



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



EXTRAKCE PŮDNÍ SEMENNÉ BANKY PLEVELŮ

Metodika

Agrotest fyto, s.r.o.

OP vzdělávání pro konkurenceschopnost

Oblast podpory 7.2.3 - Lidské zdroje ve výzkumu a vývoji

Název projektu: Zkvalitnění lidských zdrojů v aplikovaném zemědělském
výzkumu v oblasti udržitelné produkce obilovin

(Improvement of human resources in applied agricultural research on
sustainable cereal production)

Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/30,0011

Kroměříž, 2014

Ing. Lukáš Strnad, Ph.D.

Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

Extrakce půdní semenné banky plevelů

Metodika vznikla jako součást projektu CZ.1.07/2.3.00/30,0011 „Zkvalitnění lidských zdrojů v aplikovaném zemědělském výzkumu v oblasti udržitelné produkce obilovin“.

© L. Strnad, 2014

ISBN: 978-80-87555-12-5

Cíl metodiky

V souvislosti se vzpomínkou na zlaté časy herbicidů a přítomnou akcelerující rezistencí plevelů (Delye, 2013) bude stále důležitější studium potencionálního zaplevelení půdy. Tyto informace mohou poskytnout potřebný náskok v boji s polními plevely. Půdní semenná banka plevelů je mimo jiné indikátorem kvality regulačních opatření. Na druhou stranu je třeba si uvědomit, že mezi potencionálním a aktuálním zaplevelením bývá slabá korelace (Cardine *et al.*, 1996) a data půdní semenné banky plevelů slouží jen letnému vhledu do dynamického systému jakým i hospodářství kulturních rostlin bezesporu je.

Půdní semennou bankou rozumíme soubor živých semen (ve smyslu reproduktivní, tedy generativní diaspor). Semena se dostávají do půdní semenné banky nejen z místní populace, kdy dojde k jejich dostatečné produkci, ale také přenosem např. se statkovými hnojivy. Semenná banka uchovává genetickou variabilitu, je „evoluční paměť“ populace (semena různého původu a stáří). Rozlišujeme přechodnou banku semen, kde diaspor vytrvávají kratší dobu než jeden rok, a trvalou s delší dobou zachování životaschopnosti. K výzkumu půdní semenné banky slouží jednak extrakční metody (extraction method), kdy se semena vybírají z odebraných vzorků půdy k jejich následné determinaci. Druhým způsobem jak získat přehled o půdní semenné bance je kultivační metoda (emergence method). Vzorek se umístí do vhodných podmínek ve skleníku, kde obsažená semena plevelů vzcházejí a jsou určována. Užívá se též kombinace obou postupů, kdy se vzorky nejprve proplaví přes síta a vyberou se semena, která se kultivují ve skleníku. Všechny postupy jsou poměrně pracné, vyžadující mnoho času, jsou však finančně relativně nenáročné. Žádný si nenárokují univerzálnost použití a pro každou studii může být příhodná jiná metoda (Forcella *et al.*, 2003). To platí i o způsobu odběru vzorků půdy.

V průběhu řešení projektu CZ.1.07/2.3.00/30,0011 „Zkvalitnění lidských zdrojů v aplikovaném zemědělském výzkumu v oblasti udržitelné produkce obilovin“ byla hodnocena půdní semenná banka plevelů u dlouhodobých polních pokusů. Na závěr metodiky jsou výsledky studie představeny. Odběr vzorků půdy a výsledky z následné extrakce semen plevelů jsou podkladem pro další studium, které zahrnuje i informaci o aktuálním zaplevelení.

Cílem předkládané metodiky bylo vypracovat a popsat detailní postup odběru vzorků půdní semenné banky plevelů s následnou extrakcí semen a jejich zhodnocením. Diskutována jsou témata jako termíny a způsob odběru, počet sond, uchovávání vzorků, vlastní extrakce vzorků, určování životaschopnosti semen, determinace druhů, interpretace výsledků. V neposlední řadě je podáno srovnání s dalšími způsoby provedení studia půdní semenné banky plevelů.

Vlastní popis metodiky

Odběr vzorků

Termíny odběru

Odběr vzorků by měl být uskutečněn s ohledem na možné srovnání aktuálního zaplevelení, tedy po dozrání a opadu semen. V úvahu je třeba brát též zpracování půdy, kdy například s orbou dochází k zapracování semen do větších hloubek. Odběr obvykle provádíme těsně před jarním setím plodiny. I z organizačního hlediska se jeví časné jaro jako nejvhodnější termín odběru. Při ranějších termínech odběru je třeba počítat se ztrátou semen během zimy. Jestliže plánujeme opakovaná měření stejná doba odběru je samozřejmostí.

Rozmístění odběru vzorků

Obecně se semena plevelů nacházejí v nepravidelném rozmístění s tendencí shlukovat se na několika málo místech. Pro zachycení nejvíce pravděpodobnějšího obrazu nepoužíváme náhodné, ale vhodnější systematické (např. čtvercová síť) rozmístění vzorků (Ambrosio *et al.*, 2004). Čtverce by měly být umístěny v závislosti na typu studie, tedy nezkoumáme-li vliv okolní vegetace, ve středu ploch. Na druhou stranu z dřívějších prací např. Benoit *et al.* (1989) doporučoval vhodnější náhodné rozmístění. Při zvažování počtu a velikosti (objem vzorku v cm^3 , hmotnost) půdních sond bereme v úvahu hustotu semen. Jestliže se semena vyskytují zřídka, snadněji dosáhneme přesnosti použitím větších sond s méně opakováním. Při vyšších hustotách semen bývá požadovaná přesnost dosažena i s menším počtem sond.

Počet a velikost vzorků

Odebíráme dílčí vzorky ornice (vpichy sondovací tyčí) ty pak z jedné sledované plochy smícháme a z takto vzniklého základního vzorku odebereme průměrné vzorky pro analýzu. Celková hmotnost dílčích vzorků na plochu se většinou pohybuje kolem 3-4 kg čerstvé zeminy a průměrné vzorky (obvykle z 10 dílčích) se odebírají tři o hmotnosti zhruba 350 g čerstvé zeminy. Ze vzorků se vytrídí větší kameny a půda se rozdrobí. V objemových jednotkách je to 500 - 600 cm^3 na 1 ha orné půdy při stanovení na velkých plochách. Jiné prameny doporučují hmotnost jednoho průměrného vzorku (celkem analyzujeme dva) pro analýzy 500 g na vzduchu vyschlé zeminy.

Výsledky přepočteme přes kruhovou základnu sondy na 1m², nebo pracujeme-li s vyschlou zemínou, jak uvádí (Smutný *et al.*, 2002), pomocí koeficientu *C*.

$$C = 10\,000 \cdot h \cdot O_v / g$$

h = hloubka odběru dílčích vzorků (cm)

O_v = objemová hmotnost redukována (zeminy, g.cm⁻³)

g = hmotnost průměrného vzorku

Z praktického hlediska se doporučuje sonda s průměrem 5 cm a hloubkou 20 cm nebo s ohledem na hloubku možné orby až 30 cm. Počet sond pak uvádí tabulka, tedy při požadované přesnosti (odvozená z předchozích studií) *D* = 0,3 a odhadovaném počtu semen 5 000 na m² je to 8 sond, ale akceptovatelná hranice je i nižší *D* = 0,5 (Forcela *et al.*, 2003). Nižší číslo koeficientu *D* nám tedy udává vyšší pravděpodobnost správného odhadu skutečných hodnot počtu semen v půdě. Na těžších půdách je vhodnější použít většího průměru sondy.

Tabulka 1 Odhadovaný počet semen ve zkoumané ploše a počet sond s průměrem 5 cm při různé požadované přesnosti

Počet semen na 1 m ²	Požadovaná přesnost (<i>D</i>)			
	0,2	0,3	0,4	0,5
10	716	318	179	115
50	277	123	69	44
100	184	82	46	29
500	71	32	18	11
1000	47	21	12	8
5000	18	8	5	3
10000	12	5	3	2

Počty a velikosti vzorků jsou tedy závislé na typu studie, pro každou může být dostačující a z praktického hlediska vhodný jiný přístup (Mickelson *et al.*, 2003).



Obr. 1 Půdní sondy ke studiu semenné banky plevelů

Rozbor vzorků

Kultivační metoda (emergence method)

Tato metoda vyžaduje oproti následně podrobněji popsané extrakční metodě daleko více času a je náročnější i z hlediska potřebného prostoru, dosažené výsledky mají však větší spolehlivost. (Forcela *et al.*, 2003). Odebrané vzorky se uloží do chladu a temna. Vzorky se promyjí přes síta o tloušťkách 4 mm – 0,2 mm. Ve skleníku se zbytek ze sít zbavený větších neorganických částí rozprostře na vrstvu perlitu (Argex) se substrátem a zakryje se vrstvou rašeliny o tloušťce 4 mm (De Cauwer *et al.*, 2010). K odbourání dormance semen se doporučuje v létě po dobu dvou týdnů snížit závlahu. V zimním období necháme teplotu klesnout pod bod mrazu, opět z důvodu odbourání dormance. Vyklíčené rostliny se určují a odebírají po dobu 12 měsíců.

Příprava vzorků pro extrakční metodu

Vzorky půdy necháme proschnout a skladujeme v suchu nebo - jak je většinou obvyklé v praxi - uchováváme s původní vlhkostí v temnu v chladničce při 4 °C. Před započítáním vlastní extrakce semen necháme vzorky zeminy vylouhovat v kádince s vodou na 24 hod.

Extrakce semen

Semena jsou oddělena od zeminy promýváním na soustavě sít s nejmenší velikostí ok 0,2 mm nebo se také používá floatační metody (Tsuyuzaki, 1994). K podstatně rychlejšímu rozmělnění a promytí zeminy se používá třepací zařízení s přívodem vody např. Analysette (Smutný *et al.*, 2002). Vzorky v tomto přístroji necháme třepat a promývat obvykle 30 min. při středních otáčkách

v závislosti na typu zeminy, jílovitější půdy zpracováváme déle, tedy do té doby, až se odplaví všechny částice menší než 0,2 mm (odtékající voda je naprosto čirá). Usazeniny na jednotlivých sítích uložíme k vyschnutí na filtračním papíru. Kromě zmiňovaného přístroje lze použít i textilie (Mesgaran *et al.*, 2007).

Výběr a určování semen z vyplaveného vzorku v některých případech ztěžuje obsah písku. Specificky lehčí organické částice (včetně semen) můžeme oddělit od anorganického podílu pomocí kapaliny o větší specifické hmotnosti. Obvykle se používá chlorid uhličitý (tetrachlormethan) o specifické hmotnosti 1,59. Pozor! Je zařazen do kategorie „ostatní jedy“. Vyschlá zemina z filtračních papírů se vloží do roztoku tetrachlormethanu s vodou v poměru 1:1, kde se obsah promíchá. Lehčí podíl, včetně semen, vyplave na hladinu, minerální částice klesají ke dnu. Plovoucí část vzorku odlijeme na filtr, přidáme tetrachlormethan a postup opakujeme. Filtrovaný tetrachlormethan můžeme znovu použít. Luschei *et al.* (1998) však upozorňují na případné ovlivnění klíčivosti a životaschopnosti semen touto látkou a vlastním extrakčním procesem.



Obr. 2 Přístroj Analysette[®] k extrahování semen plevelů ze vzorků půdy

Výběr a determinace semen

Z proschlých částic na filtračním papíru se pomocí lupy nebo binokuláru, pinzety a preparační jehly vybírají a určují semena jednotlivých druhů. K určování druhů slouží obrazové atlasy (Heinisch *et al.*, 1955, Lhotská *et al.*, 1985 Lhotská 1957) nebo internetové stránky (např. <http://seeds.eldoc.ub.rug.nl/>), kde je potřeba znát důvěryhodnost zdroje.



Obr. 3 Binokulár sloužící k určování semen plevelů

Test životaschopnosti semen

Semena nemusí být klíčivá buď trvale (embryo je rozrušeno) nebo dočasně (embryo je ve stavu klidu tzv. semena dormantní). Pouze semena, která se vizuálně jeví zdravá a nepoškozená, započítáváme a určujeme. Mimo toto hodnocení se obvykle používá pinzety k lehkému zmáčknutí tzv. „seed crushing test“. Další možností, jak zjistit životaschopnost semen, je tetrazolium testem. Semena se nařízou a barví. Peters ed. (2000) uvádí podrobný postup. Sawma *et al.* (2002) srovnávající tetrazolium test a zmáčknutí zjistil lehké nadhodnocení testu zmáčknutím, nebylo však statisticky významné pro větší soubor rozdílných semen. Zuluaga *et al.* (2004) však upozorňuje, že statisticky významná část semen hodnocena zmáčknutím jako neživotaschopná, klíčila. Vybraná semena můžeme samozřejmě nechat naklíčit, to se ale z úsporných důvodů neprovádí, jestliže jsme se už jednou rozhodli pro extrakční metodu na začátku studie.



Obr. 4 Extrahovaná semena plevele Silenky noční (Silene noctiflora)

Interpretace výsledků

Univerzálním způsobem, jak lépe porozumět dynamice půdní semenné banky plevelů, je opakovat měření. Srovnání aktuálního a potenciálního zaplevelení - tedy sběr dat pokryvností a počtu jednotlivých druhů vzcházejících plevelů na místech odběru půdních vzorků - umožní rovněž přesnější výklad. Dobrým příkladem, jak využít informace vztahující se k půdní semenné bance plevelů, je práce Liebmana *et al.* (2014), kde bylo dokonce použito imitace semen k lepšímu pochopení osudu těch živých. Další kapitolou je zkombinování studia vlivu herbicidů, střídání plodin nebo způsobu hnojení na společenstvo půdní semenné banky plevelů. Studium potenciálního zaplevelení zjistíme zásobu semen v půdní semenné bance. Dostaneme tak jakýsi náskok v kontrole zaplevelení. Musíme však brát ohled na to, že množství semen v půdě pak díky dormanci a mnoha dalších vlivů nemusí s aktuálním zaplevelením korespondovat. Přesto je informace o potenciálním zaplevelení užitečná. Jabbour *et al.*, (2014) uvádí že informovanější zemědělci mají méně problémů s kontrolou plevelů.

Případová studie

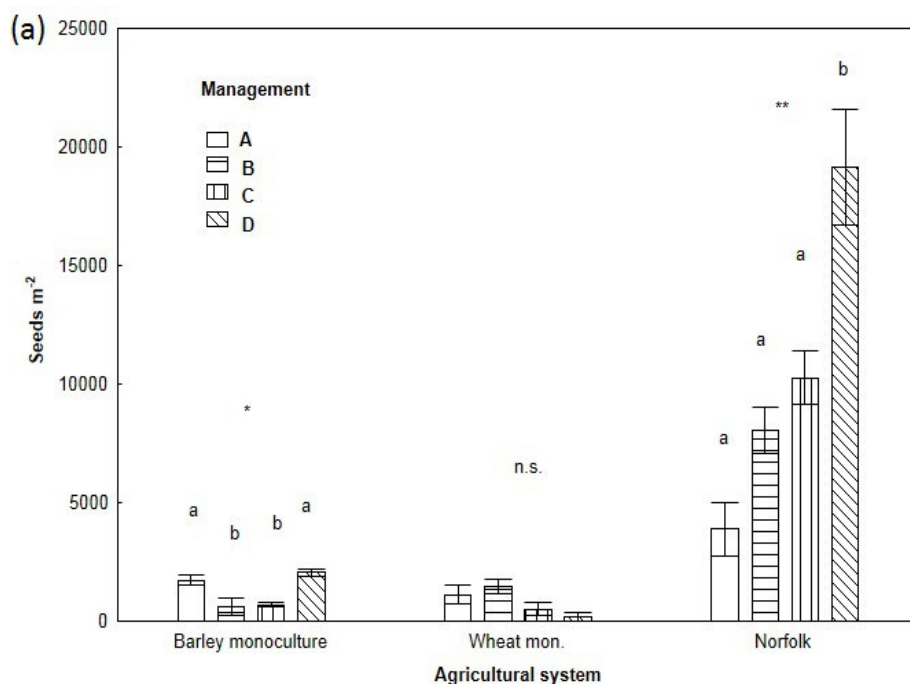
Půdní semenná banka plevelů byla hodnocena u dlouhodobých polních pokusů. Zkoumána byla monokultura jarního ječmene (založena r. 1970) a monokultura ozimé pšenice (zal. r. 1972), obě s variantami hnojení: zaorávka slámy, zaorávka slámy + zelené hnojení, zelené hnojení a kontrolou bez organického hnojení. Studie byla provedena i na norfolském osevním postupu (zal. r. 1970, sled plodin - jetel luční, pšenice ozimá, cukrovka nebo krmná řepa, ječmen jarní), který slouží oběma monokulturám jako srovnávací standard. Půdním typem je černozem hnědozemní s obsahem 40% jílovitých a 15% písčitých částic s maximální hloubkou orby 20 cm.

Odběr byl proveden na začátku dubna v obdélníku 5 x 1 m uprostřed každé subplochy (35 x 50 m). K odběru bylo použito sondy (průměr 3,5 cm) do hloubky 20 cm. Z 10 dílčích vzorků z každé plochy se po promísení, a ve stejný čas, odebraly tři průměrné vzorky s hmotností čerstvé zeminy 350 g.

Vzorky půdy byly uchovány s původní vlhkostí v temnu v chladničce při 4 °C. Před započítáním vlastní extrakce semen se nechaly vzorky zeminy vylouhovat v kádince s vodou po dobu 24 hod. K rozmělnění a promytí zeminy bylo použito třepací zařízení s přívodem vody – Analysette 3. Vzorky se v přístroji nechaly třepat a promývat 30 min. při středních otáčkách. Usazeniny na jednotlivých sítích se uložily k vyschnutí na filtračním papíru. Z proschlých částic na filtračním papíru se pomocí binokuláru, pinzety a preparační jehly vybraly a určovaly semena jednotlivých druhů. Byla započítávána jen semena životaschopná. Výsledky shrnuje tabulka a graf s přepočítanými počty semen.

Tabulka 2 Počty semen (na 1 m²) pro nalezený druh ve třech zkoumaných agrosystémech; monokultury jarního ječmene a ozimé pšenice s variantami hnojení: zaorávka slámy (A), zaorávka slámy + zelené hnojení (B), zelené hnojení (C), kontrola bez organického hnojení (D). Norfolký osevní postup s pořadím plodin: jetel luční (A), pšenice ozimá (B), cukrovka nebo krmná řepa (C), ječmen jarní (D).

Druh / Management	Monokultura ječmene				Monokultura pšenice				Norfolk			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Amaranthus retroflexus</i>						518			3453	6130	9238	15626
<i>Capsela bursa pastoris</i>									518			1899
<i>Cirsium arvense</i>											259	
<i>Echinochloa crus-galli</i>	432		86	518	259	259	259		259	1813	130	
<i>Fallopia convolvulus</i>	432	648		64								
<i>Chenopodium album</i>												97
<i>Lamium amplexicaule</i>	345		86	173							389	
<i>Polygonum aviculare</i>	173			86	70	64	432	173			86	
<i>Polygonum lapathifolium</i>	345	259	173	173								86
<i>Silene noctiflora</i>			389									
<i>Thlaspi arvense</i>											777	777
<i>Veronica hederifolia</i>			86	86	136	432				86		173
<i>Veronica persica</i>		259		432								



Obr. 5 Celkový počet semen (Seeds) na 1 m² ve třech zkoumaných agrosystémech; monokultury jarního ječmene (Barley mon.) a ozimé pšenice (Wheat mon.) s variantami hnojení (Management): zaorávka slámy (A), zaorávka slámy + zelené hnojení (B), zelené hnojení (C), kontrola bez organického hnojení (D). Norfolský osevňovací postup s pořadím plodin: jetel luční (A), pšenice ozimá (B), cukrovka nebo krmná řepa (C), ječmen jarní (D). Statisticky významné rozdíly mezi variantami vypočítané pomocí jednocestné ANOVy jsou značeny na hladinách významnosti 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) . Při označení „n.s.“ není rozdíl statisticky průkazný v daných hladinách významnosti. Malými písmeny je značena rozdílnost variant.

Z výsledků vyplývá pro Norfolský osevňovací postup vysoká hustota semen a to zejména laskavce. Tento agrosystém je obecně náchylnější k zaplevelení v důsledku neuplatňování herbicidní ochrany u krmné řepy. Monokultura ozimé pšenice se ukázala jako nejchudší, ať už vlivem způsobu použití herbicidů či vysokými dávkami hnojiv nebo naopak živinově příliš chudou půdou v kontrole. Podobný trend nebyl u monokultury jarního ječmene zaznamenán, naopak průkazně vyšší hustota semen byla zaznamenána v kontrole a v dílci kde byla aplikována zaorávka slámy a zelené hnojení. Data z odběrů pilotní studie budou použita jako podklad pro další směřování výzkumu.

Obsah

Cíl metodiky.....	4
Vlastní popis metodiky.....	5
Odběr vzorků.....	5
Termíny odběru.....	5
Rozmístění odběru vzorků.....	5
Počet a velikost vzorků.....	5
Rozbor vzorků.....	7
Kultivační metoda (emergence method).....	7
Příprava vzorků pro extrakční metodu.....	7
Extrakce semen	7
Výběr a determinace semen	8
Test životaschopnosti semen.....	9
Interpretace výsledků	10
Případová studie	10

Seznam použité související literatury

- AMBROSIO, L., *et al.* Evaluation of sampling methods and assessment of the sample size to estimate the weed seedbank in soil, taking into account spatial variability. *Weed Research*, 2004, 44.3: 224-236.
- BENOIT, D. L.; KENKEL, N. C.; CAVERS, P. B. Factors influencing the precision of soil seed bank estimates. *Canadian Journal of Botany*, 1989, 67.10: 2833-2840.
- CARDINA, J.; SPARROW, D. H. A comparison of methods to predict weed seedling populations from the soil seedbank. *Weed Science*, 1996, 46-51.
- DE CAUWER, B.; VAN DEN BERGE, K.; COUGNON, M., BULKE, R.; REHEUL, D. Weed seedbank responses to 12 years of applications of composts, animal slurries or mineral fertilisers. *Weed research*, 2010, 50(5), 425-435.
- DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 2013, 29.11: 649-658.
- FORCELLA, F.; WEBSTER, T.; CARDINA, J. Protocols for weed seed bank determination in agro-ecosystems. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*, 2003.
- HEINISCH, O., *et al.* Samenatlas der wichtigsten Futter-pflanzen und ihrer Unkrauter. 1955.
- JABOUR, R.; GALLANT, E. R.; ZWICKLE, S.; WILSON, R. S.; DOOHAN, D. Organic Farmer Knowledge and Perceptions are Associated with On-Farm Weed Seedbank Densities in Northern New England. *Weed Science* 2014, 62: 338-349.
- LHOTSKÁ, M. Určování semen a plodů v zemědělské praxi. 1957.
- LHOTSKÁ, M.; KROPÁČ, Z. Kapesní atlas semen, plodů a klíčnicích rostlin. *Státní pedagogické nakladatelství*, 1985.
- LIEBMAN, Matt, *et al.* Fates of *Setaria faberi* and *Abutilon theophrasti* seeds in three crop rotation systems. *Weed Research*, 2014, 54.3: 293-306.

- LUSCHEI, E. C.; BUHLER, D. D.; DEKKER, J. H. Effect of separating giant foxtail (*Setaria faberi*) seeds from soil using potassium carbonate and centrifugation on viability and germination. *Weed science*, 1998, 545-548.
- MESGARAN, M. B., *et al.* Comparison of three methodologies for efficient seed extraction in studies of soil weed seedbanks. *Weed research*, 2007, 47.6: 472-478.
- MICKELSON, J. A.; STOUGAARD, R. N. Assessment of soil sampling methods to estimate wild oat (*Avena fatua*) seed bank populations. *Weed Science* 2003, 51.2: 226-230.
- PETERS, J. Tetrazolium testing handbook. *Assoc. Official Seed Analysts, Contrib*, 2000, 29.
- SMUTNÝ, V.; KŘEN, J. Improvement of an elutriation method for estimation of weed seedbank in the soil. *Rostlinná výroba*, 2002, 48: 271-278.
- SMUTNÝ, V.; KŘEN, J. The effect of different soil core samplers on precision of estimating weed seedbank in soil. *Plant, Soil and Environment*, 2003, 49.10: 466-472.
- SAWMA, J. T.; MOHLER, C. L. Evaluating Seed Viability by an Unimbibed Seed Crush Test in Comparison with the Tetrazolium Test 1. *Weed Technology*, 2002, 16.4: 781-786.
- TSUYUZAKI, S. Rapid seed extraction from soils by a flotation method. *Weed Research*, 1994, 34.6: 433-436.
- ZULUAGA, M. S.; ACCIARESI, H. A.; CHIDICHIMO, H. O. Comparing the viability of seeds obtained by the physical extraction techniques VBP and VBP plus germination. *Planta Daninha*, 2004, 22.2: 225-229.

Poděkování

Rád bych poděkoval Ing. Smutnému, Ph.D. z agronomické fakulty Mendelovi univerzity v Brně za konzultaci a všem zaměstnancům v Kroměříži, kteří mi se studiem pomáhali.