

**Lesy České republiky, s.p., Hradec Králové**

**VÝZKUMNÉ PROJEKTY  
GRANTOVÉ SLUŽBY LČR**



*Projekt*

**VLIV DOBY STRATIFIKACE A VYUŽITÍ  
TERMOTERAPIE V PŘEDOSEVNÍ PŘÍPRAVĚ  
BUKVIC**

*Řešitel*

**Mendelova univerzita v Brně**

Odpovědný řešitel:

**Ing. Kateřina Houšková, Ph.D.**

Spoluřešitelé:

**Martin Baláš, Dagmar Palovčíková, Petra Kadlecová,  
Oldřich Mauer, Ivan Kuneš, Matouš Pinkava, Šimon Dolenský**

*Brno, prosinec 2023*



# **Závěrečná zpráva**

*Projekty Grantové služby LČR*

*Vliv doby stratifikace a využití termoterapie v předosevní přípravě bukvic*

---

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>MATERIÁL</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>METODY</b> .....	<b>8</b>
3.1	VLIV DOBY STRATIFIKACE .....	8
3.1.1	Hodnocení kvality bukvic .....	9
3.1.1.2	Životnost .....	9
3.1.1.3	Klíčivost .....	10
3.1.1.4	Vzcházivost .....	10
3.1.1.5	Morfologické parametry a biomasa .....	10
3.1.1.6	Dýchání bukvic – změny v obsahu fumarázy .....	10
3.1.1.7	Dýchání bukvic – změny v rychlosti vydýchávání CO <sub>2</sub> .....	11
3.1.1.8	Stanovení obsahu kyseliny abscisové a jejich derivátů .....	11
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>13</b>
4.1	VLIV DOBY STRATIFIKACE .....	13
4.1.1	Teplotní a vlhkostní podmínky v průběhu zrání bukvic .....	13
4.1.2	Teplotní a vlhkostní podmínky v průběhu předosevní přípravy .....	15
4.1.4	Životnost .....	16
4.1.5	Klíčivost v substrátu .....	17
4.1.6	Vzcházivost .....	20
4.1.7	Dýchání bukvic – změny v obsahu fumarázy .....	21
4.1.8	Dýchání bukvic – změny v rychlosti vydýchávání CO <sub>2</sub> .....	22
4.1.9	Stanovení obsahu kyseliny abscisové a jejich derivátů .....	22
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>26</b>



## **1 ÚVOD**

Cílem projektu bylo ověřit, zda by bylo možné (biologicky) a ekonomicky přijatelné (s případnými únosnými ztrátami) realizovat předosevní přípravu bukvic (studenou stratifikaci) v jiném než pracovním vyčerpáním jarním období, resp. jindy než po krátkodobém či dlouhodobém skladování. V úvahu připadá stratifikovat bukvice ihned po sběru a skladovat je v nedormantním stavu. Tato předosevní příprava by však byla opět situována v časově náročném podzimním období, kdy probíhají sběry a zpracování semenné suroviny. Z tohoto hlediska se zdá být proto perspektivní stratifikace realizovaná v průběhu dlouhodobého skladování, která by mohla být načasována do letního období, po ukončení jarních prací. Cílem projektu bylo porovnat všechny možnosti a začlenit perspektivní varianty do technologických postupů předosevní přípravy bukvic v semenářském závodu Týniště nad Orlicí (Lesy České republiky, s.p.).

Byl zpracován podrobný rozbor literatury, který byl součástí technické zprávy k 1. kontrolnímu dni. V technických zprávách k 1. a 2. kontrolnímu dni byly podrobně zpracovány výsledky z testování bukvic z úrody r. 2020, v technické zprávě ke 3. kontrolnímu dni z úrody bukvic v r. 2022. V této souhrnné zprávě jsou představeny vybrané výsledky projektu, které vedly k hlavním závěrům práce, výsledky, které ještě nebyly představeny, a výsledky vyplývající až při souhrnném hodnocení dat ze všech let projektu.

## 2 MATERIÁL

Pro testování byly v říjnu r. 2020 a r. 2022 Semenářským závodem Týniště n. Orlicí LČR (SZ) zajištěny sběry tří oddílů bukvic (Tab. 1), které jsou dále označovány číslem průvodního listu (155, 176, 199, 286, 287 a 316). Oddíly byly vybrány tak, aby v každé úrodě pocházely z jiné přírodní lesní oblasti (PLO), a to jak z Hercynské, tak Karpatské části České republiky. Hmotnost každého oddílu po zpracování činila 60 kg. Bukvice z úrody r. 2020 byly sbírány i na síť a byly po sběru pečlivě čištěny a tříděny, bukvice z úrody r. 2022 byly sbírány ze země a nebyly dočištěny na pneumatickém třídícím stole.

Tab. 1: Základní údaje o původu testovaných oddílů osiva buku lesního

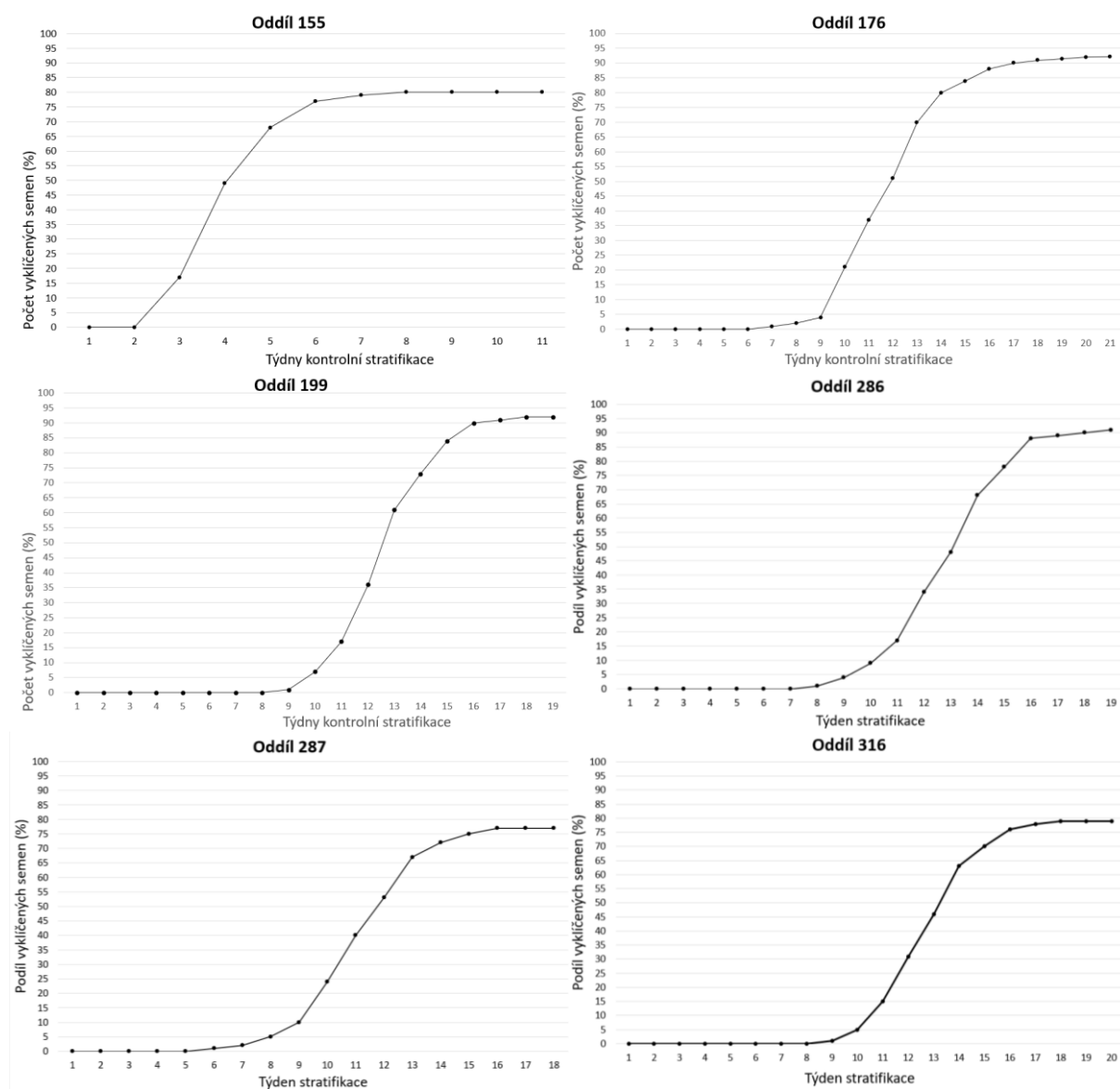
Průvodní list			Číslo uznané jednotky	Název dodavatele
155	2020	VL	CZ-2-2B-BK -00002-38-3-Z-G230-1	LČR LS Buchlovice
176	2020	VL	CZ-2-2B-BK -03379-29-4-M	LČR LS Šternberk
199	2020	VL	CZ-2-2B-BK -03243-03-4-K	LČR LS Toužim
286	2022	VL	CZ-1-2C-BK-00056-29-4-M	LČR LS Šternberk
287	2022	VL	CZ-2-2B-BK-00017-38-3-Z-G155-1	LČR LS Luhačovice
316	2022	VL	CZ-1-2C-BK-20070-21-4-L-G84-1	LČR LS Frýdlant



### 3 METODY

#### 3.1 VLIV DOBY STRATIFIKACE

U testovaných oddílů bukvic byla realizována stratifikace ihned po sběru (z úrody r. 2022), po krátkodobém skladování, v průběhu dlouhodobého skladování (z obou úrod) a po dlouhodobém skladování (z úrody r. 2020). Doba stratifikace byla určena dle tzv. kontrolní stratifikace vzorku osiva odebraného po krátkodobém skladování (bukvice z úrody r. 2020) a co nejdříve po přečištění (bukvice z úrody r. 2022). Vzorek osiva (4x100 semen) byl uložen do vlhké směsi rašeliny a písku při 3 °C a každý týden byl zjišťován počet vyklíčených semen (obr. 1).



Obr. 1: Průběh klíčení testovaných oddílů bukvic při kontrolní stratifikaci

Počet týdnů vhodný pro stratifikaci jednotlivých oddílů bez média byl určen následně jako počet týdnů nutných pro vyklíčení 10 % semen při kontrolní stratifikaci prodloužený o 2 týdny ( $x+2$ ), tj. dle Suszky et al. (1996), viz tab. 2.

Tab. 2: Doba stratifikace jednotlivých oddílů bukvic

Oddíl	Doba stratifikace (počet týdnů)
155	5
176	12
199	13
286	13
287	11
316	13

Oddíly osiva z úrody 2020 byly rozděleny na 3 části po 20 kg. První část byla stratifikována po krátkodobém skladování, druhá v průběhu dlouhodobého skladování a třetí po dlouhodobém skladování. Stratifikace po sběru nemohla být u těchto bukvic testována z důvodu počátku projektu až v lednu 2021. Oddíly osiva z úrody 2022 byly rozděleny na 4 části. První část bukvic (cca 5 kg) byla stratifikována ihned po sběru, tzn. po zpracování, druhá část bukvic (20 kg) byla stratifikována po krátkodobém skladování, třetí část (15 kg) byla stratifikována v průběhu skladování a čtvrtá část (20 kg) nemohla být testována do konce řešení projektu je ponechána v dlouhodobém skladování (do jara 2024). Tato část bukvic bude testována v následujícím, řešitelským týmem nově získaném projektu u GS LČR.

Bukvice všech testovaných oddílů byly před stratifikací dovlhčovány kropením na obsah vody 28-32 % (cca 1 týden po sběru nebo krátkodobém skladování a cca 2 týdny po skladování mrazením) a následně stratifikovány v Semenářském závodu (SZ) bez média při 3 °C po dobu stanovenou pomocí kontrolní stratifikace. Stratifikace byla pro kontrolu a porovnání realizována na menších vzorcích bukvic (cca 1000 g) na pracovišti řešitele projektu MENDELU v Brně a u některých testů rovněž ve Výzkumné stanici Kunovice (VÚLHM, v.v.i). V semenářském závodu byly bukvice uloženy do plastových perforovaných přepravek a překryty netkanou textilií. Každý týden bylo realizováno provzdušnění a dovlhčení bukvic, průběžně byl kontrolován obsah vody a udržován na 30 %. Na MENDELU v Brně byly bukvice vloženy do plastového boxu s perforací boku a víka a v některých případech i do válců uzavřených Gore-tex membránou, kde stratifikace probíhala na otáčecích policích (režim otáčení 3x denně o 2,5 otáčky). Každý týden byl kontrolován jejich obsah vody a případně realizováno dovlhčení. Ve výzkumné stanici Kunovice byla stratifikace realizována v boxech bez perforace, každý týden byly bukvice provzdušněny a 1x v průběhu stratifikace dovlhčeny.

Část bukvic, která byla stratifikována v průběhu dlouhodobého skladování v letním období r. 2021 a 2023, byla po mrazení, tj. před dovlhčováním, 3 dny (přes víkend) aklimatizována při 3 °C. Po dovlhčení a stratifikaci byly bukvice vysoušeny při provozní teplotě na obsah vody cca 10 % a znovu zamrazeny a skladovány při -7 °C. Třídenní aklimatizace bukvic při 3 °C byla realizována rovněž po dlouhodobém skladování bukvic před jarní stratifikací a výsevem.

Ve vegetačním období r. 2022 byla monitorována teplota a relativní vlhkost vzduchu (RVV) čidly Minikin Thi v porostech, ve kterých bylo sbíráno osivo (vývoj a zrání semen úrody z. r. 2022). Stejná čidla byla využita pro sledování těchto parametrů rovněž v průběhu skladování, stratifikace a sušení bukvic.

### 3.1.1 Hodnocení kvality bukvic

#### 3.1.1.2 Životnost

U všech oddílů osiva byla zjišťována životnost barvením v tetrazoliu dle ČSN 48 1211 (2006), a to po sběru, před a po stratifikaci a před výsevem. Z každého oddílu osiva všech variant byly odebrány vzorky bukvic (4x100 ks), bylo odstraněno jejich oplodí a bukvice byly

namočeny na 18 hod do vody. Následně bylo odstraněno jejich osemení a embrya byly vloženy do 1% roztoku 2,3,5-trifenylnitrazolia chloridu. Inkubace v tetrazoliu probíhala ve tmě při teplotě 30 °C. Po 24 hodinách byly bukvice vyjmuty z tetrazolia, opláchnuty pod tekoucí vodou a hodnoceny (živá x mrtvá). Za živé bukvice byly považovány ty, které měly všechny části i po podélném rozříznutí zbarveny do červena, nezbarvená nebo nekrotická pletiva byly přípustné pouze u kořenové špičky a 1/3 distálního konce děloh při povrchové nekróze. Životnost byla vypočítána jako průměr ze 4 opakování v procentech, výsledek byl kontrolován v tabulce povolených odchylek mezi dvěma vzorky dle ČSN 48 1211 (2006).

### 3.1.1.3 Klíčivost

U všech oddílů osiva po sběru, před a po skladování a po stratifikaci před výsevem (před a po předosevní přípravě) byla zjišťována klíčivost bukvic. Zkouška probíhala stejně jako kontrolní stratifikace (viz kapitola 3.1.), ale byla ukončena až v momentu, kdy dva po sobě následující týdny nevyklíčila v daném opakování žádná bukvice. Klíčivost v substrátu byla zjišťována Výzkumnou stanicí VÚLHM Kunovice.

### 3.1.1.4 Vzcházivost

U všech oddílů osiva byla po stratifikaci po sběru, po krátkodobém i v průběhu dlouhodobého skladování zjišťována vzcházivost semenáčků buku, a to v laboratoři a výzkumné lesní školce Řečkovice Ústavu zakládání a pěstění lesů (ÚZPL MENDELU), ve výzkumné stanici (VS) Truba (ČZU v Praze), v lesní školce LESCUS Cetkovice, s.r.o. a Dykových lesních školce MENDELU. Výsevy nebyly realizovány vždy na všech institucích, ale vždy byl realizován výsev minimálně 2x v laboratorních a 1x v provozních venkovního podmínkách školky tak, aby se eliminovala případná zvýšená mortalita semenáčků z jiných důvodů (abiotičtí nebo biotičtí činitelé) než z důvodu doby stratifikace. Na MENDELU bylo do výsevových misek vždy vyseto 4x50 semen z každé varianty po stratifikaci všech oddílů. V lesní školce Řečkovice byly vysety bukvice na výsevový stůl (vždy 60 ks/varianta) do směsi výsevového substrátu Gramoflor s pískem (poměr 3:1) a na záhon do minerální půdy (100 ks/varianta). Na VS Truba bylo vyseto vždy 6x50 semen do sadbovačů do fóliovníku a v r. 2022 a 2023 s ohledem na poškození oddílu 176 a 199 v r. 2021 hlodavci i do výsevových misek do inkubátoru (+4 °C), a to do písku. V lesní školce LESCUS Cetkovice bylo testováno 3x28 semen, které byly vysety do výsevového substrátu Gramoflor (3 sadbovače HIKO 265 s 28 buňkami). V Dykových školkách bylo testováno 7x28 bukvic každého oddílu (do 7 sadbovačů Tubus Rýmařov s 28 buňkami, výsevový substrát Gramoflor). Každý týden od počátku vzcházení byly počítány vzcházející klíčící rostliny, a to po dobu vzcházení, tj. cca 4-6 týdnů po výsevu. Poté byla zjištěna celková vzcházivost rostlin vzejitých ze všech variant všech oddílů osiva.

### 3.1.1.5 Morfologické parametry a biomasa

V r. 2021 byly u rostlin pocházejících ze všech testovaných oddílů bukvic (i ve variantách ošetření proti houbám) stratifikovaných v Semenářském závodu a vysetých v lesní školce Cetkovice zjištěny základní morfologické parametry (výška nadzemní části a tloušťka kořenového krčku) a biomasa (nadzemní části, listů, hrubých a jemných kořenů).

### 3.1.1.6 Dýchání bukvic – změny v obsahu fumarázy

Před dovlhčením, po dovlhčení, v průběhu a na konci stratifikace po krátkodobém skladování v r. 2021 (na konci stratifikace zvlášť pro klíčící a zvlášť pro neklíčící bukvice) byly

odebrány vzorky bukvic v Semenářském závodu s cílem stanovit obsah enzymu fumaráza, jehož aktivita by v průběhu stratifikace měla vzrůstat (Eliášová et al. 2015) a jehož hladina by mohla indikovat překonání dormance bukvic. Vzorky bukvic byly uzavřeny do plastových kónických zkumavek Eppendorf 50 ml. Vzorky byly postupně ukládány do mrazicího boxu s nastavenou teplotou -80 °C (Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat MENDELU). Všechny vzorky byly po shromáždění všech variant převezeny v polystyrenovém boxu se suchým ledem (4 kg) od výrobce SPEKTRO CZ, spol. s r.o. do laboratoře Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.).

V laboratoři Katedry biochemie byly vzorky umístěny do mrazicího boxu s nastavenou teplotou -80 °C. Následně proběhla příprava vzorků, a to vypreparování embryonálních os bukvic do studeného pufru, tj. kapalného dusíku. Příprava extraktů cytosolických/mitochondriálních frakcí byla převzata z publikace Eprintseva et al. (2014). Všechny procedury proběhly při 0-4 °C. Dva gramy kukuřičných štítků byly homogenizovány v 10 ml extrakčního pufru (poměr 1:5 w/v). Homogenát byl přefiltrován přes čtyři vrstvy gázoviny. Centrifugace (1300 g) probíhala po dobu 5 minut. Zbytky buněčných stěn byly odstraněny a supernatant byl dále centrifugován při 14 000 g po dobu 20 minut – supernatant byl použit k čištění cytosolové fumarázy. Peleta MTCH byla rozrušena v 5 ml extrakčního pufru bez sacharózy s 0,01 % Tween 80. Pufr byl homogenizován v centrifugační zkumavce a znovu centrifugován při 14 000 g po dobu 20 minut. Tento supernatant byl použit pro další čištění fumarázy. Hodnoty aktivity fumarázy byly vyjádřeny buď na množství čerstvé váhy (tj. hmotnost odebraných 7 kusů embryonálních os) nebo na množství proteinu v příslušné frakci.

### 3.1.1.7 Dýchání bukvic – změny v rychlosti vydýchávání CO<sub>2</sub>

Byl ověřován předpoklad, že intenzita dýchání bukvic se zvyšuje s dobou stratifikace, což může souviset i se zvyšováním aktivity enzymu fumaráza, nutného pro katalýzu fumarátu v Krebsově cyklu. V průběhu stratifikace byla v pravidelných 7denních intervalech měřena rychlost difúze CO<sub>2</sub> z povrchu bukvic pomocí přístroje LI-COR (LI-6800) s adaptérem Soil CO<sub>2</sub> Flux Chamber (6800-09). Bukvice byly přesypány ze stratifikační nádoby do měřicí nádoby o známých rozměrech a zváženy. Na takto připravené bukvice v měřicí nádobě byl nasazen adaptér a bylo provedeno měření rychlosti vydýchávání CO<sub>2</sub> se třemi opakováními. Monitoring difúze CO<sub>2</sub> byl realizován 1x týdně u bukvic stratifikovaných po krátkodobém skladování v r. 2021 a 2022 a při stratifikaci bukvic v průběhu dlouhodobého skladování v r. 2021, a to pravidelně v týdenních intervalech vždy před dovlhčením bukvic.

### 3.1.1.8 Stanovení obsahu kyseliny abscisové a jejích derivátů

Před dovlhčením, po dovlhčení, v průběhu (1x týdně) a na konci stratifikace (a to zvlášť pro neklíčící a zvlášť pro klíčící bukvice) po dlouhodobém skladování v r. 2022 byly odebrány vzorky embryonálních os bukvic všech variant skladování s cílem stanovit obsah inhibitoru růstu kyseliny abscisové (ABA) a jejích metabolitů: kyseliny (—)-phaseicové (PA), kyseliny (—)-dihydrophaseicové (DPA), 7-hydroxyABA (7-OHABA) a ABA-glukózový ester (ABA-GE), které vznikají při oxidaci ABA, mohou být snadno detekovány (Turečková et al. 2009) a jejichž hladina by mohla indikovat překonání dormance bukvic. Embryonální osy byly odebrány z bukvic stratifikovaných na MENDELU, pouze osy z klíčících bukvic byly odebrány ze semen stratifikovaných v SZ. Z každé varianty bylo vždy odebráno 15 bukvic (stratifikace na MENDELU, poslední vzorky klíčících bukvic ze stratifikace v SZ), z nich byly vypreparovány embryonální osy, které byly zabaleny do alobalu, označeny a vloženy do plastových kónických zkumavek Eppendorf 50 ml. Vzorky byly skladovány v mrazicím boxu při -80 °C (Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat MENDELU) a po ukončení

předosevní přípravy převezeny v polystyrenovém boxu se suchým ledem od výrobce SPEKTRO CZ, spol. s r.o. do laboratoře Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.).

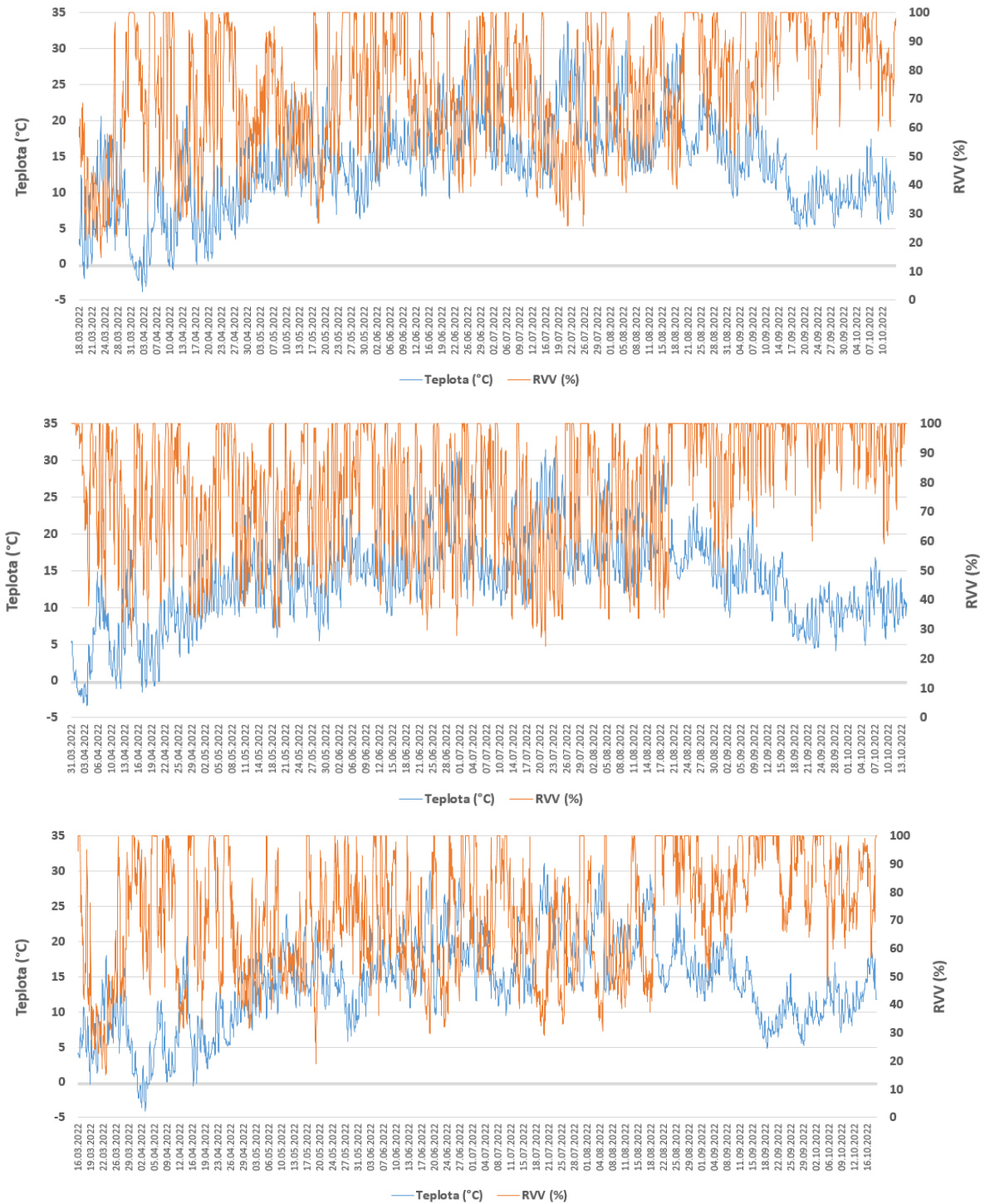
V laboratoři Katedry biochemie byly vzorky umístěny do mrazicího boxu s nastavenou teplotou -80 °C. Stanovení ABA a jejích metabolitů proběhlo dle Turečkové et al. (2009) metodou ultra účinné kapalinové chromatografie (UPLC) následované metodou ESI-MS/MS (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009004469?via%3DiHub>). Hodnoty obsahu ABA a jejích derivátů byly vyjádřeny v pmol na 1 g čerstvé váhy vzorku.

## 4 VÝSLEDKY

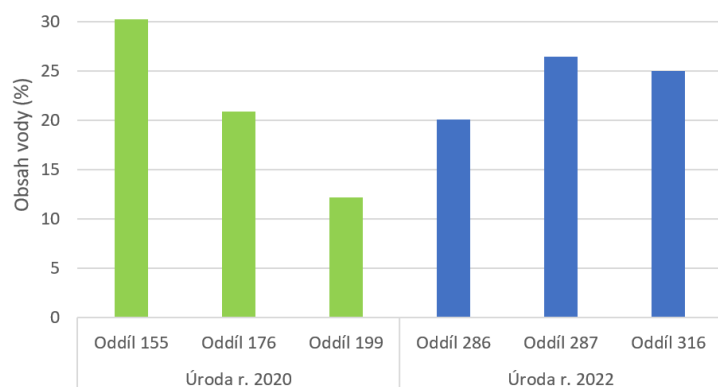
### 4.1 VLIV DOBY STRATIFIKACE

#### 4.1.1 Teplotní a vlhkostní podmínky v průběhu zrání bukvic

Z průběhu teplot a relativní vlhkosti vzduchu v době zrání bukvic v r. 2022 (obr. 3) je možné mj. vyčíst, že v před sběrem bukvic (počátek října) bylo nejvíce srážek (nejvyšší RVV) zaznamenáno u oddílu 287 a nejméně u oddílu 286. Tomu odpovídá i obsah vody v bukvicích po sběru, tj. nejvyšší u oddílu 287, nejnižší u oddílu 286 (obr. 4). Přestože teploty v září a říjnu místy klesaly až k 5 °C, což je teplota vhodná pro odbourání dormance, všechny 3 oddíly je možné označit za dormantní, a to s ohledem na výsledky kontrolní stratifikace (obr. 1). Nejrychleji však při kontrolní stratifikaci klíčily bukvice oddílu 287 s nejvyšším obsahem vody 26,5 %. Tento obsah vody je sice nedostatečný pro odbourání dormance (doporučený 28-30 %), nicméně byl zjišťován až po přechodném skladování bukvic po sběru a v době sběru a před ní, mohl být obsah vody vyšší a k mírnému odbourání dormance tak mohlo dojít. Zcela zřejmou odbouranou dormanci vykazoval oddíl 155 z předchozí úrody z r. 2020, kdy bukvice v kontrolní stratifikaci začaly klíčit již 3 týden (obr. 1) a obsah vody po sběru byl 30 % (obr. 4), resp. vhodný pro odbourávání dormance. Ostatní oddíly, kdy obsah vody po sběru nedosahoval 28 %, bylo možno označit za dormantní.



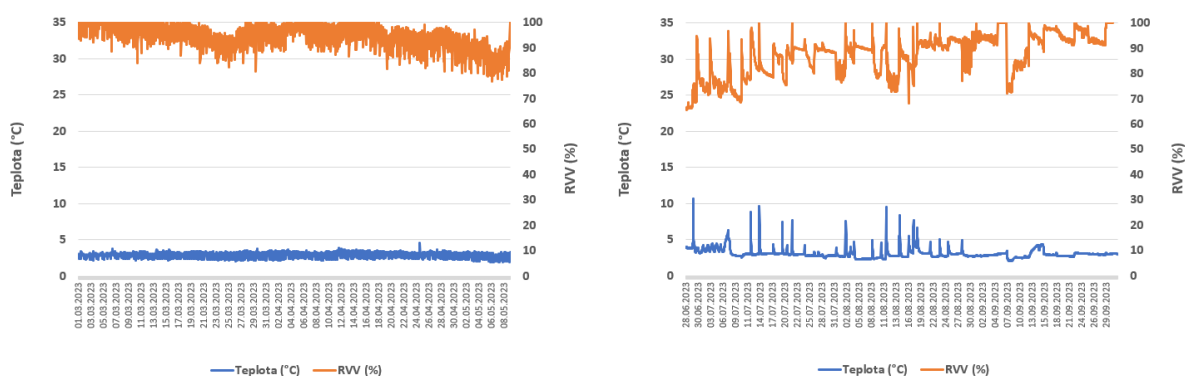
Obr. 3: Teplota a relativní vlhkost vzduchu v průběhu vegetačního období 2022 v porostech se sběry bukvic pro testování na lesní správě Šternberk (oddíl 286 nahoře), Luhačovice (oddíl 287 uprostřed), Frýdlant (oddíl 316 dole)



Obr. 4: Obsah vody v bukvicích po sběru

#### 4.1.2 Teplotní a vlhkostní podmínky v průběhu předosevní přípravy

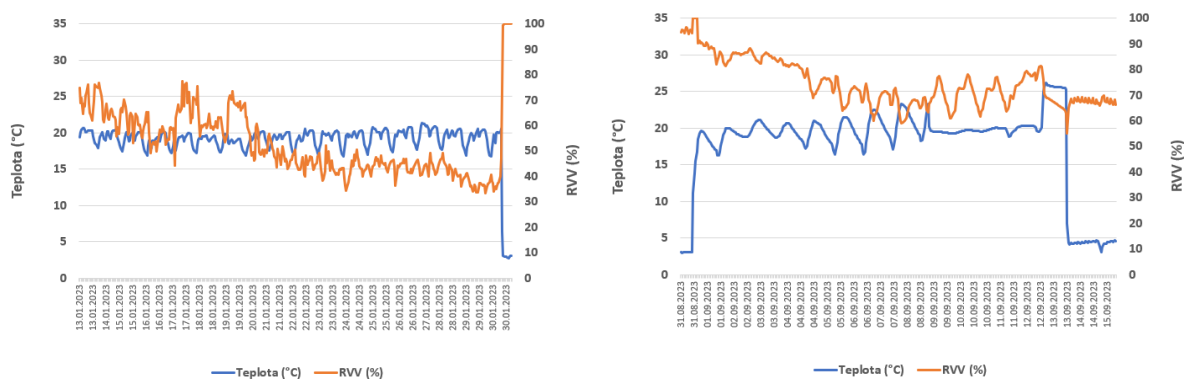
Stratifikace testovaných bukvic byla realizována vždy při teplotě vzduchu 3-4 °C, RVV blízke 100 % (obr. 5, příklad výsledků z r. 2023). V jarním období (obr. 5 vlevo) bylo možné udržet v klimatizovaném skladu stabilnější jak teplotu, tak RVV ve srovnání s letním obdobím (obr. 5 vpravo). Při otevírání dveří klimatizovaného skladu v létě zjevně teplota rychle stoupá místy až k 10 °C, RVV klesá k 70 %. S ohledem na rychlý návrat k nastavené teplotě a RVV po rychlém uzavření dveří nelze předpokládat vliv na odbourávání dormance při stratifikaci. Je však možné, že delší pobyt bukvic mimo klimatizovaný sklad (např. pro jejich dovlhčení) může mít vliv na udržení obsahu vody v bukvicích (viz dále) a i případně na odbourávání dormance.



Obr. 5: Teplota a relativní vlhkost vzduchu (RVV) v průběhu stratifikace po krátkodobém skladování (vlevo), v průběhu dlouhodobého skladování (vpravo) v Semenářském závodu Týniště n. Orlicí v r. 2023

Teplota v průběhu sušení bukvic před dlouhodobým skladováním mražením se pohybovala zpravidla pod 20 °C, v létě po stratifikaci bukvic v průběhu dlouhodobého skladování na konci sušení vystoupala k 26 °C (obr. 6). RVV v zimním období (obr. 6 vlevo) klesala postupně z 75 % k 35 %, v letním období (obr. 6 vpravo) se minimum pohybovalo okolo 60 %. Těsně před zamražením byly vždy bukvice aklimatizovány min. 24 hod při 3-4 °C. Poměrně náhlé zvýšení teploty (až na 26 °C) bez snížení RVV pod relativně vysokou hranici (60 %) na konci sušení bukvic stratifikovaných v průběhu skladování v létě mohlo být jednou z příčin většího neúspěchu stratifikace v průběhu dlouhodobého skladování, viz dále.





Obr. 6: Teplota a relativní vlhkost vzduchu (RVV) v průběhu sušení před dlouhodobým skladováním bukvic (vlevo) a po stratifikaci v průběhu dlouhodobého skladování (vpravo) s následnou aklimatizací před zamražením v Semenařském závodu Týniště n. Orlicí v r. 2023

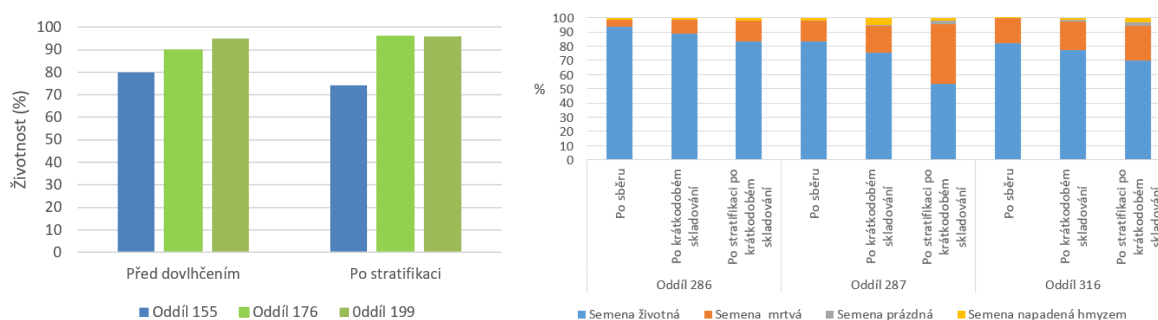
#### 4.1.4 Životnost

##### Stratifikace po sběru

S ohledem na klíčení podstatného podílu bukvic na konci stratifikace nebyla zjišťována. Byla testována pouze vzháživost semenáčků v laboratorních podmínkách po stratifikaci a po následném sušení, viz dále.

##### Stratifikace po krátkodobém skladování

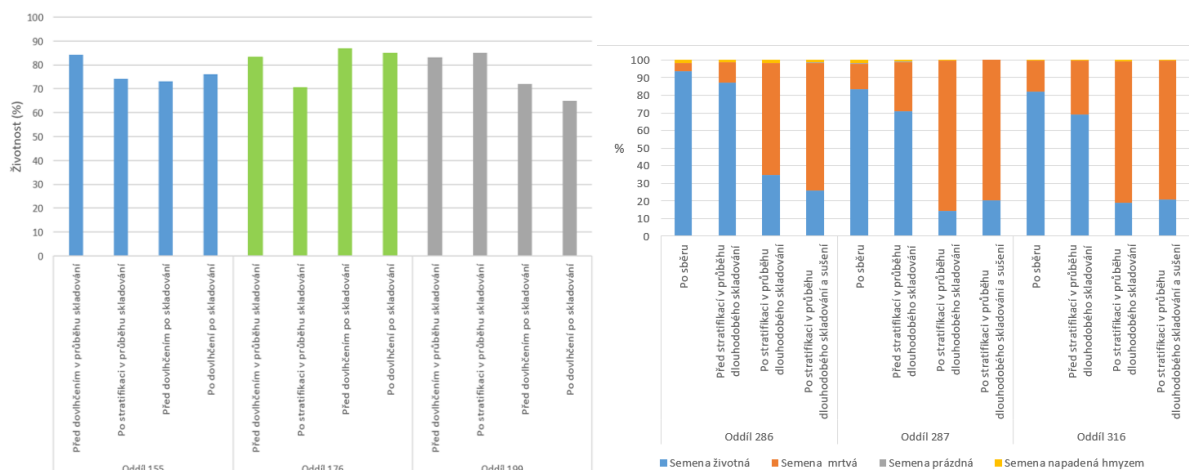
Životnost testovaných oddílů v průběhu krátkodobého skladování a následné stratifikace byla vždy zachována nebo byla jen mírně snížena u oddílů s původní životností 90 % a více (obr. 9). U oddílů s původní životností méně než 85 % došlo vždy k poklesu, a to mírnému do 10 % v průběhu krátkodobého skladování a dalšímu 5-20 % v průběhu stratifikace. To poukazuje na jistotu vyšší efektivity předosevní přípravy u oddílů s vysokou životností.



Obr. 9: Životnost testovaných oddílů osiva v různých fázích krátkodobého skladování a předosevní přípravy v r. 2021 (vlevo) a v r. 2023 (vpravo)

##### Stratifikace v průběhu dlouhodobého skladování

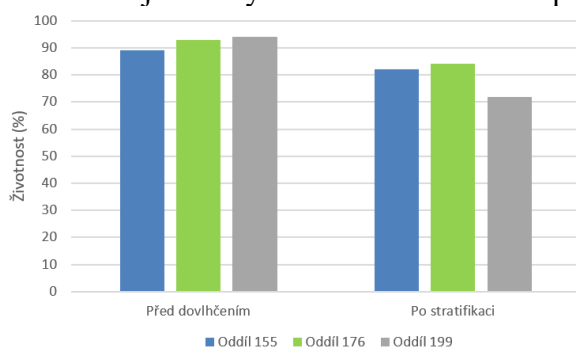
Životnost oddílů během skladování a předosevní přípravy v průběhu dlouhodobého skladování byla u bukvic z úrody 2020 víceméně zachována, pouze u oddílu 199 došlo k výraznějšímu poklesu, zejména v období po stratifikaci (obr. 10 vlevo). U bukvic z úrody r. 2022 byl však zaznamenán výrazný pokles v životnosti bukvic při stratifikaci v průběhu dlouhodobého skladování, který může souviset s horším udržením obsahu vody v průběhu stratifikace nebo s vyšším atakem hub u nedočistěných bukvic, přesto nebyl tak vysoký pokles očekáván. Je tedy zřejmá vyšší nejistota úspěchu při stratifikaci bukvic v průběhu dlouhodobého skladování.



Obr. 10: Životnost testovaných oddílů osiva v různých fázích skladování a předosevní přípravy realizované v průběhu dlouhodobého skladování v r. 2021 (vlevo) a v r. 2023 (vpravo)

### Stratifikace po dlouhodobém skladování

Životnost bukvic v průběhu dlouhodobého skladování zůstala vysoká (cca 90 %), v průběhu následné předosevní přípravy však poklesla o 10-20 % (obr. 11). To poukazuje na vhodnost zejména vysoce kvalitních oddílů pro dlouhodobé skladování.



Obr. 11: Životnost testovaných oddílů osiva po dlouhodobém skladování (před dovhlčením) a po předosevní přípravě stratifikací

### 4.1.5 Klíčivost v substrátu

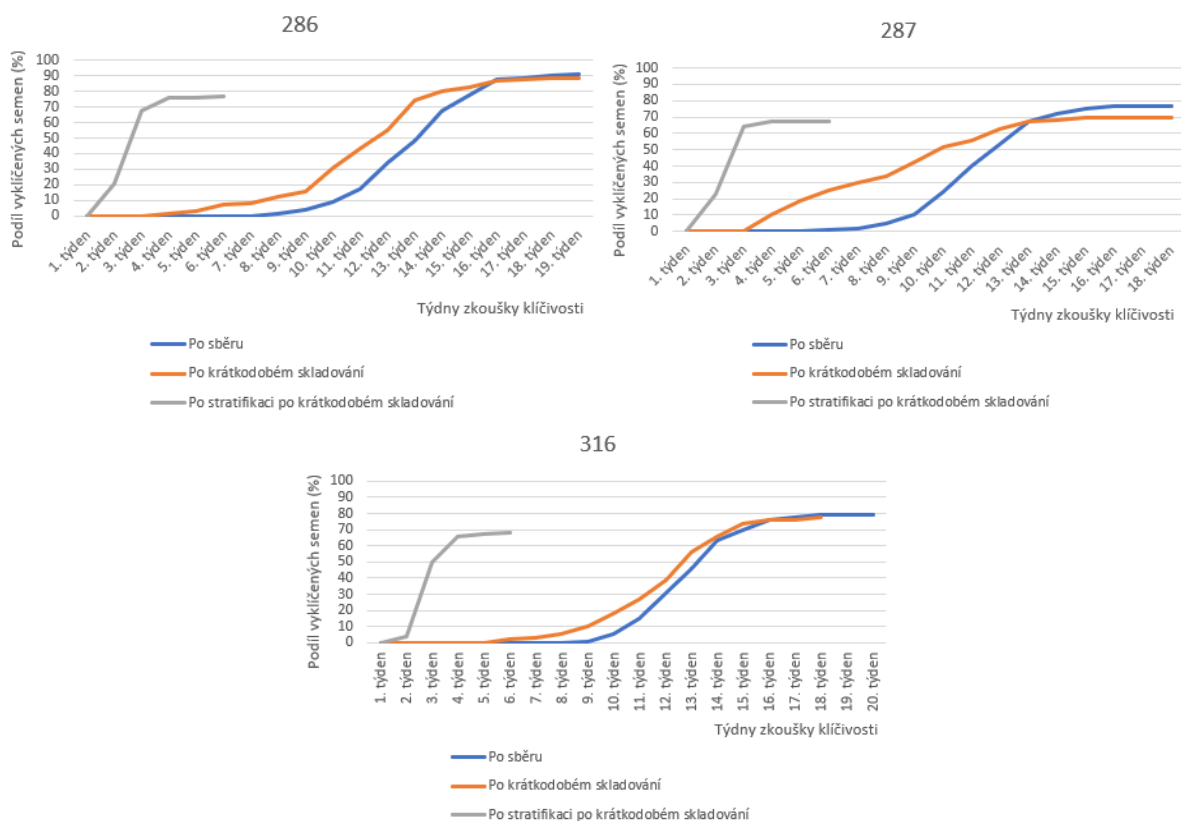
#### Stratifikace po sběru

Varianta stratifikace po sběru mohla být v rámci projektu testována pouze u úrody z r. 2022. Ke konci stratifikace po sběru však byly bukvice dovhlčeny nad obsah vody 34 %, což způsobilo jejich předčasné klíčení (u oddílu 286 klíčilo 28 % bukvic, u oddílu 287 24 % a u oddílu 316 3,5 %). Oddíl 316 potřeboval delší stratifikaci, ta byla ale kvůli počátečnímu klíčení bukvic předčasně (o 14 dnů dříve) ukončena, oddíl však obsahoval nejméně naklíčených semen. Naklíčené bukvice není možné sušit a dlouhodobě uskladnit, což bylo ověřeno a u bukvic stratifikovaných po sběru tak byla vyhodnocena zejména jejich vzcházivost, viz dále.

#### Stratifikace po krátkodobém skladování

Klíčivost bukvic po sběru, krátkodobém skladování a následné stratifikaci byla podrobně sledována u bukvic z úrody r. 2022 (obr. 12). Nejpomaleji klíčily bukvice těsně po sběru, ale dosahovaly vždy nejvyšší klíčivosti. Po krátkodobém skladování je patrné u všech

oddílů mírné urychlení klíčení a mírné snížení klíčivosti (do 5 %). Tato změna po krátkodobém skladování však může velmi ovlivnit potřebnou dobu stratifikace. Například u oddílu 287 je patrné, že po sběru při zkoušce klíčivosti vyklíčilo 10 % bukvic 9. týden, tzn. 11 týdnů potřebných pro stratifikaci (dle Suzsky et al. 1996), a po krátkodobém skladování vyklíčilo 10 % bukvic při zkoušce klíčivosti do 4 týdnů, tzn. 6 týdnů potřebných pro stratifikaci. Přesnější výsledky potom poskytuje kontrolní stratifikace realizovaná po krátkodobém skladování bukvic, nikoliv po sběru. Nejrychleji potom klíčí bukvice až po odbourání dormance studenou stratifikací; výsledná klíčivost po stratifikaci je cca o 10 % nižší, než byla původně po sběru.

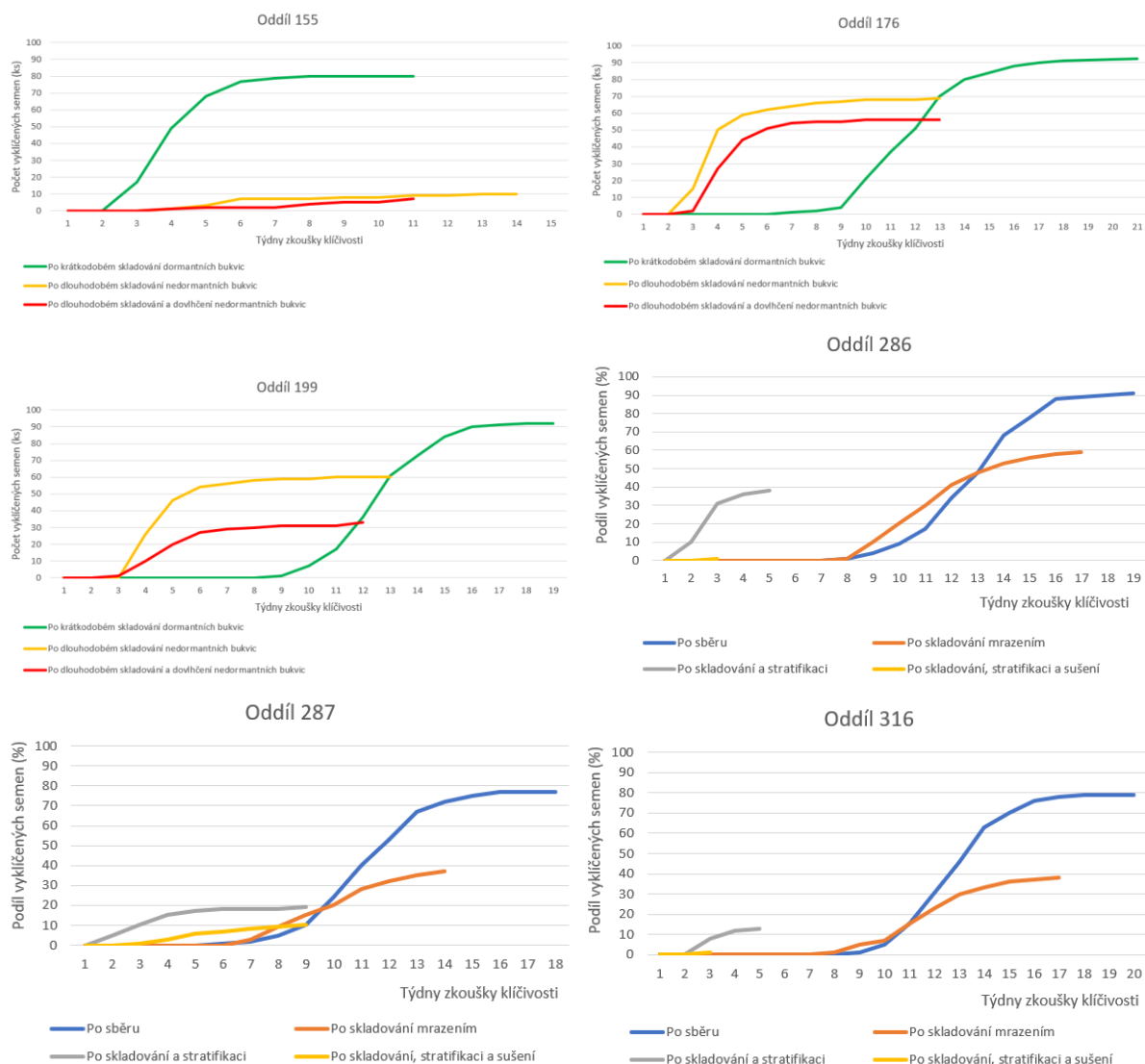


Obr. 12: Klíčivost bukvic testovaných oddílů v substrátu po sběru v r. 2022, po krátkodobém skladování a po následné stratifikaci v Semenářském závodu

### Stratifikace v průběhu skladování

Klíčovost bukvic před stratifikací v průběhu dlouhodobého skladování byla zjišťována pouze u bukvic z úrody 2022 (oddíly 286, 287 a 316, viz obr. 13). V tomto případě došlo již při skladování k výraznému snížení klíčivosti (o 30-40 %), což mohlo být způsobeno zejména nevhodným sušením bukvic na hodnotu okolo 9 % obsahu vody před uskladněním. Je zajímavé, že se projevilo toto poškození bukvic daleko výrazněji při hodnocení jejich klíčivosti než životnosti. Např. životnost oddílu 286 klesla z 93,5 % (po sběru) na 87 % (po skladování mražením), klíčivost z 91 % na 59 %. To snižuje vypovídací hodnotu zkoušky životnosti bukvic. Takto poškozené bukvice navíc při následné stratifikaci opět výrazně snížily klíčivost (o 20-30 %) a po následném sušení byla klíčivost minimální (do 10 %). U bukvic z úrody 2020 bylo v této variantě u některých oddílů dosaženo lepších výsledků. Nejlepší předosevní příprava byla realizována u oddílu 176, kde stratifikace v průběhu skladování, následné sušení a mrazení bukvic snížila klíčivost oddílu o 20 % (z 90 % na 70 %), další 10 % klíčivosti však oddíl ztratil při dovlhčení před výsevem. U oddílu 199 došlo k výraznějšímu poklesu klíčivosti v průběhu

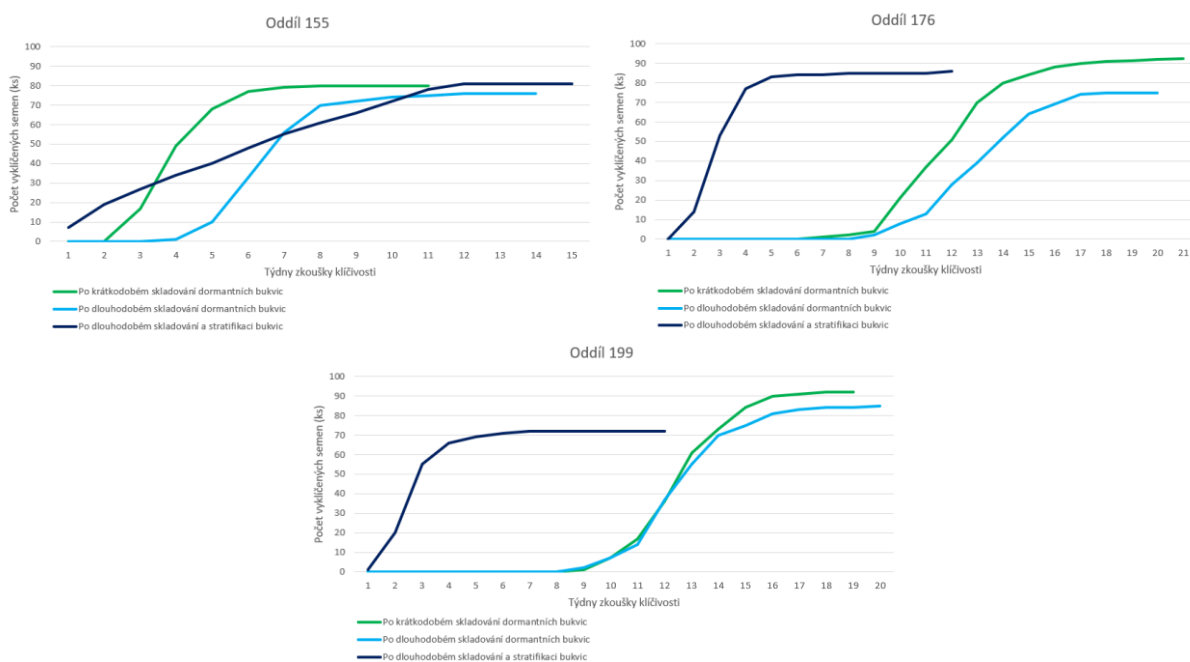
stratifikace a skladování i v průběhu dovlhčení. U oddílu 155 byla ale tato varianta zcela neúspěšná.



Obr. 13: Klíčivost bukvic testovaných oddílů v různých fázích skladování a předosevní přípravy ve variantě se stratifikací v průběhu dlouhodobého skladování

### Stratifikace po dlouhodobém skladování

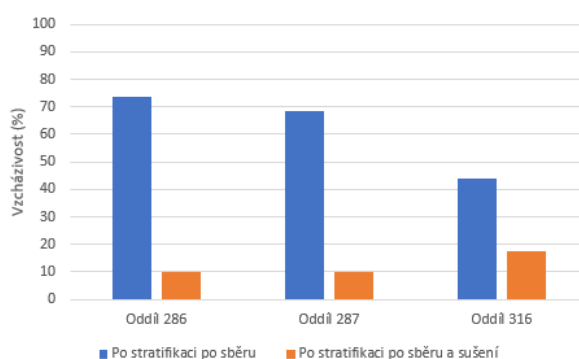
Do konce doby řešení projektu mohly být ve variantě stratifikace po dlouhodobém skladování vyhodnoceny pouze bukvice z úrody 2020. U všech oddílů v této variantě došlo k mírnému snížení klíčivosti po dlouhodobém skladování (bez stratifikace), což mohlo být způsobeno odumřením části bukvic s nižší vitalitou zejména při sušení před naskladněním, a také ke zpomalení klíčení některých oddílů, což je u bukvic s nižším obsahem vody logické (obr. 14). Výrazné urychlení klíčení potom nastává po stratifikaci po skladování před výsevem, přičemž byl zaznamenáno pouze nevýznamné nebo max. 20% snížení klíčivosti v celé předosevní přípravě. Zvláštní reakce byla zaznamenána u oddílu 155. Semena tohoto oddílu krátce stratifikovaná i před výsevem začala sice klíčit ještě dříve (již v prvním týdnu zkoušky klíčivosti), ale část z nich klíčila ještě pomaleji než bez stratifikace. Celková klíčivost tohoto oddílu ale zůstala i po dlouhodobém skladování a krátké stratifikaci zachována, což poukazuje na možnost dlouhodobě skladovat nedormantní bukvice (i se stratifikací po sběru) bez významných ztrát.



Obr. 14: Klíčivost bukvic testovaných oddílů před a po dlouhodobém skladování a po následné stratifikaci před výsevem u oddílů z úrody 2020

#### 4.1.6 Vzcházivost

Vzcházivost semenáčků z bukvic stratifikovaných po sběru v semenářském závodu byla u oddílů 286 a 287 relativně vysoká (obr. 15). S ohledem na klíčení bukvic na konci stratifikace (viz kapitola 4.1.5) však po následném sušení klesla na 10 %. Vzcházivost semenáčků oddílu 316 po stratifikaci po sběru byla nižší oproti ostatním oddílům a původní klíčivosti s ohledem na o 14 dnů dříve ukončenou stratifikaci z důvodu klíčení 3,5 % bukvic. Vzcházivost semenáčků tohoto oddílu po následném sušení však byla vyšší než u oddílů 286 a 287.



Obr. 15: Vzcházivost semenáčků testovaných oddílů osiva po stratifikaci po sběru a následném sušení v Semenářském závodu

Vzcházivost semenáčků v dalších variantách doby stratifikace (po krátkodobém, dlouhodobém a v průběhu dlouhodobého skladování) byla vždy nižší než klíčivost bukvic, a to v provozních podmínkách lesních školek výrazněji než v podmínkách laboratorních (obr. 16 – příklad oddílu 287). Všechny výsledky jsou uvedeny v jednotlivých periodických zprávách projektu. Je tedy zřejmé, že i přes pečlivou manipulaci, skladování a předosevní přípravu

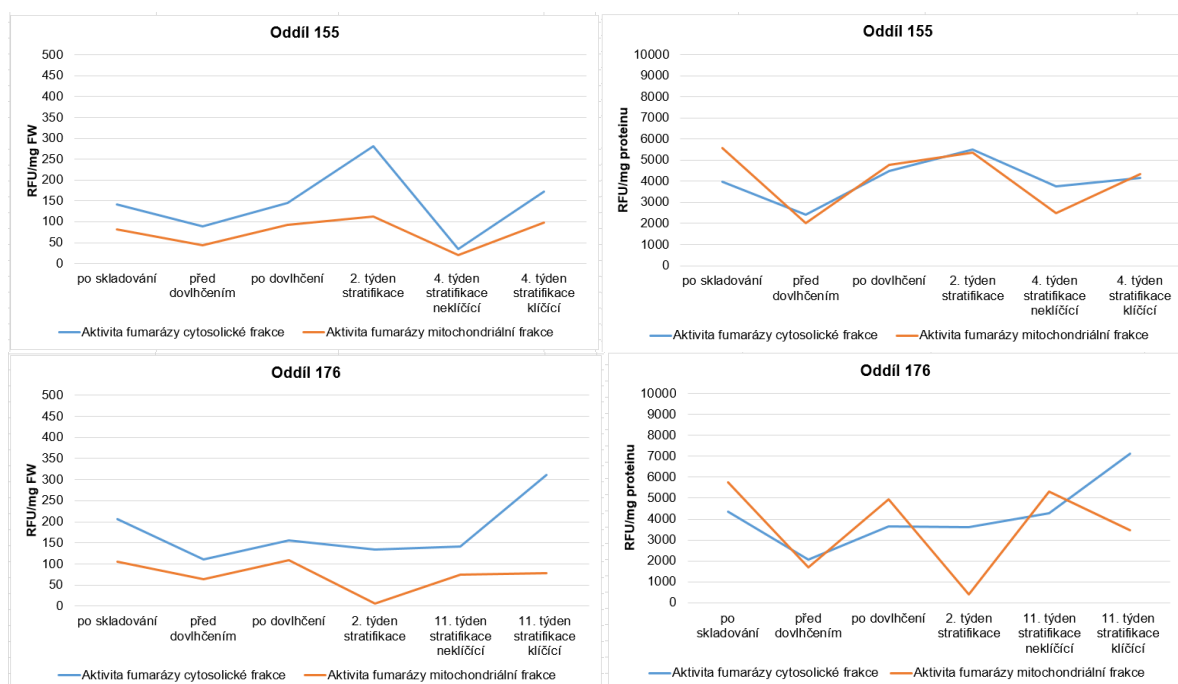
dochází k jistým ztrátám a že některé bukvice schopné klíčit nejsou schopné vzejít v semenáček, zejména v suboptimálních podmínkách provozu školek. Pečlivá manipulace s bukvicemi před výsevem a pečlivá péče o bukvice po výsevu tak může zásadně ovlivnit úspěšnost sje.

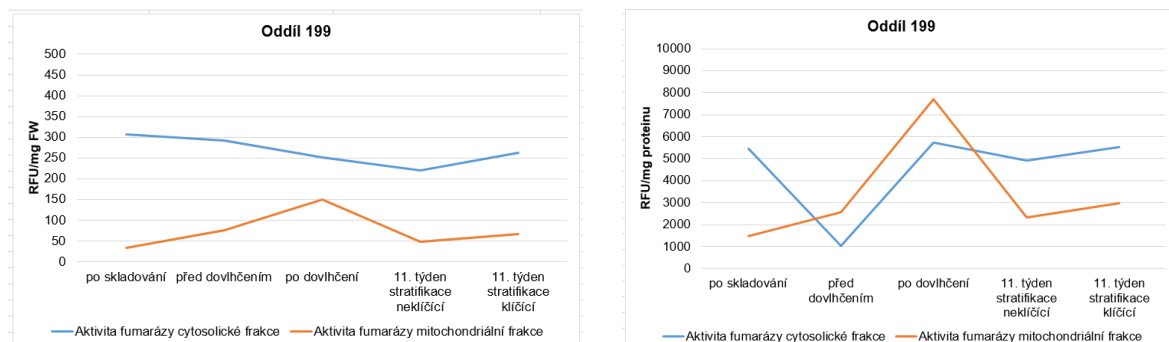


Obr. 16: Klíčivost a vzcházivost bukvice v průběhu skladování a předosevní přípravy oddílů 287

#### 4.1.7 Dýchání bukvice – změny v obsahu fumarázy

Obsah enzymu fumaráza v embryonálních osách bukvice na konci krátkodobého skladování až na výjimky (mitochondriální frakce oddílů 199) klesal (obr. 17). Po dovlhčení jeho hladina vzrostla, a to výrazně v případě přepočtu na množství proteinu, slabě nebo se příliš nezměnila v případě přepočtu na množství čerstvé biomasy. Nebylo potvrzeno, že množství enzymu roste v průběhu stratifikace, na konci předosevní přípravy byla jeho hladina až na výjimky (mitochondriální frakce u oddílů 176) vyšší u klíčících bukvice. Kolísání enzymu resp. intenzity dýchání může způsobit rozdílný obsah vody v bukvicích, který je složitý udržet v průběhu stratifikace konstantní. Z tohoto důvodu nebude moci být tento parametr použit jako indikátor odbourávání dormance a byl zjišťován pouze v prvním roce řešení projektu.

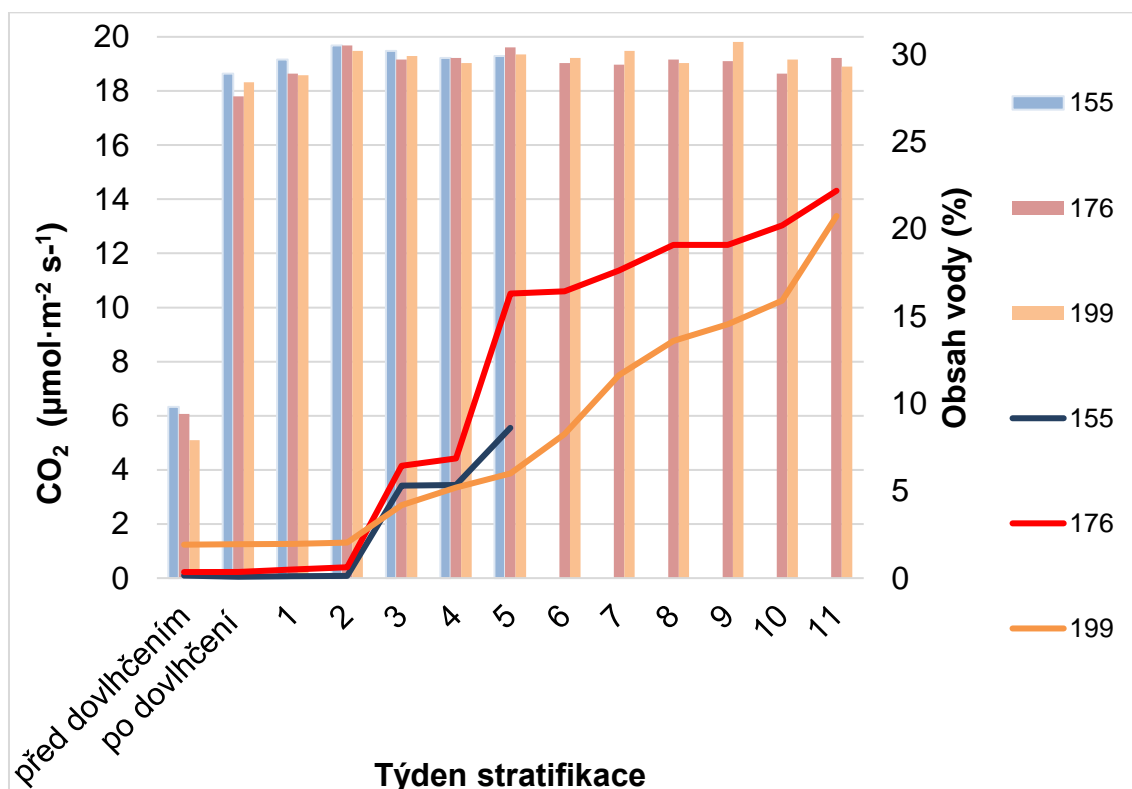




Obr. 17: Množství enzymu fumaráza (cytosolická a mitochondriální frakce) v embryonálních osách testovaných oddílů bukvic na konci krátkodobého skladování a v průběhu předosevní přípravy na 1 mg čerstvé biomasy (vlevo) a na 1 mg proteinu (vpravo)

#### 4.1.8 Dýchání bukvic – změny v rychlosti vydýchávání CO<sub>2</sub>

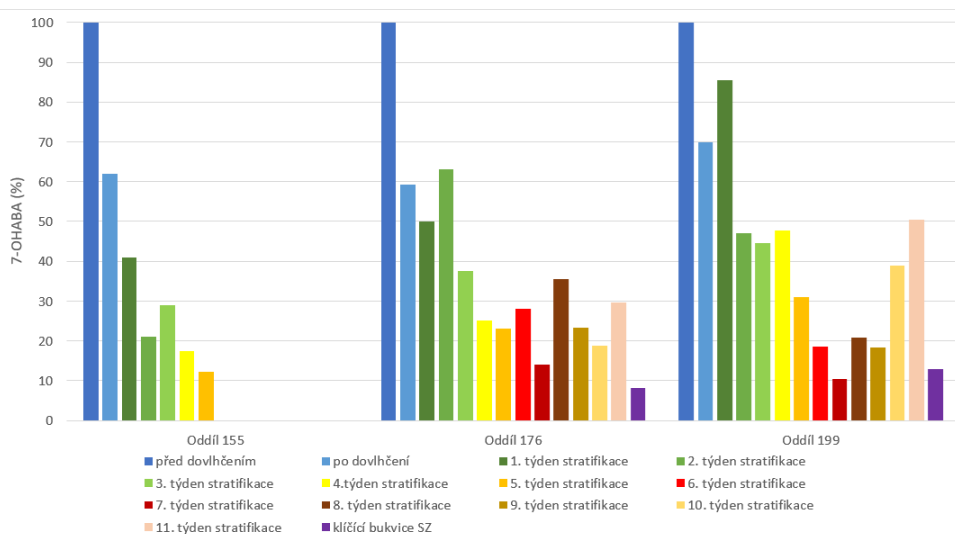
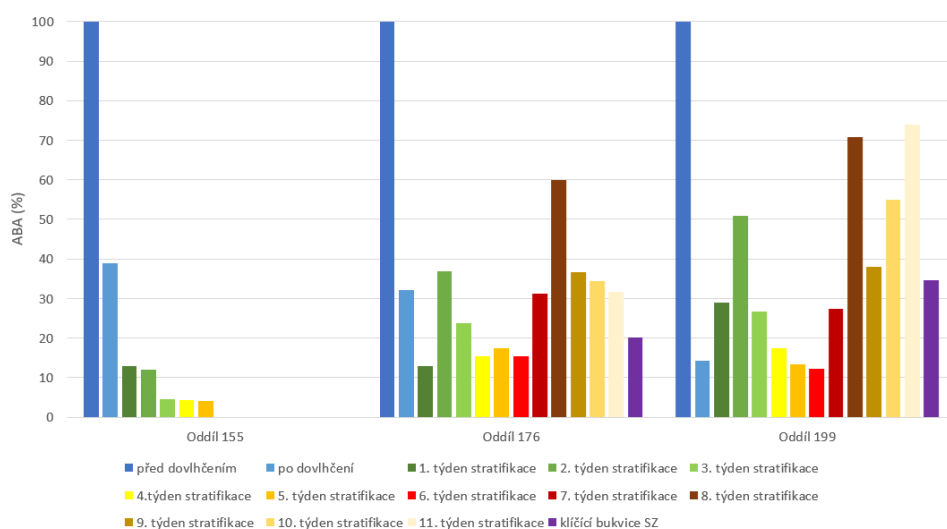
Intenzita dýchání bukvic po krátkodobém skladování a dovlhčení vzrostla u všech testovaných oddílů (obr. 18). Nelze ale jednoznačně určit hranici překonání dormance tímto parametrem, neboť u oddílu 155 byla dormance odbourána při rychlosti vydýchávání CO<sub>2</sub> 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , při této rychlosti dýchání však oddíly 176 a 199 byly uprostřed stratifikace. U oddílů 176 a 199 byla dormance odbourána až při rychlosti vydýchávání CO<sub>2</sub> 12-15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



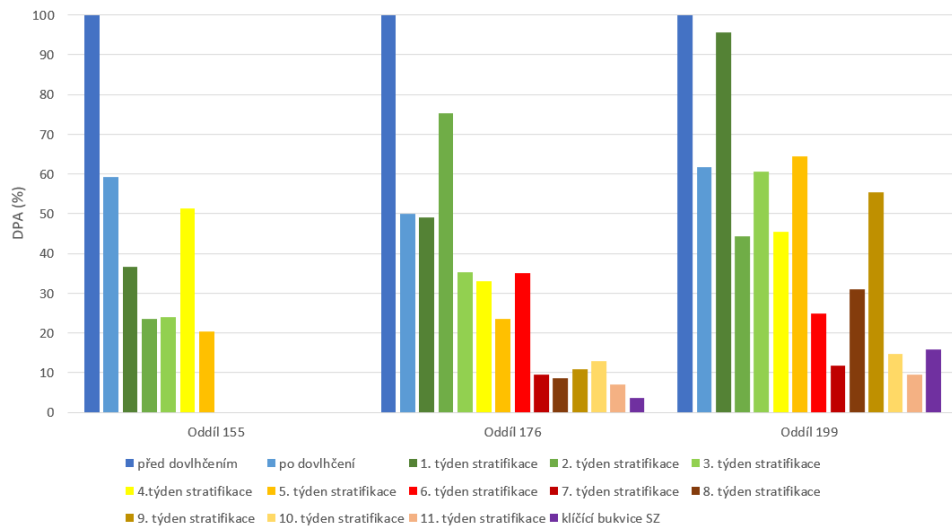
Obr. 18: Rychlost vydýchávání CO<sub>2</sub> (linie) a obsah vody (sloupce) během předosevní přípravy v průběhu dlouhodobého skladování u testovaných oddílů bukvic

#### 4.1.9 Stanovení obsahu kyseliny abscisové a jejich derivátů

V průběhu předosevní přípravy studenou stratifikací dochází k odbourávání inhibitorů růstu, v přípravě bukvic kyseliny abscisové (ABA). Již při dovlhčení bukvic před stratifikací dochází k výraznému poklesu ABA (u testovaných bukvic pod 40 % původního obsahu v embryonálních osách) a bylo zaznamenáno rovněž snížení některých jejích metabolitů, tj. 7-OHABA a DPA (obr. 19). Jejich další významné snižování je patrné i v průběhu stratifikace u oddílů 155. U oddílů 176 a 199 byl v 5. týdnu stratifikace s ohledem na časté testování bukvic (jejich vyjmutí ze stratifikace do laboratorních podmínek po dobu několika desítek minut) zjištěn nízký obsah vody (pokles pod 28 % - nedostatečný pro odbourání dormance, a to i přes pravidelné kropení vodou) a bukvice proto byly několikrát mimořádně dovlhčeny ponořením do vody. To zjevně způsobilo přechodný nárůst a kolísání ABA a jejích derivátů do konce stratifikace. Obsah ABA u klíčících bukvic byl vždy nižší než u bukvic před předosevní přípravou (před dovlhčením), ale nedosahoval minimálních hodnot zaznamenaných v průběhu stratifikace, u oddílů 176 byl vyšší než po 1. týdnu stratifikace, u oddílů 199 byl dokonce vyšší než po pouhém dovlhčení bukvic. Klíčící bukvice však měly velmi nízký obsah 7-OHABA a DPA, dosahující cca minima při předosevní přípravě (do 16 % původního obsahu). Byl zjišťován obsah i dalších derivátů ABA, ale pouze s nižší perspektivou využití, proto tyto výsledky nejsou v souhrnné zprávě zahrnuty. Význam ABA a jejích derivátů v odbourávání dormance nicméně vyžaduje další testování.







Obr. 19: Obsah ABA a jejích derivátů v embryonálních osách testovaných oddílů bukvic v průběhu předosevní přípravy na MENDELU a u klíčících bukvic ze SZ (100 % je výchozí hodnota před dovlhčením v pmol na 1 g čerstvé biomasy)

## **5 ZÁVĚR**

Z výsledků ověření možné doby stratifikace bukvic vyplývá jako optimální stratifikace uskutečněná po krátkodobém skladování a bez výrazných ztrát je možné realizovat i stratifikaci po dlouhodobém skladování bukvic. Variantu se stratifikací po sběru a v průběhu skladování není možné doporučit s ohledem na minimální klíčivost bukvic a vzcházivost semenáčků po sušení nedormantních bukvic při testech před zamražením. Jako problematický moment se jeví technika sušení bukvic, kterou bude nutné pro případné použití těchto variant optimalizovat a specifikovat podmínky sušení. Zároveň musí být u stratifikace bukvic určených ke skladování mrazením striktně udržován obsah vody v rozmezí 28-32 °C tak, aby nedošlo na konci stratifikace k jejich naklíčení.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

ČSN 48 1211. 2006. *Lesní semenářství - Sběr, kvalita a zkoušky kvality semenného materiálu lesních dřevin*. Český normalizační institut. 56 s.

ELIÁŠOVÁ, K., PEŠEK, B., VONDRÁKOVÁ, K., 2015. *Storage compounds, ABA and fumarase in Fagus sylvatica embryos during stratification*. Dendrobiology, 74, 3 s.

EPRINTSEV, A. T., FEDORIN, D. N., STARININA, E. V., IGAMBERDIEV, A. U., 2014. *Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds*. Physiologia Plantarum, 152(2): 231-40.

SUSZKA, B., MULLER, C., BONNET-MASIMBERT, M., 1996. *Seeds of forest broadleaves: from harvest to sowing*. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 110 s.

TUREČKOVÁ, V., NOVÁK, O., STRNAD, M. 2009. *Profiling ABA metabolites in Nicotiana tabacum L. leaves by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. Talanta, 80(1): 390-399.