-0.636
	11. 6.	0.753 <sup>++</sup>	0.097	0.876 <sup>+</sup>	-0.771
	16. 6.	0.786 <sup>++</sup>	-0.072	0.846	-0.883 <sup>+</sup>
	LL 7. 7.	0.284	0.829 <sup>++</sup>	-0.655	0.884 <sup>+</sup>
	NLL 7. 7.	0.058	0.594 <sup>+</sup>	-0.950 <sup>++</sup>	0.741
% N v leaves ( $x_2$ )	11. 6.	0.859 <sup>++</sup>	0.329	0.515	-0.409
	16. 6.	0.421	0.005	0.682	-0.679
	LL 7. 7.	0.519 <sup>++</sup>	0.620 <sup>+</sup>	-0.294	0.632
	NLL 7. 7.	0.641 <sup>++</sup>	0.795 <sup>++</sup>	-0.643	0.119
	N (kg.ha <sup>-1</sup> )	0.698 <sup>++</sup>	0.483 <sup>+</sup>	-	-

LL = last leaf

NLL = next to last leaf

IX. Genotypic correlation between N content in leaves and chlorophyll meter readings (SPAD) ( $n = 5$ ) (pot experiment)

Trait	SPAD			N in leaves			N	
	28. 1.	15. 2.	3. 3.	28. 1.	15. 2.	3. 3.	in grain	in straw
SPAD 28. 1.		0.777	0.179	0.400	0.581	0.289	0.036	0.760
SPAD 15. 2.			0.697	0.866 <sup>++</sup>	0.712	0.771	0.231	0.992 <sup>++</sup>
SPAD 3. 3.				0.843	0.621	0.982 <sup>++</sup>	0.624	0.696
N in leaves 28. 1.					0.736	0.908 <sup>+</sup>	0.496	0.897 <sup>+</sup>
N in leaves 15. 2.						0.746	0.771	0.777
N in leaves 3. 3.							0.677	0.787

correlation between SPAD values and N content in leaves in milk ripeness on one hand and N content in grain in technological ripeness on the other hand. Trends of correlations of SPAD values and N content in leaves to grain yield were absolutely opposite, according to growth stage negative correlations to milk ripeness and positive in time of milk ripeness, i.e. the fertile genotype had low SPAD values and N content in leaves till milk ripeness and high in the time of milk ripeness.

Likewise in the field experiment, in the pot experiment there were found strong correlations between SPAD values and N content in leaves, and they increased with the growth stage ( $r = 0.400, 0.712, 0.982^{++}$ , Tab. IX). N content in straw was in equally strong correlation with SPAD value gradually in three terms mentioned above ( $r = 0.760, 0.992^{++}, 0.696$ ) and also with N leaf content ( $r = 0.897^{+}, 0.777, 0.787$ ), but N grain content was in a closer relation with N leaf content ( $r = 0.496, 0.771, 0.677$ ) than with SPAD value ( $r = 0.036, 0.231, 0.624$ ).

## DISCUSSION

N fertilization positively affected N leaf content and SPAD values in every growth stage but in early growth stage, when a correction of nutrition could be done, the

differences between N treatments in SPAD values were lower than in later stages, what corresponds with the data Reeves et al. (1993) stating that yield prediction by N or chlorophyll content in early growth stages (GS 25) was ineffective.

In the genotype set great differences were found between genotypes in the values of N leaf status and SPAD values. Genotypical differences in SPAD values are probably general since they were found not only in wheat (Araus, 1995; Hoel, 1998) but also in barley (Užik et al., 1999), and in maize (Sunderman et al., 1997) and rice (Ladha et al., 1998), which indicate possible use of SPAD parameter in selection for better N utilization as suggested by Ladha et al. (1998) in rice, or also for tolerance to drought stress (Faniza et al., 1991).

Correlations between N leaf content and SPAD value were depended on N fertilization, genotype and sampling leaves for their determination. In case, that N variability in leaves and SPAD value is conditioned by differentiated N fertilization doses, then not only relations between N leaf content and SPAD value but also both of them to N fertilization (kg.ha<sup>-1</sup>) were very strong, what was observed not only in wheat (Hoel, 1998), but also in tobacco (Schepers et al., 1992; MacKown, Sutton, 1998). The results show, that N state prediction in soil according to N leaf or SPAD values

can be done with the same reliability by means of both, but the determination of SPAD values by chlorophyll meter Minolta-SPAD 502 is substantially cheaper and more expeditious.

In spite of the above mentioned strong relations in simulated environment and reliable prediction of N content in soil or N state in a plant by SPAD value it is not possible to apply such prediction in other environment because regression parameters differ for individual genotypes and growth stages and/or environment. It is recommended to use N sufficiency index (NSI) for correction of plant N status by fertilization using SPAD values. NSI is the ratio of SPAD values from stand which should be additionally fertilized to SPAD values from stand that is sufficiently, optimally or not-limiting fertilized by N fertilizer (Piekielek et al., 1995; Wienhold, Krupinsky, 1999).

## REFERENCES

- Araus J. (1995): Germplasm program cereals. Ann. Rep. ICARDA, Syria.
- Blackmer T. M., Schepers J. S., Vigil M. F. (1993): Chlorophyll meter readings in corn as affected by plant spacing. Commun. Soil. Sci. Pl. Anal., 24: 2507–2516.
- Evans J. T. (1983): Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat. Pl. Physiol., 72: 297–302.
- Faniza G., Ricciardi L., Bagnulo C. (1991): Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vinifera*. Euphytica, 55: 27–31.
- Hoel B. O. (1998): Use of a hand-held chlorophyll meter in winter wheat: Evaluation of different measuring positions on the leaves. Acta Agric. Scand. Sect. B, Soil Pl. Sci., 48: 222–228.
- Ladha J. K., Padre A. T. et al. (1998): Non-destructive estimation of shoot nitrogen in different rice genotypes. Agron. J., 90: 33–40.
- MacKown Ch., Sutton G. T. (1998): Using early-season leaf traits to predict nitrogen sufficiency of burley tobacco. Agron. J., 90: 21–27.
- Peterson T. A., Blackmer T. M., Francis D. D., Schepers J. S. (1993): Using a chlorophyll meter to improve N management. Nebguide G93-1171A. Coop. Ext. Serv. Univ. Nebraska, Lincoln.
- Piekielek W. P., Fox R. H., Toth J. D., Macneal K. E. (1995): Use of a chlorophyll meter at the early dent stage of corn to evaluate nitrogen sufficiency. Agron. J., 87: 403–408.
- Reeves D. W., Mask P. L., Wood W., Delancy D. P. (1993): Determination of wheat nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter: influence of management practices. J. Pl. Nutr., 16: 781–796.
- Schepers J. S., Blackmer T. M., Francis D. D. (1998): Chlorophyll meter method for estimating nitrogen content in plant tissue. In: Kalra Y. P.: Handbook of reference methods for plant analysis. Boca Raton, CRC Press: 129–135.
- Schepers J. S., Francis D. D., Vigil M., Below F. E. (1992): Comparison of corn leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings. Commun. Soil Sci. Pl. Anal., 23: 2173–2187.
- Shapiro C. A. (1999): Using a chlorophyll meter to manage nitrogen applications to corn with high nitrate irrigation water. Commun. Soil Sci. Pl. Anal., 30: 1037–1049.
- Sunderman H. D., Pontius J. S., Lawless J. R. (1997): Variability in leaf chlorophyll concentration among fully-fertilized corn hybrids. Commun. Soil Sci. Pl. Anal., 28: 1793–1803.
- Užík M., Žofajová A., Bieliková M. (1999): Variabilita obsahu chlorofylu (SPAD) a dusíka v listoch odrôd jarného jačmeňa. Ved. Práce VÚRV Piešťany, 29: 83–92.
- Wienhold B. J., Krupinsky J. M. (1999): Chlorophyll meter as nitrogen management tool in malting barley. Commun. Soil Sci. Pl. Anal., 30: 2551–2562.
- Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F. (1974): A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Res., 14: 415–421.

Received on November 12, 1999

---

Corresponding author:

Doc. Ing. Martin Užík, DrSc., Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, tel.: +421 838 772 23 11, fax: +421 838 772 63 06, e-mail: vuvr@vuvr.sk

---

# PREDIKCE ZIMOVZDORNOSTI PŠENICE SETÉ POMOCÍ GLIADINOVÝCH GENETICKÝCH MARKERŮ

## FROST-HARDINESS PREDICTION OF COMMON WHEAT USING GLIADIN GENETIC MARKERS

A. Šašek<sup>1</sup>, P. Prášilová<sup>1</sup>, J. Černý<sup>2</sup>, I. Prášil<sup>1</sup>, S. Skupinová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyně, Czech Republic

<sup>2</sup>Czech University of Agriculture in Prague, Czech Republic

**ABSTRACT:** Parallel determination of frost-hardiness and gliadin signal genes – frost-hardiness markers was used to evaluate 212 varieties of world assortment of winter wheat varieties. Frost-hardiness was expressed in resistance classes I (lowest resistance) to VI (highest resistance). Allelic gliadin blocks (Gld) determined by starch electrophoresis were evaluated for different loci 1-1A, 1-2A, 1B, 1D, 6A, 6B and 6D. The value of frost-hardiness prediction of alleles of gliadin loci was determined by their representation in different classes of frost-hardiness. Using  $\chi^2$ -test, determination of coefficients of association and closeness of relationship between the degree of freedom and representation of gliadin alleles classification of gliadin genes – frost-hardiness markers was innovated. The highest marking value was proved for Gld 1D5 and Gld 6A3. Gld 6D2 and newly also Gld 1B1 and Gld 6A1 can be considered as secondary markers. Marking efficiency of Gld 1-1A2 was not proved and occurrence of alleles Gld 6A2, Gld 2-1A0, Gld 1B4 and Gld 1B5 was rather connected with classes of lower frost-hardiness. Highly significant correlation ( $r = 0.86$ ) was proved between the total production capacity of different allelic gliadin genes of evaluated varieties and degree of resistance to winter killing.

**Keywords:** winter wheat; winter killing; gliadin markers of frost-hardiness; electrophoresis in starch gel

**ABSTRAKT:** Souběžným stanovením zimovzdornosti a gliadinových signálních genů – markerů zimovzdornosti bylo hodnoceno 212 odrůd světového sortimentu ozimé pšenice. Zimovzdornost byla vyjádřena ve třídách odolnosti I (nejnižší odolnost) až VI (nejvyšší odolnost). Alelické gliadinové bloky (Gld) stanovené škrobovou elektroforézou byly hodnoceny pro jednotlivé lokusy 1-1A, 1-2A, 1B, 1D, 6A, 6B a 6D. Hodnota predikce zimovzdornosti alel gliadinových lokusů byla určena jejich zastoupením v jednotlivých třídách zimovzdornosti. Pomocí  $\chi^2$ -testu, stanovením koeficientů asociace a těsnosti vztahu mezi stupněm odolnosti a zastoupením gliadinových alel byla inovována klasifikace gliadinových genů – markerů zimovzdornosti. Nejvyšší markerovací hodnota byla prokázána pro Gld 1D5 a Gld 6A3. Za vedlejší marker zimovzdornosti lze považovat Gld 6D2 a nově i Gld 1B1 a Gld 6A1. Nebyla prokázána markerovací účinnost Gld 1-1A2 a výskyt alel Gld 6A2, Gld 2-1A0, Gld 1B4 a Gld 1B5 souvisel spíše s třídami nižší zimovzdornosti. Mezi celkovou predikční schopností jednotlivých alelických gliadinových genů hodnocených odrůd a stupněm odolnosti k vyzimování byl prokázán výsoce významný korelační vztah ( $r = 0,86$ ).

**Klíčová slova:** ozimá pšenice; vyzimování; gliadinové markery zimovzdornosti; elektroforéza v škrobovém gelu

### ÚVOD

Některé alely gliadinových genů pšenice seté markerují zimovzdornost (Sozinov, Popereľja, 1979). Tyto signální geny se dají použít v programech tvorby nových odrůd pšenice seté s požadovanou úrovní zimovzdornosti (Šašek et al., 1984).

Bodové hodnoty predikce zimovzdornosti gliadinových alel – markerů zimovzdornosti byly ověřovány korelační analýzou, hodnotící vztah mezi stupni odolnosti (Prášil et al., 1994) a predikčními bodovými hodnotami gliadinových markerů (Černý et al., 1990; Černý et al., 1999).

Registrace nových odrůd pšenice seté včetně zahraničních odrůd vyžaduje periodické hodnocení uvedeně-

ho korelačního vztahu. Hodnotu predikce zimovzdornosti může rovněž ovlivňovat velikost a genetická různorodost pokusných souborů.

Cílem práce bylo ověření stávajících predikčních hodnot zimovzdornosti gliadinových genů souběžnou analýzou zimovzdornosti a elektroforetickou analýzou gliadinů 212 odrůd světového sortimentu pšenice.

### MATERIÁL A METODY

Hodnocené odrůdy ozimé pšenice, včetně jejich původu, stupně odolnosti (SO) – test zimovzdornosti a včetně elektroforetické skladby gliadinů (elektroforetická analýza) jsou charakterizovány v tab. I.

I. Soubor alel gliadinových genů (lokusů) jednotlivých hodnocených odrůd a stupně odolnosti vůči vyzimování – Set of alleles of gliadin genes (loci) of different evaluated varieties and degree of resistance to winter killing

Jméno odrůdy <sup>1</sup>	Země původu <sup>2</sup>	Stupeň odolnosti <sup>3</sup>	Gld alely na chromozomu <sup>4</sup>						
			1-1A	2-1A	1B	1D	6A	6B	6D
Abolikir	FRA	1	13	3	4	(2)	2	3	8
Lodi	FRA	1	13	0	4	1	2	N6	1
Kobold	DEU	1	9	0	1	1	N2	(2)	1
Maris Freeman	GBR	1	10	(0)	1	8	N1	1	6
Brock	GBR	1	4	3	4	(2)	2	1	4
Rendezvous	GBR	2	4	1	5	1	2	(2)	6
Galahad	GBR	2	2	0	4	1	2	1	N4
Xanthos	DEU	2	4	0	4	(9)	2	2	1
Lonja	YUG	2	4	3	4	N2	2	1	1
Brimstone	GBR	2	9	0	4	2	2	1	1
Hereward	GBR	2	4	0	4	1	N1	1	6
Moulin	GBR	2	4	0	4	(9)	2	1	(7)
Zagrebcanka	YUG	2	4	3	4	2	2	1	(1)
Sarno	NLD	2	14	2	2	1	(2)	N1	5
Riband	GBR	2	2	0	4	1	N1	1	1
Baranjka	YUG	3	4	3	4	3	2	1	1
Carolus	DEU	3	9	2	4	4	N1	N1	(2)
Contra	DEU	3	4	0	4	1	N1	1	1
Petrel	FRA	3	(9)	0	3	2	(1)	N6	4
Albatros	FRA	3	2	0	4	1	2	2	N14
Athlet	DEU	3	10	2	3	8	N2	N16	N15
Biserka	YUG	3	2	2	2	1	1	(2)	1
Granit	AUT	3	10	1	8	(2)	N1	1	6
Lambros	DEU	3	4	0	4	1	2	N8	5
Botri	DEU	3	2	3	4	8	2	1	5
Junior	FRA	3	9	0	4	1	1	2	1
Ortler	DEU	3	10	0	4	1	(2)	1	1
Flevina	NLD	3	2	0	1	1	2	1	6
Jaguar	DEU	3	2	0	5	8	2	1	6
Sava	YUG	3	0	3	4	(N2)	2	(1)	1
Gk Oethalom	HUN	3	7	0	1	7	2	1	1
Kiten	BGR	3	0	(3)	1	1	2	3	1
Talent	FRA	3	9	2	4	(2)	2	2	N1
Willi	DEU	3	(2)	(0)	4	1	(2)	1	1
Zvezda	YUG	3	4	0	3	(2)	2	1	1
Advokat	DEU	3	9	2	3	1	N1	2	1
Maris Fundin	GBR	3	2	0	4	(2)	(2)	N5	6
Jawa	POL	3	9	2	4	1	2	N1	5
Marijana	YUG	3	6	0	1	7	N2	1	1
Moisson	FRA	3	2	0	4	1	2	1	N1
Prestige	FRA	3	2	0	4	1	(2)	1	4
Super zlatna	YUG	3	4	3	4	3	2	1	(1)
Beaver	GBR	3	4	0	3	1	N1	1	4
Bert	GBR	3	9	0	4	1	2	2	1
Georg	AUT	3	9	2	4	(1)	2	1	1
Longbow	GBR	3	2	3	4	8	2	N5	6
Magister	NLD	3	3	0	3	1	2	N8	N1
Tabor	DEU	3	2	0	4	1	N1	1	4
Granta	GBR	4	9	0	4	8	2	1	4

Pokračování tab. 1 – Continuation of Tab. 1

Jméno odrůdy <sup>1</sup>	Země původu <sup>2</sup>	Stupeň odolnosti <sup>3</sup>	Gld alely na chromozomu <sup>4</sup>						
			1-1A	2-1A	1B	1D	6A	6B	6D
Manella	NLD	4	3	3	4	(1)	2	1	4
Maris Marksman	GBR	4	4	0	4	(1)	2	2	1
Rabe	DEU	4	0	3	4	7*	N2	1	6
Brigand	GBR	4	9	0	4	1	2	N1	N4
Primus	AUT	4	9	2	4	8	2	1	4
Rescler	FRA	4	3	0	1	1	2	N6	2
Sanja	YUG	4	4	3	4	3	2	1	1
Brokat	AUT	4	2	0	1	1	2	1	1
Citadel	NLD	4	3	3	4	(1)	(2)	1	6
Futur	DEU	4	9	0	4	1	N1	1	2
Konsul	SWE	4	9	0	4	1	2	1	4
Ritmo	NLD	4	4	0	4	9	2	2	2
Mega	GBR	4	1	1	13	1*	2	1	4
Rapier	GBR	4	9	0	4	1	2	1	1
Bovictus	DEU	4	3	0	3	1	2	1	6
Mamut	POL	4	2	0	3	1	2	1	6
Amandus	DEU	4	4	0	4	8	2	2	1
Jantar	BGR	4	3	3	1	7	N1	1	2
Recital	FRA	4	2	0	4	1	2	1	6
Skorospelka (35)	SUN	4	(4)	3	3	(2)	1	1	1
Sperber	DEU	4	N5	0	4	8	2	1	4
Clement	NLD	4	3	0	3	9	2	N1	5
Heines VII	DEU	4	2	0	4	1	2	1	6
Compal	DEU	4	8	3	4	7	2	1	1
Maris Durin	GBR	4	4	0	4	1	2	1	N1
Merkur	DEU	4	2	0	3	(2)	2	1	6
Rannaja 12	SUN	4	4	2	2	1	1	1	1
Skittija	BGR	4	4	0	4	9	2	1	1
Apollo	DEU	4	2	0	3	1	N1	N1	4
Aquila	GBR	4	2	2	4	1	N1	1	4
Caprimus	DEU	5	9	0	4	1	2	N1	6
Florida 302	USA	5	15	0	4	1	N1	1	2
Jubilar	DEU	5	9	2	4	1	N2	1	6
Oberst	DEU	5	9	0	4	1	3	1	4
Maris Nimrod	GBR	5	10	0	1	1	2	1	6
Pagode	NLD	5	10	2	4	1	2	1	2
Rota	POL	5	2	2	1	1	2	1	1
Eros	DEU	5	1	0	1	8	N2	1	(5)
Fanal	DEU	5	2	0	4	8	N1	N13	5
Poros	DEU	5	9	2	1	N1	2	1	1
Portal	DEU	5	13	2	4	1	2	1	6
Estica	NLD	5	9	2	4	1	2	N12	1
Kraka	DNK	5	2	2	4	8	N1	1	4
Taw 9790/76	DEU	5	13	0	1	(3)	3	1	1
Zlatna dolina	YUG	5	4	3	4	3	2	1	1
Florian	DEU	5	2	0	4	1	N1	1	6
Maris Huntsman	GBR	5	9	0	4	(1)	2	1	7
Taw 12399/75	DEU	5	N7	0	3	2	3	(1)	N2
Bocquiau	FRA	5	2	2	2	2	2	1	4
Fakta	DEU	5	3	(0)	1	1	2	1	4

Jméno odrůdy <sup>1</sup>	Země původu <sup>2</sup>	Stupeň odolnosti <sup>3</sup>	Gld alely na chromozomu <sup>4</sup>						
			1-1A	2-1A	1B	1D	6A	6B	6D
Kanzler	DEU	5	9	0	4	1	N2	3	6
Peresvet	SUN	5	(4)	0	1	1	(2)	1	1
Rector	DEU	5	2	0	4	1	2	1	6
Fregatt	DEU	5	2	0	4	1	N1	1	2
Modra	POL	5	2	0	4	1	2	1	4
Parada	POL	5	10	0	1	9	2	1	1
Tukan	DEU	5	2	2	4	2	N1	N4	1
Almus	DEU	5	10	0	3	2	3	1	4
Aaron	BEL	5	14	2	4	5	N1	1	1
Heima	FRA	5	2	0	1	1	2	1	6
Maris Templar	GBR	5	2	0	4	(2)	2	1	2
Martin	AUT	5	2	0	4	1	2	1	4
Trakija	BGR	5	4	0	1	1	2	1	1
Ibis	NLD	5	2	2	4	1	3	N1	1
Ikarus	AUT	5	9	(1)	3	2	3	1	1
Ares	FRA	5	2	0	4	8	3	1	6
Gk Oerzse	HUN	5	0	3	4	1	2	1	6
Mina	BEL	5	8	2	4	1	(3)	1	8
Nadeznaja 45	SUN	5	4	1	1	(1)	1	1	(2)
Obelisk	NLD	5	3	3	4	1	2	1	5
Pantus	DEU	5	4	0	3	8	2	2	1
Saturn	DEU	5	2	0	4	1	2	1	6
Florida	DEU	6	9	0	3	1	3	1	4
Granada	DEU	6	10	2	(3)	1	N1	1	2
Milan	DEU	6	9	0	4	1	N1	1	4
Obrij	SUN	6	4	1	(1)	N5	3	1	3
Olymp	DEU	6	9	(3)	3	1	N1	2	1
Stella	USA	6	10	0	4	(N1)	2	N1	1
Dolomit	DEU	6	2	0	4	1	2	1	6
Falke	DEU	6	4	2	5	1	N1	1	N10
Jana	POL	6	(14)	2 + 3	4	1	2	1	6
Elpa	DEU	6	N3	(3)	4	1	3	2	1
Maris Beacon	GBR	6	9	0	4	1	2	1	6
Mib 3388/72	POL	6	10	0	3	2	2	1	1
Taras	DEU	6	(14)	2	5	(2)	(3)	1	1
Urban	DEU	6	9	2	4	8	N2	2	6
Benno	DEU	6	10	0	3	1	2	1	6
Etoile de Choisy	FRA	6	2	0	9	2	2	N2	1
Kormoran	DEU	6	2	0	4	1	N2	1	4
Lan	SUN	6	2	0	1	1	3	2	1
Mironovskaja 60	SUN	6	2	0	1	(8)	3	2	1
Okapi	NLD	6	9	0	4	1	N1	1	4
Arkos	DEU	6	2	2	5	8	(3)	1	5
Atlantis	DEU	6	9	0	3	1	3	1	1
Aurus	AUT	6	2	0	3	2	2	1	(4)
Pokal	AUT	6	9	0	4	8	2	2	N14
Promin	SUN	6	(3)	1	1	9	3	1	(1)
Tadorna	DEU	6	(6)	2	4	(8)	(3)	(1)	6
Borenos	DEU	6	14	3	5	5	3	1	1
Heinrich	DEU	6	9	0	3	(1)	N1	1	4

Jméno odrůdy <sup>1</sup>	Země původu <sup>2</sup>	Stupeň odolnosti <sup>3</sup>	Gld alely na chromozomu <sup>4</sup>						
			1-1A	2-1A	1B	1D	6A	6B	6D
Herzog	DEU	6	2	0	3	1	3	N15	4
Houser	USA	6	4	2 + 3	14	N2	2	1	6
Kniish 403	SUN	6	4	0	4	N2	1	1	6
Polesskaja 70	SUN	6	4	0	4	(9)	1	1	1
Alcedo	DEU	6	2	2 + 3	5	7	3	1	6
Emika	POL	6	3	2	4	5	2	1	1
Gama	POL	6	3	3	4	5	2	1	6
Salwa	POL	6	2	2	4	1	2	1	1
Bussard	DEU	6	9	0	4	9	3	2	6
Dnepropetrovskaja 521	SUN	6	1	0	2	(9)	2	1	1
Kontrast	DEU	6	0	(2)	5	3	3	1	7
Linna	FIN	6	9	0	1	9	2	1	6
Duellant	DEU	6	2	0	N1	7	N1	1	1
Fundulea 29	ROM	6	15	0	3	2	1	1	1
Juznaja zarja	SUN	6	4	0	1	1	3	1	1
Vuka	DEU	6	10	0	4	1	N1	1	(1)
Fakon	DEU	6	10	1	5	8	2	1	2
Fundulea 4	ROM	6	3	(0)	3	1	3	1	6
Charkovskaja 63	SUN	6	4	1	1	5	3	1	1
Kavkaz	SUN	6	4	(3)	3	2	1	1	1
Lovrin 13	ROM	6	4	3	3	(1)	1	1	1
Walde	SWE	6	9	2	4	1*	2	3	N6
Krasnodarskaja 46	SUN	7	4	(1)	1	5	1	1	1
Mironovskaja ulucsenaja	SUN	7	3	3	1	(5)	(3)	1	2
Taw 25880/71	DEU	7	3	1	3	(2)	1	1	1
Banija	YUG	7	4	1	1	(2)	2	1	1
Liwilla	POL	7	2	0	4	8	(2)	1	5
Mironovskaja 10	SUN	7	3	(3)	3	5	1	1	1
Aurora	SUN	7	3	0	3	2	1	1	6
Odesskaja polukarlikovaja	SUN	7	4	1	1	(5)	1	1	2
Perlo	AUT	7	4	0	4	(9)	1	1	1
Solid	SWE	7	2	3	9	1	3	1	1
Jakor odesskij	SUN	7	4	3	1	4	3	1	2
Disponent	DEU	7	10	0	3	1	2	1	1
Fundulea 133	ROM	7	2	(2)	4	(2)	3	1	7
Leopold	AUT	7	14	0	1	5	2	N5	1
Norstar	CAN	7	9	0	3	4	2	1	1
Alidos	DEU	7	2	2	4	8	3	1	1
Iljicovka	SUN	7	3	1	1	1	1	1	1
Priboj	SUN	7	2	0	1	(2)	3	2	1
Bezostaja 1	SUN	7	4	1	1	(2)	1	1	1
Knirps	DEU	7	2	0	3	1	3	N1	5
Odesskaja 66	SUN	7	4	1	3	1	3	2	1
Olympija	SUN	7	4	1	1	N2	3	1	1
Miras	DEU	7	3	3	1	5	3	1	2
Prikubanskaja	SUN	7	6	(1)	1	3	1	1	1
Zentos	DEU	7	3	2 + 3	4	5	3	1	4
Eritrospermum 1034/79	SUN	7	0	0	1	2	3	2	1
Ebi	DEU	7	2	0	4	1	3	N1	6
Martonvasari 16	HUN	8	1	0	3	1	1	1	5

Jméno odrůdy <sup>1</sup>	Země původu <sup>2</sup>	Stupeň odolnosti <sup>3</sup>	Gld alely na chromozomu <sup>4</sup>						
			1-1A	2-1A	1B	1D	6A	6B	6D
Mironovskaja nizkorostla	SUN	8	3	3	3	5	3	1	1
Mironovskaja jubilejna 50	SUN	8	12	(1)	1	5	3	1	2
Bezostaja 2	SUN	8	4	(1)	3	(2)	1	1	1
Mironovskaja 808	SUN	8	3	(3)	1	5	3	1	2
Kosack	SWE	8	5	2	4	1	1	1	1
Odesskaja 75	SUN	8	4	1	1	9	3	N2	1
Ivanovskaja 12	SUN	8	4	1	1	1	1	1	1
Achtjrcanka	SUN	8	4	(1)	1	(1)	(3)	1	2
Gk Bence	HUN	8	(3)	3	3	(2)	2	1	1
Polukarlikovaja 49	SUN	8	4	1	1	(5)	(3)	1	2
Odesskaja 95	SUN	8	4	1	1	(5)	3	2	1
Ramiro	DEU	8	3	1	1	7	3	1	2
Wariga	USA	8	4	1	1	4	3	1	3
Oasis	USA	8	3	2 + 3	4	1	3	1	2
Tam W-105	USA	8	3	1	1	5	1	1	1
Donskaja bezostaja	SUN	8	3	1	1	5	3	1	2
Tarasovskaja 29	SUN	9	4	0	1	5	3	1	1
Lgovskaja 77	SUN	9	3	1	1	5	3	1	2
Mikon	DEU	9	3	3	1	8	3	1	2
Mironovskaja 26	SUN	9	4	0	3	5	3	1	1

<sup>1</sup>name of variety, <sup>2</sup>country of origin, <sup>3</sup>degree of resistance, <sup>4</sup>Gld allele on chromosome

II. Součty bodových hodnot predikce zimovzdornosti Gld alelických bloků podle tříd zimovzdornosti a jejich relativní četnosti – Sums of point values of frost-hardiness prediction of Gld allelic blocks according to classes of frost-hardiness and their relative frequency

Markery zimovzdornosti <sup>1</sup>	N	Gld alelický blok <sup>4</sup>	Body predikce <sup>5</sup>	Třídy zimovzdornosti <sup>6</sup>						Počet s bodů <sup>7</sup> /% predikce zimovzdornosti <sup>8</sup>
				I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	
Hlavní <sup>2</sup>	1.	1D5	2,5	0/0	0/0	1/2,5	4/10	7/17,5	10/25	22 n/55
	2.	6A3	2,0	–	–	4,55	18,18	31,82	45,45	%
				0/0	0/0	8/16	18/36	13/26	15/30	54 n/108
Vedlejší <sup>3</sup>	3.	6D2	1,0	–	–	14,81	33,33	24,08	27,78	%
				1/1	4/4	5/5	2/2	4/4	9/9	25 n/25
	4.	1B1	0,50	4	16	20,0	8	16	36	%
				4/2	3/1,5	11/5,5	7/3,5	16/6,5	14/7	52 n/26
				7,69	5,77	21,15	13,46	25	26,93	%
5.	6A1	0,25	3/0,75	2/0,5	1/0,25	5/1,25	9/2,25	5/1,25	25 n/6,25	
Součet bodů predikce zimovzdornosti <sup>9</sup>				3,75	6,0	29,25	52,75	56,25	72,25	body
				1,7	2,72	13,28	23,96	25,54	32,8	%

Třídy – Classes:

I. = nejnižší odolnost k vyzimování – lowest resistance to winter killing

VI. = nejvyšší odolnost k vyzimování – highest resistance to winter killing

% = relativní četnost markerů v jednotlivých třídách zimovzdornosti – relative frequency of markers in different classes of frost-hardiness

<sup>1</sup>markers of frost-hardiness, <sup>2</sup>main, <sup>3</sup>secondary, <sup>4</sup>Gld allelic block, <sup>5</sup>points of prediction, <sup>6</sup>classes of frost-hardiness, <sup>7</sup>number of points, <sup>8</sup>% of frost-hardiness prediction, <sup>9</sup>sum of points of frost-hardiness prediction

Použitou metodu stanovení zimovzdornosti a stupně odolnosti (SO = 1, nejnižší odolnost; SO = 9, nejvyšší odolnost) publikovali Prášil et al. (1994). Elektroforéza gliadinů byla realizována ve sloupcích škrobového gelu

(Sozinov, Popereľja, 1978). Alelické gliadinové bloky byly vyčleněny z elektroforetických gliadinových spekter publikovaným postupem (Šašek, Černý, 1983).

III. Výsledky a hodnocení  $\chi^2$ -testu a koeficientu asociace pro lokusy – Results and evaluation of  $\chi^2$ -test and coefficient of association for loci

Lokus <sup>1</sup>	Hodnota $\chi^2$ -testu <sup>2</sup>	Hladina významnosti <sup>3</sup> $\alpha$	Stupně volnosti <sup>4</sup>	Hodnocení $\chi^2$ -testu <sup>5</sup>	Hodnota koeficientu asociace <sup>6</sup>	Hodnocení těsnosti vztahu <sup>7</sup>
1-1A	349,158**	0,01	85	průkazný <sup>8</sup>	0,763	vyšoká <sup>9</sup>
2-1A	224,174**	0,01	20	průkazný	0,611	význačná <sup>10</sup>
1B	287,951**	0,01	45	průkazný	0,693	význačná
1D	269,006**	0,01	50	průkazný	0,670	význačná
6A	333,409**	0,01	20	průkazný	0,745	vyšoká
6B	174,181**	0,01	60	průkazný	0,539	význačná
6D	268,644**	0,01	65	průkazný	0,669	význačná

<sup>1</sup>locus, <sup>2</sup>value of  $\chi^2$ -test, <sup>3</sup>significance level, <sup>4</sup>degrees of freedom, <sup>5</sup>evaluation of  $\chi^2$ -test, <sup>6</sup>value of association coefficient, <sup>7</sup>evaluation of closeness of relationship, <sup>8</sup>significant, <sup>9</sup>high, <sup>10</sup>considerable

IV. Výsledky a hodnocení  $\chi^2$ -testu a koeficientu asociace pro alely lokusů – Results and evaluation of  $\chi^2$ -test and coefficient of association for alleles of loci

Lokus <sup>1</sup>		Hodnota $\chi^2$ -testu <sup>2</sup>	Hladina významnosti <sup>3</sup> $\alpha$	Stupně volnosti <sup>4</sup>	Hodnocení $\chi^2$ -testu <sup>5</sup>	Hodnota koeficientu asociace <sup>6</sup>	Hodnocení těsnosti vztahu <sup>7</sup>
1-1A	3	84,566**	0,01	5	průkazný <sup>8</sup>	0,375	mírná <sup>11</sup>
1-2A	0	72,314**	0,01	5	průkazný	0,347	mírná
	1	162,948**	0,01	5	průkazný	0,521	význačná <sup>10</sup>
1B	1	127,939**	0,01	5	průkazný	0,462	mírná
	4	116,494**	0,01	5	průkazný	0,441	mírná
1D	5	53,927**	0,01	5	průkazný	0,300	mírná
	1	59,542**	0,01	5	průkazný	0,315	mírná
6A	5	152,569**	0,01	5	průkazný	0,504	význačná
	1	62,361**	0,01	5	průkazný	0,322	mírná
6D	2	166,768**	0,01	5	průkazný	0,527	význačná
	3	193,852**	0,01	5	průkazný	0,568	význačná
6D	2	85,675**	0,01	5	průkazný	0,378	mírná

For 1–10 see Tab. III, <sup>11</sup>slight

Hodnocené odrůdy byly rozříděny podle stupňů odolnosti k vyzimování do šesti tříd. Vzhledem k nízkému počtu odrůd zařazených do SO 1 až 3 byly zmíněné odrůdy sloučeny do třídy I. Podobně byly sloučeny odrůdy s SO 8 a 9 do třídy VI. Ostatní třídy odolnosti odpovídaly SO podle tohoto zařazení: třída II = SO 4, III = SO 5, IV = SO 6 a V = SO 7. Podle zastoupení jednotlivých alel gliadinových lokusů, resp. podle zastoupení jim odpovídajících alelických gliadinových bloků ve zmíněných třídách odolnosti k vyzimování byla hodnocena schopnost predikce zimovzdornosti příslušných gliadinových alelických bloků a její bodová hodnota.

Ke stanovení závislosti mezi výskytem různých alel gliadinových genů a hodnocenými třídami stupňů odolnosti byl použit  $\chi^2$ -test. Testovací kritérium  $\chi^2$ -testu umožňuje posoudit rozdíl mezi skutečnou a očekávanou četností výskytu obou proměnných, tj. četností alel gliadinových signálních genů a tříd stupňů odolnosti k vyzimování.

Těsnost závislosti obou parametrů, tj. počet obměn jednoho znaku ( $k$ ) a počet obměn druhého znaku ( $m$ ), je vyjádřena koeficientem asociace  $V$ .

$$V = \frac{\chi^2}{n}$$

kde:  $V$  – koeficient asociace  
 $\chi^2$  – hodnota  $\chi^2$ -testu  
 $n$  – celkový součet četností

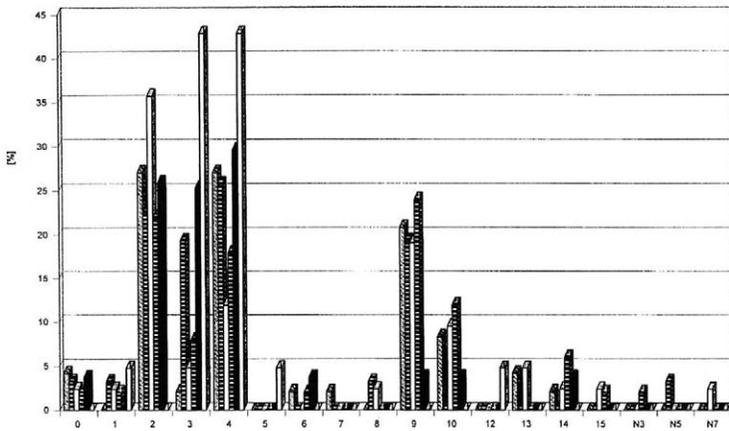
## VÝSLEDKY A DISKUSE

Četnosti jednotlivých alelických gliadinových bloků – markerů zimovzdornosti (Černý et al., 1990) jsou uvedeny v tab. II.

Výsledky a hodnocení  $\chi^2$ -testu a koeficientů asociace pro jednotlivé gliadinové lokusy přináší tab. III. Vypočítaná hodnota  $\chi^2$ -testu překročila kritickou tabulkovou hodnotu  $\chi^2$ -rozdělení. Je proto možné s 99% (\*\*), případně s 95% (\*) spolehlivostí přijmout hypotézu o prokázané závislosti mezi přítomností alely v genotypu a ve třídě odolnosti.

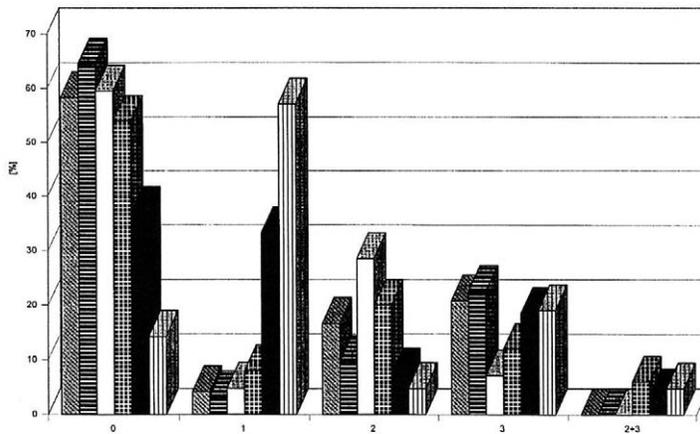
Hodnoty koeficientů asociace pro jednotlivé gliadinové alely, manifestované v podobě alelických gliadinových bloků, charakterizuje tab. IV a obr. 1 až 7.

Získané údaje potvrzují schopnost alely Gld 1D5 markerovat nejvyšší třídy zimovzdornosti. Rovněž druhý hlavní marker zimovzdornosti alela Gld 6A3 proká-

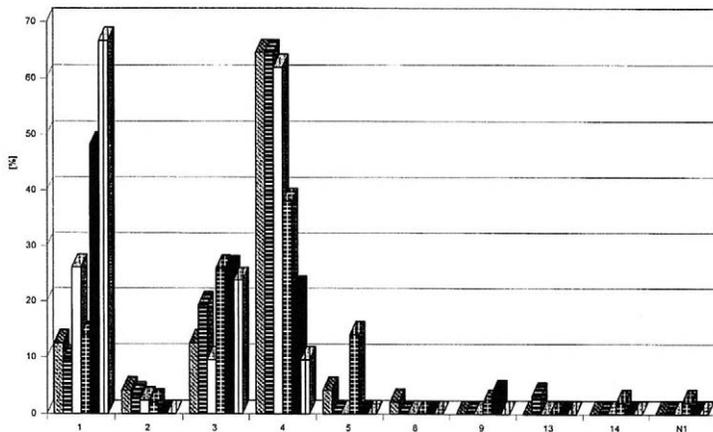


1. Četnost alelického bloku v lokusu 1-1A – Frequency of allelic block in locus 1-1A

Vysvětlivky k obr. 1 až 7 – Explanations to Figs. 1 to 7: osa x: alelické bloky – x axis: allelic blocks  
osa y: četnosti alelického bloku (%) – y axis: frequency of allelic block (%)  
I.–VI. = třída – class



2. Četnost alelického bloku v lokusu 2-1A – Frequency of allelic block in locus 2-1A



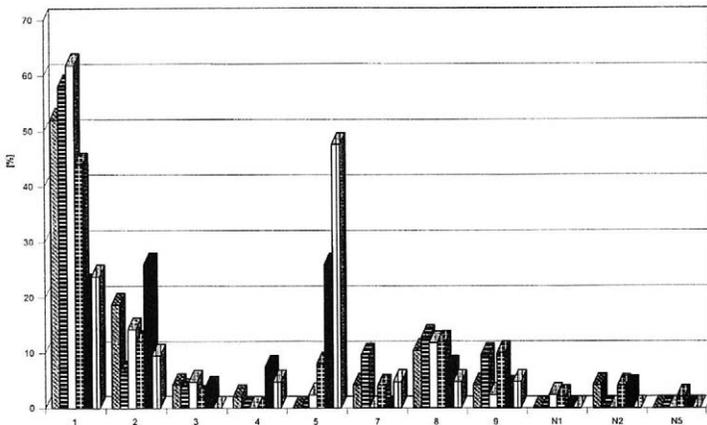
3. Četnost alelického bloku v lokusu 1B – Frequency of allelic block in locus 1B

zala význačnou těsnost vztahu mezi zastoupením této alely a vysokou třídou zimovzdornosti.

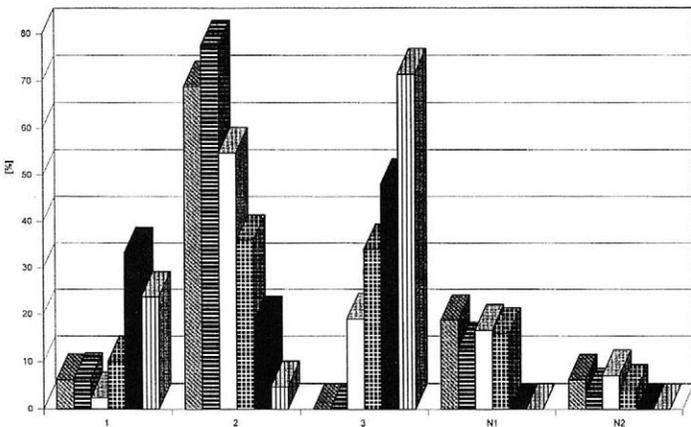
Vzhledem k vyššímu relativnímu zastoupení alely Gld 1D5 ve třídách maximální zimovzdornosti (nejvyšších stupňů odolnosti) ve srovnání se zastoupením alely

6A3 lze předpokládat vyšší markerovací hodnotu zimovzdornosti alely Gld 1D5, než je hodnota predikce zimovzdornosti alely Gld 6A3.

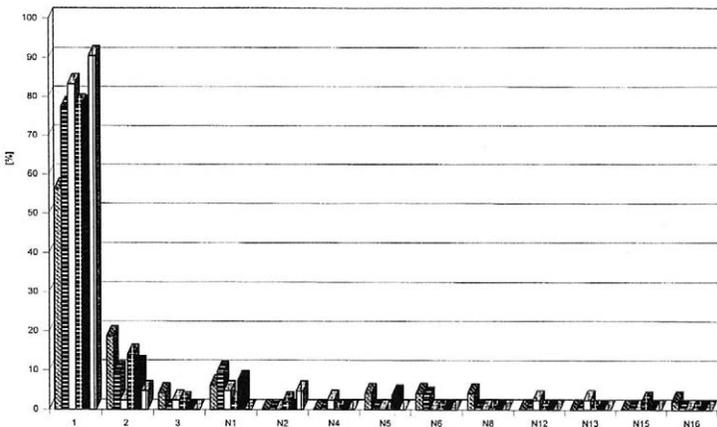
Alela Gld 1-1A2 je považována za vedlejší marker zimovzdornosti (Sozinov, Popereľja, 1979; Šašek et al., 1984;



4. Četnost aleického bloku v lokusu 1D – Frequency of allelic block in locus 1D



5. Četnost aleického bloku v lokusu 6A – Frequency of allelic block in locus 6A



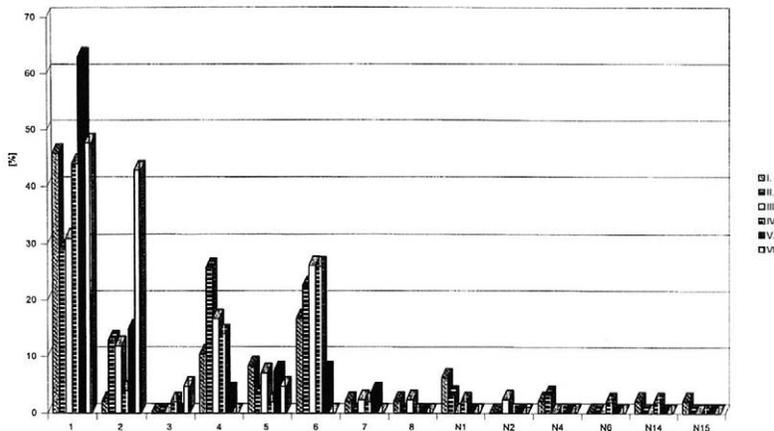
6. Četnost aleického bloku v lokusu 6B – Frequency of allelic block in locus 6B

Černý et al., 1990). Hodnocení použitého souboru 212 odrůd světového sortimentu ozimé pšenice toto tvrzení nepotvrdilo (obr. 1).

Co se týká dalšího vedlejšího známého markeru zimovzdornosti, tj. alely Gld 6D2 (Sozinov, Popereľja, 1979; Šašek et al., 1984; Černý et al., 1990), zjištěná mírná závislost mezi četností alely a třídami vyšší zimovzdornosti potvrzuje schopnost alely Gld 6D2 markerovat

přítomnost některých genů, podmiňujících odolnost k vyzimování.

Na základě zjištěných hodnot  $\chi^2$ -testu, koeficientů asociace a těsnosti vztahu mezi stupněm odolnosti a zastoupením jednotlivých gliadinových alel je možné inovovat klasifikaci gliadinových alel jako markerů zimovzdornosti, případně citlivosti k působení nepříznivých zimních povětrnostních faktorů.



7. Četnost alelického bloku v lokusu 6D – Frequency of allelic block in locus 6D

V. Původní a inovované hodnoty gliadinových markerů zimovzdornosti – Original and innovated values of gliadin markers of frost-hardiness

Gld alelický blok <sup>1</sup>	Bodová hodnota predikce zimovzdornosti <sup>2</sup>	
	původní <sup>3</sup>	inovovaná <sup>4</sup>
1D5	2	2,5
6A3	2	2
6D2	1	1
1B1	–	0,5
6A1	–	0,25
1-1A2	1	0
1-1A1	1	–

<sup>1</sup>Gld allelic block, <sup>2</sup>point value of frost-hardiness prediction, <sup>3</sup>original, <sup>4</sup>innovated

Mírná závislost mezi zastoupením alel a střední zimovzdorností byla zjištěna u alel Gld 1B1 a Gld 6A1, které představují další vedlejší gliadinové markery zimovzdornosti.

Současně byla zjištěna význačná závislost mezi výskytem alely Gld 6A2 a nízkou zimovzdorností a mírná závislost mezi výskytem alel Gld 2-1A0 a Gld 1B4 a Gld 1B5 a třídami nižší zimovzdornosti. Gliadinové bloky zmíněných alel lze považovat za markery citlivosti, nízké odolnosti k chladu, resp. náchylnosti k zimování.

Inovanou klasifikaci gliadinových markerů zimovzdornosti, vyjádřené třídami stupňů odolnosti, uvádí tab. V.

Předpokládané aditivní působení hlavních a vedlejších gliadinových genů – markerů zimovzdornosti (Sozinov, 1985) bylo použito ke stanovení korelačního vztahu mezi celkovou (aditivní) bodovou hodnotou predikce zimovzdornosti gliadinových alelických bloků

a stupňů odolnosti (SO) jednotlivých pokusných variant. Zjištěná hodnota  $r = 0,86$  je významná a prokazuje použitelnost inovované klasifikace gliadinových signálních genů – markerů zimovzdornosti pro predikci zimovzdornosti linií a odrůd pšenice seté.

Práce byla realizována za přispění Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci podpory projektu výzkumu a vývoje OC 814.20 a Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum EP9141.

## LITERATURA

- Černý J., Prášil I., Šašek A. (1990): Values of gliadin markers of frost hardiness in common wheat: correlations with frost hardiness tests. *Genet. a Šlecht.*, 26: 83–89.
- Černý J., Šašek A., Prášilová P., Prášil I. (1999): Účinnost gliadinových signálních genů zimovzdornosti u současného sortimentu ozimé pšenice. *Rostl. Výr.*, 45: 179–183.
- Prášil I., Papazisis K., Janáček J., Prášilová P. (1994): Zimovzdornost a stupně odolnosti českých a slovenských odrůd ozimé pšenice. *Rostl. Výr.*, 40: 803–816.
- Sozinov A. A. (1985): Polimorfizm belkov i jeho značenie v genetice i selekcii. Moskva.
- Sozinov A. A., Popereľja F. A. (1978): Metodika vertikalnogo elektroforeza v krachmalnom gele i genetičeskij princip klasifikacii gliadinov. Moskva.
- Sozinov A. A., Popereľja R. A. (1979): Polimorfizm prolaminov i selekcija. *Vest. sel.-choz. Nauki*, 10: 21–34.
- Šašek A., Černý J. (1983): Improving the identification of allelic gliadin blocks. *Scientia Agric. Bohemoslov.*, 15: 103–109.
- Šašek A., Černá J., Hanišová A. (1984): Gliadinové bloky – markery mrazuvzdornosti u pšenice obecné. *Genet. a Šlecht.*, 20: 109–206.

Došlo 12. 11. 1999

## Kontaktní adresa:

Ing. Antonín Šašek, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: +420 2 33 02 21 11, fax: +420 2 33 31 06 36, e-mail: sasek@hb.vurv.cz

# HIGH MOLECULAR WEIGHT GLUTENIN SUBUNITS VARIATION AND RELATIVE QUANTITATION IN WINTER SPELT WHEAT CULTIVARS

## VARIABILITA A RELATÍVNE ZASTÚPENIE VYSOKOMOLEKULÁRNYCH GLUTENÍNŮVÝCH PODJEDNOTIEK V OZIMNÝCH FORMÁCH ODRÔD PŠENICE ŠPALDOVEJ

H. Knoblochová, Z. Gálová

*Slovak Agricultural University in Nitra, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** The collection of 33 winter spelt wheat cultivars *Triticum spelta* L. was submitted to the electrophoretic analysis in the polyacrylamide gel and the results were evaluated on the qualitative and quantitative biochemical level. Following estimation of high-molecular-weight glutenin subunits composition detected that 27 cultivars have been uniform in this parameter and six cultivars have been non-uniform. The most often represented biotype appeared was the D biotype with 1, 6 + 8, 2 + 12 high-molecular-weight glutenin subunits composition and 6 Glu-score value. This one was determined by 19 cultivars (57.6%). The most non-homogeneous cultivar of Swiss origin H 92-20 (P. Kunz) was proved, by which five unequal biotypes (A–E) with the majoritarian representation of D biotype, the most repeatedly occurred biotype of the whole examined spelt wheat cultivars collection, was detected in the 24 singular grains. By all other mentioned non-uniform cultivars two or three biotypes were appointed. According to the calculated value for Glu-score the food wheat cultivars can be Ardenne, Bauländer Spelz, Franckenkorn, Holstenkorn and Rouquin and non-food wheat cultivars are Hercule and Steiner Roter Laupheimer. The average value for the sum of the high-molecular-weight glutenin subunits was 7.18% and the average value for the sum of the other subunits was 78.29%. The dough made from the spelt wheat flours is characterized with the lower stability and elasticity and with the higher extensibility and dissolubility.

**Keywords:** electrophoresis; high-molecular-weight glutenin subunits; *Triticum spelta* L.

**ABSTRAKT:** Súbor 33 odrôd ozimnej formy pšenice špaldovej *Triticum spelta* L. bol podrobený elektroforetickej analýze v polyakrylamidovom géli a výsledky boli vyhodnotené na kvalitatívnej a kvantitatívnej biochemickej úrovni. Stanovením komponentnej skladby vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek sa zistilo, že 27 skúmaných odrôd je v tomto parametri homogénnych a šesť odrôd je nehomogénnych. Najčastejšie zastúpený bol biotyp D, ktorého komponentná skladba vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek je 1, 6 + 8, 2 + 12 a hodnota Glu-hodnotenia 6; bol stanovený pri 19 odrodách (57,6 %). Najviac nehomogénnou sa ukázala odroda švajčiarskeho pôvodu H 92-20 (P. Kunz), pri ktorej bolo v 24 jednotlivých zrnách stanovených až päť rozdielnych biotypov s majoritným zastúpením biotypu D. Pri všetkých ostatných nehomogénnych odrodách boli stanovené dva až tri rozdielne biotypy. Na základe vypočítanej hodnoty Glu-hodnotenia medzi pšenice s potravinárskou kvalitou je možné zaradiť odrody Ardenne, Bauländer Spelz, Franckenkorn, Holstenkorn a Rouquin a medzi nepotravinárske pšenice odrody Hercule a Steiner Roter Laupheimer. Priemerná hodnota obsahu vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek ako celku bola 7,18 % a priemerná hodnota obsahu ostatných podjednotiek ako celku bola 78,29 %. Cesto vyrobené z múk pšenice špaldovej sa vyznačuje nižšou pevnosťou a pružnosťou a je viac rozťažné a rozplývavé.

**Kľúčové slová:** elektroforéza; vysokomolekulárne glutenínové podjednotky; *Triticum spelta* L.

### INTRODUCTION

Spelt (*Triticum spelta* L.) is an old-world crop which was one of the major feed and food cereals of ancient Europe. At the present time it is in the position of a minor crop, but it rightly attracts renewed interest in the field of its relationship to wheat, methods of production, final use characteristics and breeding methods (Campbell, 1997).

The distinction between common and spelt wheat, however, is often difficult because they are closely related. There are some differences in plant height, spike shape, seed appearance and number of maturation days. Spelt plants are about 40 cm taller than common wheat ones, their average height is 90 to 130 cm, the spikes are lax and 4 to 7 cm longer than those of common wheat (but with similar spikelets number per a spike) and seeds tend to be larger and longer. Spelt matures

several days later than common wheat (Lafever, Campbell, 1977). Production practices with regard to seedbed preparation and planting date are similar. Spelt cultivars show a higher resistance to environmental influences and so they are suitable for performance in areas of high precipitation, heavy soils and cool temperatures (Ruegger et al., 1990).

Spelt wheat is reported to have a unique flavour, high vitamin content and to be more nutritious than common wheat. Bognar, Kellerman (1993), Abdel-Aal et al. (1995) and Ranhotra et al. (1996) determined, however, that protein, fiber, vitamin and mineral composition of spelt flours (grains) were similar to those of common wheat flours, with the exception of cultivar Rouquin, which contained significantly more content of vitamin E, thiamin and pyridoxine, and higher zinc and potassium and lower riboflavin content of several spelt cultivars.

Spelt wheat is reported to have a higher protein content, too. This was confirmed by Stalknecht et al. (1996), who determined averaged 18 to 40% higher spelt wheat protein content. Our department measured protein content of five spelt wheat and two common wheat cultivars during three growing seasons and we found out about averaged 28.4% higher protein content in spelt cultivars mentioned earlier (results not published). 80% of the total wheat grain proteins comprise storage proteins, which are subdivided into glutenins (high-molecular-weight [HMW] glutenin subunits and low-molecular-weight [LMW] glutenin subunits) and gliadins. Gluten proteins are important because of their major effect on wheat cultivar bread-making quality. Gliadins influence the viscosimetric (extensibility and dissolubility) and HMW glutenin subunits elastic (gluten structure stability and elasticity) characteristics of the wheat dough. Electrophoretic characterization of spelt seed gliadins was studied by several authors (Abdel-Aal et al., 1996; Harsch et al., 1997). Variation in HMW glutenin subunits was reported by Rodriguez-Quijano et al. (1990).

The present study aimed at the investigation of HMW glutenin subunits variation and relative quantitation in 33 winter spelt wheat cultivars collected in Praha-Ruzyně and Piešťany Genebanks based on ISTA SDS-PAGE electrophoretic analysis.

## MATERIAL AND METHODS

The accessions evaluated in this study were 33 winter spelt wheat (*Triticum spelta* L.) cultivars (Tab. I). They were obtained from Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic Genebank (23 cultivars) and from Research Institute of Crop Production, Piešťany, Slovak Republic Genebank (10 cultivars). Winter wheat cultivar Marquis and spring wheat cultivar Chinese Spring (*Triticum aestivum* L.) with known HMW glutenin subunits composition (obtained from Research Institute of Crop Production, Praha-Ruzyně, Czech Republic) were included as controls.

The samples were dehulled and hull-free grains were analysed. High molecular weight glutenin subunits were fractionated by standard vertical discontinual electrophoresis (gel electrophoresis apparatus SE 660, Pharmacia Biotech) in the polyacrylamide gel in the presence of SDS reported by international organisation ISTA, ISTA SDS-PAGE (Wrigley, 1992) with the next densitometric detection (ImageMaster DTS, Pharmacia-LKB). Analysis of 24 individual grains of each analysed cultivar was traced. For identification of the HMW glutenin subunits and the Glu-score calculation the nomenclature proposed by Payne, Lawrence (1983) was used. Quantitation was realised by programme Diversity One, PDI.

## RESULTS AND DISCUSSION

All results obtained studying the HMW glutenin subunits composition, Glu-score calculation and average relative percentage quantitation of all 33 analysed winter spelt wheat cultivars are well-arranged and written down in Tab. I. We investigated cultivars from seven (prevalingly European) countries. Majority of the cultivars were of German origin (17), four of them (Fuggers Babenhäuser, Rothweiler Fruehkorn, TRI 2400 [Gatersleben] and Waggerhauser Kolbendinkel) came from the collection before the 1949 year. No mean share also constituted Swiss origin cultivars, those were nine. In few representation cultivars of Belgium origin (Hercule, Rouquin) and Polish origin cultivars (Baetting Niederwill, Weissler winter Granendinkel) occurred, two cultivars of the particular origin country. Austrian (Steiner Roter Laupheimer), Czech (*T. spelta* [Uhříněves]) and American (Renval) origin had always only one variety (Tab. I).

In the first part of the received results evaluation we fixated to the qualitative biochemical analysis of the each tested cultivar, that is the basic biochemical cultivar characteristics determination, namely I, estimation of the HMW glutenin subunits composition and II, Glu-score value calculation. Following assignment of HMW glutenin subunits composition we detected, that 27 cultivars are homogeneous in this parameter and six cultivars are non-homogeneous. By homogeneous cultivars all 24 singly analysed grains of given sample allocated after electrophoresis realization the same electrophoretic profile, e.g. the amount and the position of individual bands in all lanes were similar. In the composition of the electrophoretically divided HMW glutenin subunits we totally designated eight unequal electrophoretic profiles, which we entitled as biotypes and because of the limpidity we labelled them with the first eight Greece alphabet capital letters (A–H). Their particular HMW composition we presented in Tab. I. By uniform cultivars we appointed generally six different biotypes (A, D–H). The most often represented biotype appeared D biotype, which HMW glutenin subunits composition is 1, 6 + 8, 2 + 12 and Glu-score

I. High molecular weight glutenin subunits composition, Glu-score calculation and average relative percentage quantitation of analysed winter spelt wheat cultivars (*Triticum spelta* L.)

Cultivar	Genebank	Country of origin	Number of biotypes	Percentage of biotype	Designation of biotype	HMW glutenin subunits	Glu-score	1 (% <sup>b</sup> )	6 + 8 (% <sup>b</sup> )	7 + 8 (% <sup>b</sup> )	7 + 9 (% <sup>b</sup> )	13+16 (% <sup>b</sup> )	20 (% <sup>b</sup> )	2 + 12 (% <sup>b</sup> )	5 + 10 (% <sup>b</sup> )	HMW (% <sup>b</sup> )	LMW <sup>c</sup> (% <sup>b</sup> )
Altgold	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.83	1.60	—	—	—	—	3.90	—	6.33	85.62
Ardenne	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	E	1, 6 + 8, 5 + 10	8	1.28	3.22	—	—	—	—	—	5.18	9.68	70.85
Baetting Niederwill	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Poland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.67	1.40	—	—	—	—	2.70	—	4.77	64.13
Bauländer Spelz	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany	1	100.0	G	1, 13 + 16, 2 + 12	8	1.30	—	—	—	4.30	—	5.32	—	10.92	61.40
Burgdorf 1	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.35	3.73	—	—	—	—	5.17	—	10.25	65.23
Franckenkorn	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany	1	100.0	E	1, 6 + 8, 5 + 10	8	0.91	1.87	—	—	—	—	—	3.39	6.17	74.91
Fuggers Babenhauser	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany (till 1949)	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.37	0.90	—	—	—	—	2.56	—	3.83	91.03
H 92-20 (P. Kunz)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	5	4.2	A	0, 6 + 8, 2 + 12	4	—	2.90	—	—	—	—	4.10	—	7.00	78.30
				8.3	B	0, 6 + 8, 5 + 10	6	—	1.90	—	—	—	—	—	4.30	6.20	85.65
				4.2	C	0, 7 + 9, 2 + 12	5	—	—	—	1.70	—	—	2.30	—	4.00	84.10
				79.1	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.73	1.89	—	—	—	—	3.96	—	6.58	86.16
				4.2	E	1, 6 + 8, 5 + 10	8	0.80	1.70	—	—	—	—	—	4.40	6.90	84.70
H 92-27 (P. Kunz)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	3	91.6	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.75	1.94	—	—	—	—	3.88	—	6.57	90.27
				4.2	E	1, 6 + 8, 5 + 10	8	0.80	1.60	—	—	—	—	—	4.40	6.80	81.20
				4.2	G	1, 13 + 16, 2 + 12	8	0.40	—	—	—	3.00	—	2.90	—	6.30	82.80
Hercule	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Belgium	1	100.0	A	0, 6 + 8, 2 + 12	4	—	0.53	—	—	—	—	2.20	—	2.73	88.55
Holstenkorn	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany	1	100.0	F	1, 7 + 8, 2 + 12	8	0.75	—	3.23	—	—	—	3.40	—	7.38	71.66
Kipperhaus weisser Spelz	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.38	2.55	—	—	—	—	6.28	—	10.21	71.90
KR 489-11-15 (P. Kunz)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	2	12.5	B	0, 6 + 8, 5 + 10	6	—	1.70	—	—	—	—	—	3.87	5.57	75.97
				87.5	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.17	2.31	—	—	—	—	4.21	—	7.69	76.39
Lueg	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	2	4.2	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.80	2.00	—	—	—	—	3.10	—	5.90	81.50
				95.8	E	1, 6 + 8, 5 + 10	8	1.27	2.04	—	—	—	—	—	5.73	9.04	83.07
LW 12 (Nuertingen)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany	2	33.3	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.08	2.37	—	—	—	—	4.25	—	7.70	82.25
				66.6	G	1, 13 + 16, 2 + 12	8	1.03	—	—	—	3.61	—	3.92	—	8.56	79.18
LW 13 (Nuertingen)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.85	2.47	—	—	—	—	3.45	—	6.77	78.28
Oberkulmer Rotkorn	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.95	2.42	—	—	—	—	3.58	—	6.95	76.68
Oberkulmer Schwarzer	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.12	2.30	—	—	—	—	3.75	—	7.17	77.33
Ostro	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.93	2.19	—	—	—	—	3.55	—	6.67	82.03
Ostro Schwarzer	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Switzerland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.98	2.63	—	—	—	—	3.94	—	7.55	82.07

Cultivar	Genebank	Country of origin	Number of biotypes	Percentage of biotype	Designation of biotype	HMW glutenin subunits	Glu-score	1 (% <sup>b</sup> )	6 + 8 (% <sup>b</sup> )	7 + 8 (% <sup>b</sup> )	7 + 9 (% <sup>b</sup> )	13+16 (% <sup>b</sup> )	20 (% <sup>b</sup> )	2 + 12 (% <sup>b</sup> )	5 + 10 (% <sup>b</sup> )	HMW (% <sup>b</sup> )	LMW <sup>c</sup> (% <sup>b</sup> )
Renval	RICP <sup>a</sup> Piešťany	United States of America	1	100.0	H	1, 20, 2 + 12	6	1.05	—	—	—	—	5.27	6.31	—	12.63	74.05
Roter Kolbendinkel	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.93	2.55	—	—	—	—	4.07	—	7.55	82.32
Rotthweiler Fruehkorn	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany (till 1949)	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.97	2.30	—	—	—	—	3.78	—	7.05	73.83
Rouquin	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Belgium	1	100.0	E	1, 6 + 8, 5 + 10	8	0.97	2.25	—	—	—	—	—	4.36	7.58	85.10
Schwabenkorn	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.67	1.66	—	—	—	—	3.60	—	5.93	81.85
Schwabenkorn (Dinkel)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany	2	75.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.84	2.01	—	—	—	—	3.88	—	6.73	72.88
				25.0	G	1, 13 + 16, 2 + 12	8	0.97	—	—	—	3.13	—	4.17	—	8.27	71.03
Spalda (Landrace 1-96)	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.10	2.87	—	—	—	—	4.45	—	8.42	71.15
Steiner Roter Laupheimer	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Austria	1	100.0	A	0, 6 + 8, 2 + 12	4	—	1.98	—	—	—	—	4.10	—	6.08	75.34
<i>T. spelta</i> (Uhřiněves)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Czech Republic (till 1993)	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.85	1.77	—	—	—	—	3.38	—	6.00	73.57
TRI 2400 (Gatersleben)	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany (till 1949)	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.93	1.95	—	—	—	—	4.23	—	7.11	80.82
Waggershauser Kolbendinkel	RICP <sup>a</sup> Praha-Ruzyně	Germany (till 1949)	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.83	1.92	—	—	—	—	4.00	—	6.75	82.08
Weisser Kolbenspelz	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Germany	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	0.98	2.10	—	—	—	—	3.80	—	6.88	81.32
Weisser winter Granendinkel	RICP <sup>a</sup> Piešťany	Poland	1	100.0	D	1, 6 + 8, 2 + 12	6	1.37	2.67	—	—	—	—	5.45	—	9.49	67.88

<sup>a</sup> Research Institute of Crop Production

<sup>b</sup> average relative percentage — individual glutenin subunits percentage of all electrophoretically divided subunits (calculated by the Diversity One Programme)

<sup>c</sup> other electrophoretically divided subunits fraction including LMW glutenin subunits fraction, gliadins fraction and albumins plus globulins fraction

value 6. This one we determined by 19 cultivars (57.6%). All the other five biotypes were in the minority representation. E biotype (1, 6 + 8, 5 + 10; 8) we specified by three cultivars (Ardenne, Franckenkorn, Rouquin), A biotype (0, 6 + 8, 2 + 12; 4; Hercule, Steiner Roter Laupheimer) by two cultivars and F biotypes (1, 6 + 8, 2 + 12; 8; Holstenkorn), G (1, 13 + 16, 2 + 12; 8; Bauländer Spelz) and H (1, 20, 2 + 12; 6; Renväl) only by one cultivar.

Cultivars H 92-20 (P. Kunz), H 92-27 (P. Kunz), KR 489-11-15 (P. Kunz), Lueg, LW 12 (Nuertingen) and Schwabenkorn (Dinkel) we assessed as non-uniform, by which we destined two to five variant electrophoretic profiles. The most non-homogeneous cultivar was proved the one of Swiss origin H 92-20 (P. Kunz), by which we detected five unequal biotypes (A–E) with the majoritarian representation of the D biotype, in 24 singular grains, the most repeatedly occurred biotype of the whole examined collection of spelt wheat cultivars. D biotype is either the major biotype of three further non-uniform cultivars (H 92-27 [P. Kunz], KR 489-11-15 [P. Kunz], Schwabenkorn [Dinkel]). By cultivar H 92-27 (P. Kunz) we appointed three diverse biotypes and by all other mentioned non-homogeneous cultivars two. Four non-homogeneous cultivars were of Swiss origin and two were of German origin.

In the percentage of biotype column the percent part of the variant biotypes, that is the percentage of the grains with particular biotype from the total amount of the electrophoretically analysed grains, is listed. Following the assigned composition of HMW glutenin subunits in the individual biotypes we enumerated the value for Glu-score, which we presented in the Glu-score column (Tab. I). These achieved values between 4 to 8. Inasmuch as the value for Glu-score is in the direct correlation with the bread-making quality of the cultivar may be assumed, that the cultivars with lower values for Glu-score have worse technological quality and on the other hand the cultivars with upper values for Glu-score are food quality wheats. On the contrary, this background in our collection of 33 analysed spelt wheat cultivars food wheat cultivars are Ardenne, Bauländer Spelz, Franckenkorn, Holstenkorn and Rouquin and non-food wheat cultivars are Hercule and Steiner Roter Laupheimer. For the complete arbitration of the bread-making quality of the concrete wheat cultivar, eventually biotype, it is unavoidable according to Payne, Lawrence (1983) and Payne et al. (1987) to proofread the assigned value for Glu-score by its decreasing in the case of the occurrence of gliadin (secaline) allelic GLD 1B3 block, which is characterised as the bad bread-making cultivar quality marker. Our listed results concerning the prediction of the bread-making quality of the analysed spelt wheat cultivars collection are in this meaning uncomplete. The incidence of the HMW glutenin and gliadin markers of the bread-making quality prediction of a few spelt wheat new-bred varieties traced Šašek, Černý (1997), who following the valuation of the obtained electrophoretic

gliadin spectras did not approve the GLD 1B3 marker either the other common wheat (*Triticum aestivum* L.) high bread-making quality markers attendance in the analysed spelt wheat cultivars.

Determination of the spelt wheat HMW glutenin subunits composition was dealt with Rodríguez-Quijano et al. (1990). They surveyed 118 Spanish landraces of spelt. They designed that the most common subunits composition was 1, 13 + 16, 2 + 12 (found in 63% of the analysed cultivars). Besides that, a novel subunit pair, 13 + 18, was presented in 12% of the accessions and a new allele, designated 2.3 was identified and assigned to *Glu-D1* locus. Some new combinations of subunits were found, too.

In the second part of the evaluation of the received results we fixated to the quantitative biochemical analysis of the each tested cultivar, that is the specification of the average relative percentage representation of I, individual (couples) HMW glutenin subunits II, the sum of the HMW glutenin subunits and III, the sum of the other electrophoretically divided subunits (low-molecular-weight glutenin subunits fraction, gliadins fraction and albumins plus globulins fraction) by all analysed spelt wheat cultivars and in all assigned biotypes. The results are tabularly listed in Tab. I. Average relative percentage representation means the average percentage part of individual subunit (fraction) of all electrophoretically divided subunits and was calculated by the Diversity One Programme.

As it is seen from Tab. I, the sum of HMW glutenin subunits content values varied in comparatively wide range 2.73% to 12.63% with the average value 7.18%. The lowest value 2.73% was determined by cultivar Hercule, low values also itemised cultivars Fuggers Babenhäuser (3.83%) and Baetting Niederwill (4.77%). The highest value 12.63% we assessed by cultivar Renväl, higher than 10% contribution of HMW glutenin subunits had either cultivars Bauländer Spelz (10.92%), Burgdorf I (10.25%) and Kipperhaus weisser Spelz (10.21%). The values for the sum of the other subunits moved in the span 61.40% (Bauländer Spelz) to 91.03% (Fuggers Babenhäuser) with the average value 78.29%. After the comparison of the specified average values for the sum of the HMW glutenin subunits content and the sum of the other subunits content in the analysed collection of 33 spelt wheat cultivars *Triticum spelta* L. with their appertained values from the common winter wheat cultivars collection *Triticum aestivum* L. (results not shown) it was found out, that the average content of the sum of the HMW glutenin subunits is by spelt wheat cultivars lower than by the common winter wheat cultivars. Inasmuch as the glutenins are responsible for the elastic features of the dough (stability and elasticity of the gluten structure) it may be assumed that the dough made from these flours will be less stable and elastic. Other way round, the average content of the sum of the other subunits is by spelt wheat cultivars higher than by the common winter wheat cultivars. Whereas the gliadins are accountable for the viscosimetric

attributes of the dough (extensibility and dissolubility), the dough made from these flours will be more extensible and dissoluble. This evidence was also acknowledged by the more particular study of the bread-making quality of three winter spelt wheat cultivars in the comparison with the common winter wheat (Smolková et al., 1998). Capouchová (1996) states, that for the technological treatment the flour from spelt wheat requires in comparison with the flours from common wheat the introduction of ascorbic acid because of the strengthness of the gluten structure and the reduction of the dough extensibility. Kernel, milling and baking properties of spring-type spelt wheats were studied by Abdel-Aal et al. (1997). They found out that with addition of only 15 ppm bromate the spelt accessions gave breads with loaf volumes similar to those of common wheat breads.

### Acknowledgement

Authors thank to the Research Institute of Crop Production Genebank, Praha-Ruzyně, Czech Republic and Research Institute of Crop Production Genebank, Piešťany, Slovak Republic for supplying the *Triticum spelta* L. cultivars. This work has been supported by the VEGA grant No. A 61 G (95/5195/189).

### REFERENCES

- Abdel-Aal E. S. M., Hucl P., Sosulski F. W. (1995): Compositional and nutritional characteristics of spring einkorn and spelt wheats. *Cereal Chem.*, 72: 621–624.
- Abdel-Aal E. S. M., Hucl P., Sosulski F. W., Bhirud P. R. (1997): Kernel, milling and baking properties of spring-type spelt and einkorn wheats. *J. Cereal Sci.*, 26: 363–370.
- Abdel-Aal E. S. M., Salama D. A., Hucl P., Sosulski F. W., Cao W. (1996): Electrophoretic characterization of spring spelt wheat gliadins. *J. Agric. Fd Chem.*, 44: 2117–2123.
- Bognar A., Kellerman C. (1993): Comprehensive studies on the vitamin content of spelt, wheat, and rye. *Ernährungsforschung*, 38: 149–170.
- Campbell K. G. (1997): Spelt: agronomy, genetics, and breeding. *Pl. Breed. Rev.*, 15: 187–213.
- Capouchová I. (1996): Pěstování pšenice špaldy, její potravinářská jakost a možnosti využití. In: *Využitie integrovanej rastlinnej výroby v podmienkach Slovenska*, Nitra, DT ZSVTS: 241–244.
- Harsch S., Gunther T., Kling Ch. I., Rozynek B., Hesemann C. U. (1997): Characterization of spelt (*Triticum spelta* L.) forms by gel electrophoretic analyses of seed storage proteins. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 52–60.
- Lafever H. N., Campbell L. G. (1977): Spelt: a new look at an old crop. *Crops Soils*, 29: 15–16.
- Payne P. I., Lawrence G. J. (1983): Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, 11: 29–35.
- Payne P. I., Nightingale M. A., Krattiger A. F., Holt L. M. (1987): The relationship of HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Fd Agric.*, 40: 51–66.
- Ranhotra G. S., Gelroth J. A., Glaser B. K., Lorenz K. J. (1996): Nutrient composition of spelt wheat. *J. Fd Comp. Anal.*, 9: 81–84.
- Rodríguez-Quijano M., Vázquez J. F., Carrillo J. M. (1990): Variation of high molecular weight glutenin subunits in Spanish landraces of *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* and ssp. *spelta*. *J. Genet. Breed.*, 44: 121–126.
- Ruegger A., Winzeler H., Nosberger J. (1990): Die Ertragsbildung von Dinkel (*Triticum spelta* L.) und Weizen (*Triticum aestivum* L.) unter verschiedenen Umweltbedingungen im Freiland. *J. Agric. Crop Sci.*, 164: 145–152.
- Smolková H., Gálová Z., Gregová E. (1998): Biochemická analýza technologickej kvality zrna pšenice *Triticum spelta* L. *Acta Fytotechn. Zootechn.*, 1: 99–103.
- Stallknecht G. F., Gilbertson K. M., Ranney J. R. (1996): Alternative wheat cereals as food grains: einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. In: *Janick J.: Progress in new crops*. Arlington. Amer. Soc. Hort. Sci.: 156–170.
- Šašek A., Černý J. (1997): Gliadinové a gluteninové signální geny pšenice špaldy (*Triticum spelta* L.). *Rostl. Vyr.*, 43: 149–151.
- Wrigley C. W. (1992): Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In: *Linskens H. F., Jackson J. F.: Seed analysis*. Berlin, Heilderberg, Springer-Verlag: 17–41.

Received on October 19, 1999

Corresponding author:

Ing. Henrieta Knoblochová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, tel.: +421 87 65 08 277, fax: +421 87 41 35 12, e-mail: knobloch@afnet.uniag.sk

# DORMANCY AND POST-HARVEST MATURATION OF MALT BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) CARYOPSES

## DORMANCE A POSKLIZŽNOVÉ DOZRÁVÁNÍ OBILEK SLADOVNICKÉHO JEČMENE (*HORDEUM VULGARE* L.)

J. Hradilík<sup>1</sup>, V. Psota<sup>2</sup>, H. Fišerová<sup>1</sup>, M. Hudeová<sup>1</sup>, M. Klemš<sup>1</sup>, V. Reinöhl<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Brewery and Malting Research Institute, Brno, Czech Republic

**ABSTRACT:** During 1997 to 1999 the dormancy and process of post-harvest maturation of caryopses were studied in the Akcent and Krona malt barley varieties. In both varieties the deepest dormancy was observed in 1997 when rainfall was the heaviest at the time of caryopses ripening and temperatures were, on average, by ca 2 °C lower than in the two following years. Using the index and rate of germination it was possible to differentiate the Akcent and Krona varieties immediately after harvest and also during post-harvest maturation. The greatest differences between the two varieties were found in 1997. Caryopsis dormancy was always higher in Krona than in Akcent. In the stage of milk ripeness, when the caryopsis is the most sensitive to weather effects, the differences in the content of abscisic acid (ABA) were the biggest, corresponding with the assumption that the ABA content is higher in a cooler and more humid climate when more dormant caryopses are formed. The total content of phenolic substances was the highest in 1997 and contributed to the level of caryopsis dormancy. Indolyl-3-acetic acid (IAA) and the majority of cytokinins (CK) participate particularly in the regulating processes associated with caryopsis filling, their content rapidly declining after reaching maturity.

**Keywords:** barley; caryopses; dormancy; weather conditions; post-harvest maturation; germination; auxin; gibberellins; cytokinins; abscisic acid; phenolic compounds; ethylene

**ABSTRAKT:** V průběhu let 1997 až 1999 byla studována dormance a proces posklizžového dozrávání obilek u odrůd sladovnického ječmene Akcent a Krona. Hloubka dormance byla u obou odrůd největší v roce 1997, kdy bylo v období dozrávání obilek zaznamenáno nejvíce srážek a také teploty byly ca o 2 °C v průměru nižší než v dalších dvou letech. Pomocí indexu a rychlosti klíčení bylo možné odlišit odrůdy Akcent a Krona ihned po sklizni i během posklizžového dozrávání. V roce 1997 byly rozdíly mezi oběma odrůdami největší. Odrůda Krona se vždy vyznačovala vyšší dormancí obilek než odrůda Akcent. V období mléčné zralosti, kdy je obilka nejcitlivější na povětrnostní vlivy, byly nalezeny největší rozdíly v obsahu abscisové kyseliny (ABA), odpovídající předpokladu, že v chladnějším a vlhčím klimatu, kdy se utvářejí více dormantní obilky, je obsah ABA vyšší. Celkový obsah fenolických látek byl nejvyšší v roce 1997 a přispíval k hloubce dormance obilek. Indolyl-3-octová kyselina (IAA) a většina stanovených cytokininů (CK) se účastní zejména regulačních procesů spojených s naplňováním obilek a při dosažení zralosti jejich obsah v obilkách prudce klesá.

**Klíčová slova:** ječmen; obilky; dormance; povětrnostní podmínky; posklizžové dozrávání; klíčení; auxin; gibbereliny; cytokininy; abscisová kyselina; fenolické sloučeniny; ethylen

## INTRODUCTION

The dormancy of caryopses is a genetically based property, the manifestation of which is affected by weather conditions of the respective year during maturation (Buraas, Skinnes, 1984, 1985). The manifestation of primary dormancy in cereals is that viable caryopses are not capable of immediate (rapid and uniform) germination in the first weeks after harvest. The period of gradually increasing germination is indicated as post-harvest maturation (physiologically it is the breaking of dormancy). Most frequently caryopsis dormancy is di-

vided into two parts – embryo dormancy and dormancy caused by the caryopsis covering structures (Corbineau, Come, 1996). Aleurone dormancy is also described in literature (Backhuizen et al., 1995), and/or secondary dormancy caused by strong populations of microorganisms on the caryopsis surface (Briggs, 1995). Caryopsis dormancy is a complex phenomenon, the reason why its causes have been comprehended only partly.

Endogenous phytohormones affect physiological processes in the caryopses, including dormancy, germination and enzyme production. All these processes are important for barley malting and are decisive for the

homogeneity and rate of malting and for malt quality. Results obtained when studying the relationship between the ABA content and dormancy in barley are very different and e.g. Boivin et al. (1995) did not find a clear correlation between the ABA and IAA content and the germination index. Wang et al. (1995) studied caryopses of one variety grown under different conditions evoking different levels of dormancy and found that the level of ABA was higher in the embryos of dormant caryopses. Also the sensitivity of embryos to exogenous ABA differs considerably and is dependent on the variety and its dormancy (Wang et al., 1994).

In addition to the embryo, barley dormancy is markedly affected by the covering structures (hulls, pericarp and testa). After removing the hulls, the caryopses can germinate easily in a wide range of temperatures. The covering structures limit the access of oxygen to the embryo. Hull-less caryopses can germinate well in an atmosphere containing at least 10% of oxygen, while isolated embryos can germinate fully at 3 to 5% of oxygen (Corbineau, Come, 1996). The covering structures of barley caryopses bind oxygen with polyphenoloxidase during the oxidation of phenolic compounds present in these tissues in great amounts. During the first hours of imbibition, the dormant barley caryopses absorb more oxygen than the non-dormant ones. In the non-dormant caryopses the hulls bind oxygen to a lesser extent. This inhibition of oxygen diffusion increases with increasing temperature, but is weaker in non-dormant caryopses (Lenoir et al., 1986). The breaking of dormancy is eased by increasing the temperature during dry storage (Lenoir et al., 1983).

In terms of malt quality, it is important if the aleurone cells are affected by dormancy. Caryopses containing the dormant aleurone layer may begin to germinate, but in the course of malting they produce lower levels of hydrolases, resulting in undermodification of the endosperm. The sensitivity of aleurone layers isolated from dormant caryopses to GA<sub>3</sub> proved to be lower than from non-dormant ones (Schuurink et al., 1992b) and the reduced reaction of the aleurone to GA<sub>3</sub> *in vitro* correlates with the lower germination index (Bakhuizen et al., 1995).

The level of dormancy of barley (*Hordeum vulgare* L. *sensu lato*) caryopses is a varietal property and is markedly affected by the production and weather conditions during caryopsis formation (Foley, Fennimore, 1998). Cold and humid weather at this time deepens dormancy (Buraas, Skinnes, 1985; Schuurink et al., 1992a). In addition, humid weather during harvest could evoke secondary dormancy, probably caused by a strong growth of microflora population on the caryopsis surface which consumes oxygen (Briggs, 1995).

The rate and uniformity of germination shows the level of dormancy of a certain part or sample of spring barley caryopses. It is dependent on the degree of maturity of the individual caryopses which is considerably uneven after harvest. The unevenness is based on the different level of maturity of caryopses of the individual

plants and on the level of maturity of the caryopses of the main stem and tillers, but also on the position of the caryopses in the ear. Post-harvest germination of caryopses is not only slow, but also uneven, showing that there are many intensities of dormancy in the sample (Briggs, 1995). That is why several methods of measuring the germination rate are used to determine the level of dormancy as this is the best way of showing the undesirable unevenness of the sample.

The objective of the present study was to evaluate the effect of various weather conditions during caryopsis maturation on the level of dormancy of two barley varieties, the selection of which was based on previous studies (Psota, unpublished results), as varieties considerably differing in the level of dormancy. The evaluation of caryopsis dormancy was based on a set of methods currently used in malting for the determination of the germination rate and determination of the alpha-amylase activity as one of the most important parameters for the production of good-quality malt. The entire spectrum of plant growth regulators was determined to evaluate the internal homeostasis of caryopses and the possible share of the individual substances in dormancy and its fading away in the course of post-harvest maturation.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

Caryopses of barley (*Hordeum vulgare* L.), varieties Accent and Krona, differing in their level of dormancy and thus length of post-harvest maturation necessary for full caryopsis germination, were selected. The varieties were produced at the Testing Station of the Central Agricultural Control and Testing Institute in Věrovaný (harvest: 28 July 1997, 24 July 1998, 21 July 1999). The caryopses were sampled one week and three weeks before harvest, at harvest and two, five and eight weeks after harvest. Before harvest the caryopses were taken from the middle part of the ear, from harvest the caryopses were sorted on a 2.5 mm sieve.

### Malting parameters

The germinating energy is the percentage of germinated caryopses within given time (72 h) and was determined according to the EBC method (Analytica, 1987). The index and rate of germination were calculated from results obtained when estimating the germinating energy. The homogeneity of germination was determined according to Riis, Bang-Olsen (1991). The changes of activity of  $\alpha$ -amylase after 24 to 72 h of germination were also followed (MacCleary, Sheehan, 1987).

### Determination of plant growth regulators

The method of GC-MS analysis using pentadeuterated IAA as an internal standard was used to determine the

content of native indolyl-3-acetic acid (IAA) (Balla et al., 2000). For CK determination the samples were extracted for 24 hours in Bielski mixture. The extract was purified with cellulose phosphate and DEAE cellulose columns combined with C18 Sep-pack cartridges. The CKs were separated by HPLC according to Macháčková et al. (1993) and quantified by ELISA according to Strnad et al. (1990). Abscisic acid was quantified by RIA method (Quarrie et al., 1988). Gibberellins were determined by lettuce biotest (Frankland, Wareing, 1960) modified by Hradilík (1977).

For the analysis of phenolic compounds 1 g of lyophilized and ground caryopses were hydrolyzed in boiling 50 ml of 1 M HCl. After filtration and cooling the volume was set with water to 50 ml and the solution was extracted three times with 25 ml diethylether. The pooled organic phases were desiccated with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated to dryness. The dried sample was dissolved in 10 ml of 5% methanol and applied to a SPE column Oasis HLB (Waters). The eluate was evaporated and dissolved in 700  $\mu\text{l}$  of mobile phase and 30  $\mu\text{l}$  were injected to HPLC Hewlett Packard 1100 with a binary pump and DAD detector. The separation was run on a Zorbax SB C18 column (75 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , Hewlett Packard). A binary gradient was used: mobile phase A – 5% acetic acid in water and B – acetonitrile, mobile phase flow 1 ml/min at 30 °C. The detection was at 350 nm, band width 100 nm, reference 420 nm/100 nm. The calibration curve was obtained from three calibration concentrations and identification of substances was based on comparison of data with a spectral library. Following substances were identified: gallic acid, pyrocatechuic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzoic acid, p-hydroxybenzaldehyde, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, syringic acid, veratric acid.

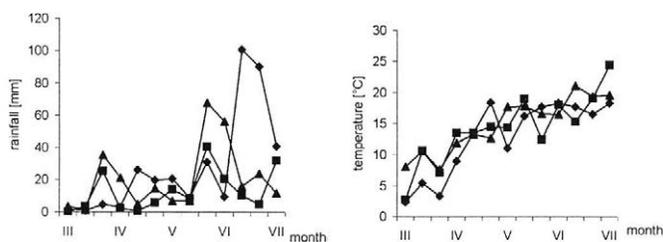
## RESULTS AND DISCUSSION

The weather during the last weeks before harvest is decisive for the level of dormancy of mature caryopses and length of post-harvest maturation (Schuurink et al., 1992a). Fig. 1 shows 10-day values of average temperatures and precipitation measured at the meteorological station in Věrovný. The investigated period before har-

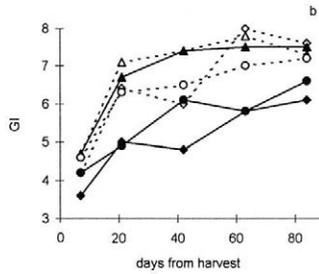
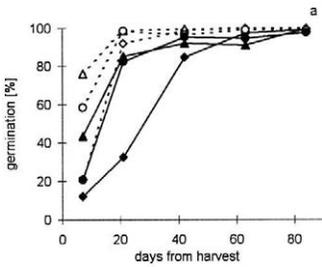
vest in 1997 (late June to late July) was the rainiest with temperatures around 17 °C, 1998 had the least rain but average temperatures ranged around 19 °C. The period before harvest in 1999 was as warm as the previous year but with more rainfall.

The germination energy, germination index, rate of germination and homogeneity of germination were used to characterize the intensity of dormancy and length of post-harvest maturation of both varieties in the respective years. The energy of germination (Fig. 2a) helped to detect the marked differences between the varieties, particularly in the first weeks after harvest. In the 6th week after harvest the differences between the varieties began to disappear. The non-dormant, viable caryopsis may not germinate quickly – it still lacks vitality (Astrup et al., 1989). Riis, Bang-Olsen (1991) suggested that the germination index (GI) can be used as a measure of vitality. The germination index is basically the average rate of caryopsis germination in the test for germination energy. It expresses the vitality of caryopses of the given sample and fairly well reflects the intensity of post-harvest maturation and the differences between the varieties (Fig. 2b). During the investigations the values of the germination index gradually grew. The germination index detected the differences between the varieties even in the 9th and 12th weeks after harvest. The germination rate (Fig. 2c) expresses the degree of vitality of the given sample. Using this character we obtained results similar to the germination index. The homogeneity of germination (Riis, Bang-Olsen, 1991) can be used to illustrate the degree of post-harvest maturation (Fig. 2d). The homogeneity of germination should be as high as possible, especially in samples with a low germination index. Basing on the results the most suitable parameters for the determination of the intensity of dormancy and thus for studying the process of post-harvest maturation occur to be the germination index and rate of germination.

The dynamics of the content of native abscisic acid considerably differed in the respective years and between the two varieties (Fig. 3). In the period of caryopsis formation before harvest the ABA level was dependent on the weather in both varieties. The ABA level and also the dormancy of caryopses were the highest in 1997, which was the coldest and most humid year. Goldbach, Michael (1976) found a similar relation

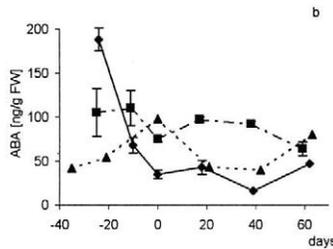
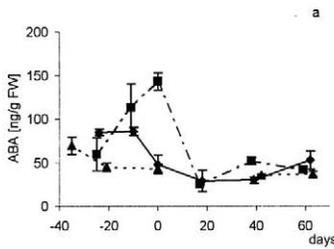
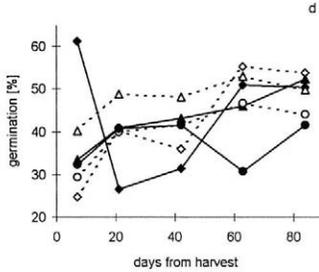
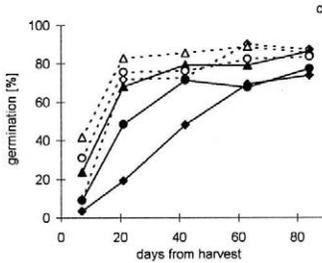


1. Rainfall (a) and mean temperatures (b) in decades during the growing season of barley in the years 1997 to 1999



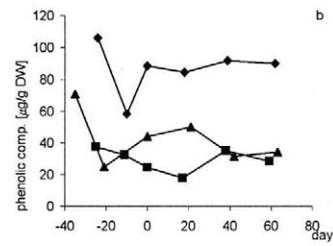
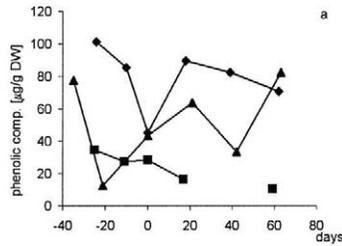
2. Germination characteristics of caryopses: a) germination energy, b) germination index, c) germination rate, d) germination homogeneity

—●— Krona 1997  
 —▲— Krona 1998  
 —●— Krona 1999  
 - - -○- - Akcent 1997  
 - - -△- - Akcent 1998  
 - - -○- - Akcent 1999



3. The content of ABA in barley caryopses in the years 1997 to 1999 during ripening and post harvest maturation; a) Akcent, b) Krona

—●— 1997  
 - - -■- - 1998  
 - - -▲- - 1999  
 0 = the day of the harvest  
 FW = fresh weight



4. The content of total phenolic compounds in barley caryopses in the years 1997 to 1999 during ripening and post harvest maturation; a) Akcent, b) Krona

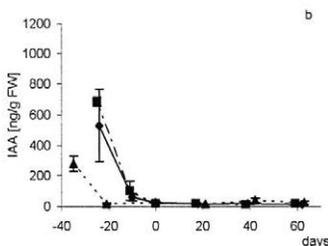
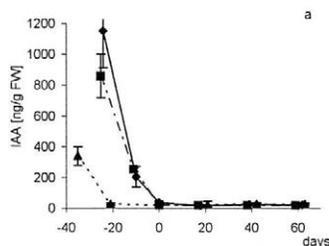
—●— 1997  
 —■— 1998  
 —▲— 1999  
 0 = the day of the harvest  
 DW = dry weight

between the ABA content in the period of the formation of caryopses and their dormancy. It was in 1997, during post-harvest maturation, that the ABA level declined to the lowest level, i.e. when the ABA level before harvest was the highest. Fluctuation of the ABA level during post-harvest maturation cannot be correlated with the increasing germination rate of the caryopses and thus with the reduced dormancy of caryopses, as was reported e.g. by Boivin et al. (1995).

Other substances, which participate in the dormancy of barley caryopses, are phenolic substances. During the three years the dynamics of the content of the individual phenolic substances was studied, in some of them a certain tendency to decrease their content during post-harvest maturation was observed (e.g. ferulic, sinapic and p-coumaric acid in 1998 in both varieties and the same substances in 1999 in Krona, unpublished data). The total content of all phenolic compounds did not

I. Activity of  $\alpha$ -amylase (units.g<sup>-1</sup>) in germinating caryopses measured during 12 weeks after harvest

Year	Variety	Germination (h)	Days after harvest				
			7	21	42	63	84
1998	Akcent	24	0.26	0.62	0.79	1.19	0.75
		48	2.96	3.06	3.00	3.07	3.03
		72	79.00	107.00	167.00	118.00	111.00
	Krona	24	0.07	0.30	0.88	1.00	0.61
		48	2.46	3.10	2.97	2.98	3.06
		72	52.00	97.00	126.00	90.00	107.00
1999	Akcent	24	4.00	3.00	6.00	4.00	14.00
		48	4.00	19.00	21.00	36.00	51.00
		72	31.00	64.00	85.00	96.00	142.00
	Krona	24	2.00	4.00	5.00	15.00	14.00
		48	4.00	15.00	35.00	24.00	65.00
		72	17.00	50.00	82.00	112.00	133.00



5. The content of IAA in barley caryopses in the years 1997 to 1999 during ripening and post harvest maturation; a) Akcent, b) Krona

—◆— 1997  
 - - -■- 1998  
 ···▲··· 1999  
 0 = the day of the harvest  
 FW = fresh weight

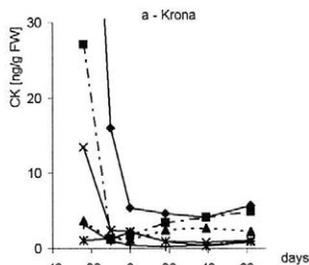
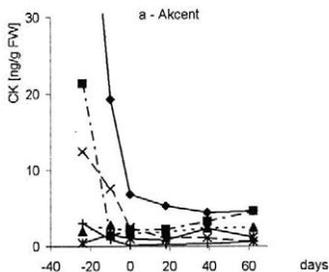
change considerably during post-harvest maturation (Fig. 4). The total content of phenolic substances was compared for the respective years and was considerably higher, particularly in Krona in 1997, obviously due to the most humid and cold weather and can be related to the deepest dormancy in this year in both varieties in all the three years. The decreased caryopsis dormancy during post-harvest maturation is obviously not connected with the reduced content of phenolic substances, but is probably caused by the slight inhibition effect of the hulls after dry storage, which is associated with delayed oxygen absorption by hulls during imbibition. As a result the embryo has enough oxygen and begins to germinate earlier than is the oxygen bound by hulls to a larger extent (Lenoir et al., 1986).

The activity of  $\alpha$ -amylase (Tab. I) in caryopses of Akcent and Krona barley during the first 72 h of germination increased, but there were differences between the varieties. The activity of  $\alpha$ -amylase in Akcent was higher over the entire studied period. The differences between the varieties were found to be the greatest in the first week after harvest. During post-harvest maturation the activity of  $\alpha$ -amylase increased and the differences between the varieties decreased. During storage the ability to produce enzymes as a reaction to the endogenous production of gibberellic acid increased (Crabb, 1971). Bioassays did not show any significant

differences in the endogenous level of gibberellins in the course of post-harvest maturation and neither between the varieties (unpublished data). The quicker activation of  $\alpha$ -amylase in Akcent is probably associated with the better capacity of the aleurone layer to respond to the gibberellin signal (Bakhuizen et al., 1995).

The levels of IAA and CK were the highest during caryopsis filling. The content of native IAA in the caryopses during full maturity rapidly decreased (Fig. 5). The entire spectrum of cytokinins was determined in 1998 only. Before harvest the contents of zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), zeatin-O-glucoside (ZOG) (Fig. 6a), dihydrozeatin (DHZR) (Fig. 6b), ortho-topolin (oT) (Fig. 7a), meta-topolin-O-glucoside (mTOG) (Fig. 7b) were increased in the caryopses of both varieties, and the levels of all these CK considerably decreased in the time of harvest. The level of isopentenyl adenine (iP) (Fig. 6c) and its conjugates temporarily increased in the last week before harvest. One week before harvest until three weeks after harvest, the content of benzyladenine (BAP) (Fig. 8) in the caryopses was very high. The majority of cytokinins participate mainly in processes associated with the formation of the storing capacity of the caryopses and then with the attraction of assimilates into the fruit (sinks).

In conclusion we could say that the weather from the stage of milk ripeness to full maturity considerably in-



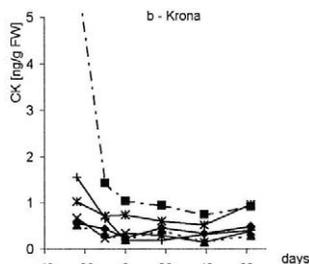
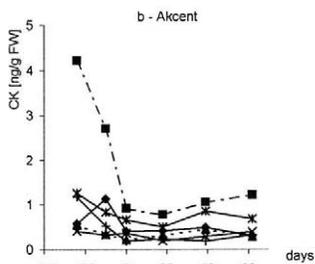
6. The content of isopentenyl cytokinins in barley caryopses in the year 1998 during ripening and post harvest maturation in varieties Akcent and Krona

0 = the day of the harvest

FW = fresh weight

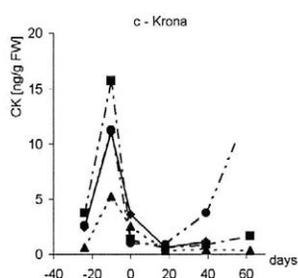
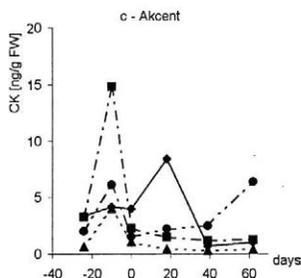
a)

- Z = zeatin
- ZR = zeatin riboside
- ▲— Z9G = zeatin-9-glucoside
- ×— ZOG = zeatin-O-glucoside
- \*— ZROG = zeatin riboside-O-glucoside
- +— ZRMP = zeatin riboside monophosphate



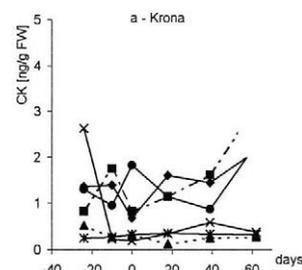
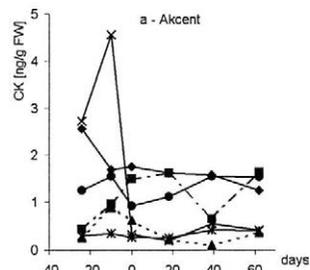
b)

- DHZ = dihydrozeatin
- DHZR = dihydrozeatin riboside
- ▲— DHZ9G = dihydrozeatin-9-glucoside
- ×— DHZOG = dihydrozeatin-O-glucoside
- \*— DHZROG = dihydrozeatin riboside-O-glucoside
- +— DHZRMP = dihydrozeatin riboside monophosphate



c)

- iP = isopentenyl adenine
- iPR = isopentenyl adenosine
- ▲— iP9G = isopentenyl adenine-9-glucoside
- iPRMP = isopentenyl adenosine monophosphate



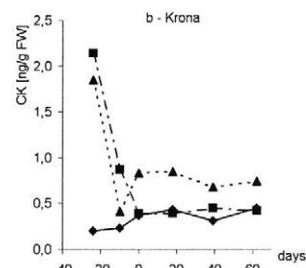
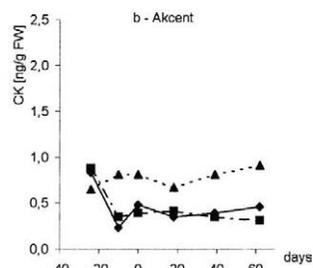
7. The content of aromatic cytokinins in barley caryopses in the year 1998 during ripening and post harvest maturation in varieties Akcent and Krona

0 = the day of the harvest

FW = fresh weight

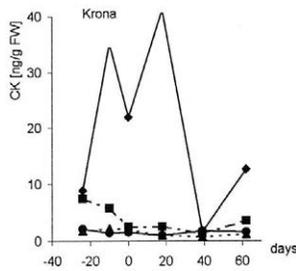
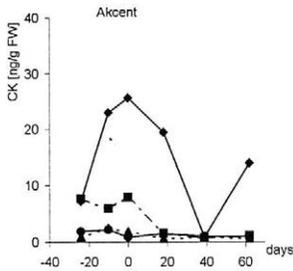
a)

- mT = m-topolin
- mTR = m-topolin riboside
- ▲— mT9G = m-topolin-9-glucoside
- ×— mTOG = m-topolin-O-glucoside
- \*— mTROG = m-topolin riboside-O-glucoside
- +— mTRMP = m-topolin riboside monophosphate



b)

- o-T = o-topolin
- o-TR = o-topolin riboside
- ▲— o-T9G = o-topolin-9-glucoside



8. The content of benzyladenine cytokinins in barley caryopses in the year 1998 during ripening and post harvest maturation in varieties Akcent and Krona  
0 = the day of the harvest  
FW = fresh weight  
—●— BAP = benzyladenine  
---■--- BAPR = benzyladenosine  
...▲... BAP9G = benzyladenine-9-glucoside  
—◆— BAPRMP = benzyladenosine monophosphate

fluences the manifestation of genetic prerequisites for the dormancy of barley caryopses. In the period of 1997 to 1999, the level of dormancy was the highest in the first year when precipitation was the highest and temperatures were, on average, by about two degrees lower. Although the Akcent and Krona varieties can be differentiated not only immediately after harvest, but also in the course of post-harvest maturation using the index and rate of germination, the differences between the two varieties were the greatest in 1997. Krona, the genetically based more dormant variety, was more sensitive to the cooler and more humid conditions. In the period when the caryopsis is most sensitive to weather effects, also the ABA content differed most, corresponding with the assumption that in a colder and more humid climate when more dormant caryopses appear, the ABA content is higher.

#### Acknowledgement

The authors would like to thank J. Blažková, B. Klejduš, Š. Klíčová, D. Smolíková, M. Strnad and H. Vítková for their excellent co-operation. The present study was carried out under support of the Grant Agency of the Czech Republic project No. 506/97/366.

#### REFERENCES

Analytica-EBC (1987): Brauerei- und Getränke- und Getränerkunderschau, 4th ed. Zürich.  
Aastrup S., Riis P., Hansen J. R. (1989): Higher vigour – The basis for high malting barley quality. In: Proc. 22nd Eur. Brew. Conv. Congr. Zürich: 171–178.  
Bakhuizen R., Veen S. W. van der, Sinjorgo K. M. C., Doderer A. (1995): Aleurone dormancy in malting barley. In: Proc. 25th Eur. Brew. Conv. Congr.  
Balla J., Blažková J., Reinöhl V., Procházka S. (2000): Isolated pea buds – an approach for apical dominance studies. Pl. Physiol. (in press).  
Boivin P., Kohl S., Clamagirand V. (1995): Barley endogenous phytohormones and malting performance. Bios Boissons Condit., 26: 119–124.  
Briggs D. E. (1995): Aspects of dormancy. In: Brewing room book 1995–1997. Pauls Malt.: 31–35.

Buraas T., Skinnes H. (1984): Genetic investigations on seed dormancy in barley. Hereditas, 101: 235–244.  
Buraas T., Skinnes H. (1985): Development of seed dormancy in barley, wheat and triticale under controlled conditions. Acta Agric. Scand., 35: 233–244.  
Corbineau F., Come D. (1996): Barley seed dormancy. Bios Boissons Condit., 27: 113–119.  
Crabb D. (1971): Changes in the response to gibberellic acid of barley endosperm slices during storage. J. Inst. Brew., 77: 522–528.  
Foley M. E., Fennimore S. A. (1998): Genetic basis for seed dormancy. Seed Sci. Res., 8: 173–182.  
Frankland B., Wareing P. F. (1960): Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. Nature, 185: 255–256.  
Goldbach H., Michael G. (1976): Abscisic acid content of barley grains during ripening as affected by temperature and variety. Crop. Sci., 16: 797–799.  
Hradilík J. (1977): Vliv exogenní kyseliny giberelové (GA<sub>3</sub>) na prodloužení hypokotylů některých sort salátu (*Lactuca sativa* L.). Acta Univ. Agric. Brno, Fac. Agron., 25: 3–9.  
Lenoir C., Corbineau F., Come D. (1983): Principales caractéristiques de la formance de l'orge de brasserie et de son élimination. Bios, 14: 24–29.  
Lenoir C., Corbineau F., Come D. (1986): Barley (*Hordeum vulgare*) seed dormancy as related to glumela characteristic. Physiol. Plant., 68: 301–307.  
MacCleary B. V., Sheehan H. (1987): Measurement of cereal alfa-amylase: A new assay procedure. J. Cereal. Sci., 6: 237–251.  
Macháčková I., Krekule J., Eder J., Seidlová F., Strnad M. (1993): Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. Physiol. Plant., 87: 160–166.  
Quarrie S. A., Whitford P. N., Appleford N. E. J., Wang T. L., Cook S. K., Henson L. E., Laveys B. R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. Planta, 173: 330–339.  
Riis S., Bang-Olsen K. (1991): Germination profile – A new term in barley analysis. In: Proc. 23rd Eur. Brew. Conv. Congr. Lisbon: 101–108.  
Schuurink R. C., Beckum J. M. M. van, Heidekamp F. (1992a): Modulation of grain dormancy in barley by variation of plant growth conditions. Hereditas, 117: 137–143.

- Schuurink R. C., Sedee N. J. A., Wang M. (1992b): Dormancy of the barley grain is correlated with gibberellic acid responsiveness of the isolated aleurone layer. *Pl. Physiol.*, *100*: 1834–1839.
- Strnad M., Vaněk T., Binarová P., Kamínek M., Hanuš J. (1990): Enzyme immunoassays for cytokinins and their use for immunodetection of cytokinins in alfalfa cell-cultures. In: Kutáček M., Elliott M. C., Macháčkova I. (eds.): *Molecular aspects of hormonal regulation of plant development*. The Hague, SPB Acad. Publ.: 41–54.
- Wang M., Bakhuizen R., Heimovaara-Dijkstra S., Zeijl M. J. van, Vries M. A. de, Beckum J. M. van, Sinjorgo K. M. C. (1994): The role of ABA and GA in barley grain dormancy: A comparative study between embryo and aleurone dormancy. *Russ. J. Pl. Physiol.*, *41*: 577–584.
- Wang M., Heimovaara-Dijkstra S., Duijn B. van (1995): Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta*, *195*: 586–592.

Received on January 20, 2000

---

*Corresponding author:*

Prof. RNDr. Jan Hradilík, CSc., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, tel.: +420 5 45 13 30 17, fax: +420 5 45 13 30 13, e-mail: hradilik@mendelu.cz

---

# TVORBA BIOMASY PŘI ROZDÍLNÉM OŠETŘOVÁNÍ TRAVNÍCH POROSTŮ BEZ PÍCNINÁŘSKÉHO VYUŽITÍ

## THE PRODUCTION OF BIOMASS BY DIFFERENT MANAGEMENT OF GRASSLANDS WITHOUT USING FOR FORAGE PRODUCTION

J. Fiala, J. Gaisler

Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyně, Research Station of Grassland Ecosystems, Liberec, Czech Republic

**ABSTRACT:** The consequences of non-management grasslands are not known because up till now it has not been necessary to study the problems. But the spontaneously production biomass influences botanical composition of grasslands, production and decomposition of biomass and bottom water quality – especially nitrates concentration. This work is a part of the solved problem of a relative balance of forming plant biomass and its decomposition. Each plant material is partly mineralised and humified (Dykyjová et al., 1989). We expect the amount of organic soil mass remains roughly constant year by year consequently there is a balance between inputs and outputs of organic substance (Rychnovská et al., 1987). These results are to be completed and developed because they do not issue from grasslands studies whose system of use was on principle changed. That is, why in the years 1997 to 1999 we evaluated the influence of a different way of treatment on biomass formation of grasslands. The results are compared with standard management, thus two-cut plant with removal of mass. The other variant is let without management – green fallow and in further variants the grassland of association *Trifolio-Festucetum rubrae* Oberdorfer 1957 are influenced by different frequency and times of cutting and mulching always with leaving mass on cut out. During a relatively short period of three years there is a great variability of results (Tab. I). As to the formation of the total biomass there is not a significant difference between variants. The trend of development for three years can be defined with difficulty. However, we can make out the dependence of yield on the number of cutting out (mulching). It is conforming to harvested growths, thus the yield of the first cutting is going down with the number of cutting during the year. But this is not valid more by the fraction of stubble and litter. By underground biomass where a decisive part is formed with roots the dependence of production of biomass on frequency of cutting (mulching) is also indicated. The trends are not unambiguous in such a short time period. Weight of total biomass ranged on average of three years between 20.5 and 28 t dry matter.ha<sup>-1</sup>, highest by once mulched treatments and least by twice managed plots. Rate of above-ground biomass in total biomass was by all treatments between 22 and 27% (Fig. 2). Amount of litter inclusive mulched or cut biomass was found in spring 1999 and it was highest by treatment once mulched in September (1.75 t.ha<sup>-1</sup>) and least by harvested treatment (0.12 t.ha<sup>-1</sup>) (Fig. 1). Significant differences in litter inclusive cut or mulched biomass between treatments are shown in Tab. II.

**Keywords:** unharvested grasslands; production of biomass; management

**ABSTRAKT:** Spontánně produkovaná biomasa travních porostů pícninářsky nevyužívaných zatěžuje a mění travní ekosystémy. Na velkých plochách porostů, ležících ladem nebo sporadicky mulčovaných, se mění především jejich botanické složení a nárůst a rozklad biomasy. V jihozápadní části Jizerských hor na porostu bližícím se svým botanickým složením asociaci *Trifolio-Festucetum rubrae* Oberdorfer 1957, který byl šest let ponechán ladem, bylo v roce 1997 založeno deset variant s různým způsobem obhospodařování (zelený úhor, sečení s odstraněním hmoty, sečení s ponecháním hmoty na pokose a mulčování s různými termíny a frekvencí zásahů). Za sledované období nebyly v množství celkové biomasy u jednotlivých způsobů zjištěny průkazné rozdíly. Přesto můžeme konstatovat mírnou závislost hospodářského výnosu v termínu první seče na počtu sečí (mulčování). Zjednodušeně je nepřímo úměrná počtu sečí, podobně jako u sklizených porostů. Obdobný trend byl zjištěn i u podzemní biomasy. Hmotnost celkové biomasy se v průměru za tři roky pohybovala mezi 20,5 a 28 t sušiny.ha<sup>-1</sup>, přičemž nejvyšší byla u variant jedenkrát mulčovaných a nejnižší u dvakrát ročně ošetřených ploch. Podíl nadzemní hmoty na celkové biomase se u všech variant pohyboval mezi 22 a 27 %.

**Klíčová slova:** nesklizené travní porosty; tvorba biomasy; způsoby ošetřování

### ÚVOD

Travní porosty, které se pícninářsky nevyužívají – zůstávají ladem nebo se udržují různým způsobem, za-

znamenávají změny, které jsou dány především floristickým složením, nárůstem a rozkladem celkové biomasy a kvalitou podzemní vody. Ošetřování těchto porostů by mělo napomoci k rovnováze mezi tvorbou biomasy

a jejím rozkladem (pokud nebude odstraněna). Základní podmínkou ovšem musí být, že mineralizace biomasy ani struktura výsledného porostu nesmí dlouhodobě narušit životní prostředí. Dále je důležité, aby voda (pokud možno bez škodlivin) byla co nejdéle zadržena a využita travními porosty (Rychnovská et al., 1987).

Zachování kulturního porostu a jeho stability vyžaduje energetické vstupy dané formou obhospodařování. Pozměněné travní ekosystémy jsou labilnější a zcela neplní žádoucí mimoprodukční funkce při ochraně půdy, vody a zachování biodiverzity (Dykyjová et al., 1989).

Předložená práce hodnotí vztah mezi různými způsoby ošetřování (i ponechání ladem) travních porostů a hmotností vyprodukované biomasy. Řešení tohoto problému je důležitou součástí projektu *Modifikovaná pratotechnika*, jehož cílem je ekologicky šetrně a ekonomicky přijatelně ošetřovat travní porosty, které se nevyužívají pro produkci píce. Tento vědní obor se u nás ani ve světě dosud nezabýval problémem, jak ošetřovat nevyužívané louky a pastviny bez negativních dopadů.

## MATERIÁL A METODY

Pozorování byla zahájena v roce 1997 na stanovišti Mníšek u Liberce (nadmořská výška 420 m, průměrná roční teplota 7,2 °C, roční úhrn srážek 803 mm, kambizem kyselá, pH 4,7). Porost se svým složením blížil svazu *Arrhenatherion* (asociace *Trifolio-Festucetum*

*rubrae* Oberdorfer 1957). Na pokusné ploše bylo založeno deset variant s různými způsoby obhospodařování ve čtyřech opakováních s plochou parcel 35 m<sup>2</sup>:

1. 2x sečení s odstraněním hmoty (5. 6. a 15. 8.)
2. kontrola bez obhospodařování
3. 1x sečení s ponecháním hmoty (15. 7.)
4. 2x sečení s ponecháním hmoty (5. 6. a 15. 8.)
5. 3x sečení s ponecháním hmoty (25. 5., 15. 7. a 25. 9.)
6. 1x mulčování (25. 5.)
7. 1x mulčování (15. 7.)
8. 1x mulčování (25. 9.)
9. 2x mulčování (5. 6. a 15. 8.)
10. 3x mulčování (25. 5., 15. 7. a 25. 9.)

Na jednotlivých variantách byly odebrány vzorky pro určení hospodářského výnosu, množství veškerého opadu a strniště na ploškách 0,04 m<sup>2</sup> vždy v termínu 25. 5. až 5. 6. Ve stejném termínu byla pomocí sondryky o průměru 0,05 m zjišťována hmotnost podzemní biomasy v hloubce 0 až 0,2 m. Pro porovnávací rozdíly mezi jednotlivými variantami byla použita analýza variance a Tukeyův test.

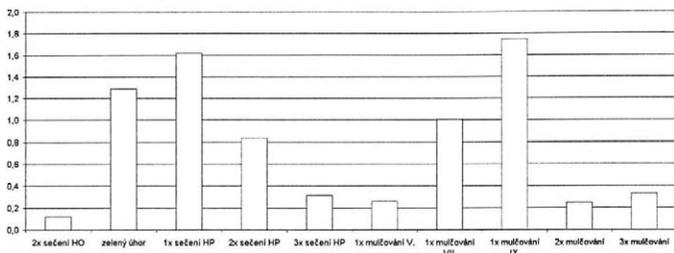
## VÝSLEDKY A DISKUSE

Hmotnosti jednotlivých částí celkové rostlinné biomasy v sušině uvádí tab. I. Zachycuje stav vždy v ob-

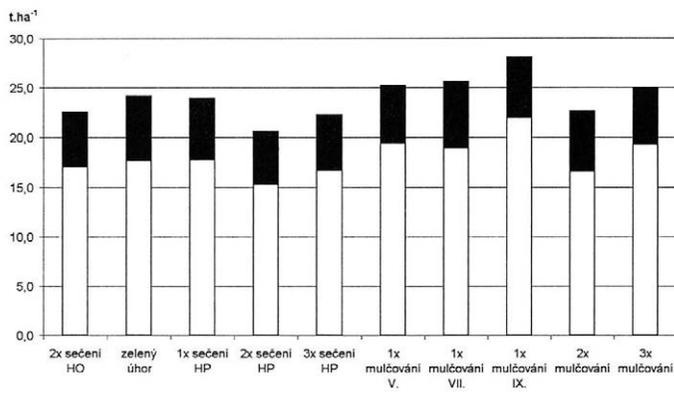
I. Celková biomasa a její složky (t sušiny.ha<sup>-1</sup>) při různém obhospodařování – Total biomass and its parts (t dry matter.ha<sup>-1</sup>) under different management

Rok <sup>1</sup>	Varianta <sup>3</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1997	hospodářský výnos <sup>4</sup>	3,23	3,80	3,30	3,05	3,45	3,56	2,20	3,60	3,40	3,08
	strniště + opad <sup>5</sup>	3,94	4,08	3,17	3,14	3,87	3,30	3,86	3,12	3,88	3,68
	nadzemní biomasa <sup>6</sup>	7,17	7,88	6,47	6,19	7,32	6,86	6,06	6,72	7,28	6,76
	podzemní biomasa <sup>7</sup>	16,95	20,89	20,31	15,75	17,12	20,00	19,50	23,25	14,25	16,97
	celková biomasa <sup>8</sup>	24,12	28,77	26,78	21,94	24,44	26,86	25,56	29,97	21,53	23,73
1998	hospodářský výnos	1,47	1,69	1,41	1,69	2,07	2,00	1,93	1,78	1,47	2,10
	strniště + opad	1,59	1,74	0,92	1,56	1,59	1,25	1,94	1,55	1,73	2,02
	nadzemní biomasa	3,06	3,43	2,33	3,26	3,67	3,25	3,87	3,33	3,20	4,12
	podzemní biomasa	13,65	16,42	16,02	12,52	13,28	20,33	15,96	21,12	14,44	18,22
	celková biomasa	16,71	19,85	18,35	15,77	16,94	23,58	19,83	24,44	17,64	22,33
1999	hospodářský výnos	3,84	4,65	5,29	3,96	3,02	3,83	5,63	5,29	4,10	2,76
	strniště + opad	2,54	3,41	4,56	2,54	2,74	3,47	4,41	2,92	3,66	3,39
	nadzemní biomasa	6,38	8,07	9,85	6,50	5,76	7,30	10,04	8,20	7,76	6,15
	podzemní biomasa	20,46	15,76	16,82	17,57	19,66	17,86	21,28	21,53	20,89	22,58
	celková biomasa	26,85	23,83	26,67	24,07	25,42	25,16	31,31	29,74	28,66	28,72
Průměr <sup>2</sup>	hospodářský výnos	2,85	3,38	3,33	2,90	2,85	3,13	3,25	3,55	2,99	2,65
	strniště + opad	2,69	3,08	2,88	2,41	2,73	2,67	3,40	2,53	3,09	3,03
	nadzemní biomasa	5,54	6,46	6,22	5,32	5,58	5,80	6,66	6,08	6,08	5,67
	podzemní biomasa	17,02	17,69	17,72	15,28	16,68	19,40	18,91	21,97	16,53	19,25
	celková biomasa	22,56	24,15	23,93	20,59	22,27	25,20	25,57	28,05	22,61	24,93

<sup>1</sup>year, <sup>2</sup>average, <sup>3</sup>treatment, <sup>4</sup>yield, <sup>5</sup>stubble + litter, <sup>6</sup>above-ground biomass, <sup>7</sup>underground biomass, <sup>8</sup>total biomass



1. Hmotnost nerozloženého opadu včetně mulčované nebo posečené hmoty (t sušiny.ha<sup>-1</sup>); jaro 1999 – Weight of undecomposed litter inclusive of mulched or cut biomass (t dry matter.ha<sup>-1</sup>); spring 1999



2. Hmotnost nadzemní a podzemní biomasy travního porostu (t sušiny.ha<sup>-1</sup>) při různém ošetřování – Weight of above-ground and underground biomass of grassland (t dry matter.ha<sup>-1</sup>) under different management

Vysvětlivky k obr. 1 a 2 – Explanations to Figs. 1 and 2:

- HO = hmota odstraněná – removed biomass
- HP = hmota ponechána – left biomass
- V., VII., IX. = měsíce – months
- nadzemní biomasa – above-ground biomass
- podzemní biomasa – underground biomass
- sečení – cutting
- mulčování – mulching
- zelený úhor – green fallow

dobí konce května až začátku června. Podíl stařiny (odumřelé nadzemní biomasy), který není ve výsledcích uveden, je již obsažen v položkách hospodářského výkonu, strniště a opadu. Pro vyjádření rozdílů hmotnosti jednotlivých frakcí a celkové biomasy mezi variantami jsme stanovili průměrné hodnoty, což usnadní vyhodnotit, kterým způsobem ošetřování je možné lépe zachovat rovnováhu mezi tvorbou a rozkladem organické hmoty.

Rozdíly v tvorbě biomasy mezi variantami nebyly statisticky průkazné. Byly zjištěny pouze rozdíly ročníkové, zejména u nadzemní biomasy, které byly způsobeny zřejmě průběhem počasí v období největšího nárůstu biomasy, tj. na konci dubna a v květnu. V roce 1998 byl zaznamenán podstatně nižší hospodářský výkon, přičemž v období poslední dekády dubna a prvních dvou dekád v květnu spadlo při poměrně vysokých teplotách pouze 5 mm srážek. V letech 1997 a 1999

II. Průkaznost rozdílů v množství nerozloženého opadu včetně mulčované nebo posečené hmoty (Tukey-test) – Significance of differences in amount of undecomposed litter inclusive mulched or cut biomass (Tukey-test)

Varianta <sup>1</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	–	**	**	**	NS	NS	**	**	NS	NS
2	**	–	NS	NS	**	**	NS	NS	**	**
3	**	NS	–	**	**	**	*	NS	**	**
4	**	NS	**	–	NS	*	NS	**	*	NS
5	NS	**	**	NS	–	NS	**	**	NS	NS
6	NS	**	**	*	NS	–	**	**	NS	NS
7	**	NS	*	NS	**	**	–	*	*	**
8	**	NS	NS	**	**	**	*	–	*	**
9	NS	**	**	*	NS	NS	*	*	–	NS
10	NS	**	**	NS	NS	NS	**	**	NS	–

F = 23,954

NS = neprůkazné rozdíly – not significant differences

\* průkazné rozdíly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  – significant differences at a significance level  $\alpha = 0.05$

\*\* průkazné rozdíly na hladině významnosti  $\alpha = 0,01$  – significant differences at a significance level  $\alpha = 0.01$

<sup>1</sup>treatment

v tomto období bylo naměřeno 75, resp. 39 mm srážek. Hospodářský výnos tvořil pouze 11 až 14 % hmotnosti celkové biomasy a pohyboval se v průměru tří let mezi 2,65 a 3,55 t.ha<sup>-1</sup>. Byl nepřímě úměrný počtu sečí (mulčování), což je obdobné jako u sklizených porostů. Podobné hodnoty u nesklizených porostů zjistil Bakker (1989) u porostu s dominantní *Festuca rubra* L., u porostu mulčovaného v červenci udává výnos okolo 4 t.ha<sup>-1</sup>, při mulčování jednou za dva roky okolo 3 t.ha<sup>-1</sup>. Rovněž Kvítek et al. (1998) zjistili u mulčovaného porostu (avšak v minulosti setého) výnos sušiny okolo 3 t.ha<sup>-1</sup>. Podíl strniště a opadu na celkové hmotnosti byl u našeho porostu 9 až 13 % bez průkazných rozdílů. Na začátku vegetace 1999 bylo zjištěno množství nerozložené nadzemní hmoty (opadu a mulčované či posečené hmoty). Největší hodnoty byly nalezeny u varianty mulčované jednou na podzim, protože téměř veškerá mulčovaná hmota zůstala přes zimu nerozložená, tj. 1,75 t.ha<sup>-1</sup> (obr. 1). Velké množství bylo zjištěno u varianty jednou sečené v červenci (1,62 t.ha<sup>-1</sup>) a jednou mulčované ve stejném termínu (1,01 t.ha<sup>-1</sup>), což lze vysvětlit špatnými rozkladnými podmínkami v suchých měsících. Nejmenší množství nerozložené biomasy bylo u varianty sklizené (0,12 t.ha<sup>-1</sup>), poměrně nízké hmotnosti byly zaznamenány u dva- až třikrát sečených nebo mulčovaných ploch. Malé množství opadu bylo také u varianty mulčované jednou na jaře, kdy byly pro rozkladné procesy ideální podmínky (vlhkost, teplota), množství nerozložené hmoty bylo téměř porovnatelné s plochami dva- nebo třikrát mulčovanými či sečenými. Průkazné rozdíly mezi variantami ukazuje tab. II.

Podzemní biomasa, tj. část odnožovací zóny a kořeny, tvořila z celkové biomasy podstatnou část 73 až 78 % (obr. 2). Fiala (cit. Rychnovská, 1993) udává u asociace *Trifolium-Festucetum rubrae* Oberdorfer 1957 z Českomoravské vrchoviny dokonce více než 90% podíl na celkové biomase porostu. Fiala (1980) uvádí dobu obratu podzemní biomasy dva až dva a půl roku. To znamená, že roční nárůst, ale přibližně i rozklad v rhizosféře činí 10 t sušiny.ha<sup>-1</sup>. Z roční bilance rozkladných produktů v travním ekosystému (Rychnovská et al., 1987) lze odvodit, že toto množství organické hmoty se rovná přibližně 5 t C.ha<sup>-1</sup>. Z toho se 80 % uvolní jako CO<sub>2</sub>, ale zbytek, tj. 1 t.ha<sup>-1</sup>, je inkorporován do humusu. Zvyšováním obsahu uhlíku, resp. humusu v půdě se dusík více poutá do organických forem a méně ho uniká ve formě nitrátů do podzemních vod (Dykyjová et al., 1989). Je-li ovšem v půdě pod travními porosty zachován poměr C : N 10 až 20 : 1, je

podstatná tvorba nadzemní hmoty, prostřednictvím které (pratotechnickými zásahy) je ovlivněn nárůst celkové biomasy. Pro stabilitu travního ekosystému je důležitý větší počet zastoupených druhů v porostu (40 až 60), čemuž lze napomoci právě menší hmotností nadzemní biomasy a jejím pravidelným rozmístěním na pokose. Z tohoto hlediska se nejvíce přibližují ideálnímu stavu (tj. dvakrát sklizeným porostům) varianty, které sečeme nebo mulčujeme třikrát ročně. U sklizeného porostu byla produkce nadzemní biomasy 5,54 t sušiny.ha<sup>-1</sup> a třikrát sečené nebo mulčované porosty produkovaly 5,58 až 5,67 t.ha<sup>-1</sup>. Z ekonomického hlediska je však vhodnější dvakrát mulčovat nebo na nezaplevelených porostech jedenkrát mulčovat v pozdním termínu, kdy byla produkce vyšší pouze o 0,5 t.ha<sup>-1</sup>.

Pro určení závislosti tvorby biomasy na jednotlivých způsobech ošetření je však třeba realizovat dlouhodobější pozorování, protože různé způsoby ošetřování mají také vliv na změny v botanickém složení porostu a výskyt prázdných míst bez pokryvu, s čímž souvisí i rozdílná tvorba biomasy, popřípadě její rozklad (odumřelá hmota jedinců *Festuca rubra* se bude zřejmě rozkládat jinou rychlostí než měkké části dvouděložných druhů). V průběhu dosavadního sledování nedošlo k žádné typologické alternaci a u všech sledovaných variant zůstala dominantní *Festuca rubra*.

Tato práce byla finančně podporována GA ČR (521/97/0068).

## LITERATURA

- Bakker J. P. (1989): Nature management by grazing and cutting. Geobotany 14. London. Kluwer Acad. Publ.: 275–282.
- Dykyjová D. et al. (1989): Metody studia ekosystémů. Praha, Academia: 523–545.
- Fiala K. (1980): Roční produkce a rychlost obratu podzemní rostlinné biomasy lučního porostu. In: Sbor. Ref. Ekológia trávneho porastu, Banská Bystrica, VÚLP: 199–209.
- Kvítek T., Klímová P., Šonka J. (1998): Vliv mulčování na botanické složení a pokryvnost lučního porostu, evapotranspiraci a vlhkost půdy. Rostl. Výr., 44: 553–560.
- Rychnovská M. et al. (1987): Metody studia travinných ekosystémů. Praha, Academia: 56–65, 114–124.
- Rychnovská M. (ed.) (1993): Structure and functioning of seminatural meadows. Praha, Academia: 133–136.

Došlo 18. 11. 1999

### Kontaktní adresa:

Ing. Josef Fiala, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, Výzkumná stanice travních ekosystémů Liberec, Rolnická 6, pošt. příhr. 15, 460 11 Liberec 11, Česká republika, tel.: +420 48 510 37 18, fax: +420 48 510 37 18, e-mail: grass@mbox.vol.cz

# PŘÍJEM KADMIA A ZINKU ROSTLINAMI OVSA PO APLIKACI ČISTÍRENSKÝCH KALŮ OŠETŘENÝCH VÁPENCEM A BENTONITEM

## CADMIUM AND ZINC UPTAKE BY OAT FROM SOILS AMENDED BY SEWAGE SLUDGE INCUBATED WITH LIME AND BENTONITE

J. Balík, P. Tlustoš, D. Pavlíková, J. Száková, S. Kaewrahn, A. Hanč

*Czech University of Agriculture in Prague, Czech Republic*

**ABSTRACT:** The effect of application of differently treated and incubated sludge on the accumulation of Cd and Zn in oat biomass (variety Pan) was investigated in pot experiment. Three soils (Chernozems, Luvisols and Fluvisols) and three sewage sludges were tested in the experiment. Sewage sludge treated by bentonite in the amount of 30% of dry matter of sludge and by calcium carbonate in the amount of 18% was preincubated for eight months under aerobic and anaerobic environment at temperature of 20 °C. Fresh sludge in the rate of 33.33 g of dry matter was homogenized with 5 kg of soil and with NPK in the amount of 1 g N, 0.16 g P and 0.4 g K applied as solution of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Mixture was inserted into pots and sown by oat seeds. Green biomass of oat was harvested and analyzed. The oat Cd and Zn contents were substantially affected by tested soil. The highest accumulation of both elements in oat biomass was determined at Fluvisols. The addition of lime more affected content of elements in oat biomass than bentonite application. Cd and Zn contents in plants were not influenced by the presence of air during sludge incubation. Positive effect of lime addition into sludge was confirmed by lower extractable content of both elements from treated soils by  $0.01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  and by  $0.025 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NH}_4\text{EDTA}$  solution. Extraction of elements by  $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$  did not show any difference among treatments. Availability of both elements determined by  $0.01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  solution correlated with their uptake by plants very well.

**Keywords:** sewage sludge; bentonite; lime; cadmium; zinc; oat

**ABSTRAKT:** V nádobových vegetačních pokusech byl zjišťován vliv aplikace různě ošetřených čistírenských kalů na obsah Zn a Cd v rostlinách. Experimenty proběhly se třemi různými zeminami (černozem, hnědozem, fluvizem) a se třemi kaly. Pokusnou plodinou byl oves (odrůda Pan). Byly sledovány kaly předem preinkubované po dobu osmi měsíců při teplotě 20 °C za aerobních i anaerobních podmínek s přidavkem bentonitu (30 % z množství sušiny kalu) a dále ošetřené uhličitánem vápenatým (18 %  $\text{CaCO}_3$  z množství sušiny kalu). U všech variant bylo kromě kalu použito NPK hnojení. Oves byl sklizen v mléčně-voskové zralosti. Obsah Zn a Cd v rostlinách byl významně ovlivněn použitou zeminou. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny na fluvizemi. Byla nalezena vyšší účinnost omezení transferu Cd a Zn do rostlin při použití vyvápňených čistírenských kalů než kalů ošetřených bentonitem. Nebyly stanoveny rozdíly v obsazích Cd v rostlinách u variant s kaly preinkubovanými za různých podmínek aerace. Pozitivní účinek vápnění na zvýšení pevnosti sorpce Zn a Cd v kalech byl prokázán také sníženým obsahem těchto prvků v půdě po extrakci  $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  a  $0,025 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NH}_4\text{EDTA}$ . Při použití výluhu  $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$  nebyly zaznamenány rozdíly mezi jednotlivými variantami. Extrahovatelná množství Cd a Zn  $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  velmi dobře charakterizovala příjem těchto prvků rostlinami.

**Klíčová slova:** čistírenské kaly; bentonit; vápnění; kadmium; zinek; oves

### ÚVOD

Eliminace negativních vlastností čistírenských kalů je stále aktuálním tématem výzkumných aktivit řady pracovišť. Z inkubačních pokusů s různými zeminami a s kaly preinkubovanými osm měsíců vyplývá omezená mobilita Cd a Zn v půdě u variant s kaly ošetřenými  $\text{CaCO}_3$  (Balík et al., 1999; Balík et al., 2000a, b), což bylo odvozeno na základě extrakce prvků různými vyluhovadly. Také analýzy postupné frakcionace samot-

ných vyvápňených kalů potvrzují tento závěr (Kaewrahn, 1999). Snížená mobilita Cd byla také zjištěna ve vegetačních pokusech s vyvápňenými kaly. Růžek et al. (1999) stanovili snížení obsahu Cd a Zn v rostlinách hořčice v modelových pokusech v klimaboxu u kalů, ke kterým byl přidán oxid vápenatý v dávce 10 % z množství sušiny. Autoři dále konstatují omezení příjmu Cd a Zn v nádobových vegetačních pokusech s jíllem vtrvalým. Kromě aplikace vyvápňených kalů je sledována možnost imobilizace rizikových prvků v půdách ap-

likací vápenatých hmot na pozemcích určených pro využití kalů (Whatmuff, 1999).

Jako další možný meliorant pro omezení mobility rizikových prvků v kalech lze využít bentonit. V inkubačních pokusech se zeminami (Balík et al., 2000a, b) se však nepotvrdil předpoklad o jeho vhodnosti za účelem snížení mobility Cd a Zn v kalech. Přitom ve vegetačních pokusech, v nichž bylo aplikováno vysoké množství bentonitu přímo do půdy, byl zaznamenán snížený obsah rizikových prvků v rostlinách. Richter, Hlušek (1991) stanovili významné snížení obsahu Cd v nati a Zn v nati i hlízách brambor. Chlopecka, Adriano (1997) zjistili statisticky průkazné omezení příjmu Zn rostlinami kukuřice na variantách s přidavkem zeolitu do půdy. Sims, Boswell (1978) rovněž uvádějí, že přidavek bentonitu (2,5, 5 a 10 %) snížil množství mobilního Zn a Cd v zeminách po aplikaci kalů.

Cílem práce bylo určit vliv aplikace vyvápňených kalů a kalů s přidavkem bentonitu na obsah Zn a Cd v rostlinách a dále sledovat změny v uvolnitelných obsazích Zn a Cd z půdy při použití různých extrakčních činidel.

## MATERIÁL A METODY

Nádobové vegetační pokusy byly realizovány se třemi různými zeminami: černozem, hnědozem, fluvizem (tab. I). Experimenty proběhly se šestiměsíčním odstupem od inkubačních pokusů (Balík et al., 1999; Balík et al., 2000a, b). Ačkoli jde o zeminy odebrané z identické lokality, jsou zde určité rozdíly v celkových obsazích Zn a Cd. Pokusnou plodinou byl oves (odrůda Pan). Byly sledovány kaly předem preinkubované po dobu osmi měsíců při teplotě 20 °C za aerobních i anaerobních podmínek s přidavkem bentonitu (30 % z množství sušiny kalu) a dále kaly ošetřené uhlíčitelným vápenatým (18 % CaCO<sub>3</sub> z množství sušiny kalu). Popis preinkubačních pokusů s kaly uvádějí Balík et al. (2000a, b). Kal byl dodán v čerstvém stavu a v množství odpovídajícím v přepočtu 33,33 g sušiny na nádobu. Navážka suché zeminy činila 5 kg na nádobu. U všech variant bylo kromě kalu použito NPK hnojení (1 g N, 0,16 g P, 0,4 g K na nádobu ve formě NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> a K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Nádoby byly zavlažovány deionizovanou vodou. Vlhkost zeminy byla udržována na 60 % MVK. V každé nádobě bylo pěstováno 20 rostlin. Sklizeň ovsa proběhla v mléčně-voskové zralosti. Každá varianta byla založena ve třech opakováních.

Obsah Zn a Cd ve vzorcích byl stanoven metodou plamenové a bezplamenové atomové absorpční spektro-

metrie ve Stopové laboratoři katedry chemie a v laboratoři katedry agrochemie a výživy rostlin AF ČZU v Praze na přístrojích Varian Spectr AA 400 a Varian SpectrAA 300 s grafitovou kyvetou GTA a automatickým ředicím zařízením SIPS 5.

Rostlinná hmota byla po homogenizaci rozložena suchou cestou (Mader et al., 1989).

Celkový obsah Cd v půdách byl stanoven separátně v mineralizátech získaných předchozím dvoustupňovým rozkladem s využitím přístroje APION a následným rozpuštěním pevného zbytku ve směsi HF + HNO<sub>3</sub> (Mader et al., 1998).

Při extrakci půdních vzorků bylo postupováno takto:

- 0,01 mol.l<sup>-1</sup> roztok CaCl<sub>2</sub> v poměru 1 : 10 (w/v), 6 h třepání, poté se reakční směs centrifugovala 10 min při 3000 ot./min (centrifuga Hettich Universal 30 RP) a supernatant byl uložen při 6 °C do doby měření (Novozamsky et al., 1993);
- 0,025 mol.l<sup>-1</sup> roztok NH<sub>4</sub>EDTA (pH 4,6) v poměru 1 : 5 (w/v), 90 min třepání, poté se reakční směs centrifugovala 10 min při 3000 ot./min (centrifuga Hettich Universal 30 RP) a supernatant byl uložen při 6 °C do doby měření (Zeien, 1995);
- 2 mol.l<sup>-1</sup> roztok HNO<sub>3</sub> v poměru 1 : 10 (w/v), po 16 h stání byla suspenze 6 h intenzivně protřepávána, poté byl vzorek 10 min centrifugován při 3000 ot./min (centrifuga Hettich Universal 30 RP) a uložen při laboratorní teplotě do doby měření (Kozák et al., 1990).

Vzorek kalu byl rozložen na suché cestě (Mader et al., 1998) s následným rozpuštěním popela ve zředěné lučavce královské.

Pro kontrolu kvality analytického postupu byly použity certifikované referenční materiály: RM Silty Clay Loam (půda), RM Light Sandy Soil (půda), RM 12-03-12 Sludge (kaly), RM 12-02-03 Lucerne (rostliny).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V průběhu osmiměsíční preinkubace se chovaly jednotlivé kaly rozdílně a v tab. II jsou uvedeny obsahy Zn a Cd tak, jak jsme je stanovili před založením nádobových pokusů. Nelze však vyloučit určité odchylky vzniklé heterogenitou používaného materiálu. Je zřejmé, že nejvyšší obsahy byly stanoveny u samotných kalů a nejnižší u variant s bentonitem. Změny pH a základní frakcionaci těchto rizikových prvků publikovali Kaewrahn (1999) a Balík et al. (2000a, b). U variant s CaCO<sub>3</sub> byla zvýšena hodnota pH preinkubovaných

### I. Agrochemická charakteristika půd – Agrochemical soil characteristics

Zemina <sup>1</sup>	C <sub>ox</sub> (%)	pH/KCl	KVK <sup>2</sup> (mval.kg <sup>-1</sup> )	Cd (mg.kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )
Černozem <sup>3</sup> (ČM)	2,30	7,2	185	0,378 ± 0,034	74,5 ± 6,2
Hnědozem <sup>4</sup> (HM)	1,55	7,0	146	0,161 ± 0,008	41,5 ± 1,4
Fluvizem <sup>5</sup> (FM)	0,95	5,5	73	0,182 ± 0,021	26,0 ± 0,8

<sup>1</sup>soil, <sup>2</sup>CEC, <sup>3</sup>Chernozems, <sup>4</sup>Luvisol, <sup>5</sup>Fluvisols

II. Schéma pokusů a obsah Cd a Zn v kalech po osmiměsíční preinkubaci – Scheme of trials and Cd and Zn content in sewage sludge after eight-month incubation

Kal <sup>1</sup>	Varianta <sup>2</sup>	mg Cd.kg <sup>-1</sup>	mg Zn.kg <sup>-1</sup>
1	A1	5,05	2 365
	A1 + vápnění <sup>3</sup>	4,19	1 698
	A1 + bentonit <sup>4</sup>	3,97	1 857
	AN1	5,17	1 642
	AN1 + vápnění	5,99	1 662
	AN1 + bentonit	4,39	1 220
2	A2	7,44	1 890
	A2 + vápnění	7,21	1 452
	A2 + bentonit	5,26	1 287
	AN2	6,71	1 399
	AN2 + vápnění	5,91	1 379
	AN2 + bentonit	5,53	1 125
3	A3	1,92	692
	A3 + vápnění	1,63	590
	A3 + bentonit	1,51	560
	AN3	1,99	838
	AN3 + vápnění	1,55	705
	AN3 + bentonit	1,63	641

A = preinkubace za aerobních podmínek – preincubation under aerobic conditions

AN = preinkubace za anaerobních podmínek – preincubation under anaerobic conditions

<sup>1</sup>sewage sludge, <sup>2</sup>treatment, <sup>3</sup>liming, <sup>4</sup>bentonite

kalů, u variant s bentonitem byla stanovena téměř stejná úroveň jako u kontrol. Obsah Zn v CaCO<sub>3</sub> činil 3,2 mg.kg<sup>-1</sup> a v bentonitu 143 mg.kg<sup>-1</sup>. Rozhodující podíl v celkovém množství Zn v takto ošetřených kalech měl tedy Zn z kalů. U variant s CaCO<sub>3</sub> tvořil Zn kalu téměř 100 %, u kombinace s bentonitem 97,3 % (kal 1), 96,7 % (kal 2) a 91,6 % (kal 3). Obsah Cd v CaCO<sub>3</sub> činil 0,094 mg.kg<sup>-1</sup> a v bentonitu 0,120 mg.kg<sup>-1</sup>. Ve vyvápněných kalech tvořilo Cd kalu 98,2 až 99,6 % a v kalech s bentonitem 96,3 až 99,4 %.

Na základě našich dosavadních zkušeností byly použity kaly v množství 33,33 g sušiny kalu na nádobu, což po přepočtu odpovídá 20 t sušiny na 1 ha. V praktickém zemědělství jde o dávku kalů sice vysokou, ale reálnou.

Výnos sušiny nadzemní biomasy ovsu je uveden v tab. III. Současnou aplikací NPK minerálních solí a kalů při zakládání pokusů bylo záměrně omezeno výnosotvorné působení kalů tak, aby obsah rizikových prvků v rostlinách byl minimálně ovlivněn nárůstem biomasy.

Je zřejmé, že s výjimkou pokusů na fluvizemi nemělo ošetření kalů vliv na nárůst biomasy ovsu. Statisticky významné zvýšení bylo zaznamenáno pouze na fluvizemi u variant AN2 + bentonit a AN3 + bentonit. V důsledku použitých meliorantů se lišilo množství dodaných živin v jednotlivých variantách a také pevnost a charakter jejich vazeb, což je zřejmě příčinou určité

diference v dosažených výnosech. Dále je patrné, že na výnosové úrovni se podílela zemina. Průměrný výnos na černozemi činil 90,6 g, na hnědozemi 95,2 g a na fluvizemi 88,3 g na nádobu.

Dávkou 33,33 g sušiny kalu bylo dodáno množství rizikových prvků, kterým byl ovlivněn celkový obsah těchto prvků v jednotlivých variantách. Z jednoduché bilance u varianty s nejvyšším (A2) a nejnižším (A3 + bentonit) obsahem Cd vyplývá, že podíl dodaného Cd v kalech tvořil na černozemi 2,7 až 13,1 %, na hnědozemi 6,3 až 30,8 % a na fluvizemi 5,5 až 27,3 % vzhledem k celkovému množství Cd v zemině. Zn bylo dodáno v kalech ještě relativně vyšší množství. Nejnižší obsah Zn byl u varianty A3 + bentonit a nejvyšší u varianty A1. Na černozemi bylo aplikací kalů dodáno 5,0 až 21,1 %, na hnědozemi 9,0 až 38,0 %, a na fluvizemi 14,4 až 60,6 % vzhledem k celkovému množství Zn v zemině. Pouze z tohoto jednoduchého porovnání lze předpokládat významnější působení kalů v případě Cd na hnědozemi a fluvizemi a v případě Zn především na fluvizemi.

V tab. IV jsou uvedeny obsahy Cd v nadzemní biomase ovsu jako výslednice působení jednotlivých faktorů (zemina, kal, způsob ošetření kalu). V průměru všech tří kalů činil obsah Cd u rostlin pěstovaných na černozemi 0,068 mg.kg<sup>-1</sup>, na hnědozemi 0,071 mg.kg<sup>-1</sup> a nejvyšší byl na fluvizemi s hodnotou 0,142 mg.kg<sup>-1</sup>.

Zatímco v našich inkubačních pokusech se samotnými zeminami (Balík et al., 2000a) byly stanoveny významné rozdíly v mobilitě Cd u aerobně a anaerobně preinkubovaných kalů, v těchto nádobových vegetačních pokusech nelze stanovit jednoznačný trend změn. U variant na černozemi a na hnědozemi jsou průměrné obsahy anaerobně a aerobně ošetřených variant téměř vyrovnané, na fluvizemi je u anaerobně ošetřených variant zřejmě mírné zvýšení.

Přestože u variant ošetřených CaCO<sub>3</sub> a bentonitem bylo dodáno v závislosti na jednotlivém kalu a způsobu ošetření pouze 68 až 100 % Cd ve srovnání s kontrolními variantami, neprojevila se tato disproporce vždy průkazně na obsahích Cd v rostlinách. Statisticky významné snížení obsahu Cd v rostlinách v důsledku použitých meliorantů bylo zjištěno na hnědozemi u variant AN1 + vápnění, AN1 + bentonit, AN2 + vápnění a na fluvizemi u variant A1 + vápnění, A1 + bentonit, A2 + vápnění, A2 + bentonit, AN2 + vápnění. Jestliže zachováme základní členění podle aeračních podmínek při preinkubaci kalů, potom získáme 18 dílčích podsouborů se třemi variantami: kal, kal + vápnění, kal + bentonit. U variant s bentonitem byl stanoven nižší obsah než u kontroly v 50 % případů a u vápnění v 72 %. Přitom v průměru všech variant bylo na variantách s vyvápněnými kaly aplikováno 91 % úrovně neošetřené kontroly a u variant s bentonitem pouze 80 % kontroly. Je tedy zřejmé, že vápnění kalů bylo dosaženo podstatně nižšího využití Cd rostlinami než v případě bentonitu, což je také plně v souladu s výsledky inkubačních pokusů se samotnými zeminami (Balík et al., 1999; Balík et al., 2000a).

## III. Výnos sušiny ovsu (g na nádobu) – Oat dry matter yield (g per pot)

Kal <sup>1</sup>	Varianta <sup>2</sup>	Zemina <sup>5</sup>	Výnos <sup>6</sup>	Zemina	Výnos	Zemina	Výnos
1	A1	ČM	85,4	HM	91,1	FM	79,7
	A1 + vápnění <sup>3</sup>	ČM	86,2	HM	95,1	FM	84,4
	A1 + bentonit <sup>4</sup>	ČM	86,4	HM	96,1	FM	82,2
	AN1	ČM	90,0	HM	93,6	FM	82,2
	AN1 + vápnění	ČM	85,3	HM	93,1	FM	82,9
	AN1 + bentonit	ČM	84,7	HM	90,5	FM	84,5
<i>F</i> -test			0,67		1,50		0,67
<i>D</i> <sub>min</sub>							
2	A2	ČM	94,4	HM	95,1	FM	95,7
	A2 + vápnění	ČM	96,2	HM	93,9	FM	92,4
	A2 + bentonit	ČM	97,0	HM	94,3	FM	95,2
	AN2	ČM	93,5	HM	96,1	FM	81,4
	AN2 + vápnění	ČM	94,8	HM	91,3	FM	87,6
	AN2 + bentonit	ČM	92,4	HM	100,6	FM	90,0
<i>F</i> -test			0,77		2,58		7,08
<i>D</i> <sub>min</sub>							7,80
3	A3	ČM	90,8	HM	92,1	FM	96,2
	A3 + vápnění	ČM	95,6	HM	96,0	FM	97,7
	A3 + bentonit	ČM	92,8	HM	98,8	FM	92,6
	AN3	ČM	87,7	HM	97,9	FM	85,2
	AN3 + vápnění	ČM	86,0	HM	100,7	FM	85,5
	AN3 + bentonit	ČM	91,5	HM	96,9	FM	94,6
<i>F</i> -test			1,51		0,63		5,82
<i>D</i> <sub>min</sub>							8,68

 For 1–4 see Tab. II, <sup>5</sup>soil, <sup>6</sup>yield

 IV. Obsah Cd a Zn v biomase ovsu (mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) – Cd and Zn content in oat biomass (mg.kg<sup>-1</sup> of dry matter)

Kal <sup>1</sup>	Varianta <sup>2</sup>	Zemina <sup>5</sup>	Cd	Zn	Zemina	Cd	Zn	Zemina	Cd	Zn
1	A1	ČM	0,078	30,3	HM	0,063	19,8	FM	0,157	84,0
	A1 + vápnění <sup>3</sup>	ČM	0,086	22,2	HM	0,073	25,4	FM	0,136	60,0
	A1 + bentonit <sup>4</sup>	ČM	0,107	21,0	HM	0,069	31,5	FM	0,112	63,4
	AN1	ČM	0,077	20,1	HM	0,053	19,9	FM	0,142	69,6
	AN1 + vápnění	ČM	0,051	18,8	HM	0,033	36,4	FM	0,118	61,1
	AN1 + bentonit	ČM	0,037	15,7	HM	0,049	41,4	FM	0,175	58,0
<i>F</i> -test			1,31	1,50		8,11	8,72		3,34	3,84
<i>D</i> <sub>min</sub>						0,02	11,7		0,05	19,1
2	A2	ČM	0,043	24,4	HM	0,048	23,2	FM	0,177	63,1
	A2 + vápnění	ČM	0,047	20,9	HM	0,047	20,4	FM	0,117	56,4
	A2 + bentonit	ČM	0,037	20,8	HM	0,053	23,7	FM	0,107	71,0
	AN2	ČM	0,065	29,5	HM	0,081	31,1	FM	0,181	83,5
	AN2 + vápnění	ČM	0,064	28,8	HM	0,076	26,5	FM	0,108	45,8
	AN2 + bentonit	ČM	0,051	27,5	HM	0,095	31,5	FM	0,210	72,2
<i>F</i> -test			1,44	4,46		8,96	4,17		4,03	4,57
<i>D</i> <sub>min</sub>				7,1		0,03	8,5		0,09	24,0
3	A3	ČM	0,078	20,4	HM	0,063	23,6	FM	0,084	47,6
	A3 + vápnění	ČM	0,070	21,9	HM	0,125	21,3	FM	0,104	33,8
	A3 + bentonit	ČM	0,083	21,9	HM	0,094	28,9	FM	0,172	44,0
	AN3	ČM	0,099	29,2	HM	0,109	32,0	FM	0,184	80,4
	AN3 + vápnění	ČM	0,068	28,2	HM	0,068	28,9	FM	0,098	37,0
	AN3 + bentonit	ČM	0,090	24,8	HM	0,073	31,5	FM	0,167	49,4
<i>F</i> -test			0,67	4,75		1,93	5,31		1,51	50,99
<i>D</i> <sub>min</sub>				6,5			7,3			9,1

 For 1–4 see Tab. II, <sup>5</sup>soil

V. Podíl odebraného množství Cd a Zn nadzemní biomasou ovsu k aplikovanému množství Cd a Zn kaly (%) – The portion of withdrawn amount of Cd and Zn by above-ground oat biomass to applied amount of Cd and Zn by sewage sludge (%)

Kal <sup>1</sup>	Varianta <sup>2</sup>	Zemina <sup>5</sup>	Odběr <sup>6</sup> Cd	Odběr Zn	Zemina	Odběr Cd	Odběr Zn	Zemina	Odběr Cd	Odběr Zn
1	A1	ČM	4,0	3,3	HM	3,4	2,3	FM	7,4	8,5
	A1 + vápnění <sup>3</sup>	ČM	5,3	3,4	HM	4,9	4,3	FM	8,2	8,9
	A1 + bentonit <sup>4</sup>	ČM	7,0	2,9	HM	5,0	4,9	FM	7,0	8,5
	AN1	ČM	4,0	3,3	HM	2,9	3,4	FM	6,8	10,5
	AN1 + vápnění	ČM	2,1	2,9	HM	1,5	6,1	FM	4,7	9,1
	AN1 + bentonit	ČM	2,1	3,3	HM	3,0	9,2	FM	10,0	12,0
F-test			4,58	0,17		21,92	13,93		7,07	3,90
D <sub>min</sub>			3,4			1,1	2,5		2,6	2,8
2	A2	ČM	1,6	3,6	HM	1,8	3,5	FM	6,8	9,6
	A2 + vápnění	ČM	1,9	4,1	HM	1,8	4,0	FM	4,5	10,7
	A2 + bentonit	ČM	2,1	4,7	HM	2,9	5,2	FM	5,8	15,7
	AN2	ČM	2,7	5,9	HM	3,5	6,4	FM	6,6	14,6
	AN2 + vápnění	ČM	3,1	5,9	HM	3,6	5,3	FM	4,8	8,7
	AN2 + bentonit	ČM	2,6	6,8	HM	5,2	8,4	FM	10,2	17,3
F-test			1,66	8,51		13,63	12,07		3,64	9,04
D <sub>min</sub>				1,6		1,3	2,0		4,2	4,6
3	A3	ČM	11,0	8,0	HM	9,1	9,5	FM	12,6	19,9
	A3 + vápnění	ČM	12,2	10,6	HM	22,0	10,3	FM	18,7	16,8
	A3 + bentonit	ČM	15,3	10,9	HM	18,4	15,2	FM	31,2	21,8
	AN3	ČM	12,9	9,2	HM	16,0	11,2	FM	23,6	24,5
	AN3 + vápnění	ČM	11,3	10,3	HM	13,2	12,4	FM	16,3	13,4
	AN3 + bentonit	ČM	14,9	10,6	HM	13,1	14,3	FM	29,1	21,8
F-test			0,82	5,38		1,98	5,73		1,62	19,66
D <sub>min</sub>				1,8			3,7			3,5

For 1–4 see Tab. II, <sup>5</sup>soil, <sup>6</sup>uptake

V tab. IV je rovněž uvedeno hodnocení obsahu Zn v rostlinách. Také zde je obsah determinován použitou zemínou. Rostliny pěstované na černozemi měly průměrný obsah Zn 23,7 mg.kg<sup>-1</sup>, na hnědozemi 27,6 mg.kg<sup>-1</sup> a na fluvizemi 60,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Statisticky významné snížení obsahu Zn po přidavku ošetřených kalů bylo stanoveno pouze na fluvizemi. Po použití vápnění bylo zaznamenáno snížení obsahu u variant A1 + vápnění, AN2 + vápnění, A3 + vápnění, AN3 + vápnění, v případě bentonitu pouze u variant A1 + bentonit, AN3 + bentonit. Z prostého výčtu změn v rámci 18 dílčích podsouborů je zřejmé, že při použití bentonitu bylo stanoveno snížení v 61 % případů a u vápnění v 83 % případů proti neošetřené kontrole. Přitom bylo u variant s vápněním dodáno v průměru 86 % úrovně Zn oproti kontrole a u bentonitu pouze 76 %. Obdobně jako u Cd, bylo i zde vápnění účinnějším opatřením pro snížení mobility Zn v dodaných kalcích než přidavek bentonitu a potvrzují se závěry našich inkubačních pokusů se samotnými zemínami (Balík et al., 1999).

Podíl odebraného množství Cd a Zn nadzemní biomasou rostlin ovsu je doložen v tab. V. Z výsledků vyplývá, že rostliny odebírají poměrně malou část dodaných rizikových prvků v kalcích. Přitom také zde platí

obecný princip, že využití dodaných rizikových prvků rostlinami je vyšší v nádobových vegetačních pokusech než v polních podmínkách. Pravidelným používáním kalů může tedy docházet ke zvýšené akumulaci těchto rizikových prvků v půdách. Z výčtu četnosti změn vyplývá, že jak u Zn, tak u Cd bylo ve většině případů vyšší odebrané množství u ošetřených variant než na kontrole. Je to dáno způsobem výpočtu, při kterém nebylo odpočteno množství odebraných rizikových prvků na variantách bez čistírenských kalů. Uvedená interpretace není vhodná pro posouzení účinnosti jednotlivých způsobů ošetření kalů, neboť dominantní je zde především vliv zeminy a dále obsah rizikových prvků v kalcích. U ošetřených variant jsou získávány relativně vyšší hodnoty vzhledem k celkově nižšímu množství dodaných rizikových prvků v takto ošetřených kalcích. Proto také byly nalezeny nejvyšší hodnoty u kalu 3, který měl nejnižší obsah Cd i Zn. Z porovnání jednotlivých zemín je zřejmé, že nejvyšší podíl Cd i Zn byl odebrán na fluvizemi.

V tab. VI jsou uvedeny výsledky analýz zemín různými extrakčními činidly po sklizni ovsu u variant, u nichž byl použit kal 2. Tak jako v předchozích experimentech (Tlustoš et al., 1994) byla provedena extrak-

Varianta <sup>1</sup>	Zemina <sup>2</sup>	mg Cd.kg <sup>-1</sup>			mg Zn.kg <sup>-1</sup>		
		CaCl <sub>2</sub>	EDTA	HNO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>	EDTA	HNO <sub>3</sub>
A2	ČM	0,0009	0,232	0,375	0,098	13,4	36,7
A2 + vápnění <sup>3</sup>		0,0006	0,219	0,349	0,025	13,3	38,0
A2 + bentonit <sup>4</sup>		0,0012	0,206	0,304	0,013	11,6	37,8
AN2	ČM	0,0019	0,241	0,319	0,047	16,5	41,9
AN2 + vápnění		0,0011	0,217	0,338	0,090	16,6	40,8
AN2 + bentonit		0,0015	0,207	0,342	0,079	15,1	47,0
A2	HM	0,0040	0,145	0,159	0,063	7,5	22,2
A2 + vápnění		0,0012	0,131	0,182	0,029	7,4	18,7
A2 + bentonit		0,0045	0,131	0,117	0,035	6,3	18,7
AN2	HM	0,0078	0,192	0,141	0,200	9,5	19,9
AN2 + vápnění		0,0020	0,157	0,160	0,117	6,4	19,5
AN2 + bentonit		0,0057	0,170	0,163	0,149	7,7	19,1
A2	FM	0,0410	0,073	0,139	3,264	10,6	21,2
A2 + vápnění		0,0162	0,058	0,115	0,728	8,3	18,0
A2 + bentonit		0,0284	0,058	0,163	1,983	9,9	21,8
AN2	FM	0,0322	0,070	0,207	2,825	12,3	24,0
AN2 + vápnění		0,0100	0,030	0,191	0,483	9,9	23,0
AN2 + bentonit		0,0317	0,029	0,180	2,563	13,1	22,0

<sup>1</sup>treatment, <sup>2</sup>soil, <sup>3</sup>liming, <sup>4</sup>bentonite

ce zemin 0,01 mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0,025 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>EDTA a 2 mol.l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. K analýzám byly použity průměrné vzorky ze tří nádob a každá analýza byla dvakrát opakována.

Nejnižší množství mobilního Cd (výluh CaCl<sub>2</sub>) bylo vždy u variant s vápněním. Toto významné snížení bylo zaznamenáno u variant aerobně i anaerobně preinkubovaných. Potvrzují se zde závěry z literatury (Blume, 1994; Podlešáková et al., 1998; Němeček et al., 1999). Citovaní autoři uvádějí dominantní vliv pH na sorpci Cd v půdě. V našich pokusech bylo v průměru všech vyvápněných variant u kaly 2 dodáno 93 % úrovně kontroly, ale obsahy Cd v extraktantu byly pouze na úrovni 42 % kontroly. Lze se objektivně domnívat, že vápnění snížilo mobilitu Cd, což také nepřímo dokazují obsahy Cd v rostlinách. Přestože u variant s bentonitem bylo dodáno menší množství celkového Cd v kaly 2 (77 % úrovně kontroly) než u vyvápněných variant, byl nalezen vyšší obsah extrahovatelného Cd. Opět se zde projevil silnější vliv vápnění. Při použití tohoto extraktantu nebyly stanoveny rozdíly mezi aerobně a anaerobně preinkubovanými kaly, což také objasňuje obdobné hodnoty obsahu Cd v rostlinách u těchto souborů.

Při použití extraktantu EDTA bylo uvolněno podstatně vyšší množství Cd z půdy. Jak uvádějí Liebe et al. (1997), je možné předpokládat stanovení potenciálně mobilizovatelného Cd v půdě. Jde především o Cd ve frakci vodorozpuštěné, výměnné, specificky sorbované a organicky vázané.

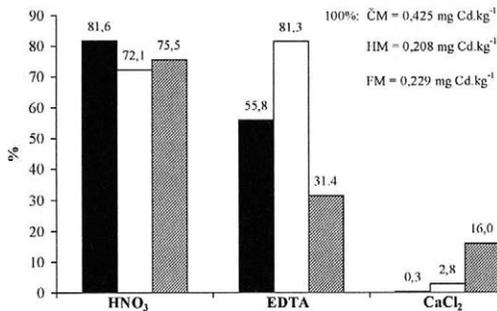
Roztok NH<sub>4</sub>EDTA je vhodným extraktantem, neboť charakterizuje poměrně mobilní frakce Cd v půdě a zá-

roveň je extrahované množství Cd dostatečně vysoké, což zvyšuje reprodukovatelnost analytických hodnot. Na všech třech zemínách bylo vždy nejvyšší množství na kontrolní variantě, což je také v dobré korelaci s dodaným množstvím Cd v kaley. V případě variant s vápněním zde bylo extrahováno 80 % a u variant s bentonitem 79 % úrovně kontrolní neošetřené varianty.

Z výsledků analýz s HNO<sub>3</sub> vyplývá, že při jejím použití jsou extrahována poměrně značná množství Cd a rozdíly mezi jednotlivými variantami nezrcadlí pokusné schéma. Se zvyšující se extrakční silou se relativně snižuje rozdíl mezi jednotlivými variantami.

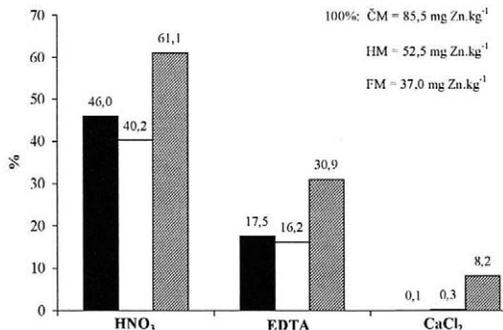
V tab. VI jsou rovněž uvedena extrahovatelná množství Zn. V případě výluhu CaCl<sub>2</sub> byly s výjimkou anaerobně preinkubovaných kalů na černozemi nalezeny vždy nižší obsahy u ošetřených variant. Při vyjádření v relativních hodnotách z celého souboru měření bylo u variant s vápněním vyluhováno 60 % a u bentonitu 77 % úrovně neošetřených variant. Přitom dodané množství Zn v kaly 2 bylo podle jednotlivých variant v poměru: kontrola 100 %, vápnění 86 %, bentonit 76 %. Vyvápněním kalů se tedy významně snížila mobilita Zn. Tyto analýzy představují velmi dobrý základ pro objasnění rozdílů v obsahích Zn v rostlinách ovsa. K obdobným závěrům jsme dospěli také v inkubačních pokusech se samotnými zemínami (Balík et al., 2000b).

Také extrahovatelné množství Zn roztokem EDTA má poměrně dobrou vypovídací schopnost o množství Zn dodaného kaly. Přitom však jsou nesporně menší relativní rozdíly mezi kontrolními a ošetřenými variantami. Přestože se v této frakci odráží podstatně zřetel-



1. Podíl extrahovatelného Cd (%) z celkového množství Cd zeminy a kalu (průměr A2 + AN2) – The portion of available Cd (%) from total Cd content in soil and sludge (mean of A2 + AN2)

■ ČM = černozem – Chernozems  
 □ HM = hnědozem – Luvisols  
 ▨ FM = fluvizem – Fluvisols



2. Podíl extrahovatelného Zn (%) z celkového množství Zn zeminy a kalu (průměr A2 + AN2) – The portion of available Zn (%) from total Zn content in soil and sludge (mean of A2 + AN2)

něji vliv celkového obsahu Zn v zemínách, činilo extrahovatelné množství u varianty s vápněním 87 % a u varianty s bentonitem 91 % úrovně kontroly. Také zde lze uvažovat o snížení mobility Zn vlivem vápnění kalů. Obdobně jako u Cd, také v případě Zn vyluh HNO<sub>3</sub> téměř nereaguje na změny mobility Zn v zemině způsobené různými zásahy.

Na obr. 1 a 2 jsou znázorněny rozdíly v extrakčních schopnostech jednotlivých činidel. Jsou zde vyjádřeny relativní podíly vzhledem k celkovému množství rizikového prvku na počátku pokusů v zemínách + kal 2 na neošetřených variantách (průměr z aerobních + anaerobních variant). Velice mobilní je Cd na fluvizemi (vyluh CaCl<sub>2</sub>) a extrahováno zde bylo 16 % z Cd zeminy + Cd kalu 2. Proti tomu na černozemi bylo v této frakci zjištěno pouze 0,3 %. Vysoký podíl mobilního Cd ve fluvizemi byl předpokladem vysokého obsahu Cd v rostlinách ovsu pěstovaných na této zemině. U extraktantu EDTA je zajímavý velmi vysoký podíl uvolněného Cd na hnědozemi, dokonce vyšší než při vyluhu HNO<sub>3</sub>. Příčina je zřejmě v poměru dodaného Cd v ka-

VII. Vztah mezi obsahem a odběrem Cd a Zn rostlinami ovsu a extrahovatelným množstvím Cd a Zn z půdy různými činidly (korelační koeficient) – The relationship between content and uptake of Cd and Zn by oat plants and the extractable amount of Cd and Zn from soil by different agents (correlation coefficient)

Extraktant <sup>1</sup>	Obsah <sup>2</sup> Cd	Odběr <sup>3</sup> Cd	Obsah Zn	Odběr Zn
HNO <sub>3</sub>	-0,48	-0,50	-0,37	-0,39
EDTA	-0,71	-0,72	0,008	-0,04
CaCl <sub>2</sub>	0,87	0,85	0,83	0,81

<sup>1</sup> solution, <sup>2</sup> content, <sup>3</sup> uptake

lech vzhledem k celkovému obsahu Cd v jednotlivých zemínách. Tento poměr činil u černozemě 12,5 %, u hnědozemě 29,3 % a u fluvizemě 25,9 %. Vysoký podíl extrahovatelného Cd na hnědozemi byl proto zřejmě způsoben především Cd z použitého kalu. V porovnání s tím je u variant na černozemi podstatně vyšší vliv vlastní zeminy. Také u Zn je patrná jeho vysoká mobilita u fluvizemě (8,2 % ve vyluhu CaCl<sub>2</sub>).

Schopnost charakterizovat přístupnost Cd a Zn rostlinám pomocí různých extrakčních činidel je doložena v tab. VII. Byla vypočtena těsná pozitivní korelace u roztoku CaCl<sub>2</sub>, a to jak u Cd, tak u Zn. Toto zjištění odpovídá našim předchozím sledováním v nádobových pokusech s kukuřicí, ječmenem a pšenicí (Balík et al., 1998). Negativní korelace u HNO<sub>3</sub> potvrzuje nevhodnost jejího použití pro charakteristiku přijatelných obsahů Cd a Zn v půdách. Zajímavé jsou zde nižší hodnoty korelačního koeficientu s odběrem Cd a Zn než s obsahem těchto prvků v rostlinách, neboť zpravidla při tomto typu pokusů vychází vyšší těsnost vztahu pro odběr.

Na základě výsledků analýz rostlin i frakcionace Cd a Zn v půdě a v souladu se závěry z literatury (Růžek et al., 1999) lze konstatovat, že vápnění čistírenských kalů může přispět ke snížení mobility Cd a Zn v půdě a ke snížení transferu těchto rizikových prvků do rostlin, přičemž dobré účinnosti bylo dosaženo i při relativně malé dávce CaCO<sub>3</sub>.

Použití bentonitu se zde projevilo jako málo efektivní opatření. Naproti tomu Tlustoš et al. (1995) dosáhli v rostlinách špenátu na variantách s bentonitem v průměru čtyř sklizní snížení obsahu Cd o 36 % a Zn o 35 % proti kontrole. Zásadní rozdíl však mezi těmito pokusy je v úrovni aplikovaného bentonitu. Zatímco citovaní autoři aplikovali 150 g bentonitu na nádobu, v našem pokuse bylo aplikováno 7,7 g jako součást ošetřeného kalu (0,15 % z množství zeminy). V pokusech se špenátem došlo u variant s bentonitem k mírnému zvýšení pH půdy (o 0,5 jednotky), což také významně ovlivnilo mobilitu Zn a Cd v zemině. Efektivnost bentonitu se snížila ve čtvrtém pěstebním cyklu špenátu, kdy se hodnota pH na obou variantách přiblížila. V našich experimentech nelze předpokládat pozitivní změnu pH, neboť jsme ji nezaznamenali ani v inkubačních testech, kdy dávky kalů byly 8,3krát vyšší než v těchto nádobových pokusech. Proto zde pouťání Cd

a Zn záviselo pouze na nespecifické a specifické sorpci bentonitu. Obdobně velmi vysokou dávkou bentonitu (125 g na 6 kg zeminy) jako Tlustoš et al. (1995) použili v pokusech Richter, Hlušek (1991). Sims, Boswell (1978) aplikovali dokonce bentonit na úrovni 10 % z množství zeminy. Srovnání úrovně dávkování bentonitu s jinými experimenty objasňuje malou účinnost meliorantu v našich vegetačních pokusech.

Výzkum je financován z prostředků GA ČR, projekt 526/97/0845.

## LITERATURA

- Balík J., Tlustoš P., Száková J., Blahník R., Kaewrahn S. (1999): Sorpce kadmia v půdě po použití vyvápňených čistírenských kalů. *Rostl. Výr.*, 45: 511–518.
- Balík J., Tlustoš P., Száková J., Kaewrahn S., Hanč A. (2000a): Vliv přidavku bentonitu k čistírenským kalům a podmínek inkubace kalů na sorpci kadmia v půdách. *Rostl. Výr.*, 46: 1–7.
- Balík J., Tlustoš P., Száková J., Kaewrahn S., Hanč A. (2000b): The effect of addition of different ameliorative compounds into sewage sludge on zinc sorption in soils. *Rostl. Výr.*, 46: 93–102.
- Balík J., Tlustoš P., Száková J., Pavlíková D., Balíková M., Blahník R. (1998): Změny obsahu kadmia v rostlinách po aplikaci čistírenských kalů. *Rostl. Výr.*, 44: 449–456.
- Blume H. P. (1994): Bindung, Abbau und Mobilität von organischen und anorganischen Schadstoffen in Böden. *Ber. Landwirtschaft.*, 208: 128–137.
- Chlopecka A., Adriano D. C. (1997): Inactivation of metals in polluted soils using natural zeolite and apatite. In: *Int. Conf. Biogeochemistry of trace elements, Berkeley*: 415–416.
- Kaewrahn S. (1999): Uptake of heavy metals by plant from soil treated by sewage sludge. [Doktorská dizertace.] Praha, ČZU. Kozák J., Jehlička J., Křišťoufková S., Haladová H., Vachoušek V. (1990): Retence těžkých kovů půdami. [Závěrečná zpráva.] Praha, VŠZ.
- Liebe F., Welp G., Brümmer G. W. (1997): Mobilität anorganischer Schadstoffe in Böden Nordrhein-Westfalens. Essen.
- Mader P., Kučera J., Cibulka J., Míhlová D. (1989): Ověření způsobu mineralizace jater pro stanovení kadmia a olova diferenční pulsní anodickou rozpouštěcí voltmetrií mezi laboratorním experimentem. *Chem. Listy*, 83: 765–773.
- Mader P., Száková J., Míhlová D. (1998): Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analisis*, 26: 121–129.
- Němeček J., Podlešáková E., Roth Z. (1999): Possibilities of the prediction of trace elements mobility in the soils. *Rostl. Výr.*, 45: 345–350.
- Novozamsky J., Lexmond T. M., Houbá V. J. G. (1993): A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *Int. J. Envir. Anal. Chem.*, 51: 47–58.
- Podlešáková E., Němeček J., Vácha R. (1998): Možnosti remediací zemědělských půd. *Rostl. Výr.*, 44: 209–215.
- Richter R., Hlušek J. (1991): Využití půdních zlepšovačů ke snížení obsahu některých cizorodých prvků u brambor. *Agrochémia*, 31: 248–251.
- Růžek P., Kusá H., Hrazdíra J. (1999): Hygienizace kalů z ČOV a jejich uplatnění v zemědělství. In: *Sbor. Kaly a odpady 99, Brno*: 163–172.
- Sims T., Boswell F. C. (1978): Effect of bentonite on plant availability of sludge-borne heavy metals in soil. *J. Envir. Qual.*, 7: 501–505.
- Tlustoš P., Dijk D. van, Száková J., Pavlíková D. (1994): Uvolňování Cd a Zn vybranými vyluhovadly. *Rostl. Výr.* 40: 1107–1121.
- Tlustoš P., Vostal J., Száková J., Balík J. (1995): Přímá a následná účinnost vybraných opatření na obsah Cd a Zn v biomase špenátu. *Rostl. Výr.* 41: 31–37.
- Whatmuff M. (1999): Applying biosolids to acid soils in NSW, Australia: sustained availability of Cd 8 years after application. In: *5th Int. Conf. Biogeochemistry of trace elements, Vídeň*: 286–287.
- Zeien H. (1995): Chemische Extraktionen zur Bestimmung der Bindungsformen von Schwermetallen in Böden. [Doktorská dizertace.] Bonn.

Došlo 18. 11. 1999

---

### Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Jiří Balík, CSc., Česká zemědělská univerzita v Praze, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: +420 2 24 38 27 32, fax: +420 2 20 92 03 12, e-mail: balik@af.czu.cz

---

# ODVOZENÍ PRIMÁRNÍCH KULTUR Z KVĚTNÍCH PUPENŮ RODODENDRONŮ

## IN VITRO PROPAGATION OF RHODODENDRON SPP. FROM FLOWER BUDS

D. Pavingerová<sup>1</sup>, J. Bříza<sup>1</sup>, E. Prenerová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*

<sup>2</sup> *Jihočeské lesy České Budějovice, a. s., Biotechnology Laboratory Olešná, Bernartice, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Twelve *Rhododendron* cultivars (Marcel Menard, Blutopia, Madame, Old Port, Lugano, Omega, Album Novum, Franceska, Polar Nacht, Lumina, Erato and Blurettia) were tested for *in vitro* propagation ability from flower buds. The flower buds were withdrawn from the outdoor stock plants during the dormant period. Outer resinous bud scales were removed, buds were surface disinfected in 10% SAVO, a commercial bleach (5% NaClO), with 0.1% Tween 20 and rinsed thrice with sterile distilled water. Florets were excised from the buds and cultivated on agar Anderson's medium supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) and 6-(dimethylallylamino)-purine (2iP). The concentrations of IAA/2iP of 1/5 and 4/15 mg/l stimulated to growth of granular callus, while the concentrations of IAA/2iP of 1/8 and 4/15 mg/l stimulated shoot proliferation. Nine out of twelve *Rhododendron* cultivars tested were found to be able to propagate from flower buds.

**Keywords:** *Rhododendron*; micropropagation; flower buds

**ABSTRAKT:** U dvanácti odrůd rododendronů (Marcel Menard, Blutopia, Madame, Old Port, Lugano, Omega, Album Novum, Franceska, Polar Nacht, Lumina, Erato a Blurettia) jsme ověřovali schopnost propagace v podmínkách *in vitro*. K odvození primárních kultur jsme použili květní pupeny. Navození kalogeneze i následná mikropropagace probíhaly na médiích s vyšším obsahem růstových látek. 1 nebo 4 mg/l kyseliny indolyloctové (IAA) a 5, 8 nebo 15 mg/l 6-(dimethylallylamino)-purinu (2iP). Růst granulárních kalusů nejlépe stimulovala koncentrace 4 mg/l IAA a 15 mg/l 2iP, případně koncentrace 1 mg/l IAA a 5 mg/l 2iP. Pro proliferaci stonků pak byly nevhodnější koncentrace růstových regulátorů IAA/2iP v hodnotách 1/8 a 4/15 mg/l. U devíti sledovaných odrůd se podařilo odvodit primární kultury.

**Klíčová slova:** *Rhododendron*; mikropropagace; květní pupeny

### ÚVOD

K odvození primárních kultur se u většiny rostlin používají vrcholové meristémy nebo stonkové segmenty. Jejich použití je vázáno na kvalitní sterilizaci, což u stonkových segmentů rododendronů komplikuje hlavně tloušťka stonků spolu s pryskyřičným povrchem a trichomy. Uvádí se, že úspěšná sterilizace stonkových částí se u rododendronů pohybuje v rozmezí 4 až 5% (Norton, Norton, 1989). Úspěšná proliferace stonků ze stonkových vrcholů v podmínkách *in vitro* se podařila jen u několika odrůd (Anderson, 1984; Iapichino et al., 1991).

Publikovány byly i práce, kdy se organogeneze stonků podařila navodit z tyčinek (Shevade, Preece, 1993) a květních pupenů (Meyer, 1982). Ukázalo se, že u všech zmíněných metodik hraje významnou roli použitá odrůda.

V našich pokusech jsme se zaměřili na metodu *in vitro* propagace z květních pupenů a našim cílem bylo

ověřit možnost použití této metodiky u 12 odrůd, u kterých dosud nebyla popsána.

### MATERIÁL A METODY

#### Odběr květních pupenů

Odběr květních pupenů byl proveden u 12 odrůd rododendronů, a to Marcel Menard, Blutopia, Madame, Old Port, Lugano, Omega, Album Novum, Franceska, Polar Nacht, Lumina, Erato, Blurettia.

Květní pupeny byly odebírány v zimních měsících 1999, v intervalu leden až březen, vždy jeden odběr u každé odrůdy. Pokud se ukázalo, že odebrané pupeny obsahují málo použitelných kvítků, byl odběr zopakován. Pupeny byly přepravovány v uzavřených nádobách v navlhčené buničité vatě a zpracovány co nejdříve po odběru, maximálně do jednoho týdne. V případě něko-

likadenního uchování byly odebrané pupeny ponechány v přepravní nádobě v ledničce.

### Sterilizace květních pupenů

Odebrané pupeny byly sterilizovány 15 min ve sterilizačním roztoku 10% SAVO (5% NaClO) + 0,1% Tween 20 při občasném promíchání. Pak byly opláchnuty sterilní destilovanou vodou (3 x 5 min) a pinzetou byly asepticky odstraněny vnější pryskyřičnaté šupiny. Ponechána byla pouze bílá papírovitá šupina, pod kterou již byly patrné jednotlivé kvítky. Takto upravené pupeny byly znovu sterilizovány 15 min v novém sterilizačním roztoku stejného složení. Po důkladném opláchnutí sterilní destilovanou vodou byly pupeny rozebrány na jednotlivé kvítky, které byly zasunuty alespoň do poloviny jejich výšky do agarového média, vždy jeden kvítek do jedné zkumavky.

### Kultivační média

Za základ bylo použito práškové Andersonovo médium (Anderson, 1984) včetně vitaminů, s přídavkem 30 g/l sacharózy, zpevněné agarem, s konečným pH = 5,2. Pro potlačení negativního vlivu uvolňovaných fenolických látek se do média přidával PVP (polyvinylpyrrolidon K 30) v koncentraci 2 g/l. Měňena byla pouze koncentrace růstových látek. Médium RD obsahovalo 1 mg/l IAA + 8 mg/l 2iP (Pavingerová et al., 1997), médium RD1 1 mg/l IAA + 5 mg/l 2iP a RD2 4 mg/l IAA + 15 mg/l 2iP (Meyer, 1982).

### Navození kalogeneze a mikropropagace

Jednotlivé kvítky byly kultivovány v médiu RD1 nebo RD2 nejprve dva týdny ve tmě a dále na světle (fotoperioda 16 h, intenzita světla 90  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , 23 °C). Kalus s prvními náznaky regenerace byl přenesen na nové médium stejného složení. K mikropropagaci byly použity regenerované stonky alespoň 1 cm dlouhé, které byly odděleny a kultivovány samostatně ve vodorovné poloze na agarovém médiu RD nebo RD2, opět s fotoperiodou 16 h, intenzitou světla 90  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , při 23 °C. Zakořenění stonků 3 až 4 cm dlouhých se provádělo nesterilně v substrátu pro rododendrony.

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Volně rostoucí květní pupeny byly odebírány z rostlin několikrát během zimního období. Kompletní pupeny, které obsahovaly 15 až 20 kvítků, byly po přenesení do laboratoře sterilizovány a použity k navození kalogeneze. Přestože odvození explantátových kultur z volně rostoucích dřevin je vždy velmi obtížné, při použití květních pupenů jsme se nesetkali s žádnými problémy.

Květní pupeny rododendronů jsou dobře chráněny květními šupinami, což založení aseptických kultur usnadňuje. Během našich pokusů jsme se nesetkali ani s jedním případem kontaminace.

K další kultivaci jsme použili pouze světlé kvítky, jejichž počet se na jeden odebraný květní pupen pohyboval od dvou do 13. Často se v květech vyskytovaly kvítky tmavé, jejichž počet někdy dokonce převyšoval použitelné kvítky světlé (tab. I). Tento jev mohl být způsoben povětrnostními podmínkami, např. suché léto, nedostatečné zakořenění nově přesazených keřů, mraz apod.

I. Přehled odběru květních pupenů rododendronů – The summary of collection of *Rhododendron* flower buds

Odrůda <sup>1</sup>	Počet odebraných květních pupenů <sup>2</sup>	Počet kvítků v pupenech <sup>3</sup>	
		světlých <sup>4</sup>	tmavých <sup>5</sup>
Marcel Menard	5	47	69
Blutopia	4	4	46
Madame	5	34	35
Old Port	1	10	2
Lugano	4	13	39
Omega	1	4	1
Album Novum	1	2	6
Franceska	1	19	3
Polar Nacht	6	15	69
Lumina	2	10	14
Erato	1	2	9
Bluretția	5	5	89

<sup>1</sup>cultivar, <sup>2</sup>number of collected flower buds, <sup>3</sup>number of florets in buds, <sup>4</sup>light, <sup>5</sup>dark

II. Kalogeneze a regenerace z květních pupenů rododendronů – Growth of calli and regeneration from *Rhododendron*'s florets

Odrůda <sup>1</sup>	Kalogeneze <sup>2</sup>		Regenerace <sup>3</sup>
	RD1	RD2	
Marcel Menard	–	++	za <sup>4</sup> 6–11 týdnů <sup>5</sup>
Blutopia	+	+++	za 7 týdnů
Madame	–	+	za 9–14 týdnů
Old Port	–	+	za 5 měsíců <sup>6</sup>
Lugano	–	–	
Omega	–	+++	za 5 týdnů
Album Novum	–	+	za 5 měsíců
Franceska	–	+	za 5 měsíců
Polar Nacht	+++	+++	za 5 týdnů
Lumina	–	–	
Erato	+	++	za 5 měsíců
Bluretția	–	–	

+, ++, +++ = relativní velikost kalusu<sup>7</sup>

<sup>1</sup>cultivar, <sup>2</sup>growth of calli, <sup>3</sup>regeneration, <sup>4</sup>after, <sup>5</sup>weeks, <sup>6</sup>months, <sup>7</sup>relative size of calli

Odrůda <sup>1</sup>	RD1	RD2	RD
Marcel Menard	–	+	+
Blutopia	–	+	+
Madame	–	+	+
Old Port	–	+	+
Omega	–	+	+
Album Novum	–	+	+
Franceska	–	+	+
Polar Nacht	–	+	+
Erato	(+)	+	+

<sup>1</sup>cultivar

K navození kalogeneze jsme použili média RD1 a RD2, která se lišila obsahem IAA a 2iP. Po čtyřech až osmi týdnech se na květních stopkách a základech semeníků začaly objevovat první kalusy. Jako vhodnější se ukázalo médium RD2 s vyšším obsahem růstových látek, hlavně cytokininu 2iP (tab. II). Pouze u odrůdy Polar Nacht docházelo k hojně tvorbě kalusu na obou použitých médiích. Kalusy byly zelené, často však byly tmavé, případně nafialovělé, spíše granulární a drobné. I u téměř černých kalusů však docházelo k regeneraci. Meyer (1982) se zmiňuje o velmi pomalém růstu granulárních kalusů, které jsou teprve po třech až čtyřech měsících schopné další subkultivace. V našem případě jsme několikaměsíční vývoj kalusů zaznamenali pouze u odrůd Old Port, Album Novum, Franceska a Erato. U odrůd Lugano, Lumina a Blurettia se nám kalusy odvodit nepodařilo.

První známky regenerace jsme zaznamenali po pěti týdnech až po pěti měsících (tab. II). Až do této doby byly kvítky ponechány v původním médiu bez subkultivace. Jakmile byly pozorovány první náznaky regenerace, byly kalusy přeneseny na nové médium stejného složení. Zde docházelo postupně k bohaté regeneraci prýtů, které byly použity pro mikropropagaci. Samotné granulární kalusy byly samozřejmě schopné znovu iniciovat vegetativní fázi rostliny.

K mikropropagaci byly použity stonky nebo jejich části asi 1 cm dlouhé. Nejlépe se zde osvědčila média RD nebo RD2, významný rozdíl mezi nimi nebyl pozorován. Médium RD1 se ukázalo jako zcela nevhodné, zřejmě vzhledem k nižšímu obsahu 2iP (tab. III). Po dvou až třech měsících jsme z každého stonkového segmentu získali několik desítek nových prýtů, které byly použity k další mikropropagaci nebo byly převedeny do substrátu pro rododendrony, kde zakořenily. Někteří autoři (Iapichino et al., 1991) doporučují před převodem rostlin do substrátu jejich zakořenění v podmínkách *in vitro*, a to na médiu bez cytokininů, ale se zvýšeným obsahem IAA. Jelikož jsme se zakořeněním stonků v substrátu neměli problémy, tento krok jsme vynechali.

Květní pupeny rododendronů se ukázaly jako velmi vhodný materiál pro odvození primárních kultur u odrůd Marcel Menard, Blutopia, Madame, Old Port, Omega, Album Novum, Franceska, Polar Nacht a Erato. Nepozorovali jsme vliv data odběru na regenerační schopnosti odebraných květních pupenů.

## LITERATURA

- Anderson W. C. (1984): A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109: 343–347.
- Iapichino G., Chen, T. H. H., Fuchigami L. H. (1991): Adventitious shoot production from a *Vireya* hybrid of *Rhododendron*. *Hort. Sci.*, 26: 594–596.
- Meyer M. M. (1982): *In vitro* propagation of *Rhododendron catawbiense* from flower buds. *Hort. Sci.*, 17: 891–892.
- Norton C. R., Norton M. E. (1989): Rhododendrons. In: Bajaj Y. P. S. (ed.): *Biotechnology in agriculture and forestry 5. Trees II*. Berlin, Springer-Verlag: 428–451.
- Pavingerová D., Břiza J., Kodýtek K., Niedermeierová H. (1997): Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with GUS-intron chimeric gene. *Pl. Sci.*, 122: 165–171.
- Shevade A., Preece J. E. (1993): *In vitro* shoot and floral organogenesis from stamen explants from a *Rhododendron* PJM group clone. *Scien. Hort.*, 56: 163–170.

Došlo 17. 12. 1999

## Kontaktní adresa:

Daniela Pavingerová, CSc., Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, Branišovská 31, 370 05 Česká Budějovice, Česká republika, tel. +420 38 777 55 05, fax: +420 38 530 03 56, e-mail: daniela@umbr.cas.cz

## VYUŽITÍ TRANSGENOZE U OKRASNÝCH ROSTLIN

### TRANSGENOSIS IN ORNAMENTAL PLANTS

D. Pavingerová

*Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*

**ABSTRACT:** The genetic transformation of ornamental crops considerably enhances the existing efforts of traditional and *in vitro* breeders. These new molecular techniques provide opportunities to alter specific characteristics such as plant form, colour, and pest and disease resistance. The most important application of genetic engineering technologies to the ornamental plants is likely to be in the area of flower colour. In most plants the colour of the flower is determined by flavonoids which are provided by phenylpropanoid pathway. There are two ways of manipulation: blocking flavonoid biosynthesis by antisense genes and transfer of new genes into plant genome. The plants with antisense ACC synthase transgene have a reduced senescence response leading to increased vase life. *Agrobacterium*-mediated gene transfer is the preferred transformation technique in use for ornamental plants.

**Keywords:** *Agrobacterium*; antisense; flavonoids; *chs* gene; transformation

**ABSTRAKT:** Genetickou transformací jako zdroj nových vlastností uplatňují šlechtitelé okrasných rostlin ve stále větší míře. Praktické využití transformací je zde dvojího charakteru. Jeden směr výzkumu je společný s výzkumem prováděným u řady kulturních plodin a týká se odolnosti k chorobám a škůdcům. Druhý směr je specifický pouze pro okrasné rostliny a týká se takových změn fenotypu a vlastností, které by bylo možné využít pro komerční účely. Pozornost se soustřeďuje jednak na změny v zabarvení květů, které souvisejí především se zásahy do biosyntetické dráhy antokyanů, jednak na prodloužení trvanlivosti řezaných květů ve váze, což souvisí s inhibicí syntézy etylenu.

**Klíčová slova:** *Agrobacterium*; antokyaniny; chalkonsyntáza; transgenozé

#### Úvod

Při šlechtění okrasných rostlin se jako doplněk klasických postupů začínají ve stále větší míře uplatňovat metody molekulární genetiky. Nejlépe komerčně využitelný, a tudíž prioritní, je výzkum týkající se změny barvy květů, na který je v současné době soustředěna největší pozornost. Barvu květů ovlivňuje celá řada květních barviv, např. antokyaniny, aurony, chalkony, karoteny apod., které se v květech vyskytují buď samostatně, nebo se mohou různým způsobem kombinovat a doplňovat. Dobrá znalost biosyntetické dráhy květního barviva umožňuje využití jednotlivých genů při změnách barvy květů navozených genetickou transformací.

Barva květů je ve většině případů závislá na konečném produktu biosyntetické dráhy antokyanů daného rostlinného druhu a právě tato biosyntetická dráha je v současnosti nejlépe prostudována.

První specifická flavonoidní struktura vzniká kondenzací jedné molekuly coumaroyl-CoA se třemi molekulami malonyl-CoA za účasti enzymu chalkonsyntázy

(CHS). Výsledkem této reakce je žlutý produkt naringenin chalkon (tetrahydroxychalkon), který je ústředním meziproductem biosyntézy flavonolů, flavononů, izoflavonoidů a antokyanů. V květech je naringenin chalkon okamžitě přeměněn na bezbarvý naringenin flavanon působením enzymu chalkonizomerázy (CHI). Další enzymatický krok, jehož se účastní enzym flavanon-3-hydroxyláza (F3H), může vést ke třem meziproductům (dihydrokaempferol, dihydroquercitin a dihydromyricitin). Ty se dále přemění buď na bezbarvé flavonoly (kaempferol, quercitin a myricetin), nebo působením enzymů dihydroflavonol-4-reduktázy (DFR) a následně 3-O-flavonoid glukosyltransferázy (3GT) přecházejí na květní barviva antokyaniny. V nejjednodušším případě je dihydrokaempferol prekurzorem oranžově zabarveného pelargonidinu, dihydroquercitin se mění na červeně zabarvený kyanidin a dihydromyricetin na modře zabarvený delphinidin. Další odstíny barev závisejí na druhu připojených radikálů (-OH, -OCH<sub>3</sub>) a jejich počtu. V celé biosyntetické dráze antokyanů jsou zabarveny pouze tetrahydroxychalkon a antokyaniny (Mol et al., 1989).

Rozdíly v barvě květů u jednotlivých rostlinných druhů jsou závislé na konečném produktu biosyntézy antokyanů. Často neprobíhá biosyntéza ke všem třem základním antokyanům, jak bylo uvedeno. Např. u petúnií je znám pouze kyanidin a delphinidin, nikoli pelargonidin (Meyer et al., 1987), u chryzantém je konečným přirozeným produktem syntézy antokyanů pouze kyanidin (Courtney-Gutterson et al., 1994), u rododendronů často převažují metylované hydroxyly, které posunují zabarvení k červené barvě (Sakata et al., 1991, 1993; Miyajima et al., 1997). Žluté zabarvení, způsobené nahromaděním chalkonu, se v květech vyskytuje hlavně v prašnicích, nikoli v okvětních lístcích. Jiným konečným produktem biosyntetické dráhy flavonoidů jsou flavonoly, které jsou pro lidské oko bezbarvé. Konečné zabarvení květů je však dáno nejen specifickým antokyanem, ale i hodnotou pH ve vakuolách a přítomností a koncentrací flavonolů a dalších doplňkových barviv.

### Potlačení barvy květů

Při řízených modifikacích barvy květů se vychází z poznatku, že vnesené transgeny, ať už v orientaci antisense (protismyslově) nebo sense, mohou vést u vyšších rostlin k potlačení exprese homologních genů (Blokland et al., 1993), a tedy i k zablokování biosyntézy antokyanů. Obecně se předpokládá, že antisense RNA působí prostřednictvím dsRNA komplexů. Je zřejmé, že mechanismus umlčování genů pomocí antisense RNA je komplexní a zahrnuje řadu faktorů (Nellen, Sczakie, 1996). Na jedné straně může být tento proces přísne sekvenčně specifický, na druhé straně může být antisense RNA použita pro blokování exprese i ne plně homologních genů. K docílení efektu umlčení genu nemusí být použita kopie celého genu, ale pouze kratší homologní úsek. Tyto významné vlastnosti antisense RNA byly prokázány rovněž v případě chalkonsyntázového (*chs*) genu (Jorgensen et al., 1996; Stam et al., 1997a, b), který je klíčovým enzymem biosyntetické dráhy antokyanů.

Geny pro CHS se v rostlinách vyskytují jako mnohagenové rodiny. Nejpodrobněji je soubor *chs* genů studován u petúnií. Zde se genová rodina skládá z osmi až deseti členů lokalizovaných na dvou různých chromozomech (Koes et al., 1987). Většina z těchto *chs* genů byla klonována a některé z nich se mohou zařadit do podrodin na základě jejich vysoké sekvenční homologie a těsné vazby. V okvěti je ve větší míře transkribován gen *chsA* (90% *chs* mRNA) a v menší míře gen *chsJ* (10% *chs* mRNA) (Gutterson, 1995). Ukázalo se, že ostatní *chs* geny postrádají typické charakteristiky pseudogenů, a mohou být proto aktivovány na nižší úrovni v jiných tkáních nebo za jiných vývojových podmínek (Koes et al., 1989b). Pouze gen *chsD* vystupuje jako neaktivní pseudogen. Každý člen této rodiny se skládá ze dvou exonů oddělených intronem různé velikosti a sekvence, který je lokalizován v konzervované pozici. Homologie mezi ne vazebnými *chs* geny je na úrovni

DNA přibližně 80%, homologie mezi členy podrodin je vyšší (90 až 99%) (Koes et al., 1989a). Rovněž u gerbery byla prokázána mnohagenová rodina pro *chs* geny, obsahující sedm až deset členů (Elomaa et al., 1993), a je velmi pravděpodobné, že podobná situace je i u ostatních rostlin.

Potlačení exprese genů pro CHS za využití jak sense, tak antisense orientace *chs* genu je rozpracováno hlavně u petúnií (např. Krol et al., 1988; Krol et al., 1990; Mol et al., 1990; Napoli et al., 1990; Que et al., 1997). Zde se úspěšná transformace projevuje střídáním barevných a bílých prstenců, případně sektorů. Naproti tomu u gerber se umlčení genů pro CHS projevuje jako celoplošné zesvětlení květů (Elomaa et al., 1993, 1996; Helariutta et al., 1995a).

Využívají se i další geny bisyntetické dráhy antokyanů, především *dfp* geny, a to rovněž u petúnie (Mol et al., 1990) a gerber (Helariutta et al., 1995b). Účinek je obdobný jako v případě *chs* genů.

### Navození nové barvy květů

Nového zabarvení květů můžeme dosáhnout vnesením genu, který je pro rostlinu cizí. Pokud je v rostlině přítomen vhodný meziproduct, navodí tento gen syntézu nového květního barviva. Zatímco v případě umlčování genů pomocí antisense RNA je možné výsledkem do značné míry předpovědět, zde je výsledek zcela nepředvídatelný.

Nejznámější příklad tohoto genového přenosu poprvé uvedli u petúnie Meyer et al. (1987). Petúnie není schopná převádět dihydrokaempferol na pelargonidin. Neschopnost syntetizovat pelargonidin spočívá v substrátové specifitě jejího enzymu DFR, který jako substrát akceptuje pouze dihydromyricetin a méně často dihydroquercetin. Mutanty petúnií, které neobsahují dihydromyricetin a dihydroquercetin, se mohou projevit pouze bílou barvou. Mutant petúnie RL01 obsahuje recesivní alely v Ht1 a Hf1 lokusech, a postrádá tudíž F3H aktivitu, což se projeví značným snížením množstvím kyanidinových a delphinidinových derivátů a akumulací dihydrokaempferolu. Všechny ostatní geny nezbytné pro biosyntézu antokyanů jsou reprezentovány dominantními alelami. Autoři využili mutantu RL01 jako příjemce genu A1 z kukuřice, který kóduje dihydroquercetin-4-reduktázu (DQR), což je enzym, který se účastní syntézy kyanidinových derivátů v aleuronech kukuřice. Tento enzym nevykazuje tak úzkou substrátovou specifitu jako DFR z petúnie a je schopen redukovat i dihydrokaempferol, a tím poskytnout meziproduct pro biosyntézu pelargonidinu.

### Transformace okrasných rostlin pomocí *Agrobacterium*

Při přenosu genů do okrasných rostlin se používá celá řada známých metod transformací. U dvoudělož-

ných rostlin se většinou využívá přenos genů zprostředkovaný bakteriemi rodu *Agrobacterium*, u jednoděložných rostlin je potřeba použít některý z přímých přenosů DNA do rostlinných buněk (Ondřej, 1992).

Při transformaci okrasných rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Agrobacterium rhizogenes* se téměř vždy uplatňuje modifikovaná metoda transformace listových disků (Horsch et al., 1985). Ne všechny okrasné rostliny jsou schopné regenerovat nové rostliny z listových čepelí, často je potřeba použít jiné části rostliny – řapíky, internodia, hypokotyle, děložní lístky apod. Rozdíly nalézáme nejen mezi rostlinnými druhy, ale často i mezi odrůdami téhož druhu. Prvým krokem transformací proto musí být vždy vypracování efektivního regeneračního systému s minimálním kalusovým stadiem, aby se co nejvíce redukoval vliv somaklonální variability. Dále je potřeba propracovat nejjvhodnější metodiku transformace a až poté lze přikročit k cíleným přenosům genů. Při testování vhodných metod se transformace provádí s vektory nesoucími některý snadno detekovatelný signální gen, např.  $\beta$ -glukuronidázu, luciferázu, GFP protein.

Kromě již zmíněné petúnie byly do současné doby publikovány úspěšné transformace celé řady okrasných rostlin, z nichž některé uvádíme:

**Chryzantéma (*Dendranthema* sp.).** Citlivost chryzantém k *A. tumefaciens* je značně odrůdově specifická, liší se i závislost na typu explantátu a kultivačního média. Rozdíly byly zaznamenány i při použití různých kmenů *A. tumefaciens*, způsobu selekce, typu regeneračního systému apod. K úspěšně transformovaným odrůdám patří např. Iridon (Urban et al., 1994), Pictor (Renou et al., 1993), resp. White Snowdon (Pavingerová et al., 1994). U odrůdy Moneymaker se podařilo inhibovat expresi *chs* genu (Courtney-Guttererson, 1993; Courtney-Guttererson et al., 1994).

**Gerbera (*Gerbera hybrida*).** U odrůdy Terra Regina se podařilo změnit pomocí antisense *chs* genu původní červenou barvu květů (Elomaa et al., 1993, 1996). K transformacím byly úspěšně použity listové řapíky, k vyhubení bakterií citování autoři nedoporučili použití cefotaximu, jelikož významně redukoval regenerační schopnost.

**Karafiát (*Dianthus caryophyllus*).** První úspěšná transformace karafiátu pomocí *Agrobacterium* byla publikována v roce 1989 (Woodson, Goldsbrough, 1989). V současné době se k transformacím nejčastěji používají buď bazální části listů (Firoozabady et al., 1991), nebo stonkové segmenty (Lu et al., 1991). Protože se karafiát pěstuje především jako rostlina používaná k řezu, má nesporný význam úspěšná transformace antisense genem pro ACC (1-aminocyclopropan-1-carboxylová kyselina) syntázu. Inhibice tohoto genu snižuje syntézu etylenu, a tím umožní prodloužení životnosti květů ve váze (Michael et al., 1993).

**Pelargonie (*Pelargonium*).** Citlivost pelargoníí k *A. tumefaciens* byla prokázána jak u odrůd *Pelargonium x domestikum*, tak u odrůd *Pelargonium x hortorum* (Ro-

bichon et al., 1995; Boase et al., 1996). K transformacím byly použity děložní a primární listy.

**Růže (*Rosa* sp.).** Transgenní rostliny růže byly získány jednak po kokultivaci kalusů růže s *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes* (Firoozabady et al., 1994), jednak po transformaci protoplastů *A. tumefaciens* (Robinson, Firoozabady, 1993). K selekci byla využívána jak rezistence ke kanamycinu, tak k hygromycinu.

**Rhododendron (*Rhododendron* sp.).** Úspěšná transformace rododendronů byla doposud publikována ve dvou případech (Ueno et al., 1996; Pavingerová et al., 1997). V obou případech šlo o transformaci pomocí *A. tumefaciens* a do rostlin byl vnášen gen pro  $\beta$ -glukuronidázu a *nptII* gen navozující rezistenci ke kanamycinu. Transformace rododendronů mohou být využity při modifikaci barvy květů, morfologických forem nebo při navození odolnosti ke stresům vnějšího prostředí.

**Tulipán (*Tulipa gesneriana*).** Zvládnutí transformačních technik u tulipánů je ze strany šlechtitelů velice žádoucí. K přenosu genů zde byly použity dvě techniky, jednak přímý přenos pomocí mikroprojektilů, jednak přenos zprostředkovaný bakteriemi rodu *Agrobacterium* (Wilmink et al., 1992). V obou případech byly získány transgenní rostliny nesoucí gen pro  $\beta$ -glukuronidázu.

## Závěr

S rozvojem vědních oborů, jakými jsou např. molekulární genetika nebo genové inženýrství rostlin, se začala rozvíjet i nová etapa šlechtění okrasných rostlin. Je identifikováno a izolováno stále více důležitých genů, které je možné pomocí vhodných vektorů vnášet do rostlinného genomu, a navodit tak zcela nové vlastnosti okrasných rostlin. Studují se biosyntetické dráhy auro-nu, flavonolů a karotenů, které přispívají ke žlutému zbarvení květů, objevují se i snahy po využití dalších zdrojů modrého zbarvení květů.

Vedle barvy, tvaru, doby nasazení a životnosti květů je věnována pozornost i možnostem, jak ovlivnit celkový habitus rostlin, jak navodit rezistenci vůči pesticidům a herbicidům a samozřejmě i odolnost rostlin k různým chorobám. Neoddělitelnou součástí novodobého šlechtění okrasných rostlin se tak vedle tradičních šlechtitelských metod stávají i metody transgenoz.

## Poděkování

Práce vznikla na základě teoretických předpokladů projektu AV ČR S5051006.

## LITERATURA

- Blokland R. van, Lange P. de, Mol J. N. M., Kooter J. M. (1993): Modulation of gene expression in plants by antisense genes. In: Croke S. T., Lebleu B. (eds.): Antisense research and applications. London, Tokyo, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbon: 125–148.

- Boase M. R., Deroles S. C., Winefield C. S., Butcher S. M., Borst N. K., Butler R. C. (1996): Genetic transformation of regal pelargonium (*Pelargonium x domesticum* Dubonet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Pl. Sci.*, *121*: 47–61.
- Courtney-Gutterson N. (1993): Molecular breeding for colour, flavour and fragrance. *Scient. Hort.*, *55*: 141–160.
- Courtney-Gutterson N., Napoli C., Lemieux C., Morgan A., Firoozabady E., Robinson K. E. P. (1994): Modification of flower color in florist's chrysanthemum: Production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Bio/Technology*, *12*: 268–271.
- Elomaa P., Helariutta Y., Kotilainen M., Teeri T. H. (1996): Transformation of antisense constructs of the chalcone synthase gene superfamily into *Gerbera hybrida*: differential effect on the expression of family members. *Mol. Breed.*, *2*: 41–50.
- Elomaa P., Honkanen J., Puska R., Seppanen P., Helariutta Y., Mehto M., Kotilainen M., Nevalainen L., Teeri T. H. (1993): *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Technology*, *11*: 508–511.
- Firoozabady E., Lemieux C. S., Moy Y. S., Moll B., Nicholas J. A., Robinson K. E. P. (1991): Genetic engineering of ornamental crops. *In Vitro*, *27*: 96A.
- Firoozabady E., Moy Y., Courtney-Gutterson N., Robinson K. E. P. (1994): Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryonic tissue. *Bio/Technology*, *12*: 609–613.
- Gutterson N. (1995): Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression. *Hort. Sci.*, *30*: 964–966.
- Helariutta Y., Elomaa P., Kotilainen M., Griesbach R. J., Schroder J., Teeri T. H. (1995a): Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (*Asteraceae*). *Pl. Mol. Biol.*, *28*: 47–60.
- Helariutta Y., Kotilainen M., Elomaa P., Teeri T. H. (1995b): *Gerbera hybrida* (*Asteraceae*) imposes regulation at several anatomical levels during inflorescence development on the gene for dihydroflavonol-4-reductase. *Pl. Mol. Biol.*, *28*: 935–941.
- Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, *227*: 1229–1231.
- Jorgensen R. A., Cluster P. D., English J., Que Q., Napoli C. A. (1996): Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single copy vs. complex T-DNA. *Pl. Mol. Biol.*, *31*: 957–973.
- Koes R. E., Spelt C. E., Elzen P. J. M. van den, Mol J. N. M. (1989a): Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene*, *81*: 245–257.
- Koes R. E., Spelt C. E., Mol J. N. M. (1989b): The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Pl. Mol. Biol.*, *12*: 213–225.
- Koes R. E., Spelt C. E., Mol J. N. M., Gerats A. G. M. (1987): The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V 30): sequence homology, chromosomal localization and evolutionary aspects. *Pl. Mol. Biol.*, *10*: 159–169.
- Krol A. R. van der, Lenting P. E., Veenstra J., Meer I. M. van der, Koes R. E., Gerats A. G. M., Mol J. N. M., Stuitje A. R. (1988): An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, *333*: 866–869.
- Krol A. R. van der, Mur L. A., Lange P. de, Mol J. N. M., Stuitje A. R. (1990): Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Pl. Mol. Biol.*, *14*: 457–466.
- Lu C., Nugent G., Wardley-Richardson T., Chandler S. F., Young R., Dalling M. J. (1991): *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Bio/Technology*, *9*: 864–868.
- Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H. (1987): A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*, *330*: 677–678.
- Michael M. Z., Savin K. W., Baudinette S. C., Graham M. W., Chandler S. F., Lu C.-Y., Caesar C., Gautrais R., Young R., Nugent G. D., Stevenson K. R., O'Conner E. L. J., Cobbett C. S., Cornish E. C. (1993): Cloning of ethylene biosynthetic genes involved in petal senescence of carnation and petunia, and their antisense expression in transgenic plants. In: Pech J. C. (ed.): Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Dordrecht, Kluwer Acad. Publ.: 298–303.
- Miyajima I., Uemoto S., Sakata Y., Arisumi K. (1997): Morphology and flower pigments of wild evergreen azalae. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, *66*: 385–391.
- Mol J. N. M., Krol A. R. van der, Tunen A. J. van, Blokland R. van, Lange P. de, Stuitje A. R. (1990): Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS*, *268*: 427–430.
- Mol J. N. M., Stuitje A. R., Krol A. van der (1989): Genetic manipulation of floral pigmentation genes. *Pl. Mol. Biol.*, *13*: 287–294.
- Napoli C., Lemieux C. S., Jorgensen R. A. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Pl. Cell*, *2*: 279–289.
- Nellen W., Sczakie G. (1996): *In vitro* and *in vivo* action of antisense RNA. *Mol. Biol.*, *6*: 7–15.
- Ondřej M. (1992): Genové inženýrství kulturních rostlin. Praha, Academia: 111–183.
- Pavingerová D., Bříza J., Kodýtek K., Niedermeierová H. (1997): Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with GUS-intron chimeric gene. *Pl. Sci.*, *122*: 165–171.
- Pavingerová D., Dostál J., Bisková R., Benetka V. (1994): Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Pl. Sci.*, *97*: 95–101.
- Que Q., Wang H., English J. J., Jorgensen R. A. (1997): The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter

- strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Pl. Cell*, *9*: 1357–1368.
- Renou J. P., Brochard P., Jalouzot R. (1993): Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) after hygromycin resistance selection. *Pl. Sci.*, *89*: 185–197.
- Robichon M. P., Renou J. P., Jalouzot R. (1995): Genetic transformation of *Pelargonium x hortorum*. *Pl. Cell Rep.*, *15*: 63–67.
- Robinson K. E. P., Firoozabady E. (1993): Transformation of floriculture crops. *Scient. Hort.*, *55*: 83–99.
- Sakata Y., Arisumi K., Miyajima I. (1991): Some morphological and pigmental characteristics in *Rhododendron kaempferi* Planch., *R. kiusianum* Makino and *R. eriocarpum* Nakai in Southern Kyushu. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, *60*: 669–675.
- Sakata Y., Miyajima I., Arisumi K. (1993): Variations in some morphological and pigmental characteristics in *Rhododendron kaempferi* Planch., *R. kiusianum* Makino and their natural hybrids on Kirishima mountain mass. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, *61*: 925–932.
- Stam M., Bruin R. de, Kenter S., Hoorn R. A. L. van der, Blokland R. van, Mol J. N. M., Kooter J. M. (1997a): Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Pl. J.*, *12*: 63–82.
- Stam M., Mol J. N. M., Kooter J. M. (1997b): The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.*, *79*: 3–12.
- Ueno K., Fukunaga Y., Arisumi K. (1996): Genetic transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Pl. Cell Rep.*, *16*: 38–41.
- Urban L. A., Sherman J. M., Moyer J. W., Daub M. E. (1994): High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Pl. Sci.*, *98*: 69–70.
- Wilink A., Ven B. C. E. van de, Dons J. J. M. (1992): Expression of the GUS gene in the monocot tulip after introduction by particle bombardment and *Agrobacterium*. *Pl. Cell Rep.*, *11*: 76–80.
- Woodson W. R., Goldsbrough P. B. (1989): Genetic transformation of carnation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Hort. Sci.*, *24*: 80.

Došlo 17. 12. 1999

---

*Kontaktní adresa:*

Daniela Pavingerová, CSc., Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel. +420 38 777 55 05, fax: +420 38 530 03 56, e-mail: daniela@umbr.cas.cz

---

## POKYNŮ PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doloženy krátkým a rozšířeným souhrnem (včetně klíčových slov).

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nesmí přesáhnout 12 strojopisných stran včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

**Vlastní úprava rukopisu:** formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery. K rukopisu je třeba přiložit disketu s prací pořízenou na PC a s grafickou dokumentací. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

**Název práce (titul)** nemá přesáhnout 85 úhozů. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

**Krátký souhrn (Abstrakt)** je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Musí obsahovat klíčová slova. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

**Rozšířený souhrn (Abstract)** je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

**Úvod** má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována, a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

**Literární přehled** má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému.

**Metoda** se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

**Výsledky** – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

**Diskuse** obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

**Literatura** by měla sestávat hlavně z lektorovaných periodik. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PŠC, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

**Rukopis nebude redakcí přijat k evidenci, nebude-li po formální stránce odpovídat pokynům pro autory.**

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary (including key words).

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed 12 typescript pages, including tables, figures and graphs.

**Manuscript layout:** quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript. A PC diskette should be provided with the paper and graphical documentation. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The **title** of the paper shall not exceed 85 strokes. Subtitles of the papers are not allowed either.

**Abstract** is an information selection of the subject and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise basic numerical data including statistical data. It must contain key words. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

**Introduction** has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

**Review of literature** should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

**Discussion** contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The section **References** should preferably contain reviewed periodicals. The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number or e-mail.

**The manuscript will not be accepted to be filed by the editorial office if its formal layout does not comply with the instructions for authors.**

## OBSAH – CONTENTS

Užík M., Žofajová A.:	
Chlorophyll and nitrogen content in leaves of winter wheat at different genotypes and fertilization Obsah chlorofylu a dusíka v listoch ozimnej pšenice pri rozdielnych genotypoch a hnojení .....	237
Šašek A., Prášilová P., Černý J., Prášil I., Skupinová S.:	
Predikce zimovzdornosti pšenice seté pomocí gliadinových genetických markerů Frost-hardiness prediction of common wheat using gliadin genetic markers.....	245
Knoblochová H., Gálová Z.:	
High molecular weight glutenin subunits variation and relative quantitation in winter spelt wheat cultivars Variabilita a relatívne zastúpenie vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek v ozimných formách odrôd pšenice špaldovej.....	255
Hradilík J., Psota V., Fišerová H., Hudecová M., Klemš M., Reinöhl V.:	
Dormancy and post-harvest maturation of malt barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) caryopses Dormance a posklizňové dozrávanie obiliek sladovníckeho ječmene ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) .....	261
Fiala J., Gaisler J.:	
Tvorba biomasy při rozdílném ošetřování travních porostů bez pícninářského využití The production of biomass by different management of grasslands without using for forage production ..	269
Balík J., Tlustoš P., Pavlíková D., Száková J., Kaewrahn S., Hanč A.:	
Příjem kadmia a zinku rostlinami ovesa po aplikaci čistírenských kalů ošetřených vápencem a bentonitem Cadmium and zinc uptake by oat from soils amended by sewage sludge incubated with lime and bentonite .....	273
Pavingerová D., Bříza J., Prenerová E.:	
Odvození primárních kultur z květních pupenů rododendronů <i>In vitro</i> propagation of <i>Rhododendron</i> spp. from flower buds .....	281
INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ – INFORMATION – STUDY – REPORT	
Pavingerová D.:	
Využití transgenozu u okrasných rostlin Transgenesis in ornamental plants.....	284