

Metody pro fenotypizaci kořenů rostlin z polních podmínek

Methods for root system phenotyping in field conditions

Tomáš Středa^{1,2}, Jan Haberle³, Jana Klimešová¹, Pavel Svoboda³, Hana Středová^{1,2}

Mendelova univerzita v Brně¹, Český hydrometeorologický ústav², Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.³

Abstrakt

Cílem článku je detailní popis metod, vhodných pro: (i) hodnocení relativní velikosti kořenového systému rostlin *in situ* pomocí měření elektrické kapacity kořenů, (ii) odběr vzorků kořenového systému rostlin pomocí přímé metody soil-core, která umožňuje hodnocení architektury kořenového systému, (iii) následné hodnocení parametrů kořenového systému pomocí digitální analýzy obrazu. Popsané metody hodnocení kořenového systému rostlin v polních podmínkách jsou využitelné v zemědělském výzkumu a šlechtitelské praxi pro fenotypizaci kořenového systému rostlin. Závazné postupy však nebyly doposud publikovány.

Klíčová slova: kořeny rostlin, elektrická kapacita, soil-core, digitální analýza obrazu, WinRHIZO

Abstract

The aim of the paper is to bring a detail description of methods applied for: (i) evaluation of relative root system size *in situ* by its electrical capacity, (ii) sampling of roots by soil-core method which enables evaluation of root system architecture, (iii) subsequent evaluation of root system parameters with digital image analyses. The methods are applicable in agricultural research and breeding for phenotypization of root system. Binding procedures were not published yet.

Keywords: plant roots, electrical capacitance, soil-core, digital image analysis, WinRHIZO

Úvod

Větší kořenový systém umožňuje lepší využití živin z půdy, a tudíž menší kontaminaci prostředí nevyužitými živinami, hlavně dusíkem a fosforem (Gewin, 2010). K záměrnému šlechtění např. na toleranci k suchu je třeba precizně identifikovat vhodné fenotypy. Kvantitativní znaky, charakterizující kořenový systém, jako je délka, plocha, hmotnost, hustota prokořenění, hloubka pronikání kořenů a průměr kořenů, jsou genotypově vázány, ale

zároveň ovlivněny prostředím. Je tak nesnadné předvídat nebo modelovat jejich chování. Adaptabilita umožňuje rostlině optimalizovat náklady vynaložené na tvorbu a udržování kořenového systému s přístupem k vodě a živinám. Otázkou je, na který znak by měli šlechtitelé selektovat, chtějí-li získat k suchu tolerantní materiál. Například, hluboce kořenící odrůdy mohou být úspěšné v suchých letech na půdách s vyšší hladinou podzemní vody. Také topologie kořenového systému, např. různé úhly větvení zárodečných kořenů u pšenice (Manschadi, 2006) mají vztah k účinnosti příjmu vody. Fitter (2002) uvádí, že vyšší schopnost kořenů získávat živiny naznačují vysoké hodnoty SRL (specific root length; délka kořene na jednotku hmotnosti kořene).

Údaje o distribuci kořenů byly využity pro výpočet rizika ztrát dusíku vyplavením nitrátů. S využitím jednoduchého modelu, dat o srážkách a vlastnostech půdy, které jsou dostupné in farms, byl zpracován on-line expertní systém pro predikci rizika vyplavení v provozních podmínkách (Haberle et al., 2009, www.nitrat.cz). Údaje o hloubce kořenů získané pomocí soil-core metody byly využity i pro zvýšení úspěšnosti simulace vyplavení dusíku (např. Haberle and Káš, 2012) a modelování dopadů sucha (např. Svoboda et al., 2014). Na základě údajů o hloubce kořenů byl vytvořen on-line expertní systém pro výpočet bilance vody a odhad nástupu stresu sucha u hlavních plodin v provozních podmínkách (Haberle et al., 2015, Haberle a Svoboda, 2015).

Pro experimentální hodnocení vlastností kořenů je aplikováno široké spektrum metod (Smit et al., 2010). Každá metoda má své výhody i nedostatky. Při výběru metody musí být respektováno široké spektrum faktorů a hledisek (cíl sledování, charakter zkoumaných znaků, prostředí – pole versus laboratoř, finanční a technická náročnost, časové a personální kapacity). Ideální metoda pro hodnocení kořenového systému by měla umožňovat získání podrobné charakteristiky širokého spektra jeho parametrů při dostatečně vysokém počtu měření. Bohužel, univerzální, levná, spolehlivá a rychlá metoda, kombinující měření morfologických, fyziologických, kvantitativních a kvalitativních vlastností kořenového systému v polních experimentech prozatím není známa.

Obecně se při hodnocení kořenového systému v širší míře uplatňuje několik základních skupin metod: (i) metody exkavační, podobné jako v archeologii (metody destruktivní – měření na stejné rostlině již nelze opakovat; pověstné svou časovou náročností a pracností); hodnocení probíhá přímo na místě růstu rostliny, (ii) metody půdních bloků (metody *ex situ*; vyjímání bloků půdy různé velikosti z půdního profilu; časově a pracovně náročné; metody destruktivní – měření na stejné rostlině již nelze opakovat; umožňují hodnocení morfologických parametrů kořenového systému), hodnocení vzorků probíhá v laboraři, (iii)

metody zobrazovací (metody *in situ*, např. počítačová tomografie CT, rentgen RTG, magnetická rezonance MRI, etc.), (iv) metody elektrické – metoda měření elektrické kapacity nebo impedance (metody *in situ*, podrobněji specifikováno dále v textu), (v) root windows, rhizoboxy, minirhizotrony and rhizotrony (metody *in situ*, různě velké skleněné nebo plastové nádoby pro pěstování rostlin, určené speciálně pro výzkum kořenového systému).

Standardizace nepřímé metody – měření elektrické kapacity kořenů

Popis metody

Progresivní, technicky, finančně, pracovní a časově nenáročnou *in situ* metodou je měření velikosti kořenového systému prostřednictvím jeho elektrické kapacity (Chloupek, 1972) nebo měření elektrické impedance. Unikátní metoda byla vyvinuta (Chloupek, 1972) a v poslední dekádě je intenzivně rozvíjena (Chloupek et al., 2010; Středa et al., 2012; Středa a Chloupek, 2013; Svačina et al., 2014; Heřmanská et al., 2015, etc.) na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství Mendelovy univerzity v Brně. Není známa jiná polní metoda pro opakované hodnocení stejné rostliny v různých vývojových stádiích s možností sklizně semen z vybraných rostlin. To je důležitý předpoklad pro úspěšné a praktické šlechtění. Nevýhodou může být ovlivnění měřených výsledků půdními vlastnostmi a nemožnost přímo hodnotit morfologické parametry kořenového systému.

Hlavní zásady (standardizace) měření elektrické kapacity kořenů

Na základě dlouholetých zkušeností autorů vyplývá, že dosažení korektních výsledků a jejich interpretace, je možné pouze při dodržení níže specifikovaných zásad. Technický popis přístrojového vybavení je uveden v certifikované metodice Středa a Klimešová (2016).

1. Bezproblémové je pouze srovnání hodnot naměřených u rostlin téhož druhu (např. v rámci *Triticum aestivum* L.). Nelze srovnávat rozdíly mezi druhy ani uvnitř jedné čeledi (tj. rozdíly např. *Triticum aestivum* L. versus *Hordeum vulgare* L.). Různé odrůdy téhož druhu je možné srovnávat, pokud jsou morfologicky podobné a mají podobnou rychlost vývoje.
2. Při měření elektrické kapacity kořenů by měly být v den měření rostliny v přibližně stejné růstové fázi. Několikadenní rozdíl v ranosti odrůd není problém. Kořenový systém roste intenzivněji ve vegetativní fázi růstu. Diference v ranosti jsou tak větším problémem ve vegetativní fázi růstu.
3. Povrch stonku měřených rostlin nesmí být mokrá (kapky vody – rosa, déšť), aby měřící proud nepřecházel i na sousední rostliny v porostu.
4. Povrch půdy nesmí být mokrá (bezprostředně po dešti; kaluže vody), ale může být vlhký.

5. Bezproblémové je srovnávání diferencí jen mezi rostlinami, které rostou ve stejném substrátu. To znamená, že je možné srovnávat jen rostliny na jednom pozemku (se stejnými závlahami). Heterogenitu půdních podmínek na pozemku je nutné eliminovat dostatečným počtem opakování (měření rostlin na více pokusných parcelách či na různých místech na pokusném pozemku). Není možné srovnání hodnot elektrické kapacity kořenů z pozemků výrazně od sebe vzdálených, s různými půdními, agrochemickými a půdně-klimatickými podmínkami. Se zvyšující se vlhkostí se zvyšuje i hodnota elektrické kapacity. Obdobně má na hodnoty elektrické kapacity vliv také chemismus půdy – obsah iontů v půdě.

6. V případě hodnocení nádobových pokusů je možné srovnávat jen hodnoty z nádob se stejným substrátem (např. písek), ze stejných vláhových a živinných režimů. Není tedy možné srovnávat hodnoty např. z varianty „stres suchem“ s hodnotami z varianty „optimální závlaha“, nebo hodnoty z varianty „nehnojeno“ a „hnojeno NPK“. Obdobně, při hodnocení dat elektrické kapacity kořenů z hydroponických pokusů – srovnání mezi různě koncentrovanými roztoky nebo roztoky s různým chemickým složením by mohlo poskytnout zavádějící výsledky.

7. Spolehlivě lze srovnávat jen hodnoty, naměřené „ve stejný den“ (nejlépe v odstupu maximálně několika hodin). V rámci jednoho dne mohou v substrátu nastat dramatické změny, znemožňující srovnání hodnot (typicky: hodnoty naměřené před deštěm versus hodnoty po dešti).

8. Důležitou otázkou je volba relevantní růstové fáze pro měření elektrické kapacity kořenového systému, zejména při hodnocení souvislostí s výnosem nebo kvalitou produkce. Pro obilniny doporučujeme měření elektrické kapacity kořenů přibližně v růstových fázích BBCH 36 (BBCH dle Meier, 1997), BBCH 55 a BBCH 71 – 73.

9. Vliv na hodnotu naměřené elektrické kapacity má vzdálenost mezi elektrodami (elektrodou v půdě a elektrodou umístěnou na rostlině). Při umístění půdní elektrody je nutné dodržovat vždy stejnou vzdálenost od stonkové elektrody (stonku). Ideální vzdálenost je 5 – 10 cm.

10. Pozice stonkové elektrody (vzdálenost od povrchu půdy) musí být konstantní. S rostoucí vzdáleností od kořenů narůstá rezistence a klesá kapacita. Při připevňování elektrody je proto nutné dodržovat stejnou, co možná nejmenší vzdálenost od kořenů (Dalton, 1995).

11. Ideální je založit porost do pravidelných vzdáleností (např. obilniny $0,125 \times 0,05$ metru). Uvedená varianta je komfortnější a nedochází při ní k poškození sousedních rostlin. Možné a ověřené je však i měření v normálně založených porostech (řádkový výsev při běžné hustotě

porostu). Nicméně, v případě opakovaného měření, je nutné odlišit (označit) měřené rostliny od ostatních.

12. Pro měření je používána souprava na měření velikosti kořenového systému pomocí elektrické kapacity (Středa a Chloupek, 2013), která sestává z digitálního LCR multimetru, běžně používaného např. pro měření kapacity kondenzátorů. LCR multimetr je spojen s elektricky vodivou elektrodou (půdní elektroda) a s elektricky vodivými kleštěmi (stonková elektroda). Alternativně může být místo kleští jako stonková elektroda použita jehla (např. pro měření *Beta vulgaris*, *Brassica napus*, etc.). Parametry LCR multimetru: měřicí frekvence 1 kHz, paralelní režim zapojení (C_p), měření v jednotkách nF (nanofarady). Obecně se naměřené hodnoty pohybují v rozsahu několik desetin až jednotek nanofaradů. Pro uvedené měření lze použít komerční přístroje, např. univerzální LCR multimetr ESCORT ELC-131D, nebo EXTECH 380193 či VOLTCRAFT LCR 4080.

13. Konstrukce měřících elektrod má vliv na hodnoty elektrické kapacity kořenů. Pro hodnocení diferencí v rámci jednoho měření je nutné použít hodnoty jen z jedné soupravy pro měření kořenů.

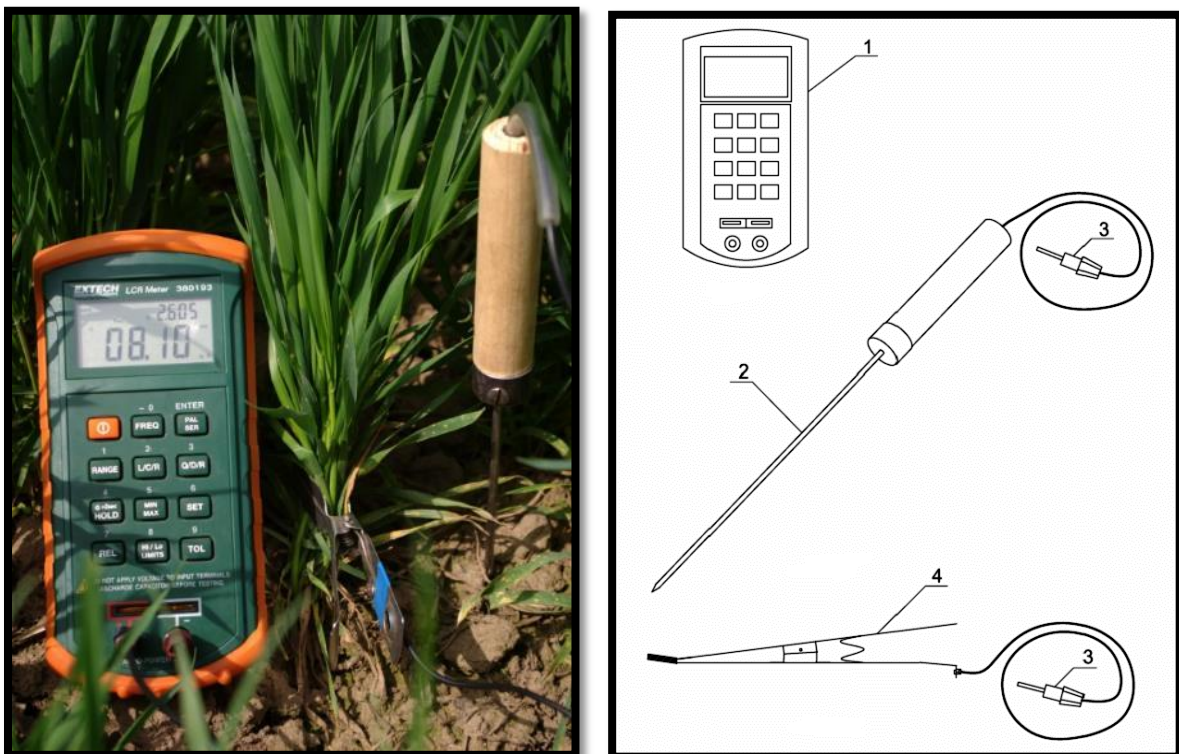
14. Jednu elektrodu (kovové kleště pro obilniny, vojtěšku apod.) nebo jehlu (pro vzrostlou slunečnici, kukuřici, řepku, mrkev, řepu apod.), je nutné umístit na bázi stonku rostliny (1 – 5 cm nad zemí, bez kontaktu s povrchem půdy). V případě obilnin je nezbytné do kleští zachytit i odnože (protože nebývají vždy vodivě spojeny). Druhá elektroda (půdní elektroda) musí být zasunuta do půdy do hloubky asi 10 cm, vždy do stejné hloubky a stejné vzdálenosti od měřené rostliny. Hluběji umístěná zemní elektroda zvýší měřenou kapacitu kořenového systému, v důsledku větší kontaktní plochy mezi elektrodou a půdou.

15. Je nutné vždy provést měření elektrické kapacity kořenového systému nejméně desítek jedinců (pro zajištění dostatečné vypovídací hodnoty výsledku při vzájemném srovnávání odrůd). Minimální počet měřených jedinců závisí na variabilitě půdních podmínek, variabilitě povrchu pozemku, na biologických vlastnostech druhu (uniformitě). Míru variability je vhodné stanovit přípravným měřením před zahájením samotného hlavního měření. Pro obilniny ze standardních maloparcelových pokusů je minimem pro měření 30 rostlin jednoho genotypu (minimálně měřící místa v porostu krát 10 rostlin). Je zřejmé, že s rostoucím počtem měřených rostlin (více opakování, více změřených jedinců v opakování) klesá vliv pokusné chyby a roste vypovídací hodnota výsledku.

16. Diference mezi genotypy lze hodnotit (i) zvlášť v jednotlivých termínech měření (mezi genotypy existují rozdíly v rychlosti nárůstu kořenové biomasy), nebo (ii) jako průměrnou

hodnotu za všechna měření (průměrná hodnota reprezentuje velikost kořenového systému genotypu v průběhu delší etapy vegetace).

17. Mnohokrát byly prokázány a publikovány vazby mezi hodnotou elektrické kapacity kořenů a hmotností, délkou, povrchem nebo objemem kořenového systému. Nicméně, hlavní výhodou metody je možnost měřit tisíce rostlin denně, a to opakovaně během vegetace. To je ideální pro porovnání genotypů a pro selekci v průběhu šlechtění. Odvozování morfologie kořenového systému není možné (Dietrich et al., 2013).



Obr. 1: Měření elektrické kapacity kořenů různých plodin – varianta s kleštěmi

V rámci bilaterální spolupráce AKTION Česká republika – Rakousko, byl na Mendelově univerzitě v Brně a University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna řešen projekt „Root System as a Factor of Yield Formation and Quality of Barley and Oilseed Rape“. Cílem projektu byla, mimo jiné, validace dvou používaných metod měření velikosti kořenového systému (nepřímá metoda měření elektrické kapacity a přímá metoda soil-core). Zjištěny byly statisticky průkazné vztahy mezi hodnotami elektrické kapacity a hmotností, plochou a objemem kořenového systému. Obě metody byly precizovány a v současnosti jsou využívány pro účely zemědělského výzkumu a šlechtění.

Standardizace přímé metody – Odběr a hodnocení kořenového systému rostlin metodou soil-core s následným hodnocením digitální analýzou obrazu

Popis metody

Většina pracovních úkonů soil-core metody je prováděna ručně. Výsledky tak mohou být ovlivněny vlivem lidského faktoru. Chyby při odběru, praní a čištění vzorků mohou znehodnotit výsledky. Proto jsou níže definovány zásady odběru vzorků, metody čištění a konzervace kořenů, měření délky a dalších parametrů kořenů, včetně využití digitální analýzy obrazu.

Princip metody spočívá v získání půdního vzorku s využitím sondy, praní vzorku a separaci přítomných kořenů. Pro kvantitativní a kvalitativní hodnocení kořenů (hmotnost, délka, průměr, počet kořenových špiček atd.) je pak možné použít více návazných metod (nejčastěji skenování kořenů a digitální analýza obrazu pomocí software). Používá se nejčastěji pro získání základních dat o hustotě prokořenění, hloubce prokořenění, hmotnosti, povrchu, délce a průměru kořenů.

Odebraný vzorek půdy obsahuje pouze malou část celkového objemu půdy, ve kterém se kořeny rostliny nachází. Z tohoto důvodu je nutné odebírat vzorky z více míst. Se snižujícím se průměrem sondy je nutné zvýšit počet odběrů. V praxi se používají především sondy o průměru 5 – 8 cm. Běžně používaným typem je standardní půdní vrták, v pedologii používaný pro odběr půdních vzorků, zakončený válcovitým tubusem s ostrou hranou. Tubus bývá 15 cm dlouhý o průměru 7 cm. Pomocí ručního vrtáku může být zaveden až do hloubky 1 m a více. Tento základní typ byl mnohými autory modifikován (Obr. 2). Hloubka vzorkování je závislá na předpokládané hloubce prokořenění rostliny.

Časově a manuálně nejnáročnější částí přímé metody je separace kořenů praním vodou. Praní vzorků s využitím sestavy sít může být manuální nebo automatické (např. Klimek-Kopyra a Řebilas, 2018). S klesající velikostí ok síta stoupá množství zachycených minerálních částic a rostlinných zbytků, které zvyšují nároky na dočištění vzorků. Pokud půda obsahuje vysoký podíl jílovitých částic a jílu, je možné použít i chemikálie pro lepší disperzi půdních částic (Böhm, 1979; Oliveira et al., 2000). Zbytky zeminy na kořenech a nedostatečné vyčištění vzorku od organických zbytků mohou nadhodnotit výsledky až o desítky % (Böhm, 1979).



Obr. 2: Souprava na odběr vzorků kořenového systému vyvinutá a používaná na University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna a na Mendelově univerzitě v Brně.

Následnou fází je analýza morfologických parametrů kořenového systému. V současnosti jsou tyto charakteristiky (délka kořenů, průměr kořenů, plocha kořenů, RLD – root length density tj. délka kořenů na jednotku objemu půdy v $\text{cm} \cdot \text{cm}^{-3}$, RSD – root surface density tj. plocha kořenů na jednotku objemu půdy v $\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$, SRL – specific root length tj. délka kořenů na jednotku hmotnosti kořene v $\text{m} \cdot \text{g}^{-1}$), hodnoceny pomocí digitální analýzy obrazu. Celosvětově nejpoužívanějším programem pro hodnocení parametrů kořenového systému patří WinRHIZO/MacRHIZO (Régent Instruments Inc., Quebec, Kanada). Pro jednoduchou digitální analýzu obrazu byly při výzkumu kořenového systému použity i jiné programy, např. ROOTEDGE (National Soil Tilth Laboratory, Ames, IA, USA), NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) a jiné.

Hlavní zásady (standardizace) použití přímé metody odběru a hodnocení kořenového systému rostlin

Metoda byla v posledních dekádách zdokonalována a modifikována na University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna a na Mendelově univerzitě v Brně. Na základě dlouholetých zkušeností vyplývá, že dosažení korektních výsledků a jejich interpretace, je možné pouze při dodržení níže specifikovaných zásad. Technický popis přístrojového vybavení je uveden v certifikované metodice Středa et al. (2017).

Fáze 1 – Odběr vzorků

1. Na University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna a Mendelově univerzitě v Brně je používána ocelová válcová sonda o délce 1 m, s vnitřním průměrem 63 mm, silou stěny 5 mm, a s kalenou zkosenou hranou (korunkou) ve spodní části (pro snadnější pronikání do půdy). Na horním konci sondy jsou madla, která se používají při vytahování sondy z půdy. Před zasunutím sondy do půdy se na horní konec nasadí ocelová hlavice (brání poškození stěn sondy kladivem). Pomocí kladiva je sonda zaražena do požadované hloubky. Při vyjímání sondy z půdy je možno použít pákový mechanismus. Vzorek je po vytažení z půdy vytlačen ze sondy pomocí tyče s průměrem identickým jako vnitřní průměr sondy.

2. Hloubka vzorkování je závislá na aplikaci výsledků, morfologických vlastnostech plodiny a půdních podmínkách. Obilniny by měly být hodnoceny minimálně do hloubky 60 cm. Vzorky půdy s kořenovou biomasou se segmentují na válce o délce 10 cm. Možné je tak hodnocení vertikální distribuce kořenového systému a hodnocení kvantitativních a kvalitativních parametrů v různé hloubce půdního profilu.

3. Nutné je odebírat vzorky z reprezentativní části porostu, který je lokalizován dále od okrajů pozemků nebo místních terénních nerovností. Kořeny citlivě reagují na utužení půdy (vliv pojezdů mechanizace). Možný je vliv lokálního přehnojení nebo nerovnoměrné distribuce statkových hnojiv, slámy a jiných posklizňových zbytků. Rostliny indikují habitem a zbarvením lokální nepříznivé podmínky. Potenciální dopad na kořeny může mít i napadení škůdci a chorobami (Richards, 2008).

4. V případě plodin pěstovaných v řádcích je vhodné odebírat vzorky v řádku i mezi nimi (hustota je v horních vrstvách rozdílná). V hlubších vrstvách půdy je prokořenění rovnoměrné. Tyto rozdíly v hustotě kořenů musí být zohledňovány na začátku vegetace, zejména v případě lokální aplikace hnojiv. U obilnin je zpravidla používán systém s umístěním vzorkované rostliny do středu sondy. V případě plodin s dřevnatějícím masivním kořenem je odběr vzorků prováděn v meziřadí. Nezbytné je dodržení jednotného metodického postupu u všech sond. V případě trav a plodin, které nejsou pěstovány v řádcích, je nutný znáhodněný výběr odběrových míst. To je stejné i u složitých společenstev, jako jsou agrolesnické systémy nebo přirozená vegetace. Gregory (2006) uvádí, že při odebrání 15 – 20 vzorků o průměru 10 cm z jedné varianty je v průměru dosaženo 90 % šance zaznamenat průkazné rozdíly.

5. Termín odběrů vzorků závisí na cíli sledování. V případě hodnocení vlivu agrotechnických opatření (například odlišných systémů zpracování půdy) nebo hodnocení vlivu lokalizace hnojiv je nutné sledovat rozvoj kořenů i na počátku růstu. Nicméně, pro většinu cílů je

potřeba určit velikost kořenů v době největšího rozvoje. U jednoletých druhů se zvětšuje celková délka kořenů a jejich hloubka ve vegetativní fázi růstu. V době tvorby semen růst ustává. Optimální termín je na konci vegetativního růstu, v době kvetení a na počátku tvorby semen (BBCH 50 – 76). V této fázi růstu jsou nejmladší kořeny turgescenční, většinou světlé, prostým okem dobře odlišitelné od půdy, organických zbytků a kořenů předplodin.

6. Ke ztrátě na hmotnosti (5 – 10 %) dochází díky dýchání kořenů již v době 24 hodin po odběru, pokud vzorky nejsou drženy v chladu (4 °C). Dlouhodobé skladování vzorků půdy je optimální při teplotě -20 °C v polyethylenových sáčcích. Eliminován je tak rozklad kořenů. Dle zamýšleného cíle analýzy je možné uložit separované kořeny i v roztoku vody s alkoholem, nebo vysušit, nebo při uchovat při teplotě 15 °C ve vodě po dobu několika dnů.

Fáze 2 – Separace kořenů

1. Před praním musí být zmrazené vzorky půdy s kořeny rozmrazeny při laboratorní teplotě nebo ve vodní lázni. Před praním doporučujeme nechat vzorek několik desítek minut namočený ve vlažné vodě (důkladné rozplavení půdních agregátů).

2. V průběhu ručního praní jsou kořeny z půdy vymývány proudem tekoucí vody. Proud vody musí být jemný z důvodu rizika ztrát a poškození kořenové biomasy. Dle dosavadních zkušeností doporučujeme využít soustavu sít o velikosti ok 1,6 mm a 0,6 mm. To se ukázalo jako dostatečně přesné pro většinu polních plodin.

3. Kořeny jsou ze sít následně manuálně separovány s použitím pinzety a oplachovány ve vodě. Velkou péčí je nutné věnovat oddělení kořenů od ostatních rostlinných zbytků a kořenů jiných druhů rostlin. To vyžaduje delší praxi, zkušenosti a trpělivost laboranta. Mrtvé (loňské) kořeny jsou tmavě hnědé a při mechanickém namáhání se dříve přetrhnou. K identifikaci nejjemnějších kořenů na sítích je nutné použít laboratorní lampu s lupou.

4. S ohledem na cíl analýzy mohou být kořeny pro dlouhodobé uskladnění (i) vysušeny při 60 – 75 °C, nebo (ii) zmrazeny v plastové nádobě s menším množstvím vody a chloraminu (1 – 3 %), nebo (iii) uchovány v roztoku vody formalínu (5% koncentrace), nebo (iv) v roztoku alkoholu. Množství alkoholu v roztoku je nepřímo úměrné teplotě skladování. Na základě zkušeností doporučujeme vzorky skladovat v plastových zkumavkách v roztoku ethanolu a vody v poměru 1:2.

Fáze 3 – Hodnocení vzorků digitální analýzou obrazu a následnými analýzami

1. Barvení kořenů umožní získat ostrý kontrast mezi kořeny a pozadím, který je pro zpracování obrazu vyžadován. Výhodou některých barviv je, že prostoupí jen do pletiv živých

kořenů. Je tak možné odseparovat mrtvé kořeny. Délka barvení trvá několik minut až hodin, v závislosti na použitém barvivu. Mezi často používaná barviva patří methylenová modř. Doporučená délka barvení methylenovou modří je 10 minut.

2. Před vlastním umístěním na skener je nutné barvivo opláchnout z povrchu kořenů. Po obarvení se tak kořeny proplachují pod tekoucí vodou.

3. V rámci přípravy ke skenování jsou kořeny rozprostřeny do mělké nádoby o známé ploše, která je naplněná 2 – 3 mm vysokou hladinou vody. Nutné je i) eliminovat vzduchové bubliny, které by znehodnocovaly naskenovaný obraz, a b) pohyb kořenů a jejich nežádoucí překrytí.

4. Pro hodnocení kořenového systému je nezbytné použití profesionální skener se svrchním i spodním osvětlením skenovací plochy (pro eliminaci stínů). Při použití skeneru s tímto typem osvětlení není nutné kořeny barvit. Kritickým parametrem skeneru je rozlišení (alespoň 1200 × 2400 dpi).

5. Následuje skenování a digitální analýza obrazu pomocí software s ohledem na požadované výstupy.

6. Po ukončení analýzy je možné vzorky kořenového systému vysušit do konstantní hmotnosti a zvážit pro analýzu hmotnosti biomasy kořenů.

Závěr

Ze zkušeností autorů vyplývá, že aplikace *in situ* metody je ideální u rostlinných druhů s kořenovým systémem, který je jen málo suberinizovaný – např. kořenový systém obilnin nebo některých zelenin. U obilnin je dosahováno vysoké hodnoty korelace mezi elektrickou kapacitou kořenů a hmotností kořenového systému. Pravděpodobnost úspěšné selekce na větší kořenový systém podle elektrické kapacity je tak vysoká.

Výsledky sledování využití vody a dusíku kořeny plodin (pomocí metody soil-core) potvrzují význam hlubokého a aktivního kořenového systému, zvláště v podmínkách vyčerpání zdrojů v povrchových vrstvách. S jistou mírou zobecnění lze říci, že hluboce kořenicí odrůdy lze doporučit do oblastí se zrnitostně těžším podorničím se zvýšenou retenční schopností. Odrůdy s velkým, mělkým kořenovým systémem, lze doporučit do sušších oblastí s pravidelnými, méně vydatnými srážkami, kdy je vlhčena jen svrchní vrstva půdního profilu.

Literatura

- BÖHM, W. *Methods of Studying Root Systems*. Springer, Berlin, 1979, 188 s.
- DALTON, F. N. In-situ root extent measurements by electrical capacitance methods, *Plant and Soil*, 1995, 173, 157-165.
- DIETRICH, R. C., BENGOUGH, A. G., JONES, H. G., WHITE, P. J. Can root electrical capacitance be used to predict root mass in soil? *Annals of Botany*, 2013, 112, 457-464.
- FITTER, A. Characteristics and functions of root systems. In: *Plant roots: The hidden half*. Marcel Dekker Inc., New York, 2002, 15-32.
- GEWIN, V. Food: An underground revolution. *Nature*, 2010, 466, 7306, 552-553.
- GREGORY, P. *Plant roots, growth, activity and interaction with soils*. Blackwell Publishing, Oxford, 2006, 318 s.
- HABERLE, J., KÁŠ, M. Simulation of nitrogen leaching and nitrate concentration in a long-term field experiment. *Journal of Central European Agriculture*, 2012, 13, 416-425.
- HABERLE, J., KUSÁ, H., SVOBODA, P., KLÍR, J. The changes of soil mineral nitrogen observed on farms between autumn and spring and modelled with a simple leaching equation. *Soil and Water Research*, 2009, 4, 159-167.
- HABERLE, J., SVOBODA, P. Calculation of available water supply in crop root zone and water balance of crops. *Contributions to Geophysics and Geodesy*, 2015, 45, 4, 285-298.
- HABERLE, J., VLČEK, V., KOHUT, M., STŘEDA, T., DOSTÁL, J., SVOBODA, P. *Bilance a určení dostupné zásoby vody v kořenové zóně plodin. Metodika pro praxi*, 2015. Dostupné z: <http://svt.pi.gin.cz/vuzt/koreny.php>.
- HEŘMANSKÁ, A., STŘEDA, T., CHLOUPEK, O. Improved wheat grain yield by a new method of root selection. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35, 1, 195-202.
- CHLOUPEK, O. Evaluation of size of a plants root system using its electrical capacitance. *Plant and Soil*, 1977, 48, 525-532.
- CHLOUPEK, O. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum*, 1972, 14, 227-230.
- CHLOUPEK, O., DOSTÁL, V., STŘEDA, T., PSOTA, V., DVOŘÁČKOVÁ, O. Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. *Plant Breeding*, 2010, 129, 6, 630-636.
- KLIMEK-KOPYRA, A., REBILAS, K. Dependence of pea root mass distribution on weather conditions under varying levels of phosphorus application. *International Agrophysics*, 2018, 32.

MANSCHADI, A. M., CHRISTOPHER, J., DEVOIL, P., HAMMER, G. L. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited conditions. *Functional Plant Biology*, 2006, 33, 823-837.

MEIER, U. BBCH-Monograph. Growth stages of plants – Entwicklungsstadien von Pflanzen – Estadios de las plantas – Développement des Plantes. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin a Wien, 1997, 622 s.

OLIVEIRA, M., DO R. G., VAN NOORDWIJK, M., GAZE, S. R., BROUWER, G., BONA, S., MOSCA, G., HAIRIAH, K. Auger sampling, ingrowth cores and pinboard methods, 2000, 175–210. In: *Root Methods: A Handbook*. Springer, Berlin, 587 s.

RICHARDS, R. A. Genetic opportunities to improve cereal root systems for dryland agriculture. *Plant Production Science*, 2008, 11, 12-16.

SMIT, A. L., BENGOUGH, A. G., ENGELS, C., VAN NOORDWIJK, M., PELLERIN, S., GEIJN, S. C. VAN DE. *Root Methods: A Handbook*. Springer Science & Business Media, 2010, 594 s.

STŘEDA, T., DOSTÁL, V., HORÁKOVÁ, V., CHLOUPEK, O. Effective use of water by wheat varieties with different root system sizes in rain-fed experiments in Central Europe. *Agricultural Water Management*, 2012, 104, 2, 203-209.

STŘEDA, T., CHLOUPEK, O. Kit for measuring size of root system. Patent Number: CZ201100530-A3. 2013. Derwent Primary Accession Number: 2013-D47711.

STŘEDA, T., KLIMEŠOVÁ, J. Hodnocení relativní velikosti kořenového systému rostlin v přirozeném prostředí. Certifikovaná metodika. Mendelova univerzita v Brně, 2016.

STŘEDA, T., HABERLE, J., KLIMEŠOVÁ, J., SVOBODA, P., STŘEDOVÁ, H., KHEL, T. Metodika odběru a hodnocení kořenového systému polních plodin. Certifikovaná metodika. Mendelova univerzita v Brně, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i., 2017.

SVAČINA, P., STŘEDA, T., CHLOUPEK, O. Uncommon selection by root system size increases barley yield. *Agronomy for Sustainable Development*, 2014, 34, 2, 545-551.

SVOBODA, P., HABERLE, J., KUREŠOVÁ, G. Root growth and depletion of nitrogen from root zone of winter wheat under drought and ample water supply. In: 13th Alps-Adria Scientific Workshop. Villach, Rakousko, 2014, 299-302.

Poděkování

Výsledky byly získány s podporou projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QJ1510098 „Nové linie pšenice pro efektivnější využití vstupů a s vyšší odolností ke stresům“.

Kontakt:

Ing. Tomáš Středa, Ph.D.

Český hydrometeorologický ústav, pobočka Brno

Kroftova 43, 616 67

e-mail: tomas.streda@chmi.cz