

1. Úvod

Cílem této práce je otestovat vliv látky denatonium benzoát (komerčně dostupné pod názvem Bitrex) na klíčení osiva jedle bělokoré (*Abies alba*) a smrku ztepilého (*Picea abies*). Tato látka by měla mít repelentní účinky a tedy snižovat škody na sazenicích vzniklé okusem zvěře. Za pomoci jiných látek fungujících jako přenašeče by se denatonium benzoát měl dostat do rostlinných pletiv a zajišťovat tak systémové repelentní působení. Chemickými analýzami bude rovněž ověřeno, zda tato látka dokáže pronikat do rostliny, přes membrány kořenových buněk, případně v jakém množství a jak se dále dokáže šířit v jejích pletivech a tvořit ji tak méně atraktivní pro zvěř.

V našich podmínkách jsou nyní škody působené spárkatou zvěří na rostlinných kulturách velkou ekonomickou, ale i hospodářskou ztrátou, která se v posledních několika desetiletích značně zvyšuje (Havránek et al. 2010; Henderson et al. 2013; Ward et al. 2010; Findo 2012; Wagner, Nolte 2001; Ries et al. 2001). Je zde několik možných řešení této situace, avšak často při nich dochází ke střetu zájmů jednotlivých zúčastněných skupin (Willoughby et al. 2010), proto jde o velmi komplikované téma. Je pravdou, že zvěř do lesa patří (Havránek et al. 2010), ovšem je nutné zohlednit mnoho faktorů, které ovlivňují stanovení jejích počtů, které jsou pro daný ekosystém únosné. Např. Kubíková (2005) uvádí, že současné stavy spárkaté zvěře v naší zemi jsou přibližně 5krát, v některých oblastech České republiky ale až 15krát vyšší než byl původní stav. Jedním z řešení je odlovem snížit současné vysoké stavy zvěře (Havránek et al. 2010; Trent et al. 2001). Na toto řešení jsou však ve společnosti a mezi všemi zúčastněnými stranami značně protichůdné názory.

Na snížení stavů zvěře má zájem mnoho odvětví, jako je například zemědělství, lesnictví, doprava, ochrana přírody a jiné. Každé z odvětví má však jiné požadavky a metody, kterými se snaží dosáhnout svých cílů, a tyto zatím bohužel nejsou v praxi sladěné do jednotné metody, která by komplexně a důsledně omezovala škody zvěří působené (Findo 2012). Společnost i různé zájmové spolky však požadují a preferují metody, které neřeší snížení škod odstřelem zvěře, ale jinými, ke zvěři šetrnými metodami (Trent et al. 2001; Ward et al. 2010; Wagner, Nolte 2001).

Toto je jedna z příležitostí pro uplatnění repelentů k odpuzení zvěře (Levar 2007; Henderson et al. 2013), především pak repelentů se systémovým účinkem, které mají oproti ostatním repelentním přípravkům mnohem delší dobu trvanlivosti (Levar 2007). Podle

některých autorů mají repelenty potenciál zajišťovat ochranu blížící se fyzické bariéře, tedy oplocení (Ward et al. 2010; Bosland, Bosland 2000).

V dnešní době je pro systémovou ochranu lesních dřevin používán pouze jeden komerční repelentní prostředek, a to tablety Repellex®, které se umísťují ke kořenům rostlin (Henderson et al. 2013; Levar 2007). Tento repelent je prodáván pouze v některých státech USA a v Evropě je jen velmi těžko dostupný. Navíc jeho složení je formulováno pro použití na ochranu dřevin pěstovaných v USA, které jsou druhově odlišné od středoevropských dřevin.

Pěstování rostlin pro komerční účely je důležitou částí ekonomiky, a to nejen v zemědělství jako zdroji potravin, ale i při pěstování hospodářských dřevin jako zdrojů dříví (Levar 2007). Proto škody na hospodářských rostlinách často působí značné ekonomické ztráty. Vzhledem k této situaci je již po dlouhou dobu aktuální potřeba vyvinout efektivní a levnou ochranu pro mnoho rostlinných druhů (Levar 2007). Je však třeba stanovit koncentrace a účinnost repelentů tak, aby byly schopny účelně chránit kultury i ušetřit finanční prostředky vynakládané při současném řešení ochrany kultur (Findo 2012), protože pro provozní podmínky je příliš častá aplikace nepřijatelná, ať už kvůli nákladům materiálovým nebo mzdovým. Produkty musí být snadno aplikovatelné, levné a s dlouhodobou účinností.

Z hlediska fyziologie rostlin je nutné si uvědomit, že jde o poměrně velkou část biomasy, kterou býložravci zkonzumují jako potravu, a tudíž rostliny vystavené tlaku zvěře jsou značně omezeny ve svém vývoji nebo až ohroženy na samotné existenci. Například jelen denně zkonzumuje potravu o hmotnosti zhruba 3% svojí tělesné hmotnosti, navíc když je potravy nedostatek, jeleni jsou schopni zkonzumovat skoro každý rostlinný druh (Curtis, Richmond 1994 in Henderson et al. 2013). Poměrně problematickou skutečností je, že jeleni mají při stresu naopak hodně potomků (Jescavage-Berndt 1998 in Henderson et al. 2013), a to ještě zhoršuje současnou situaci, kdy již tak vysoké stavy zvěře se ještě rozšiřují.

Kromě toho, že zvěř působí velké škody na porostech hospodářských dřevin, je skutečností, že zvěř je součástí lesního ekosystému a okus lesních dřevin je přirozenou součástí její potravy. Proto je velký problém určit limit, kdy jde o hospodářsky významnou škodu, která přesahuje přijatelnou míru poškození (Šebeň, Bošela 2012). Velikost škod je však ovlivněna i způsobem obhospodařování lesů, s kterým úzce souvisí jeho úživnost pro zvěř. Přestože lesní porosty s jednoduchou výstavbou jsou vždy zvěří více poškozované, tak v lesních komplexech obecně jsou škody vždy více rozptýlené a méně intenzivní než např. v zemědělství. I tak je v podmínkách střední Evropy poškozen zhruba každý čtvrtý jedinec

obnovy porostů; ve srovnání intenzity škodlivých faktorů má proto zvěř dominantní pozici (Šebeň, Bošela 2012).

Umělá obnova porostů je často spojena s rizikem nezdaru (Gosling, Baker 2004), pomineme – li rizika spojená s klimatickými podmínkami a s fyziologií rostlin, resp. dřevin, je též velkým problémem okus zvěří. Ten je ještě zvýšen tím, že jelení zvěř ve své potravě preferuje rostliny, které byly hnojené (Conover, Kania 1988 in Henderson et al. 2013), což vzhledem k intenzivnímu způsobu pěstování rostlin ve školkách vystavuje nebezpečí vlastně všechny uměle obnovované porosty. Ať už jde o zvěř spárkatou či drobné hlodavce škodící na sazenicích a semenech, platí, že střelba, odchyt nebo trávení problémových druhů sice rychle a ihned redukuje populační hustotu, ale jen když se praktikuje pečlivě a selektivně – to je často drahé, ne vždy legální, efektivní, humánní a někdy to i vyvolává konflikty s ostatními uživateli lesa (Trent et al. 2001).

Atraktivita rostlin pro okus zvěří se mění i v průběhu roku, například některé dřeviny jsou na jaře po období dormance pro zvěř mnohem více atraktivní než jiné druhy (Trent et al. 2001). Škody takto způsobené na počátku vegetačního období jsou velmi závažné, protože při ztrátě pupenů dochází k zásadnímu snížení přírůstu a často i k deformaci růstu. Škody způsobené zvěří jsou tedy často limitujícím faktorem obnovy, a to umělé i přirozené (Ward et al. 2010; Trent et al. 2001; Šebeň, Bošela 2012). Nejinak je tomu i v některých zahraničních zemích, kde navíc můžeme zjistit i snahy o ochranu semen před jejich predátory (Willoughby et al. 2010; Gosling, Baker 2004) nebo ochranu sazenic před hlodavci (Wittmer et al. 1998; Curtis et al. 2000), a to za pomoci repelentů se systémovým účinkem.

2. Literární přehled

2.1 Repelentní přípravky

Repelentní látky různých druhů, jako součást chemické obrany proti škůdcům, jsou používány již po dlouhou dobu. Jejich aplikace je ale poměrně náročná na čas i finance a výsledek není vždy jistý. Proto je v současnosti zájem na dalším rozvoji nové metody, kterou je systémová ochrana rostlin (Systematic plant protection) (Levar 2007; Henderson et al. 2013). Stanovení parametrů účinných látek repelentů je velmi složité, především proto, že odpudivost repelentů závisí na mnoha faktorech, které částečně můžeme nebo nemůžeme ovlivnit, a proto je ochrana repelenty vždy s určitou měrou náchylná k neúspěchu (Trent et al. 2001). To, jestli se budou cílové druhy vyhýbat ošetřeným rostlinám, záleží především na počtu a denzitě zvěře, pohyblivosti problémových druhů zvěře, prvotních zkušenostech zvířat s potravou a jejich obeznámení s okolím, dostupnosti alternativních míst k pobytu, dostupnosti alternativní potravy, chuti a možnosti pozření ošetřených rostlin (resp. koncentrace účinných látek v nich obsažených) a v neposlední řadě i na klimatických podmínkách (Ober, Kane 2012; Trent et al. 2001).

Chemické repelenty se obecně dělí na pachové, chuťové a strach evokující repelenty. Často však jednotlivé přípravky využívají kombinaci druhů repelentních látek najednou. Pachové repelenty užívají látek, které zvěři nepříjemně zapáchají a tím ji odpuzují. Chuťové repelenty, kam patří veškeré repelenty obsahující denatonium benzoát nebo kapsaicin, působí zvěři při požití nepříjemnou chuť nebo nepříjemné pocity (horko, pálení apod.). Mezi strach evokující repelenty patří například prostředky obsahující moč predátorů, které využívají přirozených instinktů zvěře nezdržovat se v blízkosti predátora. Chuťové repelenty se většinou aplikují přímo na rostliny a nazývají se kontaktní (Ober, Kane 2012). Repelenty tak jsou většinou složitou směsí mnoha chemických nebo přírodních látek, které se vzájemně doplňují při tvorbě účinku proti škůdci, neboť jak dodává Find'o (2010) zatím neexistuje repelent jen s jednou chemicky čistou, přírodní nebo syntetickou účinnou látkou.

Dnes je dostupných mnoho repelentů, avšak neexistuje porovnání jejich účinnosti (Trent et al. 2001). A jak tento autor dodává, i při registraci někdy není nutné porovnání účinnosti prostředku. Některé repelenty tak mohou obsahovat aktivní přísady s koncentrací nedosahující prahových hodnot, jiné mohou obsahovat přísady, které nechrání přímo cílové druhy (Trent et al. 2001). Repelenty proti jelenovitým většinou počítají s tím, že zvěř se

instinktivně vyhýbá místům, kde cítí nebezpečí nebo je má spojena s nepříjemnou chutí či nepříjemnými pocity (Ober, Kane 2012; Trent et al. 2001; Wright, Milne 1994; Bosland, Bosland 2000). Repelenty navozující strach nebo pocit nebezpečí mají většinou složku s obsahem síry, emitující zápach, který ve svém okolí přirozeně zanechává predátor. Obsahují např. moč predátora nebo různé bílkoviny (Ober, Kane 2012, Trent et al. 2001). U herbivorů pak přítomnost těchto látek indikujících pohyb predátora v okolí navozuje obavy a zvěř se v těchto místech nezdržuje. Chuťové repelenty využívají hořkých, pálivých nebo jinak nepříjemně chutnajících látek. Jejich složení má za úkol při pozření rostlinných pletiv zvěři vyvolávat nepříjemné chuťové pocity. Jsou založeny na skutečnosti, že zvěř obvykle nežere mnoho potravy, která je spojena s asociací špatné chuti nebo nepříjemných pocitů. Základní problém při užívání chuťových repelentů je, že jsou univerzálně averzivní pro všechny savce (Trent et al. 2001). Tento autor však dochází k závěru, že všežravci se za normálních podmínek vyhýbají hořkým chutím, zatímco býložravci jsou v tomto směru obecně indiferentní, alespoň při koncentracích používaných řadou repelentů. Oproti tomu je příkladně kapsaicin averzivní jak pro masožravce tak i pro býložravce (Find'ò 2010) a je tedy vhodnou účinnou látkou do repelentních přípravků. Užití chemikálií jako savčích a ptačích repelentů je předmětem mnoha studií už od čtyřicátých let minulého století a od té doby bylo zkoušeno mnoho tisíc látek. Některé práce ale naznačují, že prozatím nebyl vyvinut repelent, který by snížil predaci a nepoškodil přitom příliš rostlinu (Willoughby et al. 2010). Přestože zvyšování koncentrace účinných látek snižuje škody okusem, tak bohužel vysoké koncentrace naopak poškozují rostliny i regeneraci celých porostů (Baker et al. 1999). Jako nejefektivnější repelenty se obecně ukazují repelenty založené na extraktech z vajec, kterým je např. Big Game Repellent (Ward, et al. 2010). I když je efektivita repelentů značně variabilní, mnoho prací prokazuje jejich úspěšné použití (Baker et al. 1999).

Účinnost repelentů se může měnit i v průběhu roku, Conover (1987 in Bosland, Bosland 2000) uvádí, že efektivita repelentů proti jelenům přes zimu poklesla, a to i navzdory opakované aplikaci. To však může souviset spíše s dostupností potravy (Curtis, Richmond 1994 in Henderson et al.2013).

I migrace někdy může působit problémy s efektivitou repelentů, protože u některých migrujících druhů nemusí repelenty dosahovat stejných výsledků jako u místních druhů zvěře (Trent et al. 2001). Rovněž je velmi těžké předem určit efektivitu v polních testech pouze na základě extrapolace laboratorních dat (Trent et al. 2001). Pro své výhody, i přes své nevýhody, se repelenty v poslední době dostaly na přední místo v oblasti ochrany rostlin a to nejen u nás, ale i v zahraničí (Find'ò 2012).

2.2 Systémové repelenty

Systémová ochrana rostlin (Systemic plant protection) je nedávno objevenou metodou na ochranu rostlin, která je založena na absorbování účinných látek rostlinou. Ta je za určitých podmínek schopna tyto přijmout a dále šířit po svých pletivech a též je šířit i do nově vznikajících pletiv (Levar 2007; Henderson et al. 2013). Systémové repelenty jsou založeny na schopnosti rostliny začlenit účinné látky přímo do svých pletiv (Levar 2007; Trent et al. 2001; Henderson et al. 2013). Nemohou tak být smyty deštěm ani ovlivňovány klimatickými podmínkami jako kontaktní repelenty a trvání účinku by mělo být mnohem delší. To řeší poměrně zásadní problém klasických repelentů, kterým je krátká trvanlivost (Ries et al. 2001)

V systémové ochraně rostlin se užívá mnoho látek, avšak jejich podstata je obdobná. Vždy jde o kombinaci aktivní látky a pomocných komponentů, které umožňují absorpci účinné látky do rostliny a její následnou translokaci, která zajišťuje šíření do všech pletiv dané rostliny (Levar 2007). Účinné látky se dokáží efektivně začlenit do rostliny a rozptýlit po celém rostlinném organismu (Levar 2007; Henderson et al. 2013) v koncentracích, které jednak působí odpudivě a jednak na rostlinu nepůsobí škodlivě (Levar 2007; Trent et al. 2001), nebo by alespoň podle současných dostupných informací škodlivě působit neměly. Jejich vznik a vývoj byl motivován snahou překonat problém s nutností časté a opakované aplikace účinných látek tím, že účinné látky budou integrovány do rostliny, a to buď absorpcí přes kořeny nebo olistění (Ward et al. 2010; Levar 2007; Henderson et al. 2013). Jednou z možností aplikace účinných látek je zálivkou, Levar (2007) uvádí, že bez ztráty jakýchkoliv pozitivních účinků použitých látek. Rozptýlení účinné látky po celém rostlinném organismu je velmi důležité např. při ochraně před drobnými hlodavci, kteří škodí nejen na prýtu, ale i na podzemních částech rostlin (Witmer et al. 1998). Komponenty zahrnují pomocné látky a rozpouštědla, které jsou schopny účinnou látku (exogenní sloučeninu) šířit půdou a následně umožní její vniknutí do rostliny přes kořeny a další šíření uvnitř v rostlině. Bez nich by rostlina nebyla tyto cizí látky schopna přijmout. (Hendersom et al. 2013; Levar 2007).

Systémová ochrana má mnohostranné využití. Lze ji využít především k zabránění škod na rostlinách působených okusem, pro odpuzení škůdců, jako hmyzí repelent nebo například ke zlepšení zdravotního stavu rostlin (Levar 2007), záleží na tom, jaké látky se podaří úspěšně začlenit do rostlinných pletiv. Tato metoda je však omezena pouze na rostliny, které nejsou určeny pro potravinářské využití, jako jsou lesní sazenice, okrasné rostliny, květiny a obecně všude, kde nehrozí, že rostlina bude použita jako potravina (Levar 2007). Bohužel z mnoha studií vyplývá, že žádný z testovaných repelentů obsahujících denatonium

benzoát nebo kapsaicin nechrání rostlinu na sto procent (Ward et al. 2010; Trent et al. 2001; Henderson et al. 2013). I u tablet Repellex® se někdy vyskytují potíže s nedostatečnou ochranou (Henderson et al.; Trent et al. 2001; Ward et al. 2010), možná proto, že obecně lepších výsledků dosahují repelenty s častější aplikací (Ward et al. 2010), to je však pro běžný provoz neakceptovatelné. Komerčně dostupný repelent se systémovým účinkem je v současnosti prakticky jen Repellex® systémové tablety (Henderson et al. 2013; Levar 2007)

2.3 Systémové tablety Repellex®

Levar (2007) uvádí, že systémové tablety Repellex® jsou účinnou ochranou rostlin před okusem a zároveň nemají žádné toxické vlivy na rostlinu. Účinné i transportní látky užívané v systémové ochraně rostlin jsou mimo jiné uznány i FDA (správa pro potraviny a léky). Tyto látky jsou užívány též v kosmetice, přípravcích pro osobní péči a zdravotnických produktech (Levar 2007). Protože účinné látky jsou v přírodních podmínkách pro rostlinu nevstřebatelné, využívá se pomocných látek, které v rostlině působí tak, aby ta byla schopna dané látky přijmout. V daném produktu je užitá formulace účinné látky a dvou nebo více osmolytických nosičů, které mají za úkol zvýšit hodnotu účinných látek nad hodnotu v rostlině se přirozeně vyskytující (Levar 2007; Trent et al. 2001).

K účinným látkám se často přidávají pomocné látky ke zvýšení účinnosti, jak je tomu například u různých druhů pesticidů. Pomocné látky jsou většinou smáčeující přísady, látky pro podporu šíření účinných látek v rostlině, emulgátory, pěnové látky, penetranty, zahušťovadla nebo výplňové látky (Levar 2007). Jejich úkolem je zajistit absorpci a následné rozptýlení účinné látky po celé rostlině, čímž se stane neatraktivní pro zvěř (Henderson et al. 2013; Levar 2007; Wagner, Nolte 2001). V přípravku Repellex® se užívají dvě pomocné látky, a to tak, že jedna zajišťuje průchod účinných látek z půdy do kořenů a druhá dále zajišťuje pohyb látky v rostlině (Levar 2007; Henderson et al. 2013). Začleněním účinných látek lze zvýšit účinek na 10%, 100%, 1000% i více oproti hodnotám vyskytujícím se v rostlině přirozeně (Levar 2007). Jako spolehlivé pomocné látky se používají: EDTA (kyselina ethylendiamin-tetraoctová) jako chelatační pomocná látka, DMSO (dimethylsulfoxid) jako rozpouštědlo nebo osmolyt, ALS (1,2-dihydroxyantrachinin-3-sulfonová kyselina) jako transportní látka nebo detergent (povrchově aktivní látka), BABA jako růstový hormon, BTH (S-methylbenzo(1,2,3)thiadiazolo-7-karbothioát), pak jako transportní látka (Levar 2007).

Osmolitický nosič je zásadní látkou, která má za úkol upravit poměry v osmotické membráně v cílové rostlině, aby ta byla schopna přijmout větší množství účinné látky. Jako látky považované za úspěšné chuťové repelenty proti okusu se v systémové ochraně rostlin používají především denatonium benzoát nebo kapsaicin (Levar 2007; Bosland, Bosland 2000; Trent et al. 2000; Willoughby et al. 2010; Witmer et al. 1998; Ward et al. 2010; Wagner, Nolte 2001).

Podle výrobce je aplikace přípravku Repellex® velmi jednoduchá a vzhledem k tomu, že účinná látka je absorbována do rostliny přes kořeny a dále je rozvedena po celé rostlině, zajišťuje dlouhodobé řešení ochrany (Levar 2007). Tablety Repellex® jsou vhodné pro nově vysazované i stávající starší rostliny. Aplikace probíhá umístěním tablet ke kořenům vysazovaných rostlin zhruba 5 až 8 cm pod kořenový krček (Wittmer et al. 1998) nebo ke kořenům stávajících rostlin (Trent et al. 2001). Počet tablet výrobce stanovil podle parametrů rostliny, konkrétní počty, které výrobce doporučuje jsou uvedeny v příloze. Při umístění je nutné zajistit dobrý kontakt tablet s kořeny, proto je také možné je umisťovat i do výsadbových kontejnerů (Levar 2007; Henderson et al. 2013). Po umístění tablet vlhkost umožní absorpci aktivní látky a její rozptýlení po celé rostlině v průběhu 5 – 6 týdnů (Levar 2007). Aktivní látka zůstane u většiny jednoletých i víceletých rostlin po celou sezónu a více jak dva roky u stále zelených okrasných rostlin. Protože tableta potřebuje několik týdnů, aby byla plně efektivní, po tuto dobu se může užít repelentní spray, Repellex liquid®, pro dočasnou ochranu olistění (Henderson et al. 2013). Systémové tablety dokáží efektivně působit dlouhou dobu, výrobce zaručuje účinnost na dvě sezóny, Ward et al.(2010) uvádí až tři roky.

2.4 Denatonium benzoát

Denatonium benzoát je chemická látka komerčně dostupná pod názvy Bitrex, Bitrexene® (Kaukeinen, Buckle 1992, Henderson et al. 1998) a nebo i pod jinými staršími názvy jako je vilex či aversion apod. Byla objevena v roce 1958 (Henderson et al. 1998). Je to nejvíce hořká člověku známá látka (Kaukeinen, Buckle 1992, Henderson et al. 1998), takže má velký potenciál pro použití v repelentech a prostředcích určených k zabránění požití některých toxických látek (Henderson et al. 1998). Plný název této chemické sloučeniny je Benzyldiethyl-N-2,6-xylyl-carbamoyl-methyl-amonium benzoát (Anonymus 1997). Její che-

mická struktura je v příloze na obr. č. 1. Molekulový vzorec je $C_{28}H_{34}N_2O_3$ (Anonymus 2010). Rozpustnost ve vodě při teplotě $20^{\circ}C$ je $45g.l^{-1}$ (Anonymus 2010).

Její přítomnost je patrná i ve velmi malém množství. Průměrný člověk detekuje koncentraci už 10 ppm a hořkou chuť dokonale rozpozná při koncentraci 50 ppm (Kaukeinen, Buckle 1992). Pro své vlastnosti se užívá např. k denaturaci lihu. V této oblasti je používaná už od sedmdesátých let 20. století v koncentraci 6 až 10ppm (Kaukeinen, Buckle 1992; Henderson et al. 1998). Dále je užívána v chemickém a drogistickém průmyslu jako přísada do čistících prostředků, desinfekcí, pracích prostředků a obecně tam, kde je třeba zabránit požití škodlivých látek (Kaukeinen, Buckle 1992; Henderson et al. 1998; Skolil 2012). Rovněž se nezřídka užívá v průmyslu automobilových kapalin jako zhořčující přísada dodávající hořkou chuť kapalinám určeným k ostříkování skel (Skolil 2012). Je hojně užívaná též proto, že studie prokázaly její nízkou toxicitu pro savce, LD50 je 584 mg/kg (Timm 2005 in Willoughby et al. 2010). LD 50 pro dospělého potkana při orálním podání má hodnotu $612mg.kg^{-1}$ (Anonymus 2010). Vzhledem k těmto dávkám a především pro velmi vysokou hořkost je dosti nepravděpodobné, aby zvíře zkonzumovalo letální dávku (Witmer et al. 1998). V chemickém a drogistickém průmyslu se obvykle používá v hodnotě 6-50 ppm (Kaukeinen, Buckle 1992). Podle (Henderson et al. 1998) dokonce jen v rozmezí 10-30 ppm. Přesná dávka vždy závisí na povaze produktu, do kterého se přidává. Její hořká chuť je způsobena molekulární strukturou s oddělitelnou zvlášť nabitou součástí, která silně působí na chuťové receptory (Kaukeinen, Buckle 1992). Chemicky je příbuzná přírodní hořké substanci chininu (Kaukeinen, Buckle 1992).

Toxikologické testy dochází k závěru, že pro člověka není mutagenní, dráždivá a ani její vdechování nevádí (Kaukeinen, Buckle 1992). V popisu standardních vět o nebezpečnosti je denatonium benzoát popsán takto: H302 Zdraví škodlivý při požití, H319 Způsobuje vážné podráždění očí, H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest, H315 Dráždí kůži (Anonymus 2010). Při práci s touto látkou je tedy třeba dodržovat běžné zásady bezpečnosti práce.

2.5 Kapsaicin

Kapsaicinoidy jsou alkaloidy s velmi intenzivním aroma, vyskytující se pouze u rodu *Capsicum* sp, kde byly identifikovány již roku 1919 (Young, Sang 1995). Dokáží působit ostrou pálivou chuť a jsou schopné vytvářet pocity horka (Bosland, Bosland 2000; Young, Sang 1995). Kapsaicin je bezbarvá krystalická velmi stabilní látka bez zápachu, odolná vůči teplu, chladu i zmražení. Podle výzkumu se nerozkládá ani po dlouhé době (Find'o 2010).

Vzhledem k tomu, že má mnoho efektů na vjemy savců, jeví se jako dobrá přísada do repelentních prostředků určených na ochranu rostlin před zvěří. Při velkých dávkách však dokáže narušit i jejich termoregulační systém, (Curtis et al. 2000)

Produkty obsahující kapsaicinoidy jsou komerčně dostupné jako ochrana proti okusu a požeru rostlin (Bosland, Bosland 2000). Jsou často užívanou účinnou přísadou repelentů, která při styku se sliznicemi např. v ústech, nose nebo očích působí podráždění, bolest nebo pálení (Trent et al. 2001). Kapsaicinoidy se proto často užívají pro ochranu před divoce žijícími savci proti škodám na zahradách, okrasných rostlinách a ve školkách (Bosland, Bosland 2000). Přestože kapsaicin je vyráběný jako derivát z potravin, je extrémně účinný (Bosland, Bosland 2000) a má nízkou toxicitu (Young, Sang 1995). Ta je vyjádřena hodnotou LD50 pro savce 47 mg/kg (Timm 2005 in Willoughby et al. 2010), při letální dávce kapsaicinoidy způsobí paralýzu dýchacích orgánů (Young, Sang 1995).

Kapsaicinoidy mají tendenci být odpudivé a účinné, ale při povrchové aplikaci je doba jejich účinku rychle pomíjívá (Bosland, Bosland 2000). Proto je vzhledem k jejich dobrým averzivním vlastnostem v poslední době snaha tyto užít v systémové ochraně rostlin (Systemic plant protection), protože tím by se jejich trvanlivost značně prodloužila.

Podle pokusů významně snižují škody působené hlodavci. Obecně však působí odpudivě na všechny savce (Curtis et al. 2000). Na rozdíl od jiných chemických repelentů působí kapsaicinoidy jak na býložravce, tak na masožravce (Find'o 2010). Curtis et al. (2000) i Find'o (2010) se shodují na poznatku, že zatímco savci reagují na kapsaicinoidy ihned, ptáci ne. Jako repelent proti ptactvu, v souvislosti se škodami na semenech rostlin, se tak zdají jako neúčinné (Fitzgerald et al. 1997 in Willoughby et al. 2010).

Podle dlouhodobých výzkumů se kapsaicinoidy ukázaly jako relativně netoxické a bez mutagenních účinků (Young, Sang 1995).

2.6 Přehled dosavadních výsledků výzkumů

2.6.1. Vliv repelentních přípravků na živočichy

V této kapitole je stručně popsáno několik realizovaných výzkumů s použitím repelentních prostředků obsahujících jako účinnou látku denatonium benzoát nebo kapsaicin. Též je zde stručně popsána metodika jednotlivých pokusů. V jednotlivých pokusech jsou někdy zmíněny i repelenty, které neobsahují výše jmenované látky, ale jsou důležité pro porovnání účinnosti jednotlivých repelentních přípravků mezi sebou, v daných pokusech. Pro lepší přehlednost je na konci kapitoly tabulka s přehledem účinných látek u všech repelentních přípravků zmíněných v této kapitole.

Henderson et al. (2013) se ve své studii zabývá hodnocením efektivity produktů Repellex® tablety se systémovým účinkem a s ním souvisejícího Repellex® liquid s listovou aplikací, vyráběných v Repellex Seeding Protection Systems, British Columbia, Canada, jako prostředku odpuzujícího jelení zvěř. Ve všech částech studie byly tablety aplikovány do kořenového balu a školkovány 6 až 8 týdnů podle instrukcí výrobce a jako zvíře byl užit jelenec *Odocoileus Virginianus*. V první části studie byla hodnocena efektivita Repellex® Liquid s listovou aplikací. Záměrně byly vybrány druhy rostlin, které podle pěstitelů nejvíce podléhají okusu, konkrétně *Azalea* spp., *Hemerocallis* spp. a *Raphiolepis indica*, vždy s ošetřenou a neošetřenou variantou. Výsledky ukázaly, že míra okusu je značně indiferentní podle druhu rostliny. *Azalea* – v průběhu prvního až šestého týdne nebyl významný rozdíl mezi ošetřenou a neošetřenou variantou, poté jelenci začali konzumovat významně více neošetřené rostliny. *Hemerocalis* – během šestého týdne začali jelenci konzumovat ošetřené rostliny zatímco neošetřené byly zcela sežrané už 2. týden. *Raphiolepis indica* – neošetřené rostliny byly sežrané už koncem prvního týdne. Otázka je, zda jelenci nepozdrželi začátek okusování ošetřených rostlin, protože v nich zprvu spatřovali cizí předměty. V druhé části hodnotí listovou aplikaci Repellex liquid® a zároveň systémové tablety Repellex® na druzích *Azalea* spp. a *Hemerocallis* spp. – ošetření mělo 4 varianty. První varianta: aplikace dvou tablet k rostlině při přesazení a ošetření sprejem, druhá varianta: ošetření jen sprejem, třetí varianta: ošetření jen dvěma tabletami při přesazení a čtvrtá neošetřená kontrolní varianta. Výsledek byl následující: rostliny *Azalea* ošetřené sprejem Repellex liquid® si bez Repellex® tablet byly od počátku okousané, avšak během pokusu nebyly významně okousány. Rostliny ošetřené systémovými tabletami byly okousané od začátku pokusu a koncem druhého týdne byly okousány zcela. *Hemerocallis* ošetřené tabletami a roztokem

Repellex liquid® byly od prvního týdne trochu poškozeny okusem, ale zůstaly po zbytek studie, zatímco jedinci ošetření pouze systémovými tabletami byly sežrané už ve druhém týdnu, takže se opět ukázal Repellex liquid® jako významně lepší než Repellex® systémové tablety. V poslední části studie byl hodnocen vliv systémových tablet jako repelentní látky aplikované na rostlinné řízky. První aplikace proběhla rovnou po odběru a zasazení řízků a po jejich přesazení proběhla druhá aplikace. Studie měla 3 varianty. První varianta: ošetření jednou systémovou tabletou při množení a dvěma při přesazování, umístěnými do kořenového balu, druhá varianta: ošetření jednou systémovou tabletou při množení a třetí kontrolní neošetřená varianta. Rostliny byly následně kultivovány po dobu 8 týdnů, aby byla zaručena dostatečná absorpce účinných látek rostlinou. Při přesazování byly řízky ještě ošetřeny prostředkem pro rozvoj kořenového systému. Už druhý den po začátku pokusu však byly všechny rostliny všech variant zcela sežrány.

V této studii tedy bylo prokázáno, že za daných podmínek dosahuje systematicky lepších výsledků listově aplikovaný Repellex liquid® oproti Repellex® systémové tablety.

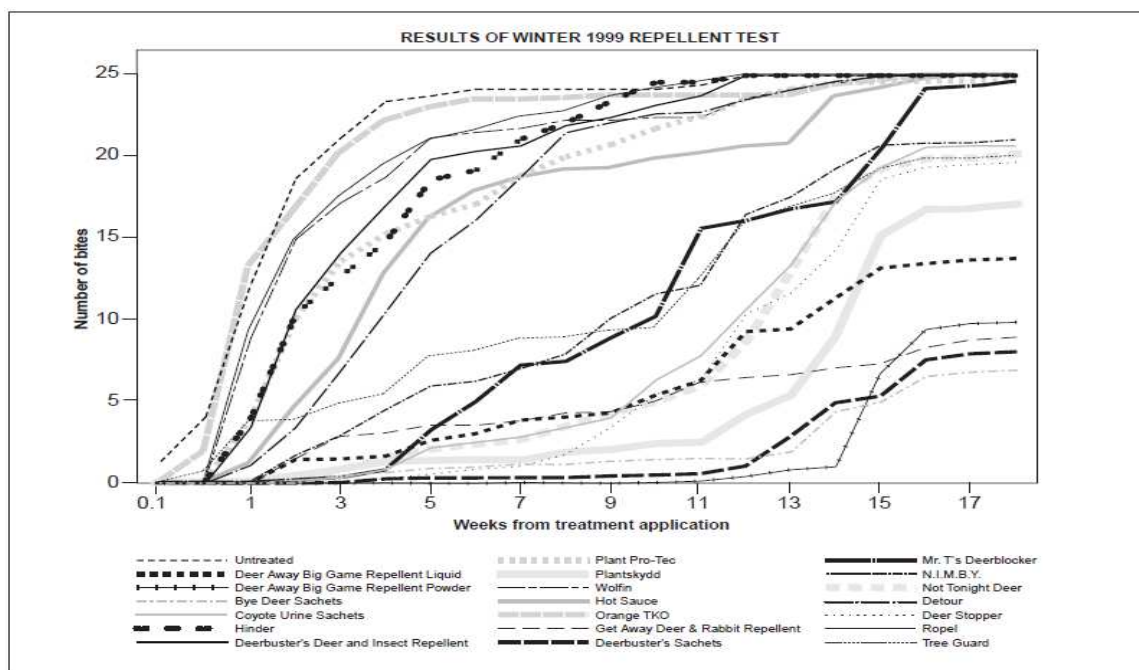
Witmer et al. (1998) testuje ve dvou nezávislých pokusech efektivitu bitrexu na snížení škod působených drobnými hlodavci, konkrétně *Thomomys talpoides* – pytlonoš severní. První část se uskutečnila v letech 1992/3, kdy bylo na holoseči vysazeno 1920 ks jednoletých sazenic borovice těžké a douglasky. Plocha se vyskytuje v nadmořské výšce 1155 m v oblasti s převažující borovicí těžkou, na málo produktivních půdách s nízkou vodní kapacitou. Sazenice byly rozmístěny záměrně poblíž aktivních nor obydlených hlodavci. Vysazené rostliny byly předem ošetřeny následujícím způsobem: u první části byla při výsadbě pod kořeny umístěna tableta 1,5g s 210mg látky denatonium benzoát (resp. 14% aktivní přísady), u druhé části byla ještě navíc provedena aplikace spreje s 2% aktivní látky, aplikovaná na olistění, třetí část zůstala bez ošetření jako kontrolní varianta. Koncentrace účinné látky byly záměrně vybrány kvůli množství účinných látek v komerčně dostupných repelentech.

Po skončení pokusu proběhl odběr vzorků půdy i jehličí pro zjištění přítomnosti aktivní látky. Metodou HPLC (high-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie sloužící k separaci složek ve vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace ve vzorku) byla při UV záření o vlnové délce 210 nm zjištěna přítomnost 0,5 ppm denatonium benzoátu ve vzorcích odebraných od kořenů v hloubce 15 cm pod zemí.

Druhá část pokusu se uskutečnila v Idaho. Na plochu bylo vysazeno 120 sazenic borovice těžké v kontejnerech se sponem 2 m. Celkem byla 3 opakování, resp. 3 plochy. Na každé ploše bylo vysazeno 30 sazenic ošetřených systémovými tabletami i sprejem, 30 sazenic ošetřených jenom systémovými tabletami, 30 sazenic ošetřených jenom sprejem a 30 sazenic kontrolních bez ošetření. Při vyhodnocování venkovních testů bylo zjištěno, že v první části pokusu nebyly žádné rozdíly ve velikosti škod způsobených hlodavci mezi různým ošetřením a kontrolní variantou. Testy prokázaly, že ve vzorcích půdy i asimilačních orgánů je koncentrace denatonium benzoátu 0 ppm, v druhé části byly výsledky obdobné.

Tento neúspěch však autoři vysvětlují pomocí příliš velkého sucha po výsadbě, což bylo ověřeno odkrytím několika sazenic na podzim, kde byly patrné stále ještě větší kusy nerozložených systémových tablet. Teplé počasí a nedostatek vlhkosti působil jako inhibitor rozkladu a absorpce účinných látek sazenicemi. V závěru dodávají, že za daných podmínek v tomto pokusu denatonium benzoát neposkytuje sazenicím signifikantní ochranu proti drobným hlodavcům, která je pravděpodobně způsobena nízkými koncentracemi účinných látek v rostlině. Je tedy nutný další výzkum, který by otestoval účinky denatonium benzoátu při vyšších koncentracích.

Trent et al. (2001) ve svém pokusu srovnávají 20 komerčně dostupných repelentů proti jelení zvěři a na základě číselných hodnot zjišťují rozdíly v účinnosti aktivních přísad. Pokus se uskutečnil na pěti místech o velikosti 2 až 5 akrů s přirozeným porostem douglasky a olše s podrostem. V každém místě bylo umístěno 5 až 6 jelenců (*Odocoileus hemious*). K testování byly použity sazenice *Thuja plicata*, které byly zasazeny na 21 plochách. Na každé ploše určené pro jeden druh repelentu byly sazenice rovnoměrně rozmístěny ve 3 řadách po třech sazenicích ve sponu 1m. Dvacátá první plocha byla ponechána jako kontrolní, tedy bez ošetření. Sazenice měly při výsadbě velikost kolem 50cm a při jejich výběru byl kladen důraz na to, aby sazenice měly dostatek laterálních větví. Hodnocení probíhalo jednou týdně po dobu 18 týdnů. Poškození bylo hodnoceno podle počtu okusů na každé sazenici s maximálním počtem 25 okusů. V závěru uvádějí, že výsledky byly velmi rozdílné mezi jednotlivými přípravky, avšak žádný repelent nedokázal zcela ochránit sazenice po celou dobu pokusů. Obecně lépe dopadly repelenty navozující strach. Výsledky znázorňující efektivitu jednotlivých repelentů jsou v následujícím grafu.



Obrázek č. 1 – přehled porovnání účinnosti jednotlivých repelentů (Trent et al. 2001)

Za povšimnutí stojí především přípravky: Ropel a Tree Gard obsahující účinnou látku denatonium benzoát. Dále pak Hot Sauce, Get Away Deer and Rabbit Repellent a N.I.M.B.Y. obsahující účinnou látku kapsaicin.

Ward et al. (2010) uskutečnili podobný pokus, v němž testovali 10 komerčně dostupných repelentů na sazenicích tisu *Taxus cuspidata*, konkrétně: Chew-Not®, Deer Off®, Deer-Away® Big Game Repellent, Plantskydd®, Bobbex®, Liquid Fence®, Deer Solution®, Hinder®, Repellex® systémové tablety a kojotí moč a jejich efektivitu při odpuzení jelence *Odocoileus virginianus*. Tato studie obsahuje 2 varianty, pozitivní (oplocená) a negativní (nechráněná – vystavená herbivorům). Rostliny byly vysazovány 0,5 m od sebe, mezi skupinami a řádky ve vzdálenosti 2 metry, protože při vzdálenosti menší jak jeden metr by docházelo k vzájemnému ovlivnění nebo odpuzování mezi jednotlivými repelenty (Wagner, Nolte 2001). Na konci pokusu bylo po pravidelných odečtech učiněno porovnání biomasy pozitivní a negativní varianty a podle pozitivní varianty byl spočítán index ochrany pro sazenice vystavené okusu. Sazenice byly vysazovány ve dvoulitrových obalech. Na každém umístění byly dva bloky s dvanácti skupinami po šesti tisech. Pro možnost porovnání mezi repelenty byl stanoven tzv. index ochrany u sazenic vystavených herbivorům, který byl odvozen od velikosti rostliny a hmotnosti suchého jehličí na konci pozorování. Velikost sazenic v pozitivní variantě byla uvažována jako 100%, sazenice v negativní části pak podle účinnosti repelentů dosahují určitých podílů této hodnoty. Ukázalo se, že obecně lepší

ochranu poskytují repelenty, jež vyžadují častější aplikaci. Podle indexu ochrany dopadl nejlépe produkt Bobbex® s ochranou 93 %. Ošetření však vyšlo nejdražší a aplikace je nutná velmi často (po 10 až 14 dnech). Hinder® se stejnými nároky na aplikaci dosáhl 83 %, avšak ošetření stálo jen zlomek ceny oproti Bobbex®. Oproti tomu sazenice ošetřené Repellex® systémovými tabletami nebyly statisticky prokazatelně větší než sazenice neošetřené žádným repelentem. Neošetřené sazenice mají index ochrany 49%. To je sice ze všech nejméně, avšak index 50% u sazenic ošetřených systémovými tabletami Repellex® nepředstavuje statisticky významný rozdíl na dané hladině významnosti užití v této studii. Velká výhoda tohoto repelentu však spočívá v jeho snadné aplikaci s dlouhým časovým intervalem, avšak účinnost se zdá jako poměrně malá. Závěrem však nutno dodat, že žádný z těchto repelentů nechrání sazenice na 100%. Vliv okusu byl skutečně velký. Sazenice kontrolní varianty chráněné oplocením (index ochrany 100%) byly o 72% větší a měly 18krát větší hmotnost jehličí, než neošetřená kontrolní a rovněž nejvíce poškozená varianta s indexem ochrany 49%. U sazenic docházelo průměrně k mortalitě 7%, avšak nebyla statisticky významně rozdílná mezi jednotlivými repelenty.

Bosland, Bosland (2000) se ve své studii zabývají vlivem kapsaicinoidů na potlačení škod působených králíky na zeleninových polích se salátem, přičemž se vycházelo ze skutečnosti, že v normálních podmínkách se králíci hořké nebo ostré chuti potravy instinktivně vyhýbají. Studie se uskutečnila v New Mexico, USA. Pro ošetření salátů byl použit koncentrovaný kapsaicin izolovaný z usušených paprik a poté s ním byly poprášeny ošetřované saláty. V pokusu byly králíkům vystaveny polní saláty, a to buď neošetřené nebo ošetřené kapsaicinem. Aplikace kapsaicinu probíhala každodenním nanášením prášku s využitím adheze vody, po celou dobu se provádělo hodnocení. Z toho vyplynulo, že nejdříve byly zkonsumovány saláty neošetřené, avšak s nastávajícím nedostatkem potravy byly poté zkonsumovány postupně i saláty ošetřené. V závěru autoři dodávají, že kapsaicin není skutečný repelent, ale účinkuje spíše jako deterent. Studie prokázala, že jeho účinek a efektivita jsou při dané aplikaci dostatečné pouze dokud je na výběr z alternativních zdrojů potravy.

Willoughby et al. (2010) se ve své studii zaměřili na srovnání repelentů s mírnou toxicitou, některé jsou i deriváty z potravin. Konkrétně jde o kapsaicin, aluminium amonium sulphate, rybí olej, denatonium benzoát a ziram. Repelenty byly aplikovány na ovesné zrní a spolu s neošetřeným zrním jako alternativní potravou bylo předkládáno drobným hlodavcům.

Ukázalo se, že všechny repelenty signifikantně snižují konzumaci o 40% a více oproti neošetřeným. Kapsaicin dosahoval hodnoty ochrany až 95%. Denatonium benzoát rovněž dosahuje lepších výsledků než zbylé repelenty, avšak nebyla prokázána statistická významnost. Po dvou týdnech se však repelenty stávají neefektivní. V závěru dodávají, že kapsaicin je z těchto repelentů v daných podmínkách nejefektivnější, a to i přestože byla použita koncentrace jen 325 ppm, což je méně než doporučená efektivní dávka (Fitzgerald et al. 1997 in Willoughby et al. 2010).

V závěru této podkapitoly bych chtěl uvést ještě některé poznatky z méně rozsáhlých prací. Například Wright, Milne (1994) též potvrzuje teorii, že pokud je dostatek potravy, tak se býložravci instinktivně vyhýbají potravě spojené se špatnou chutí nebo nepříjemnými pocity. Ve svém pokusu, ve kterém vystavoval potravu ošetřenou repelentním prostředkem denatonium benzoát postupně srnci i jelenu, tak zjistil, že ani koncentrace 1000ppm nezabrání v přijetí potravy, pokud není na výběr jiná potrava. V okamžiku, kdy byla k dispozici vedle potravy ošetřené i neošetřená, byla ihned konzumována potrava bez chuťových přísad.

Lehmkuhler et al. (2003) porovnávají velikost škod na třech plochách, kde byla kontrolní neošetřená varianta, varianta ošetřená repelentním prostředkem Tree Guard® s 0,20% účinné látky denatonium benzoát s listovou aplikací a variantu, kde byly jednotlivé rostliny chráněny drátem s elektrickým proudem. V závěru zjišťuje, že spolehlivou ochranu zajišťuje pouze varianta s ochranou elektrickým proudem.

Santilli et al. (2004) zkoušejí, jak chránit sazenice olivovníku (*Olea europaea*) před okusem daňčí zvěří. Za tím účelem testují tři repelentní prostředky; Tree Guard®, Eutrofit® a Hot Sauce®. Zatímco Tree Guard®, s účinnou látkou denatonium benzoát a Eutrofit® poskytují sazenicím signifikantní ochranu (snížení okusu o 54,5%, resp. 40,9%), tak prostředek Hot Sauce®, s účinnou látkou kapsaicin, statisticky významný rozdíl ve snížení okusu za daných podmínek neposkytuje. V závěru dodávají, že Tree Guard® a Eutrofit® se zdají jako dobrá alternativa pro snížení škod působených zvěří v oblastech s nižší a střední hustotou populace škodící zvěře.

Zajímavou informaci publikují Fitzgerald et al. (1995), kdy při pokusech s repelentními vlastnostmi kapsaicinu zjišťují, že při hladině významnosti $p > 0,05$ je malá koncentrace účinné látky stejně odpudivá jako větší.

2.6.2. Vliv repelentních látek na rostliny a semena

U všech repelentů je požadavek kromě jejich účinnosti proti škůdcům též to, aby nebyly škodlivé pro rostliny (Levar 2007, Gosling, Baker 2004) a životní prostředí vůbec (Findo 2010). V tom často spočívá jejich neúspěch, alespoň u některých rostlinných druhů. Semena stromů jsou obecně více citlivá na fyto toxické účinky chemikálií, než semena užívaná v zemědělství, semena zeleniny či květin, proto mnoho účinných repelentů se při aplikaci na semena lesních dřevin projevilo jako významně snižující klíčivost (Lamontagne 1974 in Gosling, Baker 2004). Chránit je nutné nejen rostliny, ale i jejich semena, která často podléhají predaci ptáky, hmyzem a hlodavci (Wittmer et al. 1998; Gosling, Baker 2004). Ochrana semen chemickými repelenty byla střídavě zkoumána jako praktická metoda snížení těchto ztrát (Gosling, Baker 2004).

Pro porovnání vlivu repelentů na klíčení semen dřevin vytvořili Gosling, Baker (2004) studii, ve které testovali Aaprosect, Capsaicin, Guardsman, Scuttle, Treeguard and Hallmark v souvislosti s vlivem na klíčení semen *Fraxinus excelsior* L, *Betula pendula* L, *Pinus nigra* ssp. *Laricio* L a *Acer pseudoplatanus*. Pro tuto rešerši mají význam především Capsaicin s účinnou látkou Capsaicin 0.05% s aplikací 1 ml na 75 g semen a Treeguard s účinnou látkou Bitrex (denatonium benzoát) s aplikací 1 ml na 25 g semen. Od každého druhu bylo odměřeno 2400 semen, polovina jich byla ošetřena podle instrukcí výrobce a druhá polovina zůstala neošetřená jako kontrolní. Aplikace proběhla formou aerosolu dobře pokrývajícího semena a poté byla semena umístěna do sadbovačů a umístěna do fóliovníku. Klíčení probíhalo s periodami 16 hodin tma při teplotě 20°C a 8 hodin umělého osvětlení při teplotě 30°C. Semena břízy a borovice byla kultivována na vlhkém filtračním papíře a semena jasanu a javoru byla vzhledem ke své velikosti kultivována na směsi rašeliny a písku. Na konci pokusu byla nevyklíčená semena zkoumána, zda jsou mrtvá nebo nevyklíčila z důvodu aplikace repelentních látek. Pro srovnání byla borovice a bříza kultivována též i na směsi rašeliny a písku. Výsledky jsou vcelku pozitivní. U břízy a jasanu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v klíčení u žádného produktu. Klíčení borovice statisticky významně snižovaly pouze Aaprosect a Scuttle. U javoru bylo statisticky významné snížení klíčivosti semen zjištěno jen u produktu Guardsman.

Z toho plyne, že produkty obsahující kapsaicin nebo denatonium benzoát při dané hladině významnosti signifikantně nesnižují klíčivost semen těchto dřevin v daných podmínkách.

3. Materiál a metodika

Veškeré testy učiněné v rámci této diplomové práce se uskutečnily buď v detašovaném pracovišti katedry pěstování lesa Truba, Kostelec nad Černými lesy, a nebo ve školkách Školního lesního podniku Kostelec nad Černými lesy.

Nejprve byly prováděny testy klíčivosti, které probíhaly od dubna do srpna 2013. Veškeré zkoušky klíčivosti probíhaly podle normy ČSN 48 1211 – „Sběr, jakost a zkoušky jakosti semenného materiálu lesních dřevin“. Při každé zkoušce klíčivosti byly vylišeny dvě varianty. Jedna varianta byla ošetřena repelentním roztokem denatonium benzoátu s pomocnou transportní látkou DMSO (dimethylsulfoxid), zatímco druhá zůstala neošetřená – jako kontrolní, s cílem následně porovnat, zda má repelentní látka účinek na klíčení semen. Každá varianta měla vždy osm opakování po 100 kusech semen, aby data z testů měla dostatečnou statistickou průkaznost. Ošetření probíhalo máčením semen v roztoku denatonium benzoátu a dimethylsulfoxidu o stanovené koncentraci $2,1\text{mg.l}^{-1}$ po dobu 24 hodin. Následně byla semena obou variant kultivována v miskách na filtračním papíře, které byly umístěny v klimakomorách. Semena jedle bělokoré byla kultivována dle normy 28 dnů a semena smrku ztepilého 21 dnů. Světelný a teplotní režim v klimakomorách byl nastaven na střídání vždy 8 hodin světla při 30°C a 16 hodin tmy při 20°C .

Veškerý vyklíčený reprodukční materiál ze zkoušek klíčivosti byl následně přesazen do směsi rašeliny a písku v poměru 2:1 a následně byl kultivován ve skleníku, aby mohl být po dosažení dostatečného množství biomasy analyzován, zda účinná látka zůstala, případně v jakém množství, v rostlinných pletivech. Při zkouškách klíčivosti byla zkouška použita i semena modřínu opadavého.

Další součástí projektu byla aplikace účinné látky přímo na vzrostlé sazenice v lesní školce. V tomto případě se jednalo o tříleté sazenice (2+1) jedle bělokoré. Protože Levar (2007) uvádí, že podle patentu č. US 2007/0104751, se do rostlin vstřebá 0,01-10 % účinné látky, ale největších účinků se dosahuje při 1-2 %, byly ve školce pokusně použity dvě různé koncentrace repelentní látky. Celkem byly rozlišeny tři varianty. První varianta byla ošetřena roztokem s účinnou látkou denatonium benzoát o koncentraci $5,15\text{mg.l}^{-1}$, druhá varianta byla ošetřena roztokem s účinnou látkou denatonium benzoát o koncentraci 10mg.l^{-1} a třetí varianta byla neošetřená, jako kontrolní. Každá varianta měla celkem 2 opakování. Mezi jednotlivými variantami byly vylišeny pufrční zóny o velikosti 1 metr, aby nedocházelo k ovlivnění variant mezi sebou (Nolte, Wagner 2000 in Ward et al. 2010). Účinná látka byla

aplikována zálivkou ke kořenům. Na jednu variantu (přibližně 70 sazenic) bylo použito 5 litrů roztoku. Aplikace proběhla během vegetační doby celkem třikrát. Před aplikací byla vždy půda mechanicky upravena a narušena, aby nedocházelo k nežádoucímu úniku účinné látky do větší vzdálenosti od sazenice a zároveň aby se roztok mohl lépe vsakovat. Na konci vegetační doby koncem října byly ze sazenic odebrány vzorky letorostů, z jejichž jehlic byly následně provedeny analýzy na obsah repelentní látky.

V další části projektu byla vyseta neošetřená semena jedle bělokoré a smrku ztepilého do směsi rašeliny a písku v poměru 2:1, která byla po vyklíčení následně přesazena do sadbovačů se směsí rašeliny s pískem v poměru 2:1. Po ujmoutí semenáčků byly sadbovače rozděleny na dvě části. Jedna část byla ošetřena repelentním roztokem s účinnou látkou denatonium benzoát o koncentraci $5,15 \text{ mg.l}^{-1}$, zatímco druhá část zůstala neošetřená, jako kontrolní. Repelentní roztok byl aplikován zálivkou ke kořenům. Vzhledem k tomu, že sadbovače obsahovaly po patnácti semenáčích, byla stanovena dávka zálivky repelentního roztoku na jeden litr na sadbovač. Zálivka byla opakována celkem dvakrát. Semenáče jsou po celou dobu kultivovány ve skleníku s automatickou pravidelnou zálivkou, který je součástí pracoviště na Truba.

Vzhledem k tomu, že ještě v současné době jsou semenáčky stále příliš malé a jejich biomasa zatím nestačí pro analýzy na obsah repelentů, budou tyto analýzy provedeny až v následujícím roce.

4. Výsledky

4.1 Výsledky zkoušek klíčivosti

V této kapitole jsou popsány výsledky pokusů klíčivosti semen jedle bělokoré a smrku ztepilého ošetřených repelentním roztokem v porovnání s kontrolní variantou a jejich následné statistické vyhodnocení. Vyhodnocení probíhá následujícím způsobem: první tabulka obsahuje hodnoty zjištěné u varianty ošetřené repelentním roztokem, druhá tabulka obsahuje hodnoty zjištěné u kontrolní varianty. Poté byly celkové hodnoty (červeně zvýrazněné) testovány pomocí Mann-Whitney U-test a Kruskal-Wallis ANOVA. Výsledky testů jsou v následující tabulce. Pokud hodnota p nepřesahuje hodnotu α (0,05), výsledek je statisticky významný.

Celkové hodnoty za celý pokus klíčení byly ještě testovány Hayterovým testem, který uvažuje pouze celkové hodnoty vyklíčených semen (zvýrazněné modře) vzhledem k celkovému počtu vyšetých semen. Hodnota T byla spočtena na 0,064, pokud byla hodnota p větší, šlo o statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 0,05.

V poslední tabulce je vypočítaná klíčivost pro obě varianty, ke které je přiložen graf.

Výsledky všech testů odpovídají hladině významnosti 0,05 a pro větší přehlednost jsou nejprve uvedeny hodnoty a výsledky tří pokusů provedených s jedlí bělokorou a poté rovněž tři pokusy provedené se smrkem ztepilým.

V následujících tabulkách písmeno N znamená normálně vyklíčené semeno a I abnormálně vyklíčené nebo infikované semeno.

4.1.1 Výsledky klíčení jedle bělokoré

Tabulka č. 1 – výsledky 1. pokusu s jedlí bělokorou – ošetřená varianta

Odečet	1. – 15.5.		2. – 22.5.		3. – 29.5.		4. – 6.6.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
1 Bi	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
2 Bi	2	0	1	0	1	0	0	0	4	0
3 Bi	3	0	4	0	0	0	0	0	7	0
4 Bi	4	0	3	0	0	0	0	0	7	0
5 Bi	4	0	4	0	2	0	0	0	10	0
6 Bi	2	0	1	0	0	0	0	0	3	0
7 Bi	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
8 Bi	1	0	3	0	0	0	0	0	4	0
Σ	16	0	20	0	3	0	0	0	39	0

Tabulka č. 2 – výsledky 1. pokusu s jedlí bělokorou – neošetřená varianta

Odečet	1. – 15.5.		2. – 22.5.		3. – 29.5.		4. – 6.6.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
1	4	0	3	0	0	0	0	0	7	0
2	1	0	4	0	1	0	0	0	6	0
3	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0
4	2	1	2	0	0	0	0	0	4	1
5	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	2	0	0	0	0	0	3	0
8	1	0	4	0	0	0	0	0	5	0
Σ	11	1	17	0	1	0	0	0	29	1

Tabulka č. 3 – statistické testování výsledků 1. pokusu s jedlí bělokorou ($\alpha=0,05$)

Tyt testování	Hodnota p	Výsledek
Mann-Whitney U-test	0,431	Rozdíl není významný
Kruskal-Wallis ANOVA	0,396	Rozdíl není významný

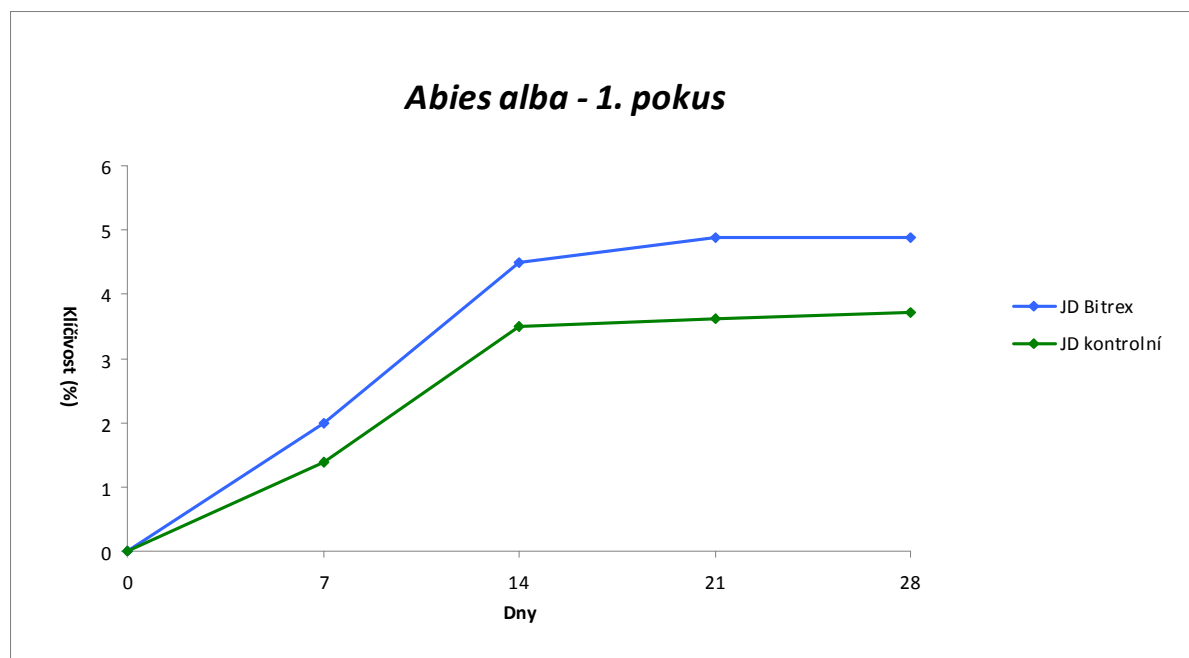
Tabulka č. 4 – Hayterův test výsledků 1. pokusu s jedlí bělokorou ($\alpha=0,05$)

Varianta	Zaseté	Vyklíčené	Výsledek
Ošetřená	39	800	Rozdíl není významný
Kontrolní	29	800	

Tabulka č. 5 – klíčivost jedle bělokoré v % při 1. pokusu – obě varianty

Varianta	Ošetřená				Neošetřená			
	1.–15.5.	2.–22.5.	3.–29.5.	4.–6.6.	1.–15.5.	2.–22.5.	3.–29.5.	4.–6.6.
1	0,00	1,00	1,00	1,00	4,00	7,00	7,00	7,07
2	2,00	3,00	4,00	4,00	1,00	5,00	6,00	6,06
3	3,00	7,00	7,00	7,00	1,00	2,00	2,00	2,00
4	4,00	7,00	7,00	7,00	2,02	4,04	4,04	4,08
5	4,00	8,00	10,00	10,00	1,00	2,00	2,00	2,00
6	2,00	3,00	3,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	3,00	3,00	3,00	1,00	3,00	3,00	3,13
8	1,00	4,00	4,00	4,00	1,00	5,00	5,00	5,43
Průměr	2,00	4,50	4,88	4,88	1,38	3,51	3,63	3,72

Graf č. 1 – klíčivost ošetřené a neošetřené varianty v prvním pokusu (hodnoty v %)



Tabulka č. 6 – výsledky 2. pokusu s jedlí bělokorou – ošetřená varianta

Odečet Označení	1. – 7.6		2. – 13.6.		3. – 20.6.		4. – 26.6.		Celkem	
	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
1 Bi	4	0	2	0	2	0	0	0	8	0
2 Bi	8	0	2	0	0	0	0	0	10	0
3 Bi	14	0	2	0	0	1	0	0	16	1
4 Bi	7	0	2	0	2	0	2	0	13	0
5 Bi	10	0	2	0	0	0	0	0	12	0
6 Bi	5	0	2	0	1	0	0	0	8	0
7 Bi	3	0	4	0	1	0	0	0	8	0
8 Bi	5	0	1	0	0	0	0	0	6	0
Σ	56	0	17	0	6	1	2	0	81	1

Tabulka č. 7 – výsledky 2. pokusu s jedlí bělokorou – neošetřená varianta

Odečet Označení	1. – 7.6		2. – 13.6.		3. – 20.6.		4. – 26.6.		Celkem	
	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
1	11	0	5	0	2	1	0	0	18	1
2	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0
3	4	0	7	0	1	1	0	0	12	1
4	5	0	1	0	0	0	0	0	6	0
5	12	0	1	0	1	0	0	0	14	0
6	3	0	1	0	0	0	0	0	4	0
7	5	0	1	0	0	0	0	0	6	0
8	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0
Σ	51	0	17	0	4	2	0	0	72	2

Tabulka č. 8 – statistické testování výsledků 2. pokusu s jedlí bělokorou ($\alpha=0,05$)

Typ testování	Hodnota p	Výsledek
Mann-Whitney U-test	0,561	Rozdíl není významný
Kruskal-Wallis ANOVA	0,526	Rozdíl není významný

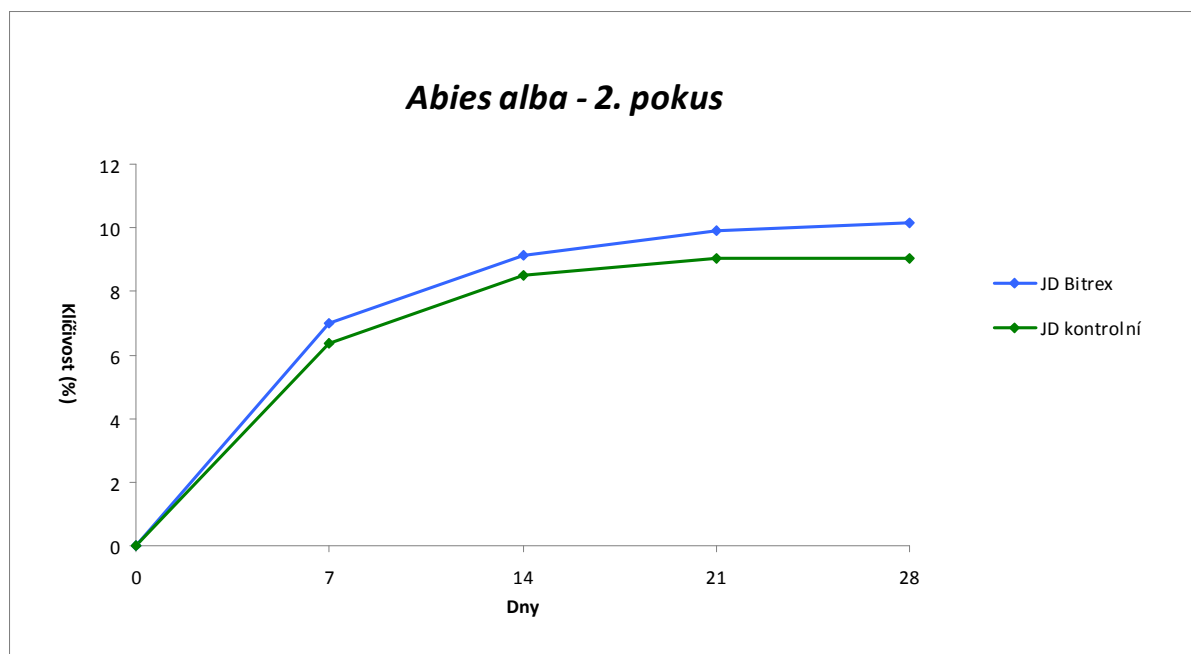
Tabulka č. 9 – Hayterův test výsledků 2. pokusu s jedlí bělokorou ($\alpha=0,05$)

Varianta	Zaseté	Vyklíčené	Výsledek
Ošetřená	81	800	Rozdíl není významný
Kontrolní	72	800	

Tabulka č. 10 – klíčivost jedle bělokoré v % při 2. pokusu – obě varianty

Varianta	Ošetřená				Neošetřená			
	1.-7.6	2.-13.6.	3.-20.6.	4.-26.6.	1.-7.6	2.-13.6.	3.-20.6.	4.-26.6.
1	4,00	6,00	8,00	8,00	11,00	16,00	18,18	18,18
2	8,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
3	14,00	16,00	16,16	16,16	4,00	11,00	12,12	12,12
4	7,00	9,00	11,00	13,00	5,00	6,00	6,00	6,00
5	10,00	12,00	12,00	12,00	12,00	13,00	14,00	14,00
6	5,00	7,00	8,00	8,00	3,00	4,00	4,00	4,00
7	3,00	7,00	8,00	8,00	5,00	6,00	6,00	6,00
8	5,00	6,00	6,00	6,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Průměr	7,00	9,13	9,90	10,15	6,38	8,50	9,04	9,04

Graf č. 2 – klíčivost ošetřené a neošetřené varianty v druhém pokusu (hodnoty v %)



Tabulka č. 11 – výsledky 3. pokusu s jedlí bělokorou – ošetřená varianta

Odečet	1. – 13.6		2. – 20.6.		3. – 26.6.		4. – 4.7.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
1 Bi	5	0	3	0	0	0	0	0	8	0
2 Bi	1	0	2	1	0	0	0	0	3	1
3 Bi	7	0	2	0	0	0	0	0	9	0
4 Bi	4	1	4	1	2	0	0	0	10	2
5 Bi	4	0	5	0	1	0	0	0	10	0
6 Bi	6	1	7	1	0	0	0	0	13	2
7 Bi	3	0	2	1	1	0	0	0	6	1
8 Bi	5	0	6	2	3	0	0	0	14	2
Σ	35	2	31	6	7	0	0	0	73	8

Tabulka č. 12 – výsledky 3. pokusu s jedlí bělokorou – neošetřená varianta

Odečet	1. – 13.6		2. – 20.6.		3. – 26.6.		4. – 4.7.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
1	10	1	3	1	0	0	0	0	13	2
2	5	0	3	0	0	0	0	0	8	0
3	4	1	6	1	1	0	0	0	11	2
4	3	0	6	1	1	0	0	0	10	1
5	3	0	3	0	1	0	0	0	7	0
6	10	0	4	0	4	0	0	0	18	0
7	11	0	7	0	1	1	0	0	19	1
8	10	0	5	2	2	0	0	0	17	2
Σ	56	2	37	5	10	1	0	0	103	8

Tabulka č. 13 – statistické testování výsledků 3. pokusu s jedlí bělokorou ($\alpha=0,05$)

Typ testování	Hodnota p	Výsledek
Mann-Whitney U-test	0,154	Rozdíl není významný
Kruskal-Wallis ANOVA	0,131	Rozdíl není významný

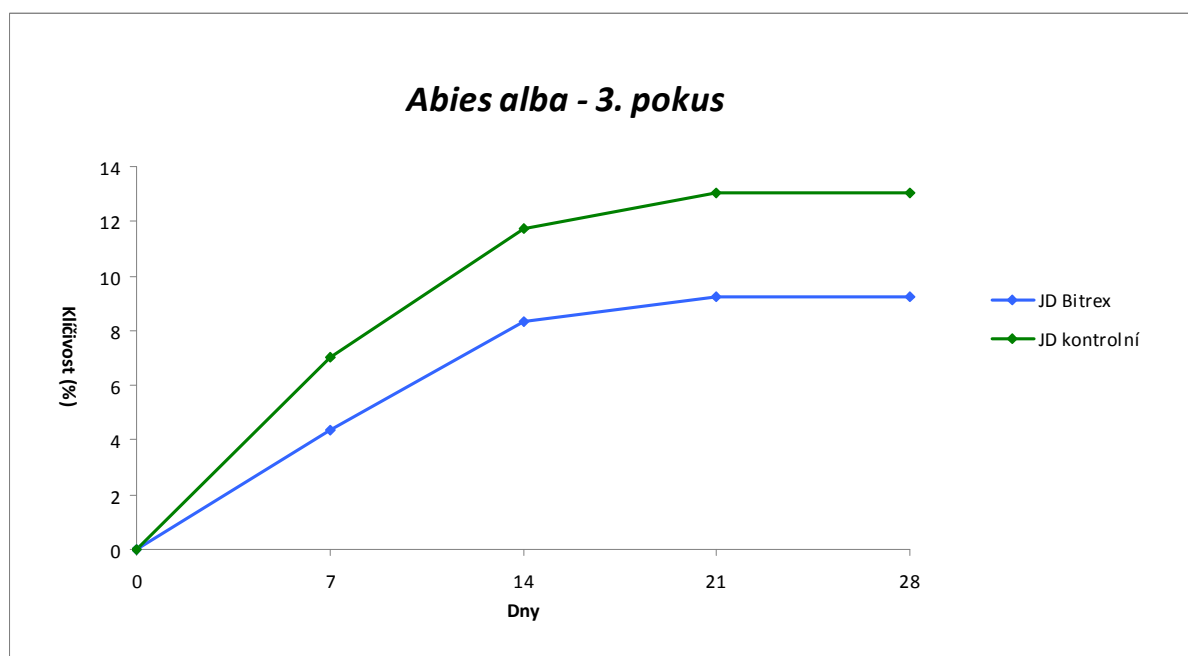
Tabulka č. 14 – Hayterův test výsledků 3. pokusu s jedlí bělokorou ($\alpha=0,05$)

Varianta	Zaseté	Vyklíčené	Výsledek
Ošetřená	73	800	Rozdíl není významný
Kontrolní	103	800	

Tabulka č. 15 – klíčivost jedle bělokoré v % při 3. pokusu – obě varianty

Varianta	Ošetřená				Neošetřená			
	1.–13.6	2.–20.6.	3.–26.6.	4.–4.7.	1.–13.6	2.–20.6.	3.–26.6.	4.–4.7.
1	5,00	8,00	8,00	8,00	10,10	13,27	13,27	13,13
2	1,00	3,03	3,03	3,00	5,00	8,00	8,00	8,00
3	7,00	9,00	9,00	9,00	4,04	10,20	11,22	11,11
4	4,04	8,16	10,20	10,10	3,00	9,09	10,10	10,00
5	4,00	9,00	10,00	10,00	3,00	6,00	7,00	7,00
6	6,06	13,27	13,27	13,13	10,00	14,00	18,00	18,00
7	3,00	5,05	6,06	6,00	11,00	18,00	19,19	19,19
8	5,00	11,22	14,29	14,00	10,00	15,31	17,35	17,00
Průměr	4,39	8,34	9,23	9,15	7,02	11,73	13,02	12,93

Graf č. 3 – klíčivost ošetřené a neošetřené varianty v třetím pokusu (hodnoty v %)



4.1.2 Výsledky klíčení smrku ztepilého

Tabulka č. 16 – výsledky 1. pokusu se smrkem ztepilým – ošetřená varianta

Odečet	1. – 6.6.		2. – 13.6.		3. – 20.6.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I
1 Bi	3	0	5	0	3	0	11	0
2 Bi	4	0	4	0	3	0	11	0
3 Bi	3	0	21	0	10	0	34	0
4 Bi	3	0	7	0	2	0	12	0
5 Bi	0	0	10	0	1	0	11	0
6 Bi	4	0	11	0	0	0	15	0
7 Bi	5	0	7	0	0	0	12	0
8 Bi	3	0	0	0	4	0	7	0
Σ	25	0	65	0	23	0	113	0

Tabulka č. 17 – výsledky 1. pokusu se smrkem ztepilým – neošetřená varianta

Odečet	1. – 6.6.		2. – 13.6.		3. – 20.6.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I
1	11	0	13	0	8	0	32	0
2	1	0	14	0	2	0	17	0
3	8	0	14	0	4	0	26	0
4	2	0	7	0	0	0	9	0
5	10	0	11	0	5	0	26	0
6	5	0	8	0	4	0	17	0
7	2	0	9	0	4	0	15	0
8	1	0	3	0	1	0	5	0
Σ	40	0	79	0	28	0	147	0

Tabulka č. 18 – statistické testování výsledků 1. pokusu se smrkem ztepilým ($\alpha=0,05$)

Typ testování	Hodnota p	Výsledek
Mann-Whitney U-test	0,291	Rozdíl není významný
Kruskal-Wallis ANOVA	0,267	Rozdíl není významný

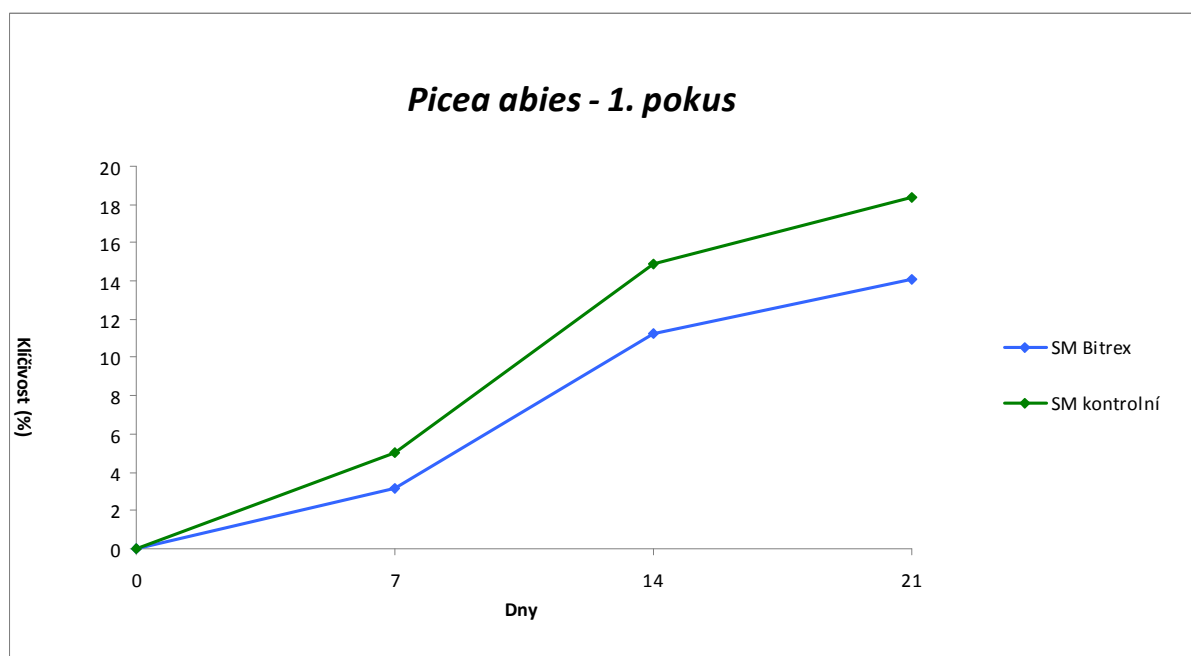
Tabulka č. 19 – Hayterův test výsledků 1. pokusu se smrkem ztepilým ($\alpha=0,05$)

Varianta	Zaseté	Vyklíčené	Výsledek
Ošetřená	113	800	Rozdíl není významný
Kontrolní	147	800	

Tabulka č. 20 – klíčivost smrku ztepilého při 1. pokusu – obě varianty

Varianta	Ošetřená			Neošetřená		
	1. – 6.6.	2. – 13.6.	3. – 20.6.	1. – 6.6.	2. – 13.6.	3. – 20.6.
1	3,00	8,00	11,00	11,00	24,00	32,00
2	4,00	8,00	11,00	1,00	15,00	17,00
3	3,00	24,00	34,00	8,00	22,00	26,00
4	3,00	10,00	12,00	2,00	9,00	9,00
5	0,00	10,00	11,00	10,00	21,00	26,00
6	4,00	15,00	15,00	5,00	13,00	17,00
7	5,00	12,00	12,00	2,00	11,00	15,00
8	3,00	3,00	7,00	1,00	4,00	5,00
Průměr	3,13	11,25	14,13	5,00	14,88	18,38

Graf č. 4 – klíčivost ošetřené a neošetřené varianty v prvním pokusu (hodnoty v %)



Tabulka č. 21 – výsledky 2. pokusu se smrkem ztepilým – ošetřená varianta

Odečet	1. – 4.7.		2. – 11.7.		3. – 18.7.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I
1 Bi	0	0	2	0	2	4	4	4
2 Bi	0	0	12	0	3	1	15	1
3 Bi	0	0	16	0	3	3	19	3
4 Bi	0	0	0	0	4	3	4	3
5 Bi	0	0	2	0	4	1	6	1
6 Bi	0	0	10	0	2	3	12	3
7 Bi	0	0	13	1	0	1	13	2
8 Bi	0	0	7	0	2	0	9	0
Σ	0	0	62	1	20	16	82	17

Tabulka č. 22 – výsledky 2. pokusu se smrkem ztepilým – neošetřená varianta

Odečet	1. – 4.7.		2. – 11.7.		3. – 18.7.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I
1	0	0	7	0	4	1	11	1
2	0	0	13	0	2	0	15	0
3	0	0	15	0	4	0	19	0
4	0	0	10	0	1	2	11	2
5	0	0	21	0	3	0	24	0
6	0	0	24	0	6	0	30	0
7	0	0	15	0	7	2	22	2
8	0	0	7	0	8	3	15	3
Σ	0	0	112	0	35	8	147	8

Tabulka č. 23 – statistické testování výsledků 2. pokusu se smrkem ztepilým ($\alpha=0,05$)

Typ testování	Hodnota p	Výsledek
Mann-Whitney U-test	0,034	Významný rozdíl
Kruskal-Wallis ANOVA	0,031	Významný rozdíl

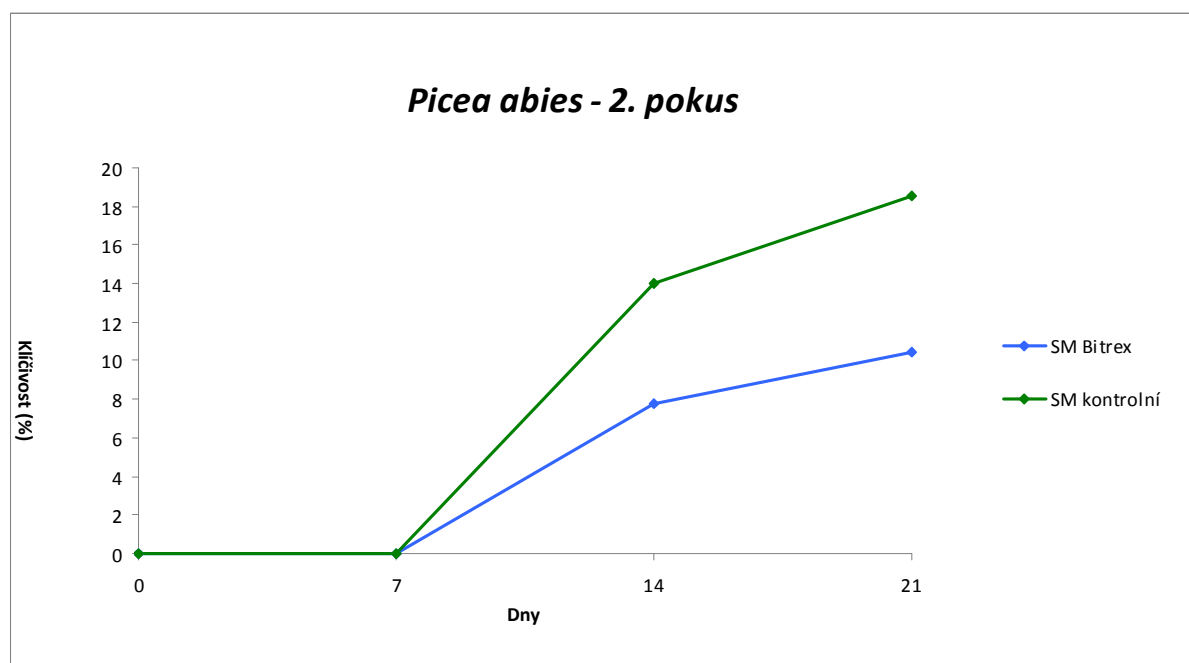
Tabulka č. 24 – Hayterův test výsledků 2. pokusu se smrkem ztepilým ($\alpha=0,05$)

Varianta	Zaseté	Vyklíčené	Výsledek
Ošetřená	82	800	Významný rozdíl
Kontrolní	147	800	

Tabulka č. 25 – klíčivost smrku ztepilého při 2. pokusu – obě varianty

Varianta	Ošetřená			Neošetřená		
	1. – 4.7.	2. – 11.7.	3. – 18.7.	1. – 4.7.	2. – 11.7.	3. – 18.7.
1	0,00	2,00	4,17	0,00	7,00	11,11
2	0,00	12,00	15,15	0,00	13,00	15,00
3	0,00	16,00	19,59	0,00	15,00	19,00
4	0,00	0,00	4,12	0,00	10,00	11,22
5	0,00	2,00	6,06	0,00	21,00	24,00
6	0,00	10,00	12,37	0,00	24,00	30,00
7	0,00	13,13	13,27	0,00	15,00	22,45
8	0,00	7,00	9,00	0,00	7,00	15,46
Průměr	0,00	7,77	10,47	0,00	14,00	18,53

Graf č. 5 – klíčivost ošetřené a neošetřené varianty v druhém pokusu (hodnoty v %)



Tabulka č. 26 – výsledky 3. pokusu se smrkem ztepilým – ošetřená varianta

Odečet	1. – 18.7.		2. – 25.7.		3. – 1.8.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I
1 Bi	2	0	12	0	8	2	22	2
2 Bi	1	0	15	0	15	0	31	0
3 Bi	0	0	20	0	5	0	25	0
4 Bi	0	0	10	0	9	1	19	1
5 Bi	0	0	12	0	8	1	20	1
6 Bi	4	0	16	0	5	0	25	0
7 Bi	1	0	17	0	7	0	25	0
8 Bi	0	0	8	0	10	0	18	0
Σ	8	0	110	0	67	4	185	4

Tabulka č. 27 – výsledky 3. pokusu se smrkem ztepilým – neošetřená varianta

Odečet	1. – 18.7.		2. – 25.7.		3. – 1.8.		Celkem	
Označení	N	I	N	I	N	I	N	I
1	0	0	11	0	7	2	18	2
2	6	0	21	0	12	0	39	0
3	0	0	17	0	5	0	22	0
4	6	0	25	0	4	1	35	1
5	0	0	15	1	5	0	20	1
6	2	0	25	0	5	0	32	0
7	0	0	27	1	2	4	29	5
8	2	0	23	0	9	0	34	0
Σ	16	0	164	2	49	7	229	9

Tabulka č. 28 – statistické testování výsledků 3. pokusu se smrkem ztepilým ($\alpha=0,05$)

Typ testování	Hodnota p	Výsledek
Mann-Whitney U-test	0,170	Rozdíl není významný
Kruskal-Wallis ANOVA	0,154	Rozdíl není významný

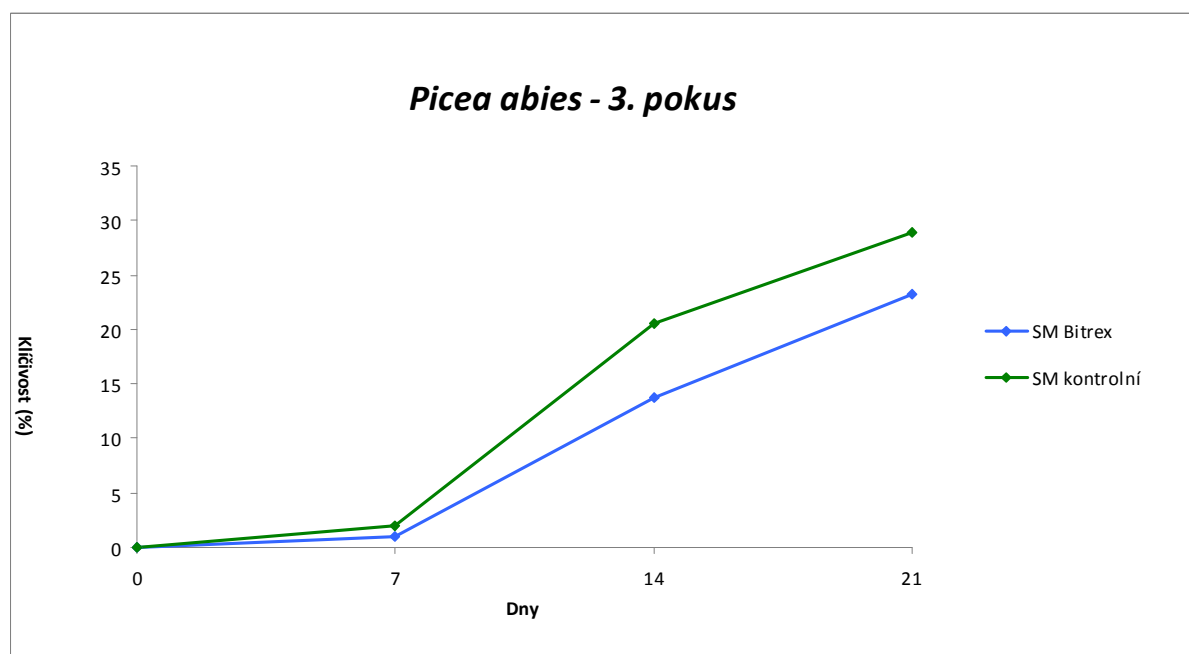
Tabulka č. 29 – Hayterův test výsledků 3. pokusu se smrkem ztepilým ($\alpha=0,05$)

Varianta	Zaseté	Vyklíčené	Výsledek
Ošetřená	185	800	Rozdíl není významný
Kontrolní	229	800	

Tabulka č. 30 – klíčivost smrku ztepilého při 3. pokusu – obě varianty

Varianta Označení	Ošetřená			Neošetřená		
	1. – 6.6.	2. – 13.6.	3. – 20.6.	1. – 6.6.	2. – 13.6.	3. – 20.6.
1	2,00	12,00	22,45	0,00	11,00	18,37
2	1,00	15,00	31,00	6,00	21,00	39,00
3	0,00	20,00	25,00	0,00	17,00	22,00
4	0,00	10,00	19,19	6,00	25,00	35,35
5	0,00	12,00	20,20	0,00	15,15	20,20
6	4,00	16,00	25,00	2,00	25,00	32,00
7	1,00	17,00	25,00	0,00	27,27	30,53
8	0,00	8,00	18,00	2,00	23,00	34,00
Průměr	1,00	13,75	23,23	2,00	20,55	28,93

Graf č. 6 – klíčivost ošetřené a neošetřené varianty v třetím pokusu (hodnoty v %)



V následující tabulce je souhrnný přehled, ve kterém jsou uvedeny pouze výsledky jednotlivých statistických testů. Pro zjednodušení jsou použity zkratky: N = rozdíl není významný, V = rozdíl je statisticky významný. Všechny výsledky jsou na hladině významnosti 0,05.

Tabulka č. 31 – přehled výsledků všech pokusů

Test	Pokus	1. JD	2. JD	3.JD	1. SM	2. SM	3. SM
Mann-Whitney U-test		N	N	N	N	V	N
Kruskal-Wallis ANOVA		N	N	N	N	V	N
Hayterův test		N	N	N	N	V	N

Ve výše uvedené tabulce je názorně vidět, že statisticky významný rozdíl mezi ošetřenou a neošetřenou variantou je sledován jen v jednom případě z šesti pokusů, a to v neprospěch ošetřené varianty, na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Respektive jen v jednom pokusu je významný rozdíl, a to s 95% pravděpodobností. Přestože významný rozdíl byl zaznamenán v neprospěch ošetřené varianty a ošetřená varianta dosahovala spíše nižších hodnot oproti kontrolní variantě, tak ve dvou případech (konkrétně 1. a 2. pokus u jedle bělokoré) dosahovala ošetřená varianta hodnot vyšších než varianta kontrolní. Vzhledem k počtu pokusů se však nedá jednoznačně říci, zda Bitrex (denatonium benzoát) systematicky snižuje nebo zvyšuje klíčivost semen lesních dřevin a nebo zda by se při větším počtu pokusů zjistilo, že se toto rozdělení blíží Gaussově křivce.

Na závěr je možné konstatovat, že aplikace repelentní látky Bitrex za daných podmínek u těchto vzorků semen jedle bělokoré a smrku ztepilého významně nepůsobí na snížení klíčivosti.



Obrázek č. 2 – semenáč jedle bělokoré vzešlý z ošetřených semen (foto: autor, 28.3.2014)



Obrázek č. 3 - semenáč jedle bělokoré vzešlý z ošetřených semen (foto: autor, 10.4.2014)

4.2 Výsledky pokusu v lesní školce

Koncem října 2013 byly odebrány vzorky z ošetřených sazenic ve školce. Vzhledem k tomu, že sazenice mohou být použity v dalších pokusech, byly vzorky odebrány tak, aby sazenice nebyly příliš poškozeny. Též byl kladen důraz na to, aby byly vzorky odebrány ze všech rostlin a výsledek tak byl statisticky průkazný. K chemickým rozběrům bylo potřeba cca 100g jehlic. Nejprve byly vzorky testovány v laboratoři na Fakultě agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Tato chemická analýza obsahu účinných látek zatím neprokázala výskyt účinných látek v odebraných vzorcích. Poté byly vzorky ještě dány k analýze do externí laboratoře. Výsledky této analýzy v době odevzdání této práce (24.4.2014) ještě nejsou známy.

Při okulárním hodnocení však sazenice ošetřené repelentním roztokem nevykazují žádné chorobné změny oproti kontrolní variantě a již (začátek dubna) nasazují nové přírůsty.



Obrázek č. 4 – lesní školka (foto autor, 10.4.2014)



Obrázek č. 5 – srovnání zdravotního stavu ošetřených (vpravo) a neošetřených sazenic (foto: autor, 10.4.2014)



Obrázek č. 6 a 7 – vitalita sazenic jedle bělokoré ošetřené Bitrexem (foto: autor, 10.4.2014)

4.3 Výsledky u sazenic ošetřených po výsevu

Semena byla vyseta v průběhu června a během července byla postupně přesazena do sadbovačů. Po ujetí byla ošetřena repelentním roztokem obsahujícím Bitrex. Přestože semenáče rostou normálně, tak kvůli požadovanému množství biomasy potřebnému k chemickým analýzám stále nedosahují potřebné velikosti. Semenáče na počátku dubna 2014 dosahují průměrné výšky zhruba 4 – 7 cm, průměr kořenového krčku se pohybuje kolem 1,5mm. Při okulárním hodnocení však semenáče ošetřené repelentním roztokem nevykazují žádné chorobné změny oproti kontrolní variantě.



Obrázek č. 8 – vzešlé semenáče jedle bělokoré ošetřené zálivkou denatonium benzoátu (foto: autor, 10.4.2014)



Obrázek č. 9 – průměrně velký semenáč JD (foto: autor 10.4.2014)



Obrázek č. 10 – vzešlé semenáče smrku ztepilého Ošetřeného zálivkou denatonium benzoátu (foto: autor, 10.4.2014)



Obrázek č. 8 – průměrně velký semenáč SM(foto: autor, 10.4.2014)

5. Diskuse

Vzhledem k již uvedeným skutečnostem způsobujícím nezdary některých repelentů se mnoho autorů snaží tyto neúspěchy vysvětlit. Chuťové repelenty jsou často neefektivní, pravděpodobně proto, že koncentrace účinných látek jsou někdy příliš nízké (Trent et al. 2001). Jednou z příčin při neúspěchu použití systémových tablet (např. v pracích Wittmer et al. 1998; Henderson et al. 2013) mohou být špatně vlhkostní poměry v půdě, kdy tablety při nedostatku půdní vlhkosti zůstávají dlouho částečně nerozložené a tak rostliny nemohou dosáhnout potřebných koncentrací účinných látek ve svých pletivech. Wittmer et al. (1998) jako důkaz uvádějí své zatím nepublikované výsledky z venkovních testů ve školce, kde ošetřené sazenice douglasky tisolisté dosahovaly koncentrací denatonium benzoátu ve svých pletivech od 0,0 do 21,6ppm, respektive 7,9ppm v průměru.

Jednou z možností, proč některé repelenty nemají požadovaný účinek, může být, že přísada hořkých složek u některých herbivorů dostatečně nesnižuje chuťovou atraktivitu jejich potravy, a pokud nemají na výběr, jsou ochotní konzumovat i potravu s nepříjemnou chutí (Wright, Milne 1994). Některé studie ukazují, že repelenty založené na hořké chuti mají jen mírně lepší výsledky než stav bez jejich použití (Ward et al. 2010; Trent et al. 2001), proto by bylo potřeba jejich koncentrace úměrně zvýšit. To však nemusí působit příznivě na stav rostliny, protože podle Bergquist, Örlander (1996) by úroveň hořkých substancí dostačujících k zabránění okusu byla pro rostliny toxická a měla za následek mortalitu nad 75% sazenic.

Účinnost repelentů též rychle klesá při nedostatku alternativní potravy (Bosland, Bosland 2000). Systémové tablety Repellex® jsou potenciálně dobrým řešením současné situace, jsou jednoduché na aplikaci, ale zatím neposkytují dostatečně efektivní ochranu, kromě toho systémové repelenty nelze užít při výrobě surovin pro potravinářský průmysl (Ward et al. 2010). V našich podmínkách bude určitě hrát roli i cena, která v současné době na americkém trhu odpovídá 100 USD na 300 tablet. Jedna tableta se přitom aplikuje na každých 30 cm součtu výšky a šířky (korunového průměru) ošetřované rostliny.

Zaznamenávání intenzivních škod na pokusných plochách též může být způsobeno skutečností, že na menších plochách je obvykle mnohem větší predační a konkurenční tlak než na velkých volných plochách (Willoughby et al. 2010). U jelena evropského je zjištěno, že pokud je rušen, dochází k narušení jeho cirkadiálních rytmů, na což reaguje nestandardním chováním, konkrétně zvýšením škod působených na lese (Havránek et al. 2010).

Přes všechny úspěchy i neúspěchy v používání repelentních prostředků se systémovým účinkem by měl výrobce nadále pokračovat ve zdokonalování absorpce a dávkování účinných látek k zajištění rychlejší a dokonalejší absorpce rostlinou (Henderson et al. 2013), protože systémová ochrana rostlin by mohla v budoucnu být komplexním řešením ochrany rostlin, alespoň v případě pěstování lesa.

V závěru bych chtěl poznamenat několik podnětů k průběhu a výsledkům pokusů učiněných pro získání a sběr dat pro tuto práci.

Vzhledem k tomu, že účinná látka podle dosavadních výsledků chemických analýz ke dni odevzdání této práce (24.4.2014) patrně do rostlin nepronikla, a nebo alespoň ne v dostatečném množství, měly by být ještě provedeny odběry vzorků půdy, aby bylo možné zjistit, kde se účinná látka nachází, případně zjistit, zda sama půda ve školce neobsahuje látky, které částečně brání vstřebávání účinné látky do rostliny.

Vzhledem k tomu, že v chemických analýzách byly použity pouze jehlice, není tedy možná vyloučeno, že účinná látka se zatím drží v kořenové části a do jehličí zatím neproniká. Protože kořeny jsou jedinou možností vstupu účinné látky do rostliny, mohly by být provedeny rozbory, zda se denatonium benzoát nenachází zatím pouze v nich nebo v jejich blízkosti.

Pozitivním zjištěním je, že denatonium benzoát podle výsledků této práce nijak významně nesnižuje klíčivost, neboť to je první předpoklad pro jeho zdárné užívání v systémové ochraně rostlin. V tomto směru je ještě nutné po získání dostatečné biomasy z vyklíčených semen provést chemické rozbory, zda denatonium benzoát do semen pronikl a dále se rozšířil do nově vznikajících pletiv semenáčů.

6.Závěr

Podle výše uvedených výsledků lze říci, že chemická látka denatonium benzoát nemá za daných podmínek v tomto případě statisticky významný vliv na snížení klíčivosti. Respektive na hladině významnosti 0,05 byl ze šesti testování pouze v jedné případě zjištěn statisticky významný rozdíl mezi ošetřenou a neošetřenou variantou, tedy že s 95% pravděpodobností denatonium benzoát statisticky snižuje klíčivost jen v jednom případě z šesti. Podle okulárního pozorování nebyl na jaře 2014, tedy po osmi až dvanácti měsících od jednotlivých aplikací, zjištěn žádný rozdíl ve vitalitě ošetřených a neošetřených rostlin.

Podle dosavadního chemického analyzování nebyla zatím zjištěna přítomnost látky denatonium benzoát v asimilačních orgánech ošetřených sazenic jedle bělokoré.

Rostliny, které zatím nedosáhly potřebného objemu biomasy pro chemickou analýzu, budou dále ponechány, aby mohly být též analyzovány. Jde o sadební materiál vzešlý ze zkoušek klíčivosti a o ošetřené semenáče vzešlé z neošetřených semen. Výsledky těchto analýz budou zveřejněny v dalších pracích.

7. Použitá literatura

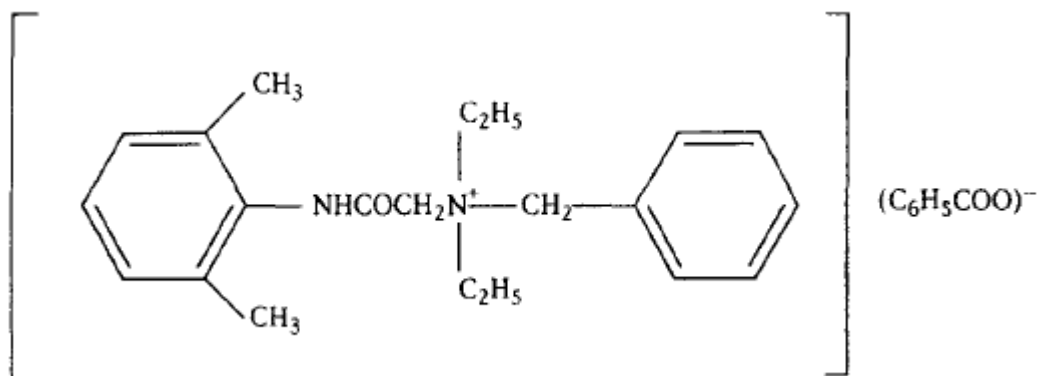
- ANONYMUS (1997): Zákon o lihu, 61/1997 Sb.
- ANONYMUS (2010): Bezpečnostní list podle nařízení (ES) č. 1907/2006, ve znění nařízení 453/2010/EC – DENATONIUM BENZOÁT (Bitrex). Dostupné na:
http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/d/bezplist_269.pdf., [cit 22-01-2014].
- BAKER, D.L. – ANDELT, W.F. – BURNHAM, K.P. – SHEPPERD, W.P. (1999): Effectiveness of Hot sauce® and Deer away® repellents for deterring elk browning on aspen sprouts. *Journal of wildlife management*, Vol.63, No.4, pp. 1327-1336, 1999.
- BERGQUIST, J. – ÖRLANDER, G (1996): Browning deterrent and phytotoxic effects of roe deer repellents on *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*, Vol. 11 pp.145–152.
- BOSLAND, W.K. – BOSLAND, P.W. (2000): Preliminary field tests of capsaicinoids to reduce lettuce damage by rabbits. *Crop protection*, Vol. 2001, No. 20, pp. 535-537, 2000.
- CURTIS, P.D. – ROWLAND, E.D. – CURTIS, G.B. – DUNN, J.A. (2000): Capsaicin-treated seed as a squirrel deterrent at birdfeeders" (2000). *Wildlife Damage Management Conferences Proceedings*. Paper 18.
Dostupné na: <http://digitalcommons.unl.edu/icwdm_wdmconfproc/18>, [cit. 22-01-2014].
- ČSN 48 1211. Lesní semenářství – Sběr, kvalita a zkoušky kvality semenného materiálu lesních dřevin. 1. 4. 2006. 60 s.
- FINDŮ, S. (2010): K vývoju repelentov na ochranu kmeňov lesných drevín proti poškodzovaniu zverou. In: Aktuálne problémy v ochrane lesa 2010, Zborník referátov z medzinárodného seminára, 15. a 16. apríla 2010 v Novom Smokovci. Editor: Ing. Andrej Kunca, PhD. Národné lesnícke centrum vo Zvolene 2010, prvné vydání, 152 stran. ISBN 978 – 80 – 8093 – 108 – 7.
- FINDŮ, S. (2012): Repelenty jako súčasť integrovanej ochrany lesa proti škodám zverou. In: Aktuálne problémy v ochrane lesa 2012, sborník referátů z 21. mezinárodní konference v Novém Smokovci, 12. a 13. 4. 2012. Editor: Ing. Andrej Kunca, PhD. Národní lesnické centrum ve Zvolenu 2012, první vydání, 170 stran.
ISBN 978 – 80 – 8093 – 161 – 2.
- FITZGERALD, CH. S. - CURTIS, P.D. – RICHMOND, M.E. - DUNN, J. A (1995): Effectiveness of Capsaicin as a Repellent to Birdseed Consumption by Gray Squirrels.

- National Wildlife Research Center Repellents Conference 1995*. Paper 16. Dostupné na: <http://digitalcommons.unl.edu/nwrcrepellants/16>
- GOSLING, P. G. – BAKER, C. (2004): Six chemicals with animal repellent or insecticide properties are screened for phytotoxic effects on the germination and viability of ash, birch, Corsican pine and sycamore seeds. *Forestry*, Vol. 77, No. 5: nestr.
- HAVRÁNEK, F. – BUKOVJAN, K. – CZUDEK, R. (2010): Snižování škod zvěří na lese. Dostupné na: <http://www.profimysl.cz/um-vyzkum>, [cit. 12-02-2014].
- HENDERSON, M.C. – NEUMANN, C.M. – BUHLER, D.R. (1998): Analysis of denatonium benzoate in Oregon consumer products by HPLC. *Chemosphere*, Vol. 36, No. 1, pp. 203-210, 1998.
- HENDERSON, K. – WADE, G. – JACKSON, J. (2013): Effect of Repellex™ Deer Repellent on Browsing of Container-grown Ornamental Shrubs. Dostupné na: <http://www.canr.org/99003.pdf>, [cit. 17-02-2014].
- KAUKEINEN, D. E. – BUCKLE, A. P. (1992): Evaluations of a versive agents to Increase the selectivity of rodenticides, with emphasis on denatonium benzoate (Bitrex®) bittering agent. Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference 1992. Paper 42. Dostupné na: <http://digitalcommons.unl.edu/vpc15/42>, [cit. 16-03-2013].
- KUBÍKOVÁ, J. (2005): Ekologie vegetace střední Evropy, díl první, Karolinum, Praha, 2005. Dotisk prvního vydání, 129 stran.
- LEHMKUHLER, J.W. – FELTON, E.E.D. – SCHMIDT, D.A. – BADER, K.J. – GARRET, H.E. – KERLEY M.S. (2003): Tree protection methods during the silvopastoral-system establishment in midwestern USA: Cattle performance and tree damage. *Agroforestry systems*, Vol. 59, pp. 35-42, 2003.
- LEVAR, T. E. (2007): Systemic plant conditioning composition: United States, Patent Application Publication, US 2007/0104751. May 10, 2007.
- OBER, H.K. - KANE, A. (2012): How to Use Deterrents to Stop Damage Caused by Nuisance Wildlife in Your Yard. Dostupné na <http://edis.ifas.ufl.edu>, [cit. 10-02-2013].
- RIES, S. – BAUGHAN, R. – NAIR, M.G. – SCHUTZKI, R (2001): Repelling animals from crops using plant extracts. *HortTechnology* (2001), Vol 11, No. 2, pp. 302-307, 2001. Dostupné na: <http://horttech.ashspublications.org/content/11/2/302.full.pdf+html>, [cit. 12-02-2014].

- SANTILLI, F. – MORI, L. – GALARDI, L. (2004): Evaluation of three repellents for the prevention of damage to olive seedlings by deer. *Wildlife Research* (2004), Vol. 50, pp. 85-89, 2004.
- SKOLIL, J. (2012): Kapaliny do ostříkovačů – toxicita kontra cena. *Petrol*, 2012, číslo 3.
- ŠEBEŇ, V. - BOŠELA, M. (2012): Mladé lesné porasty a ich poškodzovanie zverou podľa NIML SR. In: Aktuálne problémy v ochrane lesa 2012, sborník referátů z 21. mezinárodní konference v Novém Smokovci, 12. a 13. 4. 2012. Editor: Ing. Andrej Kunca, PhD. Národní lesnické centrum ve Zvolenu 2012, první vydání, 170 stran. ISBN 978 – 80 – 8093 – 161 – 2.
- TRENT, A. – NOLTE, D. – WAGNER, K. (2001): Comparison of Commercial Deer Repellents (2001). *USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications*. Paper 572. Dostupné na: http://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/572, [cit. 15-02-2014].
- WAGNER, K.K. – NOLTE, D.L. – (2001): Comparison of active ingredients and delivery systems in deer repellents. *USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications*. Paper 598, 2001. Dostupné na: http://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/598, [cit. 22-01-2014].
- WARD, J.S. – WILLIAMS, S.C. (2010): Effectiveness of deer repellents in Connecticut. *Human-Wildlife Interactions*, Vol. 4, No.1, pp. 56-66, 2010.
- WILLOUGHBY, I.A. – JINKS, R.L. – MORGAN, G.W. – PEPPER, H. – BUDD, J. – MAYLE, B. (2010): The use of repellents to reduce predation of tree seed by wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) and grey squirrels (*Sciurus carolinensis* Gmelin). *Forest Research* (2011), Vol. 130, pp. 601–611, 2010.
- WITMER, G.W. – PIPOES, M.J. – BUCHER, J.C. (1998): Field tests of denatonium benzoate to reduce seedling damage by pocket gophers (*Thomomys talpoides* Rich.). *Crop Protection* Vol. 17, No. I, pp. 35-39, 1998.
- WRIGHT, I.A. – MILNE, J.A. (1994): Aversion of red deer and roe deer to denatonium benzoate in the diet. *Forestry* (1996), Vol. 69, No. 1, pp. 1-4, 1996. Dostupné na: <http://www.forestry.oxfordjournals.org/content/69/1/1.1.abstract>, [cit. 25-02-2014].
- YOUNG, J.S. – SANG, S.L. (1995): Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life sciences*, Vol.56, No.22, pp. 1845-1855, 1995.

8. Přílohy

Příloha č. 1: Chemická struktura látky denatonium benzoát (Young, Sang 1995)



Příloha č. 2: Reklamní prospekt výrobce nabízejícího systémové tablety Repellex®

Repellex Tablets

How REPELLEX™ Systemic Tablets Work...

Simply place the recommended number of tablets directly into root contact, approximately 2-3 inches below the root-collar. The tablet may be placed into growing containers, in the soil at time of transplanting, or in the roots of more developed trees and shrubs.

After the placement of tablets, moisture facilitates the uptake of active ingredients and translocation throughout the plant within 5-6 weeks. The active ingredients will then remain within most annuals and perennials for a full growing season and up to two years in evergreen ornamentals.

Remember that since the tablets do take a few weeks to become fully effective, you will want to use a spray repellent to protect your plants during that time.



Plant Height	Container size	# of ML2s
6-12 inches	1/2 Gal.	1 Tablet
10-24 inches	1/2 Gal.	2 Tablets
6-12 inches	1 Gal.	2 Tablets
10-24 inches	1 Gal.	3 Tablets
24-36 inches	2 Gal.	4 Tablets
28-40 inches	3 Gal.	5 Tablets
32-44 inches	4 Gal.	6 Tablets
36-48 inches	5 Gal.	8 Tablets
>48 inches	Apply 2 tablets/foot height	

Příloha č. 3: prostory laboratoře na detašovaném pracovišti Katedry pěstování lesa Truba
(foto: autor)



Příloha č. 4: skleník na detašovaném pracovišti Katedry pěstování lesa Truba (foto: autor)



Příloha č. 5: systémové tablety Repellex® v komerčně dostupném obalu (foto: autor)

