

Lesy České republiky, s.p.

VÝZKUMNÉ PROJEKTY
GRANTOVÉ SLUŽBY LČR

LESYČR



Projekt

**VYUŽITÍ METOD FLUORESCENCE CHLOROFYLU
A RTG SNÍMÁNÍ PRO TRÍDĚNÍ SEMENNÉHO
MATERIÁLU LESNÍCH DŘEVIN**

Závěrečná zpráva výzkumného projektu

Řešitel

Masarykova univerzita

Odpovědný řešitel:

doc. RNDr. Vít Gloser, Ph.D.

Spoluřešitelé:

Mgr. Peter Váczi, Ph.D, Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.

Brno, říjen 2025

Projekt Grantové služby LČR

Závěrečná zpráva

Využití metod fluorescence chlorofylu a RTG snímání pro třídění semenného materiálu lesních dřevin

Obsah

1.	ÚVOD	4
2.	POSTUP PRACÍ V PRŮBĚHU ŘEŠENÍ PROJEKTU	5
2.1.	OV1: Vliv obsahu chlorofylu na změny klíčivosti semen při skladování	5
2.1.1.	Literární rešerše	5
2.1.2.	Průběh a výsledky řešení v OV 1	7
2.2.	Testy klíčivosti/životnosti oddílů sledovaných od roku 2024	14
2.3.	OV2: Zjištění vad osiva pomocí snímání rentgenovými paprsky	16
2.3.1.	Literární rešerše	16
2.3.2.	Průběh a výsledky řešení v OV 2	18
2.4.	Zpřesnění vztahu mezi přítomností vady zjištěné pomocí RTG a klíčivosti	27
2.5.	Hodnocení RTG snímků vadných semen	28
2.6.	Ověřování využitelnosti třídění na principu RTG detekce pro provozní nasazení	29
2.7.	Následné testování roztríděných semen	32
2.8.	Ekonomická hodnocení třídění semen dřevin pomocí RTG detekce	32
2.8.1.	Další předpoklady úspěšné návratnosti investice do třídíče	33
3.	SPLNĚNÍ PLÁNOVANÝCH DÍLČÍCH CÍLŮ DLE ZADÁNÍ PROJEKTU	35
4.	UPLATNĚNÍ VÝSLEDKŮ VÝZKUMU V PRAXI	36
5.	PUBLICITA PROJEKTU	37
6.	ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ	38
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

Anotace projektu:

Projekt se zabývá výzkumem využití dvou metod pro zjištění kvality osiva a jejich uplatněním při zlepšení kvality osiva lesních dřevin v praxi. Pomocí metody indukované fluorescence chlorofylu byl zjišťován obsah chlorofylu v semenech. Následně byla hledána příčinná souvislost obsahu chlorofylu se změnami klíčivosti semen při dlouhodobém uložení. Pomocí RTG snímání byly u zkoumaných druhů nalezeny vizuální znaky (vady) osiva, které mají přímou souvislost s klíčivostí semen. Tyto znaky byly potom využity k posouzení kvality osiva a třídění osiva pomocí moderního třídíče s RTG snímačem. Zjištěná efektivita třídění pomocí RTG snímání byla pak využita k ekonomické kalkulaci přínosů využití třídíče tohoto typu v provozu semenářského závodu.

Klíčová slova:

Vady osiva, klíčivost osiva, životnost osiva, fluorescence chlorofylu, x-ray snímač, třídíč osiva

1. ÚVOD

Účelem projektu bylo najít provozní technologické postupy třídění semenného materiálu pro zvýšení kvality vyráběného a expedovaného osiva ze Semenářského závodu v Týništi nad Orlicí. Projekt měl dva hlavní úkoly. Ověřování vlivu obsahu chlorofylu v osivu na jeho skladovatelnost by mohlo pomoci v provozu Semenářského závodu zlepšit řízení zásob osiva při jeho dlouhodobém skladování a expedici. Zvýšený obsah chlorofylu v osemeni je u řady zemědělských plodin známým faktorem, který je spojován s rychlejší ztrátou schopnosti klíčení u semen. Jak významně se tento faktor podílí na poklesu klíčivosti semen lesnických významných dřevin však není známo. Cílem první části tohoto projektu tedy bylo zjištění významnosti vztahu mezi poklesem klíčivosti v průběhu skladování semenného materiálu a počátečním obsahem chlorofylu v tomto materiálu. Vztah byl zjišťován pro semena několika vybraných druhů lesních dřevin. Současně bylo také zkoumáno, jestli rychlá nedestruktivní metodika stanovení množství chlorofylu v semenech dřevin pomocí indukované fluorescence je vhodný nástroj pro přesné zjištění obsahu chlorofylu u všech zkoumaných druhů. Nasazení vhodné metody hodnocení kvality oddílů v praxi by přineslo výrazné zlepšení plánování doby skladování zpracovaných oddílů osiva a potenciálně také další možnosti třídění při zpracování semenného materiálu.

Výsledky druhého z úkolů k ověřování možností zvyšování kvality vyrobeného osiva pomocí třídícího stroje s rentgenovými paprsky by v případě jejich ekonomické efektivity mohly být využity v provozu Semenářského závodu k produkci oddílů tříděného osiva pro přesné výsevy v intenzivních technologiích lesních školek a pro zlepšení kvality oddílů osiva s nižším podílem klíčivých semen tříděním. Cílem druhé části projektu tedy bylo ověření možnosti hodnocení vad semen pomocí RTG paprsků. Technologie hodnocení kvality semen z RTG snímků umožňuje potenciálně odhalit vady semen jinými metodami nezjistitelné a využít tyto informace při třídění. Tato technologie se v současnosti používá ve velmi omezené míře a pro malé spektrum zemědělsky využívaných druhů (např. rajče, lilek). Zatím nebyla použita pro třídění semen dřevin v provozních podmínkách. Aktivity v této části projektu tedy zkoumaly vztah mezi klíčivostí semen a vadami osiva zjištěnými z RTG snímků. Cílem bylo také zjistit, jak velký podíl ze zjištěných vad (tj. příčiny nevyklíčení semene) může být odhaleno pouze RTG detekcí. Na základě těchto informací získaných pro druhy uvedené v zadání bylo v plánu vytvoření ekonomické rozvahy pro rentabilitu nasazení RTG technologie třídění v provozních podmínkách.

2. POSTUP PRACÍ V PRŮBĚHU ŘEŠENÍ PROJEKTU

2.1.OV1: VLIV OBSAHU CHLOROFYLU NA ZMĚNY KLÍČIVOSTI SEMEN PŘI SKLADOVÁNÍ

2.1.1. Literární rešerše

Kvalitní semena jsou taková, která jsou nepoškozená a produkují životaschopné a silné semenáčky bez vad za různých podmínek prostředí a také po skladování (Dickson, 1980). Jedním z parametrů, které ovlivňují kvalitu semen je obsah chlorofylu. Množství chlorofylu v semenech se mění v průběhu embryogeneze. Během dozrávání je chlorofyl degradován (např. Allorent et al., 2015, Smolíkova et al., 2018). Chlorofyl není nicméně degradován úplně a ve zralých semenech lze nalézt tzv. zbytkový chlorofyl (Smolíkova et al., 2017). Přítomnost chlorofylu byla studována v semenech různých rostlinných druhů a bylo zjištěno, že obsah chlorofylu souvisí s kvalitou semen. Tomuto tématu se věnuje mnoho prací, které se zabývají především zemědělsky významnými druhy (např. druhy z čeledi *Apiaceae* – Grulichová et al. 2022, sója – Teixeira et al. 2020). Přítomnost chlorofylu po dozrání semen je (až na výjimky) nežádoucí, protože je spojena nejen s nižší kvalitou, ale i rychlejším poklesem kvality osiva (klíčivosti, životnosti) při skladování (Suhartanto 2002).

Také mutanti *Arabidopsis* se zvýšeným obsahem chlorofylu v semenech vykazovaly nižší klíčivost při CD testech (controlled deterioration – zvýšení vlhkosti semen při 40 °C pro dobu několika hodin až dnů). Důvodem mohlo být zvýšené množství aktivních forem kyslíku v semenech s vyšším obsahem chlorofylu (Clerkx et al. 2003). Informace o obsahu chlorofylu v semenném materiálu může být tedy užitečná jak pro posouzení aktuální kvality osiva, tak i jeho skladovatelnosti.

Chlorofyl lze ze semen extrahovat různými rozpouštědly a poté změřit v extraktu spektrofotometricky. Mezi často používaná rozpouštědla patří aceton (Allorent et al. 2015), dimethylformamide (Zinsmeister et al 2016), methanol (Smolíkova et al. 2018) nebo petroleum ether a tetrahydrofuran (Bulda et al. 2008, Grulichova et al. 2022). Takovéto extrakce jsou jednoduché, levné a rychlé. Prací, které by sledovaly obsah chlorofylu v semenech, není mnoho a zabývají se spíše nezralými semeny nebo mutanty se zvýšeným obsahem chlorofylů, jen málo se zabývá zralými semeny (viz tabulka 1).

Tabulka 1. Příklady koncentrací chlorofylů v semenech z literatury.

Rostlinný druh	Koncentrace chl a+b ($\mu\text{g/g}$ sušiny)	Zdroj
Sója	0,33	Bulda et al. (2008)
Kukuřice	0,57	Bulda et al. (2008)
Zelí	2,30 – 10,4	Bulda et al. (2008)
Čeľad' <i>Fabaceae</i>	3,6 – 22,2	Fernández-Marín et al. (2017)
Pšenice	n.d. – 0,18 – 2,33	Grulichová et al. (2017)
Mrkev	13,5 – 43,41	Grulichová et al. (2022)
Petržel	5,89 – 84,56	Grulichová et al. (2022)
Kopr	10,43 – 19,66	Grulichová et al. (2022)

Pozn.: Sója, kukuřice - zralá semena, ostatní - různé odrůdy nebo různá zralost.

Pro detailnější analýzy obsahu chlorofylu a jiných pigmentů (např. karotenoidů) v semenech se používá také analýza pomocí HPLC (např. semena různých druhů čeledi *Fabaceae* – Fernandez-Marin et al. 2017). Analýza na HPLC je nicméně náročná časově i finančně.

Kontrola kvality semen pomocí měření fluorescence chlorofylu

Jalink et al. (1998) navrhli metodu pro hodnocení zralosti a kvality semen založenou na měření indukované fluorescence chlorofylu intaktních semen. Semena zelí (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) rozdělili do několika podskupin založených na intenzitě signálu fluorescence chlorofylu. Semena s nejnižším signálem měla nejvyšší procento klíčivosti a normální klíčící rostlinky, zatímco semena s nejvyšším signálem měla naopak nejnižší procento klíčivosti i nejvíce abnormálních klíčících rostlinek. Vysoký obsah chlorofylu v semenech tedy koreloval s nižší kvalitou osiva v testech klíčivosti.

Mnoho vědeckých prací, které sledují obsah chlorofylu v semenech v souvislosti s kvalitou semen, se zabývá pouze signálem fluorescence chlorofylu jako indikátorem obsahu chlorofylu, bez stanovení skutečného obsahu chlorofylu v semenech. Například Dell'Aquila et al. (2002) korelovali signál fluorescence chlorofylu s klíčivostí poškozených semen zelí a Konstantinova et al. (2002) určovali pomocí fluorescence chlorofylu zralost semen ječmene.

Nicméně existují i studie, ve kterých byl srovnáván signál fluorescence chlorofylu a obsah extrahovatelného chlorofylu v semenech, například Deleuran et al. (2013). Pomocí třídíče využívajícího fluorescenci chlorofylu vytvořili 5 skupin semen špenátu podle intenzity signálu fluorescence chlorofylu a semena z těchto skupin pak extrahovali ethanolem. Obsah chlorofylů byl kvantifikován v těchto extraktech pouze jako bezrozměrná čísla získaná z měření extraktů spektrofotometricky při specifických vlnových délkách (maximech absorpce pro chlorofyly). Síla signálu fluorescence chlorofylu korelovala s obsahem chlorofylu.

Ke sledování signálu fluorescence chlorofylu v semenech se používají různé přístroje s různým nastavením. Srovnání absolutní hodnoty signálu mezi různými pracemi je tak nemožné.

Nicméně autoři Franca-Silva et al. (2022) srovnávali fluorescenci chlorofylu získanou dvěma různými excitačními vlnovými délkami (660 a 730 nm). Měření prováděli na několika skupinách semen sóji, lišících se v procentuálním zastoupením zelených semen (0 – 14%). Tyto skupiny byly vytvořeny vizuálním výběrem zelených a žlutých semen. Skupiny s minimálním zastoupením zelených semen měly nejnižší signály u obou vlnových délek a zároveň nejlepší výsledky klíčivosti i ostatních testů kvality semen. Signál fluorescence chlorofylu může podle těchto autorů interferovat s barvou a strukturou povrchu různých semen, což je nutné brát v potaz jako limitaci použití metody fluorescence chlorofylu. U některých semen (např. kukuřice, slunečnice) byla metoda stanovení fluorescence chlorofylu neefektivní z důvodu velmi nízkého obsahu chlorofylu v osemení (Kenanoglu et al. 2013).

2.1.2. Průběh a výsledky řešení v OV 1

Metodická příprava sledování obsahu chlorofylu v semenech dřevin

Na počátku řešení OV1 bylo potřebné ověřit plánovanou metodiku stanovení obsahu chlorofylu v semenech. Byl analyzován obsah chlorofylu extrahovaného z pomletých semen a tato informace dána do souvislosti se signálem indukované fluorescence celých semen. Tato měření byla prováděna na oddílech osiva uložených v Semenářském závodě před začátkem řešení zakázky. Jednalo se o všechny druhy dřevin ze zadání projektu (vždy dva oddíly od každé dřeviny pro srovnání různé kvality) s výjimkou lípy srdčité, která nebyla v zásobách uložených v Semenářském závodě Týniště. Na těchto vzorcích byly na počátku práce testovány všechny využívané metody.

Extrakce a analýza množství chlorofylu v biomase

Semena byla jemně pomleta na centrifugálním mlýnku a následně extrahována několika různými postupy. V první fázi byly použity jako extrakční činidla dimethylsulfoxid a aceton. Tyto látky jsou běžně používány v experimentální práci řešitele a velmi dobře fungují pro extrakce chlorofylů z listů. Následná analýza obsahu chlorofylů v extraktu pomocí stanovení jeho absorpance při několika vlnových délkách je velmi přesná a spolehlivá (Wellburn 1994). V případě semen se však ukázaly dvě komplikace: 1. celkový obsah chlorofylu a tím i signál spektrofotometru byl velmi nízký, 2. některé složky extraktu absorbovaly v podobných vlnových délkách jako chlorofyl a tím znemožnily jeho přesné stanovení.

Pro vyřešení tohoto problému jsme zkusili jiný typ extrakčního činidla. Provedli jsme extrakci podle publikace Bulda et al. (2008), která se zabývala extrakcí fotosyntetických pigmentů ze semen vyšších rostlin. Extrakčním činidlem byla směs petroletheru a tetrahydrofuranu v poměru 3:1. Extrakty byly změřeny na spektrofotometru a vyhodnoceny jako úspěšné díky maximům absorpce ve vlnových délkách pro chlorofyly.

Uvedeným způsobem se podařilo získat uspokojivé informace o extrahovatelném obsahu chlorofylu pro dva druhy (jedle bělokorá a olše lepkavá). Obsah chlorofylu byl spočítán podle vzorce uvedeného v článku Bulda et al. (2008). U dalších druhů se ukázalo, že obsah chlorofylu je velmi malý – pod hranicí stanovitelnosti kvantitativního obsahu běžně používanými extrakčními a analytickými metodami.

V další fázi řešení pokračovaly práce na zpřesnění extrakčních postupů u semen oddílů určených k uskladnění. Stanovení po extrakci bylo následně využito pro ověření výsledků nepřímého stanovení chlorofylu pomocí indukované fluorescence. Chlorofyly byly extrahovány ze semen pomocí acetonu nebo směsi petrolether/tetrahydrofuran. Výsledné extrakty byly měřeny na spektrofotometru Specord 205 (Analytik Jena, Německo).

Vhodnost extrakčního činidla byla ověřena pomocí absorpčních spekter při vlnových délkách 380 – 700 nm. Extrakční činidlo bylo hodnoceno jako vhodné pro extrakci chlorofylů, pokud naměřené absorpční spektrum odpovídalo očekávanému absorpčnímu spektru s maximy ve vlnových délkách, které se využívají při výpočtech obsahu barviv ze vzorců uvedených v literatuře. Olše a lípa byly extrahovány v acetonu, jedle byla extrahována ve směsi petrolether/tetrahydrofuran. V extraktech semen druhů douglaska, borovice a třešň nebylo možné množství chlorofylu kvantifikovat z důvodu velmi nízké koncentrace, která nebyla spolehlivě měřitelná pomocí spektrofotometru.

V případě semen olše, lípy a jedle bylo množství chlorofylu kvantifikováno pomocí hodnot absorbance v definovaných vlnových délkách s pomocí vzorců uvedených v literatuře (Wellburn 1994, Bulda et al. 2008) a je uvedeno v tab. 2.

Tabulka 2. Množství chlorofylu (chlorofyl a, chlorofyl b a jejich součet) v semenech vybraných oddílů dřevin. Hodnoty jsou průměrem pěti opakování \pm směrodatná odchylka. Vysvětlivky: ZS – začátek sběru, KS – konec sběru.

Druh dřeviny	Označení oddílu	Chlorofyl a ($\mu\text{g/g DW}$)	Chlorofyl b ($\mu\text{g/g DW}$)	Chlorofyl a+b ($\mu\text{g/g DW}$)
Jedle bělokorá	174/2022 ZS	$7,72 \pm 0,71$	$6,18 \pm 0,69$	$13,92 \pm 1,37$
	235/2022 KS	$7,05 \pm 0,56$	$6,04 \pm 0,62$	$13,09 \pm 1,17$
Olše lepkavá	338/2022 ZS	$7,69 \pm 2,60$	$9,34 \pm 3,63$	$17,02 \pm 6,19$
	429/2022 KS	$8,23 \pm 1,81$	$9,15 \pm 1,21$	$17,37 \pm 2,77$
Lípa malolistá	341/2022 ZS	$4,73 \pm 1,02$	$4,11 \pm 1,89$	$8,84 \pm 2,92$
	374/2022 KS	$7,93 \pm 0,61$	$5,52 \pm 1,59$	$13,45 \pm 2,17$

Extrakce a analýza množství chlorofylu v semenech různé zralosti

Důležitou otázkou při řešení bylo, jestli obsah chlorofylu v osivu může souviset se stupněm zralosti osiva. Za tímto účelem byly zadavatelem dodány oddíly semen vybraných druhů nasbírané v různém období sběru (označení termínů sběru: podtržené, středně zralé, zralé, příp. úplně zralé). Obsah chlorofylu byl pak hodnocen pomocí metody fluorescence chlorofylu (viz. tabulka 4) a také spektrofotometrickou analýzou extraktu. Zjištěné množství chlorofylu je uvedeno v tab. 3.

Tab. 3. Množství chlorofylu (chlorofyl a, chlorofyl b a jejich součet) v semenech různé zralosti vybraných oddílů dřevin. Hodnoty jsou průměrem pěti opakování \pm směrodatná odchylka.

Druh dřeviny	Označení oddílu	Chlorofyl a ($\mu\text{g/g DW}$)	Chlorofyl b ($\mu\text{g/g DW}$)	Chlorofyl a+b ($\mu\text{g/g DW}$)
Jedle bělokorá	210/22 podtržené	7,52 \pm 0,30	9,35 \pm 0,40	16,87 \pm 0,70
	210/22 středně zralé	6,39 \pm 0,31	7,95 \pm 0,38	14,34 \pm 0,70
	210/22 zralé	7,26 \pm 0,78	9,26 \pm 1,00	16,52 \pm 1,78
	210/22 úplně zralé	7,92 \pm 0,68	9,90 \pm 0,85	17,82 \pm 1,53
Olše lepkavá	456/22 podtržené	2,67 \pm 0,67	3,10 \pm 1,00	5,77 \pm 1,57
	456/22 středně zralé	2,11 \pm 0,14	2,09 \pm 0,14	4,20 \pm 0,28
	456/22 zralé	6,02 \pm 0,83	4,62 \pm 1,24	10,64 \pm 2,07

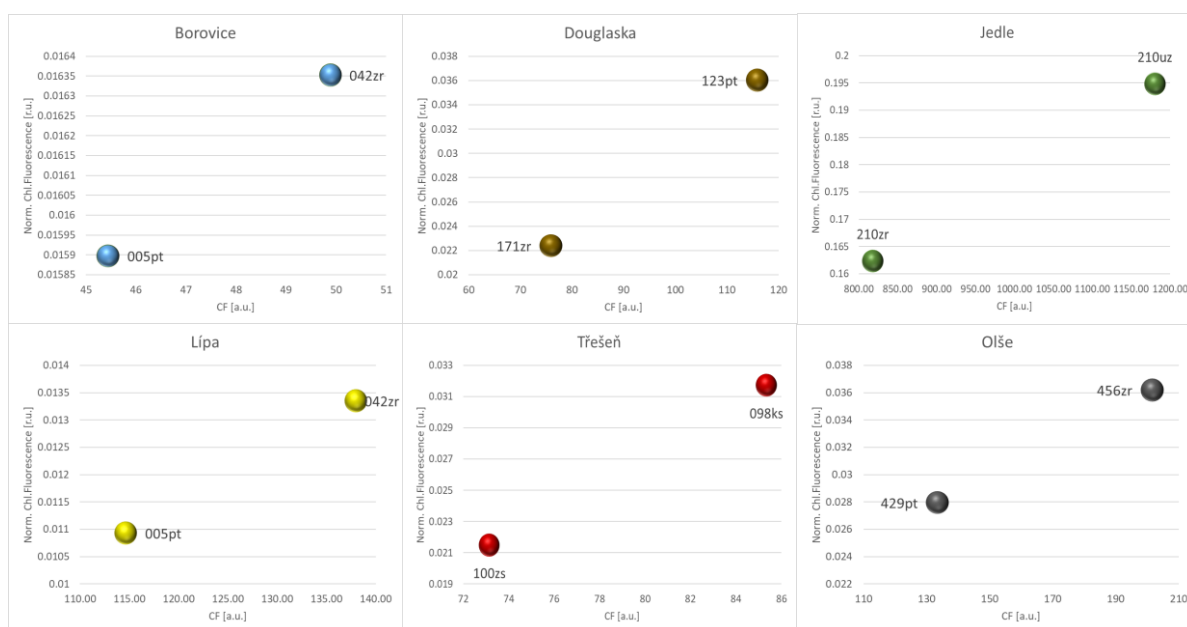
Metodika měření indukované fluorescence chlorofylu pro posouzení obsahu chlorofylu v osemeni

Pro stanovení byly použity v průběhu řešení dva systémy. První z nich – FluorCam FC-800 (PSI, Drásov, CZ) - zaznamenává fluorescenci chlorofylu indukovanou pomocí záblesku excitačního světla využitím kamerového detektoru. To umožňuje měřit fluorescenci semen rozložených na ploše (např. miska) ca. 12x12cm a stanovit tak fluorescenci velkého množství semenného materiálu v jednom měření (dle velikosti stovky až tisíce ks semen). V průběhu řešení byla optimalizována metodika nepřímého měření obsahu chlorofylu v semenném materiálu pomocí měření indukované fluorescence chlorofylu. Semenný materiál je vždy navrstven do roviny na ploše minimálně 10x10cm, co umožňuje v jenom měření otestovat víc než 100 semen. Měření je vždy prováděno třikrát pro vyloučení špatného postavení jednotlivých semen při jednotlivém měření. Základní parametr udávající množství přítomného chlorofylu je intenzita emitované fluorescence. Intenzita absolutního signálu emitované fluorescence se však mezi různými testovanými vzorky (různé druhy, různý čas sběru) značně měnila a kvůli dostatečně citlivému odlišení emitované fluorescence od pozadí bylo nutné upravovat citlivost přístroje. Aby bylo možné jednotlivá měření vzájemně srovnat přistoupili jsme k normalizaci absolutního signálu fluorescence vůči fluorescenčnímu standardu, který je přiřkládán ke každému měření.

S pomocí druhého systému SeQso (iXeed-CFA300) byla zkoumána velikost fluorescence jednotlivých semen. Tento systém umožňuje stanovení variability fluorescenčního signálu mezi jednotlivými semeny zkoumaného oddílu.

Srovnání měření fluorescence systémy FluorCam a SeQso

Robustnost a spolehlivost metodiky stanovení obsahu chlorofylu pomocí systému FluorCam byla ještě ověřena pomocí srovnávacích měření na druhém, komerčně prodávaném systému specializovaném pro měření fluorescence semen od firmy SeQso (iXeed-CFA300). Byly takto změřeny všechny sledované oddíly semenného materiálu analyzovaného i systémem FluorCam. Výsledky získané z obou systémů jsou prezentovány v obrázku 1 a tabulce 4. Srovnáním informací z obou měřících systémů se podařilo potvrdit dobrou citlivost obou systémů pro nepřímé posuzování obsahu chlorofylu v semenném materiálu. Naměřené výsledky jsou srovnatelné. Z výsledků také vyplývá, že data ze systému SeQso vykazovala u srovnávaných oddílů semen výrazně větší variabilitu naměřeného signálu než systém FluorCam (viz tab. 4).



Obrázek 1. Grafy srovnání hodnot fluorescence chlorofylu (CF) naměřené přístrojem SeQso (osa X) a normalizované chlorofylové fluorescence (Norm. Chl. Fluorescence - osa Y) naměřené přístrojem FluorCam pro různé oddíly semenného materiálu (označeno čísly) zkoumaných dřevin v různém stadiu zrání (pt – podtržené (nedozrálé), zr – zralé, uz – úplně zralé, zs – začátek sběru, ks – konec sběru).

Tabulka 4. Výsledky měření fluorescence chlorofylu (CF) naměřené přístrojem SeQso a normalizované chlorofylové fluorescence (Norm. chl. Fluorescence) naměřené přístrojem FluorCam pro různé oddíly semenného materiálu zkoumaných dřevin nasbíraného v různém stadiu zrání (pt – podtržené, sz – středně zralé, zr – zralé, uz – úplně zralé, zs – začátek sběru, ks – konec sběru).

Druh	Oddíl	FluorCam		SeQso	
		Norm. chl. [r.u.] avg	Fluoresc. std dev	Chl. Fluoresc.[a.u.] avg	std dev
Borovice	BO_5_ZS	0.0159	0.0049	45.44	21.97
	BO_42_KS	0.0164	0.0086	49.89	20.47
Douglaska	DG_123_ZS	0.0360	0.0184	115.87	47.43
	DG_159_SZ	0.0287	0.0084	86.43	29.03
	DG_171_KS	0.0224	0.0110	75.95	36.48
Jedle	JD_174_ZS	0.1276	0.0383	1 040.44	431.45
	JD_210_PT	0.1782	0.0545	1 186.25	432.09
	JD_210_SZ	0.1755	0.0500	1 200.31	384.78
	JD_235_KS	0.1624	0.0473	817.76	347.91
	JD_210_UZ	0.1948	0.0530	1 180.65	366.82
Lípa	LP_341_ZS	0.0109	0.0028	114.62	86.86
	LP_374_KS	0.0134	0.0041	137.97	89.32
Olše	OL_338_ZS	0.0279	0.0102	133.45	41.28
	OL_456_PT	0.0235	0.0081	122.75	30.69
	OL_456_SZ	0.0238	0.0050	130.57	48.79
	OL_429_KS	0.0249	0.0061	146.57	43.96
	OL_456_ZR	0.0362	0.0097	201.54	55.35
Třešeň	TR_100_PT	0.0215	0.0053	73.15	40.79
	TR_98_ZR	0.0317	0.0066	85.34	32.43

Srovnání fluorescence chlorofylu a obsahu extrahovaného chlorofylu

Naměřené hodnoty normalizovaného signálu fluorescence chlorofylu byly verifikovány srovnáním s obsahem chlorofylu *a* zjištěného analyticky z extraktů ze semenného materiálu. Přehledně jsou výsledky uvedeny v tabulce 5 pouze pro oddíly semenného materiálu, u kterého byla extrakce a analýza úspěšně provedena (detaily viz. kap. *Extrakce a analýza množství chlorofylu v biomase*). U druhů jedle bělokoré a lípy malolisté je přímá úměra mezi obsahem chlorofylu *a* v extraktech ze semenného materiálu a intenzitou normalizovaného fluorescenčního signálu. U analyzovaných oddílů olše lepkavé však pozitivní korelace mezi obsahem chlorofylu *a* fluorescence zjištěna nebyla. V tomto případě zralejší oddíl semenného materiálu vykazoval vyšší obsah chlorofylu *a*, ale nižší hodnoty fluorescence chlorofylu. Rozdíly mezi srovnávanými oddíly u jednotlivých sledovaných druhů, a to jak v obsahu chlorofylu, tak v intenzitě fluorescence, však nebyly statisticky průkazné.

Tabulka 5. Srovnání intenzity normalizovaného signálu fluorescence chlorofylu a obsahu chlorofylu a různých oddílů semenného materiálu zkoumaných druhů dřevin. ZS = začátek sběru, KS = konec sběru.

Druh dřeviny	Označení oddílu	Chlorofyl a ($\mu\text{g/g DW}$)	Norm. Chl. Fluorescence (r.u.)
Jedle bělokorá	174/2022 ZS	$7,72 \pm 0,71$	0.1276 ± 0.0383
	235/2022 KS	$7,05 \pm 0,56$	0.1079 ± 0.0358
Olše lepkavá	338/2022 ZS	$7,69 \pm 2,60$	0.0279 ± 0.0102
	429/2022 KS	$8,23 \pm 1,81$	0.0249 ± 0.0061
Lípa malolistá	341/2022 ZS	$4,73 \pm 1,02$	0.0109 ± 0.0028
	374/2022 KS	$7,93 \pm 0,61$	0.0134 ± 0.0041

Analýza a uložení vzorků osiva pro sledování změn klíčivosti v čase

Vybrané oddíly osiva byly standartním způsobem zpracovány v Semenářském závodě Týniště a uloženy tamtéž ve standartních podmínkách. Reprezentativní část vzorku semen určených k uložení byla nejprve podrobena analýze indukované fluorescence chlorofylu a díky nedestruktivní povaze analýzy byla takto změřená semena součástí celkového vzorku zasláného na analýzu klíčivosti dle ČSN 481211 (dále jen „ČSN“). Tato data pak ukazují počáteční klíčivost každého sledovaného oddílu a fluorescenční signál osiva indikující obsah chlorofylu na počátku uložení. V dalším období řešení byla u části uloženého materiálu vždy jednou ročně otestována klíčivost stejným způsobem. Data o klíčivosti/životnosti semen oddílů zkoumaných v OV1 a určených k dlouhodobému uložení byla získána zakázkovými testy v akreditované laboratoři Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i. (dále jen „VÚLHM“).

Hodnocení vztahu mezi počátečním obsahem chlorofylu a klíčivostí uložených oddílů

Klíčivost uložených semen byla testována na reprezentativním vzorku uloženého osiva počátku sledování a pak po každém roce uložení. Čerstvé osivo pro uložení bylo dodáno Semenářským závodem na konci roku 2022 (borovice a třešeň) a na začátku roku 2023. Výběr oddílů pro analýzy provedl Semenářský závod a byl proveden tak, aby umožnil větší odlišnosti v obsahu chlorofylu (oddíly ze začátku období sběru a z konce období sběru).

Výsledky testů klíčivosti před uložení, po 1 a 2 letech uložení a normalizované hodnoty chlorofylu a jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Výsledky testů klíčivosti/životnosti dle ČSN provedené VÚLHM na dodaných oddílech dřevin na počátku (A), po prvním roce (B) a po dvou letech (C) uložení. Testy životnosti byly provedeny u lípy malolisté a třešně ptačí (hodnoty označené *), u ostatních byly provedeny testy klíčivosti. Testy klíčivosti semen lípy malolisté a třešně ptačí po dvou letech uložení byly provedeny na pracovišti zadavatele. V tabulce jsou také data intenzity normalizovaného signálu fluorescence chlorofylu pořízených před uložení (±směrodatná odchylka). Zkratky: K - klíčivost, Ž - životnost, S - stratifikace.

Druh dřeviny	Označení oddílu	A. K/Ž (%) před uložení (2023)	B. K/Ž (%) po 1. roce ulož. (2024)	C. K/Ž (%) po 2 letech ulož. (2025)	Norm.Chl. Fluorescence na počátku (leden 2023)
Douglaska tisolistá	123/2022	70 (po S) 63 (bez S)	58 63	71 57	0.0360±0.0184
	171/2022	88 (po S) 75 (bez S)	89 75	87 80	
Lípa malolistá	341/2022	51*	49*	2 (2)	0.0109±0.0028
	374/2022	88*	82*	30 (42)	0.0134±0.0041
Jedle bělokorá	174/2022	39 (po S)	46	31	0.1276±0.0383
	235/2022	62 (po S)	46	11	0.1079±0.0358
Olše lepkavá	429/2022	78	74	75	0.0279±0.0102
	338/2022	81	84	82	0.0249±0.0061
Borovice lesní	5/2022	96	93	89	0.0159±0.0049
	42/2022	92	90	90	0.0164±0.0086
Třešeň ptačí	98/2022	93*	94*	80/90*	0.0317±0.0066
	100/2022	94*	91*	92/92*	0.0215±0.0053

Pozn.: Hodnoty klíčivosti u lípy malolisté po 2 letech uložení jsou pravděpodobně podhodnocené z důvodu zkrácené doby stratifikace. V závorce jsou uvedena procenta svěžích semen.

V osivu jedle bělokoré se vyskytuje velké množství prázdných semen a zastoupení prázdných semen se mírně lišilo mezi vzorky jednoho oddílu testovanými v různých letech. Abychom se vyhnuli možnému zkreslení změn klíčivosti vlivem různého zastoupení prázdných semen ve vzorku, je v tabulce 7 uvedeno srovnání hodnot klíčivosti celého oddílu a klíčivosti plných semen v několika letech sledování.

Tab. 7. Srovnání klíčivosti celého oddílu, podílu prázdných semen a klíčivosti plných semen u vybraných oddílů jedle bělokoré na počátku (2023), po prvním (2024) a po druhém roce uložení (2025).

Oddíl	Klíčivost celého oddílu (%)			Prázdná semena (%)			Klíčivost plných semen (%)		
	2023	2024	2025	2023	2024	2025	2023	2024	2025
174/22	39	46	31	43	38	32	84	85	63
235/22	62	46	11	33	29	32	99	73	25

2.2. TESTY KLÍČIVOSTI/ŽIVOTNOSTI ODDÍLŮ SLEDOVANÝCH OD ROKU 2024

Ve třetím roce řešení byl pak soubor testovaných oddílů rozšířen o další oddíly, které se podle předběžného testování v laboratoři zadavatele výrazněji lišily fluorescenčním signálem. Jednalo se o osivo těchto druhů: borovice lesní (4 oddíly), jedle bělokorá (3 oddíly) a lípa malolistá (4 oddíly). Cílem této aktivity bylo získání větší variability v obsahu chlorofylu a tím také více dat pro zjištění vztahu obsahu chlorofylu a klíčivosti osiva. Tyto oddíly byly po roce uložení zaslány k testování ve VÚLHM. Klíčivost semen lípy byla testována u zadavatele. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8. Výsledky testů klíčivosti/životnosti dle ČSN provedené VÚLHM na nově vybraných oddílech dřevin před uložení (A) a po roce uložení (B). Testy životnosti (hodnoty označené *), byly provedeny u lípy malolisté a jedle bělokoré před uložení, u ostatních byly provedeny testy klíčivosti. Po roce uložení byly provedeny testy klíčivosti u všech druhů. V tabulce jsou také data intenzity normalizovaného signálu fluorescence chlorofylu pořízených před uložení (\pm směrodatná odchylka).

Druh dřeviny	Označení oddílu	A. Klíčivost/životnost (%) před ulož. (rok testu v závorce)	B. Klíčivost (%) po 1 roce ulož. (2025)	Norm.Chl. Fluorescence (leden 2024)
Borovice lesní	10/2023	97 (2023)	93	0,0331 \pm 0,0104
	30/2023	96 (2024)	98	0,0319 \pm 0,0068
	84/2023	89 (2024)	91	0,0332 \pm 0,0073
	100/2023	97 (2023)	98	0,0302 \pm 0,0073
Jedle bělokorá	157/2022	44* (2024)	34	0,1628 \pm 0,0419
	207/2022	48* (2024)	43	0,1410 \pm 0,0283
	233/2022	65* (2024)	52	0,1259 \pm 0,0321
Lípa malolistá	427/2022	98* (2023)	29 (50)	0,0308 \pm 0,0034
	461/2022	95* (2023)	34 (46)	0,0319 \pm 0,0068
	525/2022	88* (2023)	35 (24)	0,0323 \pm 0,0031
	538/2022	78* (2023)	20 (37)	0,0326 \pm 0,0325

Pozn.: Hodnoty klíčivosti u lípy malolisté po 1 roce uložení jsou pravděpodobně podhodnocené z důvodu zkrácené doby stratifikace. V závorce jsou uvedena procenta svěžích semen.

Souhrn závěrů z OV1

Zpracování většího množství vzorků osiva prakticky ukázalo, že stanovení množství chlorofylu pomocí extrakce a následné detekce na spektrofotometru je možné jen u některých ze zkoumaných druhů (olše, jedle, lípa). U těchto druhů byl zjištěný obsah chlorofylu ve většině případů v souladu se signálem fluorescence chlorofylu měřeným před extrakcí, jak je uvedeno v tab. 5. Sledování signálu indukované fluorescence chlorofylu je tedy vhodnou a rychlou metodou pro stanovení relativního obsahu chlorofylu v semenech lesních dřevin.

Analýza signálu indukované fluorescence chlorofylu prováděná pomocí metodiky vyvinuté v laboratořích Masarykovy univerzity pro přístroj FluorCam se ukázala jako robustnější a přesnější ve srovnání s běžně používaným specializovaným přístrojem firmy SeQso (tab. 4). Ukazuje to zejména nižší míra variability měření provedených na stejných oddílech oběma přístroji. Z toho vyplývá, že výsledky získané nově vyvinutou metodikou jsou přesnější a jsou schopny potenciálně zjišťovat menší rozdíly v signálu fluorescence než zatím běžně používané přístroje. Oba přístroje však poskytují kvalitní informace využitelné pro posouzení relativního obsahu chlorofylu v semenech dřevin.

V průběhu přípravy vzorků osiva pro uložení byla věnována velká pozornost jejich výběru s ohledem na očekávaný obsah chlorofylu. V součinnosti se zadavatelem byly také připraveny vzorky osiva sklizeného v obdobích neoptimální zralosti. Cílem těchto aktivit bylo získat oddíly dostatečně rozdílné v obsahu chlorofylu, aby bylo možné posoudit jejich vliv na klíčivost po dlouhodobém uskladnění. Zjištěný fluorescenční signál byl však u všech zkoumaných semen obecně velmi nízký. Odlišnosti ve velikosti signálu mezi vzorky oddílů vybraných pro uložení byly zcela minimální u všech zkoumaných druhů. Průkazné rozdíly nebyly dokonce zjištěny ani mezi vzorky semen trhaných cíleně v nezralém nebo přezralém stupni zralosti. Oddíly dodatečně přidané do sledování se bohužel v rámci jednoho druhu také mezi sebou v obsahu chlorofylu průkazně nelišily. Zvýšit variabilitu v obsahu chlorofylu mezi testovanými oddíly se tedy i přes snahu získat vhodnější materiál pro tyto testy nepodařilo.

U všech sledovaných druhů byly změny v klíčivosti po jednom roce uložení minimální (v jednotkách procent) a to jak u původně vybraných oddílů sledovaných od roku 2023 (tab. 6), tak i u oddílů dodatečně zařazených do sledování v roce 2024 (tab. 8). Ani po dvou letech uložení u většiny druhů nedošlo k výrazným změnám klíčivosti (jednotky procent). Výraznější změny byly zaznamenány pouze u jedle a douglasky. Největší změna klíčivosti byla zjištěna u oddílu jedle 235/2022, u kterého poklesla klíčivost z 62 na 11%. Tento pokles je výrazný také při srovnání klíčivosti plných semen: z 99% na 25%. Tento oddíl však vykazoval nejmenší fluorescenční signál ze všech sledovaných oddílů jedle. V případě oddílu douglasky 123/2022 došlo k poklesu klíčivosti po prvním roce uložení, avšak po druhém roce uložení byla klíčivost již stejná jako před uložení.

U třešně a lípy byly na přání zadavatele provedeny po dvou letech uložení testy klíčivosti z důvodu možného nadhodnocení výsledků testů živostnosti. Tyto nově získané informace potvrdily závěry z předchozích testů, a tedy nepřinesly žádné změny předchozích závěrů.

Na základě provedených měření a zjištěných výsledků se **nepodařilo prokázat příčinnou souvislost mezi signálem fluorescence chlorofylu a změnami v klíčivosti semen** zkoumaných druhů při uložení. Přispělo k tomu několik faktorů. Prvním byla obecně slabá intenzita fluorescenčního signálu, někdy na detekčním limitu měřicí techniky. Dalším faktorem byly velmi malé rozdíly v intenzitě signálu detekovatelné mezi oddíly jednotlivých druhů, což fakticky neumožnilo srovnání oddílů s průkazně odlišným obsahem chlorofylu. Posledním faktorem bylo, že zjištěné změny v klíčivosti v čase byly velmi malé. Změny klíčivosti u sledovaných druhů probíhají tedy zřejmě pomalu. Omezená doba řešení zakázky neumožnila zjistit tyto změny po více než dvou letech uložení a případně je prokázat statistickými metodami.

2.3.OV2: ZJIŠTĚNÍ VAD OSIVA POMOCÍ SNÍMKOVÁNÍ RENTGENOVÝMI PAPRSKY

2.3.1. Literární rešerše

Snímací technika a její technický rozvoj

Technika zkoumání vnitřních částí neporušených živých objektů pomocí snímání rentgenovým zářením (RTG) začala poměrně brzy po svém objevu hledat uplatnění nejen v oblasti zdravotnictví, ale i v oboru semenářství. Představovala totiž velmi atraktivní způsob kontroly a hodnocení kvality osiva. Technika RTG snímání se v několika posledních desetiletích velmi výrazně zdokonalila. Zlepšilo se přesné dávkování energie, zacílení a zaostření zdroje RTG paprsků (microfocus X-ray) a také se velmi zdokonalila detekce záření po průchodu objektem (stručný přehled v Arkhipov et al. 2019). Původní detektory využívající fotografický film nebo později fosforové desky měly poměrně malou citlivost. Získání snímku vyžadovalo delší čas a obraz bylo před dalším zpracováním nutné digitalizovat pomocí scanneru. Využití nových typů detektorů na principu scintilátorů a elektronické detekce a záznamu vzniklého viditelného záření (souhrnný přehled v Lanca et Silva 2013) umožnilo přesnější vykreslení struktur a citlivější detekci (zachycení většiny záření detektorem) při nižší dávce a energii použitého RTG záření. Tyto technické pokroky umožnily výrazně zkrátit čas expozice a také následné digitální zpracování získaného obrazu. Nižší dávka energeticky méně bohatého záření při použití moderních přístrojů také už v současnosti nepředstavuje významné riziko ani pro rostoucí buňky rostlin (Zappala et al. 2013). Pro kvalitní kontrastní vykreslení vnitřní struktury také není už většinou potřeba semena speciálně připravovat například bobtnáním ve vodě nebo v chemických roztocích zvyšujících kontrast, jako v minulosti.

Všechny tyto nové schopnosti snímací techniky umožnily širší použití této technologie pro kontrolu kvality osiva a také dovolily ji aplikovat na druhy s menšími semeny. Obrazové rozlišení 10 μm umožňuje u špičkových přístrojů poměrně kvalitní pozorování struktury objektů milimetrových rozměrů. Výrobou RTG přístrojů s vysokým rozlišením pro využití v materiálových vědách i semenářství se už zabývá ve světě několik výrobců a stále častěji se tyto přístroje stávají součástí kontrolních laboratoří. Otevřela se také příležitost využít tuto zobrazovací techniku při třídění semen pro zvýšení kvality osiva. Prvním impulzem pro vývoj systému na třídění osiva podle RTG snímků byla práce van der Burg et al. (1994) ukazující vztah mezi vnitřní strukturou semen rajčat a kvalitou mladých rostlin z nich vzešlých. Technickou složitost tohoto úkolu však ilustruje fakt, že první komerční třídící stroj na tomto principu, specializovaný na třídění cenných semen hybridů rajčat a paprik, byl uveden na trh až v roce 2007, třináct let po začátku jeho vývoje (Bruggink et van Duijn 2017).

Vývoj techniky pro 2-D i 3-D snímání osiva (Gomes Junior et al. 2009, Gargiulo et al. 2019, Porsch 2020) udělal sice velký pokrok, avšak automatizace rozeznávání složitějších znaků vnitřní struktury semen ze získaných obrazů, jako nezbytná podmínka automatického třídění, je stále v začátcích (de Medeiros et al. 2021). Z publikovaných informací je zřejmé, že

rozeznávání jednoznačně dobrých a také jednoznačně vadných semen je (po počáteční kalibraci systému pro konkrétní druh) relativně jednoduché. V souboru semen však existuje řada případů, kde je jednoznačné posouzení závažnosti odchylky od normálu/vady obtížné a rozhodování bude založeno na míře pravděpodobnosti s jakou daný stupeň odchylky od normálu ještě ovlivňuje klíčivost nebo živostnost semene. Schopnost přesně vyladit algoritmus analýzy snímaných obrazů na základě dobře definovaných znaků (pokud jsou k dispozici) může být rozhodující pro to, jestli je tato technologie třídění pro daný druh semen vhodná.

Vady semen a jejich identifikace pomocí RTG snímání

Velmi významným faktorem při hodnocení semen pomocí RTG je jejich tvar. Rozpoznání vnitřních struktur i případného výskytu vady je výrazně závislé na směru projekce semene jako třírozměrného objektu do dvourozměrného RTG obrazu. Nejlepší výsledky jsou tedy v tomto směru dosahovány u semen s plochým nebo zploštělým tvarem, jejichž poloha při snímání je u většiny semen zkoumaného vzorku podobná např. rajče, paprika nebo meloun (Dell'Aquila 2007, Gomes Junior et al. 2012, Silva et al. 2013). Poškození nebo vady semen jsou však stále častěji zjišťovány RTG metodou i u řady druhů s kulatými nebo oválnými semeny (Goodman et al. 2005, Lombardo et McCarthy 2009, Musaev et al. 2022).

K vadám, které jsou relativně jednoduché na detekci pomocí RTG snímání patří zejména prázdná semena nebo semena s nedostatečně vyvinutým endospermem (Himanen et al. 2016, Arkhipov et al. 2020, Yuan et al. 2021). Také semena poškozená působením herbivorů jsou rozpoznatelná poměrně dobře (Karunakaran et al. 2004, Lombardo et McCarthy 2009, Pinto et al. 2009, Dalgleish et al. 2009). Jemnější rozlišení snímaného obrazu vyžaduje identifikace poškození ve formě prasklin ve vnitřní struktuře semene (Gomes Junior et Cicero 2012, Costa et al. 2014, Arkhipov et al. 2020)

Ještě složitější vyhodnocení vyžaduje identifikace semen napadených patogeny, zejména houbami nebo bakteriemi. V tomto případě jsou strukturální změny na RTG obrazu minimální a rozpoznání bývá většinou založeno na změnách celkové absorpce záření semenem nebo změn v homogenitě absorpce uvnitř semena (Narvankar et al. 2009).

Velmi speciálním znakem pro hodnocení vitality semen je také velikost a stupeň zralosti embrya v semeni (van den Burg et al. 1994, Dell'Aquila 2009, Pereira et al. 2014, Yuan et al. 2021). Tento znak je například velmi významný pro klíčivost a životaschopnost klíčenců u rajčete (Silva et al. 2013) nebo také u nahosemenných dřevin (Arkhipov et al. 2020).

Publikace zaměřené na hodnocení kvality semen dřevin pomocí RTG snímků jsou stále ojedinělé. Několik prací bylo zaměřeno na hodnocení vlivu poškození semen *Quercus rubra* a *Castanea dentata* herbivory (Lombardo et McCarthy 2009, Dalgleish et al. 2009) nebo vlivem různého stupně vyschnutí (Goodman et al. 2005). Zkoumána byla také zralost semen hospodářsky významného keře *Jatropha curcas* (Pinheiro et al. 2020). Moderní technologie snímání microfocusem X-ray se ukázala jako dobře použitelná pro kvalitní zobrazení struktur uvnitř výrazně menších semen dřevin než v případě předcházejících studií. Například u semen *Pinus pumila* byl hodnocen vztah mezi klíčivostí a znaky zjištěnými z vnitřní struktury semen pomocí RTG. Zejména zjištěné plochy endospermu a embrya pozitivně korelovaly s klíčivostí

semen (Karamysheva et al. 2020). Plocha embrya, případně jeho délka se jeví jako důležitý znak pro vitalitu semen nahosemenných dřevin (Arkhipov et al. 2020). Tato práce také upozorňuje na další znaky potenciálně významné pro posouzení vitality semen, které je možné dobře kvantifikovat pomocí analýzy získaného RTG obrazu. Jde například o automatizované měření plochy vybraných vnitřních částí semene, například endospermu, nebo denzitometrickou analýzu endospermu – ukazující jak průměrnou absorbanci záření, tak i míru její heterogenity. Jak se ukazuje na příkladech semen různých druhů, všechny tyto znaky mohou mít těsný vztah ke klíčivosti. Přesnější kvantitativní údaje však stále chybí, a to nejen pro semena dřevin. Přehled informací z literatury tedy jasně ukazuje, že práce provedené v tomto projektu byly velmi potřebné a přispěly k doplnění chybějících informací o potenciálu RTG snímání pro odhalování vad semen vybraných lesních dřevin.

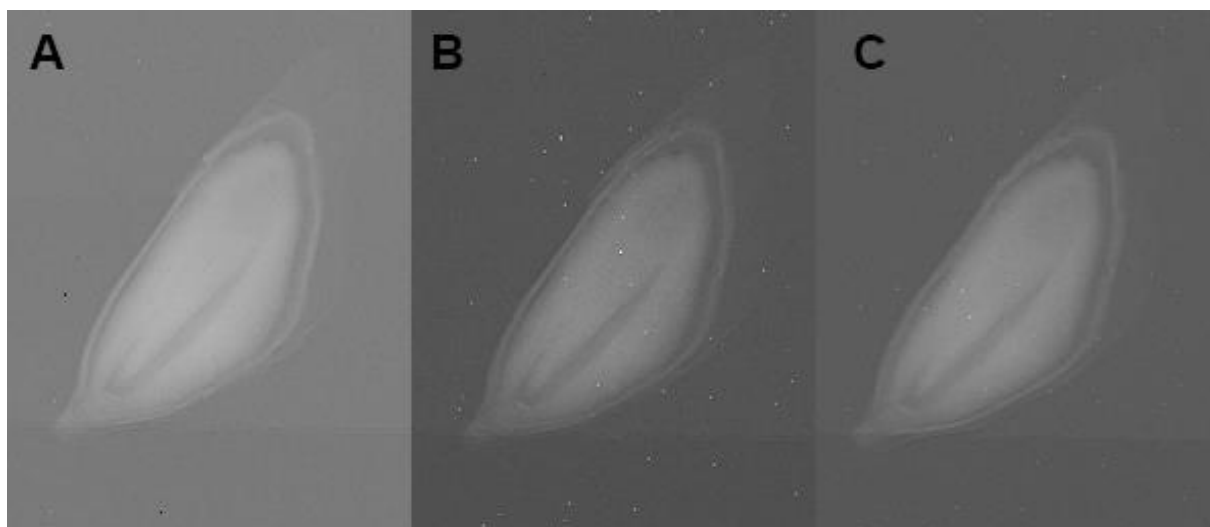
2.3.2. Průběh a výsledky řešení v OV 2

Testování klíčivosti/životnosti semen zkoumaných druhů

V první fázi bylo provedeno úspěšné ověření postupů pro testování klíčivosti semen dřevin na pracovišti řešitele. Výsledky testů klíčivosti provedené na menších souborech semen byly ve velmi dobré shodě s výsledky testů klíčivosti dle ČSN provedeným ve VÚLHM. Testování klíčivosti na pracovišti řešitele umožnilo v průběhu řešení ověřovat vztahy mezi vadami nalezenými pomocí RTG snímků a klíčivostí semen v dílčích pokusech. Životnost semen byla testována ve spolupráci s VÚLHM z důvodu nutné dlouhodobé zkušenosti pro dosažení správných výsledků.

Využitá snímací technika

V první fázi řešení bylo osivo snímáno pomocí X-ray scanneru vyráběného firmou Radalytica pro plant phenotyping a provozovaného ve firmě PSI Drásov. Byly vytvořeny sady snímků pro každý druh při různém nastavení zdroje záření a detektoru. Rozdíly v kvalitě snímků nebyly mezi různými nastaveními nijak výrazné. Získané snímky byly v dostatečné kvalitě (jas, kontrast) i rozlišení pro podrobnější zkoumání vnitřku semen. Drobné technické obtíže vznikly při volbě vhodné neabsorbující podložky a způsobu uchycení semen na ní. Tyto potíže se však podařilo úspěšně vyřešit. Snímky s vyšší energií poskytovaly lepší kontrast bez úprav, avšak snímky získané s nižší energií zase poskytovaly (po úpravách v editoru) lepší vykreslení a menší úroveň šumu (obr. 2).



Obrázek 2. Srovnání vlivu různého nastavení energie záření na kvalitu snímku stejného semene jedle. A) 25kV, B) 35kV, C) 50kV.

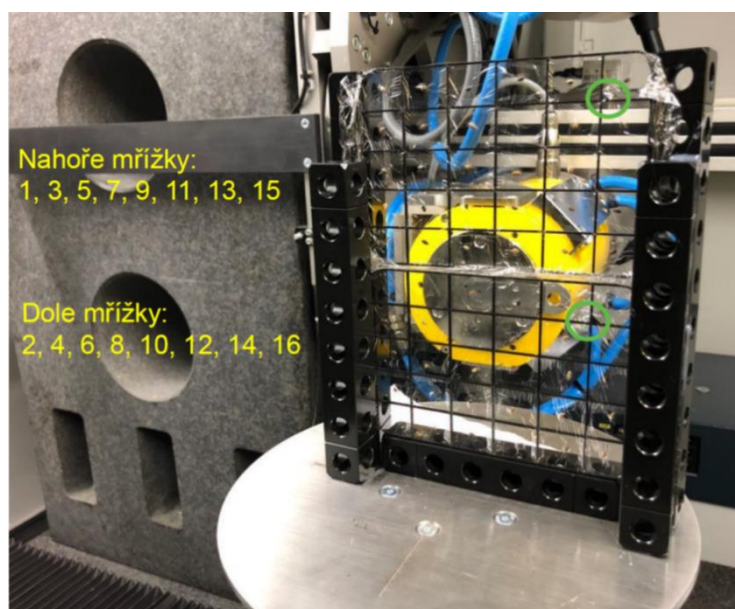
Kvalitu našich snímků jsme měli možnost srovnat se snímky použitého semenného materiálu na jiném snímáacím zařízení (Faxitron MultiFocus x-ray cabinet) při návštěvě semenné banky v polské Kostrzyci (Leśny Bank Genów, Kostrzyca). V tomto případě bylo snímání celkově rychlejší. Úprava nastavení i zpracování získaných obrazů bylo také rychlejší a automatické.

Zajímavé výsledky se ukázaly při použití RTG snímání k hodnocení velikosti a směřování klíčku u stratifikovaných semen buku (obr. 3). Metoda by mohla sloužit k výběru aktivně rostoucích semen s vyvinutým klíčkem, který ale ještě nevyrostl mimo osemení a tím je chráněn proti mechanickému poškození.



Obrázek 3. Snímky stratifikovaných semen buku zjevně v rozdílném stavu vitality. Vlevo zdravé semeno s rostoucím klíčkem, uprostřed pravděpodobně neklíčivé semeno s neznámým typem vady, vpravo semeno s poškozeným endospermem.

Počínaje druhým rokem řešení bylo snímání semen prováděno zakázkově v laboratořích CEITEC VUT Brno na přístroji GE Phoenix v|tome|x L240. Tento průmyslový CT 3D scanner je vybaven rentgenovou trubicí 180kV nano focus pro podrobné rozlišení. Vzorky semen všech druhů byly snímány při jednotném nastavení s použitím urychlovacího napětí 80kV a proudem 200 mA. Akviziční čas byl 900 ms na snímek. Přístroj primárně slouží ke snímání 3D objektů. Snímání semen sice bylo prováděno ve zjednodušeném 2D zobrazení, ale vzhledem k technickým možnostem přístroje bylo nutné semena snímat ve svislém uspořádání. Pro jednoznačnou identifikaci jednotlivých semen a jejich snadné přemístění do nakličovacích misek byla proto semena uchycena ve speciálně vyrobených plastových mřížkách pomocí potravinové folie (obr. 4). Snímání potom probíhalo v několika krocích. Po skončení snímání byly snímky jednotlivých semen upraveny na stejný rozměr a kvalitu obrazu (zejména jas a kontrast) a provedeno hodnocení pozorovaných znaků.



Obrázek 4. Uspořádání semen borovice lesní uchycených svisle v mřížkách při snímání na přístroji GE Phoenix v|tome|x L240 a popis systému označení získaných snímků.

Uchycením semen pro snímání v mřížkách pomocí plastové folie s nízkou absorpcí RTG záření se dobře osvědčilo (obr. 5, vlevo). Pouze v případě žaludů a bukvic bylo nutné z důvodu větší váhy semen přilepit je na průhlednou lepicí pásku a potom teprve přikrýt potravinovou fólií, aby zůstaly ve středu pole i ve svislé poloze mřížky (obr. 5, vpravo).



Obrázek 5. Semena borovice v mřížce (levý obrázek), upevněná mezi dvěma vrstvami průhledné fólie, a semena dubu v mřížce (pravý obrázek), upevněná přilepením na průhlednou lepicí pásku a přikrytá vrstvou průhledné fólie.

Ve třetím a čtvrtém roce řešení bylo možné ke snímání využít také přístroj Kubtec Parameter X-Ray cabinet v Semenářském závodě. V tomto případě nebylo nutné vertikální uchycení a proto byla semena umístěna těsně před RTG snímáním na očíslovaná víčka mikrotitračních destiček (obr. 6). Po snímání byla semena přemístěna do očíslované mikrotitrační destičky, ve které bylo možné díky označení pozic jednotlivých jamek zajistit pozdější přesnou identifikaci jednotlivých semen.



Obrázek 6. Semena buku umístěná na víčku mikrotitrační destičky a vlastní mikrotitrační destička s číslovanými pozicemi (vlevo), semena buku umístěná v mikrotitrační destičce (vpravo).

Zjištění vztahu mezi identifikovanou vadou a klíčivostí semen

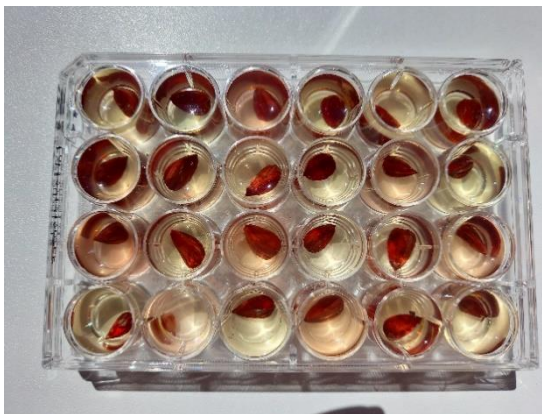
Po RTG snímání byla semena i s mřížkami (po odstranění fólie) umístěna do průhledných plastových nádob na 4 vrstvy vlhkého filtračního papíru (obr. 7). Nádoby byly uzavřeny průhledným víčkem a vloženy do uzavíratelného sáčku. Takto uzavřené nádoby udržely dostatečnou vlhkost pro klíčení semen. Nádoby se semeny jedle byly ještě před vlastním testem klíčivosti umístěny na dobu 21 dnů do lednice (teplota cca. 3 °C) kvůli stratifikaci.



Obrázek 7. Semena buku umístěná v krabičce na vlhkém filtračním papíru. Pozice semen byla zajištěna stejnou mřížkou, která byla použita i při RTG snímání.

Od zadavatele jsme obdrželi kromě nestratifikovaných (oddíl 279/2020) i stratifikovaná (oddíl 286/2022) semena buku. U stratifikovaných bukvic byly provedeny testy klíčivosti dle upravené metodiky ČSN. Nádoby se semeny a mřížkami byly umístěny do lednice (3 °C). Dle požadavků ČSN mají být bukvice umístěny do vlhké rašeliny. V našem testu jsme dostatečné ovlhčení bukvic zajistili překrytím semen vrstvou vlhkého filtračního papíru. Tato úprava se ukázala jako dostatečná pro zajištění optimálních podmínek klíčení (semena klíčila s vysokou úspěšností).

Nestratifikované bukvice byly po provedení RTG snímání převezeny do VÚLHM. Tam jsme je z důvodu zachování konkrétních pozic přemístili do plastových kultivačních destiček a pracovnice VÚLHM pak na nich provedly testy životnosti pomocí barvení tetrazoliem (obr. 8).



Obrázek 8. Ukázka z průběhu testů životnosti prováděných na VÚLHM. Semena namočená do roztoku tetrazolia (foto VÚLHM).

Testovací nádoby se semeny douglasky, borovice, smrku a jedle (po stratifikaci) byly umístěny do kultivačních boxů (obr. 9). Testy klíčivosti probíhaly při teplotě 30/20 °C (den/noc) a fotoperiodě 8/16 hod (den/noc), dle požadavků na testy klíčivosti dle ČSN. Klíčivost semen byla pravidelně kontrolována (min. 2x za týden). Vyklíčená semena (délka kořínku byla min. 4x větší než velikost semene) byla průběžně odstraňována.



Obrázek 9. Plastové nádoby s klíčovými semeny v kultivačním boxu.

Po skončení testů klíčivosti byla nevyklíčená semena preparována (obr. 10). Preparace nevyklíčených semen umožnila rozdělení semen na svěží (bez známek poškození) a mrtvá (nekrotizovaný obsah).



Obrázek 10. Příklady preparovaných nevyklíčených semen borovice. Svěží (nalevo) a mrtvé, nekrotizované (napravo) semeno. Čísla sloužila k identifikaci pozice v mřížce a následnému hodnocení RTG snímků konkrétních semen.

Žaludy byly po RTG snímání připraveny pro testy klíčivosti dle ČSN (odstřížení 1/3 distálního konce děloh, oloupání osemení a namočení na 24 h při laboratorní teplotě). Poté byly žaludy umístěny do plastových nádob naplněných pískem (výška písku 8 cm, velikost zrněk 0,5 - 0,8 mm). Pozice žaludů byla v jednotlivých nádobách zachována tak, aby odpovídala pozici v mřížce při RTG snímání. Po celou dobu testování klíčivosti byl písek udržován vlhký. Testy probíhaly v kultivačních boxech při teplotě 20 °C a fotoperiodě 8/16 hod (den/noc). Žaludy byly považovány za správně klíčící, pokud se v průběhu testu (21 dnů) vytvořily první pravé listy. Nevyklíčené a špatně vyklíčené žaludy byly po skončení testu preparovány, což umožnilo rozdělení semen na svěží (se zdravě vypadajícími dělohami, ale zastaveným klíčením) a mrtvá (nekrotická pletiva). Průběh přípravy a testování klíčivosti žaludů je zaznamenán na obr. 11.



Obrázek 11. Ukázka přípravy a průběhu testů semen dubu. Namočení semen po odstřížení 1/3 děloh a odstranění osemení (nahore vlevo), založení testu (nahore vpravo), 7 dnů od začátku testu (dole vlevo), před vyhodnocením testu (dole vpravo). Pozice semen byla zajištěna umístěním do pozic totožných s jejich umístěním v mřížce při RTG snímání.

Výsledky hodnocení RTG snímků semen a vytvoření katalogu vad

Snímky získané při RTG snímání byly zpracovány pomocí programu FIJI (upravené na vhodnou velikost). Kontrast umožňující dobré pozorování obsahu semen byl nastaven pomocí programu IrfanView a následně byly snímky převedeny do formátu JPEG. Takto upravené snímky byly následně využity pro vizuální analýzu za účelem posouzení vzhledu semen a jejich rozřídění do kategorií v programu XnView (XnSoft). Jako vady byly hodnoceny odchylky od normálního vzhledu semen.

Výsledky vlivu znaku pozorovaného na RTG snímcích na klíčivost/životnost semen

Díky znalosti konkrétních pozic semen během snímání a testování klíčivosti/životnosti bylo možné rozřídít snímky semen na klíčící/životná a neklíčící/mrtvá (zahrnuje nekrotizovaná i svěží, tj. normálně vypadající megagametofyt, příp. dělohy (bukvice a žaludy) a embryo, ale semena nevyklíčila) (tab. 9).

Tabulka 9. Celková klíčivost/životnost oddílů dřevin po RTG snímání.

Druh dřeviny (oddíl)	Klíčivost/životnost (%)
Borovice lesní (42/2022)	61
Douglaska tisolistá (171/2022)	78
Buk lesní – stratifikovaná s. (286/2022)	72
Buk lesní – nestratifikovaná s. (279/2022)	72
Dub letní (246/2022)	54
Smrk ztepilý (485/2022)	78
Jedle bělokorá (210/2022)	55 (78)*

* - vyskytovalo se velké procento (27 %) prázdných semen identifikovaných pomocí rentgenového snímání. Klíčivost po odečtu těchto prázdných semen byla 78 %.

Posouzení vlivu orientace semene při snímání semen dubu a buku

Velká semena buku, dubu a jedle s nejednoznačnou orientací na snímacím zařízení byla snímána na RTG přístroji v náhodných orientacích. Z následné analýzy výsledných RTG snímků vyplynulo, že orientace semene nemá vliv na hodnocení vad.

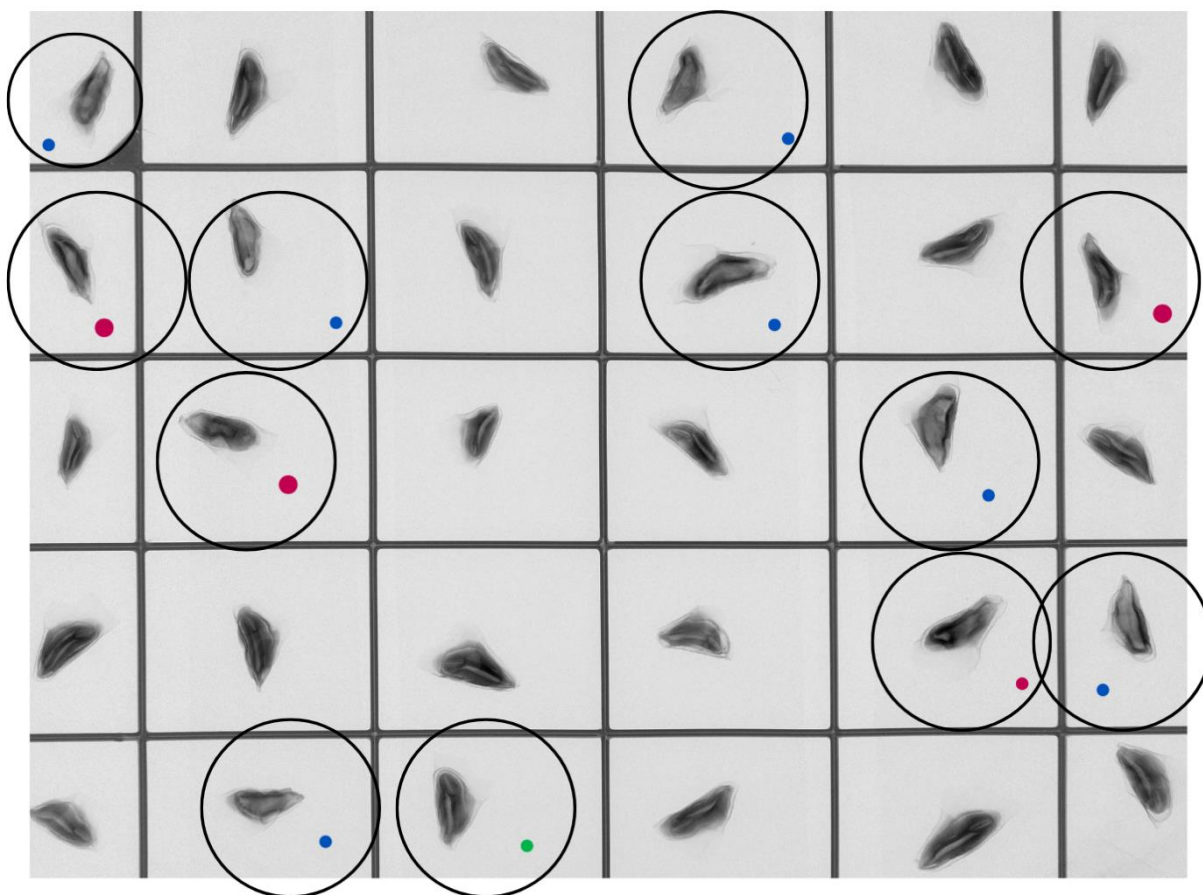
Semena buku, která jsou charakteristická třemi plochami (na průřezu trojúhelníkovitý tvar), neukazovala žádné vady, které by byly pozorovatelné z jedné z ploch lépe. Velmi blízké uspořádání děloh v osemení znemožňovalo pozorování detailů uvnitř embrya, nezávisle na pozici semene.

Oválná semena žaludů neumožňují podle osemení určit pozici uloženého embrya. Na některých snímcích byla pozorována velmi úzká čára (zřejmě předěl) mezi dvěma sousedícími dělohami, ale tato čára je dobře odlišitelná od vady IA Světlé čáry, protože je rovná a přibližně uprostřed snímaného semene na rozdíl od nepravidelných čar, které byly považovány za vadu. Na posouzení semene tedy tato orientace nemá vliv.

Semena jedle mají výrazně nepravidelný tvar, a jak jsme zjistili při analýze po snímání, i velmi nepravidelný vzhled obsahu semene na RTG snímcích. Tyto nepravidelnosti jsou způsobeny pryskyřičnými váčky rozmístěnými na různých místech semene. Orientace semene jedle při RTG snímání pak měla vliv na vzhled pryskyřičných váček - váčky snímané na okraji semene se jeví jako prázdná místa pod osemením, zatímco váčky snímané uprostřed semen způsobovaly plošná zesvětlení. Pozice pryskyřičných váček na snímku však neměla vliv na hodnocení vad semen.

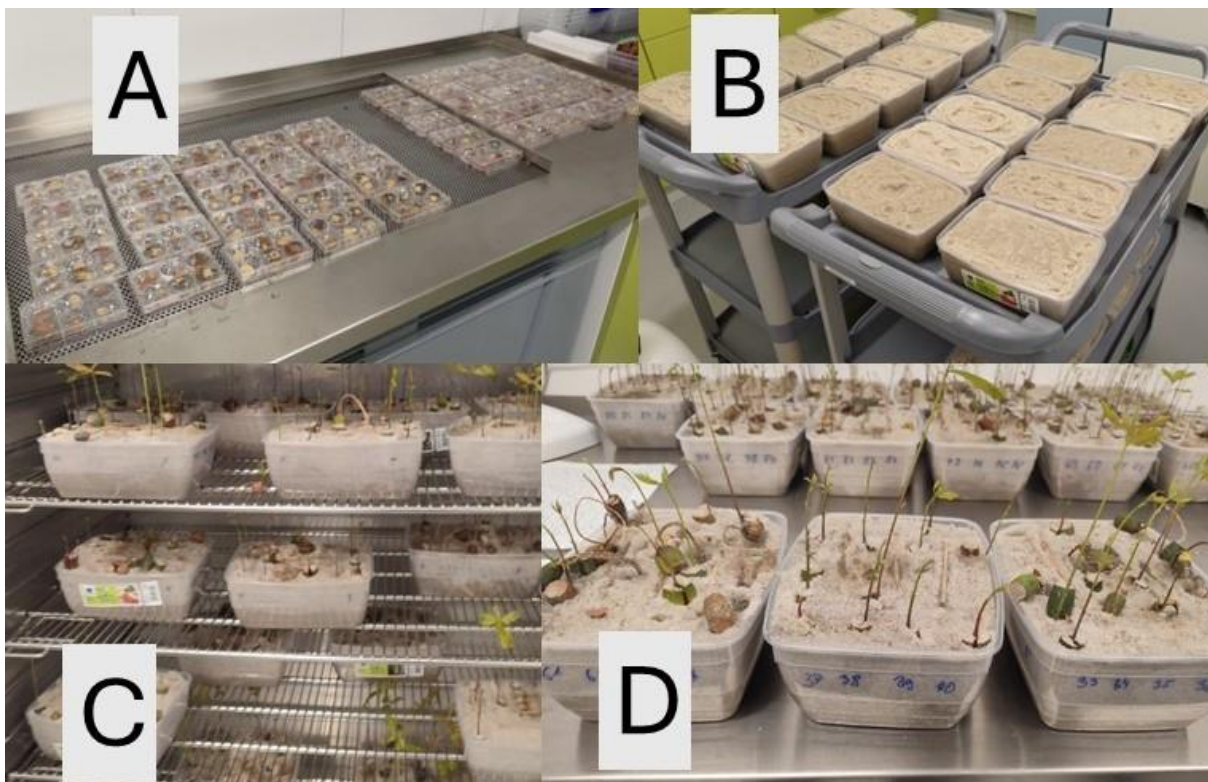
2.4. ZPŘESNĚNÍ VZTAHU MEZI PŘÍTOMNOSTÍ VADY ZJIŠTĚNÉ POMOCÍ RTG A KLÍČIVOSTÍ

Ve třetím roce řešení pro účely podrobnějšího zjištění důsledků přítomnosti vad bylo testování klíčivosti a životnosti efektivněji prováděno pouze na výběru semen se zjištěnými vadami. Z každého zkoumaného oddílu semen různých druhů (s výjimkou žaludů) bylo snímkováno minimálně 1000 semen. Na základě vyhodnocení snímků byla vybrána semena vykazující alespoň jednu ze zjištěných vad (příklad viz. obr. 12). Tato semena pak tvořila zkoumaný **suboddíl**, u kterého byla následně testována klíčivost. Testování klíčivosti suboddílů proběhlo na pracovišti řešitele dle podmínek předepsaných ČSN.



Obrázek 12. Příklad způsobu výběru a označování semen na RTG snímcích: RTG snímek jedle. Semena označená černým kruhem jsou semena vybraná pro testování klíčivosti z důvodu výskytu vady. Modrý bod vedle semene znamená prázdné semeno, červený bod znamená, že semeno nevyklíčilo a zelený, že semeno vyklíčilo.

V případě semen dubu byla nasnímána a následně testována (na klíčivost) všechna semena. Testy klíčivosti žaludů byly provedeny na pracovišti Semenářského závodu za dodržení podmínek dle ČSN (obr. 13).



Obrázek 13. Testy klíčivosti žaludů v SZ Týniště. A – po odstranění osemení byla semena namočena na 24 hodin ve vodě. B – semena zasazená v písku. C - klíčení v kultivačních skříních. D - Vyklíčená semena. Identifikace jednotlivých semen byla možná díky specifikovaným pozicím v plastových krabicích, které odpovídaly číslům v rámci mikrotitračních destiček.

2.5.HODNOCENÍ RTG SNÍMKŮ VADNÝCH SEMEN

Vady, které byly zaznamenány na RTG snímcích, byly klasifikovány na základě Katalogu vad, který je součástí jedné z dílčích zpráv. Následně byla frekvence výskytu jednotlivých vad a jejich kombinací zjištěna a vyhodnocena vždy pro jeden vybraný oddíl od každé dřeviny zařazené do výzkumu. Byla také zjištěna informace o významnosti dopadu jednotlivých kategorií na klíčivost



Obrázek 14. Příklad kombinace vad (RTG snímek smrku): praskliny v osemení, málo zřetelné embryo a stíny a skvrny v megagametofytu.

2.6. OVĚŘOVÁNÍ VYUŽITELNOSTI TŘÍDĚNÍ NA PRINCIPU RTG DETEKCE PRO PROVOZNÍ NAsAZENÍ

Firm zabývajících se vývojem a výrobou třídíčů na principu RTG je celosvětově velmi málo. Pro spolupráci a testovací třídění byla vybrána nizozemská firma. Firma vyrábí moderní RTG třídíče pro komerční využití umožňující rychlost třídění až 20 semen za sekundu. Hlavním segmentem zákazníků pro využití RTG třídíče tvoří výrobci osiva zeleniny a okrasných rostlin. Praktické využití třídíče pro třídění semen lesních dřevin bylo tak pro pracovníky firmy novým úkolem s odlišným typem semenného materiálu.

Z důvodů omezeného času řešení a po dohodě se zadavatelem bylo pro účely této zakázky vybráno osivo jedle bělokoré jako modelový příklad využití třídíče na principu RTG. Testování použitelnosti této technologie pro třídění semen lesních dřevin v provozních podmínkách probíhalo v posledním roce řešení ve třech etapách.

V **první etapě** bylo nezbytné vytvořit pro třídíč algoritmus (obrazový model), který je schopen rozlišovat z digitálních RTG obrazů mezi semeny zdravými a vadnými. Tvorbu algoritmu provedla firma formou placené služby ve svém originálním softwaru využívající prvky AI na základě propojení obrazu semene a informace o jeho kvalitě (vadné nebo zdravé). Tento postup tvorby rozhodovacího algoritmu pro třídění je velmi odlišný od vyhledávání jednotlivých typů vad a následném zjišťování jejich významnosti pro klíčivost semen. Pro proces přípravy algoritmu („učení“) je zapotřebí řádově několik tisíc semen (typicky 3-4 tisíce). V našem případě jsme pro přípravu algoritmu ručně vybrali s pomocí běžného RTG snímání na pracovišti Semenářského závodu cca dva tisíce zdravých, plných semen a podobné množství prázdných nebo jinak vadných semen. Tyto dvě předem připravené sady byly pak použity pro přípravu třídícího algoritmu.

Alternativní způsob přípravy algoritmu využívaný firmou je založen na postupném snímání jednotlivých semen, jejich následném označení a uložení na klíčovost a zjištění klíčivosti. Výhodou této metody je vytvoření přímého vztahu mezi znaky zjištěnými při snímání a klíčivostí bez potřeby ručního třídění a také bez nutnosti zabývat se jednotlivými vadami semen a jejich možným dopadem na klíčivost.

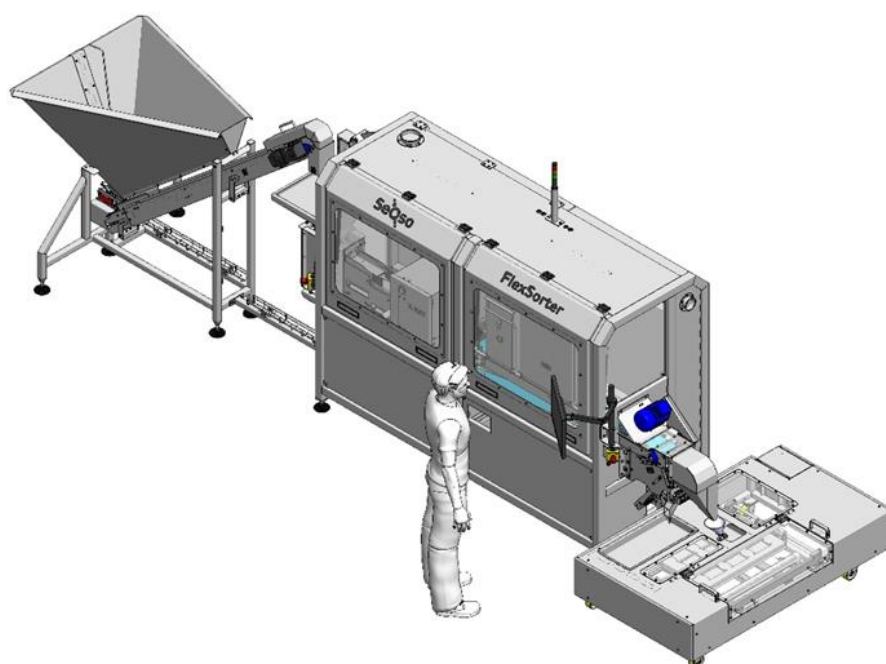
Ve **druhé etapě** byla kvalita algoritmu testována na sadě cca 5000 semen odebraných bez jakékoliv úpravy z oddílu č. 91/2024. Ověřování kvality algoritmu bylo provedeno s pomocí pomalejšího experimentálního třídíče, který umožňoval dobré sledování celého procesu třídění včetně záznamu snímků jednotlivých semen. Třídění probíhalo poměrně pomalu, rychlostí cca 6 semen za minutu.



Obrázek 15. Laboratorní třídič využitý pro zkušební třídění semen jedle a ověření kvality třídícího algoritmu. A - celkový pohled na třídič, B – zásobník tříděných semen a podavač na pohyblivý pás, C – koncová rozdělovací část, nerozpoznaná semena padají do nádoby na konci pásu a vrací se do třídění.

Rychlost třídění zejména limitovala nerovnoměrná distribuce semen na pásový dopravník stroje v důsledku lepivosti povrchu semen. Semena v těsné blízkosti, bez dostatečného odstupu na pásu, systém nedokázal roztřídit a vracela se zpět mezi neroztřídná, což výrazně snižovalo rychlost třídění, přestože průchod strojem byl relativně rychlý. Po skončení této etapy byla semena roztřídná do dvou kategorií (zdravá a vadná) opět šetrně přepravena do ČR k dalším testům.

Ve **třetí etapě** byl menší vzorek semen testován na nově vyvinutém modelu třídiče, který prakticky prokázal schopnost třídění semen jedle bez technických potíží rychlostí 20 semen za sekundu (Obr. 16). Tento nový model třídiče byl uveden na trh na začátku července 2025, takže první testy pro tuto dílčí zprávu byly provedeny na vývojově starším laboratorním stroji. Nový třídič je tedy nyní komerčně dostupný a finanční kalkulace uvedené v této zprávě jsou spojeny právě s informacemi, které se k tomuto třídiči podařilo získat.



Obrázek 16. Moderní tříděč schopný využívat několik různých snímacích technologií, mimo jiné také RTG snímání.

2.7. NÁSLEDNÉ TESTOVÁNÍ ROZTRÍDĚNÝCH SEMEN

V dalším období byla ověřována kvalita třídění. Nejčastější vadou zjištěnou u semen jedle byla vada „Prázdné semeno“. Tato vada se může v některých oddílech vyskytovat až u 50 % semen, protože semena s touto vadou je velmi obtížné vytrítit běžně používanými třídícími metodami. Výskyt nesprávně zařazených semen ve vytríděném materiálu byl následně ověřen pomocí přístroje Kubtec Parameter X-Ray cabinet na pracovišti Semenářského závodu. Na snímcích získaných z tohoto přístroje byl vizuálně spočítán celkový počet semen a počet semen, která byla špatně zařazena do dané kategorie (tj. v kategorii „Zdravá“ byla spočítána semena s jiným než normálním vzhledem, v kategorii „Vadná“ byla spočítána semena s normálním vzhledem). Následně byla vypočtena úspěšnost třídění jako procento správně vytríděných semen (tab. 34).

Tabulka 34. Množství semen ve skupinách vytríděných pomocí komerčního třídíče a úspěšnost třídění. Celkem bylo roztríděno 4046 semen z toho bylo 52 % zdravých (2119 ks) a 48 % vadných (1927 ks).

Kategorie vytríděných semen	Celkový počet semen	Počet špatně vytríděných semen	Úspěšnost třídění (%)
Zdravá	2119	58	97
Vadná	1927	90	95

Oba soubory semen (zdravá i vadná) byly ihned po snímkování na RTG přístroji zaslány na testování klíčivosti dle ČSN do VÚHLM (tab. 35). Současně byl na testování zaslán i nevytríděný oddíl semen, aby byla získána aktuální klíčivost celého oddílu.

Tabulka 35. Výpis parametrů z výsledků zkoušek kvality dle ČSN pro roztríděná (Zdravá a Vadná) a neroztríděná semena z použitého oddílu.

Kategorie semen	Datum ukončení testu	Klíčivost (%)	Mrtvá semena (%)	Svěží semena (%)	Semena napadená hmyzem (%)	Prázdňá semena (%)	Klíčivost plných semen (%)
Zdravá	24.6.2025	55	23	20	0	2	77
Vadná	24.6.2025	5	7	0	1	87	38
Neroztríděný oddíl	24.6.2025	31	11	11	1	45	76

2.8. EKONOMICKÁ HODNOCENÍ TŘÍDĚNÍ SEMEN DŘEVIN POMOCÍ RTG DETEKCE

Pro vlastní hodnocení ekonomických přínosů třídění pomocí RTG detekce byly uvažovány tři možné varianty využití této technologie pro třídění osiva jedle vyráběného v semenářském závodě. Jednalo se o varianty nákupu třídíče, pronájmu třídíče a třídění osiva formou služby u výrobce. Kromě těchto hlavních ekonomických modelů je třeba brát do úvahy další předpoklady úspěšné návratnosti investice do třídíče, jak je uvedeno v následující kapitole.

2.8.1. Další předpoklady úspěšné návratnosti investice do třídiče

Úspěšnost třídění a zvýšení kvality osiva

Důležitou podmínkou vysoké ziskovosti z prodeje vytríděného osiva jedle je, aby bylo dosaženo vysoké klíčivosti vyrobených semen. Ta je závislá jednak na kvalitě vytrídění prázdných semen, ale také na klíčivosti semen plných. Na základě testů klíčivosti osiva jedle prováděných v průběhu práce na zakázce, klíčivost většiny zkoumaných oddílů po úspěšném vytrídění prázdných semen by skutečně reálně mohla dosahovala 80 % a více, jak vyplývá z tabulky 38.

Tabulka 38. Vybrané údaje z testů klíčivosti prováděných na zkoumaných oddílech jedle podle ČSN ve VÚLHM. Klíčivost plných semen je typicky velmi vysoká a efektivní odstranění prázdných semen by klíčivost mohlo u vybraných oddílů zvýšit nad 80 %.

Oddíl	Rok testu	Klíčivost celého oddílu (%)	Prázdná semena (%)	Klíčivost plných semen (%)
235/22	2023	62	33	99
233/23	2025	52	28	83
174/22	2024	46	38	85
207/22	2025	43	38	79
157/22	2025	34	47	77

Provozní kapacita třídiče a její využití

Další důležitou podmínkou návratnosti investice, je dostatečná rychlost třídění semen na třídiči, která minimálně umožní zpracování celkového množství semen sklizených v daném kalendářním roce. Semenářský závod ročně vyrobí v průměru 1378 kg osiva jedle. Při provozu třídiče pracujícího maximální rychlostí 20 semen/s, po 6 h za den bude možné zvládnout třídění tohoto množství osiva za 67 pracovních dnů, tedy jen za 27 % z celkové roční pracovní kapacity třídiče v jednosměnném provozu. Poměrně velká pracovní kapacita třídiče může být tedy využita pro třídění semen jiných druhů, případně ji lze nabídnou formou služby externím subjektům. Tyto aktivity zajistí rychlejší návratnost investice do třídiče.

Souhrn závěrů z OV2

V průběhu řešení se podařilo získat kvalitní informace o četnosti vad zjistitelných pomocí RTG snímání a také významnost dopadu takto zjištěných vad na klíčivost semen.

Vady s nejvyšší četností zjištěné u **borovice** neměly příliš vysoký dopad na klíčivost. Vada praskliny v osemeni měla naopak vysoký dopad na klíčivost a je dobře identifikovatelná jako znak pro třídění, avšak její četnost výskytu byla jen kolem 5 %. Naopak nejčastější vada “Nezřetelné embryo” byla na určení velmi obtížná.

V případě osiva **smrku** bylo zjištěno velké množství vad s vysokou četností a současně velkým dopadem na klíčivost. Jako znak pro třídění lze určitě doporučit pět nejčastěji zastoupených vad a jejich kombinací.

U semen **buku** bylo zjištěno velké množství vad a zejména pět nejvíce četných doporučujeme využít jako znaky pro třídění i vzhledem k jejich vysokému dopadu na klíčivost.

Semena **dubu** vykazovala malý počet vad i jejich kombinací. Dvě nejčastěji zastoupené vady měly současně největší dopad na klíčivost přesahující 70 %, takže jsou velmi vhodnými znaky pro třídění tohoto osiva.

Douglaska vykazovala celou řadu vad a jejich kombinací zjistitelných RTG detekcí. Většina z nich měla dopad na klíčivost větší než 50 %, a jsou tedy užitečnými znaky pro třídění.

V případě **jedle** byl zjištěn poměrně velký počet prázdných semen, která se nepodařilo vytřídit jinými technikami. Identifikace této vady je velmi jednoznačná. Druhý typ vady s velkou četností, nezřetelné embryo, má také velký dopad na klíčivost, ale strojová identifikace této vady může být problematická.

Identifikace přítomnosti vad s pomocí přístroje pro jednoduché RTG snímání osiva a katalogu vad je užitečná, zejména pro rychlou a jednoduchou kontrolu kvality osiva daného oddílu. Jak se však ukázalo v další fázi řešení zakázky, příprava algoritmu třídiče probíhá jiným způsobem, než přesným výběrem a učením typických vad osiva. Propojení schopností strojového učení moderních třídících systémů a následného přesného testování klíčivosti snímkaného osiva umožňuje dále zkvalitnit třídící algoritmus a obohatit ho o znaky, které jsou běžným pozorováním obtížně identifikovatelné.

Ekonomické modely nasazení třídiče v praxi dokládají, že využití třídiče na principu RTG detekce pro třídění semen lesních dřevin může být ekonomicky přínosné. Ukázalo se, že i při využití třídiče pro výrobu pouze jednoho druhu kvalitního osiva s potenciálně vysokou cenou na trhu může být návratnost investice rychlá, výrazně rychlejší, než je odpisová doba stroje.

V případě variant třídění osiva formou služby a pronájmu třídiče z kalkulace vyplynulo, že jsou vhodné pouze pro výrobu osiva určeného pro přesné síje do sadbovačů s vysokou prodejní cenou. Třídění osiva pro síje na záhony je vzhledem k vysokým nákladům na třídění ekonomicky nevýhodné.

3. SPLNĚNÍ PLÁNOVANÝCH DÍLČÍCH CÍLŮ DLE ZADÁNÍ PROJEKTU

OV1: Cílem první části tohoto projektu bylo zjištění významnosti vztahu mezi poklesem klíčivosti v průběhu skladování semenného materiálu a počátečním obsahem chlorofylu v tomto materiálu.

V období vymezeného pro řešení projektu nebyla na základě shromážděných dat u osiva dřevin, které byly předmětem zakázky, potvrzena existence závislosti mezi obsahem chlorofylu a poklesem klíčivosti osiva v čase. Tento závěr je relevantním výstupem dílčího cíle, který tím byl splněn.

OV2: Cílem bylo ověřit možnosti hodnocení vad semen pomocí RTG paprsků a třídění semen pomocí RTG paprsků.

U semen všech zkoumaných druhů se podařilo vytvořit katalog detailně popsaných vad ovlivňujících klíčivost osiva a zjistitelných pomocí RTG snímků. Výskyt a dopad vad na klíčivost byly také přesně kvantifikovány. Úspěšné bylo také modelové třídění semen jedle na komerčně prodávaném třídíči. Připravena byla také ekonomická kalkulace praktického nasazení třídíče. Dílčí cíle této části projektu byly tedy také splněny.

4. UPLATNĚNÍ VÝSLEDKŮ VÝZKUMU V PRAXI

OV1

Po získání delší časové řady údajů z nově sklizených oddílů osiva bude pravděpodobně možné jednoznačně potvrdit nebo vyvrátit hypotézu o vlivu zvýšeného obsahu chlorofylu na klíčivost semen dřevin. Sběr těchto údajů nepředstavuje pro Semenářský závod Týniště velkou pracovní zátěž a větší datová sada může dát v budoucnu odpověď na otázku, jestli je potřebné se obsahem chlorofylu v semenech dále zabývat v semenářské praxi.

OV2

Výsledky získané v tomto projektu ukazují výborné uplatnění třídiče na principu RTG detekce pro třídění semen řady druhů. Ekonomická kalkulace provozu ukazuje na příkladu semen jedle významné ekonomické přínosy zavedení této metody třídění v Semenářském závodu Týniště.

5. PUBLICITA PROJEKTU

V souvislosti s řešením projektu vytvořila na ÚEB MU Mgr. Jana Brabcová diplomovou práci s názvem: „Analýza možného negativního vlivu zvýšeného obsahu chlorofylu v semenech stromů na jejich klíčivost“ ve které rozpracovala zejména metodiku stanovení obsahu chlorofylu v semenech dřevin a formou rešerše představila známé důsledky zvýšeného obsahu chlorofylu na klíčivost semen.

V přípravě je rukopis článku zaměřeného na metodiku stanovení obsahu chlorofylu v semenech lesních dřevin. Kombinuje metody indukované fluorescence chlorofylu a extrakce chlorofylu ze semen pomocí extrakčních činidel a stanovení chlorofylu v extraktu pomocí spektrofotometrických metod.

6. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

OV1

Vzhledem k dlouhodobému charakteru zkoumaných změn a krátkému času na řešení projektu nebylo možné existenci hledaného vztahu u dřevin jednoznačně vyloučit nebo prokázat. Tento vztah však byl v minulosti pozorován u některých druhů bylin. Otázka možného vlivu obsahu chlorofylu v semenech dřevin na jejich klíčivost je tedy relevantní a zůstává vzhledem ke krátké době sledování stále otevřená. Doporučujeme proto Semenářskému závodu v Týništi pokračovat v pravidelném sledování parametrů fluorescence chlorofylu nově sklizených oddílů u vybraných druhů osiva a v budoucnosti výsledky tohoto výzkumu dále zpřesnit doplněnými údaji.

OV2

Analýza provedená v tomto projektu jednoznačně ukázala velký potenciál uplatnění třidiče na principu RTG detekce pro třídění semen lesních dřevin. Ekonomické přínosy zavedení této metody třídění v Semenářském závodu Týniště jsou také nepochybné, přestože mohou být ovlivněny aktuální situací na trhu s vysoce kvalitním osivem pro moderní technologie přesného setí. Vzhledem k rychlosti třídění, může být třidič využíván k třídění osiva jiných druhů z produkce semenářského závodu. Kromě výroby vysoce kvalitního osiva, může RTG třídění také pomoci se zvýšením kvality těch oddílů, jejichž klíčivost je na hranici nebo pod hranicí potřebnou pro prodej, a zajistit tak bezproblémovou obchodovatelnost méně kvalitních oddílů.

Další možností pro urychlení návratnosti investice je zakázkové třídění semen pro jiné výrobce v období volné kapacity třidiče. Jak je zřejmé z druhé modelové kalkulace, i náklady na třídění formou služby mohou být pro některé výrobce osiva (a jejich zákazníky) přijatelné a představuje tedy ekonomicky zajímavé řešení zvýšení kvality osiva. Maximalizace využití provozního času třidiče i zakázkovou činností je ekonomicky reálné a může dobu návratnosti investice dále zkrátit

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Odkazy na literaturu

- Allorent, G., Osorio, S., Ly Vu, J., Falconet, D., Jouhet, J., Kuntz, M., Fernie, A. R., Lerbs-Mache, S., Macherel, D., Courtois, F., & Finazzi, G. (2015). Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 205(2), 707–719. <https://doi.org/10.1111/nph.13044>
- Arkhipov, M., Priyatkin, N. S., Guskova, L. P., Potrakhov, N. N., Gryaznov, A. Y., Bessonov, V. B., Obodovskii, A., & Staroverov, N. E. (2019). X-Ray Computer Methods for Studying the Structural Integrity of Seeds and Their Importance in Modern Seed Science. *Technical Physics*, 64(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1134/S1063784219040030>
- Arkhipov, M. V., Priyatkin, N. S., Guskova, L. P., Karamysheva, A. V., Trofimuk, L. P., Potrakhov, N. N., Bessonov, V. B., & Shchukina, P. A. (2020). Microfocus X-Ray Method for Detecting Hidden Defects in Seeds of Woody Forest Species and Other Types of Vascular Plants. *Technical Physics*, 65(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1134/S1063784220020024>
- Bruggink, H., & van Duijn, B. (b.r.). X-ray Based Seed Analysis. *Seed Testing International*, 2017, 6.
- Bulda, O. V., Rassadina, V. V., Alekseichuk, H. N., & Laman, N. A. (2008). Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(4), 544–551. <https://doi.org/10.1134/S1021443708040171>
- Clerkx, E. J. M., Vries, H. B.-D., Ruys, G. J., Groot, S. P. C., & Koornneef, M. (2003). Characterization of green seed, an Enhancer of *abi3-1* in *Arabidopsis* That Affects Seed Longevity. *Plant Physiology*, 132(2), 1077–1084. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022715>
- Costa, D. S., Kodde, J., & Groot, S. P. C. (2014). Chlorophyll fluorescence and X-ray analyses to characterise and improve paddy rice seed quality. *Seed Science and Technology*, 42(3), Art. 3. <https://doi.org/10.15258/sst.2014.42.3.11>
- Dalgleish, H. J., Shukle, J. T., & Swihart, R. K. (2012). Weevil seed damage reduces germination and seedling growth of hybrid American chestnut. *Canadian Journal of Forest Research*, 42(6), 1107–1114. <https://doi.org/10.1139/X2012-067>
- Deleuran, L., Olesen, M., & Boelt, B. (2013). Spinach seed quality: Potential for combining seed size grading and chlorophyll fluorescence sorting. *Seed Science Research*, 23. <https://doi.org/10.1017/S0960258513000202>
- Dell'Aquila, A., Schoor, & Jalink, H. (2002). Application of chlorophyll fluorescence in sorting controlled deteriorated white cabbage (*Brassica oleracea* L.) seeds. *Seed Science and Technology* 30 (2002). - ISSN 0251-0952, 30.
- Dell'Aquila, A. (2007). Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. *Seed Science and Technology*, 35(3), Art. 3. <https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.3.01>
- Dell'Aquila, A. (2009). Development of novel techniques in conditioning, testing and sorting seed physiological quality. *Seed Science and Technology*, 37(3), Art. 3. <https://doi.org/10.15258/sst.2009.37.3.10>
- de Medeiros, A. D., Bernardes, R. C., da Silva, L. J., de Freitas, B. A. L., Dias, D. C. F. dos S., & da Silva, C. B. (2021). Deep learning-based approach using X-ray images for classifying *Crambe abyssinica* seed quality. *Industrial Crops and Products*, 164, 113378. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113378>

- Dickson, M. H. (1980). Genetic aspects of seed quality. *HortScience*, 15(6, I), 771–774. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19811602489>
- Fernández-Marín, B., Míguez, F., Méndez-Fernández, L., Agut, A., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., Kranner, I., & Colville, L. (2017). Seed Carotenoid and Tocochromanol Composition of Wild Fabaceae Species Is Shaped by Phylogeny and Ecological Factors. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01428>
- França-Silva, F., Cicero, S. M., Gomes-Junior, F. G., Medeiros, A. D., França-Neto, J. de B., & Dias, D. C. F. S. (2022). Quantification of chlorophyll fluorescence in soybean seeds by multispectral images and their relationship with physiological potential. *Journal of Seed Science*, 44, e202244023. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v44258703>
- Gargiulo, L., Grimberg, A., Repo-Carrasco-Valencia, R., Carlsson, A. S., & Mele, G. (2019). Morpho-densitometric traits for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed phenotyping by two X-ray micro-CT scanning approaches. *Journal of Cereal Science*, 90, 102829. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102829>
- Gomes Junior, F. G., & Cicero, S. M. (2012). X-Ray analysis to assess mechanical damage in sweet corn seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100010>
- Gomes Junior, F. G., Cícero, S. M., Vaz, C. M. P., & Lasso, P. R. O. (2019). X-ray microtomography in comparison to radiographic analysis of mechanically damaged maize seeds and its effect on seed germination. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 41(1), 42608. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v41i1.42608>
- Gomes-Junior, F. G., Yagushi, J. T., Belini, U. L., Cicero, S. M., & Tomazello-Filho, M. (2012). X-ray densitometry to assess internal seed morphology and quality. *Seed Science and Technology*, 40(1), Art. 1. <https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.1.11>
- Goodman, R. C., Jacobs, D. F., & Karrfalt, R. P. (2005). Evaluating desiccation sensitivity of *Quercus rubra* acorns using X-ray image analysis. *Canadian Journal of Forest Research*, 35(12), Art. 12.
- Grulichová, M., Sedlakova, V., Trojan, V., Hanáček, P., & Vyhnánek, T. (2022). Correlation of photosynthetic pigments content with indicators of seed quality in the seeds of carrot, celery, dill, parsley, and parsnip. *Journal of Seed Science*. <https://doi.org/44.10.1590/2317-1545v44260767>
- Himanen, K., Helenius, P., Ylioja, T., & Nygren, M. (2016). Intracone variation explains most of the variance in *Picea abies* seed weight: Implications for seed sorting. *Canadian Journal of Forest Research*, 46(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2015-0379>
- Jalink, H., Schoor, R. van der, Frandas, A., Pijlen, J. G. van, & Bino, R. J. (1998). Chlorophyll fluorescence of Brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. *Seed Science Research*, 8(4), 437–443. <https://doi.org/10.1017/S0960258500004402>
- Karamysheva, A., Trofimuk, L., Priyatkin, N., Arkhipov, M., Gusakova, L., Sshukina, P., Staroverov, N., & Potrakhov, N. (2020). Comparative study of the fullness of dwarf Siberian pine seeds *Pinus pumila* (Pall.) Regel from places of natural growth and collected from plants introduced in northwestern Russia by microfocus X-ray radiography to predict their sowing qualities. *Biological Communications*, 65(4), Art. 4. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2020.403>
- Karunakaran, C., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2004). Detection of internal wheat seed infestation by *Rhyzopertha dominica* using X-ray imaging. *Journal of Stored Products Research*, 40(5), Art. 5. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2003.06.003>

- Kenanoglu, B. B., Demir, I., & Jalink, H. (2013). Chlorophyll Fluorescence Sorting Method to Improve Quality of Capsicum Pepper Seed Lots Produced from Different Maturity Fruits. *HortScience*, 48(8), 965–968. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.8.965>
- Konstantinova, P., Schoor, van den Bulk, R., & Jalink, H. (2002). Chlorophyll fluorescence sorting as a method for improvement of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed health and germination. *Seed Science and Technology* 30 (2002). - ISSN 0251-0952, 30.
- Lanca, L., & Silva, A. (2013). *Digital Imaging Systems for Plain Radiography*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5067-2>
- Lombardo, J. A., & McCarthy, B. C. (2009). Seed germination and seedling vigor of weevil-damaged acorns of red oak. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(8), Art. 8.
- Musaev, F., Priyatkin, N., Potrakhov, N., Beletskiy, S., & Chesnokov, Y. (2022). Assessment of Brassicaceae Seeds Quality by X-ray Analysis. *Horticulturae*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010029>
- Nakajima, S., Ito, H., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2012). Chlorophyll b Reductase Plays an Essential Role in Maturation and Storability of Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology*, 160(1), 261–273. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196881>
- Narvankar, D. S., Singh, C. B., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2009). Assessment of soft X-ray imaging for detection of fungal infection in wheat. *Biosystems Engineering*, 103(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.01.016>
- Ooms, D., & Destain, M.-F. (2011). Evaluation of chicory seeds maturity by chlorophyll fluorescence imaging. *Biosystems Engineering*, 110(2), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2011.07.012>
- Pereira, L. A., de Carvalho, M. L. M., Nery, M. C., & Toorop, P. E. (2014). Embryo morphology indicates physiological maturity better than seed mass in *Syngonanthus elegans* (Eriocaulaceae). *Seed Science and Technology*, 42(2), Art. 2. <https://doi.org/10.15258/sst.2014.42.2.05>
- Pinheiro, D. T., Medeiros, A. D., Zavala-Leon, M. J., Dias, D. C. F. S., & da Silva, L. J. (2020). Physical and physiological quality of *Jatropha curcas* L. seeds at different maturity stages using image analysis. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18(3), Art. 3. <https://doi.org/10.5424/sjar/2020183-16028>
- Pinto, T. L. F., Cicero, S. M., França-Neto, J. B., & Forti, V. A. (2009). An assessment of mechanical and stink bug damage in soybean seed using X-ray analysis test. *Seed Science and Technology*, 37(1), Art. 1. <https://doi.org/10.15258/sst.2009.37.1.13>
- Porsch, F. (2020). Automated seed testing by 3D X-ray computed tomography. *Seed Science and Technology*, 48(1), Art. 1. <https://doi.org/10.15258/sst.2020.48.1.10>
- Silva, V. N., Cicero, S. M., & Bennett, M. (2013). Associations between X-ray visualised internal tomato seed morphology and germination. *Seed Science and Technology*, 41(2), Art. 2. <https://doi.org/10.15258/sst.2013.41.2.05>
- Smolikova, G., Dolgikh, E., Vikhnina, M., Frolov, A., & Medvedev, S. (2017). Genetic and Hormonal Regulation of Chlorophyll Degradation during Maturation of Seeds with Green Embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1993. <https://doi.org/10.3390/ijms18091993>
- Smolikova, G., Kreslavski, V., Shiroglazova, O., Bilova, T., Sharova, E., Frolov, A., & Medvedev, S. (2017). Photochemical activity changes accompanying the embryogenesis of pea (*Pisum sativum*) with yellow and green cotyledons. *Functional Plant Biology*, 45. <https://doi.org/10.1071/FP16379>
- Suhartanto, M. R. (2002). Chlorophyll in tomato seeds: Marker for seed performance? PhD. Thesis, Wageningen university.

- Teixeira, S. B., Silva, J. G. da, Meneguzzo, M. R. R., Martins, A. B. N., Meneghello, G. E., & Tunes, L. V. M. de. (2020). Green soybean seeds: Effect on physiological quality. *Ciência Rural*, 50. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180631>
- van der Burg, W. J., Aartse, J. W., van Zwol, R. A., Jalink, H., & Bino, R. J. (1994). Predicting Tomato Seedling Morphology by X-ray Analysis of Seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(2), Art. 2. <https://doi.org/10.21273/JASHS.119.2.258>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Yuan, T., Wei, Q., Jourdan, P., & Yoo, Y. K. (2021). Germination of *Pulsatilla cernua* var. Koreana Seeds as Influenced by Harvest Dates and Development of Seeds Analyzed by X-ray Imaging. *Hortscience*, 56(4), Art. 4. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15683-20>
- Zappala, S., Helliwell, J. R., Tracy, S. R., Mairhofer, S., Sturrock, C. J., Pridmore, T., Bennett, M., & Mooney, S. J. (2013). Effects of X-Ray Dose On Rhizosphere Studies Using X-Ray Computed Tomography. *PLOS ONE*, 8(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067250>
- Zinsmeister, J., Lalanne, D., Terrasson, E., Chatelain, E., Vandecasteele, C., Vu, B., Dubois-Laurent, C., Geoffriau, E., Signor, C., Dalmais, M., Gutbrod, K., Dörmann, P., Gallardo, K., Bendahmane, A., Buitink, J., & Leprince, O. (2016). ABI5 Is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes. *The Plant Cell*, 28, tpc.00470.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00470>