

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra Aplikovaných rostlinných biotechnologií

Studijní program: P 4102V Fytotechnika
Studijní obor: 4102V002 Obecná produkce rostlinná

**KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ UKAZATELE
PRODUKCE PYLU Z POROSTU KOSTŘAVY ČERVENÉ
(*Festuca Rubra L.*) V ZÁVISLOSTI NA AGROTECHNICE**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
Školitel specialista: prof. Ing. Jan Tříška, CSc.
Doktorand: Ing. Alena Ratajová

2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů, zdrojů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích dne2013

Práce byla vypracována na Katedře aplikovaných rostlinných biotechnologií Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Č. Budějovicích v období 2009 – 2013 s finanční podporou Czech Globe – Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i. sekce impaktových studií a fyziologických analýz, Reg. No. CZ. 1.05/1.1.00/02.0073 a s finanční podporou MŠMT (projekt č. MSM 6007665806).

Poděkování:

Děkuji svým školitelům - panu prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc., prof. Ing. Janu Třískovi, CSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při zpracování mé disertační práce.

Dále pak děkuji za cenné rady, podporu a součinnost během celého výzkumu panu prof. Ing. Ladislavu Kolářovi, CSc. a paní Ing. Marii Čechové (JU v ČB, ZF – Katedra Aplikovaných rostlinných biotechnologií), paní RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. (Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Laboratoř metabolomiky a izotopových analýz), panu doc. RNDr. Václavu Nýdlovi, CSc. a paní RNDr. Janě Klicnarové, Ph. D. (JU v ČB, EF – Katedra aplikované matematiky a informatiky), kolektivu pracovníků společnosti TAGRO Červený Dvůr, spol. s r.o. (zejména panu Ing. Janu Smržovi, Ing. Slavomíru Beranovi, Ing. Martině Beranové, Ph. D.), společnosti BONAPOL a.s. (zejména panu Jiřímu Tomkovi, Ing. Petru Jehlíkovi), dále pak RNDr. Tomášovi Hájkovi, Ph. D. (JU v ČB., PF - Katedra experimentální biologie rostlin), společnosti SEVAPHARMA a.s. (zejména panu RNDr. Ladislavu Burešovi, CSc., Ing. Mgr. Alešovi Pernickému), panu Ing. Pavlu Kutmonovi (Limagrain Central Europe Cereals s.r.o.).

Děkuji rovněž společnosti OSIVA BORŠOV, spol. s.r.o (zejména panu Ing. Václavu Benadovi) za podporu a umožnění výzkumu v součinnosti se zaměstnáním.

ANOTACE

V disertační práci se pojednává o problematice **vlivu různé úrovně výživy travních porostů dusíkem na změny chemické skladby pylového zrna a na změny jeho alergenicity.**

V současné době otázka pěstování travních porostů velice aktuální. Travních porostů se pěstuje stále více a více z různých důvodů. Např. v posledních letech silně poklesl stav mléčného skotu a naopak silně narostl význam chovu masných plemen, která jsou vázána na pastevní programy. Dotační tituly směřující do této oblasti využití zemědělské půdy jsou ekonomicky velmi zajímavé. Navíc, kromě běžných ploch, jsou tedy systematicky zakládány semenářské porosty trav pro výrobu certifikovaných osiv (ve větším rozsahu), která se používají následně pro zásev pastevních a lučních porostů.

Současné celosvětové zemědělství, zejména v marginálních oblastech (LFA), hledá nové a alternativní způsoby využití zemědělské produkce. Jedním z nich je i cílená produkce biomasy trav. Tato je významnou součástí celkového potenciálu biomasy, jako obnovitelného přírodního zdroje využitelného pro energetické účely v podmínkách např. i České republiky. Energetické využití trav je novým směrem jejich využití v průmyslu a vytváří nové možnosti pro výzkum v této oblasti a praktickou realizaci. V současnosti je výzkum energetických trav zaměřen na realizaci spalování travní biomasy v technických zařízeních a využití trav pro produkci bioplynu.

Soudobým trendem je nejen výzkum ekonomického přínosu, ale i výzkum dopadu nových trendů na životní prostředí, krajinu a obyvatelstvo. Během posledních dvou desetiletí stoupl výskyt alergií v některých civilizovaných státech na 30 – 40% populace. Již každý čtvrtý až pátý člověk trpí alergií.

Disertační práce je pilotním projektem, který propojuje zemědělství se současnými poznatky farmaceutického průmyslu, chápe pyl jako sekundární - finální produkt rostliny a hledá odpovědi na otázky dopadu různé úrovně výživy travních porostů na lidské zdraví.

OBSAH

1	ÚVOD.....	5-6
2	CÍL PRÁCE.....	7
	2.1 Hlavní cíle.....	7
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8-60
	3.1 Travní porosty.....	8
	3.2 Kostřava červená (<i>Festuca rubra</i> L.).....	8
	3.2.1 Taxonomie	8-9
	3.2.2 Výskyt.....	10
	3.2.3 Základní využití.....	10-11
	3.2.4 Alternativní využití.....	11
	3.2.5 Odrůda Tagera.....	11
	3.2.6 Semenářské porosty.....	12-13
	3.2.7 Obligátní vegetativní fáze, kvetení.....	13-14
	3.2.8 Agrotechnika.....	14
	3.2.9 Výživa a hnojení.....	14-17
	3.2.9.1 Srovnání novosti postupů.....	17-18
	3.2.9.2 Vědecky zdůvodněná výživa trvalých travních porostů.....	18-20
	3.2.9.3 Spolurozhodující faktory mající vliv na kvalitu píce.....	21
	3.2.9.3.1 Přirozená úrodnost půdy a vláhové podmínky.....	21
	3.2.9.3.2 Fenofáze – růstová fáze.....	21
	3.2.9.4 Hnojení trvalých travních porostů minerálními hnojivy.....	21
	3.2.9.4.1 Kvalifikované předpoklady.....	21-22
	3.2.9.4.2 Hnojení – N.....	22-24
	3.2.9.4.3 Hnojení – P, K, Mg.....	24-26
	3.2.9.4.4 Vápnění travních porostů.....	26
	3.2.9.5 Hnojení travních porostů statkovými hnojivy.....	27-30
	3.2.9.5.1 Vliv hnojení na porost.....	30-31

	3.2.9.5.2	Hnojení a hospodářský výnos.....	31-32
	3.2.9.5.3	Hnojení a kvalita píče.....	32-33
	3.2.9.6	Právní předpisy upravující hnojení travních porostů dusíkem.....	33-36
	3.2.10	Chemické ošetření.....	36
	3.2.11	Sklizeň.....	36-37
3.3		Pylová alergie.....	37-38
	3.3.1	Historie.....	38-39
	3.3.2	Prevalence polinózy.....	39-40
	3.3.3	Rizikové faktory rozvoje polinózy.....	40
	3.3.3.1	Genetická prepozice.....	40-42
	3.3.3.2	Znečištění životního prostředí.....	42
	3.3.3.3	Intenzita expozice pylovým alergenům.....	42-44
	3.3.4	Pylové zrno.....	44
	3.3.4.1	Morfologie, anatomie.....	44
	3.3.4.2	Fyziologie.....	44-45
	3.3.4.3	Chemická analýza.....	46-47
	3.3.4.4	Alergeny.....	47
	3.3.5	Transport pylu, meteorologické aspekty.....	47-48
	3.3.6	Zkřížené reakce.....	48-49
	3.3.7	Patofyziologie polinózy.....	49-50
	3.3.8	Klinické projevy polinózy.....	50-51
	3.3.9	Diagnostika polinózy.....	51-52
	3.3.9.1	Nefarmakologické možnosti.....	53-54
	3.3.9.2	Specifická alergenová imunoterapie (SIT).....	54-57
	3.3.9.2.1	Specifická imunoterapie alergické rýmy mění koncentrace tryptofanu v krvi.....	57-58
	3.3.10	Farmakoterapie polinózy, celková léčba.....	58-59
3.4		Standardizace alergenů.....	59
3.5		Sběr a výroba pylu.....	59-60
4		MATERIÁL A METODIKA.....	61-91
	4.1	Založení pokusu.....	61
	4.1.1	Lokalita.....	61
	4.1.2	Schema pokusu.....	62-63

4.1.3	Zásev.....	62
4.2	Agrochemické analýzy půdy.....	62
4.2.1	Stanovení sorpční kapacity.....	64
4.2.2	Frakcionace humusových látek (HL).....	64-65
4.2.2.1	Stanovení celkového C _{OX}	65-66
4.2.2.2	Stanovení C _{OX} HL.....	67
4.2.2.3	Stanovení C _{OX} FK a HK.....	67
4.2.3	Horkovodorozpustný uhlík C _{hws}	68
4.2.4	Stanovení C _{PM} (Blair, 1995).....	69-71
4.2.5	Stanovení mineralizovatelného dusíku N _{miner}	71-72
4.3	Agrotechnika, metodika výživy a hnojení.....	72-73
4.4	Metodika sběru pylu.....	73-74
4.5	Metodika úpravy pylu, měření velikosti pylového zrna	75
4.6	Chemické analýzy.....	75
4.6.1	Extrakce fenolických látek z upraveného pylu.....	75-76
4.6.2	HPLC analýza.....	76
4.6.3	LC – MS analýza.....	76-77
4.7	Alergologické analýzy.....	77
4.7.1	Extrakce alergenů.....	77
4.7.2	ELISA test.....	77-84
4.7.3	SDS – ELFO.....	85-91
4.8	Statistika.....	91
5	VÝSLEDKY.....	92-127
5.1	Agrochemické analýzy půdy.....	92
5.1.1	Základní analýzy.....	92
5.1.2	Doplňkové analýzy.....	92-97
5.2	Agrotechnika, hnojení porostu.....	97-98
5.3	Stanovení obsahu dusíku v nadzemních částech rostlin.....	98-99
5.4	Sběr pylu.....	99-100
5.5	Úprava pylu.....	100-103
5.5.1	Mikroskopické analýzy.....	104, 105-107
5.5.2	Velikost pylového zrna.....	104, 108-109
5.6	Chemické analýzy.....	109-114
5.7	Alergologické analýzy.....	115

5.7.1	ELISA test.....	115-120
5.7.2	SDS – PAGE.....	120-122
5.8	Skližeň semene, semenářský výnos.....	123-124
5.9	Statistika.....	125
5.9.1	Statistika výsledků chemických analýz.....	125-128
6	DISKUSE.....	128-138
7	ZÁVĚR.....	139-140
8	SUMMARY	141-143
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	144-158
10	SEZNAM TABULEK.....	159
11	SEZNAM OBRÁZKŮ (v textu).....	160
12	PUBLIKACE.....	161
13	SEZNAM PŘÍLOH.....	162
14	PŘÍLOHY	

ÚVOD

Kostřava červená patří mezi rhizomatické trávy (s oddenky podzemními) [KOBES 2009]. Roste na všech půdních druzích, a to i v subalpinském pásmu. Vyskytuje se na evropském, asijském, americkém a africkém kontinentu. [HRUBIŠKO a kol. 2003]. Z ekologického hlediska je to naše nejskromnější tráva, nejvíce rozšířená na mezooligotrofních půdách. Poměrně dobře přežívá sucho a horko, lze ji využít i na částečně zastíněných stanovištích, může se uplatnit při mírném, dočasném zamokření. Pícní trávy rostou na půdách s pH od 5,0 – 7,5. Dusík je nejučinnějším výnosotvorným faktorem; jeho návratnost u trav je mimořádně vysoká. Kostřava červená se však spokojí i s nízkou úrovní N – hnojení. Všechny odrůdy mají vysokou odolnost k vyzimování, vysokou vytrvalost a nenáročnost na půdní a klimatické podmínky [CAGAČ a kol. 2004].

Dosavadní využití trav a výzkum různé úrovně výživy směřoval zejména do oblasti využití trav v zemědělské praxi pro výživu hospodářských zvířat [HRABĚ a kol. 2004] nebo v rámci pěstování travníků [HRABĚ a kol. 2003].

Dalším trendem jsou výzkumy (zejména v Polsku), které zkoumají pyl jako alternativní potravinu určenou pro lidskou výživu s koncentrovanou vysokou nutriční hodnotou v malém objemu (podobně jako mořské řasy); pro sportovce, kosmické programy, pro rekonvalescenci pacientů apod. Pyl je rovněž součástí kosmetických přípravků. V 90. letech 20. stol. se zvažovalo i o alternativním využití travních ploch pro výrobu přírodního chlorofylu pro potravinářské účely [GÁBORČÍK 1988]. Novým současným (nízkonákladovým) trendem je výzkum energetických trav zaměřený na realizaci spalování travní biomasy v technických zařízeních a využití trav pro produkci bioplynu [FRYDRYCH a kol. 2005, 2006].

Pěstování trav pro různé alternativní využití má v současné době vzestupný trend, a proto byl výzkum v rámci disertační práce zaměřen na otázky dopadu různé úrovně výživy travních porostů na životní prostředí a lidské zdraví.

První známá epidemiologická studie (ze Švýcarska z roku 1921) ukázala výskyt alergie u 1% populace. Jen za poslední dvě desetiletí stoupl výskyt alergií v některých civilizovaných státech na 30 – 40% populace [HRUBIŠKO a kol. 2003]. Alergická onemocnění jsou problémem zejména civilizovaných států; každý čtvrtý až pátý člověk trpí alergií. Významnou roli hraje dědičnost [DIETHAR a kol. 2007, POLLENINFO

2009]. Více než třetina lidí v ČR v sobě nosí geny pro alergii. Čtvrtina lidí se opravdu v průběhu svého života projeví alergickým onemocněním. Zatímco astmatiků je v České republice přibližně 800 tisíc, alergickou rýmu trpí nejméně 1,3 miliónu lidí a počet exematiků se blíží jednomu milionu [ŠPIČÁK a kol. 2005].

Alergické příznaky jsou vyprovokovány při určitých koncentracích pylových zrn ve vzduchu. V průměru stačí již $5 - 50 \text{ zrn} \cdot \text{m}^{-3}$ [ESCH 1999]. Onemocnění způsobené pylovými alergeny označujeme termínem polinóza. Projevuje se jako senná rýma, sezónní alergické postižení spojivek, horních cest dýchacích, kůže a pylové astma. [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004].

Kostřava červená (*Festuca Rubra L.*) patří mezi větrosnubné rostliny, spadající do druhého období pylové sezón tj. první polovina léta [ŠPIČÁK a kol. 2005]; patří k nejvýznamnějším druhům polinózních trav v Evropě. Právě proto byl tento travní druh (odrůda Tagera) vybrán pro výzkum (z hlediska nenáročnosti a celosvětového rozšíření v kontextu na alergologii).

Imunologie je vědní disciplína zabývající se obrannými reakcemi organismu; klinická imunologie je její část, která je integrovanou součástí medicíny. Neoddělitelnou částí klinické imunologie je alergologie. Antigeny, indukující specifickou protilátkovou odpověď typu IgE se nazývají alergeny. Smyslem standardizace antigenů je vyrábět antigeny s přesným a reprodukovatelným složením a účinkem a využít je v alergenové imunoterapii [FERENČÍK a kol. 2002, BUC 2001, NYULASSY 2002].

Pyl trav je současnými trendy chápán nejen jako zárodečná buňka sloužící k reprodukci druhu, ale i jako finální komerční produkt - jako surovina pro farmaceutický průmysl, kdy lze cíleně získat kvalitativně i kvantitativně lepší či horší surovinu pro výrobu extraktů sloužících pro výrobu prick testů a následně léčiv [HOCHOVÁ 2003].

Výsledky Disertační práce konfrontují ekonomicky zajímavé nové alternativní trendy pěstování trav s možným následným dopadem na zdraví obyvatelstva.

2 CÍL PRÁCE

2.1 HLAVNÍ CÍLE

Cílem práce bylo prokázat vliv různé úrovně výživy (N-hnojení) porostu kostřavy červené (*Festuca Rubra L.*) na kvalitu produkovaného pylu (tj. vyčištěného a upraveného pylu – jako finální suroviny pro farmaceutický průmysl) a to:

- zda dochází ke změnám chemické skladby pylového zrna (chemické změny)
- zda je ovlivněn alergenní profil extraktu (biologické změny)

Dále pak zjistit:

- zda dochází ke změnám velikosti pylového zrna
- zda sběrem pylu bude ovlivněn semenářský výnos porostu

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 TRAVNÍ POROSTY

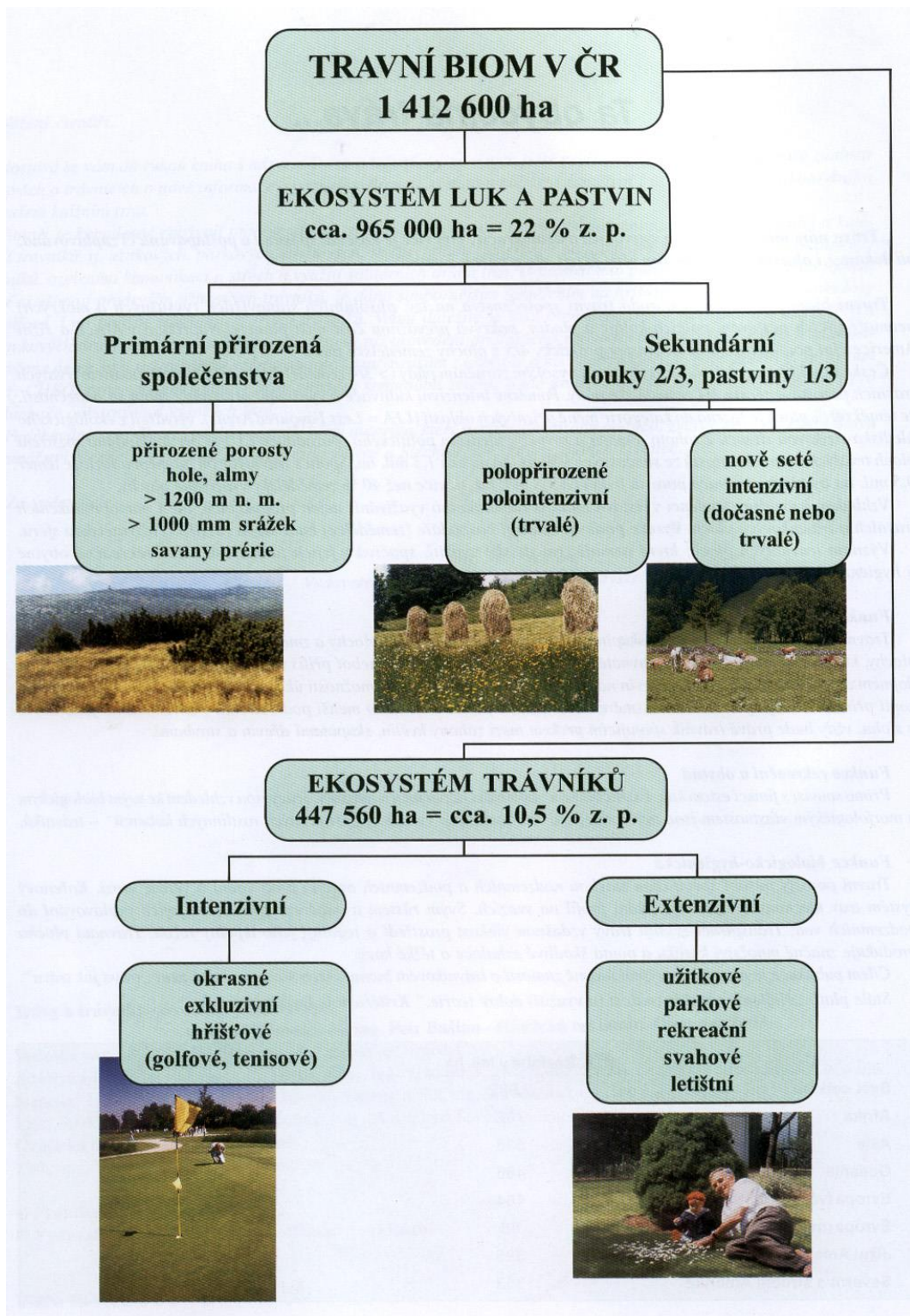
Travní biom v ČR se rozprostíral již v roce 2002 na celkové výměře 1 412 600 ha, z toho ekosystém luk a pastvin 965 00 ha (22% zemědělské půdy; 2/3 louky a 1/3 pastviny) a ekosystém trávníků na 447 560 ha (10,5% z. p.) (viz Obr. 1) [HRABĚ 2003]. Zvyšování zatravněných ploch stále stoupá. Tyto plochy se nacházejí ve všech výrobních oblastech, zejména však v pícninářských. Obvykle mají pozici horších půdních, vodních a terénních stanovišť (kambisoly, podzosoly, stagnosoly). Přibližně 25% trvalých travních porostů leží v CHKÚ. Z výsledků agrochemických rozborů ÚKZÚZ vyplývá, že 38% půd je slabě kyselých a 32% kyselých až extrémně kyselých; dále pak, že malý až velmi malý obsah přístupného P v půdě má 41%, K 24 %, a Mg pouze 6% ploch. Půda pod trvalými travními porosty má vyšší obsah organické hmoty, s vyšším podílem surového humusu (tedy i širším poměrem C : N) než u orné půdy (kde je naopak vyšší stupeň humifikace) [HOUBA, HOSNEDL 2002].

3.2 KOSTŘAVA ČERVENÁ (*Festuca Rubra L.*)

3.2.1 TAXONOMIE

Kostřava červená (*Festuca rubra L.*) je víceletá nižší tráva [REGAL 1953]. Patří do říše: Rostliny (*Plantae*), podříše: Cévnaté rostliny (*Tracheobionta*), oddělení: Krytosemenné (*Magnoliophyta*), třída: Jednoděložné (*Liliopsida*), čeleď: Lipnicovité (*Poaceae* – zastarale Trávy – *Graminae* – termín dosud používaný v USA), podčeleď: Vlastní lipnicovité (*Pooideae*). [GÁBORČÍK 1988].

Kostřava červená patří mezi rhizomatické trávy (s oddenky podzemními) [KOBES, VESELÁ 2009]. Odrůdy kostřavy červené jsou členěny do třech morfologicky odlišných forem: výběžkatá (*Festuca rubra rubra*), krátce výběžkatá (*Festuca rubra trichophylla*) a trsnatá (*Festuca rubra commutata*).



Obr. 1 Travní biom v ČR [HOUBA, HOSNEDL, 2002]

3.2.2 VÝSKYT

Roste na všech půdních druzích, a to i v subalpinském pásmu [VESELÁ 2009]. Vyskytuje se na evropském, asijském, americkém a africkém kontinentu. [HRUBIŠKO 2003]. Z ekologického hlediska je to naše nejskromnější tráva, nejvíce rozšířená na mezo oligotrofních půdách. Poměrně dobře přežívá sucho a horko, lze ji využít i na částečně zastíněných stanovištích, může se uplatnit při mírném, dočasném zamokření. O možnostech uplatnění a výnosech jednotlivých druhů trav rozhodují především vlhkostní poměry. Pro intenzivní travní porosty jsou vhodné oblasti s ročním úhrnem srážek 600 – 700 mm, v závislosti na půdních vlastnostech a na množství přístupných živin. Transpirační koeficient u trav je variabilnější než u jetelovin (300 – 1000) a lze ho výrazně snížit hnojením až o 30 – 50%. Po intenzivním hnojení klesá na 300 – 400 [CAGAŠ a kol. 1989].

3.2.3 ZÁKLADNÍ VYUŽITÍ

Patří mezi základní trávy víceletých pícnin, mezi jejichž základní funkce patří produkční výroba píce, mimoprodukční funkce – ochrana půd před vodní erozí, v jetelotravní směsi působí jako vysoce účinný biologický filtr kořenového systému – proti úniku nitratového N do podzemních vod [CAGAŠ a kol. 1989]. Je velmi přizpůsobivá a hojně zastoupená v různých typech travních porostů. Šlechtí se pro travníkové a pícninářské využití. Pro pícninářství má největší význam dlouze výběžkatá forma. Odrůdy se uplatňují v extenzivně obhospodařovaných lučních a pastevních porostech na extrémnějších stanovištích (ve vyšších polohách a chudších půdách); zaplňují spodní patro porostu a zvyšují stabilitu drnu. Kvalita píce je průměrná; je vhodná především do směsek s nižší až střední úrovní výživy, případně pro dočasné porosty (max. 4 užitkové roky) [GÁBORČÍK 1988]. Výhodou trav v extenzivních oblastech je poměrně vysoká odolnost vůči dočasným přísuškům, chorobám a škůdcům [IGER ANNUAL REPORT 1995/96]. Pícní trávy rostou na půdách s pH od 5,0 – 7,5.

Dusík je nejúčinnějším výnosotvorným faktorem, jeho návratnost u trav je mimořádně vysoká. Kostřava červená se však spokojí i s nízkou úrovní N – hnojení [CAGAČ a kol. 1989]. V nehnojených extenzivně využívaných porostech často zcela převládá. Usměrněnou pastvu snáší dobře, ale při nadměrném sešlapávání ustupuje,

stejně jako při vyšších dávkách N – hnojení (nejlépe jí vyhovuje dávka N do 100 kg.ha¹) [KOBES 2009]. Všechny odrůdy mají vysokou odolnost k vyzimování, vysokou vytrvalost a nenáročnost na půdní a klimatické podmínky [VŠÚP TROUBSKO 1988]. Jedná se o odolnou, otužilou travu, její oddenky obsahují značné zásoby rezervních látek, umožňujících její rychlý jarní vývoj [CAGAČ a kol. 1989]. Výběžkatá forma se obvykle používá pro fairway a rough golfových hřišť; krátce výběžkatá a trsnatá forma se používá pro golfové greeny, kde vytváří jemný a hustý travní koberec [HRABĚ 2003, ŠANTRŮČEK 1993].

3.2.4 ALTERNATIVNÍ VYUŽITÍ

Již kolem roku 1988 se na základě výzkumu uvažovalo o alternativním využití travních ploch pro výrobu přírodního chlorofylu pro potravinářské účely [GÁBORČÍK 1988]. Nově lze použít také jako biomasa pro energetické využití (spalování biomasy, bioplynové stanice) [FRYDRYCH a kol. 2005, MAROUŠEK 2013)].

3.2.5 ODRŮDA TAGERA

Odrůda Tagera byla vyšlechtěna na šlechtitelské stanici Červený Dvůr s.r.o., v roce 1996 byla registrována v ČR a v roce 1998 v EU. Má polovzprímený, hustý trs tmavě zelené barvy, velmi dobře olistěný, s dlouhými výběžky. Vytváří bohaté přízemní listy, je intenzivně výběžkatá, málo poléhavá, vytváří hustý porost a kompaktní drn. Rychle obrůstá, stéblo je středně jemné, květenství středně dlouhé. Je odolná proti listovým chorobám a proti zasychání špiček listů [TAGRO 1999]. Obilky jsou osinaté [ŠAŠKOVÁ, ŠTOLFA, 1993]. Výhodou je ekologická nenáročnost a odolnost. Lze využít od nížin až po horské pásmo, na všech půdách, dobře vyrovnává nedostatek i přebytek vláhy, lze pěstovat při slabé až střední zásobě živin. Zařazuje se do směsí pro luční a pastevní využití, pro technické využití do trávníků rekreačního typu, parkových a hřištních ploch. Vhodné je i využití v protierozních opatřeních a komunikačních porostech [TAGRO 1999].

3.2.6 SEMENÁŘSKÉ POROSTY

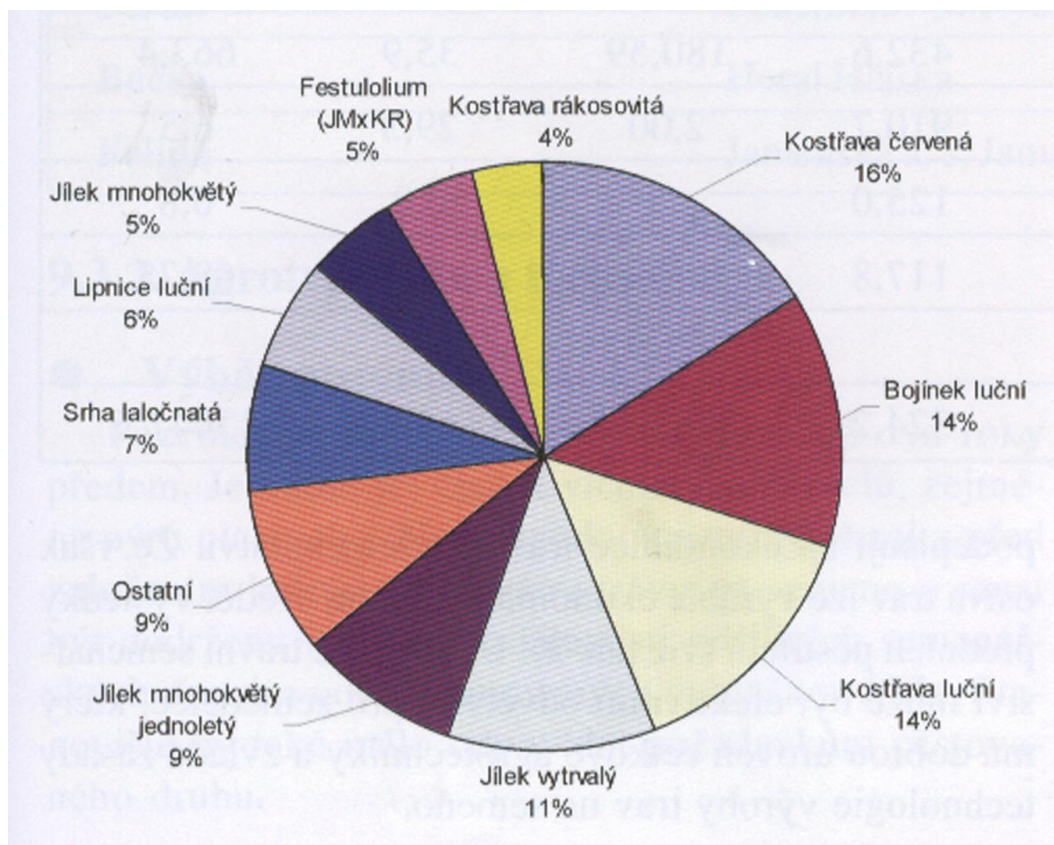
Celková plocha travních porostů na zemědělské půdě v ČR činí přes 1,4 milion ha. Plocha množení se pohybuje okolo 14 – 15 tis. ha [HOUBA, HOSNEDL, 2002].

Pro semenné porosty trav (Obr. 2) jsou příznivé častější srážky, zejména v průběhu jara a na počátku léta. Důležitá je v tomto období i vyšší vzdušná vlhkost, zejména v době květu. Naproti tomu v posledních fázích zrání a při sklizni je vhodné slunné bezesrážkové počasí. Pro semenářství trav jsou příznivé půdy středně těžké, hlinité, s dobře nasyceným sorpčním komplexem [ŠPIČÁK 2003, ŠRÁMEK, TVRZ 1990]. Po výsevu je vývoj v prvním roce pozvolný, plně se uplatňuje až v dalších letech [CAGAČ a kol. 1989].

Většina druhů trav je ozimého charakteru, kde o výnosu semen rozhoduje počet odnoží vytvořených na podzim. Podporu jejich tvorby je nutno zajistit dostatečnou výživou a osvětlením odnožovacích uzlin (optimalizace dusíkatého hnojení aj.). Vzhledem k intenzivnímu hospodaření v minulosti dochází často u některých druhů půd k deficitu mikroprvků, které mohou být limitující pro tvorbu výnosu semen trav [CAGAŠ, FRYDRYCH 2005]. Intenzitu podzimního odnožování zvýšíme především aplikací dusíkatých hnojiv koncem léta [FAIREY, LEFKOVITCH 2000].

Semenářské porosty se běžně ošetřují vhodnými pesticidy, ale pro sběr pylu pro farmaceutické využití je naprosto vyloučeno jakékoliv chemické ošetření porostu dle směrnice [EMEA 2008].

(Z dosavadních výzkumů je třeba při zakládání porostů poblíž lesních porostů přihlížet např. i k alelopatickým účinkům Borovice (*Pinus sylvestris* L.), která má výrazně inhibiční účinky při klíčení trav apod.) [BULUT, DEMIR 2007].



Obr. 2 Struktura semenářských porostů [HOUBA, HOSNEDL, 2002]

3.2.7 OBLIGÁTNÍ VEGETATIVNÍ FÁZE, KVETENÍ

Převážná většina trav dozrává již 3 – 4 týdny po plném kvetení. Květenstvím je nafialovělá vzpřímená lata [VŠÚP TROUBSKO 1988]. Jedna lata produkuje až 5 milionů pylových zrn. Počet kvítků v klásku je 4 – 6; květ obsahuje 3 prašníky. Kvítek zůstává otevřený a tím přístupný opylení velice krátkou dobu (zpravidla jen pár hodin). Většina trav v ČR kvete zrána (maximum mezi 5,00 – 9,00 hod.); je však i mnoho výjimek – některé trávy kvetou v poledne, případně i v noci. Teplota a relativní vlhkost vzduchu mají největší vliv na průběh kvetení. Negativní vliv na průběh kvetení má déšť.

Dříve než může nastoupit fáze kvetení, většina trav musí projít obligátní vegetativní fází. U kostřavy červené může trvat i několik měsíců (co určuje minimální délku vegetativní fáze - není známo) [MÍKA 2002]. Délka může být měřena buď na časové ose nebo počtem listů vytvořených vegetačním vrcholem před vytvořením květního orgánu [LANGER 1972]. Hlavními faktory, které řídí přechod z vegetativního

do reprodukčního růstu trav je fotoperioda a teplota. Indukci lze definovat jako vnímání signálů prostředí buď přímo vegetačními vrcholy (teplota) nebo listy (fotoperioda) V případě listů musí být vnímání provázeno syntézou a transportem florigenních signálů do vrcholu na vegetačním výhonu [HEIDE, 1994, AAMLID a kol. 1997]. Mnoho vytrvalých travních druhů má dvojí požadavky na indukci: Rostliny musí projít účinky zimy (krátkého dne nebo nízkých teplot) – „primární indukce“ dříve, než se u nich objeví odezva na prodloužení délky dne a kvetou – „sekundární indukce“ [MÍKA 2002]. Kostřava červená patří do skupiny trav s extrémními induktivními požadavky [CALDER 1966]. Průběh opylení bývá intenzivnější za teplého počasí a při nízké vlhkosti vzduchu [MÍKA 2002].

3.2.8 AGROTECHNIKA

Odrůda *Tagera* není náročná na půdní a klimatické podmínky. Nejvhodnější jsou půdy střední a lehčí v bramborářské oblasti. Doporučuje se výsev na jaře – nejlépe v dubnu; do krycí plodiny (pšenice jarní, oves setý, ječmen jarní - se sníženým výsevem krycí plodiny max. 80 – 100 kg . ha⁻¹ osiva). Výsev kostřavy červené 16 kg . ha⁻¹, hloubka setí 10 – 15 mm, šířka řádků 125 – 250 mm. Setí kolmo na řádky krycí plodiny.

Na půdách bez plevelů lze provádět i přímý výsev (čistosev) bez krycí plodiny. Při výsevu do krycí plodiny po sklizni krycí plodiny provést v září 1 x odplevelovací seč na vyšší strniště 70 – 80 mm. Při výsevu bez krycí plodiny provést až 2 odplevelovací seče (koncem července a počátkem září), též na vyšší strniště. V užitkových letech (2. a dalších letech vegetace) vyhovují kostřavě červené nejlépe 2 seče (1. v červnu a 2. počátkem září); při vyšším zaplevelení a na vlhčích a úrodnějších půdách 3 seče (1. počátkem června, 2. koncem července a 3. počátkem září) [TAGRO 1999].

3.2.9 VÝŽIVA A HNOJENÍ

Názory na určení optimální dávky N – hnojení a zejména její rozložení nejsou univerzální a zcela jednotné; vždy je třeba přihlížet zejména k využití porostu pro dané účely. Různé dávky N ovlivňují hustotu a tloušťku listů. Např. dle výzkumu CAGAŠE

2004 se nejlépe osvědčila varianta s aplikací 75 kg . ha⁻¹ v první dekádě října [CAGAŠ 2005].

Hnojení travních porostů bude v budoucnu orientováno na efektivní využívání statkových hnojiv a bude limitováno podle § 33 odst. 2 zákona 254/2001 Sb. v platném znění, které je poplatné nitrátové směrnici EU [FRYDRYCH a kol. 2006, GILSUM, BOELT 2009].

Dusík je součástí bílkovin, mezi které patří i enzymy. Aplikací N – hnojiv se jejich koncentrace v asimilačních pletivech trav zvyšuje. Platí to i pro enzym, podílející se na fixaci CO₂ v procesu fotosyntézy, ta se potom zvyšuje, což znamená, že za stejnou dobu se v listových pletivech vyváže více CO₂ než v rostlinách s nižší dávkou N. Vyšší dávka N se také kladně odráží na biosyntéze základního barviva – chlorofylu. [GÁBORČÍK 1988, ROGERS 1980, FICHTER, SCHULZE 1992]. Dusík má též velký význam na odnožování trav a urychluje růst listů, dále zasahuje do vodního režimu trav, přičemž při vyšších dávkách se snižuje intenzita transpirace a zvyšuje se efektivita využití vody. Na aplikaci N – hnojiv citlivě reaguje i proces přerozdělení vytvořených asimilátů (sušiny) mezi nadzemní a podzemní částí porostu (ve většině případů se více asimilátů akumuluje v nadzemní části rostlin a klesá množství akumulované kořenové hmoty [GÁBORČÍK 1988]. Po semenářské seči aplikujeme 2. dávku N při výšce mladých listů 40 – 100 mm pro podporu plodných odnoží [TAGRO 1999, ŠRÁMEK, TVRZ 1990].

Kostřava červená je středně náročný druh na výživu a hnojení. Na loukách a pastvinách převládá na chudších a sušších místech v důsledku menšího konkurenčního tlaku jiných, náročnějších druhů trav (což např. potvrdil i experiment trvajícím 35 let založený na horské louce v Estonsku. V průběhu experimentu se měnilo druhové složení porostu v souvislosti s různou úrovní hnojení N. Kostřava červená byla v hojném výskytu na všech stanovištích, včetně nehnojených N vůbec) [GALKA a kol. 2005].

Průmyslově vyspělé státy mají zpravidla i vyspělé zemědělství a to je dáno v podstatě využitím mechanizace, chemie, energie a vědeckých poznatků. A protože šlo v prvé řadě o ekonomiku, byla sice výsledkem vysoká produktivita práce, ale s více či méně negativním dopadem na přírodní zdroje a tím i potraviny a životní prostředí. Reakcí na tuto situaci jsou **nyní snahy o trvale udržitelný rozvoj, respektive setrvalé zemědělství**. Má-li tedy nadále být setrvalé zemědělství ekologicky únosné a také

ekonomicky přijatelné a rovněž sociálně spravedlivé i humánní, pak jedním ze způsobů dalšího vývoje bude **ekologická intenzifikace** [FIALA a kol. 2007].

Efektivně vyrábět nelze bez určité intenzity pěstování. To znamená, že v lepších podmínkách by se mělo intenzivně využívat především travních porostů obnovovaných, přísévaných a intenzivních trvalých. Každý travní porost se přizpůsobuje svému stanovišti, pokud ho určitou dodatečnou energií nedonutíme změnit strukturu, produkci a kvalitu. To je ovšem rentabilní pouze v lepších půdně – ekologických podmínkách. V horších podmínkách se travní porosty využívají extenzivně nebo při současném nízkém stavu skotu, kdy krmení není prostě potřeba, se pro píci nevyužívají vůbec. Tím se **význam travních porostů ještě více přesouvá na jejich mimoprodukční, ekologické funkce**. Zemědělství je rozhodující součástí péče o krajinu, zachování životního prostředí a rázu krajiny. Obhospodařování travních porostů, tedy i hnojení, musí být v rovnováze se stanovištěm. Jeho úroveň odpovídá produkčním schopnostem dané lokality a účelu využití píce.

Rozhodujícími faktory hospodářského výnosu travních porostů potom jsou: přirozená úrodnost půdy, úroveň výživy, floristické složení, počet a termín sečí, průběh počasí na jaře a ve vegetačním období, zvláště dešťových srážek a složení směsky při obnově, nebo přisevu. V souvislosti s hnojením, nebo obecně ošetřováním travních porostů, je třeba zmínit ještě další tři atributy: kvalitu píce, ekologickou stabilitu porostu a kvalitu a množství vody. Kvalita píce je zpravidla nejvíce ovlivněna fenofází, ve které je porost sklizen a následným uskladněním. Je rovněž závislá na hnojení a v současné době rychlého nárůstu doживosti tomuto trendu nestačí, a proto se používá velký podíl jádra. Strukturální vývoj a stabilita travního porostu je dána agroekologickými podmínkami stanoviště a hlavně způsobem obhospodařování. Pokud je ekosystém schopen vyrovnávat změny způsobené dodatečnou energií ve formě hnojení, frekvence sečí, obnovy a p. a dalšími vnějšími činiteli a přitom zachovat své přirozené vlastnosti a funkce, pak mluvíme o jeho ekologické stabilitě. Ta roste s počtem složek společenstva – biodiverzitou. Variabilní pak jsou výnosy, které jsou ovlivněny hnojením, počtem sečí a průběhem počasí. Značné výkyvy v průběhu počasí v jednotlivých letech způsobují rozdíly na výnosech travní hmoty celkem i v jednotlivých sečích. Dochází tak k závažnému ovlivnění účinnosti dodaných hnojiv i ostatních pratotechnických zásahů. Hnojení travních porostů, zvláště minerálním dusíkem, má jistě významný vliv na podzemní vody. Proto se při něm musí dodržet podmínka, že dávky a způsob hnojení

nenaruší životní prostředí a voda procházející krajinou se co nejdéle zdrží, využije a oteče bez škodlivin [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.1 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Poslední metodika hnojení travních porostů vyšla v roce 1990, jako součást „Komplexní metodiky výživy rostlin“. Zohledňovaly se především základní makroprvky **N, P, K s poněkud menší návazností na obsahy vápníku a hořčíku a nízkým důrazem na statková hnojiva a ekologii.**

V roce 2007 byla vydána Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Praze Metodika pro praxi - Výživa a hnojení travních a jetelovinotavných porostů; která shrnuje veškeré nové dosavadní poznatky a v celkové šíři (dle účelu a intenzity pěstování) přináší doporučení pro praxi. V současné době je hlavním používaným zdrojem informací pro management výživy travních porostů v ČR; (v kapitole 3.2.9 proto čerpám maximum informací vycházejících z tohoto zdroje; zahrnuje nejširší souhrn dosavadních poznatků. Na základě toho byl zvolen následně i management výživy a vedení pokusu).

Současná metodika vychází z potřeby efektivní výroby píce, což bez určité intenzity pěstování nelze a zvláště podporuje její kvalitativní znaky a produkční účinnost. Obhospodařování travních porostů, tedy i hnojení, ale musí být v rovnováze se stanovištěm. Jeho úroveň musí odpovídat produkčním schopnostem dané lokality a účelu využití píce. Proto se opírá o „ekologickou intenzifikaci“.

Již dřívější doporučené způsoby hnojení travních porostů byly v podstatě bilančními metodami. Vycházely ze stanoviště, resp. z jeho produkčních možností a snahy vyrovnat vstupy a výstupy živin. Jednalo se o diferencovaný přístup podle stupňů intenzity, nebo ekologicko - výrobních hladin a těm se přiřadil určitý normativ hnojení. Normativy se ještě korigovaly podle zásob přístupného fosforu a draslíku. Preferovaly se především základní makroprvky N, P, K s poněkud menší návazností na obsahy vápníku a hořčíku a nízkým akcentem na statková hnojiva a ekologii. Bilanční metody používáme s vědomím, že nejsou zcela přesné, ale z agronomického hlediska jsou dostačující. Problém je v kvantifikaci zdrojů i ztrát živin z půdy. Navíc, chování prvků v půdě ovlivňuje pH, výměnná sorpční kapacita, zrnitost, objemová hmotnost, typ půdy,

obsah jílových minerálů a oxidů Fe, Al a Mn, obsah a kvalita organické hmoty, provzdušnění, redoxpotenciál a teplota [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.2 VĚDECKY ZDŮVODNĚNÁ VÝŽIVA TRVALÝCH TRAVNÍCH POROSTŮ

Z dlouhodobých pokusů v ČR (12 roků) vyplývá, že při trojsečném využívání lučního porostu v rozhodujícím horizontu 0,0 – 0,2 m neklesá kyselost půdy (pH) ani na nehnojené variantě, ale jen do celkové dávky dusíku (ve formě LAV) $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Extrémně vysoká dávka $300 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, vysoké výnosy a tím i odčerpání téměř dvojnásobku vápníku sklizní proti kontrole (z 26 na $44 \text{ kg Ca} \cdot \text{ha}^{-1}$), způsobuje již mírný pokles pH. Obsah uhlíku (C_{ox}) má naopak u všech variant mírně sestupnou tendenci. Koncentrace přijatelného fosforu v půdě stoupá při každoročním hnojení $32 \text{ kg P} \cdot \text{ha}^{-1}$ ($72,7 \text{ kg P}_2\text{O}_5$). S rostoucími dávkami dusíku, tedy vyšším výnosem, klesá zásobenost draslíku v půdě, a to až na úroveň 85% původního stavu při ročních dávkách $80 \text{ kg K} \cdot \text{ha}^{-1}$ ($96,4 \text{ kg K}_2\text{O}$). Rovněž obsah hořčíku v půdě klesá při vysokých výnosech, tzn. dávkách dusíku $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ a více. Jeho export výnosem je na nehnojené variantě 15 kg Mg z ha, ale při maximálním hnojení dvojnásobek – $30 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Hořčík je živina při hnojení zanedbávaná a přitom velmi důležitá jak pro nutriční hodnotu píce, tak i v konečném důsledku ve výživě lidí. Zvláště pastevní porosty je třeba hnojit hořčíkem, protože při jarních odběrech, především za chladného počasí, je koncentrace Mg nízká, což ohrožuje skot travní tetanií ($\text{Ca} + \text{Mg} : \text{K} = 1 : \text{max. } 2,2$ – tetanický poměr. Vydeme-li ze situace, že pH i zásobenost živin je v rovnováze, pak dusík exportovaný sklizní převyšuje hodnoty dusíku dodaného hnojením jen do dávky $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$; při vyšších dávkách se již exportuje méně dusíku, než se dodá hnojením, což je ztrátové a vzniká nebezpečí vyplavení nitrátů do podzemních vod (Tab. 1).

Tab. 1 Dusík dodaný hnojením a jeho export sklizní

	Trojsečné využití			Pětisečné využití		
Dávky N ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)	50	150	300	50	150	300
Export N% z dávek	253,2	104,5	60,1	260,8	102,8	67,7

Zvyšováním dávek N klesá jeho produkční účinnost, a to v závislosti na produkčním potenciálu půdy a průběhu meteorologických podmínek. **Porost kostřavy červené je neekonomické hnojit vyšší dávkou než 80 kg N . ha⁻¹.** (Naproti tomu porost trojštětostřhový je ještě rentabilní hnojit dávkou 165 kg N . ha⁻¹ při trojsečném a 145 kg . ha⁻¹ při pětisečném využití). Při těchto dávkách se dlouhodobě dosahovalo výnosu 6,9 resp. 5,6 t sušiny. ha⁻¹. K dosažení maximálního výnosu, tj. 7,4 t . ha⁻¹ bylo třeba u trojsečného využití dávky 270 kg N a u pětisečného porostu k max. výnosu 6,4 t . ha⁻¹ dávky 305 kg N . ha⁻¹ (což je již velice neekonomické).

Při každoročním hnojení dávkou 32 kg P . ha⁻¹ se navrátí exportem živin sklizní následující podíl (%) této dávky (Tab. 2).

Tab. 2 Fosfor dodaný hnojením (32 kg P . ha⁻¹) a jeho export sklizní

	Trojsečné využití			Pětisečné využití		
Dávky N (kg . ha ⁻¹)	50	150	300	50	150	300
Export P (% z dávky 32 kg P . ha ⁻¹)	72,6	91,5	100,3	75,7	89,9	100,2

To znamená, že fosfor dodaný ve hnojivech není při efektivních dávkách kolem 150 kg N . ha⁻¹ využit a bude účelné nehnojit fosforem paušálně, ale zachovat určitý poměr k dusíku. Ten nebude stálý, ale s vyššími dávkami N se bude rozšiřovat (Tab. 3). Vše za předpokladu vyhovující zásobenosti P v půdě i požadované koncentrace v sušině píce (0,3%).

Tab. 3 Výživa travních porostů, dávky a poměr N : P : K

Dávky	N	50	150	300 kg . ha ⁻¹
Dávky	P (P ₂ O ₅)	23 (52)	29 (66)	32 (73)
Dávky	K (K ₂ O)	60 (72)	83 (100)	100 (120)
Poměr	N : P : K	1 : 0,46 : 1,2	1 : 0,2 : 0,55	1 : 0,11 : 0,33

Při každoročním hnojení dávkou $80 \text{ kg K} \cdot \text{ha}^{-1}$ ($96,4 \text{ kg K}_2\text{O}$) se vrátí ve sklizni vždy více drasla, než jsme dodali (Tab. 4). Také u nehnojeného porostu exportuje sklizeň v průměru 60 kg K z 1 ha . Dochází také k uvolňování K z půdy, které probíhá prakticky celoročně, i když není odčerpáván rostlinami. Část se vyplaví, ale část v jarním období pastvy ohrožuje zvířata svou vysokou koncentrací v píci $2,5 - 3\%$. Potřeba zvířat je $0,5\%$ ($0,2 - 1,0$). Proto je vhodné posunout hnojení draslem po prvním pastevním cyklu resp. po 1. seči.

Tab. 4 Export draslíku sklizní při stupňovaných dávkách dusíku

Dávky N ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)	Trojsečné využití			Pětisečné využití		
	50	150	300	50	150	300
Export K (% z dávky $80 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)	148,6	171,7	160,7	138,3	150,3	154,3

Vzhledem k dostatečné koncentraci K v píci není účelné zvyšovat dávky drasla hnojením až na exportovanou výši, která by byla $123 \text{ kg K} \cdot \text{ha}^{-1}$ ($148 \text{ kg K}_2\text{O}$) při hnojení 50 kg N , ale až 143 kg K ($172 \text{ kg K}_2\text{O}$) při hnojení $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$. Tím by docházelo k luxusnímu příjmu drasla. Na druhé straně ale došlo, při dlouhodobém hnojení $80 \text{ kg K} \cdot \text{ha}^{-1}$, k poklesu přijatelného K v půdě, bez ohledu na dávky dusíku, v průměru na 95% původního stavu. Proto bude účelné hnojit intenzivní plochy dávkami podle úrovně dusíkatého hnojení, tedy výnosu sušiny.

Hnojení trvalých travních porostů (neobnovených, nepřisetých, tedy s nižším podílem jetelovin do $10 - 20\%$) minerálními hnojivými, vychází z produkčního potenciálu stanoviště, tj. pH, zásobenosti živinami i typu porostu, průměrných výnosů minulých let a počtu sečí (pastevních cyklů) [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.3 SPOLUROZHODUJÍCÍ FAKTORY (MAJÍCÍ VLIV NA VÝNOS A KVALITU PÍCE)

3.2.9.3.1 PŘIROZENÁ ÚRODNOST PŮDY A VLÁHOVÉ PODMÍNKY

Úrodnost půdy je dána především půdním druhem a typem, mocností ornice a vodními poměry. Na vlhkých až čerstvě vlhkých stanovištích rostou nejkvalitnější druhy s nejvyššími výnosy. Úrodnější pozemek je také charakterizován hlinitou až hlinitojílovitou půdou. Tak například na hlinitopísčité kambizemi (hnědá půda kyselá HPa–37) s žulovým geologickým podkladem s pH 4,3, P 10, K 84 a Mg 32 mg . kg⁻¹, s **dominancí kostravy červené**, byl dosažen dlouhodobý (8 let) výnos sušiny na nehnojeném porostu 1,8 t . ha⁻¹. Travní porost je schopen vylepšit půdy svojí kořenovou soustavou obohacením o organické látky a humus. Zlepšuje tak strukturu a úrodnost půdy [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.3.2 FENOFÁZE – RŮSTOVÁ FÁZE

Pravděpodobně rozhoduje o kvalitě píce nejvýznamněji. U pastevních porostů je optimum ve fázi začátku prodlužování stébel tj. výška porostu 100 – 150 mm a u lučních v začátku metání rozhodujících druhů trav. Stárnutím rostlin, zvláště po vymetání trav, se podstatně snižuje jejich stravitelnost, snižuje obsah dusíkatých látek a využitelná energetická složka – to jsou rozhodující ukazatele kvality [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.4 HNOJENÍ TRAVNÍCH POROSTŮ MINERÁLNÍMI HNOJIVY

3.2.9.4.1 KVALIFIKOVANÉ PŘEDPOKLADY

BPEJ, zranitelná oblast, agrochemické rozbory, normál srážek a teplot a způsob využití. BPEJ (bonitované půdně ekologické jednotky) vyjadřují stanovištní podmínky,

jsou digitalizovány pro jednotlivé parcely a zavedeny na katastrálních úřadech. První číslice pětímístného číselného kódu vyjadřuje klimatický region, druhá a třetí hlavní půdní jednotku (v podstatě půdní typ a druh), čtvrtá sklonitost a expozici a pátá skeletovitost a hloubku půdy. Zranitelné oblasti (nebezpečí znečištění povrchových a podzemních vod dusičnany a zohlednění eutrofizace vod) jsou územně vymezeny katastrálními územími, jejichž seznam je uveden v příloze nařízení vlády č. 103/2003 Sb. ve znění nařízení č. 219/2007 Sb. (změna zranitelných oblastí od 1.9.2007).

Agrochemické rozborů půd se provádí alespoň 1x za 6 let na obsah: pH, (C_{ox}), přijatelný P, K, Mg, ($N_{min.}$) z půdní vrstvy 0 – 200 mm. Srážkové a teplotní třicetileté průměry za rok a vegetační období se získají v nejbližší meteorologické stanici. Pro současnou, praktickou potřebu systému obhospodařování v ČR členíme travní porosty podle produkčního potenciálu stanoviště a způsobu využití (Tab. 5). Protože jsou půdně klimatické podmínky našich stanovišť velice rozdílné, lze podle konkrétních podmínek odvodit další členění s cílem určit přirozenou produkční schopnost toho kterého stanoviště [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.4.2 HNOJENÍ - N

Doporučené dávky jsou variabilní podle výnosů a způsobu využití, tedy stanovišť (viz Tab. 5, 6, 8, 9, 10). V rámci rozpětí jednotlivých dávek se použije úroveň podle místních zkušeností hospodáře – podle ročníku, barvy listů, ekonomiky apod. Snížení dávek dusíku je rovněž možné na dobrých půdách se zastoupením jetelovin v porostu, které „dodávají“ dusík a tak se dosahují dobré výnosy. Celkové dávky dusíku nad 80 kg . ha⁻¹ je třeba dělit k sečím. Přihlíží se k zastoupení jetelovin v porostu, dusík se přidává s ustupující jetelovinou [FIALA a kol. 2007].

Tab. 5 Úroveň výnosů dle způsobu využití a stanoviště

Způsob využití dle		Průměrný výnos v sušině (t . ha ⁻¹)		
		nízký	střední	vysoký
Louka trvalá 1 seč + 1x pastva	extenzivní	1,5	2,0	–
2 seče	extenzivní	2,0	3,5	–
3 seče	intenzivní	5,0	6,0	7,0
přísev 4seče	intenzivní	–	7,0	8,5
dočasná obnova 4 seče	intenzivní	–	7,5	9,0
Pastvina trvalá volná pastva	extenzivní	2,5	4,0	–
trvalá (přisěvaná)	intenzivní	4,0	5,0	6,0
trvalá (1–2 seče, 1–2past.cykly)	intenzivní	3,5	4,5	5,5
Jetelovinotravní směs na o.p.				
jetel nad 20%	intenzivní	6,0	8,0	10,0
jetel pod 20%	intenzivní	5,0	7,0	9,0
Travní porosty pícninářsky nevyužívané		mimoprodukční funkce		

Tab. 6 Doporučené dávky dusíku (kg . ha⁻¹)

Způsob využití / Doporučené dávky N za rok*)		Průměrný výnos v sušině (t . ha ⁻¹)		
		nízký (kg . ha ⁻¹)	střední (kg . ha ⁻¹)	vysoký (kg . ha ⁻¹)
Louka trvalá 1 seč + 1x pastva	extenzivní	–	–	–
2 seče	extenzivní	–	30	–
3 seče	intenzivní	60–80	100–120	120–140
přísev 4 seče (40% jetelovin)	intenzivní	–	100–120	120–140
dočasná, obnova 4 seče	intenzivní		120–140	140–160
Pastvina trvalá volná pastva	extenzivní	–	–	–
trvalá (přísévaná jetelotrávou)	intenzivní	50	60	70
trvalá (1–2 seče +1–2 past. cykly)	intenzivní	70	80	90
trvalá (celodenní pastva)	intenzivní	50	60	70
Jetelovinotravní směs na o.p.				
jetel nad 20%	intenzivní	0–30	0–40	0–40
jetel pod 20%	intenzivní	60–80	80–120	140–160
Travní porosty pícninářsky nevyužívané		mimoprodukční funkce		

*) do dávky dusíku není započítán přívod dusíku ve výkalech a moči pasených zvířat

3.2.9.4.3 HNOJENÍ - P, K, Mg

Tab. 7 pH a obsah základních makroprvků v půdě*(mg . kg⁻¹),
střední půdy, Mehlich III)

	pH	P	K	Mg
Luční půda	5 – 6	51–90	161–250	131–170
Orná půda	5,5 – 6,5	81–115	171–310	161–265

*Pozn.: uvedené hodnoty – jsou **optimální** hodnoty pH a obsah základních makroprvků v půdě

V případě, že nehnojíme statkovými hnojivy, ale pouze minerálními, odvíjí se dávky P, K a Mg od výnosové úrovně – tedy hnojení dusíkem zásobenosti těchto prvků v půdě. To vše za předpokladu pH 5,0 – 6,0 a vyhovujícího obsahu těchto makroprvků v půdě (Tab. 7) Při nižším obsahu, než jsou hraniční hodnoty, násobíme každých chybějících 10 mg koeficientem + 0,1 a při vyšším obsahu – 0,1. Tedy např. při obsahu fosforu v půdě $41 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ je třeba povýšit základní dávku ročního hnojení násobit ji koeficientem 1,1. Na lučních porostech, kde není přísun dusíku ovlivněn výkaly pasoucích se zvířat ani vyšším zastoupením jetelovin, se zachovává poměr N : P v minerálních hnojivech 1 : 0,40 při dávce dusíku $50 - 75 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, 1 : 0,22 při dávce dusíku $75 - 125 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ a 1 : 0,20 při dávce dusíku nad $125 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ [FIALA a kol. 2007].

Hořčíkem je třeba hnojit na pastvinách vždy a na loukách při výnosech větších než $3,5 \text{ t sušiny} \cdot \text{ha}^{-1}$. Hořčík ovšem není dobře využit v kyselých půdách s pH nižším než 5,2. Je-li v půdě obsah ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ půdy, Mehlich III) draslíku a hořčíku v poměru do 1,6 pak je výživa v pořádku; od 1,6 do 3,2 je třeba hnojení hlídat a nad 3,2 je nutné korigovat K, respektive Mg. Minerální hnojiva je třeba aplikovat v termínech, kdy je rostliny nejlépe využijí. Na jaře je to v začátku vegetace, kdy trávy začínají intenzivněji růst. To se týká dusíku, hořčíku a fosforu. Draslík, především na pastvinách, aplikujeme po prvním přepasení, na loukách po první seči, protože na jaře, díky uvolňování K i přes zimu, je obsah K v píci nejvyšší. Vlastní aplikace je závislá na době působení jednotlivých druhů hnojiv a důležitá je pravidelnost a dávkování, což významně ovlivňuje použité rozmetadlo [FIALA a kol. 2007].

Na lučních porostech je poměr N : K v minerálních hnojivech 1 : 1,20 při dávce dusíku $50-75 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, 1 : 0,85 při dávce dusíku $75 - 125 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ a 1 : 0,80 při dávce dusíku nad $125 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ [FIALA a kol. 2007].

Tab. 8 Doporučené dávky fosforu (kg . ha⁻¹)

Způsob využití / Doporučené dávky P, (P ₂ O ₅) za rok		Průměrný výnos v sušině (t . ha ⁻¹)					
		nízký		střední		vysoký	
		P	P ₂ O ₅	P	P ₂ O ₅	P	P ₂ O ₅
Louka trvalá 1 seč + 1 x pastva	extenzivní	–	–	–	–	–	–
2 seče	extenzivní	–	–	–	–	–	–
3 seče	intenzivní	23	52	26	59	29	66
přísev 4 seče (40% jetelovin)	intenzivní	–	–	26	59	29	66
dočasná, obnova 4 seče	intenzivní	–	–	29	66	32	73
Pastvina trvalá volná pastva	extenzivní	–	–	–	–	–	–
trvalá (přísévaná)	intenzivní	10	23	14	32	17	39
trvalá (1–2 seče, 1–2 past.cykly)	intenzivní	16	36	18	41	20	45
trvalá (celodenní pastva)	intenzivní	4	9	7	16	11	25
Jetelovinotravní směs na o.p.							
jetel nad 20%	intenzivní	23	52	26	59	32	73
jetel pod 20%	intenzivní	23	52	26	59	32	73
Travní porosty pícninářsky nevyužívané				mimoprodukční funkce			

*) do dávky fosforu není započítán přívod fosforu ve výkalech a moči pasených zvířat

3.2.9.4.4 VÁPŇENÍ TRAVNÍCH POROSTŮ

Pokles pH v půdě pod travními porosty nastává až při vysokých dávkách dusíku (nad 200 kg . ha⁻¹) a vyšších výnosech než 8 t sušiny na ha. Jinak stačí doplnění CaO v hnojivech (je-li v nich obsažen), není-li ovšem půda kyselá (pH méně než 5). Potom je třeba doplnit CaO v dávkách do 1 t CaO . ha⁻¹ na středních půdách a do 0,8 t . ha⁻¹ na lehkých půdách za rok. Potřebné vyšší dávky rozdělíme na více roků. Vápník zvyšuje mineralizaci a uvolnění dusíku, proto při rozorávce drnu nevápníme, aby nedocházelo k vyplavování dusičnanů [FIALA a kol. 2007].

Tab. 9 Doporučené dávky draslíku (kg . ha⁻¹)

Způsob využití / Doporučené dávky K,(K ₂ O) za rok*)		Průměrný výnos v sušině(t . ha ⁻¹)					
		nízký		střední		vysoký	
		K	K ₂ O	K	K ₂ O	K	K ₂ O
Louka trvalá 1 seč + 1x pastva	extenzivní	–	–	–	–	–	–
2 seče	extenzivní	–	–	40	48	–	–
3 seče	intenzivní	84	101	95	114	104	125
přísev 4 seče (40% jetelovin)	intenzivní	–	–	95	114	104	125
dočasná, obnova 4 seče	intenzivní	–	–	104	125	120	145
Pastvina trvalá volná pastva	extenzivní	–	–	–	–	–	–
trvalá (přisěvaná)	intenzivní	40	48	50	60	60	72
trvalá (1–2 seče,1–2 past.cykly)	intenzivní	50	60	60	72	70	84
trvalá (celodenní pastva)	intenzivní	–	–	15	18	30	36
Jetelovinotravní směs na o.p.							
jetel nad 20%	intenzivní	95	114	104	125	120	145
jetel pod 20%	intenzivní	84	101	95	114	104	125
Travní porosty pícninářsky nevyužívané		mimoprodukční funkce					

*) do dávky draslíku není započítán přívod draslíku ve výkalech a moči pasených zvířat

3.2.9.5 HNOJENÍ TRAVNÍCH POROSTŮ STATKOVÝMI HNOJIVY

Racionální využívání statkových hnojiv je proti minerálním levnější, ale je i v souladu s filosofií trvale udržitelného zemědělství. Minimalizuje totiž vnější vstupy a využívá vnitřní, které jsou v zemědělství k dispozici v rámci koloběhu živin v podniku (pokud subjekt má živočišnou výrobu). Zvyšuje, resp. udržuje kvalitu půdy a vody a také kvalitu píce (Tab. 11, 12).

Tab. 10 Doporučené dávky hořčíku (kg . ha⁻¹)

Způsob využití / Doporučené dávky Mg, (MgO)za rok*)		Průměrný výnos v sušině (t . ha ⁻¹)					
		nízký		střední		vysoký	
		Mg	MgO	Mg	MgO	Mg	MgO
Louka trvalá 1 seč + 1x pastva	extenzivní	–	–	–	–	–	–
2 seče	extenzivní	–	–	–	–	–	–
3seče	intenzivní	22	–	25	–	30	–
přísev 4 seče (40% jetelovin)	intenzivní	–	–	30	–	32	–
dočasná, obnova 4 seče	intenzivní	–	–	32	–	35	–
Pastvina trvalá volná pastva	extenzivní	–	–	–	–	–	–
trvalá (přisěvaná)	intenzivní	25	–	32	–	40	–
trvalá (1–2 seče,1–2 past. cykly)	intenzivní	25	–	32	–	40	–
trvalá (celodenní pastva)	intenzivní	–	–	32	–	40	–
Jetelovinotravní směs na o.p.							
jetel nad 20%	intenzivní	32	–	36	–	40	–
jetel pod 20%	intenzivní	25	–	32	–	36	–
Travní porosty pícninářsky nevyužívané		mimoprodukční funkce					

*) do dávky hořčíku není započítán přívod hořčíku ve výkalech a moči pasených zvířat

Tab. 11 Vliv minerálních a statkových hnojiv na výnos a kvalitu píce

Varianty hnojení	Hodnocený znak						
	Sušina	NL	vláknina	PDIN	PDIE	NEV	NEL
	t . ha ⁻¹	g . kg ⁻¹	g . kg ⁻¹	g . kg ⁻¹	g . kg ⁻¹	MJ . kg ⁻¹	MJ . kg ⁻¹
NPK	6,54	131,6	248,4	76,7	77,6	4,98	5,21
Hnůj + Močůvka	5,65	133,9	238,9	78,2	77,9	5,06	5,27
Kejda	5,37	131,2	237,7	76,5	77,9	5,13	5,32

Racionální využití statkových hnojiv ke hnojení travních porostů předpokládá ale použití správné technologie jejich skladování a aplikace. Tzn. hnůj vyzrálý, schopný pravidelné aplikace, bez dlouhé slámy apod. Dostatečně dlouhou dobu skladování kejdy i močůvky, aby se odstranily, respektive potlačily zdroje infekcí (koliformní bakterie,

salmonely, zárodky parazitů apod.), látky s inhibičním účinkem na rostliny (kyselina hipurová, močová, benzoová) a tak, aby došlo ke ztrátě klíčivosti plevelných semen. Dále je nutné dodržovat pravidla pro aplikaci a skladování statkových hnojiv. Průměrný přívod dusíku a dalších živin při aplikaci minerálních a statkových hnojiv a při pobytu zvířat na loukách a pastvinách ukazuje Tab. 12 [FIALA a kol. 2007].

Tab. 12 Průměrný přívod živin do půdy ve statkových hnojivech (kg . t⁻¹)

Statkové hnojivo	Průměrný obsah sušiny (%)	Dusík (N)	Fosfor (P ₂ O ₅)	Draslík (K ₂ O)
Hněj skotu	23,0	5,0	3,1	7,1
Hněj skotu (z hluboké podestýlky)	23,0	6,0	3,1	10,7
Hněj prasat	23,0	6,2	5,7	5,1
Hněj prasat (z hluboké podestýlky)	23,0	7,4	5,7	7,1
Koňský hnůj	29,0	5,2	3,2	7,3
Ovčí hnůj (hnůj koz)	28,0	7,6	3,7	10,4
Močůvka skotu a hnojůvka	2,4	2,5	0,2	5,3
Močůvka prasat a hnojůvka	2,0	2,8	0,5	2,5
Kejda skotu	7,8	3,2	1,5	4,8
Kejda prasat	6,8	5,0	3,0	2,3
Kejda ovčí (koz)	24,0	6,0	2,1	5,3
Kejda drůbeže	11,8	9,6	6,4	3,8
Čerstvý drůbeží trus	23,0	18,0	11,9	7,1
Drůbeží trus uleželý (ztráty N 35%)	33,0	16,8	17,1	10,2
Suchý drůbeží trus (ztráty N 50%)	50,0	19,2	24,3	14,9
Suchý drůbeží trus (ztráty N 50%)	73,0	28,0	35,5	21,8
Drůbeží podestýlka (ztráty N 50%)	50,0	19,2	16,0	11,3
Výkaly a moč skotu (průměrná roční produkce 14,0 t / DJ)		3,3 ²⁾	2,2	7,1
Výkaly a moč ovčí, koz (průměrná roční produkce 9,1 t / DJ)		4,9	2,6	6,6
Výkaly a moč koní (průměrná roční produkce 8,6 t / DJ)		2,8	2,3	3,5

1) Přívod živin do půdy ve statkových hnojivech je uváděn již po odečtu ztrát ve stájích, při skladování statkových hnojiv a při pastvě hospodářských zvířat nebo jejich pobytu na zemědělské půdě. Pokud je k dispozici rozbor obsahu živin, nepoužijí se hodnoty uvedené v tabulce.

2) Pro mladý skot (do 2 let) se použije hodnota 2,6 kg N . t⁻¹ výkalů a moči.

Statková hnojiva neobsahují jen nejučinnější makroprvek dusík, ale i organické látky, širší spektrum makro a mikroprvků, bakterie a látky stimulující povahy (heteroauxiny). Tab. 12 uvádí již jen „čistý“ přívod dusíku do půdy výkaly a močí pasených zvířat, přičemž s celkového obsahu dusíku se odečítají ztráty 40%. Pro účely výživy travního porostu pak z tohoto přívodu počítáme využitelný dusík, což je v prvním roce ohodnoceno koeficientem účinnosti 0,6. Zbytek (0,4) je započítán další rok. Pokud se tedy pase každoročně, tak se vlastně každým rokem započítává celý přívod (0,6 + 0,4) [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.5.1 VLIV HNOJENÍ NA POROST

V horských a podhorských oblastech, kde bývá až 100% zastoupení travních porostů ze zemědělské půdy, jsou statková hnojiva významným a relativně levným zdrojem živin. Hospodaření s nimi (jejich ošetřování, forma, dávkování, termíny použití) má na využití živin travním porostem zásadní vliv. Na špatně zásobených půdách lépe čerpají P a K jeteloviny, přičemž trávy a ostatní byliny získají díky nim dusík hlízkových bakterií. Na dobře zásobených plochách, kde se nepřehnojuje dusíkem, je mezi hlavními agrobotanickými skupinami (trávy, jeteloviny a ostatní byliny) rovnováha. **Dusík dodaný statkovými, nebo minerálními hnojivy čerpají především trávy** a byliny tak trochu na úkor jetelovin. Se stoupajícím dusíkatým hnojením si je třeba uvědomit dobu využití porostu, protože tím klesá zastoupení jetelovin a nízkých trav, porost řídne a převládají vysoké trávy a byliny, včetně plevelných. Intenzita využívání musí být ovšem podpořena intenzivnějším hnojením. Na jaké stanoviště a porost je vhodné určit statkové hnojivo uvádí Tab. 13 a 14. [FIALA a kol. 2007].

Minerální hnojiva více podporují trávy, ale potlačují jeteloviny. Statková hnojiva zachovávají větší rovnováhu, porost je vyrovnanější s vyšším podílem jetelovin. Podíl jetelovin je hnojem a močůvkou podporován až do dávky 15 t hnoje a 6 t močůvky na hektar. Potom už se jejich zastoupení snižuje ve prospěch ostatních bylin.

Tab. 13 Preference použití statkových hnojiv na travních porostech

Těžší půdy, hlubší, intenzivní využívání porostu, převaha trav, louky a pastviny	kejda, močůvka	
Lehčí půdy, převaha trav, extenzivnější využití 2 seče, eventuelně přepasení		hnůj, kompost
Svažité stanoviště, zaplevelená, více srážek, krátkodobé záplavy		hnůj, kompost
Plochy pozdě sečené, nebo spásané		hnůj, kompost
Porosty s vysokým výnosem a kvalitou píce a tomu odpovídající zhodnocení hnojiva	kejda, močůvka	
Jetelovinotravní porosty na orné půdě s vyšším podílem jetelovin		hnůj, kompost
Intenzivní směsky s vysokým podílem trav, zvláště jílků	kejda, močůvka	

Tab. 14 Vliv hnojení na travní porost (dlouhodobý pokus – 23 roků, výsledky jsou průměry z posledních deseti let)

Hnojivo	Přepočet kg N . ha ⁻¹	Výnos		Ostatní byliny (%)	
		sušiny (t . ha ⁻¹)	Trávy (%)		Jeteloviny (%)
Nehnojeno		2,99	34	13	53
P, K		6,62	32	22	46
Hnůj a močůvka + P, K	101	7,83	41	16	43
Kejda + P, K	99	7,81	41	16	43

3.2.9.5.2 HNOJENÍ A HOSPODÁŘSKÝ VÝNOS

Jakákoliv výživa a hnojení by měla vycházet ze znalosti zásobenosti živin a pH půdy. Při správném využití statkových hnojiv se budou živiny na travní porosty zase vracet. Doplnění minerálními hnojivy je potřeba jen zřídka, musí se ovšem doplnit zásoba živin v půdě. Export živin a minerálních látek sklizní při lučním využití v

přepočtu na 1 tunu sušiny píce je v průměru 24 kg N, 4,2 kg P, 20 kg K, 6,5 kg Ca, 4,0 kg Mg a 0,5 kg Na. Pastevní travní porost má vyšší koncentraci živin a méně vlákniny (je stravitelnější), protože je spásán v ranějším stádiu (fenologické fázi), takže na 1 tunu sušiny obsahuje v průměru 28 kg N, 5,0 kg P, 22 kg K, 6,7 kg Ca, 4,2 kg Mg a 0,5 kg Na. Není třeba dohnojovat celý export, živiny se doplňují i mineralizací, hlízkovými bakteriemi na kořenech jetelovin, nebo i dešťovými srážkami. Hořčík je ale důležitý zvláště na pastvinách při zahájení pastvy („travní tetanie“). Hodnotná statková hnojiva zvyšují půdní úrodnost a snižují potřebu nákupu poměrně drahých minerálních hnojiv. Je výhodnější aplikovat menší dávky na mladý porost a častěji, než velkou dávku najednou. Lépe se využijí živiny, snižuje se nebezpečí zaplevelení a je vyrovnanější obsah minerálií v píci, zvláště obsah draslíku se udrží pod 3% v sušině. Jde tím i o snižování kapacit na uskladnění.

Stupňované dávky dusíku výnos sušiny zvyšují jen málo. Je to dáno zvýšenou frekvencí sečí, neboť platí pravidlo, že zvýšeným počtem sečí klesá výnos, ale stoupá kvalita. Toto pravidlo není sice dogma, protože výnosy zpravidla klesají až po dvou, někdy třech sečích a za stejných podmínek hnojení a sečení, ale v zásadě je určující. S ohledem pouze na výnos sušiny **můžeme tedy konstatovat, že minerální hnojiva jsou v tomto ohledu účinnější**, než statková [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.5.3 HNOJENÍ A KVALITA PÍCE

Statková hnojiva jsou ve vztahu dodání makro i mikroelementů pro travní porost dostatečně účinná. Např. průběh účinnosti dusíku závisí na podílu lehce rozpustného amoniakálního dusíku ($\text{NH}_4\text{-N}$) a organicky vázaného dusíku. Dále na ztrátách ve formě čpavku do ovzduší a na druhé straně rychlé přeměně v půdě – mineralizaci. Nejvyšší podíl amoniakálního dusíku má močůvka, ale i prasečí nebo drůbeží kejda. Dusík rychle působí, ale jsou zde i největší ztráty. Vyšší podíl organicky vázaného dusíku má kejda skotu a zvláště hnůj a kompost – zde jsou ztráty N nižší. Přežvýkavci by měli především využívat objemná krmiva a tedy i píci travních porostů. Úroveň travních porostů – jejich obhospodařování a ekologická stabilita je závislá na úrovni chovu skotu.

Současný problém trvalých travních porostů (TTP) je jednak v tom, že jsou nízké stavy zvířat, zejména v horách, a potom v tom, že se nedostatečná kvalita objemné píce dohání (nahrazuje) koncentráty. Porovnáme-li například rakouský systém

v alpských podmínkách, kde je základem krmné dávky do 5 000 kg mléka bez jádra píce z travních porostů a při užitkovosti 6 500 – 7 000 kg mléka spotřeba jádra 600 – 700 kg na krávu, pak je rozdíl evidentní. V českém zemědělství je průměrná roční krmná dávka složená z 35% víceleté pícniny na orné půdě, 30% travní porosty a 35% silážní kukuřice a k tomu se přidává 1 620 kg jádra na krávu při průměrné užitkovosti 6 250 kg mléka. Řešení je ve kvalitě píce. Ta má dvojitý efekt. Za prve se zvyšuje dobrovolný příjem píce na kus a den z 10,4 až na 15,2 kg sušiny a tím i její produkční účinnost z 11,4 na 23,0 kg mléka na krávu a den a za druhé se tím pádem dosáhne stejné produkce mléka s menším stádem krav a významně se šetří jádro. Dosažení kvality je především závislé na sklizni ve správné růstové fázi rostlin – fenofázi.

S postupujícím stářím se mění složení v neprospěch kvality a stravitelnosti. Především první nárůst v roce by neměl překročit fázi metání nejrozšířenějších trav. Protože s vyšším počtem sečí se zkracuje doba nárůstu, rostliny se sklízí mladší a jsou tedy kvalitnější a stravitelnější – mají nižší obsah vlákniny.

Racionální využívání statkových hnojiv, od skladování, zrání až po vhodnou aplikaci, prospívá vyvážené výživě porostu a kvalitě sklizené, nebo pasené píce. **Současně je i zárukou posílení mimoprodukčních funkcí travních porostů a ochrany životního prostředí.** Při porovnání účinnosti na výnos lze říci, že použitím minerálních hnojiv se sice dosahuje vyšších výnosů sušiny, než hnojením statkovými hnojivy v přepočtu stejnými dávkami základních makroprvků, ale jinak tomu je při hodnocení kvality píce a biodiverzity porostu. Po hnojení statkovými hnojivy se zvyšuje energetická složka píce NEL i NEV a také NL. Naopak se snižuje vláknina. **Minerální hnojiva více podporují trávy**, ale potlačují jeteloviny. Statková hnojiva zachovávají větší rovnováhu, porost je vyrovnanější s vyšším podílem jetelovin [FIALA a kol. 2007].

3.2.9.6 PRÁVNÍ PŘEDPISY UPRAVUJÍCÍ HNOJENÍ TRAVNÍCH POROSTŮ DUSÍKEM

Předpisy upravující hnojení travních porostů N lze rozdělit na předpisy povinné a dotační, kde záleží na zemědělci, zda bude uvedený předpis dodržovat a pobírat dotace (pokud se takto rozhodne, stane se pro něj předpis závazným).

Mezi **povinné** právní předpisy patří **nařízení vlády č. 103/2003 Sb.**, ve znění pozdějších předpisů, kterým stanoví podmínky pro zemědělské hospodaření ve zranitelných oblastech (§ 33 vodního zákona), tzv. akční program. Akční program stanovuje následující podmínky pro hnojení travních porostů:

1. Úplný zákaz hnojení travních porostů v zimním období, a to podle následující tabulky.

Plodina nebo kultura	Klimatický region	Hnojiva s rychle uvolnitelným dusíkem	Minerální dusíkatá hnojiva
Travní (jetelovínotravní) porosty na orné půdě,	0 – 5	15. 11. – 31. 1.	1. 10. – 28. 2.
trvalé travní porosty	6 – 9	5. 11. – 28. 2.	15. 9. – 15. 2.

2. Zákaz hnojení travních porostů N na zamokřených půdách (pokud nebyly meliorovány odvodněním) a omezená jednorázová dávka hnojení travních porostů N na půdách mělkých a půdách s nevyvinutým půdním profilem.
3. Zákaz používání dusíkatých hnojivých látek v pásu min. 5 m okolo vodních toků.
4. Zákaz používání tekutých statkových hnojiv s rychle uvolnitelným N na půdách s vysokou sklonitostí (nad 7°), a to nejméně 25 m od břehové čáry vodního útvaru.

Dalšími jsou předpisy **dotačního** typu, tj. právní předpisy vymezující podmínky dotačních opatření (agroenvironmentální opatření, opatření Natura 2000 na zemědělské půdě) podle programových dokumentů Horizontální plán rozvoje venkova 2004–2006 (HRDP) a Program rozvoje venkova 2007–2013 (PRV).

Nařízení vlády č. 242/2004 Sb., v platném znění (HRDP) upravuje:

1. aktuální denní intenzitu hospodářských zvířat v době 120 denního pastevního období u základního a nadstavbového managementu pastvin, včetně možnosti aplikace hnojiv a statkových hnojiv, jak je uvedeno v následující tabulce.

Management	aktuální denní intenzita	povolená aplikace
Základní	0,5 – 1,25 VDJ . ha ⁻¹	40 kg N . ha ⁻¹ (zákaz aplikace kejdy prasat)
Nadstavbový	0,4 – 1,05 VDJ . ha ⁻¹	–

2. aplikaci hnojiv a statkových hnojiv u základního a nadstavbového managementu luk, jak je uvedeno v následující tabulce.

Management	povolená aplikace
Základní	40 kg N . ha ⁻¹
Nadstavbový	–

Nařízení vlády č. 79/2007 Sb. (PRV) upravuje

1. limity ročního přívodu N u základního a nadstavbových managementů pastvin, jak je uvedeno v následující tabulce.

Management	maximální limit N celkem na management	min. přívod N pastvou na půdní blok/díl	max. přívod N pastvou na management
Základní	80 kg N . rok ⁻¹	5 kg N . rok ⁻¹	55 kg N . rok ⁻¹
Druhově bohaté pastviny (pouze pastva)		5 kg N . rok ⁻¹	40 kg N . rok ⁻¹
Suché stepní trávníky a vřesoviště (pouze pastva)		5 kg N . rok ⁻¹	30 kg N . rok ⁻¹

2. limity ročního přívodu N u základního a nadstavbových managementů luk, jak je uvedeno v následující tabulce.

Management	Maximální limit N
Základní	60 kg N . rok ⁻¹ (včetně případného přepasení)
Horské a suchomilné louky	60 kg N . rok ⁻¹ (možnost přepasení stanoveno v lpis*)
Podmáčené a rašelinné louky	–
Hnízdiště bahňáka a chřástala	–

*evidence zemědělské půdy podle uživatelských vztahů

Nariadení vlády č. 75/2007 Sb. (PRV) upravuje v rámci podpory oblastí Natura 2000 na zemědělské půdě max. limit přívodu N pastvou do 30 kg N . ha⁻¹ pasených ploch za rok [FIALA a kol. 2007].

3.2.10 CHEMICKÉ OŠETŘENÍ

Běžně se užívají registrované herbicidy a insekticidy, avšak pro sklizeň pylu nesmí být porost chemicky ošetřen [TAGRO 1999, EMEA 2008]. Porost lze ošetřovat pouze mechanicky, kultivací meziřádků rotační plečkou [CAGAŠ a kol 1989].

3.2.11 SKLIZEŇ

Na semeno se kostřava červená sklízí z první seče. Nejlepší podmínky půdní i klimatické jsou v bramborářské výrobní oblasti; s rovnoměrně rozdělenou sumou srážek 700 – 800 mm za rok [ŠRÁMEK, TVRZ 1990]. Porosty kvetou v počátku června a dozrávají v 1. polovině července. Doporučuje se nechat porost dobře vyžrát [TAGRO 1999]. Po kombajnové sklizni je potřeba semena dosušit; nenechat více než 2 hodiny na voze. Porost obvykle využíváme semenářsky 2 užitkové roky. Výnos semen se pohybuje od 0,3 – 0,8 t . ha⁻¹ [TAGRO 1999]; v zahraničí mnohdy však až 1,0 t . ha⁻¹ [JANOVŠKY 1986], či dokonce 2,136 kg . ha⁻¹ [FAIREY 2008]. Výnosy semene kostřavy červené často značně i meziročně kolísají [REGAL 1953]. HTS činí 1,0 – 1,3 g [TAGRO 1999]. Hnojením semenných porostů dusíkem na jaře vede často k tvorbě větších obilek (vyšší HTS). Počet fertálních odnoží není v zásadě ovlivněn výsevkem

(např. v počtu fertálních odnoží *Festuca rubra* L. při výsevcích v rozpětí 3 – 24 kg . ha⁻¹ nebylo stanoveno významných rozdílů; s vyšším výsevkem stoupal celkový počet odnoží, ale podíl fertálních odnoží z celkových klesal) [MÍKA 2001].

Sklizeň zelené hmoty může dosáhnout až 40 – 50 t . ha⁻¹ [JANOVŠKY 1986]. Kostřava červená je velice citlivá k vyležení porostu, proto je nutno po sklizni vždy pečlivě vyhrabat a odvézt zbytky hmoty (slámy i listů) a přihnojit porost dusíkem a fosforem [ŠS HLADKÉ ŽIVOTICE 2004].

3.3 PYLOVÁ ALERGIE

Polinóza je multisystémové alergické onemocnění, jehož výskyt ve světě i v České republice od druhé poloviny 20. století vytrvale stoupá. Jde o celkové sezonní alergické onemocnění, které je podmíněno alergickou reakcí prvního typu (IgE mediovanou) na alergeny obsažené v pylových zrnech. Nejčastějším klinickým projevem polinózy je alergická rinokonjunktivitida, méně časté jsou astmatické potíže, objevuje se však i řada dalších projevů v závislosti na postiženém cílovém orgánu. Základní roli v diagnostice polinózy hraje pečlivě odebraná anamnéza, upřesnění a konečné potvrzení diagnózy umožní kožní testy, v některých zvláštních případech vyšetření specifických protilátek typu IgE.

Nejdůležitějším léčebným postupem je prevence kontaktu s pylem, či alespoň omezení expozice pylovým alergenům. Kauzálním terapeutickým postupem je pečlivě indikovaná a správně provedená specifická imunoterapie kvalitními standardizovanými alergeny. Farmakoterapie polinózy ovlivňuje jak alergický zánět, tak akutní projevy onemocnění. Zahrnuje léčbu celkovou (především s využitím druhé generace antihistaminik a nově také antihistaminik s imunomodulačními účinky) a léčbu lokální (kde v léčbě nosních příznaků polinózy zaujímá přední místo použití nosních kortikosteroidů, dále stabilizátorů mastocytů a topických antihistaminik). V léčbě očních projevů dominuje použití stabilizátorů mastocytů a topických antihistaminik. Pro rychlé zvládnutí akutních nosních a očních projevů jsou vhodné přípravky s obsahem dekonjestiv. Nedílnou součástí léčby je důsledná edukace pacienta a využívání informací Pylové informační služby (dále PIS) [RYBNÍČEK 2004].

Pacientů s pylovou alergií vytrvale přibývá a celosvětově jsou na léčbu problémů vyvolávaných alergickými chorobami vynakládány stále větší finanční

prostředky. To samozřejmě vede ke zvýšenému zájmu výzkumníků i farmaceutických společností o zkvalitňování antialergických léků a léčebných postupů.

Přestože ani moderní medicína neumí alergická onemocnění ještě zcela vyléčit, zvládá většinou velmi dobře alespoň odstranit potíže, a to s minimálními vedlejšími účinky léčby. V příštích letech se nebude zkvalitňovat pouze farmakoterapie, výrazné pokroky už nyní zaznamenala také imunomodulační léčba a lze očekávat, že v blízké budoucnosti právě imunomodulační postupy přinesou největší zkvalitnění léčby alergických onemocnění [RYBNÍČEK 2004].

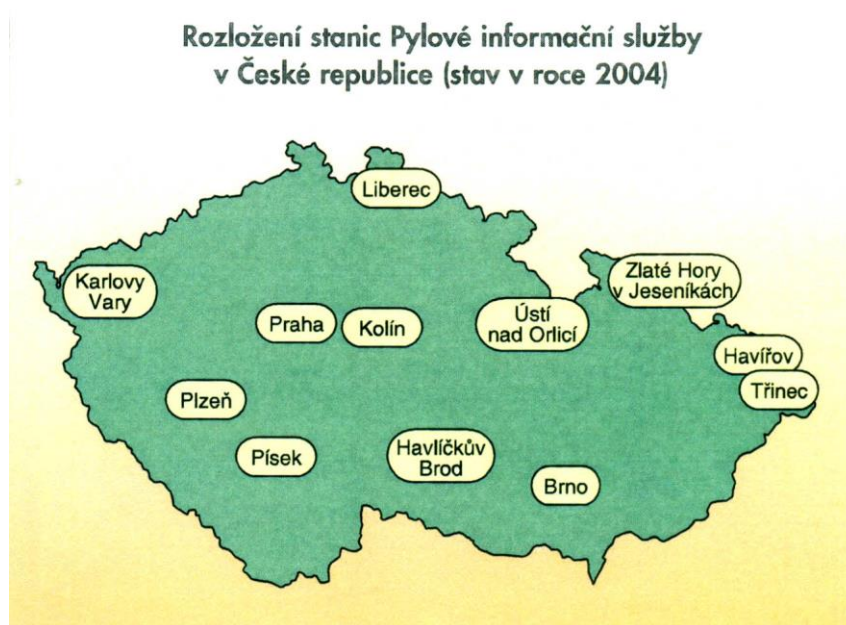
3.3.1 HISTORIE

Pylová alergie patří k onemocněním známým již po staletí – první popis alergie na květy růží pochází z Persie už z 9. století n. l. [FRANKLAND 1991]. Dlouho se ale jednalo o onemocnění velmi vzácné a jeho příčina byla nejasná. V roce 1819 Angličan John Bostock popsal „periodické postižení očí a hrudi“ (Case of a periodical affection of the eyes and chest). Tehdy mu trvalo 9 let, než našel 27 dalších podobných pacientů, jejichž potíže popsal jako „summer catarrh“ – letní katar [SIBBALD, STRACHAN 1995]. Obecné mínění v té době bylo, že popisované potíže jsou vyvolávány senem nebo pobytem ve skleníku. Až další Angličan, Charles H. Blackley, řadou pokusů jednoznačně prokázal, že příčinou potíží jsou pylová zrna. Své výzkumy shrnul v roce 1873 v publikaci *Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus Aestivus* [COMTOIS 1995]. Poměrně vzácné bylo toto onemocnění i v první polovině 20. století [NOON 1911]. Termín alergie pochází z řeckého „ALLOS ERGOS“ – „jiná reakce“ a poprvé ho v roce 1906 pro označení neobvyklé reakce organismu použil vídeňský lékař Clemens von Pirquet. První známá epidemiologická studie (ze Švýcarska z roku 1921) ukázala výskyt alergie 1% [HRUBIŠKO a kol. 2003]. Teprve v posledních desetiletích začal výskyt polinózy celosvětově prudce narůstat.

Rovněž léčba polinózy zaznamenala v průběhu let řadu důležitých kroků: v roce 1911 popsal Noon [NOON 1911] specifickou alergenovou vakcinaci, která se nejen používá s jistými úpravami dosud, ale navíc nabývá stále většího významu. Ve 40. letech se objevila první generace antihistaminik, 70. léta přinesla lokální inhalační kortikosteroidy, 80. léta druhou generaci nesedativních antihistaminik, 90. léta antileukotrieny a na přelomu tisíciletí se potom objevila antihistaminika s imunomodulačním účinkem. Pokročilo se i v prevenci – v roce 1936 byla založena

první monitorovací pylová stanice v USA, od 60. let se začala rozvíjet síť monitorovacích stanic v Evropě. V roce 1992 zahájila provoz rovněž první stanice pylové služby (PIS) v Československu, v současné době je v České republice k dispozici lékařům i pacientům 12 stanic PIS (Obr. 3).

V posledních letech se začíná klást stále větší důraz např. i na vhodný výběr a údržbu parkové zeleně i z hlediska její vhodnosti pro alergiky [RYBNÍČEK 2004].



Obr. 3 Rozložení stanic PIS [RYBNÍČEK 2004].

3.3.2 PREVALENCE POLINÓZY

Výskyt polinózy v posledních desetiletích neustále stoupá. Například Wüthrich [WÜTHRICH kol. 1989] uvádí vzestup prevalence pylové rýmy ve Švýcarsku z 0,28% populace v roce 1926 na 10% v roce 1985. V současné době se prevalence polinózy v různých zemích světa pohybuje u dětí i dospělých od méně než 1% až po více než 40% [MONTGOMERY 1988, WRIGHT a kol 1994]. V České republice udával Vondra [VONDRA a kol. 1997] v polovině 90. let prevalenci pylové rýmy v Praze 8 u 14- a 15-letých dětí 5,3%, v Teplicích 4,5% a Prachaticích 3,7%. Faierajzlová [FAIERAJZLOVÁ, ŠVANDOVÁ 1997] uvádí ve stejné době průměrnou prevalenci v řadě monitorovaných českých měst u 5-, 9- a 13-letých dětí 5,7%. Podle Centra hygieny životního prostředí SZÚ Praha (dr. J. Kratěnová), kde dlouhodobě probíhá projekt, který v 16 městech ČR sleduje prevalence alergických onemocnění v běžné

populaci 17- letých, se polinóza v roce 2000 vyskytovala u 11,7% probandů (u 14% chlapců a 9,5% dívek) v této věkové kategorii. V roce 2001 udával Státní zdravotní ústav prevalenci polinózy u 5- letých dětí 4,1% a u 17- letých adolescentů 16,2% [KRATĚNOVÁ 2003]. V některých oblastech České republiky je prevalence polinózy pravděpodobně ještě vyšší. Velmi vysoká je rovněž subklinická senzibilizace zdravé populace na pylové alergen. Hrubiško [HRUBIŠKO, KVASNIČKA 1997] uvádí, že až 17% zdravých obyvatel Bratislavy je senzibilizováno pylem trav. Údaje z ČR [VONDRA a kol. 1997] i ze zahraničí [PEDRSEN, WEEKE 1981] dokládají, že ve městech je výskyt polinózy vyšší než na vesnicích. V průběhu života je prevalence pylové alergie nejnižší v raném dětství – do 5 let, poté prudce stoupá, maxima dosahuje v adolescenci a časně dospělosti a dále s věkem opět postupně klesá. V dětském věku jsou častěji postiženi chlapci než dívky, tento rozdíl se vyrovnává v časně dospělosti [SIBBALD, STRACHAN 1995, FAIERAJZLOVÁ, ŠVANDOVÁ 1997] .

3.3.3 RIZIKOVÉ FAKTORY ROZVOJE POLINÓZY

3.3.3.1 GENETICKÁ PREPOZICE

Atopici jsou lidé, kteří mají vrozenou schopnost se snadněji alergizovat. Při obvykle opakovaném kontaktu s antigenní látkou (alergenem) se v jejich organismu vytváří zvláštní typ protilátek tzv. imunoglobuliny typu IgE (reaginy). Po opakovaném styku s alergenem se u nich projevuje alergická reakce prvního typu: anafylaxie, atopie. Tento typ přecitlivělosti se rozvíjí ve dvou fázích. První je klinicky latentní. Nejprve dochází k nadměrné produkci imunoglobulinů typu IgE a k jejich vazbě na membránu žírných lymfatických buněk (přítomné prakticky ve všech tkáních) a bazofilů (přítomných v krevním oběhu). Tímto procesem se žírné buňky tzv. aktivují a vypustí do svého okolí obsah drobných granul (zrníček), které do té doby skladovaly uvnitř sebe pro pozdější použití. Tyto granuly jsou plné látek (obecně – zánětlivé mediátory) a právě účinkem těchto látek vznikají známé příznaky (svědění, kýčání, vyrážka apod.) [EKOFF a kol. 2012]; jinak řečeno - přemostění navázaných protilátek antigenem (alergenem) vyvolá uvnitř těchto buněk specifické reakce, které způsobí degranulaci a uvolnění tzv. mediátorů (histamin, serotonin, leukotrieny, heparin atd.) do okolní tkáně a krevního oběhu. Tyto mediátory působí negativně a patofyziologicky na hladké svalstvo, endotelie cév (buněčnou výstelku) a žlázy. Tím vzniká klinicky se

manifestující fáze onemocnění. Tato fáze se projevuje lokálními příznaky na sliznicích (pylová rýma se zánětem očních spojivek, kopřivkou, akutním otokem kůže), může dojít ke stahu hrtanu, může vzniknout astmatický záchvat, průjem, křeče apod.

Pokud alergen pronikne přímo do krevního oběhu, vznikne životohrožující alergická reakce – anafylaktický šok. Výše uvedené mediátory uvolněné z bazofylů se rychle šíří do celého organismu. Způsobí šokový stav tím, že vyvolají rozšíření cév, homokoncentraci s hypovolémií (snížení celkového množství krve), které vedou ke zvýšené propustnosti cév. Způsobí tak dušení z nedostatku vzduchu; tento akutní stav může bez léčby končit i smrtí.

Děti atopických rodičů jsou jednoznačně predisponovány ke vzniku atopického onemocnění. Zatímco u potomků neatopických rodičů je pravděpodobnost vzniku atopie kolem 10%, stoupá tato pravděpodobnost až ke 40% při jednom rodiči s atopií a až k 60%, jsou-li atopičtí oba rodiče [MARSH a kol. 1981]. Děti jsou častěji postiženy stejnou diagnózou jako jejich rodiče, méně často trpí jiným typem alergie [GERRARD a kol. 1976]. Je tedy pravděpodobné, že genetická predispozice ke specifickému alergickému onemocnění může být zděděna nezávisle na celkové náchylnosti k alergii. Ke vzniku manifestní alergie je ale vedle genetické predispozice nutná opakovaná expozice alergenům a expozice dalším (neznámým) faktorům, které usnadní imunologickou senzibilizaci.

Často diskutovaným rizikovým faktorem je měsíc narození. Řada studií, zvláště ze severských zemí, prokázala, že děti narozené v předjarních či jarních měsících mají zvýšené riziko vzniku alergického onemocnění [ABERG 1989, BJÖRKSTEN, SUONIEMI 1976, BJÖRKSTEN a kol. 1980, PEARSON a kol. 1977, TROISE a kol. 1989]. Některé studie zjistily statistickou významnost měsíce narození pouze tehdy, pokud se alergické onemocnění projevilo v raném věku [ABERG 1989], jiné studie naopak statistickou významnost nepotvrdily [ANDERSON a kol. 1981].

Strachan [STRACHAN 1989] při sledování britských dětí narozených v roce 1958 zjistil statisticky vysoce významnou inverzní korelaci mezi počtem starších sourozenců v rodině a vznikem pylové alergie. Zdá se, že tento vztah je významnější než počet mladších sourozenců nebo celkový počet dětí v rodině.

Strachanova studie dále uvádí vyšší výskyt pylové alergie u dětí z rodin s průměrným nebo nadprůměrným příjmem než z rodin chudších. Riziko rozvoje polinózy je tedy pravděpodobně ovlivňováno také socioekonomickou situací rodiny, ve které dítě vyrůstá.

Při studiu alergických onemocnění se v poslední době věnuje velká pozornost možnému ochrannému vlivu kojení, zvláště na rozvoj atopického ekzému. Některé studie [STRACHAN 1989, TAYLOR a kol. 1983] naopak prokazují vyšší výskyt polinózy u dětí kojených než u dětí krmených umělou výživou.

3.3.3.2 ZNEČIŠTĚNÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Vztah znečištění ovzduší a vzniku polinózy není zcela jasný. Některé studie ukazují, že silnější znečištění ovzduší oxidy síry v průmyslových oblastech je sice příčinou větší četnosti respiračních onemocnění, nevede ale k vyššímu výskytu alergických onemocnění [MUTIUS a kol. 1994]. Na druhou stranu se ukazuje, že znečištění ovzduší oxidy dusíku, vyšší koncentrace ozonu a polycyklické aromatické uhlovodíky z výfukových plynů proalergicky ovlivňují imunitní systém zesílením Th2 lymfocytové odpovědi, a tím zvýšením produkce IgE [DEVALIA a kol. 1997, DIAZ-SANCHEZ a kol. 1994]. Tento typ znečištění ovzduší ale ovlivňuje také rostliny. Dochází ke změnám v produkci pylu a pylová zrna mají změněnou strukturu obalových vrstev, takže jsou schopna rychleji se uvolnit. Dalšími ovlivňujícími aspekty jsou především civilizační faktory a také změny techniky hospodaření v zemědělství - nárůst ploch monokultur [KOČÍ 2010]. Ve velkých městech existuje i jiné další riziko; pylové alergeny se dokážou navázat na sloučeniny uhlíku z výfukových plynů, takže jejich koncentrace může vzrůst v obdobích zvýšené koncentrace smogu v ovzduší [FUČÍKOVÁ 1994]. Italští vědci nedávno zjistili, že znečištěný vzduch v okolí velkých silnic zvyšuje alergenní vlastnosti pylu ambrózie. Pylová zrna se příliš nelišila ve srovnání s jinými z čistého prostředí, ale jejich alergenní potenciál byl mnohonásobně vyšší. Znečištění přítomné ve vzduchu a následně i půdě ovlivňuje růst a rozmnožování rostlin – vyšší obsah CO₂ podporuje celkovou produkci pylu a zvyšuje rovněž obsah alergenů v pylových zrnech ambrozie. Lze předpokládat, že toto bude podobné i u trav [GHIANI a kol. 2012].

3.3.3.3 INTENZITA EXPOZICE PYLOVÝM ALERGENŮM

K vyvolání alergické reakce je nutná určitá minimální koncentrace pylových zrn v ovzduší. Při silné expozici dochází k senzibilizaci snadněji. U silně přecitlivělých

pacientů stačí k vyvolání potíží mnohdy jen 5 – 50 zrn . m⁻³ vzduchu [HRUBIŠKO, KVASNIČKA 1997]. Přitom většina alergizujících rostlin produkuje pylová zrna v obrovském množství – řádově se jedná o miliony až miliardy pylových zrn vytvořených a do ovzduší uvolněných jedinou rostlinou v průběhu pylové sezony. Podmínky, které je třeba splnit, aby pyl senzibilizoval atopického jedince a vyvolal u něj alergické potíže, shrnul velmi jasně už v roce 1931 Thommen [THOMMEN a kol. 1931] a to:

- pyl musí obsahovat antigenní složku schopnou indukovat senzitivitu
- musí se jednat o anemofilní (větrosprašnou) rostlinu
- pyl musí být produkován ve velkém množství
- pyl musí být dostatečně lehký, aby byl snadno přenášen větrem na velké vzdálenosti
- rostlina, pyl produkující musí být v oblasti hojně rozšířena.

Měsíc narození, počet a pořadí dětí v rodině, socioekonomická situace rodiny, kojení a znečištění ovzduší jsou rizikové faktory většinou dávané do souvislosti s prostředím, které dítě obklopuje v časných fázích života. Touto problematikou se v posledních letech zabývá především tzv. hygienická hypotéza [STRACHAN 2000, WELLIVER, DUFFY 1993]. V souvislosti s faktory prostředí se rovněž diskutuje o ochranném vlivu některých bakteriálních, ale i virových infekcí dětského věku proti rozvoji alergie [SIBBALD, STRACHAN 1995]. Na druhou stranu některé virové infekce jsou významným rizikovým faktorem pro vznik astmatu [WELLIVER, DUFFY 1993]. Silná zátěž nezralého imunitního systému pylovými alergeny může vést k časné senzibilizaci. **Největšímu ataku jsou vystaveni lidé zejména v blízkém sousedství pěstovaných porostů alergenních druhů. Doba kvetení trav a obilnin se vzájemně překrývá, a tak je populace vždy vystavena působení pylu mnoha druhů trav a obilnin současně.** Pacienti senzibilizovaní na pyly trav mají v 90% pozitivní reakci také na směs čtyř obilnin (pšenice, oves, ječmen, kukuřice). Pacienti jsou tedy polysenzibilizováni a pravděpodobně také polyalergičtí na různé druhy trav. Zkřížená reaktivita mezi pyly trav a obilnin byla již podrobně popsána. Pokud studujeme alergenové složení různých pylů trav a obilnin na molekulární úrovni, můžeme určit společné skupiny alergenů, které vykazují podobné fyzikálně - chemické a imunologické vlastnosti. Žádný alergenový protein specifický pouze pro trávy a pouze

pro obilniny nebyl dosud identifikován. Jen kukuřice se díky svému tropickému původu řadí částečně mimo skupinu ostatních travin [KOČÍ 2010].

3.3.4 PYLOVÉ ZRNO

3.3.4.1 MORFOLOGIE, ANATOMIE

Pylové zrno vzniká v samčích orgánech květu – tyčinkách – a reprezentuje samčí gamety nahosemenných a krytosemenných rostlin. Je tvořeno plazmatickým obsahem a několikavrstevnou membránou. Má 1 - 2 jádra [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004]. Plazmatický obsah přímo obaluje tenká intina. Na ni nasedá vícevrstevná, velmi odolná exina. Vnitřní vrstvu exiny tvoří tenká hladká endexina, vnější je tvořena složitě členěnou ektexinou (Obr. 4, 5) [FAEGRI, IVERSEN 1989]. Pylová zrna jsou velmi uniformní, s jedním germinačním pórem, velikosti cca 35 μm , kulovitá, hladká, žluté barvy, nelepivá, ve vzduchu se dobře vznášejí. (Velikost většiny všech pylových zrn se pohybuje od 15 do 200 μm). Forma, velikost a struktura exinů jsou hlavními identifikačními znaky pro jednotlivé druhy pylů [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004].



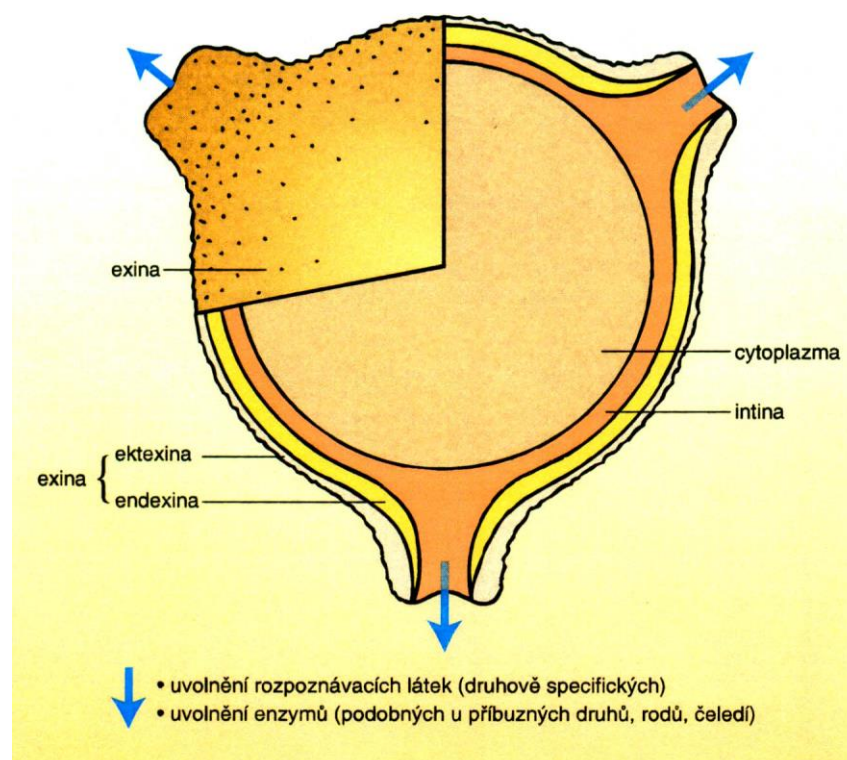
Obr. 4 Pylové zrno [HRABĚ, 2003]

3.3.4.2 FYZIOLOGIE

Pylové zrno je ideálně přizpůsobeno k velmi rychlému uvolnění části svého obsahu navenek při styku s vlhkým povrchem [SOLOMON, MATHEWS 1988].

Kostřava červená vypouští pyl z prašníků jako dehydrované mikrospory obsahující mužské gametophyte. Ty se šíří větrem, například jako pylový mrak, který se rozpouští rychle se zvyšující se vzdáleností [BOELT, STUDER 2010]. Uvolňované látky je možné zjednodušeně rozdělit na dvě hlavní skupiny. V první skupině jsou druhově specifické rozpoznávací „klíčové“ látky, které musí být samičí rostlinou rozpoznány, aby došlo k prorůstání pylové láčky do vajíčka. Ve druhé skupině jsou především enzymy uvolňované na počátku oplodnění, jejichž molekulární struktura je u příbuzných druhů, rodů, nebo dokonce čeledí velmi podobná. Jejich funkce – lyzovat překážky na cestě k vajíčku – je stejná nezávisle na druhu rostliny. Z těchto dvou typů rychle uvolňovaných substancí pocházejí i vlastní pylové alergeny [SOLOMON, MATHEWS 1988].

Schéma struktury pylového zrna



Obr. 5 Schema struktury pylového zrna [RYBNÍČEK 2004]

3.3.4.3 CHEMICKÁ ANALÝZA

Chemická analýza pylu (průměr ze 7 oblastí v USA) [HERBERT, SHIMANUKI 1978];
vztaženo k sušině v %.

Parametr	Průměr (%)
Obsah vody	24,3
Bílkoviny	24,1
Redukující cukry	20,7
Neredukující cukry	2,1
Škrob	1,8
Lipidy	4,9
Minerální látky	3,2
Hrubá vláknina	7,7
Pektiny	1,6
Ostatní	4,8
Parametr	Průměr
pH	4,8

Proteiny se skládají z řady aminokyselin. Již v roce 1953 určil De Groot jejich spektrum [DE GROOT 1953].

Esenciální aminokyseliny

Aminokyselina	Průměrný obsah (%)
Threonin	3,0
Valin	4,0
Methionin	1,5
Leucin	4,5
Isoleucin	4,0
Fenylalanin	2,5
Lysin	3,0
Histidin	1,5
Arginin	3,0
Tryptofan	1,0

Fenolické látky (FN) - nepřesně zvané též rostlinné fenoly či polyfenoly, tvoří velmi rozsáhlou heterogenní skupinu látek, z nichž mnohé patří mezi sekundární metabolity. V říši rostlin jsou všudypřítomné neboť pouze rostliny mají schopnost syntetizovat aromatické jádro. Fenolické látky jsou považovány za hlavní inhibitory trávení buněčných stěn v pícech a ovlivňují využití píce u přežvýkavců [MÍKA a kol. 2001].

O složení fenolických látek v rostlině *Festuca rubra L.* je známo jen málo. Štěrbová et al. uvádí, že v rostlině kostřavy červené byly identifikovány následující fenolické kyseliny: protocatechová, *p*-hydroxybenzoová, chlorogenová, vanillová, kávová, *p*-kumarová, ferulová a rosmarinová; dále *p*-hydroxybenzaldehyd a vanillin [ŠTĚRBOVÁ a kol. 2004]. V rostlině kostřavy červené byly dále popsány kyanidiny, peonidiny a delfinidiny [FOSSSEN a kol. 2002].

My jsme se zabývali pouze posouzením obsahu fenolických látek v pylu kostřavy červené v závislosti na různé úrovni hnojení N.

3.3.4.4 ALERGENY

Alergeny jsou látky s typickou fyzikálně – chemickou skladbou a biologickou účinností, většinou bílkovinné povahy. Rozlišujeme alergeny inhalační (vdechované), potravinové, kontaktní, bakteriální a virové, lékové a hmyzí [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004]. Protože tyto proteiny jsou okamžitě rozpustné v H₂O, jsou také schopné pronikat do sliznice a způsobit specifické reakce na imunitním systému [POLLENINFO 2009, HRABINA a kol. 2008]. Pylové zrno se po zachycení na vlhké sliznici horních cest dýchacích chová jistou dobu, jako kdyby dopadlo na bliznu. Přitom se uvolňují výše uvedené enzymy, které rozrušují povrch sliznice a alergen tak prostupuje hlouběji [MYGIND a kol. 1992]. Alergeny kostřavy červené bývají označovány Fes p 1, 4, 5 [ESCH 1999, HRUBIŠKO 2003]. Pylové alergie vyvolávají převážně menší zrna [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004].

3.3.5 TRANSPORT PYLU, METEOROLOGICKÉ ASPEKTY

Přenos pylového zrna z prašníku na bliznu je nezbytnou podmínkou pro oplodnění vajíčka. Podílejí se na něm zvířata (především hmyz, ale i ptáci a savci), voda a u rostlin větrosprašných vzdušné proudění. Určitému typu přenosu je přizpůsoben tvar zrna, jeho velikost i produkované množství pylu. Pro alergologii jsou nejdůležitější

rostliny větrosprašné, které mají pylová zrna přizpůsobena pro přenos vzduchem. Je třeba ale upozornit na skutečnost, že do ovzduší se mohou dostávat i pylová zrna rostlin hmyzosprašných či opylovaných jiným způsobem, která se vzduchem na větší vzdálenosti běžně nešíří. Uvolňování pylu do ovzduší závisí vedle vzdušného proudění také na zralosti pylu, dosažení určité teploty okolního prostředí, vlhkosti vzduchu a v mnoha případech rovněž na denní době. Mnohé rostlinné druhy vykazují přímo matematicky stanovitelnou závislost množství pylu v ovzduší na denní době [KÄPYLÄ 1984].

Právě odlišné meteorologické podmínky v jednotlivých letech, především teplota vzduchu a vlhkost, jsou jednou z hlavních příčin časových výkyvů v zahájení a průběhu pylové sezony. Ve střední Evropě je možné rozdělit pylovou sezonu na 3 hlavní období – jarní, kdy dominuje pyl stromů (především břízovitých a lískovitých); letní, kdy dominantními alergeny jsou trávy, a podzimní období s dominancí vysokobylinných plevelů (především pelyňku a v posledních letech také ambrozie). V Evropě bylo vyčleněno 6 základních skupin rostlin produkujících pylové alergeny, na něž je přecitlivělá většina pylových alergiků [VAN CAUWENBERGE a kol. 2000]. Jsou to: bříza (*Betula*) + příbuzné druhy, trávy (*Poaceae*) + obiloviny, olivovník (*Olea*) + jasan (*Fraxinus*), pelyněk (*Artemisia*) + ambrozie (*Ambrosia*), drnavec (*Parietaria*) + kopřiva (*Urtica*), cypřišovitě (*Cupressaceae*) + příbuzné druhy. Jen výjimečně může být člověk alergický na jiné pylové alergeny bez současné přecitlivělosti na tyto druhy. U všech těchto druhů již byly do současné doby biochemicky definovány hlavní alergeny, v některých případech i řada alergenů vedlejších [RYBNÍČEK 2004].

3.3.6 ZKŘÍŽENÉ REAKCE

Alergický pacient může vytvářet protilátky proti alergenům, které jsou 1) vlastní pouze pylu určité rostliny nebo 2) jsou společné pro pyly příbuzných rostlinných druhů. Pacient tak může trpět přecitlivělostí omezenou na pyl jednoho konkrétního (určitého) druhu rostliny nebo kvůli imunologické zkřížené reaktivitě strukturálně blízkých alergenů může vykazovat přecitlivělost na pyl příbuzných rostlinných druhů. Vedle těchto typů zkřížených reakcí, které jsou dány biochemickou podobností alergenů, existují rovněž zkřížené reakce způsobené panalergeny – profilyny, které jsou přítomny ve všech eukaryontních buňkách. Ty jsou zodpovědné především za reakce na některé potraviny u pacientů přecitlivělých na pylové alergeny a vyvolávají především tzv.

orální alergický syndrom. Velmi často se zkřížená reaktivita objevuje mezi příbuznými druhy trav a rovněž mezi příbuznými druhy Asteraceae (hvězdnicovité). U dřevin existuje poměrně vysoký stupeň zkřížené reaktivity mezi druhy (rody) taxonomicky příbuzných čeledí kvetoucími na jaře. Jedná se především o zkříženou reaktivitu mezi jednotlivými zástupci příbuzných čeledí břizovitých – Betulaceae (Betula, Alnus – bříza, olše) a lískovitých – Corylaceae (Corylus, Carpinus – líska, habr). Je ovšem známa i zkřížená reaktivita alergenů bez jakékoliv taxonomické příbuznosti, např. mezi pylovým extraktem z břízy a některými druhy zeleniny (mrkev, celer, brambory, melouny), ovoce (jablka, třešně, hrušky) či jedem blanokřídlého hmyzu [AALBERSE a kol. 1981, CALKHOVEN 1967, KOČÍ 2010]. Pylový extrakt z pelyňku (Artemisia vulgaris) zase zkříženě reaguje například s alergeny kořenové zeleniny celeru a mrkve [NEGRINI 1992] i s alergeny semen mrkvovitých rostlin, která se často používají jako koření (kmín, koriandr, fenykl..aj.).

3.3.7 PATOFYZIOLOGIE POLINÓZY

Antigeny indukující specifickou protilátkovou odpověď typu IgE se nazývají alergeny [HRUBIŠKO a kol. 2003]. V průběhu alergické reakce dochází ke specifické interakci alergenů s protilátkami typu IgE navázanými na receptory mastocytů a bazofilů. Přemostění dvou molekul IgE alergenem vede k modifikaci receptoru pro IgE na mastocytu, resp. bazofilu. Následuje komplexní proces biochemických pochodů, které vyústí v aktivaci buňky, spuštění metabolické dráhy kyseliny arachidonové a v uvolnění mediátorů [CRETICOS 1995]. Dosud identifikované biochemické mediátory zahrnují preformované mediátory, především histamin, dále různé enzymy a chemotaktické faktory (důležité v následné pozdní fázi alergické reakce). Vedle preformovaných mediátorů se v důsledku metabolismu kyseliny arachidonové v buňce rovněž některé mediátory vytvářejí zcela nově. Jsou to především prostaglandiny (PGD₂), leukotrieny (největší význam pro alergická onemocnění mají cysteinylové leukotrieny LTC₄, LTD₄, LTE₄) a destičky aktivující faktor (PAF) [WASSERMAN 1983, KALINER, LEUMANSKI 1992, MC MILLAN 2001]. Uvolněné mediátory jsou zodpovědné za rozvoj slizničního edému, produkci hlenu a zvýšení cévní permeability [NACLERIO 1991]. Tyto projevy jsou patofyziologickým podkladem klinických potíží pacienta. U mnohých pacientů je možné pozorovat i pozdní fázi alergické reakce. Tato fáze začíná typicky za 4 – 10 hodin po expozici alergenů a vede k nové vlně klinických

potíží. Na podnět chemotaktických faktorů uvolněných v časné fázi alergické reakce z mastocytů, makrofágů a lymfocytů jsou totiž postupně do místa zánětu přitahovány neutrofilly, eozinofily a bazofily, které v důsledku aktivace začnou rovněž uvolňovat zánětlivé mediátory. Klíčovou úlohu v pozdní fázi alergické reakce hrají eozinofily [BASCOM a kol. 1988, ILLIOPOULOS a kol. 1990]. Pozdní fáze alergické reakce je zodpovědná za rozvoj a udržování hyperreaktivitu sliznic a dýchacích cest [NACLERIO 1991]. Vyvolává zvýšenou odpověď i na opakovanou expozici specifickému alergenu, tzv. priming effect, a zvyšuje citlivost na nespecifická dráždidla, jako jsou různé polutanty, vůně, chladný vzduch nebo kouř [ILLIOPOULOS a kol. 1990, WACHS a kol. 1989].

3.3.8 KLINICKÉ PROJEVY POLINÓZY

Klinické projevy polinózy jsou velmi rozmanité. Dominantní příznaky polinózy se objevují tam, kam se pylové zrno s ohledem na svou velikost snadno dostane – na dobře přístupné sliznici nosu a oční spojivce. Nejčastějším projevem je tedy alergická rinokonjunktivitida. Projevuje se svěděním nosu a očí, slzením, kýcháním, vodnatou či sklovitou sekrecí z nosu, ale také zduřením nosní sliznice s pocitem ucpaného nosu, zhoršením čichu, otokem očních víček, může se objevit i retrobulbární bolest. S těmito projevy bývají často spojeny další potíže, jako svědění v ústech a krku. V souvislosti s novými poznatky o vzájemné propojenosti horních a dolních cest dýchacích se v poslední době opouští zavedené dělení alergické rýmy na sezonní a celoroční a zavádí se obdobné dělení jako u astmatu, tedy na alergickou rýmu intermitentní a alergickou rýmu perzistující (mírnou a středně silnou až silnou). Dokonce se hovoří o chronickém alergickém syndromu na jednotných dýchacích cestách – projevy astmatu se totiž objevují až u 40% osob s alergickou rýmou a naopak u astmatiků je možné zachytit projevy alergické rýmy až v 80 – 90% [BOUSQUET a kol. 2001, SPIČÁK 1994]. Nepřekvapí proto, že u pylových alergiků, kde dominují právě projevy alergické rýmy, bývají rovněž časté projevy bronchiální hyperreaktivitu až manifestního astmatu. Protože pylová zrna vzhledem ke své velikosti nepronikají až do dolních dýchacích cest, vysvětlovaly se tyto projevy reflexními mechanismy při podráždění nazofaryngeálních receptorů či hematogenním přenosem alergenů. V poslední době se za nejpravděpodobnější mechanismus vzniku pylového astmatu pokládá inhalace alergenů navázaných na částicích menších, než je celé pylové zrno, tedy na úlomcích pylových

zrn nebo na drobných prachových částicích do rozměru asi 5 – 10 μm [SPIEKSMÁ a kol. 1995].

Následující projevy polinózy jsou méně časté, přesto nejsou nijak vzácné. Nejčastějším kožním projevem bývá svědění kůže a výsev exantému nebo kopřivkových pupenů, u pacientů s ekzémem může v pylové sezoně docházet ke zhoršení projevu. Vzácněji se objevuje i typický Quinckeho edém. Gastrointestinální potíže vznikají polykáním pylových zrn zachycených na sliznici horních cest dýchacích nebo požitím potravin, které pylová zrna obsahují (např. med). Projevují se bolestmi až křečemi břicha, nadýmáním a průjmami. Jiným mechanismem vzniká již zmíněný orální alergický syndrom, za který je zodpovědná zkřížená reakce mezi některými potravinami a pylovými alergeny, jež je vyvolávána alergeny s obdobnou chemickou strukturou nebo panalergeny. Projevuje se především svěděním a lehkými otoky orofaryngu, vzácněji mohou být přítomny rovněž typické pylové projevy jako rinokonjunktivitida či astmatické potíže. Nejčastěji se objevuje po požití některých druhů ovoce a zeleniny. Jako projevy polinózy jsou rovněž popsány pseudorevmatické příznaky – bolesti kloubů, kostí nebo svalů. U řady polinotiků dochází v pylové sezoně ke snížení celkové výkonnosti, zvýšené únavnosti, poruchám soustředění, mohou se objevovat i subfebrilie. Je známo, že stejné množství pylových zrn ke konci pylové sezony vyvolá u téhož pacienta silnější potíže než na začátku sezony. Zvýšená dráždivost přetrvává až 6 týdnů po odeznění pylové sezony, potom postupně mizí (tzv. priming effect) [CONNEL 1968]. (Zatím není zcela jasné, zda je tento jev vázaný pouze na stejný pylový alergen nebo zda k němu u pacientů s vícečetnou alergizací dochází i po expozici jinému pylovému alergenu v průběhu sezony; např. zda po sezoně břízy pacient s přecitlivělostí na břízu i trávy bude rovněž zvýšeně reagovat na expozici travním alergenům) [NACLEIRO a kol. 1988].

3.3.9 DIAGNOSTIKA POLINÓZY

Stanovení diagnózy u pylové alergie nebývá většinou příliš obtížné. Základním diagnostickým nástrojem je v tomto případě jednoznačně pečlivě odebraná anamnéza. Typické projevy se sezonním průběhem, mnohdy s údajem o výskytu polinózy v rodinné anamnéze, umožňují ve většině případů bezpečně stanovit diagnózu. Navíc při podrobnějším zaměření na kolísání potíží v poslední sezoně je často možné při znalosti průběhu sezony jednotlivých alergizujících rostlin už z anamnézy vyčlenit několik

nejpravděpodobnějších pylových alergenů. Konečné ověření diagnózy a přesné stanovení vyvolávajících alergenů se provádí kožními testy, v některých případech vyšetřením specifického IgE. Ve sporných případech může pomoci šetření přímo v místě bydliště nebo v jiné lokalitě maximálních potíží pacienta. Ostatní diagnostické možnosti, jako spojivkové či nosní provokační testy, jsou využívány jen zřídka a většinou nepřinášejí žádné další podstatné upřesnění diagnózy. Mnohdy bývá vhodné doplnit ORL a oční vyšetření. Kožní testy u polinózy se obvykle provádějí metodou prick. Ta je při použití lancet s 1mm hrotem a kvalitních alergenových extraktů do jisté míry standardizovaná [INTERNATIONAL RHINITIS MANAGEMENT WORKING GROUP 1994].

Alergenový extrakt je směsí proteinů, oligosacharidů, lipidů, glykoproteinů a glykolipidů. Epitop je aktivní složkou extraktu, jehož konfigurace je charakterizována podle aminokyselinových sekvencí [ŠPICÁK 2003]. Méně často se kožní testy provádějí intradermálně. Důvodem je větší bolestivost, vyšší procento falešně pozitivních výsledků (antihistaminika první i druhé generace, s imunomodulačním účinkem, ketotifen, imipramin, fenothiaziny, kortikosteroidy) a větší riziko systémových reakcí. V porovnání s vyšetřením specifického IgE mají kožní prick testy srovnatelnou výpovědní hodnotu, jsou ale podstatně levnější. U kožních prick nebo intradermálních testů se u polinózy hodnotí za 15 – 20 minut velikost vzniklého pupenu, za pozitivní se považuje pupen o velikosti 3 a více milimetru [INTERNATIONAL RHINITIS MANAGEMENT WORKING GROUP 1994]. Vyšetření specifických IgE protilátek u podezření na polinózu je indikováno jen v těch případech, kdy není možné provést kožní testy. Jedná se především o pacienty s některými kožními chorobami a reakcemi, zvláště ekzémem a výrazným dermatografismem. Dále tehdy, není-li možné vysadit medikaci, která ovlivňuje kožní reakci, u pacientů s kardiopulmonální dekompenzací nebo s vysokým rizikem anafylaxe při kožním testování. Někdy je vyšetření specifických IgE protilátek výhodné u malých dětí nebo jiných špatně spolupracujících pacientů a rovněž při zjevné diskrepanci mezi anamnézou a výsledkem kožních testů.

3.3.9.1 NEFARMAKOLOGICKÉ MOŽNOSTI

PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ:

- KOMUNÁLNÍ OPATŘENÍ

Základním předpokladem pro zmenšení výskytu pylových potíží je snížení kontaktu pacienta s alergeny. U pylových alergií v době pylové sezony je téměř nemožné se pylovým alergenům zcela vyhnout, protože se vyskytují v ovzduší ubikvitárně, přesto lze alergenovou zátěž dodržováním vhodných opatření alespoň částečně snížit. V tomto směru jsou velmi důležitá některá komunální opatření. Při plánování a výstavbě městských sídlišť a vysazování parků je nutné zabránit vzniku větších seskupení rostlin téhož druhu, tzv. monokultur. Některé dřeviny nejsou do parku vůbec vhodné – vedle rostlin jedovatých k nim patří především bříza, černý bez a olše. Opatrnosti je třeba také při vysazování platanu. Velmi důležitá je pečlivá údržba trávníků – ty je nutné vždy včas pokosit ještě před zahájením květního období a pokosenou trávu ihned odvézt. Pokosené seno může být pro polinotika agresivnější než živá tráva, protože při schnutí dochází ve stejnou dobu k hromadnému uvolnění pylu z pokosené trávy. Kosení je třeba pravidelně opakovat během celého léta. Alergenovou zátěž prostředí rovněž silně zvyšuje pyl uvolňovaný z agresivních plevelů, kterými rychle zarůstají neošetřené rumištní plochy a skládky.

- REŽIM DNE V PYLOVÉ SEZÓNĚ

Během vrcholící pylové sezony je dobré podle možností omezit vycházky z domu, zvláště za slunečných a větrných dnů. Maximum pylu bývá v ovzduší kolem poledne, nejvhodnější částí dne pro pohyb mimo domov je časné ráno. Rovněž při dešti a těsně po dešti je v ovzduší minimální koncentrace pylu. Po návratu domu lze pyl, který ulpěl na šatech a ve vlasech, odstranit osprchováním a opláchnutím vlasů, převlečením oděvu. Doma se doporučuje omezit větrání nebo větrat alespoň přes vlhké prostěradlo či přes sousední místnost. Během sezony se osvědčuje využívat v domácnosti i na pracovišti čističe vzduchu. Při cestách autem nevětrat oknem, vybavení vozu je užitečné doplnit o pylový filtr. Pro polinotiky je nevhodná práce na poli, v zahradě či sběr léčivých rostlin a podobné aktivity. Pro dovolenou je dobře vybrat místo u vodní plochy, raději s písčnými nebo kamenitými okraji, vyhýbat se zatravněným

břehům. Nejlepší je podle možností vycestovat v kritickém období do klimaticky výhodnějšího prostředí – na horách bývá pylová sezona o 1 – 3 týdny zpožděná, naopak u moře se směrem k jihu Evropy zvětšuje předstih sezony. Při pobytu v přírodě se doporučuje vyhýbat okraji lesa, který funguje jako filtr, v němž se pyl koncentruje, naopak uvnitř lesa bývá pylu velmi málo.

- **EDUKACE PACIENTA**

Velmi důležitou součástí léčby jakéhokoliv chronického onemocnění, kam nepochybně polinóza patří, je edukace pacienta. Bohužel, tato část léčby bývá dosud lékaři nejčastěji opomíjena. Pacientovi je třeba opakovaně vysvětlit příčiny onemocnění, plán léčby, možné nežádoucí účinky jednotlivých léků a léčebných postupů i možnosti prevence. Nedílnou součástí edukace pacienta je rovněž Pylová informační služba (PIS). Lékař by měl pacienta o tomto zdroji informací poučit a vysvětlit možnosti využívání informací PIS v prevenci a léčbě polinózy. Aktuální informace o pylové situaci v jednotlivých zemích Evropy může zájemce najít na internetové adrese <http://www.polleninfo.org>, česká PIS má své internetové stránky na adrese <http://www.pylovasluzba.cz>, kde je umístěn také atlas hlavních alergizujících rostlin.

3.3.9.2 SPECIFICKÁ ALERGENOVÁ IMUNOTERAPIE (SIT)

SIT je proces, při němž se do organismu vpravují stoupající dávky alergenu, na který je pacient přecitlivělý. Používá se jako preventivní léčba příznaků, jež se u přecitlivělé osoby objevují po expozici alergenu. Cílem SIT je snížit patologickou odpovídavost organismu na konkrétní alergen (navození imunologické tolerance organismu), až jí zamezit. Ačkoliv Noon [NOON 1911] zavedl SIT do klinické praxe už před více než 100 lety, v celosvětovém pohledu zůstávala SIT dlouhou dobu do jisté míry kontroverzní metodou. Důvodem bylo především jisté riziko celkových nežádoucích účinků, velké množství empiricky používaných terapeutických protokolů a nerovnoměrná kvalita podávaných alergenových přípravků. V posledních letech však došlo díky standardizaci alergenů, zkvalitňování alergenových vakcín a výsledkům kvalitních klinických studií ke značnému průlomů v náhledu na tuto metodu a SIT se celosvětově stává uznávanou metodou léčby řady alergických onemocnění. U polinózy byla účinnost SIT pro řadu pylových alergenů prokázána dvojitě slepými pokusy při

aplikaci subkutánní i sublingvální, a to jak při léčbě pylové rinokonjunktivitidy (injekční SIT i sublingvální imunoterapie – SLIT), tak pylového astmatu (injekční SIT, částečně SLIT) [LI a kol. 2003, FREW 2003, CANONICA, PASSALACQUA 2003, BOUSQUET a kol. 1998].

V současné době se předpokládá, že hlavním mechanismem účinku injekční SIT je zásah na úrovni regulačních Th lymfocytů – přesmyk Th2 typu lymfocytové imunitní odpovědi na Th1 CD4+ odpovědi [BOUSQUET a kol. 1998, AKDIS, BLASER 2000]. SIT přitom může vést jednak k navození neodpovídavosti Th2 systému (anergie), která je spojena s přítomností IL-10, jednak k podpoře protekční aktivity Th2 systému (imunitní deviace), jehož produkty, především IFN- γ , inhibují syntézu IgE a rozvoj eozinofilního zánětu [AKDIS, BLASER 1999 a 2000, AKDIS, BLESKEN 1998]. Experimentální výsledky zaměřené na srovnání produkce cytokinu v průběhu alergické reakce s produkcí cytokinu během SIT a po jejím ukončení svědčí spíše pro podporu Th1 systému. Cesty k dosažení tohoto účinku u SLIT jsou zřejmě odlišné a nejsou zatím v plné míře prozkoumány. V průběhu SIT dochází k četným změnám v měřitelných imunologických parametrech. Nejvýznamnější se týkají hladin cirkulujících alergických specifických protilátek: počáteční vzestup a pozdější pokles hladiny IgE a vzestup titru tzv. blokujících protilátek IgG4. Imunomodulační vliv SIT zasahuje komplexně do celého řetězce alergické reakce od prezentace antigenu přes zásah do rovnováhy (či dysbalance) Th1, Th0, Th2 lymfocytu až po snížení zastoupení efektorových buněk zánětu v cílových orgánech a změny v jejich funkci. Všechny uvedené sledovatelné laboratorní změny jsou v současné době považovány za sekundární důsledek změny vlivu regulačních lymfocytů a pro žádnou z nich nebyl jednoznačně prokázán vztah k účinnosti a přetrvávání efektu SIT. Heterogenita působení při použití různých typů a forem alergenových vakcín a individuální odezva u jednotlivých pacientů jsou jedním z důvodů obtížného sjednocení při hodnocení jejich efektivity. Kauzální ovlivnění alergické reakce pomocí SIT nutně vede k úvahám o možném dlouhodobém „vyléčení“ polinotika a o případném zabránění progresu pylové rinokonjunktivitidy do pylového astmatu.

Dosud není shody o délce trvání účinku SIT po ukončení léčby, většinou se délka účinku počítá na roky. Velmi lákavá úvaha o ochraně před rozvojem astmatu u polinotiků byla dlouhá léta podpořena pouze výsledky Johnstoneova 14- letého sledování dětí s alergickou rinitidou, kdy u dětí léčených SIT byla ve věku 16 let zjištěna podstatně nižší prevalence astmatu ve srovnání s dětmi, jimž bylo podáváno

placebo [JOHNSTONE, DUTTON 1968]. Nedávno publikovaná rozsáhlá studie PAT dospěla k obdobným výsledkům, a tak znovu obnovila zájem o tuto možnost prevence astmatu. Indikace a vedení léčby SIT patří pro svou komplexnost a určité riziko nežádoucích reakcí do rukou specialistů – alergologů. Pro indikaci SIT u polinotika je nutné splnění několika podmínek [INTERNATIONAL RHINITIS MANAGEMENT WORKING GROUP 1994, Li a kol. 2003, BOUSQUET a kol. 1998] - přítomnost polinotických projevů ve smyslu rinokonjunktivitidy nebo astmatu, – potvrzení přecitlivělosti I. typu na konkrétní alergen pomocí kožních testů nebo vyšetření specifických IgE protilátek, – tento alergen se v rozhodující míře podílí na klinických potížích, pacient je alergický jen na jeden, maximálně na několik málo pylových alergenů, – alergen není možné eliminovat z prostředí pacienta, – je k dispozici kvalitní (standardizovaný) alergenový extrakt pro SIT, – nejsou přítomny kontraindikace SIT (nestabilní astma, těžký imunodefekt, autoimunitní nebo maligní onemocnění, průvodní léčba β -blokátory, kardiopulmonální nebo endokrinologická dekompenzace, kontraindikace podání adrenalinu či jiný stav znemožňující léčbu anafylaktické reakce, nejistá nebo špatná spolupráce pacienta; SIT se nezahajuje v graviditě).

Z praktického pohledu jednoznačnou indikací SIT u pacienta s polinózou je monosenzibilizace na pyl s dostatečně dlouhou dobou květu, kdy období potíží dobře odpovídá výsledkům kožních testů (resp. výsledkům vyšetření specifických IgE). U polysenzibilizovaných pacientů, kterých je většina, je indikace k zahájení SIT tehdy, pokud se podaří zjistit alergeny (maximálně 2 – 3), které jsou v průběhu pylové sezony dominantní příčinou potíží, jsou k dispozici ve standardizované formě a je možné vytvořit vhodnou alergenovou směs pro SIT nebo je pacient ochoten podstoupit souběžnou aplikaci více (2 – 3) vakcín. Paralelní nebo postupná (po ukončení SIT jednou skupinou alergenů se zahájí SIT další skupinou alergenů) aplikace více vakcín je jediným řešením, pokud je pacient přecitlivělý na nepříbuzné skupiny alergenů, např. pyly a roztoče. Zde navíc při smíchání těchto alergenů do jedné vakcíny hrozí enzymatická degradace alergenů a ztráta účinnosti [Li a kol. 2003, BOUSQUET a kol. 1998].

Zatímco v některých zemích stále ještě uvažují o zahájení SIT až tehdy, když selže veškerá ostatní léčba, **v řadě zemí, mezi nimi i v ČR, se naopak doporučuje zahájit SIT u pacientů s počínajícími alergickými projevy. Při včasném zahájení SIT se může uplatnit vliv preventivního účinku na průběh onemocnění; a snad i zabrzdění vzniku pozdních komplikací.** Naopak při vyčkávání se zahájením SIT až

do stadia, kdy je ostatní medikace nedostatečně účinná, již mnohdy dojde k ireverzibilním změnám, které ani SIT neovlivní. Mimoto je riziko nežádoucích účinků SIT aplikované v lehčím stadiu onemocnění podstatně nižší [BOUSQUET a kol. 1998, SEBEROVÁ 1994].

Z důvodu vyšší účinnosti a bezpečnosti SIT se doporučuje používat kvalitní standardizované alergenové extrakty [Li a kol. 2003]. V současné době převládá užívání depotních injekčních forem před vodnými roztoky, velmi rychle stoupá obliba alergenových extraktů pro sublingvální podání. Aplikace SIT trvá běžně 3 – 5 let [Li a kol. 2003, BOUSQUET a kol. 1998]. Předsezonní aplikace s pauzou během sezony v posledních letech ustoupila aplikaci celoroční.

V posledních letech byl dosažen další zásadní pokrok v podávání SIT zavedením tabletové formy. Účinnost této formy podávání SIT je jednoznačně prokázána zásluhou dobře postavených a dostatečně rozsáhlých, nově provedených klinických studií a tento důkaz je vzhledem ke kvalitě těchto studií u tablet **nejvyšší mezi všemi formami podávání SIT** [RYBNÍČEK 2004].

3.3.9.2.1 SPECIFICKÁ IMUNOTERAPIE ALERGICKÉ RÝMY MĚNÍ KONCENTRACE TRYPTOFANU V KRVI

Odborníci se domnívají, že koncentrace AMK tryptofanu v krvi a léčba pomocí SIT spolu souvisí. Jedním z důležitých faktorů při vzniku alergické rýmy a astmatu je převaha takzvané Th2-imunitní odpovědi nad Th1-imunitní odpovědí. V důsledku toho může dojít k potlačení některých biochemických drah, které jsou aktivovány v průběhu Th1-imunitní reakce. Jednou z takových drah je i biochemická degradace aminokyseliny tryptofanu, takže **u pacientů s alergickou rýmou se můžeme setkat se zvýšenou hladinou tryptofanu v krvi.** Zajímavé je, že právě jedinci, kteří mají koncentrace tryptofanu v krvi nejvyšší, většinou nereagují na léčbu specifickou imunoterapií, která je u nich jen málo účinná. Koncentrace tryptofanu lze ovlivnit léčbou. Protože **vysoké koncentrace tryptofanu v krvi jsou spojeny s nízkou účinností specifické imunoterapie v léčbě alergické rýmy,** zajímali se odborníci o to, zda a jak lze hladinu tryptofanu ovlivnit – například pomocí upraveného léčebného režimu specifickou imunoterapií.

Nedávno byly zveřejněny výsledky studie, ve které byly přibližně dvaceti pacientům s pylovou alergií aplikovány po ukončení běžné specifické imunoterapie a po

skončení pylové sezóny ještě další 4 injekce specifické imunoterapie. Autoři studie poté zjišťovali, zda tato „přídavná“ terapie nějak ovlivní hladiny tryptofanu v krvi pacientů. Ukázalo se, že další čtyři dávky specifické imunoterapie v průměru významně snížily koncentraci tryptofanu v krvi pacientů.

Autoři uvedené studie se proto domnívají, že **metabolismus tryptofanu se podílí na vzniku a průběhu alergické reakce, a i když dosud není jisté, jakým mechanismem ke zvýšení koncentrace tryptofanu v krvi dochází**, mohou nám její průběžné změny posloužit jako ukazatel účinnosti léčby [KOFLEK a kol. 2012].

3.3.10 FARMAKOTERAPIE POLINÓZY, CELKOVÁ LÉČBA

Farmakoterapie polinózy vychází ze zásady vhodného ovlivnění patofyziologického procesu vzniku onemocnění. Zamezuje uvolňování působků z některých buněk, především z mastocytů a bazofilů. Současně je zaměřena na zastavení a zvrácení rozvoje alergického zánětu, který následuje. Nezbytnou součástí léčby je rovněž zvládnutí akutních potíží pacienta vyvolaných již vyplavenými působky. Základní prvky léčby tedy zahrnují antihistaminika, která především blokují účinky histaminu (novější antihistaminika ovšem vykazují i řadu dalších antialergických účinků), zavedení adekvátní protizánětlivé léčby lokálními kortikosteroidy, kromoglykátém dvojsodným (dinatrii cromoglicas – DNCG), nedokromilem sodným (nedocromil) či jinými nesteroidními protizánětlivými léčivy, a podání dekonjestiv (popř. β -mimetika při astmatických potížích) k léčbě akutních příznaků. Dekompensace astmatu vyžaduje nasazení komplexní antiastmatické terapie, ostatní projevy je třeba léčit zavedením vhodné lokální terapie podle postiženého cílového orgánu. V následujícím přehledu se zaměříme na léčbu nejčastějších projevů polinózy, které vytvářejí obraz alergické rinokonjunktivitidy [RYBNÍČEK 2004].

K celkové léčbě jsou v současné době používána: Antihistaminika, Antileukotrieny, Systémové kortikosteroidy, Lokální léčba, Topická antihistaminika, Inhibitory degranulace mastocytu, Topické kortikosteroidy, Anticholinergika, Dekongestiva (α -sympatomimetika, vazokonstrikční látky) [RYBNÍČEK 2004].

Současný vývoj alergenové imunoterapie spěje k tabletám. V praxi bude již brzy k dispozici zcela nový lék – sublinguální tableta se směsí pěti druhů travin [KOČÍ 2010]. Vědci se zvláště zajímají o to, jaké molekuly umožňují žírným buňkám

„neunavitelnost“ a opětovnou aktivaci; budoucí léky tady mohou mířit proti žírným buňkám [EKOFF a kol. 2012].

3.4 STANDARDIZACE ALERGENŮ

Surové extrakty obsahují široké spektrum různých složek, kde vedle alergenních látek je též značné množství alergenně neaktivních komponent. Z těchto důvodů je snaha výrobců o stále přesnější definování obsahu (standardizace) jimi vyráběných alergenních přípravků. Konečným cílem standardizace je určení celkové biologické aktivity a kvalitativní i kvantitativní ohodnocení daných přípravků vzhledem k hlavním alergenům [BUREŠ a kol. 1999]. Účinnou látkou v alergenním extraktu jsou aktivní látky – alergeny, které mají schopnost se specificky vázat s lidskými protilátkami třídy IgE. Proto je standardizace zaměřena na stanovení a zjištění přítomnosti právě těchto alergenů v alergenním extraktu [HOCHOVÁ 2002]. Pomocí moderních laboratorních metod lze sledovat skutečnou biologickou aktivitu reakcí se specifickými IgE látkami. Doposud neexistuje celosvětově závazná a jednoznačná harmonizace standardizačních postupů, proto si většina výrobců vytváří svůj standardizační program a ohledem na současnou lékařskou a vědeckou potřebu a ve shodě s dostupnými rámcovými doporučeními např. Nordic Quidelinec nebo směrnice FDA platící v USA.

Při standardizaci výrobce nejdříve připraví svůj vlastní vnitropodnikový standard. Nejprve je zbaven nízkomolekulárních složek extraktu (balastních látek), poté jsou extrakty testovány kožními testy na souboru alergických pacientů a ze získaných výsledků se pomocí regresní přímky určí celková biologická aktivita (vyjádřená dle výrobce v různých jednotkách). Biologická aktivita 1000 JSK (jednotek standardní kvality) je definována pro vnitropodnikový standard jako aktivita, která vyvolává u osob přecitlivělých na daný alergen pupen o velikosti 5,5 mm. Dále se určí přítomnost jednotlivých alergenů např. pomocí SDS - PAGE. Při kvantifikaci je určena *in vitro* celková biologická aktivita (ELISA test) [BUREŠ a kol. 1999].

3.5 SBĚR A VÝROBA PYLU

Historie sběru pylů v ČR jako suroviny pro farmaceutický průmysl má poměrně mladou historii. První pokusy v ČSSR byly provedeny v roce 1988. Po roce 1989 pokračovala tato činnost jako privátní aktivita. Současně působí na trhu několik firem,

postupně odštěpených od primárního zakladatele (který osobně spolupracoval na tomto projektu). Technika sběru různých druhů pylů, manipulace s nimi, jejich čištění, sušení a příprava k expedici je chráněným duševním vlastnictvím každé firmy. Do roku 2001 byl znám pouze jediný nedokonalý způsob čištění pylu, a to prosévání přes síta. Na základě empirických zjištění a výzkumu vynalezl zakladatel převratnou technologii a v letech 2002 - 2007 se stal původcem i majitelem dvou patentových spisů v ČR a zároveň Mezinárodního patentu v 34 zemích celého světa. Zařízení je založeno na působení elektrostatického pole. Pylové zrno má kladný náboj, zatímco většina cizorodých částic má záporný. Touto metodou lze dosáhnout biologické čistoty 99 – 100%. Čistý pyl neobsahuje žádné další příměsi cizích pylů, neobsahuje plísňe, bakterie; je z hlediska standardních laboratorních nároků sterilní. Pyl zůstává při správném uskladnění aktivní („živý“) více než 1,5 roku. [TOMEK 2004, 2006, 2007].

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 ZALOŽENÍ POKUSU

4.1.1 LOKALITA

Název:	TAGRO Červený Dvůr, spol. s r.o.
Tábor – Měšice	
Nadmořská výška:	420 m
Průměrná roční teplota:	7,9 °C
Průměrný roční úhrn srážek:	590 mm
Podloží:	geologicko-petrografický substrát (Gps.) – migmatitizované biotické až dvojslídne pararuly
Půdní typ:	kambizem kyselá
Půdní druh:	hlinitopísčité
Rozbor půdy:	pH _{CaCl2} 5,15, CEC střední (180 mmol ⁺ . kg ⁻¹), C _{ox} 14,6 g . kg ⁻¹ , N _{NH4} 4,9 mg . kg ⁻¹ , N _{NO3} 21,3 mg . kg ⁻¹ , P 154 mg . kg ⁻¹ , K 407 mg . kg ⁻¹ , Mg 125 mg . kg ⁻¹ , Ca 1385 mg . kg ⁻¹ (Melich III)
Sorpční kapacita půdy:	střední; v rozmezí 13 – 24 mval/100 g půdy
Barevný kvocient:	Q _{4/6} = 4,1
Datum založení pokusu:	4.4. 2009
Předplodina:	ječmen jarní
Předseťová příprava:	po sklizni ječmene jarního podmínka radličkovým podmínáčem a na podzim zimní orba. V roce zásevu: příprava pozemku rotačními branami, výsev malopracelním secím strojem „Ojord“ a následné uválení „Cambridge“ válci. V roce zásevu: 3 x odplevelovací seč maloparcelním sklízečem zelené hmoty MPZ 115.

4.1.2 SCHEMA POKUSU

Porost byl založen jako maloparcelkový pokus s kostřavou červenou (*Festuca rubra* ssp. *rubra* L.) odrůda Tagera, st. C1. Plocha parcelky 10 m²; každá varianta v 5 opakováních. Způsob a vedení pokusu (znáhodnění číselného označení parcel) bylo prováděno v souladu s metodikou Státních odrůdových zkoušek ÚKZÚZ viz Obr. 6 [BENEŠ 1982].

Velikost parcelky:	1 m x 10 m
Mezera mezi A x B x C:	5 m
Celková výměra pokusu:	15 m x 40 m
Sudé parcelky:	sklizeň pylu
Liché parcelky	bez sklizně pylu

4.1.3 ZÁSEV

Výsevek: 15 kg · ha⁻¹ – čistosev; bez krycí plodiny
Šířka řádků: 200 mm; 6 řádků na 1 parcelce (+ 5 mezer)

4.2 AGROCHEMICKÉ ANALÝZY PŮDY

Základní rozbory (anorganické) provedla certifikovaná laboratoř AGRO – LA, spol. s r.o., J. Hradec (Mehlich III) – viz přílohy č. 4, 5, 6. Další rozbory (organické) provedla laboratoř JCU, ZF, Katedry aplikovaných rostlinných biotechnologií. Na počátku pokusu byl odebrán průměrný homogenizovaný vzorek z pokusného pozemku (byl rozdělen na 2 části pro oba typy rozborů).

č. parcelky										varianta	dávka N
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	nehnojeno
9	7	10	6	8	3	1	5	2	4	B	1/2 N
8	4	1	7	2	5	10	9	3	6	C	plná dávka N

Obr. 6 Schema pokusu

4.2.1 STANOVENÍ SORPČNÍ KAPACITY

1. Do vysoké 250 ml kádinky odvážit (přesně na 0,01 g) 10 g půdy, přidat cca 100 ml 0,1M HCl a dát na topnou desku na 30 minut, max. 50 stupňů teplé.
2. Poté se obsah kádinky kvantitativně převede na filtr (filtrační zařízení se skládá z násypky a širokohrdlé Erlenmeyerovy baňky). Zeminu na fitru promývat destilovanou vodou tak dlouho, až ve filtrátu není dokazatelný Cl^- (roztok AgNO_3).
3. Potom ji spláchneme pomocí stříčky a protržení filtru zpět do původní kádinky (vys. 250 ml), doplníme destilovanou vodou na cca 150 ml a za stálého míchání titrujeme Ba(OH)_2 (se stanoveným faktorem roztoku).
4. Hydroxid přidáváme po 1 ml po 1 minutě, vždy těsně před dalším přidavkem odečteme vodivost. To provádíme tak dlouho, dokud není přírůstek vodivosti třikrát za sebou stálý.
5. Hydroxid - stanovit faktor roztoku pomocí kyseliny šťavelové. Do baňky dáme 5 ml Ba(OH)_2 , fenolftalein.

$$T = s \cdot n \cdot f \cdot 100 / N \quad (\text{mval } 100^{-1} \text{ g}^{-1})$$

T = maximální sorpční kapacita

s = spotřeba roztoku Ba(OH)_2 v bodě ekvivalence 6 ml

f = maximální sorpční kapacita

n = normalita $\text{Ba(OH)}_2 = 0,2 \text{ N}$

N = navážka půdy v g

4.2.2 FRAKCIONACE HUMUSOVÝCH LÁTEK (HL)

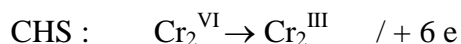
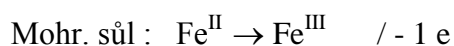
Původní metodika: skripta Pedologie (Návody pro cvičení specializovaného studia pedobiotechnologie) - Ledvina, Váchal, Horáček, Drbal - 1988

Chemikálie:

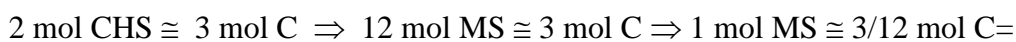
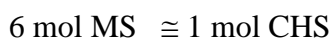
1. extrakční roztok = 0,1 M NaOH + pyrofosforečnan sodný
8 g NaOH + 44,6 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ rozpustit v destilované vodě do objemu 2000 ml
2. nasycený roztok Na_2SO_4
3. chromsírová směs 0,4 N (CHS); 39,23 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ rozpustit v 900 ml destilované vody, pomalu přidávat za stálého chlazení 1000 ml konc. H_2SO_4 a po vychladnutí doplnit destilovanou vodou do 2000 ml
4. Mohrova sůl 0,2 M (MS); 160 g $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ rozpustit v cca 600 ml destilované vody, přidat 40 ml konc. H_2SO_4 a doplnit do 2 l destilovanou vodou, přefiltrovat. Faktor se stanoví na 0,034 M $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (10 g do 1 litru)
5. H_2SO_4 1 M, 56 ml konc. H_2SO_4 doplnit do 1000 ml
6. NaOH 0,05 M, 2 g do 1000 ml

Postup:**4.2.2.1 STANOVENÍ CELKOVÉHO C_{ox} :**

0,1 - 0,3 g (přesně na 4 deset. místa) jemnozeme II (0,25 mm prosev) navážít do kádinky či titračního kelímku. Přidat 10 ml chromsírové směsi (velmi přesně), promíchat a vložit na 45 minut do sušárny při 125°C zároveň s třemi slepými pokusy. Poté vyndat, ochladit, zředit cca 20 ml destilované vody a titrovat za stálého míchání 0,2 M Mohrovou solí známého faktoru na titrátoru DL 50.

Výpočet:v průměru jako C^0

⇓



$= 12 \cdot 3/12 \text{ g C} = 3 \text{ g C}$



$$\text{mg celk. C}_{\text{ox}} / \text{g půdy} = \frac{(V_s - V) \cdot f \cdot 0,6}{m}$$

$$\% \text{ celk. C}_{\text{ox}} = \frac{(V_s - V) \cdot f \cdot 0,6}{m \cdot 10}$$

 V_s = spotřeba Mohrovy soli na slepý vzorek v ml V = - „ - vzorek v ml f = titrační faktor Mohrovy soli (kolem 1) m = navážka půdy v g**Frakcionace:**

2,5 g jemnozeme II (přesně na 0,001 g) + 50 ml extrakčního roztoku navažovat do Erlenmeyerových baněk 100 ml, uzavřít zátkou a nechat stát dva dny za občasného míchání. Pak přidat 4 ml nasyceného roztoku Na_2SO_4 , promíchat a suspenzi odstředit 15 minut při 4 000 ot/min. Supernatant opatrně slít do odměrné baňky 100 ml. Ke zbytku zeminy v kyvetě přidat 10 ml extrakčního činidla + 1 ml nasyceného roztoku Na_2SO_4 , rozmíchat a znovu odstředit 15 minut při 4 000 ot./min. Supernatant opět opatrně přidat do 100 ml odměrky, doplnit destilovanou vodou do 100 ml a uzavřít PE zátkou. Získali jsme zásobní roztok HL.

4.2.2.2 STANOVENÍ C_{ox} HL:

10 ml zásobního roztoku v kádince (100 ml) nebo ve skleněném titračním kelímku nechat odpařit do sucha v sušárně při 60°C, přidat 10 ml (velmi přesně) chromsírové směsi a vložit do sušárny 125°C teplé na dobu 45 minut. Zároveň dát do sušárny 3 slepé vzorky (10 ml CHS). Poté vyndat, ochladit, zředit a titrovat.

$$\% C_{ox} HL = (V_s - V) \cdot f \cdot 0,6 \cdot 10 / 10 \cdot m$$

4.2.2.3 STANOVENÍ C_{ox} FULVOKYSELIN (FK) A HUMINOVÝCH KYSELIN (HK):

40 ml zásobního roztoku HL do kádinky 100 - 150 ml, přidat 3,5 ml 1 M H₂SO₄ (aby bylo pH roztoku pod 2) a nechat sbalit sraženinu HK v sušárně při 60°C 1 hodinu. Za tepla filtrovat předem ovlhčeným filtrem (destilovanou vodou) nejlépe do Erlenek 50ml. 20 ml filtrátu nechat odpařit do sucha a dále zpracovávat stejně jako stanovení C_{ox} HL. Přidávat 5 ml CHS.

přepočítavací faktor pro výpočet FK: $100/40 \cdot 43,5/20 = 5,4375$

$$\% C_{ox} FK = (V_s - V) \cdot f \cdot 0,6 \cdot 5,44 / 10 \cdot m$$

Sraženina HK na filtru se rozpustí horkým 0,1 M NaOH do 50 ml odměrné baňky a doplní po značku destilovanou vodou. 20 ml tohoto roztoku necháme odpařit a pokračujeme opět stejně jako při stanovení HL (ml CHS).

přepočítavací faktor pro výpočet HK: $100/40 \cdot 50/20 = 6,25$

$$\% C_{ox} HK = (V_s - V) \cdot f \cdot 0,6 \cdot 6,25 / 10 \cdot m$$

4.2.3 ROZPUSTNÝ UHLÍK V HORKÉ VODĚ C_{hws}

Chemikálie:

1. chromsírová směs 0,4 N (CHS); 39,23 g $K_2Cr_2O_7$ rozpustit v 900 ml destilované vody, pomalu přidávat za stálého chlazení 1000 ml konc. H_2SO_4 a po vychladnutí doplnit destilovanou vodou do 2000 ml
2. Mohrova sůl 0,2 M (MS); 160 g $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6 H_2O$ rozpustit v cca 600 ml destilované vody, přidat 40 ml konc. H_2SO_4 a doplnit do 2 l destilovanou vodou, přefiltrovat. Faktor se stanoví na $K_2Cr_2O_7$ (10 g v 1 l)
3. $CaCl_2$ 0,01 M; 2,94 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ do 2000 ml
4. $MgSO_4$ 1 M; 24,6 g $MgSO_4$ doplnit do 100 ml

Postup:

10 g jemnozeme II (0,25 mm prosev) do 200 ml zábr. Erlenmeyerovy baňky + 50 ml 0,01 M $CaCl_2$. Vařit mírně na topném panelu 1 hodinu od počátku varu pod vzdušným chladičem. Poté Erlenky uzavřít, ochladit, přidat 4 kapky 1 M $MgSO_4$ - přelít do centrifugačních kyvet a 15 minut odstředit při 4000 ot./min.

Ke stanovení 25 ml supernatantu odpařit, přidat 10 ml CHS, nechat v sušárně při 125°C po dobu 45 minut zároveň s třemi slepými pokusy. Poté vyndat, ochladit, zředit cca 20 ml destilované vody a titrovat za stálého míchání 0,2 M Mohrovou solí známého faktoru na titrátoru DL 50.

Výpočet:

$$\% C_{hws} = (V_s - V) * f * 0,6 * 2/10m$$

V_s = spotřeba Mohrovy soli na slepý vzorek v ml

V = - „ - vzorek v ml

f = titrační faktor Mohrovy soli (kolem 1)

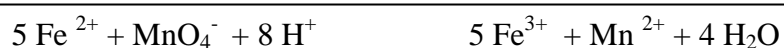
m = navážka půdy v g

4.2.4 STANOVENÍ C_{PM} (BLAIR, 1995)

Připraví se neutrální 33 mM roztok $KMnO_4$ (5,2 g v 1 l). Uchovává se v temnu, stabilní asi 1 měsíc.

Stanovení faktoru: pomocí Mohrovy soli:

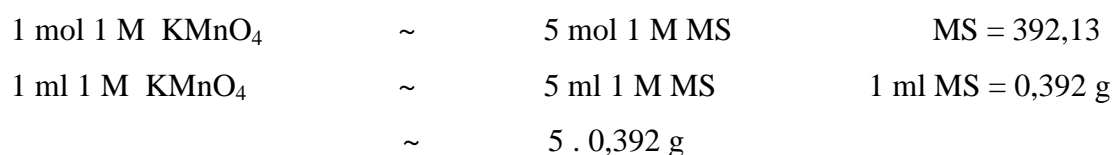
princip:



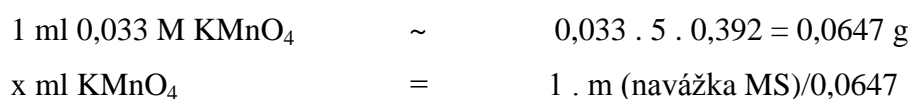
Titrace v kyselém prostředí za přítomnosti H_3PO_4 , která váže vznikající ionty Fe^{3+} do bezbarvého komplexu a tím umožňuje postřehnutí konce titrace.

Postup:

Do titrační baňky navážíme 0,4 – 0,5 g Mohrovy soli (síran železnato amonný) s přesností na desetiny mg, rozpustíme v cca 100 ml destilované vody, okyselíme 10 ml zředěné H_2SO_4 1:1, přidáme 1,5 ml konc. H_3PO_4 a titrujeme připraveným roztokem $KMnO_4$ do trvalého růžového zbarvení



Teoretická spotřeba x:



Skutečná spotřeba: V

Titrační faktor: $f = x/V = m / (0,0647 \cdot V)$

Skutečná koncentrace $KMnO_4 = 0,033 \cdot f = 0,033 \cdot m / (0,0647 \cdot V) = 0,51 m / V$

Kalibrační křivka: Alikvotní množství: 0,6 ml KMnO_4

1,0 ml

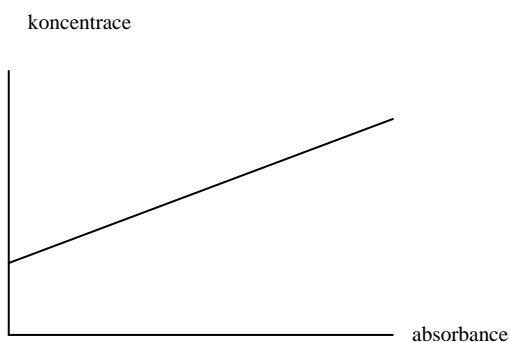
1,4 ml

1,8 ml

2,0 ml

se napipetuje do 100 ml odměrek, doplní destilovanou vodou a měří se absorbance při 565 nm na spektrofotometru. Z výsledků se sestaví kalibrační graf – koncentrace = fce absorbance

$$\text{koncentrace} = \frac{\text{alivot} * \text{exaktní koncentrace } \text{KMnO}_4}{100}$$



Stanovení:

- naváží se množství odpovídající asi 15 mg C_{ox} (stanovené chromsírovou směsí) ze vzorku na vzduchu usušeného (nikoli ze sušiny) do 2 baněk
- vzorek se zalije 25 ml 33 mM KMnO_4 a třepe se 5 minut na rotační třepačce nebo občas rukou
- stejně se připraví nulový – slepý vzorek, opět do dvou baněk
- jedna baňka vzorku a jedna baňka slepého pokusu se zpracuje po 1 hodině, druhé baňky (vzorek + slepý pokus) po 24 hodinách

Zpracování:

Baňky se centrifugují 5 minut silou 1030 g. Z baněk vzorků i slepých pokusů se pipetují 2 ml roztoku KMnO_4 do 100 ml odměrek, doplní vodou a změří se absorbance.

Výpočet:

$$C_{PM} \text{ (mg.g)} = \frac{\{(\text{mmol KMnO}_4 \text{ ve sl.pokusu}) - (\text{mmol KMnO}_4 \text{ ve vzorku})\} * 50 * 25 * 9}{1\ 000 * \text{hmotnost vzorku v g}}$$

4.2.5 STANOVENÍ MINERALIZOVATELNÉHO DUSÍKU

N_{miner}

Chemikálie:

1. K_2SO_4 1%, 20 g K_2SO_4 doplnit do 2000 ml
2. NH_4Cl 1 M, 5,35 g NH_4Cl do 100 ml, pak postupně ředit a připravit roztoky o koncentraci 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M
3. NaOH 10 M, 40 g do 100 ml
4. $NaNO_3$ 10^{-1} M, 0,85 g $NaNO_3$ do 100 ml, pak postupně ředit až na roztok 10^{-4} M
5. KNO_3 , 0,712 g KNO_3 rozpustit do 1000 ml 1% roztoku K_2SO_4 , pak 200 ml tohoto roztoku opět doplnit do 1 litru 1% K_2SO_4 , získáme základní roztok obsahující v 1 ml 0,02 mg N. Dalším ředěním získáme vhodné standardy pro měření kalibrační křivky

Postup:

- Zemina (50 g) na vzduchu vyschlá, prosev 2 mm sítím, ředěná pískem 1 : 1, zavlhčena na 60% RVK (Počítat na hmotnost půdy a ne směsi). 7 dní inkubace při 28°C (řízená vlhkost).
- Poté 1 hodinu třepáno s 1% K_2SO_4 (16 g směsi a 50 ml roztoku), zfiltrovat. Zároveň se naváží vzorek směsi (10 g) pro stanovení sušiny.
- V tom stanovit nejprve NO_3^- a poté NH_4^+ a přepočítat na sušinu. Předem změřit obě kalibrační křivky.
- Stejně zpracovat i neinkubované vzorky (8 g půdy + 8 g písku + 50 ml roztoku).

Výpočty:

- N_{\min} (minerální) je součet $N\text{-NO}_3 + N\text{-NH}_4$ u neinkubovaných vzorků
- N_{miner} (mineralizovatelný) = $N_{\text{miner} - \text{NO}_3} + N_{\text{miner} - \text{NH}_4}$
 $N_{\text{miner} - \text{NO}_3}$ = $N\text{-NO}_3$ ink. vzorku přepočtený na sušinu - $N\text{-NO}_3$ neinkub.vzorku

4.3 AGROTECHNIKA, METODIKA VÝŽIVY A HNOJENÍ

Kostřava červená TAGERA, stupeň množení: Cl; čistosev; hloubka setí 15 mm, šířka řádku 200 mm (na 1 parcelce je 6 osetých řádků + 5 mezer); před zásevem byl proveden chemický rozbor půdy v akreditované pedologické laboratoři.

V roce zásevu (2009) 3 x odplevelovací seč maloparcelním sklízečem zelené hmoty MPZ 115: I. odplevelovací seč 15.7.2009; II. seč 10.8.2009; III. seč zlom IX./X. 2009 (= před zimou; provádí se cca 6 týdnů před ukončením vegetace).

Varianty výživy a hnojení (minerální hnojiva):

Varianta A): nulová, kontrolní porost nebude vůbec hnojen po celou dobu pokusu (ani P, K).

Varianta B): nižší úroveň výživy (poloviční dávka hnojení N): aplikace $70 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$ (na jaře $30 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$ při výšce porostu max. do 100 mm; $40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$ po semenářské seči tj. cca $\frac{1}{2}$ VIII. – $\frac{1}{2}$ IX. při výšce porostu 40 - 100 mm) + [$40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ P}$; $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ K}$] za rok.

Varianta C): vyšší úroveň výživy (plná dávka hnojení N = 2x B): aplikace $140 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$ (na jaře $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$ při výšce porostu max. do 100 mm; $80 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$ po semenářské seči tj. cca $\frac{1}{2}$ VIII. – $\frac{1}{2}$ IX. při výšce porostu 40 - 100 mm) + [$40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ P}$; $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ K}$] za rok.

U variant B a C se provádí první hnojení **před setím**; v dalších užitkových letech se dávky aplikují ve stejné výši. Úroveň výživy N (P,K) pro pokusné účely volíme v reálné dávce a přitom dostatečné (při 2x násobku N) pro posouzení vlivu na zkoumané parametry pylu. Dávky hnojení jsme zvolili na základě všech dostupných

doporučení (včetně doporučení šlechtitelů TAGRO) a s ohledem na složení již hotových vyrobených minerálních hnojiv (více viz diskuse).

Aplikace N na jaře – na počátku vegetace (obruštění porostu); při výšce mladých zelených listů max. do výšky 100 mm, aby se podpořila tvorba **fertilních odnoží**.

Aplikace druhé dávky N – brzy po semenářské seči (tj. cca ½ VIII. – ½ IX.) – při výšce nových mladých listů 40 – 100 mm pro tvorbu **plodných odnoží**.

Sklizeň všech variant (všech parcelek – lichých i sudých) byla provedena přesně – maloparcelním kombajnem. Z každé parcelky zvlášť byla zvážena a zaznamenána hmotnost (kg) a vyhodnocen hektarový výnos. Výsledky byly vyhodnoceny (vliv úrovně hnojení a vliv sběru pylu) na semenářský výnos.

Pokus nebyl po celou dobu výzkumu chemicky ošetřován.

4.4 METODIKA SBĚRU PYLU

Rostlina produkuje značné množství pylu, který je za optimálních podmínek uvolňován postupně (během několika dnů) do ovzduší v závislosti na klimatických podmínkách. Uvolněné pylové zrno je velmi hydrofobické; pokud má možnost – nasaje vodu, a tím je znehodnoceno). Proto není předmětem výzkumu absolutní produkce pylu (z hlediska botanického) z jednotlivých variant a parcelek, ale **pouze ta část pylu, kterou lze popsanou konstantní níže popsanou metodou z rostliny mechanicky sklídit**. Cílem jsou **analýzy vyčištěného a usušeného pylu - tj. finální suroviny pro farmaceutický průmysl**. Na každé z variant byl proveden **sběr pylu z každé sudé parcelky** (tzn. bylo sledováno 5 opakování z každé varianty po dobu 3 let). Kostřava červená kvete obvykle po dobu 5 dní; kulminace kvetení nastává v průměru v termínu kolem 8.6. (začátek kvetení - 2 dny před a 1 den po termínu) prašníky se otevírají každý den jen po dobu několika hodin v závislosti na klimatických podmínkách (v nížinách vždy od 11,00 – 13,00; ve vyšších polohách cca od 14,00 – 17,00 hodin). V případě nepříznivých podmínek se rostlina brání a prašníky zavírá. Sběr byl proveden mechanickým neagresivním sběrem (pomocí 5 elektrických vysavačů s výkonem 8 kPA). Každý pracovník používá pro každý sběr vlastní vysavač; se

sterilizovanými jednotlivými díly: hadicí (průměr 26 mm), hubicí (průměr 50 mm) a předřazeným sítkem (oka 90 μm). Velikost pylového zrna kostřavy červené je v průměru 35 μm (zjištěné extrémy 32 a 40 μm). Pyl je podtlakem zachycován do speciálních papírových sáčků (lisovaný filtrační papír bez mřížky s max. otvory 25 μm); (vše se převáží ve sterilních obalech. Pracovník se pohybuje pomalými pohyby v mezerách; rostlin se dotýká pouze při sběru z konkrétní laty. Pyl vysává ze vzdálenosti 30 mm od laty; pohybuje hubicí ve směru vertikálním (pouze na výšku laty!). Rostliny se hubicí nedotýká; ergonomie paže umožňuje bezproblémovou obsluhu z každé strany parcelky 0,5 m.

Při sklizni (v daný den) pracuje souběžně 5 pracovníků v identických podmínkách dle metodiky - 5 parcelek u každé varianty); vždy je zaznamenán: datum, čas od - do; teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu, směr a síla větru, atmosferický tlak. Sběrač porost pozoruje denně před začátkem prvních signálů kvetení (mechanický rozbor zralosti; stav prašníků – prašník mění barvu na červeno – hnědý). U každé varianty: 1. den kvetení (otevře prašníky odhadem 10% rostlin); 2. den kvetení se toto opakuje; **3. den kvetení se otevírá cca 60% prašníků – probíhá sběr pylu.**

Pyl ze třetího dne kvetení byl po úpravách rozdělen na 2 díly (každý o min. hmotnosti 1g; pokud bude možno toto množství sebrat) – **1. část čistého pylu byla analyzována ve firmě: SEVAPHARMA a.s. (Praha); 2. část byla analyzována v: Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i.** Po sběru musí být sebraný pyl uzavřený v prodyšném sterilním sáčku uložen do přepravky a do 2 hodin (v průměru) dopraven do místa zpracování. Nesmí být vystaven slunečnímu záření; teplotám vyšším než 35°C a kolísání teplot $\pm 10^\circ\text{C}$; (jinak nutno zajistit přepravu v termoboxech).

Cílem sběru pylu nebyl sběr maxima všeho pylu včetně mnoha nečistot a znehodnocených pylových zrn. Proto metodika a technika sběru přesně stanovuje podmínky, jak přesně byl sběr prováděn. Informativně zjistíme údaje o přírodním pylu (sebraném sběrem), ale především hmotnost vyčištěného pylu (upraveného pro farmaceutický průmysl) s použitím maximálně efektivních technologií úpravy pylu.

4.5 METODIKA ÚPRAVY PYLU, MĚŘENÍ VELIKOSTI PYLOVÉHO ZRNA

Úprava nasbíraného pylu je dále prováděna okamžitě, dle standardní metodiky pro příjem pylu, zpracování pylu před vlastním čištěním a uložením (případně adjustací a expedicí) – podrobný popis technologického postupu je chráněným firemním tajemstvím včetně teploty a způsobů manipulace v jednotlivých fázích výroby. Komplexní úprava probíhá v laboratorním prostředí na sterilizovaných přístrojích.

Sebraný pyl (jednotlivé vzorky) se odděleně dosouší na topných deskách 72 hodin při teplotě 32°C. Poté se vyčistí a (s vlhkostí 6%) rozdělí na dvě poloviny. Jedna z polovin bude použita na rozборы chemické; druhá na rozборы alergologické.

Souběžně bude změřena velikost pylových zrn z jednotlivých variant a opakování na rastrovém mikroskopu. Z každé parcelky bude měřeno vždy 5 zrn.

Takto upravený pyl lze se zárukou skladovat min. 1,5 roku (avšak v praxi i více než 2 roky) v hermeticky uzavřených obalech (speciálních vialkách), uložených ve tmě a za dané teploty (- 18°C).

Sběr a úpravu pylu z pokusu provede firma BONAPOL a.s. (pod přímým dohledem majitele patentu, jehož technologie a znalosti používá firma na základě mandátu).

4.6 CHEMICKÉ ANALÝZY

4.6.1 EXTRAKCE FENOLICKÝCH LÁTEK Z UPRAVENÉHO PYLU

Extrakce 1. Hexanem:

1. pyl je nejprve extrahován hexanem - zbaven nepolárních látek, 0,2 g pylu + 3 ml hexanu, extrakce 30 min
2. hexanová frakce se odstraní a sediment se vysuší

Extrakce 2. Sediment je dále následně extrahován pomocí 70% MeOH:

1. sediment + 2 ml 70% MeOH, 30 min, lab. teplota, intenzivní protřepávání
2. centrifugace při 3 500 otáčkách /min, 10 min
3. odebrání supernatantu; sediment je ještě jednou extrahován 1 ml 70% MeOH, 15 min, lab. teplota, intenzivní protřepávání
4. po druhé centrifugaci se oba supernatanty spojí, je zjištěn přesný objem a extrakty se uchovávají při teplotě -18°C (pro následné analýzy)

4.6.2 HPLC ANALÝZA

Analýzy byly provedeny pomocí kapalinové chromatografie na HPLC systému Hewlett Packard model 1050, s detektorem diodového pole Agilent model G1315B, s použitím kolony Luna Phenomenex C18 (2) (150 mm x 2 mm, 3 µm). Objem smyčky byl 5 µl.

Mobilní fáze: voda + acetonitril + kyselina o-fosforečná
Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,1% kyselina o-fosforečná
Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,1% kyselina o-fosforečná
Gradient: 0% - 45% mobilní fáze B v 55 min., 45% - 100% B 10 min.;
s průtokovou rychlostí 0,25 ml/min., při teplotě 25°C.

Fenolické sloučeniny byly detekovány při 220 nm a koncentrace vybraných látek byla vypočtena z kalibračních křivek.

4.6.3 LC - MS ANALÝZA

Analýzy byly provedeny na LC-MS LCQ Accela Fleet (Thermo Fisher Scientific), který je vybaven APCI (zdrojem chemické ionizace při atmosférickém tlaku) a s použitím detektoru s diodovým polem a kolony Hypersil Gold (2,1 x 50 mm, 1,9 µm).

Mobilní fáze: voda + acetonitril + kyselina mravenčí
Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí
Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí
Gradient se zvýšil z 0% B na 45% B během 10 minut, průtok byl 0,400 ml / min.

4.7 ALERGOLOGICKÉ ROZBORY

4.7.1 EXTRAKCE ALERGENŮ

Ze všech dodaných vzorků pylů byly provedeny 10% extrakty v extrakční tekutině ET IIIIF (bikarbonátový pufr s přídavkem fenolu, pH 7,8 – 8,4). Extrakce probíhala 24 hodin v lednici při teplotě +2 až +8°C. Po této době byly extrakty podrobeny filtraci. Nejdříve prefiltr Millipore pro odstranění pylových částic a poté mikrofiltr o porozitě 1,2 a nakonec 0,45 µm. Výsledkem je čirý roztok. Takto připravené roztoky byly použity jak pro zjištění biologické aktivity - ELISA, tak pro SDS-elfo.

4.7.2 ELISA TEST

Principem metody inhibičního titračního ELISA testu je vazba specifického IgE preinkubovaného se zkoumaným alergenem, na alergen pevně vázaný na podklad. Koncentrace specifického IgE, (nevysyceného zkoumaným alergenem) je detekována pomocí značeného anti-IgE. Jeho koncentrace je nepřímou úměrnou koncentraci zkoumaného alergenu.

Test se provádí na mikrotitračních 96-jamkových (s plochým dnem) polystyrenových destičkách. Pro inkubaci ředěných řad vzorků se sérem se užívají zkumavky Eppendorf.

1. POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE:

- VAZEBNÝ ROZTOK (dále VR):

1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, 0,20 g NaN₃ se rozpustí v destilované vodě a doplní na 1000 ml. pH = 9,6. Roztok se skladuje v lednici při teplotě +2 až +8°C. Ředí se před použitím na 1/10.

- PROMÝVACÍ ROZTOK (dále PR):

9,0 g NaCl, 0,5 ml Tween 20 se rozpustí v 1000 ml destilované vody. pH = 7,4
Roztok se skladuje v lednici při +2 až +8°C (trvanlivost 2 roky). Ředí se před použitím na 1/20.

- ŘEDICÍ ROZTOK I (dále ŘR I):

8,0 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,2 g KCl, 10,0 g BSA (hovězí sérový albumin), 0,1 g Merthiolát, 0,5 ml Tween 20 se rozpustí v 1000 ml destilované vody.

Roztok se skladuje v lednici při teplotě +2 až +8°C.

- ŘEDICÍ ROZTOK II (dále ŘR II):

8,0 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,2 g KCl, 10,0 g BSA (hovězí sérový albumin), 0,1 g Merthiolát se rozpustí v 1000 ml destilované vody.

Roztok se skladuje v lednici při teplotě +2 až +8°C.

- ZASTAVOVACÍ ROZTOK (dále ZR) - 1 M H₂SO₄:

55,5 ml 96% H₂SO₄ (p.a. čistoty), 944,5 ml destilované vody

Roztok je možno skladovat při pokojové teplotě v dobře uzavřené lahvi.

- TMB-COMplete - chromogenní substrátový roztok obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin a peroxid vodíku

- SwAHu/IgE Px (prasečí imunoglobulin proti lidskému IgE značený peroxidázou)

- Standardní lyofilizovaná směs příslušných alergenů pro koutování destiček (dále „Koutovací směs,,)

- Lyofilizovaný standard pylových alergenů (*Festuca sp.*)
- IgE-hyperimunní (proti zkoušeným druhům alergenů - směs trav) lidské sérum, získané od vhodných dárců.

2. POSTUP:

2.1. Potahování jamek

Lyofilizovaná směs pro potahování jamek se rozpustí (přímo v lahvičce) ve VR na příslušnou koncentraci (500 PNU). Do jamek B₁ - B₁₁ G₁ - G₁₁ mikrotitrační destičky se napipetuje po 100 μl výše uvedené naředěné směsi pro potahování jamek. Poté se destička přikryje víčkem a umístí na 24 hodin do lednice při teplotě +2°C až +8°C.

2.2. Zablokování („vysycování“) volných vazebných míst

Po této době se obsah jamek odsaje a do všech jamek se napipetuje po 300 μl ŘR II a destička se přikryje víčkem. Vysycování destičky probíhá při pokojové teplotě 24 hodin.

2.3. Příprava koncentračních řad

Zároveň se připraví dvě titrační řady (standard resp. testované vzorky):

- a) pro každou řadu se připraví 11 zkumavek Eppendorf
- b) do každé zkumavky se napipetuje 400 μl ŘR II,
- c) lyofilizovaný standard *Festuca sp.* se rozpustí v ŘR II na koncentraci 40 PNU.
- d) na stejnou hodnotu PNU se pomocí ŘR II naředí i vzorky - extrakty pylu*.

* (Vzhledem k nemožnosti stanovení PNU - malé množství pylu, byly připraveny 10% extrakty standardním postupem a odhadnuto PNU (z dlouhodobé zkušenosti na 30000 PNU)).

- e) z takto naředěných výchozích vzorků se odebere po 400 μl a toto množství se přeneso do první zkumavky příslušné titrační řady, dále se postupuje u koncentrační řady pro standard i pro zkoušené vzorky stejně:
- f) obsah zkumavky se důkladně promíchá a 400 μl roztoku se přeneso do druhé zkumavky příslušné titrační řady

- g) obsah č. 2 se opět důkladně promíchá a 400 μ l se přenese do třetí zkumavky příslušné titrační řady
- h) takto se pokračuje až do desáté zkumavky příslušné řady. 400 μ l z ní debraných se odstraní - tak vznikne koncentrační řada, kde koncentrace alergenu klesá geometricky se základem 2. Obsah jedenácté zkumavky simuluje nekonečné naředění alergenu.
- i) do všech zkumavek se napipetuje po 100 μ l hyperimunního séra, obsah zkumavek se promíchá opatrným protřepáním a nechá se inkubovat při pokojové teplotě 18 hodin

2.4. Inkubace s koncentračními řadami

Jamky destičky se důkladně odsají a 2x promyjí 300 μ l naředěného PR.

- a) Do jamek $A_n - D_n$ ($n = 1 \dots 11$) se napipetuje po 100 μ l titrační směsi standardu (nebo vzorku 1) ze zkumavky n.
- b) Do jamek $E_n - H_n$ ($n = 1 \dots 11$) se napipetuje po 100 μ l titrační směsi vzorku ze zkumavky n.
- c) Do jamek $A_{12} - H_{12}$ se napipetuje po 100 μ l ŘRII.

Destička se zakryje víčkem a nechá inkubovat při laboratorní teplotě 2,5 hodiny.

2.5. Inkubace se značenou protilátkou

Jamky se důkladně odsají a 3x promyjí 200 μ l naředěného PR. Do každé z jamek destičky se napipetuje 100 μ l roztoku SwAHu/IgE Px naředěného pomocí ŘRI (obvyklé ředění je 250x). Destička se zakryje víčkem a nechá se inkubovat při pokojové teplotě 2 hodiny.

2.6. Reakce peroxidázy se substrátem (TMB)

Důkladně odsáté jamky se promyjí 5x 300 μ l naředěným PR. Chromogenní substrátový roztok (TMB-Complete) se napipetuje do všech jamek po 100 μ l. Destička se zakryje víčkem a umístí do temna při pokojové teplotě na dobu cca 20 minut.

2.7. Ukončení reakce a proměření intenzity zbarvení

Poté se reakce ukončí napipetováním 100 μ l ZR do každé jamky. Intenzita vzniklého zbarvení (**barva se změní z modré na žlutou**) se proměří na readeru při vlnové délce 450 nm. Pracovní nula (blank) se nastaví na některou jamku s negativní kontrolou.

3. VYHODNOCENÍ TESTU A POSOUZENÍ KVALITY EXTRAKTU

3.1. Význam a hodnoty jednotlivých skupin jamek:

Jednotlivé jamky mikrotitrační destičky mají pro vyhodnocování následující význam:

A₁₂ - H₁₂ Negativní kontrola.

Je kontrolou, zda v průběhu testu nedošlo k hrubé technické chybě. Některá z jamek je vždy vybírána, jako referenční bod při proměřování na readeru.

A₁ - A₁₁ Pozitivní kontrola pro užitý standard.

Je kontrolou, zda nedochází ve větší míře k nespecifické sorpci alergénového standardu či IgE na vysycený povrch jamky.

H₁ - H₁₁ Pozitivní kontrola pro testovaný vzorek.

Platí pro ni to samé, jako pro standard.

B₁ - D₁...B₁₁ - D₁₁ Koncentrační řada pro standard (resp. vzorek 1).


B_n - D_n je triplet pro stanovení při dané koncentraci.


E₁ - G₁...E₁₁ - G₁₁ Koncentrační řada pro vzorek 2.


E_n - G_n je triplet pro stanovení při dané koncentraci.

B₁₁ - D₁₁, E₁₁ - G₁₁ Tyto jamky simulují nekonečné ředění standardu resp. testovaného vzorku.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
B	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow
C	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow
D	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow
E	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow
F	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow
G	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow
H	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow

 - Negativní kontrola

 - Pozitivní kontrola

 - Standard (nebo vzorek 1)

 - Vzorek 2

Biologická aktivita (**BA**) alergenového standardu v jednotlivých zkumavkách titrační řady, vyjádřená v Jednotkách Standardní Kvality (dále JSK) je následující:

$$BA_n = K * k * 2^{(1-n)}$$

[1]

Kde:

n pořadí zkumavky v titrační řadě

k koncentrace proteinového dusíku (PNU) alergenového standardu v 1. zkumavce resp. jamce = 20 PNU

K ... poměr mezi biologickou aktivitou (JSK) a koncentrací proteinového dusíku (PNU) pro daný standard. Tato hodnota je získána z výsledků kožních testů na skupině alergických pacientů a je vyjádřena dle definice takto: **1000 JSK je taková biologická aktivita, která v prick testu na sérii alergických pacientů vyvolá v průměru velikost pupenu 5,5 mm.** Tato aktivita odpovídá jisté, obecně pro každý standard jiné koncentraci **C_{55N}** v PNU.

Tento vztah je formálně vyjádřen jako:

$$1000 \text{ JSK} \approx \text{C}_{55\text{N}} \text{ PNU} \quad (\text{„odpovídá“})$$

[2]

(Toto hodnocení nebylo u získaných vzorků pylů možno provést z důvodů malého množství vzorků)

3.2. Vyhodnocení koncentrační závislosti aktivity

Pro každý triplet ($B_n - D_n$ resp. $E_n - G_n$, kde $n=1...11$) se vypočte průměrná hodnota absorbance: $(A_{B_n} + A_{C_n} + A_{D_n})/3$ resp. $(A_{E_n} + A_{F_n} + A_{G_n})/3$. Tyto průměrné hodnoty se označí **A_{S_n}** (pro standard) resp. **A_{T_n}** (pro testovaný vzorek) a použijí se pro výpočet optimální křivky (sigmoidy) těmito body proložené. Křivka vyjadřuje závislost absorbance na pořadovém čísle jamky. Pro další vyhodnocení se postupuje, jak naznačeno dále.

3.2.1. Výpočet parametrů křivky závislosti a inflexního bodu

Grafem sledované závislosti (absorbance na pořadovém čísle jamky) v daném uspořádání je sinoida vyjádřená rovnicí:

$$Y = c + (d - c)/(1 + \exp(-2 * (\alpha + \beta * X)))$$

[3]

Tato křivka se zkonstruuje tak, aby nejlépe korespondovala s experimentálními body. Tak se získají parametry (c, d, α , β) pro dosazení do analytického vyjádření křivky [3].

Hodnotu absorbance v inflexním bodě sigmoidy Y_{50} lze vyjádřit vztahem:

$$Y_{50} = (c + d)/2$$

[4]

Dosazením do rovnice [3] a úpravou se získá výraz pro polohu inflexního bodu na ose X:

$$X_{50} = -\alpha/\beta$$

[5]

Pokud bychom znali koncentraci PNU zkoušených vzorků, mohli bychom porovnáním polohy inflexních bodů pro standard a vzorek vypočítat hodnotu biologické aktivity zkoušeného vzorku. Čím více se posunuje inflexní bod vzorku vůči témuž bodu standardu nalevo (k nižším číslům jamek), tím je biologická aktivita vzorku nižší než biologická aktivita standardu a naopak. Tím, že neznáme PNU vzorků (viz výše), můžeme pouze **odhadovat vzájemnou biologickou aktivitu z polohy inflexních bodů vzorků mezi sebou** (za předpokladu standardní extrakce).

Z číselných dat v tabulce se pro jednotlivé vzorky sestrojí sigmoida a z parametrů vypočítá poloha inflexního bodu.

4.7.3 SDS-ELFO

1. Příprava polyakrylamidového gelu:

1.1. Roztoky na přípravu gelu:

Dělicí pufr :

56,93 g Tris se rozpustí v cca 200 ml redestilované vody. pH se 1,88 M Tris / HCl, pH 8,8 upraví koncentrovanou HCl na 8,8. Roztok se doplní v odměrné baňce do 250 ml redestilovanou vodou.

Zaostřovací pufr:

18,93 g Tris se rozpustí v cca 200 ml redestilované vody. pH se 0,625 M Tris / HCl, pH 6,8 upraví koncentrovanou HCl na 6,8. Roztok se doplní v odměrné baňce na 250 ml redestilovanou vodou.

Oba roztoky se uchovávají v lednici při +2⁰C až +8⁰C po dobu max. 4 měsíců.

30% Akrylamid :

29,2 g Akrylamidu a 0,8 g Bis se rozpustí v redestilované vodě do objemu 100 ml na magnetickém míchadle. Rozpuštěný a odměřený roztok se pak zfiltruje přes obyčejnou obvazovou vatu.

Roztok se uchovává v lednici při +2⁰C až +8⁰C po dobu max. 4 měsíců. Při vyvločkování je nutné připravit nový.

0,5% SDS:

0,05 g SDS se naváží těsně před přípravou gelu a rozpustí se v 10 ml redestilované vody.

Roztok se nepřipravuje do zásoby. Nerozpuštěný SDS nesmí navlhnout.

10% Amonium persulfát:

1 g Amonium persulfátu se rozpustí v 10 ml redestilované vody těsně před naléváním gelu

Roztok je nutné používat vždy čerstvý.

TEMED: Používá se koncentrovaný.

1.2. Směs pro přípravu gelu:

Dělicí gel (16% Akrylamid)

30% Akrylamid	10,0ml
Dělicí pufr.....	3,75 ml
0,5% SDS.....	3,75 ml
Redestilovaná voda.....	0,9 ml
TEMED.....	16,0 µl
10% Amonium persulfát	90,0 µl

Směs se připraví těsně před nalitím.

Zaostřovací gel (5% Akrylamid)

30% Akrylamid	2,00 ml
Zaostřovací pufr.....	2,40 ml
0,5% SDS	2,40 ml
Redest. voda	5,20 ml
TEMED	12,0 µl
10% Amonium persulfát.....	60,0 µl

Směs se připraví těsně před nalitím.

1.3 Nalévání směsi do formy:

Mezi skla se vloží silikonové těsnění a skla se stáhnou klipsnami. Fixem se na sklo označí rozhraní dělicího a zaostřovacího gelu (1/4 celkové výšky gelu - 37 mm od horního okraje skla). Skla se postaví do svislé polohy a vyrovnají podle vodováhy. Směs pro dělicí gel se ihned nalije mezi skla do do vyznačené výšky. Nalítá směs se opatrně převrství izopropylalkoholem syceným vodou. Směs polymeruje asi 1 hod. Po ztuhnutí gelu se vylije izopropylalkohol, povrch gelu se opláchne destilovanou vodou. Nalije se směs na zaostřovací gel a ihned se nasadí forma pro aplikační jamky. Po ztuhnutí se gel ihned použije na elektroforézu nebo se může uchovat do dalšího použití v lednici v uzavřeném igelitovém sáčku ve vlhku max. týden.

2. Příprava vzorků:

2.1. Vzorkový pufr neredukující:

Zaostřovací pufr pH 6,8.....	12,5 ml
SDS	1,0 g
Glycerol	25,0 ml
Bromfenolová modř (1% roztok v metanolu)....	0,5 ml

Pufr se uchovává v lednici při teplotě +2⁰C až +8⁰C max. 6 měsíců.

2.2. Zpracování vzorků:

Lyofilizovaný standard se rozpustí v 0,67 ml redestilované vody (koncentrace 30000 PNU) a doplní se stejným objemem vzorkového neredukujícím pufru (výsledná koncentrace 15000 PNU).

Vzorky extraktů se naředí redestilovanou vodou na 30000 PNU (zde neředěno - předpoklad 30000 PNU). K 0,2 ml takto upraveným vzorkům se přidá 0,2 ml vzorkového pufru. (PNU - jednotka proteinového dusíku - 1 PNU = 10⁻⁵ mg/ml).

Všechny takto připravené vzorky (standardu i extraktů) se v eppendorfkách povaří 5 min. na vodní lázni. Takto denaturované vzorky se mohou uchovávat v lednici při teplotě +2⁰C až +8⁰C po dobu max. 14 dnů.

Standardy molekulových vah se upraví podle návodu výrobce.

3. Elektroforéza:

3.1. Elektrodotový pufr:

Zásobní pufr Tris-glycinový pH 8,3 - 8,6 10x koncentrovaný

Tris.....15,1 g

Glycin..... 72,0 g

Rozpustí se v redestilované vodě a doplní v odměrné 500 ml baňce po značku.

Zásobní pufr se uchovává v chladničce při + 2⁰C až +8⁰C po dobu max. 6 měsíců.

Pracovní roztok

0,050 M Tris

0,384 M Glycin

1% SDS

Připraví před použitím ze zásobního 10x koncentrovaného pufru. K 50 ml zásobního pufru se v odměrném 500 ml válci přidá 0,5 g SDS a doplní se redestilovanou vodou po značku.

3.2. Průběh elektroforézy:

Se zařízením pro PAGE se pracuje dle příslušného návodu výrobce.

Do spodní elektrodové nádoby se nalije elektrodový pufr a desky se upnou svorkami k elektroforetické vaně tak, aby pod gelem nebyly vzduchové bubliny. Z aplikačních jamek se knoty z filtračního papíru vysaje případný zbytek vody. Nalije se elektrodový pufr do horní nádoby a pod hladinu pufru se na dno jednotlivých jamek aplikují Hamiltonovou mikrostříkačkou vzorky (15 μ l). Do jamky na kraji gelu se dá standard molekulových vah v objemu 10 μ l.

Zařízení se uzavře, připojí se vodní chlazení a zdroj proudu. Nastaví se konstantní proud 20 mA. Když dojde čára bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, zvýší se hodnota konstantního el. proudu na 40 mA. Po skončení elektroforézy (tj. poté, co čára bromfenolové modři opustí dělicí gel) se vypne proud a chlazení, vyjmou se skla s gelem, opatrně se oddělí, zaostřovací gel se odřízne a dělicí gel se sejme do Petriho misky. Dále se gel fixuje a barví.

3.3 Fixace gelu:

1. Fixační roztok:

Kyselina sulfosalicylová	17,3 g
--------------------------	--------

Kyselina trichloroctová	57,5 g
-------------------------	--------

Rozpustí se v redestilované vodě do objemu 500 ml. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě po dobu max. 6 měsíců.

2. **Fixace:**

Fixace rozdělených bílkovin se provádí po elektroforéze před barvením gelu. Zóny zůstanou ostré, protože se bílkoviny při barvení nevymývají a gel je lépe čitelný. Gel se inkubuje ve fixačním roztoku cca 90 min. při laboratorní teplotě, pak se přenese do barvicího roztoku.

3.4 **Barvení gelu:**

1. **Barvicí roztok:**

Coomassie Brilliant Blue R 250	2,0 g
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,5 g
Etanol	425 ml
Kyselina octová	100 ml
Redestilovaná voda	425 ml

Barviva se rozpouštějí v etanolu a menším množstvím vody cca 1 hod. na magnetické míchačce. Po rozpuštění se doplní zbytek vody s kyselinou octovou a roztok se přefiltruje přes obyčejnou obvazovou vatu do tmavé lahve nebo do lahve obalené alobalem. Barva se uchovává v lednici při 4°C pro opakované použití max. 1 rok. (Podle četnosti používání).

2. **Barvení proteinů:**

Elektroforeogramy se barví v Petriho misce cca 17 hod.

3.5 **Odbarvování pozadí gelu:**

1. **Odbarvovací roztok:**

Ethanol	450 ml
Kyselina octová	100 ml
Redestilovaná voda	450 ml

Roztok se připraví v odměrné baňce na 1000 ml.

7% kyselina octová

Kyselina octová	35 ml
Redestilovaná voda	do 500 ml v odměrné baňce

3. Odbarvování:

Odbarvování gelu se provádí nejlépe na výkyvné třepačce. Odbarvovací roztok podle potřeby několikrát vymění. Obarvený roztok se vyčistí od barviv přelitím přes aktivní uhlí a takto je možné jej používat opakovaně. Pro konečné odbarvení se použije 7% kyselina octová, ve které je možné ponechat gel do druhého dne. Barvení a odbarvování téhož gelu je možné opakovat.

3.6 Sušení gelu:

1. Sušící roztok:

Metanol	150 ml
Glycerol	100 ml
Redestilovaná voda	250 ml

Připraví se v odměrné baňce na 500 ml. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě po dobu max. 6 měsíců.

2. Sušení a dokumentování gelu:

Gel se ekvilibruje v sušícím roztoku 15 - 20 minut společně se dvěma obdélníkovými přířezy celofánu velikosti sušícího rámečku s přesahem. Gel se pak vloží mezi tyto dva celofánové obdélníky tak, aby nebyly mezi vrstvami pokud možno vzduchové bubliny, vše se upne do rámečku a gel se nechá buď minimálně jeden den volně sušit při laboratorní teplotě nebo suší v dryeru. Usušený gel se oskenuje vhodným skenerem.

3.7 Hodnocení:

Pro zhodnocení se provede porovnání elektroforeogramů extraktu vzorku a standardu.

Vzorek vyhovuje, jestliže se profily označených skupin proteinů obou elektroforeogramů neliší v počtu a rozmístění zón.

Vzorek nevyhovuje, pokud je na elektroforeogramu zkoušeného vzorku těchto zón více nebo se liší od elektroforeogramu standardu. Pokud některá zóna chybí např. alergen je přítomen v extraktu v malém množství a na elektroforeogramu se neobarvil. Pokud je na imunoprintu struktura zón jiná než u příslušného standardu, vzorek nevyhovuje.

Důležité hodnoty m_w jsou cca 17 kDa, cca 30 kDa a cca 70 kDa.

4.8 STATISTIKA

Pro statistické vyhodnocení chemických rozborů byl použit volně dostupný **statistický software R** (The R project for Statistical Computing). Zkoumaných 8 složek (látek pylu) jsou navzájem korelované náhodné veličiny; proto byl použit statistický test MANOVA (Multivariate analysis of variances); jedná se o vícerozměrnou verzi ANOVA. Používá se v porovnání středních hodnot náhodných vektorů (vícerozměrných náhodných veličin).

5 VÝSLEDKY

5.1 AGROCHEMICKÉ ANALÝZY PŮDY

Před zahájením pokusu byly odebrány směsné homogenizované vzorky půdy z pokusného stanoviště; rozděleny na dvě části – pro základní rozborů půdy a další analýzy; datum odběru 2.4.2009.

5.1.1 ZÁKLADNÍ ANALÝZY

Vzorky byly ihned převezeny do akreditované laboratoře AGRO – LA, spol. s r.o. J. Hradec. Zde byly vyhodnoceny (dle Mehlich III); viz Protokoly o zkoušce - přílohy.

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Použitá metoda
N – NH ₄ (neinkubovaný)	4,90	mg/kg	SOP 76
N – NO ₃ (neinkubovaný)	19,40	mg/kg	SOP 77
N – NH ₄ (inkubovaný)	7,00	mg/kg	SOP 76
N – NO ₃ (inkubovaný)	21,3	mg/kg	SOP 77
P	154,00	mg/kg	SOP 43
K	407,00	mg/kg	SOP 42
Mg	125,00	mg/kg	SOP 42
Ca	1385,00	mg/kg	SOP 42
pH (CaCl ₂)	5,15	mg/kg	SOP 44

5.1.2 DOPLŇKOVÉ ANALÝZY

Vzorky byly ihned převezeny do laboratoře ZF JCU, Katedra aplikovaných biotechnologií; zde byly vyhodnoceny viz níže.

Půdní druh:

hlinitopísčité – hodnoceno dle Nováka (tj. 20% částic 1. kategorie; průměr částic < 0,01 mm)

RKV (retenční vodní kapacita):**RKV:** 200 g půdy + 250 ml vody

$$\text{RKV} = 250 - 116 = 134$$

Mineralizovatelný dusík:

Příprava půdy na stanovení dusičnanového a amonného dusíku viz metodika kap. 4.2.5: směs 50 g půdy a 50 g písku, navlhčená 33.5 ml vody, počátek inkubace 4.1.2010 v 10,00 hodin.

$$N_{\text{min}} (\text{minerální}) = N\text{-NO}_3 + N\text{-NH}_4 \text{ (neinkubovaných vzorků)}$$

$$N_{\text{miner} - \text{NO}_3} = N\text{-NO}_3 \text{ inkub. vzorku přepočtený na sušinu} - N\text{-NO}_3 \text{ neinkub.vzorku}$$

$$N_{\text{miner}} (\text{mineralizovatelný}) = N_{\text{miner} - \text{NO}_3} + N_{\text{miner} - \text{NH}_4}$$

$$N_{\text{min}} (\text{minerální}) = (4,90 + 19,40) = 26,40 \text{ mg/kg}$$

$$N_{\text{miner} - \text{NO}_3} = (21,30 - 19,40) = 1,90 \text{ mg/kg}$$

$$N_{\text{miner} - \text{NH}_4} = (7,00 - 4,90) = 2,10 \text{ mg/kg}$$

$$N_{\text{miner}} (\text{mineralizovatelný}) = 1,90 + 2,10 = 4,00 \text{ mg/kg}$$

pH: v KCl 5,23

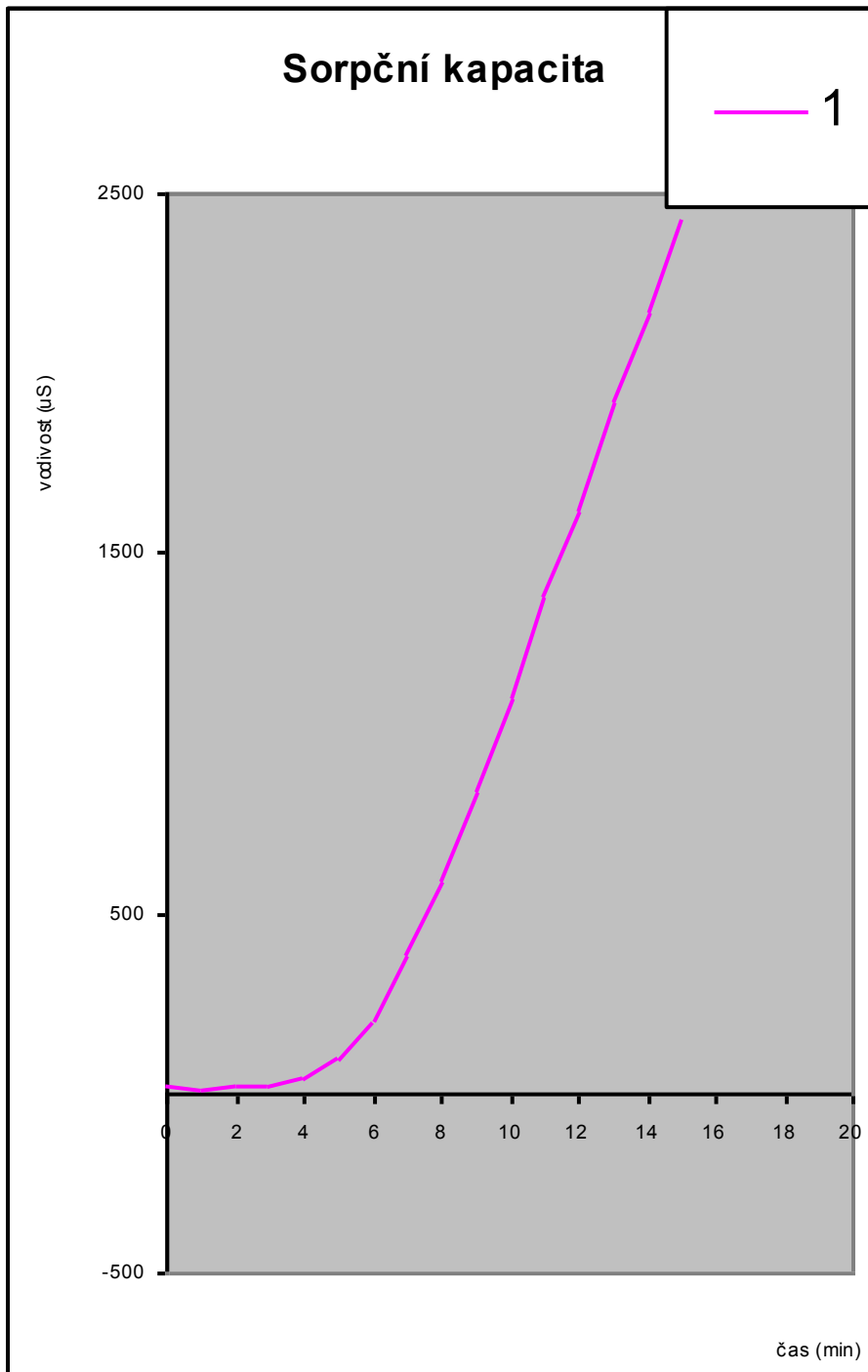
Frakcionalizace humusových látek a stanovení C_{hws} – viz metodika kap. č. 4.2.2, 4.2.3:

% celk. C_{ox}	průměr% C_{ox}	% stan. C_{HL}	průměr % C_{HL}	% C_{FK}	průměr % C_{FK}	% C_{HK}	průměr % C_{HK}	% C_{hws}	průměr % C_{hws}
1,47	1,46	0,71	0,72	0,41	0,42	0,38	0,38	0,067	0,067
1,46		0,74		0,43		0,40		0,067	
1,44		0,73		0,42		0,38		0,067	
1,49								0,067	

% celk. C_{ox}	% C_{HL} (HK+FK)	% C_{FK}	% C_{HK}	% C_{hws}	HK/FK	Sh	100* $C_{\text{hws}}/C_{\text{ox}}$
1,46	0,80	0,42	0,38	0,067	0,91	55,0	4,6

(Sh – stupeň sorpčního nasycení)

Sorpční kapacita – viz metodika kap. č. 4.2.1:



Vz.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	17	7	15	23	43	96	200	386	590	845	1100	1380	1627	1923	2170	2430

$$T = s \cdot n \cdot f \cdot 100 / N \text{ (mval } 100^{-1} \text{ g}^{-1}\text{)}$$

T = maximální sorpční kapacita

s = spotřeba roztoku Ba(OH)₂ v bodě ekvivalence 6 ml

f = maximální sorpční kapacita

n = normalita Ba(OH)₂ = 0.2 N

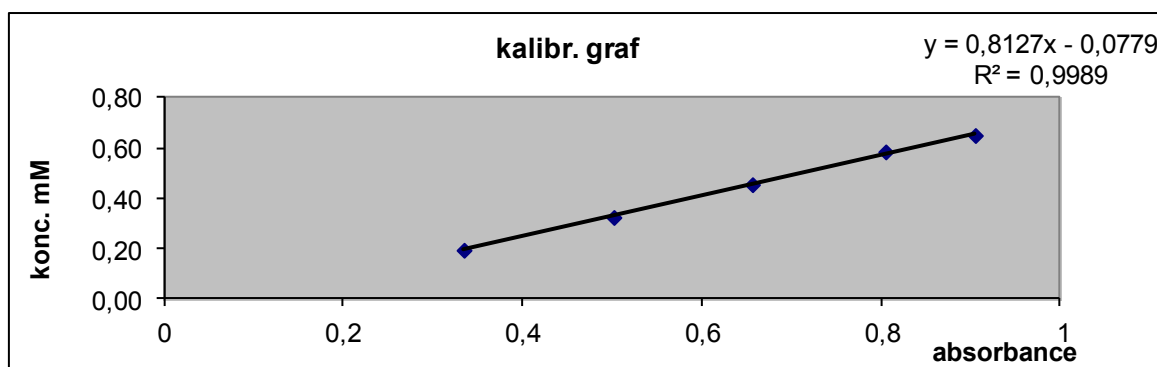
N = navážka půdy v g

Vzorek	s	T
1	6,0	14,6

Sorpční kapacita půdy je střední, tj. v rozmezí 13 - 24 mval/100 g půdy.

C_{PM} – viz metodika kap. č. 4.2.4:

aliquot (ml)	A (565 nm)	konc. mM
0,6	0,3345	0,1953
1	0,5017	0,3254
1,4	0,6563	0,4556
1,8	0,805	0,5858
2	0,905	0,6509



	slepý pokus po 1 hodině			vzorek po 1 hodině		
	absorbance	Ø	konc. (mM)	absorbance	Ø	konc. (mM)
1	0,895	0,892	0,647	0,843	0,839	0,604
	0,889			0,840		
	0,891			0,835		
	0,900	0,903	0,656	0,834	0,836	0,602
	0,905			0,838		
	0,904			0,836		
	0,894	0,895	0,649	0,837	0,836	0,602
	0,895			0,838		
	0,895			0,834		
	0,890	0,894	0,648		□	
	0,896					
	0,895					
Ø			0,650			

$$C_{PM} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(\text{mM KMnO}_4 \text{ ve sl. pok.} - \text{mM KMnO}_4 \text{ ve vzorku}) * 50 * 25 * 9}{1\,000 * \text{hmotnost vzorku v gramech}}$$

po 1 hod.	m (g)	mM sl.p.	mM vzorku	C _{PM} mg · g ⁻¹
1	0,2315	0,65	0,604	2,2
	0,2141		0,602	2,5
	0,2186		0,602	2,5
			Ø	2,4

	slepý pokus po 24 hodinách			vzorek po 24 hodinách		
	absorbance	Ø	konc. (mM)	absorbance	Ø	konc. (mM)
1	0,91	0,908	0,660	0,796	0,792	0,566
	0,903			0,785		
	0,91			0,795		
	0,910	0,910	0,662	0,792	0,795	0,568
	0,912			0,802		
	0,909			0,792		
	0,887	0,888	0,644	0,810	0,808	0,579
	0,886			0,806		
	0,891			0,808		
	0,892	0,884	0,641			
	0,880					
	0,881					

po 24 hod.	m (g)	mM sl.p.	mM vzorku	C _{PM} mg . g ⁻¹
1	0,2272	0,652	0,566	4,3
	0,224		0,568	4,2
	0,1957		0,579	4,2
			Ø	4,2
		C_{PM} mg . g⁻¹ (po 1 hod.)	C_{PM} mg . g⁻¹ (po 24 hod.)	
1	2,4		4,2	

5.2 AGROTECHNIKA, HNOJENÍ POROSTU

Předplodinou byl ječmen jarní (2008). Po sklizni byla provedena podmítka radličkovým podmítačem a na podzim zimní orba a zásobní hnojení (NPK). V roce zásevu (III/2009) byl pozemek připraven rotačními branami AMAZONE.

Zásev (4.4.2009) se prováděl maloparcelním secím strojem „Ojord“ a následně byl pozemek uválen „Cambridge“ válci. Jelikož byl pokus vyset v čistosevu (výsevek: 15 kg . ha⁻¹ – čistosev; bez krycí plodiny), tak v roce zásevu (2009) byla provedena 3 x odplevelovací seč maloparcelním sklízěčem zelené hmoty MPZ 115 (I. seč - 15.7.2009; II. seč 10.8.2009; III. seč zlom IX/X 2009).

Hnojení porostu bylo provedeno v souladu se zvolenou metodikou viz kap. č. 4.3; v obou variantách B a C bylo použito průmyslové hnojivo firmy Linzer :

LAV: Linzer LAT NAC 27 (27% N)

NPK: Linzer LAT COMPLEX 12/12/17 (12% N, 12% P, 17% K).

Aplikace:

Varianta A) – **nulová, kontrolní** - porost nebyl vůbec hnojen po celou dobu pokusu (ani P, K).

Varianta B): **nižší úroveň výživy** (poloviční dávka hnojení N) - aplikace (celkem v každém roce) 70 kg . ha⁻¹ N, 40 kg . ha⁻¹ P, 60 kg . ha⁻¹ K; na jaře 110 kg . ha⁻¹ LAV (29.3.2010, 27.3.2011, 31.3.2012) a 350 kg . ha⁻¹ NPK po semenářské seči (10.9.2010, 30.8.2011, 5.9.2012).

Varianta C): **vyšší úroveň výživy** (plná dávka hnojení N = 2x B) – aplikace (celkem v každém roce) 140 kg . ha⁻¹ N, 40 kg . ha⁻¹ P, 60 kg . ha⁻¹ K; na jaře 220 kg . ha⁻¹ LAV (29.3.2010, 27.3.2011, 31.3.2012) a 350 kg . ha⁻¹ NPK + 150 kg . ha⁻¹ LAV po semenářské seči (10.9.2010, 30.8.2011, 5.9.2012).

Skizeň semene byla prováděna maloparcelním kombajnem OSEVAN (14.7.2010, 16.7.2011, 13.7.2012).

5.3 STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU A OSTATNÍCH ŽIVIN V NADZEMNÍCH ČÁSTECH ROSTLIN

Kulminace obsahu N v nadzemních částech rostliny (kostřavy červené) bývá obvykle v 1. týdnu května. Proto byl v prvním a druhém roce pokusu odebrán soubor vzorků nadzemní hmoty – průměrný vzorek z každé varianty A, B, C. (Rostliny byly nastříhány nůžkami cca 3 cm nad zemí, homogenizovány dle variant). Vzorky byly uloženy do papírových sáčků a byly ihned (do 1 hodiny převezeny v termoboxu) do akreditované laboratoře AGRO – LA, spol. s r.o. J. Hradec. Zde byly analyzovány; viz Protokoly o zkoušce - přílohy.

1. rok – odběr 4.5.2010

Varianta	Sušina %	N %	Použitá metoda
A – bez hnojení	18,50	2,03	SOP 55
B – ½ dávka	16,30	3,19	SOP 55
C – plná dávka	16,10	3,60	SOP 55

2. rok – odběr 4.5.2011

Ukazatel	Hodnota			Jednotka	Použitá metoda
	Var. A	Var. B	Var. C		
N	2,39	2,50	2,55	%	SOP 55
P	0,35	0,32	0,34	%	SOP 43-1
K	3,01	3,04	3,09	%	SOP 41
Ca	0,24	0,26	0,26	%	SOP 41
Mg	0,20	0,04	0,04	%	SOP 41
Sušina	24,00	23,20	23,20	%	SOP 39-1

(* SOP – vysvětlivky – viz protokoly v přílohách)

Výsledky po 2 roky ukazují, že se dusík dodaný rostlinám v různé dávce promítl i v jeho obsahu v rostlině (v období - kdy dosahuje v rostlině maxima) a to přímo úměrnou závislostí (dle předpokladu). Tyto rozbor byly provedeny pro informaci, že rostlina přijala dodaný dusík hnojiv do nadzemních částí); ve 3. roce pokusu se již rozbor neprováděl.

5.4 SBĚR PYLU

Datum sběru (vždy 3. den kvetení porostu) dle metodiky kap. č. 4.4. Každý vzorek byl uložen v samostatném sterilním sáčku a uložen do termoboxu.

1. rok – 2010:

10.6.2010, od 17,30 – do 19,00 hod., teplota 30 °C, atm. tlak 980 kPa, bezvětří

2. rok – 2011:

8.6.2011, od 17,20 – do 19,00 hod, teplota 27°C, atm. tlak 1010 kPa, mírný jižní vánek

3. rok – 2012:

11.6., od 17,45 – 19,30 hod., teplota 24°C, atm. tlak 970 kPa, bezvětří

Množství sebraného (surového) pylu:

	2010	2011	2012
	1. rok	2. rok	3. rok
	g	g	g
A2	1,185	1,023	0,856
A4	1,112	1,113	0,965
A6	2,030	1,050	1,123
A8	1,300	1,960	1,596
A10	1,710	0,969	0,896
Průměr A	7,337	6,115	5,436
B2	3,797	2,003	1,780
B4	2,702	2,596	2,230
B6	3,131	2,315	1,123
B8	3,526	3,230	2,360
B10	2,918	2,089	2,320
Průměr B	16,074	12,233	9,813
C2	3,112	2,656	2,132
C4	2,451	2,360	2,202
C6	2,532	1,989	2,563
C8	1,493	2,003	3,120
C10	3,134	3,010	1,965
Průměr C	12,722	12,018	11,982

Ve 3. roce pokusu se podařilo sebrat pouze malé množství pylu z jednotlivých parcel (zejména v nehnojené variantě A).

5.5 ÚPRAVA PYLU

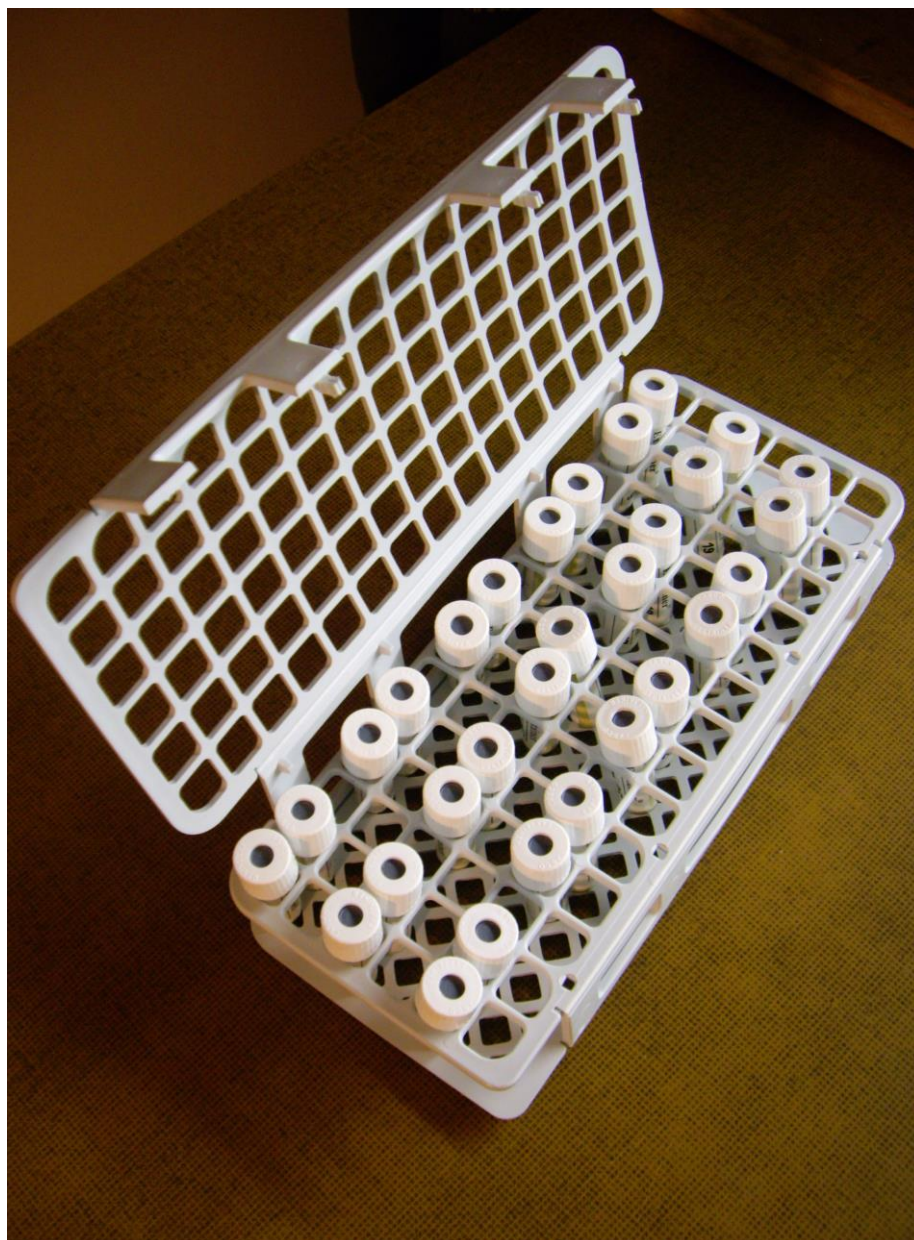
Sebraný pyl byl vždy max. do 2 hodin převezen v termoboxu do laboratoře BONAPOL a.s.. Po vysušení dle metodiky kap. č. 4.5 na topných deskách (Obr. 7) byl vyčištěn viz mikroskopické analýzy (Tab. 15, 16, 17) a uskladněn ve speciálních vialkách (Obr. 8).



Obr. 7 Sušení pylu na topných deskách

Každý vzorek byl rozdělen na cca 2 poloviny (číslování – liché, sudé) a uskladněn při teplotě -18°C . Liché vzorky byly určeny pro rozbor alergologické a sudé pro rozbor chemické. Průměrný úbytek hmotnosti pylu vzhledem k původní hmotnosti surového pylu po vyčištění činil cca 42%. Získali jsme oproti předpokladu poměrně malá množství upraveného pylu pro oba typy rozborů. Ve třetím roce (2012) by po rozdělení byly vzorky již velice malé a nedostatečné pro oba typy analýz (na každý typ rozborů by klesla hmotnost jednotlivého vzorku v některých případech již pod 0,28 g – např. u vzorků A2, A4 a A10 viz Tab. 17).

Jelikož byly výsledky z obou let 2010 a 2011 u obou typů rozborů velmi podobné a nepřinesly nové poznatky, rozhodli jsme se tedy proto použít je sesypat a použít pouze k alergologickým rozborům (což byl původní a hlavní cíl této práce) a v rozbořech chemických již nepokračovat.



Obr. 8 a) Upravený pyl ve vialkách



Obr. 8 b) Upravený pyl ve vialkách

5.5.1 MIKROSKOPICKÉ ANALÝZY

Pyl po vyčištění obsahoval (Tab. 15, 16, 17):

v 1. roce – 2010:

93,9 – 94,7 % pylu kostřavy červené, 0,3 – 0,5 % pylu jiných rostlinných druhů (pocházejících z 95 % z borovice), 4,4 – 5,2 % anorganických částic (písek, prach), 0,4 – 0,6 % ostatních příměsí (rostlinné a živočišné zbytky), 0,0 – 0,1 % spor

v 2. roce – 2011:

93,1 – 94,2 % pylu kostřavy červené, 0,3 – 0,6 % pylu jiných rostlinných druhů (pocházejících z 95 % z borovice), 4,9 – 5,9 % anorganických částic (písek, prach), 0,4 – 0,5 % ostatních příměsí (rostlinné a živočišné zbytky), v průměru vždy 0,1 % spor

v 3. roce – 2012:

92,8 – 94,5 % pylu kostřavy červené, 0,5 – 0,6 % pylu jiných rostlinných druhů (pocházejících z 95 % z borovice), 4,4 – 6,4 % anorganických částic (písek, prach), 0,3 – 0,4 % ostatních příměsí (rostlinné a živočišné zbytky), v průměru vždy 0,1 % spor.

5.5.2 VELIKOST PYLOVÉHO ZRNA

Velikost pylových zrn byla změřena na témže laboratorním pracovišti pomocí rastrového mikroskopu. Z každého vzorku (parcelky) bylo změřeno 5 pylových zrn (Tab. 18). Výsledky jednotlivých variant ani výsledky jednotlivých ročníků se téměř nelišily.

Průměr:

rok 2010 (z variant A, B, C) – 35,18 μm ; velikost zrn 33,80 – 37,10 μm

rok 2011 (z variant A, B, C) – 35,15 μm ; velikost zrn 34,80 – 37,10 μm

rok 2012 (z variant A, B, C) – 34,91 μm ; velikost zrn 34,10 – 37,10 μm

Celkový průměr z let byl 2010, 2011, 2012 – 36,40 μm .

1. rok - 2010 Rozbory upraveného pylu - mikroskopická analýza

Vzorek	Číslo vialek		Hmotnost (g)			Mikroskopická analýza - počty částic					Mikroskopická analýza - % nečistot				
	Lichý	Sudý	Lichý	Sudý	Celkem	Festuca	Cizí pyl	Písek	Ostatní	Spory	Festuca	Cizí pyl	Písek	Ostatní	Spory
A	2 I	II	0,34	0,34	0,68	556	5	27	4		93,9	0,8	4,6	0,7	0,0
A	4 III	IV	0,33	0,32	0,65	587	3	23	2		95,4	0,5	3,7	0,3	0,0
A	6 V	VI	0,59	0,58	1,17	555	2	19	3		95,9	0,3	3,3	0,5	0,0
A	8 VII	VIII	0,38	0,37	0,75	674	1	52	1	0	92,6	0,1	7,1	0,1	0,0
A	10 IX	X	0,50	0,49	0,99	625	2	50	2	1	91,9	0,3	7,4	0,3	0,1
A		suma	2,14	2,10	4,24					průměr	93,9	0,4	5,2	0,4	0,0
B	2 XI	XII	1,10	1,10	2,20	572	5	21	3		95,2	0,8	3,5	0,5	0,0
B	4 XIII	XIV	0,78	0,78	1,56	642	2	29	3	1	94,8	0,3	4,3	0,4	0,1
B	6 XV	XVI	0,91	0,90	1,81	574	1	28	2		94,9	0,2	4,6	0,3	0,0
B	8 XVII	XVIII	1,02	1,02	2,04	648	3	25	4		95,3	0,4	3,7	0,6	0,0
B	10 XIX	XX	0,85	0,84	1,69	621	4	38	2		93,4	0,6	5,7	0,3	0,0
B		suma	4,66	4,64	9,30					průměr	94,7	0,3	4,4	0,4	0,0
C	2 XXI	XXII	0,90	0,90	1,80	561	3	23	4		94,9	0,5	3,9	0,7	0,0
C	4 XXIII	XXIV	0,71	0,71	1,42	526	1	17	3	1	96,0	0,2	3,1	0,5	0,2
C	6 XXV	XXVI	0,74	0,73	1,47	817	3	27	2	1	96,1	0,4	3,2	0,2	0,1
C	8 XXVII	XXVIII	0,43	0,43	0,86	562	7	46	3	1	90,8	1,1	7,4	0,5	0,2
C	10 XXIX	XXX	0,91	0,91	1,82	644	2	33	8	1	93,6	0,3	4,8	1,2	0,1
C		suma	3,69	3,68	7,37					průměr	94,3	0,5	4,5	0,6	0,1

Cizí pyl - z 95% borovice

Písek - anorganické a jiné částice pocházející nejspíše z půdy a prachu

Ostatní - rostlinné a živočišné zbytky

Tab. 15 Mikroskopická analýza pylu – 1. rok - 2010

2. rok - 2011 Rozbory upraveného pylu - mikroskopická analýza

Vzorek	Číslo vialék		Hmotnost (g)			Mikroskopická analýza - počty částic					Mikroskopická analýza - % nečistot				
	Lichý	Sudý	Lichý	Sudý	Celkem	Festuca	Cizí pyl	Písek	Ostatní	Spory	Festuca	Cizí pyl	Písek	Ostatní	Spory
A	2 I	II	0,30	0,29	0,59	689	2	16	1		97,3	0,3	2,3	0,1	0,0
A	4 III	IV	0,32	0,32	0,64	568	1	18	3	1	96,1	0,2	3,0	0,5	0,2
A	6 V	VI	0,30	0,30	0,60	541	5	48	3		90,6	0,8	8,0	0,5	0,0
A	8 VII	VIII	0,57	0,56	1,13	682	2	32	2		95,0	0,3	4,5	0,3	0,0
A	10 IX	X	0,28	0,28	0,56	544	1	39	5	1	92,2	0,2	6,6	0,8	0,2
A		suma	1,77	1,75	3,52					průměr	94,2	0,3	4,9	0,5	0,1
B	2 XI	XII	0,58	0,58	1,16	569	3	39	1		93,0	0,5	6,4	0,2	0,0
B	4 XIII	XIV	0,75	0,75	1,50	603	5	25	1	1	95,0	0,8	3,9	0,2	0,2
B	6 XV	XVI	0,67	0,67	1,34	528	2	54	4	1	89,6	0,3	9,2	0,7	0,2
B	8 XVII	XVIII	0,94	0,93	1,87	594	5	36	2	1	93,1	0,8	5,6	0,3	0,2
B	10 XIX	XX	0,61	0,60	1,21	587	3	27	3		94,7	0,5	4,4	0,5	0,0
B		suma	3,55	3,53	7,08					průměr	93,1	0,6	5,9	0,4	0,1
C	2 XXI	XXII	0,77	0,77	1,54	602	4	18	2		96,2	0,6	2,9	0,3	0,0
C	4 XXIII	XXIV	0,69	0,68	1,37	783	4	38	4	1	94,3	0,5	4,6	0,5	0,1
C	6 XXV	XXVI	0,58	0,57	1,15	599	2	51	1		91,7	0,3	7,8	0,2	0,0
C	8 XXVII	XXVIII	0,58	0,58	1,16	636	3	47	7		91,8	0,4	6,8	1,0	0,0
C	10 XXIX	XXX	0,87	0,87	1,74	581	5	29	8	1	93,1	0,8	4,6	1,3	0,2
C		suma	3,49	3,47	6,96					průměr	93,4	0,5	5,3	0,6	0,1

Cizí pyl - z 95% borovice

Písek - anorganické a jiné částice pocházející nejspíše z půdy a prachu

Ostatní - rostlinné a živočišné zbytky

Tab. 16

Mikroskopická analýza pylu – 2. rok – 2011

3. rok - 2012 Rozbory upraveného pylu - mikroskopická analýza																
Vzorek	Číslo vialék			Hmotnost (g)				Mikroskopická analýza - počty částic					Mikroskopická analýza - % nečistot			
	Lichý	Sudý		Lichý	Sudý	Celkem	Festuca	Cizí pyl	Písek	Ostatní	Spory	Festuca	Cizí pyl	Písek	Ostatní	Spory
A	2 I	II		0,25	0,25	0,50	658	3	48	2		92,5	0,4	6,8	0,3	0,0
A	4 III	IV		0,28	0,28	0,56	532	3	41	2		92,0	0,5	7,1	0,3	0,0
A	6 V	VI		0,33	0,32	0,65	609	4	32	1	1	94,1	0,6	4,9	0,2	0,2
A	8 VII	VIII		0,46	0,46	0,92	396	2	28	2		92,5	0,5	6,5	0,5	0,0
A	10 IX	X		0,26	0,26	0,52	512	3	36	1		92,6	0,5	6,5	0,2	0,2
A		suma		1,58	1,57	3,15					průměr	92,8	0,5	6,4	0,3	0,1
B	2 XI	XII		0,52	0,51	1,03	604	2	28	2		95,0	0,3	4,4	0,3	0,0
B	4 XIII	XIV		0,65	0,64	1,29	588	5	32	4	1	93,3	0,8	5,1	0,6	0,2
B	6 XV	XVI		0,33	0,32	0,65	514	5	50	2	1	89,9	0,9	8,7	0,3	0,2
B	8 XVII	XVIII		0,69	0,68	1,37	569	2	44	1		92,4	0,3	7,1	0,2	0,0
B	10 XIX	XX		0,67	0,67	1,34	632	1	26	3	1	95,3	0,2	3,9	0,5	0,2
B		suma		2,86	2,82	5,68					průměr	93,2	0,5	5,9	0,4	0,1
C	2 XXI	XXII		0,62	0,61	1,23	548	3	40	2	1	92,3	0,5	6,7	0,3	0,2
C	4 XXIII	XXIV		0,64	0,64	1,28	502	3	32	2	1	93,0	0,6	5,9	0,4	0,2
C	6 XXV	XXVI		0,75	0,74	1,49	763	4	25	4		95,9	0,5	3,1	0,5	0,0
C	8 XXVII	XXVIII		0,91	0,90	1,81	712	6	19	2	1	96,2	0,8	2,6	0,3	0,1
C	10 XXIX	XXX		0,57	0,57	1,14	699	5	28	4		95,0	0,7	3,8	0,5	0,0
C		suma		3,49	3,46	6,95					průměr	94,5	0,6	4,4	0,4	0,1

Cizí pyl - z 95% borovice

Písek - anorganické a jiné částice pocházející nejspíše z půdy a prachu

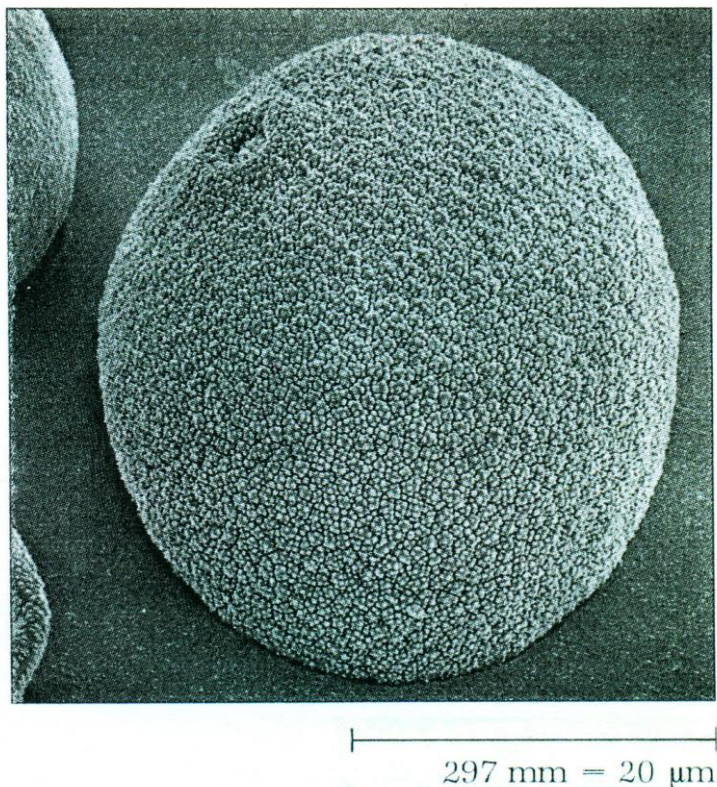
Ostatní - rostlinné a živočišné zbytky

Tab. 17

Mikroskopická analýza pylu – 3. rok – 2012

Velikost pylových zrn (μm)						
č.vzorku	měření 1.	měření 2.	měření 3.	měření 4.	měření 5.	průměr
1. rok - 2010						
A2	36,10	36,60	36,80	36,80	36,90	36,64
A4	35,20	37,00	35,90	34,40	37,00	35,90
A6	36,80	36,90	36,90	35,30	36,80	36,54
A8	36,30	36,50	33,80	37,00	37,10	36,14
A10	35,80	36,90	37,00	36,90	36,70	36,66
průměr A						36,38
směrodatná dochylka						0,87
B2	36,60	36,20	37,10	36,90	36,50	36,66
B4	37,00	35,80	36,80	36,40	35,80	36,36
B6	36,50	36,90	34,90	36,20	37,00	36,30
B8	36,80	35,20	37,10	37,00	36,80	36,58
B10	34,90	36,30	37,00	36,80	36,90	36,38
průměr B						36,46
směrodatná dochylka						0,66
C2	37,10	37,10	36,20	35,90	36,80	36,62
C4	35,90	37,00	36,20	37,10	36,50	36,54
C6	35,40	36,50	36,70	36,50	36,30	36,28
C8	35,60	37,00	35,40	36,20	37,10	36,26
C10	36,30	35,90	36,00	36,90	36,30	36,28
průměr C						36,43
směrodatná dochylka						0,54
průměr A, B, C						36,42
2. rok - 2011						
A2	36,20	36,20	35,00	36,20	37,00	36,12
A4	36,00	36,10	36,80	36,80	37,00	36,54
A6	35,40	36,90	35,70	36,40	37,10	36,30
A8	37,10	35,80	37,00	35,80	36,50	36,44
A10	37,00	36,10	36,80	37,00	36,90	36,76
průměr A						36,43
směrodatná dochylka						0,59
B2	35,50	36,50	36,80	36,90	35,90	36,32
B4	36,80	36,40	37,10	36,30	36,20	36,56
B6	36,20	37,00	36,50	36,10	37,00	36,56
B8	36,80	36,30	34,80	35,80	36,50	36,04
B10	35,90	37,00	35,50	37,00	36,90	36,46
průměr B						36,39
směrodatná dochylka						0,58
C2	35,90	36,80	36,30	36,90	36,80	36,54
C4	37,00	36,20	36,50	37,10	37,00	36,76
C6	36,80	36,90	36,90	36,20	36,80	36,72
C8	36,00	37,00	36,10	37,10	36,50	36,54
C10	36,90	35,80	35,80	35,00	36,90	36,08
průměr C						36,53
směrodatná dochylka						0,61
průměr A, B, C						36,45
3. rok - 2012						
A2	36,20	36,20	36,90	37,00	36,50	36,56
A4	35,80	36,90	37,10	36,50	37,00	36,66
A6	37,10	36,80	36,50	34,50	36,50	36,28
A8	36,30	36,30	36,90	36,90	36,70	36,62
A10	35,40	35,80	36,20	35,80	36,30	35,90
průměr A						36,40
směrodatná dochylka						0,61
B2	34,30	36,20	35,10	36,90	37,00	35,90
B4	36,90	36,90	36,90	37,10	36,50	36,86
B6	35,60	34,20	36,80	37,00	36,90	36,10
B8	36,20	36,90	36,30	35,90	35,70	36,20
B10	37,10	37,00	36,80	36,50	36,90	36,86
průměr B						36,38
směrodatná dochylka						0,83
C2	36,20	37,10	36,50	35,70	36,50	36,40
C4	35,10	37,00	36,90	36,20	34,90	36,02
C6	36,30	35,90	34,10	37,00	36,80	36,02
C8	36,90	36,50	37,00	36,80	36,10	36,66
C10	35,80	35,90	36,20	36,80	35,80	36,10
průměr C						36,24
směrodatná dochylka						0,74
průměr A, B, C						36,34
průměr 3 let (2010, 2011, 2012)						36,40

Tab. 18 Velikost pylových zrn (μm)



Obr. 9 Detail pylového zrna

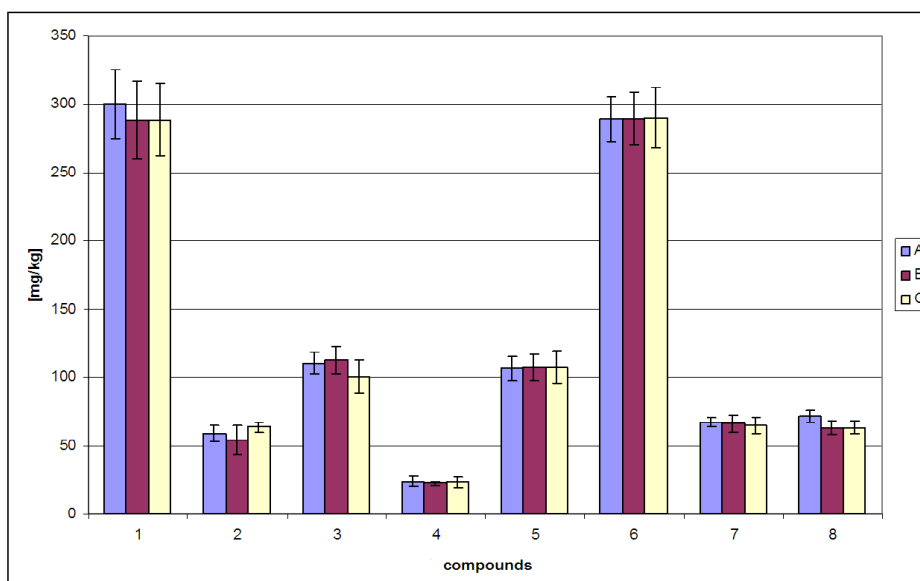
5.6 CHEMICKÉ ANALÝZY

Ze vzorků vyčištěného pylu byly připraveny extrakty 70% MeOH viz metodiky kap. č. 4.6.1 a extrakty byly analyzovány na HPLC a LC/MS - viz metodiky kap. č. 4.6.2, 4.6.3. Fenolické sloučeniny byly detekovány při 220 nm a koncentrace vybraných látek byla vypočtena z kalibračních křivek (viz Tab. 20, 21). Výsledkem bylo zjištění 8 významných detekovaných látek, které se vyskytovaly ve všech vzorcích extraktů pylu v obou letech 2010 a 2011 (esenciální AMK tryptofan a 7 fenolických látek; viz Obr. 10, Obr. 13).

Látky jsou identifikovány na základě retenčního času na HPLC a DAD spekter (v porovnání se standardy: tryptofan, kemferol, kávová kyselina) (viz Obr. 11) a MS dat (na základě literárních dat) (viz Tab. 19). Fragменты m/z 162 a 146 jsou typické pro fragmentaci glykosidů. (Schema funkce a foto přístrojů – viz přílohy). Vyhodnocení sledovaných látek viz statistika.

Číslo látky	Retenční čas (min) viz Obr. 12	Identifikace dle DAD Spekter	MS data (+APCI) Full Scan
1	12,0	tryptofan	205 ⁺
2	14,8		402 ⁺ , 360 ⁺ (M-42), 342 ⁺ (M-42-H ₂ O)
3	18,5		374 ⁺ , 195 ⁺
4	23,8	kvercetin diglukosid	627 ⁺ , 465 ⁺ (M-162), 303 ⁺ (M-162-162)
5	25,1	rhamnetin (isorhamnetin) diglukosid	641 ⁺ , 479 ⁺ (M-162), 317 ⁺ (M-162-162)
6	26,3	kvercetin diglukosid	611 ⁺ , 465 ⁺ (M-146), 303 ⁺ (M-146-162)
7	28,8	kemferol diglucosid	595 ⁺ , 449 ⁺ (M-146), 287 ⁺ (M-146-162)
8	45,6	derivát kávové kyseliny	796 ⁺ , 761 ⁺ , 515 ⁺

Tab. 19 Identifikace 8 sledovaných látek dle analýz HPLC a LC - MS



A – Nehnojeno , kontrola

B – Nižší úroveň výživy

C – Vyšší úroveň výživy

(B a C – přesný popis výživy viz metodika kap. č. 4.3)

Obr. 10 Obsah tryptofanu a 7 fenolických látek v závislosti na různé úrovni hnojení dusíkem (průměr roku 2010 a 2011) (označení látek viz Tab. 19).

HPLC analýzy - 1. rok - 2010, extrakty pylu

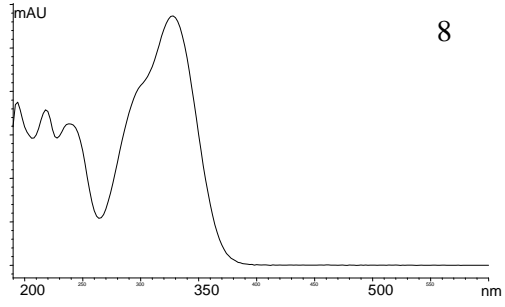
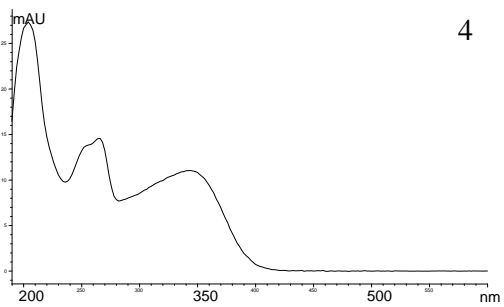
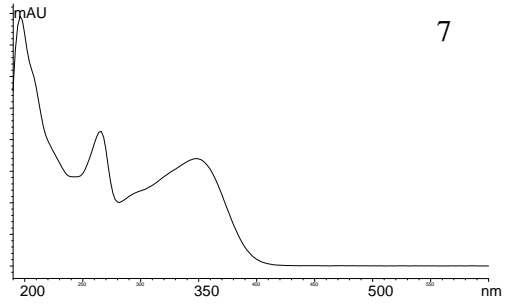
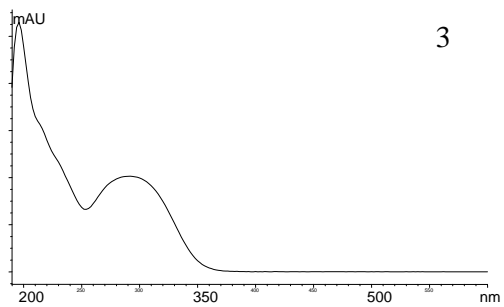
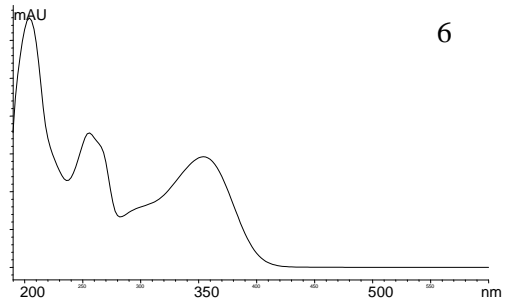
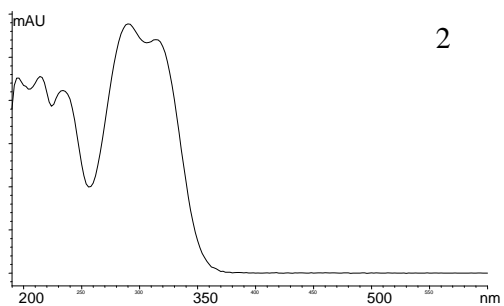
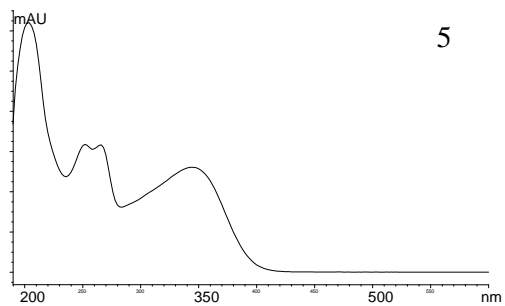
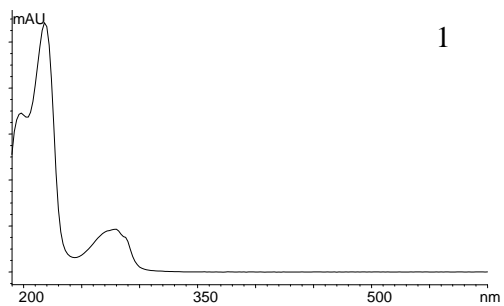
číslo parcelky	1	2	3	4	5	6	7	8
	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
A2	306,4	55,5	104,6	25,6	113,0	282,6	67,6	76,6
A4	265,9	54,6	103,0	19,6	92,7	272,2	62,1	64,6
A6	304,2	69,6	116,4	23,3	106,6	311,9	67,6	73,8
A8	290,1	55,4	108,0	22,6	105,6	278,0	68,6	71,3
A10	334,9	59,4	121,0	28,7	115,5	300,8	70,4	71,2
A průměr	300,3	58,9	110,6	24,0	106,7	289,1	67,3	71,5
A směrodatná odchyška	25,2	6,3	7,8	3,4	8,9	16,6	3,1	4,5
B2	298,2	63,4	118,2	23,3	105,4	300,2	64,5	65,4
B4	297,5	54,4	114,6	21,5	101,4	289,6	69,3	60,2
B6	241,6	37,5	99,1	20,9	99,9	258,7	58,3	58,4
B8	287,0	51,6	107,4	24,0	107,1	287,3	63,4	61,9
B10	319,3	63,4	124,6	22,0	124,0	310,8	75,4	70,7
B průměr	288,7	54,0	112,8	22,3	107,6	289,3	66,2	63,3
B směrodatná odchyška	28,9	10,7	9,9	1,3	9,7	19,5	6,5	4,9
C2	260,5	59,7	87,4	18,6	89,7	275,2	57,5	64,0
C4	290,5	59,8	107,1	23,0	108,5	284,7	63,8	59,1
C6	282,2	66,1	92,4	20,2	104,8	299,6	67,5	64,6
C8	279,9	67,2	96,3	27,1	116,7	269,4	62,5	59,1
C10	331,6	65,7	117,8	27,3	119,5	323,9	72,7	69,9
C průměr	289,0	63,7	100,2	23,3	107,8	290,5	64,8	63,3
C směrodatná odchyška	26,3	3,6	12,2	3,9	11,8	21,9	5,7	4,5
A průměr	300,3	58,9	110,6	24,0	106,7	289,1	67,3	71,5
B průměr	288,7	54,0	112,8	22,3	107,6	289,3	66,2	63,3
C průměr	289,0	63,7	100,2	23,3	107,8	290,5	64,8	63,3

Tab. 20 HPLC analýzy – 1. rok – 2010

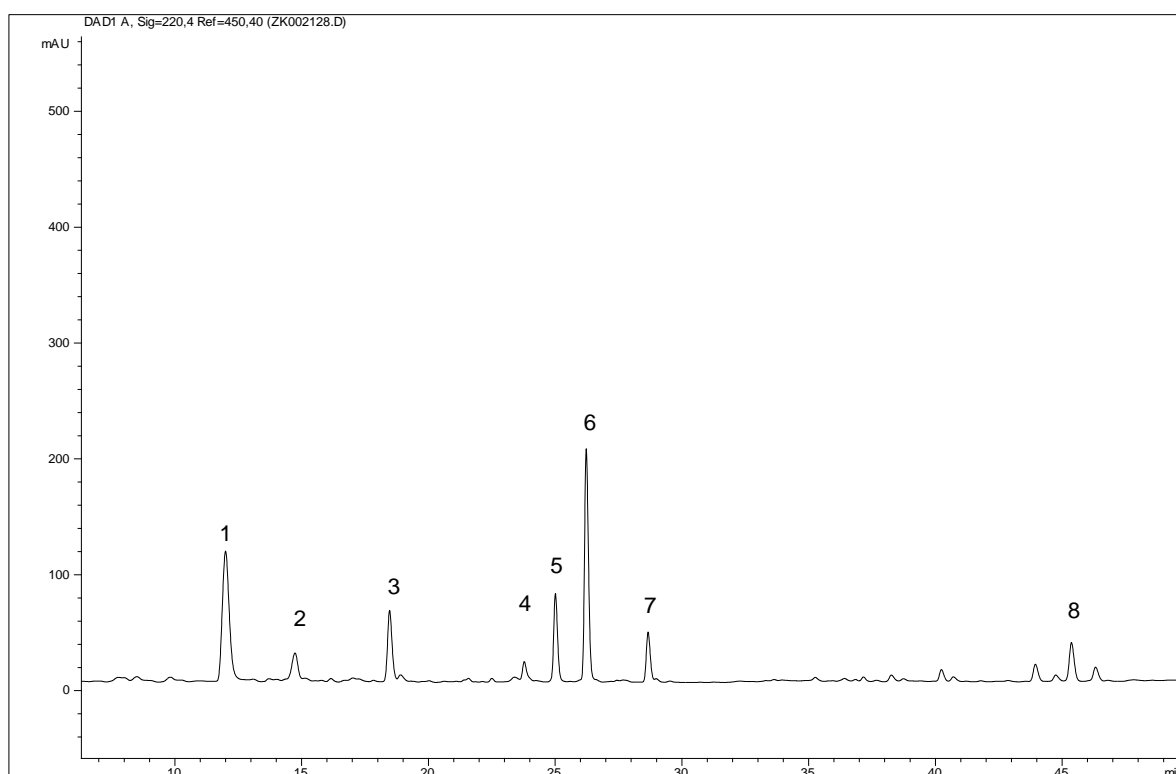
HPLC analýzy - 2. rok - 2011, extrakty pylu

číslo parcelky	1	2	3	4	5	6	7	8
	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
A2	303,2	69,0	119,1	22,2	106,0	300,0	68,2	72,9
A4	310,9	56,9	102,6	21,5	93,8	270,3	69,3	70,0
A6	334,6	54,4	121,0	29,0	105,7	281,7	70,0	71,2
A8	290,0	54,7	104,6	24,4	105,0	278,1	62,8	65,3
A10	268,1	57,9	103,8	19,1	112,8	299,9	69,9	74,9
A průměr	301,4	58,6	110,2	24,3	104,6	276,7	68,0	70,9
A směrodatná odchylka	24,7	6,0	9,0	3,4	6,8	5,9	3,0	3,6
B2	297,5	54,5	99,0	23,5	100,3	301,0	74,1	67,0
B4	318,8	55,9	123,8	22,9	104,6	309,0	68,9	58,9
B6	285,9	61,3	113,0	20,8	107,0	257,9	59,7	61,2
B8	299,0	38,5	108,3	21,9	107,7	290,0	65,4	62,6
B10	241,0	62,4	119,0	22,9	98,8	288,4	64,3	70,0
B průměr	300,7	54,5	111,0	22,3	104,9	289,5	64,6	63,9
B směrodatná odchylka	16,7	11,1	10,3	1,2	3,4	22,4	3,8	4,5
C2	265,3	65,2	90,0	23,3	118,2	283,7	68,7	59,4
C4	330,3	66,6	98,8	24,6	117,6	279,9	65,3	60,0
C6	291,4	67,0	95,6	27,0	106,2	319,0	73,2	64,3
C8	278,9	60,4	115,6	26,6	109,6	268,0	64,0	69,9
C10	283,1	58,8	108,6	19,7	95,7	299,7	59,9	64,0
C průměr	291,5	64,8	100,0	25,4	114,0	287,6	65,6	63,4
C směrodatná odchylka	28,0	3,0	11,0	1,8	6,7	22,0	5,6	4,9
A průměr	301,4	58,6	110,2	24,3	104,6	276,7	68,0	70,9
B průměr	300,7	54,5	111,0	22,3	104,9	289,5	64,6	63,9
C průměr	291,5	64,8	100,0	25,4	114,0	287,6	65,6	63,4

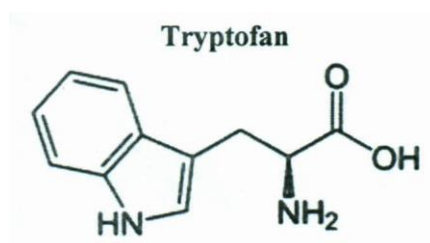
Tab. 21 HPLC analýzy – 2. rok – 2011



Obr. 11 Spektra látek (označení látek viz Tab. 19)



Obr. 12 HPLC separace extraktu z pylu. Popis vrcholů 1 - 8 viz Tab. 19



Obr. 13 Tryptofan

5.7 ALERGOLOGICKÉ ANALÝZY

Ze vzorků vyčištěného pylu byly připraveny extrakty a dále provedeny následné analýzy viz metodiky kap. č. 4.7.1 - nejprve byla zjišťována celková biologická aktivita (alergenní) *in vitro* pomocí inhibičního ELISA testu viz metodiky kap. č. 4.7.2 a poté byl zjišťován proteinový profil pomocí SDS – PAGE (elektroforeza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného - SDS) a pomocí imunoblottingu byla kvantitativně stanovena přítomnost hlavních alergenů viz metodiky kap. č. 4.7.3. (Schema funkce a foto přístrojů – viz přílohy).

5.7.1 ELISA TEST

Pomocí této metody jsme zkoumali **odhadovanou** (jelikož neznáme přesně PNU*) **biologickou aktivitu zkoumaných vzorků** (extraktů pylu); vazbu specifického IgE neinkubovaného se zkoumaným alergenem v koncentrační řadě, na alergen pevně vázaný na podklad. Koncentrace specifického IgE je detekována pomocí anti – IgE protilátky značené enzymem (křenovou peroxidázou) a jeho následnou reakcí s chromogenním substrátem Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci alergenových epitopů. **Vyhodnoceno ELISA readrem.**

Hodnoty průměrů (z tripletů stanovení) (viz Tab. 22, 23, 24) tvoří sigmoidu (příklad viz Obr. 14; pozn. ve výsledcích jsou zařazeny ukázky 4 sigmoid; z celkového počtu 45 vzorků). Hodnoty reprezentují absorbanci při 450 nm. Porovnáním vzájemné polohy inflexních bodů křivek (resp. jejich průmět do osy x (konc. alergenu)) s inflexním bodem standardu získáme porovnání celkové biologické (alergenní) aktivity jednotlivých vzorků (reprezentovaných průměrem).

Jelikož se jedná o průměry z průměrů nelze na tyto rozборы použít obvyklé statistické metody. Přístroj je vybaven softwarem, který určí shodu ($P_{0.05}$) zkoumaného vzorku se standardem. V našem pokusu byly všechny zkoumané vzorky vyhodnoceny jako jednoznačně vyhovující – ve shodě s firemním – studijním standardem.

Různá úroveň hnojení N neovlivnila biologickou (alergenní) aktivitu pylu ani v rámci variant A, B, C ani v rámci různých ročníků 2010, 2011, 2012; kvantitativní zastoupení majoritních alergenů bylo rovněž ve shodě se standardem.

Legenda k Tab. 22, 23, 24:

č. jamky	Hodnoty reprezentují absorbanci při 450 nm.
1- 11	

***Poznámka:**

Vzhledem k velmi malým množství vzorků pylu nebylo možno provést analýzy PNU (koncentrace proteinového dusíku); na základě tohoto lze pouze **odhadovat** biologickou aktivitu vzorků (BA) z polohy inflexních bodů (za předpokladu standardní extrakce).

ELISA test - 1. rok - 2010, extrakty pylu

Č. parcelky	Č. jamky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Inflex. bod
	Standard	0,395	0,378	0,405	0,452	0,637	0,720	0,923	0,973	1,265	1,317	1,547	8,400
A1		0,362	0,344	0,408	0,483	0,731	0,990	1,072	1,169	1,362	1,387	1,541	6,000
A3		0,359	0,342	0,408	0,478	0,728	0,984	1,073	1,166	1,361	1,378	1,523	6,000
A5		0,448	0,414	0,432	0,544	0,746	0,980	0,978	1,094	1,138	1,371	1,468	6,900
A7		0,499	0,396	0,419	0,620	0,771	0,883	0,937	1,127	1,278	1,443	1,528	7,600
A9		0,505	0,466	0,572	0,685	0,887	1,242	1,290	1,397	1,483	1,673	1,687	5,700
A průměr		0,435	0,392	0,448	0,562	0,773	1,016	1,070	1,191	1,324	1,450	1,549	6,440
A směrodat.odchylka		0,071	0,052	0,070	0,090	0,066	0,134	0,137	0,119	0,127	0,128	0,082	0,789
B1		0,394	0,379	0,411	0,456	0,641	0,709	0,931	0,985	1,254	1,305	1,526	8,200
B3		0,354	0,347	0,441	0,543	0,766	0,980	1,122	1,209	1,329	1,318	1,576	5,700
B5		0,444	0,413	0,429	0,545	0,748	0,977	0,991	1,098	1,137	1,374	1,460	6,700
B7		0,472	0,479	0,584	0,693	0,860	1,071	1,183	1,280	1,475	1,731	1,727	7,000
B9		0,501	0,462	0,567	0,679	0,889	1,234	1,279	1,404	1,505	1,686	1,718	5,800
B průměr		0,433	0,416	0,486	0,583	0,781	0,994	1,101	1,195	1,340	1,483	1,601	6,680
B směrodat.odchylka		0,059	0,055	0,082	0,101	0,099	0,191	0,141	0,162	0,153	0,208	0,118	1,018
C1		0,412	0,402	0,530	0,528	0,693	0,881	0,952	0,981	1,270	1,385	1,570	11,400
C3		0,350	0,346	0,439	0,538	0,759	0,981	1,111	1,192	1,314	1,302	1,552	6,000
C5		0,495	0,399	0,417	0,622	0,771	0,877	0,938	1,128	1,274	1,430	1,514	7,500
C7		0,477	0,482	0,588	0,693	0,854	1,072	1,183	1,264	1,439	1,728	1,697	7,000
C9		0,419	0,406	0,531	0,532	0,692	0,887	0,932	0,984	1,300	1,410	1,604	8,400
C průměr		0,431	0,407	0,501	0,583	0,754	0,940	1,023	1,110	1,319	1,451	1,587	8,060
C směrodat.odchylka		0,058	0,049	0,071	0,073	0,067	0,086	0,116	0,126	0,069	0,162	0,069	2,059

Tab. 22

ELISA test – 1. rok – 2010

ELISA test - 2. rok - 2011, extrakty pylu

Č. parcelky	Č. jamky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Inflex. bod
	Standard	0,395	0,378	0,405	0,452	0,637	0,720	0,923	0,973	1,265	1,317	1,547	8,400
A1		0,502	0,526	0,458	0,444	0,701	0,870	0,996	0,995	1,305	1,653	1,623	8,100
A3		0,393	0,369	0,551	0,421	0,645	0,912	1,112	1,023	1,254	1,303	1,502	7,200
A5		0,399	0,402	0,422	0,536	0,777	0,888	0,915	1,002	1,482	1,556	1,654	7,400
A7		0,425	0,458	0,523	0,432	0,802	0,903	1,214	0,987	1,653	1,304	1,514	7,700
A9		0,398	0,362	0,401	0,411	0,352	0,073	0,967	0,972	1,422	1,559	1,596	5,600
A průměr		0,423	0,423	0,471	0,449	0,655	0,729	1,041	0,996	1,423	1,475	1,578	7,340
A směrodat.odchylka		0,046	0,069	0,064	0,050	0,181	0,367	0,121	0,019	0,157	0,161	0,067	0,957
B1		0,511	0,415	0,516	0,456	0,754	0,715	0,931	1,111	1,514	1,308	1,595	7,800
B3		0,393	0,388	0,402	0,543	0,648	0,823	1,122	1,003	1,501	1,425	1,702	5,600
B5		0,401	0,415	0,402	0,545	0,609	1,036	0,991	1,365	1,333	1,699	1,725	6,400
B7		0,425	0,399	0,422	0,693	0,785	1,147	1,183	1,225	1,419	1,555	1,485	7,500
B9		0,402	0,456	0,502	0,679	0,802	0,999	1,279	1,365	1,513	1,477	1,688	6,000
B průměr		0,426	0,415	0,449	0,583	0,720	0,944	1,101	1,214	1,456	1,493	1,639	6,660
B směrodat.odchylka		0,049	0,026	0,056	0,101	0,086	0,173	0,141	0,159	0,079	0,146	0,099	0,953
C1		0,468	0,499	0,530	0,601	0,695	0,930	0,966	1,112	1,401	1,655	1,550	10,900
C3		0,486	0,477	0,439	0,489	0,788	0,888	1,005	1,113	1,312	1,450	1,626	8,600
C5		0,495	0,389	0,417	0,602	0,741	0,721	1,203	0,965	1,300	1,320	1,566	7,400
C7		0,399	0,455	0,588	0,634	0,635	0,799	1,114	1,299	1,222	1,318	1,702	6,000
C9		0,455	0,403	0,531	0,502	0,699	0,805	0,968	0,999	1,323	1,502	1,703	8,400
C průměr		0,461	0,445	0,501	0,566	0,712	0,829	1,051	1,098	1,312	1,449	1,629	8,200
C směrodat.odchylka		0,038	0,047	0,071	0,066	0,057	0,082	0,104	0,131	0,064	0,141	0,072	1,799

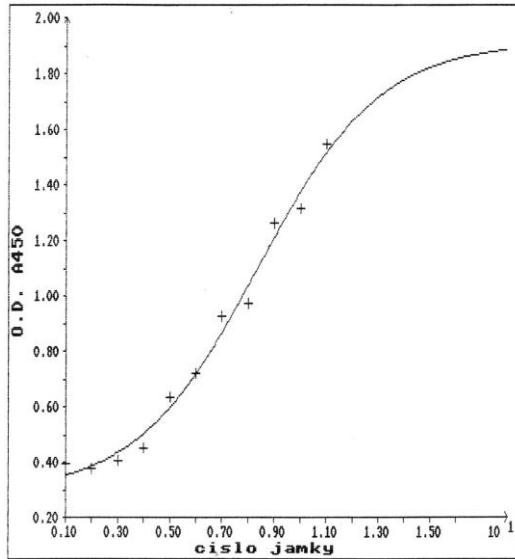
Tab. 23 ELISA test – 2. rok – 2011

ELISA test - 3. rok - 2012, extrakty pylu

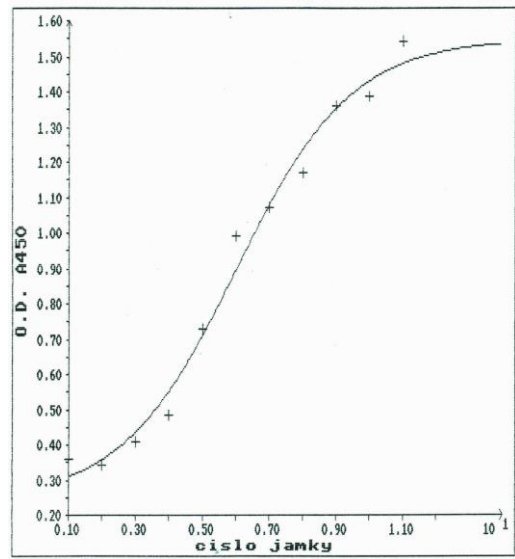
Č. parcelky	Č. jamky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Inflex. bod
	Standard	0,395	0,378	0,405	0,452	0,637	0,720	0,923	0,973	1,265	1,317	1,547	8,400
A1		0,392	0,396	0,502	0,502	0,698	0,912	0,954	1,226	1,258	1,305	1,542	6,400
A3		0,445	0,387	0,477	0,423	0,9032	0,703	0,963	0,965	1,418	1,299	1,602	6,800
A5		0,502	0,401	0,398	0,409	0,701	1,120	1,003	1,112	1,396	1,552	1,617	7,800
A7		0,511	0,421	0,401	0,432	0,452	0,788	0,912	0,958	1,251	1,378	1,523	6,900
A9		0,399	0,429	0,423	0,502	0,589	0,902	1,230	0,969	1,303	1,441	1,785	8,100
A průměr		0,450	0,407	0,440	0,454	0,669	0,885	1,012	1,046	1,325	1,395	1,614	7,340
A směrodat.odchylka		0,056	0,018	0,047	0,045	0,166	0,157	0,126	0,119	0,078	0,105	0,104	0,718
B1		0,478	0,400	0,403	0,603	0,811	1,140	0,900	1,111	1,254	1,300	1,626	8,200
B3		0,393	0,388	0,512	0,469	0,622	0,965	1,005	1,003	1,652	1,612	1,703	6,100
B5		0,489	0,464	0,519	0,528	0,631	0,854	1,039	1,365	1,698	1,698	1,487	7,800
B7		0,513	0,388	0,401	0,603	0,801	0,719	1,118	1,225	1,458	1,320	1,654	8,100
B9		0,398	0,412	0,507	0,458	0,723	0,754	0,941	1,365	1,118	1,389	1,712	6,600
B průměr		0,454	0,410	0,468	0,532	0,718	0,886	1,001	1,214	1,436	1,464	1,636	7,360
B směrodat.odchylka		0,055	0,031	0,061	0,070	0,090	0,171	0,085	0,159	0,250	0,180	0,091	0,950
C1		0,501	0,482	0,421	0,560	0,715	1,012	0,987	1,112	1,336	1,458	1,700	9,800
C3		0,387	0,421	0,564	0,478	0,741	0,745	1,236	1,113	1,625	1,462	1,596	7,900
C5		0,523	0,396	0,420	0,600	0,596	0,923	1,017	0,965	1,118	1,398	1,711	8,100
C7		0,415	0,365	0,512	0,641	0,600	1,120	0,915	1,299	1,114	1,325	1,642	6,100
C9		0,455	0,412	0,532	0,526	0,632	0,729	0,968	0,999	1,108	1,602	1,745	8,300
C průměr		0,456	0,415	0,490	0,561	0,657	0,906	1,025	1,098	1,260	1,449	1,679	8,200
C směrodat.odchylka		0,057	0,043	0,066	0,063	0,067	0,169	0,124	0,131	0,226	0,102	0,059	1,318

Tab. 24

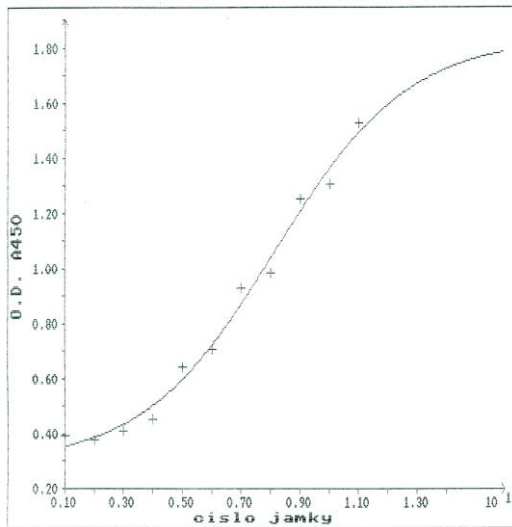
ELISA test – 3. rok – 2012



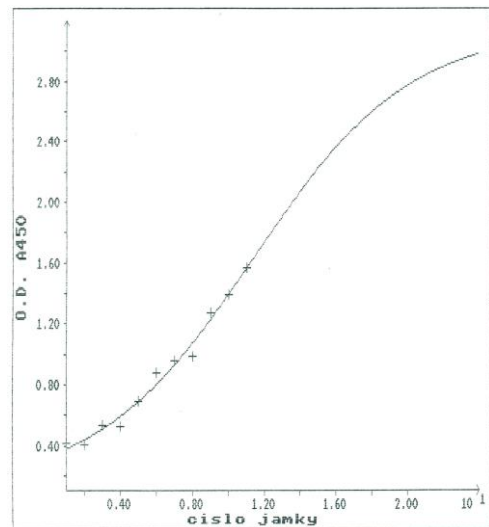
Standard



A1



A3



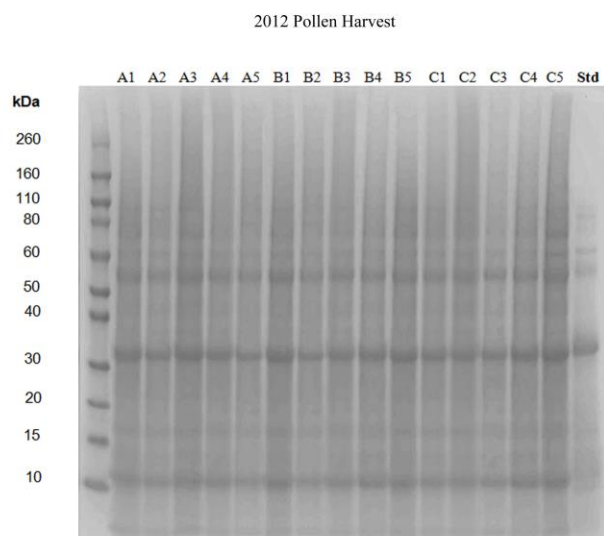
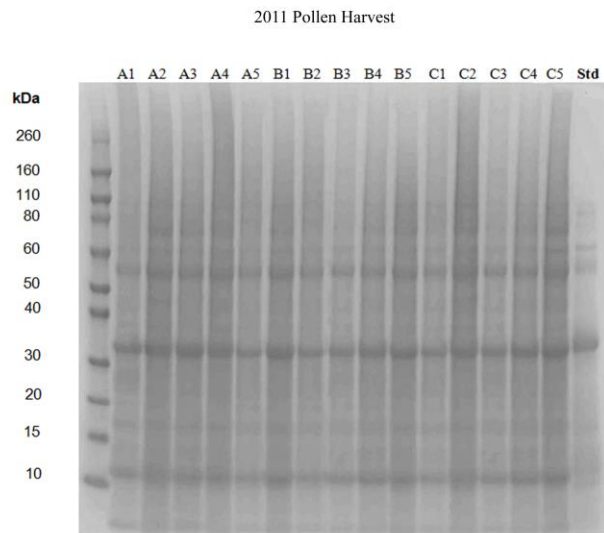
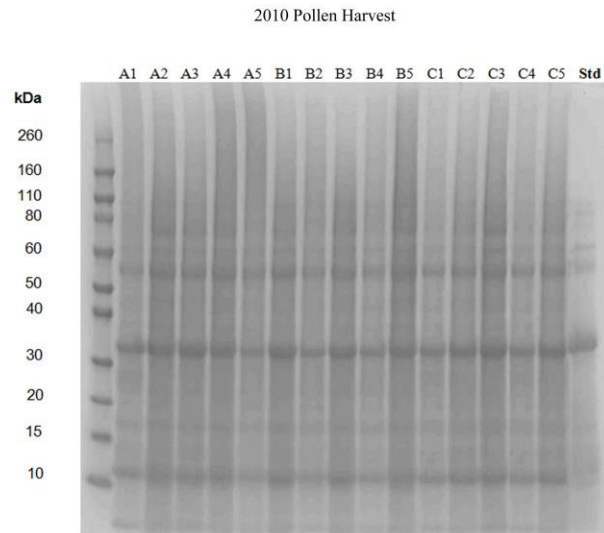
A5

Obr. 14 Příklady - sigmoidy extraktu (2010) - standard a vzorky A1, A3, A5

5.7.2 SDS – PAGE:

SDS vázaný na proteiny unifikuje jejich náboj tak, že výsledná pohyblivost proteinů závisí pouze na velikosti jejich molekuly. Vyhodnocení se děje porovnáním elektroforeogramů extraktu vzorku a standardu (resp. standardu molekulových hmotností). Vzorek vyhovuje, jestliže se profily označených skupin proteinů obou elektroforeogramů neliší v počtu a rozmístění zón (lze předpokládat shodnou sadu alergenů). Důležité hodnoty mw jsou cca 17 kDa, cca 30 kDa a cca 70 kDa (kde se nacházejí majoritní alergeny). Vzorek nevyhovuje, pokud je na elektroforeogramu zkoušeného vzorku těchto zón více nebo se liší od elektroforeogramu standardu. Pokud některá zóna chybí např. alergen je přítomen v extraktu v malém množství a na elektroforeogramu se neobarvil. Pro zhodnocení se provede porovnání elektroforeogramů extraktu vzorku a standardu (Obr. 15).

V našem pokusu byly všechny zkoumané vzorky vyhodnoceny jako jednoznačně vyhovující – ve shodě s firemním – studijním standardem. **Různá úroveň hnojení N neovlivnila proteinový profil pylu – ani v rámci variant A, B, C ani v rámci různých ročníků 2010, 2011, 2012.**



Obr. 15 SDS – PAGE – elektroforeogram – proteinový profil z extraktů pylu (kDa)

5.8 SKLIZEŇ SEMENE, SEMENÁŘSKÝ VÝNOS

Sklizeň semen probíhala po 3 roky vedení pokusu (2010, 2011, 2012). Byla prováděna maloparcelkovým kombajnem OSEVAN. Sklizené množství (kg) z každé parcelky bylo zvlášť vysypáno do plastové nádoby (vaničky), zváženo a zaznamenáno (Tab. 23). Vlhkost sklizených semen byla v průměru v roce: 2010 - 12,7%, 2011 - 13,4%, 2012 - 14,0%. Jednoznačně se potvrdil obecně známý předpoklad, že se zvyšující se úrovní hnojení N se zvyšuje semenářský výnos, a to ve všech sklizňových ročních (ve variantách bez sklizně pylu i ve variantách se sklizní pylu). Vždy byl výnos vyšší ve variantě B oproti A a C oproti B. Pokud jde o porovnání výnosu semene vždy ze shodné varianty ve stejném roce – pak **vždy byl dosažen vyšší výnos z parcelek, na nichž proběhla sklizeň pylu.**

Je zřejmé, že vlivem sklizně pylu v době kulminace kvetení, dochází k lepšímu opylení rostlin vlivem zvýšeného pohybu vzduchu v okolí prašníků a uvolňovaných pylových zrn v době sběru pylu; tím i následnému zvýšení semenářského výnosu. Uvedené hmotnosti (Tab. 25) jsou v $\text{kg} \cdot 10^{-1}$. Proto je snadný přepočet na **hektarový výnos: např. $2,592 \text{ kg} \cdot 10 \text{ m}^2$ (z 1 parcelky) = (odpovídá) $2,592 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ apod.**

Z tabulky 23 je rovněž patrné, že se semenářský výnos v jednotlivých letech (i jednotlivých variantách) obecně mezeročně snižuje (dle předpokladu); nejmarkantnější snížení výnosu je zřetelné zejména u 3. roku pokusu (2012), kdy semenářský výnos již ve všech variantách poklesl obecně na méně než cca $\frac{1}{2}$ původních hodnot v 1. roce sklizně (2010).

Sklizeň semene z 1 parcelky (tj. 10 m²) v kg

rok	2010	2011	2012
Datum	14.7.2010	16.7.2011	13.7.2012
hodina	12,15 - 14,00	13,00 - 15,00	12,30 - 14,45
teplota	31 °C	28 °C	26 °C
vítr	bezvětrí	mírný jižní vánek	bezvětrí
tlak	1010 kPa	980 kPa	960 kPa
parcelky liché - bez luxování pylu			
A1	2,00	1,46	1,09
A3	2,52	1,39	0,98
A5	2,76	1,58	1,19
A7	2,86	1,69	1,25
A9	2,82	1,22	1,54
průměr A liché	2,59	1,47	1,21
směrodatná odchylka	0,36	0,18	0,21
parcelky sudé - luxované			
A2	2,46	1,78	1,17
A4	2,98	1,59	1,14
A6	2,68	1,66	1,66
A8	3,04	1,43	1,11
A10	2,64	1,89	1,17
průměr A sudé	2,76	1,67	1,25
směrodatná odchylka	0,24	0,18	0,23
parcelky liché - bez luxování pylu			
B1	2,32	1,89	1,27
B3	3,00	1,62	1,31
B5	2,80	1,59	1,02
B7	2,74	1,78	1,42
B9	2,82	1,78	1,30
průměr B liché	2,74	1,73	1,26
směrodatná odchylka	0,25	0,12	0,15
parcelky sudé - luxované			
B2	2,92	1,98	1,03
B4	2,66	1,78	1,7
B6	2,96	1,69	1,15
B8	2,34	1,58	1,16
B10	3,16	2,31	1,37
průměr B sudé	2,81	1,87	1,28
směrodatná odchylka	0,32	0,29	0,26
parcelky liché - bez luxování pylu			
C1	2,84	2,03	1,41
C3	2,88	1,89	1,55
C5	2,84	1,76	1,05
C7	2,58	1,87	1,23
C9	2,44	1,96	1,25
průměr C liché	2,72	1,90	1,30
směrodatná odchylka	0,20	0,10	0,19
parcelky sudé - luxované			
C2	3,16	2,15	1,63
C4	3,06	1,87	1,25
C6	2,80	1,74	1,54
C8	3,06	2,13	0,98
C10	2,52	2,01	1,23
průměr C sudé	2,92	1,98	1,33
směrodatná odchylka	0,15	0,17	0,26

 Tab. 25 Sklizeň semen z 1 parcelky (tj. 10 m²) v kg

5.9 STATISTIKA

5.9.1 STATISTIKA VÝSLEDKŮ CHEMICKÝCH ANALÝZ

Pro vyhodnocení byl použit **statistický software R** (The R project for Statistical Computing) – viz metodika kap. č. 4.8.

ANOVA – *Multivariate analysis of variances* – je statistický test používající se k **porovnání středních hodnot náhodných vektorů** (vícerozměrných náhodných veličin). Někdy se mluví o porovnávání středních hodnot závislých náhodných veličin. (což jednotlivé složky pylu - látky 1 – 8 jsou).

MANOVA je vlastně vícerozměrná verze ANOVA. Má tedy stejné podmínky použití – předpokládá vícerozměrné normální rozdělení, nezávislost jednotlivých pozorování a homogenitu roztylových matic. Všechny tyto podmínky jsou v našem případě splněny.

Hypotézou tohoto testu tedy je, že **střední hodnoty vektorů nezávisí na jiné nezávislé proměnné (v našem případě na různé úrovni hnojení N)**, alternativou, že střední hodnoty jsou touto nezávisle proměnnou ovlivněny.

Úkolem bylo otestovat, zda je složení pylu ovlivněno různou úrovní hnojením N či ne. K dispozici byly výsledky chemických analýz (vzorky z roku 2010 a 2011).

Nejprve se nabízelo použít ANOVA test na dílčích 8 látek (složek pylu) - tryptofan a 7 fenolických látek (dále jen složky). Všechny podmínky pro ANOVA byly ověřeny a jsou splněny.

Hypotézou dílčích ANOVA testů tedy bylo, že **obsah zkoumané složky pylu není ovlivněn danou úrovní hnojením dusíkem.** Tato hypotéza byla testována oproti alternativě, že různá úroveň hnojení dusíkem ovlivňuje množství zkoumané složky pylu.

Tento test byl postupně proveden pro všech osm složek pylu. V případě sedmi složek (fenolických látek) vyšel test nevýznamně (a to jak ve vzorcích 2010, tak i ve vzorcích 2011), nebylo tedy možné zamítnout hypotézu, že hnojení dusíkem neovlivňuje množství těchto složek pylu. Ovšem pro 1. složku pylu (tryptofan) vyšel test významně (p- hodnoty 0,023 a 0,026), a **podařilo se tedy prokázat, že hodnoty 1. složky pylu (tryptofan) jsou ovlivněny různou úrovní hnojením dusíkem.** Speciálně se podařilo prokázat, že existuje rozdíl v obsahu této složky pylu mezi parcelkami A - kde se nehnojilo vůbec a parcelkami B a C, kde se hnojilo částečně či plně.

Závěrem **tedy bylo, že se podařilo prokázat, že obsah první složky pylu (tryptofan) je ovlivněn různou úrovní hnojení dusíkem, a to tak, že signifikantní vychází rozdíl mezi parcelkami, kde se nehnojilo vůbec (parcelkami A), kde se hnojilo částečně (B) i plně (C) (2010) a mezi parcelkami , kde se nehnojilo vůbec (A) a parcelkami, kde se hnojilo plně (C) (2011).**

Protože lze předpokládat, že obsahy jednotlivých složek pylu jsou navzájem korelované náhodné veličiny, využili jsme s testování statistický test MANOVA. Jedná se o zobecnění známého testu ANOVA pro náhodné vektory. (Zatímco ANOVA testuje shodu středních hodnot náhodných veličin, MANOVA testuje střední hodnoty náhodných vektorů). Předpoklady MANOVA testu jsou obdobné předpokladům ANOVA testu – tedy normální rozdělení, nezávislost a homogenita rozptylů. Tyto podmínky jsou splněny.

Hypotézou tedy je, že složení pylu není ovlivněno různou úrovní hnojením dusíkem. Tato hypotéza je testována oproti alternativě, že hnojení ovlivňuje složení pylu.

Při testování MANOVA je možné využít čtyř různých testových statistik – **Wilksovy, Pillaiovy, Royovy a Hotellingovy-Lawleyovy.** (Pokud chceme nezamítnout statistiku, pak je nejlepší vyzkoušet všechny čtyři a všechny by měly vyjít nepodstatně). V našem případě tomu tak však není. Naše výsledky:

	Wilks	Pillai	Roy	Hotelling-Lawley
2010	0,042	0,029	0,016	0,070
2011	0,013	0,0056	0,011	0,036

Vzorky jsme otestovali všemi těmito testovými statistikami. Kromě hodnoty Hotellingovy-Lawleyovy statistiky pro vzorky z roku 2010 (p-hodnota 0,07) vyšly všechny hodnoty statistik průkazné (na hladině 5%).

Závěr tedy je, že zamítáme hypotézu ve prospěch alternativy. Nebo-li, **podářilo se nám prokázat, že různé dávky hnojení dusíkem ovlivňují složení pylu.** S využitím dílčích analýz jsme zjistili, že **signifikantní rozdíl je způsoben první složkou pylu (tryptofan)**, a to jejími rozdílnými hodnotami na parcelkách, kde se nehnojilo vůbec (A) a parcelkách, kde se hnojilo částečně (B) či plně (C) (2010), resp. na parcelkách, kde se nehnojilo vůbec (A) a parcelkách, kde se hnojilo plně (C) (2011).

Pro kontrolu jsme provedli **MANOVA** na **naměřené hodnoty pylu na jednotlivých parcelkách**, kde jsme testovali, **zda tyto hodnoty nejsou ovlivněny rokem pozorování.** Zde vyšly hodnoty testových statistik **neprůkazné.**

(Tedy): **Hypotézou** testu je, že **složení pylu není nijak ovlivněno různou úrovní hnojení dusíkem.** (Alternativou, že různá úroveň hnojení dusíkem nějakým způsobem ovlivňuje složení pylu).

Pokud porovnááme výsledky na jednotlivých parcelkách v jednotlivých letech s využitím této metody, (jedná se evidentně o závislá pozorování), dostáváme: (máme-li roky 2010 a 2011 - potom všechny statistiky vycházejí stejně, proto jen jedna hodnota):

A	0,591
B	0,358
C	0,165

Z výše uvedeného je zřejmé, že **statisticky vychází**, že nelze tvrdit, že složení pylu není ovlivněno různou úrovní hnojení dusíkem. (Naopak, **lze statisticky prokázat, že složení pylu je ovlivněno různou úrovní hnojení dusíkem**). **Z velké části je způsobuje 1. složka pylu – tryptofan.**

6 DISKUSE

Hlavní vytýčené cíle i doplňková pozorování se v rámci disertační práce podařilo splnit.

V současné době celosvětové zemědělství, zejména v marginálních oblastech (LFA), hledá nové a alternativní způsoby využití zemědělské produkce. Současný význam travních porostů se stále více přesouvá na jejich mimoprodukční a ekologické funkce. Jedním z nich je i cílená produkce biomasy trav. Tato je významnou součástí celkového potenciálu biomasy, jako obnovitelného přírodního zdroje využitelného pro energetické účely v podmínkách např. i České republiky. Energetické využití trav je novým směrem jejich využití v průmyslu a vytváří nové možnosti pro výzkum v této oblasti a praktickou realizaci. V současnosti je výzkum energetických trav zaměřen na realizaci spalování travní biomasy v technických zařízeních a využití trav pro produkci bioplynu [FRYDRYCH a kol. 2005, 2006].

Soudobým trendem je nejen výzkum ekonomického přínosu, ale i výzkum dopadu nových trendů na životní prostředí, krajinu a obyvatelstvo. Jedním z alternativních způsobů využití travních porostů je i sběr pylu jednotlivých druhů pro farmaceutické účely. Na tento účel jsou vyhledávány monokulturní porosty (semenářské či speciálně zakládáné pro tento účel).

Během posledních dvou desetiletí stoupl výskyt alergií v některých civilizovaných státech na 30 – 40% populace. Již každý čtvrtý až pátý člověk trpí alergií. Kostřava červená patří k nejvýznamnějším druhům polinózních trav v Evropě [ŠPIČÁK a kol. 2005].

Polinóza je multisystémové alergické onemocnění, jehož výskyt ve světě i v České republice od druhé poloviny 20. století vytrvale stoupá. Jde o celkové sezonní alergické onemocnění, které je podmíněno alergickou reakcí prvního typu (IgE mediovanou) na alergeny obsažené v pylových zrnech. Nejčastějším klinickým projevem polinózy je alergická rinokonjunktivitida, méně časté jsou astmatické potíže, objevuje se však i řada dalších projevů v závislosti na postiženém cílovém orgánu. Základní roli v diagnostice polinózy hraje pečlivě odebraná anamnéza, upřesnění a konečné potvrzení diagnózy umožní kožní testy, v některých zvláštních případech vyšetření specifických protilátek typu IgE. Nejdůležitějším léčebným postupem je prevence kontaktu s pylem, či alespoň omezení expozice pylovým alergenům.

Kauzálním terapeutickým postupem je pečlivě indikovaná a správně provedená specifická imunoterapie kvalitními standardizovanými alergeny.

Pacientů s pylovou alergií vytrvale přibývá a celosvětově jsou na léčbu problémů vyvolávaných alergickými chorobami vynakládány stále větší finanční prostředky. To samozřejmě vede ke zvýšenému zájmu výzkumníků i farmaceutických společností o zkvalitňování antialergických léků a léčebných postupů. Přestože ani moderní medicína neumí alergická onemocnění ještě zcela vyléčit, zvládá většinou velmi dobře alespoň odstranit potíže, a to s minimálními vedlejšími účinky léčby [RYBNÍČEK 2004].

Právě proto byl tento travní druh (odrůda *Tagera*) vybrán pro výzkum (z hlediska nenáročnosti a celosvětového rozšíření v kontextu na alergologii).

Kostřava červená patří mezi rhizomatické trávy (s oddenky podzemními). [KOBES 2009]. Roste na všech půdních druzích, a to i v subalpinském pásmu. Vyskytuje se na evropském, asijském, americkém a africkém kontinentu. [HRUBIŠKO a kol. 2003]. Z ekologického hlediska je to naše nejskromnější tráva, nejvíce rozšířená na mezooligotrofních půdách. Poměrně dobře přežívá sucho a horko, lze ji využít i na částečně zastíněných stanovištích, může se uplatnit při mírném, dočasném zamokření. Spokojí se i s nízkou úrovní N – hnojení. Všechny odrůdy mají vysokou odolnost k vyzimování, vysokou vytrvalost a nenáročnost na půdní a klimatické podmínky [CAGAČ a kol. 2004].

Pro založení pokusu byla zvolena kostřava červená, vyzkoušená a vysoce plastická odrůda *Tagera*, která se ukázala jako dobrá volba pro kvantifikaci všech vytčených cílů práce, plně dle popisu šlechtitelů (autorů) vyšlechtěné odrůdy [TAGRO 1999]. Zde, na šlechtitelské stanici TAGRO Červený Dvůr, spol. s r. o. byly pokusy realizovány neboť zde byla záruka relevantního založení, vedení na ošetřování porostu dle metodik. Společnost disponuje možností maloparcelkového setí a sklizně.

Odrůda *Tagera* byla (vyšlechtěna na šlechtitelské stanici TAGRO Červený Dvůr s.r.o.) v roce 1996 byla registrována v ČR a v roce 1998 v EU. Má polovzpřímený, hustý trs tmavě zelené barvy, velmi dobře olistěný, s dlouhými výběžky. Vytváří bohaté přizemní listy, je intenzivně výběžkatá, málo poléhavá, vytváří hustý porost a kompaktní drn. Rychle obrůstá, stéblo je středně jemné, květenství středně dlouhé. Je odolná proti listovým chorobám a proti zasychání špiček listů [TAGRO 1999]. Obilky jsou osinaté [ŠAŠKOVÁ, ŠTOLFA, 1993]. Výhodou je ekologická nenáročnost a

odolnost. Lze využít od nížin až po horské pásmo, na všech půdách, dobře vyrovnává nedostatek i přebytek vláhy, lze pěstovat při slabé až střední zásobě živin. Zařazuje se do směsí pro luční a pastevní využití, pro technické využití do trávníků rekreačního typu, parkových a hřištích ploch. Vhodné je i využití v protierozních opatřeních a komunikačních porostech [TAGRO 1999].

Nejprve byly provedeny agrochemické analýzy půdy před založením pokusu (anorganické i organické) a zjištěno geologické podloží. Pozemek byl typickým reprezentantem obvyklých půdních podmínek u trvalých travních porostů - hlinitopísčité, kyselá kambizem na rulovém podkladě s pH 5,15 (CaCl₂); (5,23 KCl), RVK 134. Jelikož se jedná o pozemky, které obhospodařuje šlechtitelská stanice s pravidelným zásobním hnojením P a K, byly hodnoty těchto makroprvků nadstandardní. Hodnota Mg byla nižší, než doporučuje metodika hnojení [FIALA a kol. 2007] avšak jelikož poměr K : Mg byl 3,256 (což je cca hraniční hodnota pro úpravu hnojení K a Mg), nehnojili jsme tedy Mg. Vápnění pozemku nebylo potřeba, jelikož úprava se doporučuje až při poklesu pH pod 5,0 [FIALA a kol. 2007].

Využití biologického potenciálu travních porostů je rozhodující mírou ovlivněno úrovní výživy rostlin. Stejně jako u jiných plodin musíme dodržovat zásadu, že množství odčerpaných živin z půdy porostem v dané lokalitě budeme na příslušné stanoviště ve stejném množství a pravidelně navracet [VESELÁ, MRKVIČKA, ŠTĚPÁNEK 2005].

Dle výzkumu Cagaše se nejlépe obecně pro praxi osvědčila varianta s aplikací N v dávce 75 kg . ha⁻¹ v první dekádě října [CAGAŠ 2005]. Zvyšováním dávek N klesá jeho produkční účinnost, a to v závislosti na produkčním potenciálu půdy a průběhu meteorologických podmínek. Rovněž dle Fialy a kol. je neekonomické hnojit porost kostravy červené vyšší dávkou než 80 kg N . ha⁻¹ [FIALA a kol. 2007].

Společnost TAGRO Červený Dvůr, spol. s r. o. nemá živočišnou výrobu, a proto jsme hnojení prováděli pouze minerálními hnojivy.

Na základě všech teoretických poznatků a doporučení bylo velmi problematické rozhodnout se a stanovit, jak nastavit vhodnou úroveň hnojení N, P, K pro daný účel po celou dobu pokusu. Fiala a kol. uvádí vhodné nastavení úrovně hnojení jednotlivými prvky s ohledem na místní soubor faktorů a využití porostu. My jsme potřebovali nastavit dávky N dostatečně rozdílné, abychom mohli sledovat dopad těchto rozdílů výživy na sledované ukazatele, avšak zvolili jsme dávky, které by bylo v praxi možné

realizovat (nemělo smysl např. zvolit $\frac{1}{2}$ - dávku N např. $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ a plnou dávku $300 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Proto jsme zvolili: varianta A zůstala po celou dobu pokusu nehnojena N, P, K – jako kontrola.; stanovili jsme $70 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N jako poloviční dávku (varianta B) a $140 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N jako plnou dávku N (varianta C). (Varianta C je v praxi již dosti extrémní a nereálná, ale pokusy zkoumající vlivy hnojení N stupňovali dávky až do výše $300 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N viz [FIALA a kol. 2007].

Hodnoty dusíku v půdě se stále mění, a proto jsme uvedenou dávku vždy přidali ke stávajícímu stavu. Jde o pokusné účely; samozřejmě by v praxi tyto dávky nevyhovovaly současným limitujícím nitratovým směrnícím viz [FIALA a kol. 2007]. Navíc jsme aplikovali každoročně $40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ P a $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ K (na variantách B a C). Při volbě dávek jsme vycházeli z průměrů a doporučení metodiky hnojení trvalých travních porostů [FIALA a kol. 2007, TAGRO 1999].

Pro ověření, v jaké míře byl dodaný dusík přijat rostlinami, byly v prvních dvou letech pokusu odebrány vzorky nadzemních částí rostlin (homogenizované vzorky z jednotlivých variant A, B, C) vždy v prvním týdnu v květnu daného roku (kdy rostlina obsahuje maximum přijatého dusíku). Výsledky prokázaly (dle obecně známých předpokladů), že zvyšování dávek N se přímo úměrně promítlo do obsahu N v nadzemních částech rostlin v daném období.

Ochranná opatření proti abiotickému stresu vyvolanému nedostatkem vody a vysokými teplotami vzduchu jsou problematická. Z těch nepřímých, které mohou dopad vnějších podmínek zmírnit, lze jmenovat umístění trav na semeno na pozemky s hlubšími půdami, které jsou dobře zásobeny dusíkem. Pokud se jedná o podsevy, lze hovořit také pouze o nepřímých, podpůrných zásazích, jako např. důsledné odstranění zbytků krycí plodiny, přihnojení, osečení porostů a odstranění plevelů. Ochranu proti abiotickému stresu lze zajistit výběrem vhodné odolné odrůdy. Druhou možností je včasná chemická ochrana pomocí vhodného fungicidu. V současnosti však u nás registrován žádný fungicid do trav proti rzím. Z výsledků výzkumu v zahraničí i praxe u nás, je známa velmi dobrá účinnost strobilurinů vůči rzím [CAGAŠ 2006].

V našem případě jsme vyseli kostřavu červenou jako čistosev (bez krycí plodiny) a byla vybrána vhodná plastická odrůda. Uspořádání pokusu bylo v souladu s Metodikou ÚKZÚZ [BENEŠ a kol. 1982]. V pěstitelské praxi se mnohdy patogenním činitelům (a chorobám, které vyvolávají), věnuje menší pozornost s odůvodněním, že ekonomický dopad není příliš výrazný. Samozřejmě, že při různém způsobu využívání

(pícní porosty, porosty semenné, počet sečí, apod.) jejich důležitost kolísá [NEDĚLNÍK, POKORNÝ 2006]. Fungicidní ochranu nebylo možno aplikovat z důvodů sběru pylu a následných analýz, kde je chemické ošetření výslovně zakázáno [EMEA 2008].

Sebraný pyl v jednotlivých letech (2010, 2011, 2012) byl vždy max. do 2 hodin převezen v termoboxu přepraven do laboratoře BONAPOL a.s. Po vysušení na topných deskách byl vyčištěn a uskladněn ve speciálních vialkách dle metodiky. Následně byly vzorky pylů rozděleny na cca dvě poloviny – pro rozborů chemické a alergologické (biologické). V roce 2012 (3. roce pokusu) se podařilo získat pouze velmi malé množství pylu, takže by po rozdělení nebylo možné již oba typy rozborů provést; proto jsme použili vzorky vyčištěného pylu pouze na rozborů alergologické (což byl původní záměr práce), pro ověření výsledků předchozích dvou let (hmotnost 1 vzorku by byla poklesla i na 0,25 g). Ve vyčištěném pylu se objevovaly příměsi cizího pylu (z 95% pyl borovice) neboť nedaleko od pokusného stanoviště se nachází les s velkým zastoupení borovic, které uvolňují pyl ve shodnou dobu jako kostřava červená (avšak mají jinou velikost a jdou snadno separovat).

Velikost většiny všech pylových zrn se pohybuje od 15 do 200 μm . Forma, velikost a struktura exinů jsou hlavními identifikačními znaky pro jednotlivé druhy pylů [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004]. Na Novém Zélandu proběhl např. výzkum, sledující velikost pylových zrn *Chionochloa pallens* (z čeledi lipnicovitých; v Evropě se nevyskytuje) již v roce 1989, v různých nadmořských výškách (1070 a 1620 m. n.). Byly zjištěny rozdíly ve velikosti pylových zrn v průměru 21% a množství jejich produkce vzhledem k rozdílnému stanovišti až 76% [MC KONE, M. J. 1990]. Zkoumat však v poloprovozním pokusu produkci pylových zrn je zavádějící a dle mého názoru zcela nerelevantní, jelikož spousta hydroskopických pylových zrn není možno zachytit sběrem; jsou degradována dopadem na vlhkou půdu, listy apod. nebo odnesena větrem. Proto jsme po celou dobu pokusu analyzovali pouze vzorky pylu, který byl sebrán vždy 3. den kvetení rostlin (v době kulminace kvetení) ve třech po sobě jdoucích letech. (Celkový výnos pylu nebyl předmětem výzkumu).

Během tří let vedení pokusu bylo potvrzeno, že pylová zrna jsou žluté barvy, hladká, kulatého tvaru, měří v průměru 36,4 μm (s rozpětím hodnot 33,8 – 37,1 μm). Rozdíly mezi variantami a ročníky nebyly zjištěny. V průměru byla pylová zrna v pokusu větší než uváděná velikost průměrná velikost 35 μm [MARTÍNKOVÁ, HONĚK 2004].

V rámci chemických analýz byl vyhodnocen vliv různé úrovně hnojení dusíkem na změny chemické skladby pylového zrna. Tyto chemické analýzy extraktů pylu jsme zaměřili na sledování obsahu zejména fenolických látek. V rostlinách bylo identifikováno několik tisíc fenolických látek s ohromnou rozmanitostí struktur. Společným rysem je, že obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Mnohé z těchto látek jsou zastoupeny v běžných potravinách (zejména ovoci, zelenině, některých nápojích). Celkový denní příjem polyfenolů byl odhadnut na 1 g a je vyšší než příjem antioxidantních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidantní aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidantních vitaminů. Fenolické látky přijímané ve výživě člověka lze rozdělit do tří skupin: na fenolické kyseliny, flavonoidy a skupinu stilbenů a lignanů (která je méně častá) [TRNA, TÁBORSKÁ 2012].

Ze vzorků vyčištěného pylu byly připraveny extrakty 70% MeOH viz metodiky - kapitola č. 4.6.1; extrakty byly analyzovány chromatografickými metodami. Fenolické sloučeniny byly detekovány při 220 nm a koncentrace vybraných látek byla vypočtena z kalibračních křivek. Výsledkem bylo zjištění 8 významných detekovaných látek, které se vyskytovaly ve všech vzorcích extraktů pylu v obou letech 2010 a 2011 (esenciální AMK tryptofan a 7 fenolických látek). Látky byly identifikovány na základě retenčního času na HPLC a DAD spekter (v porovnání se standardy: tryptofan, kemferol, kávová kyselina) a MS dat (na základě literárních dat). Fragmenty m/z 162 a 146 jsou typické pro fragmentaci glykosidů.

Lze konstatovat, že obsah jednotlivých fenolických látek v extraktu nebyl významně ovlivněn úrovní výživy dusíkem ($P_{0,05}$), rozdíly mezi ročníky (2010, 2011) nebyly rovněž zjištěny ($P_{0,05}$), pokud posuzujeme každou z fenolických látek zvlášť.

Zjistili jsme však, že s úrovní různých dávek hnojení dusíkem stoupá obsah tryptofanu v pylovém zrně. Protože lze předpokládat, že obsahy jednotlivých (osmi sledovaných) látek jsou navzájem korelované náhodné veličiny, podařilo se nám během roku 2010 a 2011 statisticky prokázat, že různé dávky hnojení dusíkem ovlivňují složení pylu. S využitím dílčích analýz jsme zjistili, že signifikantní rozdíl je způsoben první látkou - tryptofan (dle Roy's statistic $P_{0,016}$, resp. $P_{0,011}$).

Zatímco v pylu jsou obsahy samotných fenolických látek pozoruhodně stabilní, ve vegetační hmotě kostravy červené podléhají značnému kolísání podle růstové fáze, úrovně výživy rostlin atd. Např. dle Štěrbová et al. (2004) byly v rostlině kostravy červené identifikovány následující fenolické kyseliny: protokatechová, *p*-

hydroxybenzoová, chlorogenová, vanillová, kávová, *p*-kumarová, ferulová a rosmarinová; dále *p*-hydroxybenzaldehyd a vanillin. V rostlině košťavy červené byly dále popsány kyanidiny, peonidiny a delfinidiny [FOSSSEN a kol. 2002].

Obecně, obsahy látek v generativní části rostliny vlivem exo- a endogenních činitelů kolísají zřetelně méně, než v částech vegetativních, zvláště v době plné zralosti obilek, neboť jsou biologicky konečným produktem rostliny a jejich biologický vývoj je ukončen [MÍKA a kol. 2002]. Pyl vlastně nese rovněž znaky ukončeného cyklu v rámci svého biologického poslání.

Dále byl vyhodnocen vliv různé úrovně hnojení N na biologickou (alergenní) aktivitu pylových extraktů *in vitro*; poté byl zjišťován proteinový profil a kvantitativně stanovena přítomnost hlavních alergenů ve srovnání s vnitropodnikovým (studijním) standardem SEVAPHARMA a.s..

Ze vzorků vyčištěného pylu byly připraveny extrakty a dále provedeny následné analýzy viz metodiky - nejprve byla zjišťována celková biologická aktivita (alergenní) *in vitro* pomocí inhibičního ELISA testu a poté byl zjišťován proteinový profil pomocí SDS – PAGE (elektroforeza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného - SDS) a pomocí imunoblottingu byla kvantitativně stanovena přítomnost hlavních alergenů.

Pomocí inhibičního ELISA testu *in vitro* jsme zkoumali odhadovanou biologickou aktivitu zkoumaných vzorků (extraktů pylu) pomocí vazby specifického IgE neinkubovaného se zkoumaným alergenem v koncentrační řadě, na alergen pevně vázaný na podklad. Koncentrace specifického IgE byla detekována pomocí anti – IgE protilátky značené enzymem (křenovou peroxidázou) a jeho následnou reakcí s chromogenním substrátem. Intenzita zbarvení byla přímo úměrná koncentraci alergenových epitopů. Hodnoty reprezentují absorbanci při 450 nm. Test byl vyhodnocen ELISA readrem. Hodnoty průměrů (z tripletů stanovení) tvoří sigmoidu. Porovnáním vzájemné polohy inflexních bodů křivek (resp. jejich průmětu do osy x (konc. alergenu)) s inflexním bodem standardu bylo získáno porovnání celkové biologické (alergenní) aktivity jednotlivých vzorků (reprezentovaných průměrem).

Jelikož se jedná o průměry z průměrů nelze na tyto rozborů použít obvyklé statistické metody. Přístroj je vybaven softwarem, který určí shodu ($P_{0,05}$) zkoumaného vzorku se standardem. V našem pokusu byly všechny zkoumané vzorky vyhodnoceny jako jednoznačně vyhovující, tj. ve shodě s firemním – studijním standardem.

Vzhledem k velmi malým množství vzorků pylu nebylo možno provést analýzy

PNU (koncentrace proteinového dusíku); na základě tohoto lze pouze odhadovat biologickou aktivitu vzorků (BA) z polohy inflexních bodů (za předpokladu standardní extrakce).

Pomocí SDS – PAGE (elektroforeza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného - SDS) jsme zjišťovali proteinový profil a pomocí imunoblottingu byla kvantitativně stanovena přítomnost hlavních alergenů. SDS vázaný na proteiny unifikuje jejich náboj tak, že výsledná pohyblivost proteinů závisí pouze na velikosti jejich molekuly. Vyhodnocení se děje porovnáním elektroforeogramů extraktu vzorku a standardu (resp. standardu molekulových hmotností). Pro zhodnocení se provede porovnání elektroforeogramů extraktu vzorku a standardu. Pomocí imunoblottingu byla kvantitativně stanovena přítomnost hlavních alergenů. Důležité hodnoty mw jsou cca 17 kDa, cca 30 kDa a cca 70 kDa (kde se nacházejí majoritní alergeny).

V našem pokusu byly všechny zkoumané vzorky vyhodnoceny jako jednoznačně vyhovující – ve shodě s firemním (studijním) standardem. Různá úroveň hnojení N neovlivnila proteinový profil pylu – ani v rámci variant A, B, C ani v rámci různých ročníků 2010, 2011, 2012.

Výsledky alergologických analýz tedy prokázaly stejnou biologickou (alergenní) aktivitu, stejný proteinový profil včetně průkazné přítomnosti majoritních alergenů v oblasti molekulové hmotnosti Mv 17, 30 a 70 KDa. Rozdíly nebyly zjištěny ani mezi variantami hnojení A, B, C ($P_{0,05}$) ani mezi sklizňovými ročníky 2010, 2011, 2012 ($P_{0,05}$).

Semenářské porosty kostřavy červené (či jiné monokulturní porosty kostřavy červené) přispívají v době kvetení v daném regionu ke zvýšení alergického rizika. Různou úrovní hnojení porostu sice nebyla ovlivněna vlastní alergenicita pylu, ovšem vyšší dávky hnojení dusíkem vedou obecně ke zvýšení počtu lat a tím i produkce pylu [RONGLI a kol. 2010]. Např. jedna travní lata vyprodukuje až 5 mil. těchto zrn. K vyvolání alergické reakce je nutná určitá minimální koncentrace pylových zrn v ovzduší. Při silné expozici dochází k senzibilizaci snadněji. U silně přecitlivělých pacientů stačí k vyvolání potíží mnohdy jen 5 – 50 zrn . m⁻³ vzduchu [HRUBIŠKO, KVASNIČKA 1997]. Pokud se semenářský porost nachází navíc v oblasti silně znečištěného ovzduší a následně i půdy, přidává se navíc faktor vyšší koncentrace CO₂ , který ovlivňuje celkovou produkci pylu a zvyšuje obsah alergenicity pylových zrn [GHIANI a kol. 2012].

Jako doplňkové pozorování jsme zaznamenali výsledky sklizně semen. Porost obvykle využíváme semenářsky 2 užitkové roky. Výnos semen se pohybuje od 0,3 – 0,8 t . ha⁻¹ [TAGRO 1999].; v zahraničí mnohdy však až 1,0 t . ha⁻¹ [JANOVŠKY 1986], či dokonce 2,136 kg . ha⁻¹ [FAIREY 2008]. V našem pokusu jsme dosáhli výrazně vyššího semenářského výnosu, zejména v prvních dvou letech. Pokus jsme zachovali po dobu 3 let z důvodu možnosti opakování chemických a alergologických analýz. Sklizeň semene probíhala po 3 roky vedení pokusu (2010, 2011, 2012). Byla prováděna maloparcelkovým kombajnem OSEVAN. Vlhkost sklizených semen byla v průměru v roce: 2010 - 12,7%, 2011 – 13,4%, 2012 – 14,0%. Hektarový výnos se pohyboval (1. hodnota = bez sklizně pylu; 2. hodnota = po sklizni části pylu): v roce 2010: průměr varianty A - 2,592 (2,760) t . ha⁻¹, B – 2,736 (2,808) t . ha⁻¹, C – 2,716 (2,920) t . ha⁻¹; v roce 2011: průměr varianty A - 1,468 (1,670) t . ha⁻¹, B – 1,732 (1,868) t . ha⁻¹, C – 1,902 (1,980) t . ha⁻¹; v roce 2012: průměr varianty A - 1,210 (1,250) t . ha⁻¹, B – 1,264 (1,282) t . ha⁻¹, C – 1,298 (1,326) t . ha⁻¹.

Je patrné, že se semenářský výnos v jednotlivých letech (i v jednotlivých variantách) obecně meziročně snižuje (dle předpokladu); nejmarkantnější snížení výnosu je zřetelné zejména u 3. roku pokusu (2012), kdy semenářský výnos již ve všech variantách poklesl obecně na méně než cca ½ původních hodnot v 1. roce sklizně (2010). Jednoznačně se potvrdil obecně známý předpoklad, že se zvyšující se úroveň hnojení N se zvyšuje semenářský výnos, a to ve všech sklizňových ročnících (ve variantách bez sklizně pylu i ve variantách se sklizní pylu). Vždy byl výnos vyšší ve variantě B oproti A a C oproti B. Pokud jde o porovnání výnosu semene vždy ze shodné varianty ve stejném roce – pak vždy byl dosažen vyšší výnos z parcel, na nichž proběhla sklizeň části pylu. Je zřejmé, že vlivem sklizně pylu v době kulminace kvetení, dochází k lepšímu opylení rostlin vlivem zvýšeného pohybu vzduchu v okolí prašníků a uvolňovaných pylových zrn v době sběru pylu; tím i následnému zvýšení semenářského výnosu.

Pěstitelé se často obávají poškození porostu v důsledku sklizně pylu. Náš pokus dokázal, že naopak po šetrné sklizni části pylu došlo k lepšímu opylení porostu a tím vyššímu semenářskému výnosu.

Jak jsme zjistili, s různou úrovní hnojení dusíkem stoupá obsah tryptofanu v pylovém zrnu ($P_{0,016}$, resp. $P_{0,011}$), ne však jeho biologická (alergenní) aktivita ($P_{0,05}$). Tuto esenciální aminokyselinu (tryptofan) populace přijímá výhradně potravou (či vdechnutím). Domníváme se, že vdechování či konzumace produktů obsahujících pyl

(pylem kontaminovaných potravin a nápojů) se zvýšeným obsahem tryptofanu by mohly (jako jeden z mnoha faktorů) přispívat ke zvyšování koncentrace tryptofanu v krvi, a tím i k nižší účinnosti léčby alergické rýmy pacienta léčeného specifickou imunoterapií (SIT). Metabolismus tryptofanu se podílí na vzniku a průběhu alergické reakce, i když není dosud přesně známo, jakým mechanismem ke zvýšení koncentrace v krvi dochází [KOFLER a kol. 2012].

7 ZÁVĚR

V rámci výzkumu byl zkoumán vliv různé úrovně výživy travních porostů dusíkem na změny chemické skladby pylového zrna a na změny biologické (tj. jeho alergenicity). Kostřava červená byla vybrána pro pokus, jelikož roste na všech půdních druzích, a to i v subalpinském pásmu a vyskytuje se na evropském, asijském, americkém a africkém kontinentu a patří k nejvýznamnějším druhům polinózních trav v Evropě. Z ekologického hlediska je to naše nejskromnější tráva.

Pyl trav je současnými trendy chápán nejen jako zárodečná buňka sloužící k reprodukci druhu, ale i jako finální komerční produkt - jako surovina pro farmaceutický průmysl, kdy lze cíleně získat kvalitativně i kvantitativně lepší či horší surový materiál pro výrobu extraktů sloužících pro výrobu prick testů a následně léčiv.

V současné době je otázka pěstování travních porostů velice aktuální. Travních porostů se pěstuje stále více a více z různých důvodů. Např. v posledních letech silně poklesl stav mléčného skotu a naopak silně narostl význam chovu masných plemen, která jsou vázána na pastevní programy. Navíc, kromě běžných ploch, jsou tedy systematicky zakládány semenářské porosty trav pro výrobu certifikovaných osiv (ve větším rozsahu), která se používají následně pro zásev pastevních a lučních porostů.

Rovněž současné celosvětové zemědělství, zejména v marginálních oblastech (LFA), hledá nové a alternativní způsoby využití zemědělské produkce. Jedním z nich je i cílená produkce biomasy trav. V současnosti je výzkum energetických trav zaměřen na realizaci spalování travní biomasy v technických zařízeních a využití trav pro produkci bioplynu. Soudobým trendem je nejen výzkum ekonomického přínosu, ale i výzkum dopadu nových trendů na životní prostředí, krajinu a obyvatelstvo.

Během posledních dvou desetiletí stoupl výskyt alergií v některých civilizovaných státech na 30 – 40% populace. Již každý čtvrtý až pátý člověk trpí alergií.

Předmětem pokusu bylo zjištění vlivu tří úrovní hnojení dusíkem na porostu kostřavy červené (*Festuca rubra* ssp. *rubra* L.) - odrůda Tagera - na změny chemické skladby pylového zrna a na změnu jeho alergenicity (biologické změny). Extrakty vzorků pylu (70% MeOH) byly analyzovány pomocí chromatografických metod. Výsledkem bylo zjištění 8 významných detekovaných látek, které se vyskytovaly ve

všech vzorcích extraktů pylu v obou letech 2010 a 2011 (esenciální AMK tryptofan a 7 fenolických látek).

Úroveň N- a PK-hnojení ve třech po sobě jdoucích sklizňových ročních neměla významný vliv na velikost pylových zrn (průměr 36,4 μ m), na profil a obsah fenolických látek ($P_{0,05}$) ani na ukazatele alergické (biologické) aktivity ($P_{0,05}$). Významně byl ovlivněn pouze obsah tryptofanu (dle Roy's statistic $P_{0,016}$, resp. $P_{0,011}$).

Hnojení N sice neovlivnilo alergenicitu pylu ($P_{0,05}$), vede ale obecně ke zvýšení počtu lat a produkce pylu a tím ke zvýšení koncentrace pylových zrn ve vzduchu v době kvetení semenné kultury (monokultury) kostřavy červené v dané lokalitě a odtud i k možnému zvýšení rizika výskytu alergií u vnímavých osob. Tuto esenciální aminokyselinu (tryptofan) populace přijímá výhradně potravou (či vdechnutím).

Domníváme se, vdechování či konzumace produktů obsahujících pyl (pylem kontaminovaných potravin a nápojů) se zvýšeným obsahem tryptofanu by mohly (jako jeden z mnoha faktorů) přispívat ke zvyšování koncentrace tryptofanu v krvi, a tím i nižší účinnosti léčby alergické rýmy pacienta léčeného specifickou imunoterapií (SIT). Metabolismus tryptofanu se podílí na vzniku a průběhu alergické reakce, i když není dosud přesně známo, jakým mechanismem ke zvýšení koncentrace v krvi dochází.

Obecně jsou travní semenářské porosty umístěny ve vyšších polohách. V současné době se díky dotační politice využití trav v praxi rozmohlo a každoroční potřeba osiv stoupá.

Průmyslově vyspělé státy mají zpravidla i vyspělé zemědělství a to je dáno v podstatě využitím mechanizace, chemie, energie a vědeckých poznatků. A protože šlo v prvé řadě o ekonomiku, byla sice výsledkem vysoká produktivita práce, ale s více či méně negativním dopadem na přírodní zdroje a tím i potraviny a životní prostředí. Reakcí na tuto situaci jsou nyní snahy o trvale udržitelný rozvoj, respektive setrvalé zemědělství. Má-li tedy nadále být setrvalé zemědělství ekologicky únosné, a také ekonomicky přijatelné a rovněž sociálně spravedlivé i humánní, pak jedním ze způsobů dalšího vývoje bude ekologická intenzifikace.

Z poznatků výzkumu vyplývá, že semenářské porosty (či jiné zakládání monokulturní porosty) by neměli být obecně cíleně zakládány v okolí velkých konglomerací a zejména ne tam, kde je obvykle vysoké znečištění ovzduší. Samozřejmě praxe toto mnohdy nedovoluje; pro tyto případy je pak vhodné omezit dávky hnojení dusíkem na nižší úroveň, vzhledem k dopadu na zdraví obyvatelstva.

8 SUMMARY

The dissertation thesis examined the effect of various fertilisation rates on different levels of nitrogen nutrition of grassland which changes in the chemical composition of the pollen grain and the biological properties (allergenicity). Red fescue was chosen for the experiment because grows on all soil types, even in the subalpine zone and occurs on the European, Asian, American and African continent and is one of the most important species of allergenic grasses in Europe. From an ecological perspective, this is our modest grass.

Grass pollen is by a current trends, seen not only as a germ cell used for reproduction of the species, as well as the final commercial product - as a raw material for the pharmaceutical industry, which can be targeted to obtain qualitatively and quantitatively better or worse raw material for the production of extracts used for the production of skin prick tests and subsequently medicaments.

Currently question of grassland cultivation is very topical. Grasslands are grown more and more for various reasons. In recent years, strongly decreased states of dairy cattle and vice versa strongly increased the importance of livestock breeding, which are tied to the grazing programs. Moreover, in addition to common areas, there are systematically established grasses for certified seeds production (in greater extent), which is subsequently used for sowing pasture and grassland. Also, the current global agriculture, especially in marginal areas (LFA) is looking for new and alternative ways of using agricultural production. One of them is targeted production of biomass grasses. Currently, research is focused on energy grasses and implementation of grass biomass burning in technical plants and on grasses used for the production of biogas. Current trends are not only economic benefits of research, but also research on the impact the environment, landscape and population.

During the last two decades, the occurrence of allergies increased in some civilized countries to 30 - 40% of the population. Already every fourth to fifth person suffers from allergies.

The object of this study was to determine the effect of three levels of nitrogen fertilization on red fescue crop (*Festuca rubra ssp. rubra L.*), variety Tagera which change in the chemical composition of pollen grains and their allergenicity (biological changes). The pollen extract (70% methanol) was investigated for the tryptophan and

phenolic compounds content using chromatographic methods. As a minor compounds were detected substances with a similar spectrum of phenolics (flavonols, caffeic acid units). The level of N-and PK-fertilization in three consecutive crop years had no significant effect on the size of pollen grains (mean 36.4 μ m), the profile and content of phenolic compounds ($P_{0.05}$) or the allergic indicators (biological) activity ($P_{0.05}$). There was significantly affected only the content of tryptophan (according to Roy's statistic $P_{0.016}$, respectively $P_{0.011}$). Although fertilization did not affect the allergenicity of pollen ($P_{0.05}$), but generally leads to an increase in the number of lat and pollen production and thus increase the concentration of pollen in the air at the time of flowering red fescue seed culture in the area and from there to the possible increased risk of allergies in susceptible persons. This essential amino acid (tryptophan) is received by population only in food (or inhalation). We assume, that inhalation or consumption of products contained pollen (pollen contaminated food and beverages) with increased tryptophan could (as one of several factors) contribute to increasing the concentration of tryptophan in the blood, and thus lower effectiveness of the treatment of allergic rhinitis patients treated by specific immunotherapy (SIT). Metabolism of tryptophan is involved in the development and occurrence of allergic reactions, although it is not yet known exactly by which mechanism is increased the tryptophan concentration in the blood.

Generally, grass seed crops are located at higher altitudes. Nowadays, thanks to the use of grasses subsidy policy in practice prevailed, and the annual demand for seed is increasing.

Industrialized countries generally have well developed agriculture and it is basically due to the use of machinery, chemicals, energy and scientific knowledge. And since it was first the economy, there was indeed the result high labour productivity, but with a more or less negative impact on natural resources and thus the food and the environment. The response to this situation is now efforts to achieve sustainable development, or sustainable farming. If, therefore, sustainable agriculture should be environmentally acceptable and economically feasible and also socially just and humane, then one of the ways of further development will be ecological intensification.

The research findings show that seed stands (or other founded monocultural stands) should not generally be specifically established in the vicinity of large conglomerates and especially where there is usually high air pollution. Of course, this practice is often impossible, for these cases, it is appropriate to limit the dose of nitrogen fertilization on the lower level, given the impact on public health.

Keywords:

Festuca rubra ssp. *rubra* L.; grassland; seed cultures; nitrogen fertilisation; pollen grain; phenolic compounds; tryptophan; allergenicity; public health.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] AALBERSE, R. C.; KOSHTE, V.; CLEMENS, J. G. J. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen and hymenoptera venom. *Journal Allergy Clinical Immunology* 1981, 68, s. 356 – 364
- [2] AAMLID, T. S.; HEIDE, O. M.; CHRISTIE, B. R.; MC GROW, R. L. Reproductive development and the establishment of potential yield in grasses and legumes. Forage seed production. Vol. 1, Temperature species. U. K., Wallingford: CAB International, 1997, s. 9 – 44
- [3] ABERG, N. Birth season variation in asthma and allergic rhinitis. *Clinical Experimental Allergy*, 1989, 19, s. 643 – 648
- [4] AKDIS, C. A.; BLASER, K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 2000, 55 (6), s. 522 – 530
- [5] AKDIS, C. A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M. et al. Role of IL-10 in specific immunotherapy. *Journal Clinical Investigation*, 1998, 102, s. 98 – 106
- [6] AKDIS, C. A.; BLASER, K. IL-10 induced allergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB Journal*, 1999, 13, s. 603 – 609
- [7] ANDERSON, H. R.; BAILEY, P. A.; BLAND, J. The effect of birth month on asthma, eczema hayfever and respiratory symptoms, lung function and hospital admissions for asthma. *Int. Journal Epidemiologie*, 1981, 10, s. 45 – 51
- [8] BASCOM, R.; PIPKORN, U.; LICHTENSTEIN, L. M.; NACLEIRO, R. M. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. *Revue Respiration Disaster*, 1988, 138, s. 406 – 412

- [9] BJÖRKSTEN, F.; SUONIEMI, I. Dependence of immediate hypersensitivity on the month of birth. *Clinical Allergy*, 1976, 6, s. 165 – 171
- [10] BJÖRKSTEN, F.; SUONIEMI, I.; KOSKI, V. Neonatal birch pollen contact and subsequent allergy to birch pollen. *Clinical Allergy*, 1980, 10, s. 585 – 591
- [11] BENEŠ, F. a kol. Metodika SOZ – Polní plodiny. 1. vyd. Praha: Ministerstvo zemědělství a výživy pro ÚKZÚZ, 1982, 382 s.
- [12] BOELT, B.; STUDER, B. Breeding for grass seed yield. *Fodder Crops and Amenity Grasses. Handbook of Plant Breeding 5*, DOI 10.1007/978-1-4419-0760-8_11, Springer Sci+Business Media, 2010, s. 161 – 174
- [13] BOUSQUET, J.; LOCKEY, R. F.; MALLING, H. J. WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy*, 1998, 53 (44 Suppl.), s. 1 – 42
- [14] BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEY, N. et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 2001, 108 (5 Suppl.), s. 147 – 334
- [15] BUC, M. *Imunológia*. Bratislava: Veda, Vydavateľstvo SAV, 2001, 463 s.
- [16] BULUT, Y.; DEMIR, M. The allelopathic effects of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) leaf extracts on turf grass seed germination and seedling growth. *Indie, Ghaziabad: Asian Journal of Chemistry*, 2007, s. 3169 – 3177
- [17] BUREŠ, L.; HOCHOVÁ, B.; TESÁRKOVÁ, B. Standardizace alergenů. *Medicína*, 1999, 11/VI., s. 1 – 4
- [18] CAGAŠ, B. Inovace technologických postupů v travním semenářství. Informační systém výzkumu, vývoje a inovací. Závěrečná zpráva 2004. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2005, 5 s.

- [19] CAGAŠ, B.; FRYDRYCH, J. Informační systém výzkumu, vývoje a inovací - Inovace technologických postupů v travním semenářství. Praha: Mze – Národní agentura pro zemědělský výzkum, Závěrečná zpráva, 2005, 11 s.
- [20] CAGAŠ, B., MACHÁČ, J., MACHÁČ, R. Pěstování travních semen jako základ a nedílná součást pícninářství a trávnickářství. Zborník referátov z medzinárodnej konferencie „Produkčné, ekologické a krajnotvorné funkcie trávnych ekosystémov a krmných plodín“. Nitra, 2004, s. 166 – 170
- [21] CAGAŠ, B.; MACHÁČ, J.; ŠRÁMEK, P.; FOLTA, J.; TVRZ, V. Semenářství trav. Praha: SEVT Praha, 1989, 150 s., SEVT 98 231 0
- [22] CALDER, D. M. Inflorescence induction and initiation in the *Gramineae*. The growth of cereals and grasses. London: Butterworths, 1966, s. 59 – 73
- [23] CALKHOVEN, P. G.; AALBERS, M.; KOSHTE, V. L.; POS, O.; OEI, H. D.; AALBERSE, R. C. Cross reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross reactive structures. *Allergy*, 1967, 42, s. 382 – 390
- [24] CANONICA, G. W.; PASSALACQUA, G. Noninjection routes for immunotherapy. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 2003, 111, s. 437 – 448
- [25] COMTOIS, P. The experimental research of Charles H. Blackley. *Aerobiologia*, 1995, 11, s. 63– 68
- [26] CONNELL, J. T. Quantitative intranasal pollen challenge – effect of a daily pollen challenge, environmental pollen exposure and placebo challenge on the nasal membrane. *Journal Allergy*, 1968, 41, s. 123 – 13
- [27] CRETICOS, P. S. Allergic rhinitis. Asthma and rhinitis. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Science, 1995, s. 1394 – 1414

- [28] DE GROOT, A. P. Protein and amino acid requirements of honey bee (*Apis mellifera*). *Physiologia Comparata et d'Ecologia*, 1953, 3, s. 197 – 285
- [29] DEVALIA, J. L.; BAVRAM, H.; RUSZNAK, C. et al. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy*, 1997, 52 (38 Suppl.), s. 45 – 51
- [30] DIAZ-SANCHEZ, D.; DOTSON, A. R.; TAKENAKA, H.; SAXON, A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *Journal Clinical Investigation* 94, 1994, s. 1417 – 1425
- [31] DIETHAR, B.; SAM, S.; WEBER, M. Walls of allergenic pollen: Special reference to the endexine. Oslo: Taylor & Francis AS, 2007, s. 164 – 175, ISSN: 0017-3134
- [32] EKOFF, M. et al. Anti-apoptotic bfl-1 is the major effector in a activation-induced human mast cell survival. *PLoS One*, 2012, 7 (6), 39117 s.
- [33] EMEA Guideline on alergen products: Production and quality issues. European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London, 2008, 86 s.
- [34] ESCH, R. E., Grass pollen allergens. *Allergens and Alergen Immunotherapy*, N. York: Aarcel Dekker, 1999, s. 103 – 120
- [35] FAEGRI, K.; IVERSEN, J. Textbook of pollen analysis. 4th ed., Chichester: John Wiley & Sons, 1989, 328 s.
- [36] FAIREY, NA. Effects of water and nitrogen on seed production of creeping red fescue. *Canadian journal of plant science*, 5/2008, 88 (3), s. 439 – 446, ISSN 0008 – 4220

- [37] FAIREY, NA.; LEFKOVITCH, LP. Effect of method and time of application of nitrogen fertiliser on yield and quality of seed of creeping red fescue. Canada, Ottawa: AGR INST Canada, 2000, s. 809 – 811
- [38] FAIERAJZLOVÁ, V.; ŠVANDOVÁ, E. Alergická onemocnění v dětské populaci monitorovaných měst. Zdraví a životní prostředí. 2. konference Systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí. Sborník referátů. Milovy, 27. – 29. května 1997, Praha: SZÚ, 1997, s. 124 – 135
- [39] FERENČÍK, M.; ROVENSKÝ, J.; MAŤHA, V. Dictionary of Immunology, Second Edition. Bratislava: Slovak Academic Press, 2002, 313 s.
- [40] FIALA, J.; KOUHOUTEK, A.; KLÍR, J. Výživa a hnojení travních a jetelovino-travních porostů. Metodika pro praxi. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2007, s. 7 – 14, ISBN 978 – 80 – 870011 – 25 – 6
- [41] FICHTER, K.; SCHULZE, E. D. The effect of nitrogen nutrition on growth and biomass partitioning of Annual plants originating from habitats of different nitrogen availability. Bonn: Institute für Pflanzenbau., Oecologia, 1992, 92, s. 236 – 241
- [42] FOSSEN, T.; SLIMESTAD, R.; ØVYSTEDAL, D. O.; ANDERSEN, Ø. M. Anthocyanins of grasses. Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30, s. 855 – 864
- [43] FRANKLAND, A. W. Aerobiology in Medicine. Grana, 1991, 30, s. 19 – 23
- [44] FREW, A. J. Immunotherapy of allergic disease. Journal Allergy Clinical Immunology, 2003, 111, s. 712 – 719
- [45] FUČÍKOVÁ, T. Základy klinické imunologie. RDI PRESS, Praha, 1994 s. 209

- [46] FRYDRYCH, J.; ANDERT, D.; KÁRA, J.; JUCHELKOVÁ, D. Trávy jako obnovitelný zdroj energie. *Úroda*, 2005, 11, s. 37 – 39
- [47] FRYDRYCH, J.; ANDERT, D.; KÁRA, J.; JUCHELKOVÁ, D. Nové poznatky ve výzkumu energetických trav. *Úroda*, 2006, 12, s. 31-33
- [48] FRYDRYCH, J.; ANDERT, D.; JUCHELKOVÁ, D. Výzkum energetických trav. Sborník přednášek technika a biomasa 4/2006. Praha, 2006, s. 33 – 35, ISBN 80 – 86884 – 15 –5
- [49] GÁBORČÍK, Š. Trávy naše každodenné. B. Bystrica: Horizont, s.r.o., č.t. 88/742 540, 1988, s. 1 – 118, ISBN 80-967940-0-0
- [50] GALKA, A.; ZARZYCKI, J.; KOPEC, M. Effect of different fertilisation regimes on species composition and habitat in a long-term grassland experiment. Integrating Efficient Grassland Fading and Biodiversity. *Grassland science in Europe*, 2005, 10, s. 132 – 135, ISBN 9985 – 9611 – 3 – 7
- [51] GERRARD, J.; VICKERS, P.; GERRARD, C. The familial incidence of allergic disease. *Annual Allergy*, 1976, 36, s. 10 – 15
- [52] GHIANI, A. et. al. Ragweed pollen collected along high-traffic roads shows a higher allergenicity than pollen sampled in vegetated areas. *Allergy*, 2012 May 14, doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02846.x. (Epub ahead of print)
- [53] GILSUM, R.; BOELT, B. Validity of accessible critical nitrogen dilution curves in perennial ryegrass for seed production. Denmark: Field crop Research, 2009, 111, s. 152 – 156
- [54] HEIDE, O. M. Control of flowering and reproduction in temperate grasses. *New Phytologist*, 1994, 112, s. 347 – 362

- [55] ERBERT, W.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of beecollected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 1978, 9, s. 33 – 40
- [56] HOCHOVÁ, B. Stanovisko k článku specifická alergenová imunoterapie v časopise *Alergie*, 2002, 4, s. 319 – 322
- [57] HOCHOVÁ, B. Specifická alergenová imunoterapie. *Alergie*, 2003, 4, s. 319 – 322
- [58] HOUBA, M., HOSNEDL, V. *Osivo & sadba*. 1. vyd. Praha: Martin Sedláček, 2002, 186 s., ISBN 80-902413-6-0
- [59] HRABĚ, F. a kol. *Trávy a travníky – co o nich ještě nevíte*. 1. vyd. Olomouc: Ing. Petr Baštan – Hanácká reklamní, 2003, 158 s., ISBN 80-903275-0-8
- [60] HRABĚ, F. a kol. *Trávy a jetelovino trávy v zemědělské praxi*. 1. vyd. Olomouc: Ing. Petr Baštan, 2004, 121 s., ISBN 80-903275-1-6
- [61] HRABINA, M.; PELTRE, G.; VANREE, R.; MOINGEON, P. Grass pollen allergens. *Clinical and Experimental Allergy Reviews*, 2008, 8, s. 8 – 11
- [62] HRUBIŠKO, M. a kol. *Alergológia*. Osvěta, Martin, 2003, 518 s., ISBN 80-8063-110-7
- [63] HRUBIŠKO, M.; KVASNIČKA, P. *Polinóza – aktuálny problém aj v XXI. storočí. časť I.: príčiny, klinické prejavy, súbor vyšetrených pacientov a metódy spracovania*. *Klinická imunológia a alergológia*, 1997, 1, s. 5 – 10
- [64] IGER ANNUAL REPORT. Institute of Grassland & Environmental Reserch. Aberystwyth: Cambrian Printers, No. 1995/96, 39 s., ISSN 0961 – 6071

- [65] ILIOPOULOS, O.; PROUD, D.; ADKINSON, Jr. N. F, et al. Relationship between the early, late and rechallenge reaction to nasal challenge with antigen: observations on the role of inflammatory mediators and cells. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 1990, 86, s. 851 – 861
- [66] International Rhinitis Management Working Group. International Consensus report on the diagnosis and management of rhinitis. *Allergy*, 1994, 49 (19 Suppl.), s. 5 – 34
- [67] JANOVSZKY, J. Red fescue grass. Gras species cultivated in Szarvas (Hungary). Szarvas: Research institute for irrigation, 1986, 48 s.
- [68] JOHNSTONE, D. E.; DUTTON, A. The value of hyposensitization therapy for bronchial asthma in children – a 14 year study. *Pediatrics*, 1968, 42, s. 793 – 802
- [69] KALINER, M. K.; LEMANSKI, R. Rhinitis and asthma. *JAMA*, 1992, 268, s. 2807 – 2829
- [70] KÄPYLÄ, M. Diurnal variation of tree pollen in the air in Finland. *Grana*, 1984, 23, s. 167 – 176
- [71] KOČÍ, T. Alergenová imunoterapie včera, dnes a zítra. *Medical Tribune*, 2010, 23, s. 1 – 2
- [72] KOBES, M. Výběžkaté trávy – biologie, ekologie, uplatnění. Č. Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Studijní materiály, 2009, s. 1 - 2
- [73] KOBES, M. Biologie a ekologie trav. Produkční a mimoprodukční uplatnění trav. Využití trav při bioindikaci vodního a výživného režimu. Č. Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Studijní materiály, 2009, 6 s.

- [74] KOFLER, H. et al. Specific Immunotherapy Normalizes Tryptophan Concentrations in Patients with Allergic Rhinitis. *Arch Allergy Immunology*, 2012, 159 (4), s. 416 – 421
- [75] MC KONE, M, J. Characteristic of pollen production in a population of New Zealand snow – tussock grass (*Chionochloa pallens* Zotov). *New Phytology*, 1990, 116, s. 555 - 562
- [76] KRATĚNOVÁ, J. Alergická onemocnění v dětské populaci v ČR v roce 2001. Prevalenční průřezová studie. *Alergie*, 2003, 5 (Suppl. 2), s. 8 – 10
- [77] LANGER, R. H. M. *How grasses grow*. London: Edward Arnold Publishers, 1972, 60 s.
- [78] LI, J. T.; LOCKEY, R. F.; BRENSTEIN, I. L.; PORTNOY, J. M.; NICKLAS, R. A. Allergen immunotherapy: a practice parameter. *Annual Allergy Asthma Immunology*, 2003, 90, s. 1 – 40
- [79] MAROUŠEK, J. Two-fraction anaerobic fermentation of grass waste. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 2013, 93 (10), s. 2410 – 2414
- [80] MARSH, D. G.; MEYERS, D. A.; BIAS, W. B. The epidemiology and genetics of atopic allergy. *New England Journal Medicine*, 1981, 305, s. 1551 – 1559
- [81] MARTÍNKOVÁ, Z.; HONĚK, A. Přehled a výskyt významných alergenních rostlinných druhů pro člověka. Praha: VÚRV, Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí, 2004, s. 1 –2
- [82] MC MILLAN, R. M. Leukotrienes in respiratory disease. *Paediatric Respiration*, 2001, Revue 2 (3), s. 238 – 244
- [83] MÍKA, V.; GAISLER, J.; KALAČ, P.; KLEJDUS, B.; KOHOUTEK, A.; KOMÁREK, P.; KUBÁŇ, V.; ODSTRČILOVÁ, V.; POZDÍŠEK, J. Fenolické

látky v lučních rostlinách. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 2001, 76 s., ISBN 80-86555-07-0

- [84] MÍKA, V. a kol. Morfogeneze trav. 1. vyd. Praha: VÚRV, 2002, 200 s., ISBN 80-86555-20-8
- [85] MONTGOMERY SMIT, J. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis (eczema). *Allergy: Principles and Practice*. St. Louis: CV Mosby, 1988, s. 891 – 929
- [86] von MUTIUS, E.; MARTINEZ, F. D.; FRITZSCH, C.; NICOLAI, T.; ROELL, G.; THIEMANN, H. H. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Journal Respiration Critical Care Medicine*, 1994, 149, s. 358 – 364
- [87] von MUTIUS, E.; SHERILL, D. L.; FRITZSCHG, C.; MARTINEZ, F. D.; LEBOWITZ, M. D. Air pollution and upper respiratory symptoms in children from East Germany. *Europe Respiration Journal*, 1995, 8, s. 723 – 728
- [88] MYGIND, N. Diseases. *Allergy Manual*. UCB Pharmaceutical Sector, Brussels, 1992, s. 70 – 76
- [89] NACLEIRO, R. M. Allergic rhinitis. *New England Journal Medicine*, 1991, 325, s. 860 – 869
- [90] NACLEIRO, R. M.; NORMAN, P. S.; FISH, J. E. In vivo methods for study of allergy: mucosal tests, techniques, and interpretation. *Allergy: Principles and Practice*. St. Louis: CV Mosby, 1988, s. 437 – 460
- [91] NEDĚLNÍK, J., POKORNÝ, R. Choroby plicních jetelovin. *Agro*, 2006, 6, s. 24 – 26
- [92] NEGRINI, A. C. Pollens as allergens. *Aerobiologia*, 1992, 8, s. 9 – 15

- [93] NOON, L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*, 1911, 1, s. 1572 – 1573
- [94] NYULASSY, Š. *Klinická imunológia a alergológia pre prax*, Bratislava: Herba, s.r.o., 2002, 142 s.
- [95] PEARSON, D.; FREED, D.; TAYLOR, G. Respiratory allergy and month of birth. *Clinical Allergy*, 1977, 7, s. 29 – 33
- [96] PEDERSEN, P. A.; WEEKE, E. R. Allergic rhinitis in Danish general practice. *Allergy*, 1981, 36, s. 375 – 379
- [97] POLLENINFO. How is pollen grain constructed. Mezinárodní portál pylové služby, 2009, [cit. 2009-08-05]. Dostupný z:
<http://www.polleninfo.org/index.php?language=en&nav=n7&module=article&action=first_page&id=1249&id_parent=1243>
- [98] REGAL, V. *Pícní a plevelné trávy*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1953, s. 1 – 290, SZN č. 154
- [99] ROGERS, R. W. The effect of *Festuca rubra* on size, leaf demography and reproductive capacity of *Vulva Fasciculata*. St. Lucia: School of Plant Biology, University College of North Wales. St. Lucia, *The new Phytologist*, 1980, 86, s. 229 – 236
- [100] RONGLI, O. A.; SAHA, M. C.; BHAMIDIMARRI, S.; HEIJDEN, S. VAN DER. *Fescues. Fodder Crops and Amenity Grasses. Handbook of Plant Breeding 5*, Springer Sci+Business Media, 2010, s. 261 – 292, DOI 10.1007/978-1-4419-0760-8_11
- [101] RYBNÍČEK, O. Pylová alergie – současné možnosti léčby. *Remedia*, 1998, 8 (4), s. 206–218

- [102] RYBNÍČEK, O. Pylová alergie. *Remedia*, 2004, 14, s. 56 – 68
- [103] SEBEROVÁ, E. Specifická imunoterapie v léčbě bronchiálního astmatu (SIT). *Bronchiální astma. Principy sledování a léčby*. Praha: Astra 1994, s. 114 – 119
- [104] SIBBALD, B.; STRACHAN, D. P. *Epidemiology of rhinitis. Asthma and rhinitis*. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Science, 1995, s. 32 – 43
- [105] SOLOMON, W. R.; MATHEWS, K. P. *Aerobiology and inhalant allergens. Allergy: Principles and Practice*. St. Louis: CV Mosby, 1988, s. 312 – 372
- [106] SPIEKSMAN, F. T.; NIKKELS, B. H.; DIJKMAN, J. H. Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clinical Experimental Allergy*, 1995, 25, s. 234 – 239
- [107] STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. *British Medicine Journal*, 1989, 299, s. 1259 – 1260
- [108] STRACHAN, D. P. Family size, infection and atopy: The first decade of the “hygiene hypothesis“. *Thorax*, 2000, 55 (Suppl 1), s. 2 – 10
- [109] SYSTÉM MONITOROVÁNÍ ZDRAVOTNÍHO STAVU OBYVATELSTVA VE VZTAHU K ŽIVOTNÍMU PROSTŘEDÍ. Pylová informační služba (PIS), Národní portál pylové služby, 2009, [cit. 2009-08-05]. Dostupný z: <http://www.zupu.cz/index.php?pid=31>
- [110] ŠANTRŮČEK, J. *Picinářství – povolené odrůdy*. Praha: Vysoká škola zemědělská Praha, Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1993, s. 1 – 121, ISBN 80-2123-0148-1
- [111] ŠAŠKOVÁ, D., ŠTOLFA, V. *Trávy a obilí*. 1. vyd. Praha: Artia a.s. a Granit s.r.o., 1993, 64 s., ISBN 80-85805-03-0

- [112] ŠLECHTITELSKÁ STANICE HLADKÉ ŽIVOTICE Kostřava červená. Firemní materiál., Životice, 2004, 1 s.
- [113] ŠPIČÁK, V. Poselství Josefa Lišky a Specifická alergenová imunoterapie (SAIT) – přednáška. Praha: Universita Karlova, IPVZ – Subkatedra alergologie a klinické imunologie, 2003, 6 s.
- [114] ŠPIČÁK, V. Astma a pylová alergie. Praktický Lékař 74, 1994, s. 203 – 204
- [115] ŠPIČÁK, V. Poselství Josefa Lišky a Specifická alergenová imunoterapie (SAIT) – přednáška. Praha: Universita Karlova, IPVZ – Subkatedra alergologie a klinické imunologie, 2003, 6 s.
- [116] ŠPIČÁK, V.; HRUBIŠKO, M. Alergie. Praha: Institut UCB pro alergii, 2005, 64 s.
- [117] ŠRÁMEK, P.; TVRZ, V. Pícninářské a semenářské využití nových odrůd trav - Metodiky pro zavádění výsledků výzkumu do zemědělské praxe, 6/1990. Praha: Mze ČR – Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství., 1990, s. 10 – 11, ISSN 0231 – 9470
- [118] ŠTĚRBOVÁ, D.; MATĚJÍČEK, D.; VLČEK, J.; KUBÁŇ, V. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 53, s. 435 - 444
- [119] TAGRO Červený Dvůr, s.r.o. Kostřava červená výběžkatá TAGERA. Firemní materiál., Tábor, 1999, 2 s.
- [120] TAYLOR, B.; WADSWORTH, J.; GOLDING, J.; BUTLER, N. Breast feeding, eczema, asthma and hayfever. *Journal Epidemiology, Community Health*, 1983, 37, s. 95 – 99

- [121] THOMMEN, A. A. Hay Fever. Asthma and hay fever. Springfield: Thomas, 1931; 111 s.
- [122] TOMEK, J. Pollen cleaning method and a device applying this method. Inventor: Tomek, J. Int. Cl.: B01D 36/00, B01D 36/04, B07B 7/06. World Intellectual Property Organization, WO 2004/004866 A1, vydáno 2004, 11 s.
- [123] TOMEK, J. Způsob čištění pylu a zařízení k provádění tohoto způsobu. Inventor: Tomek, J. Int. Cl.: B01D 36/04, B01D 36/00, B01D 45/16, B07B 7/04, B07B 7/086, B07B 7/10. Česká republika, CZ 296898 B6, vydáno 2006, 5 s.
- [124] TOMEK, J. Způsob čištění pylu a zařízení k provádění tohoto způsobu. Inventor: Tomek, J. Int. Cl.: B07B 7/06, B01D 36/00, B01D 36/04. Česká republika, CZ 297625 B6, vydáno 2007, 7 s.
- [125] TRNA, J.; TÁBORSKÁ, E. Přírodní polyfenolové antioxidanty. Skripta Lékařská chemie, 1. roč., 1. část., 2003, 96 s.
- [126] TROISE, C.; VOLTOLINI, S.; DELBONO, G.; EBBI, A.; NEGRINI, A. C. Allergy to Parietaria pollen and month of birth. Allergologie Immunopathology, 1989, 17, s. 201 – 204
- [127] VALENTA, R.; KRAFT, D. What makes an allergen an allergen? Allergy Clinical Immunology Internation, 1996, 8, s. 60 – 66
- [128] VAN CAUWENBERGE, P.; BACHERT, C.; PASSALACQUA, G. et al. Concensus statement on the treatment of allergic rhinitis. Allergy, 2000, 55, s. 116 – 134
- [129] VESELÁ, M. Pícní trávy. Praha: CZU, Studijní materiály, Agrokrom, 2009, s. 3 a 6

- [130] VESELÁ, M., MRKVIČKA, J., ŠTĚPÁNEK, P. Výživa a hnojení travních porostů. *Agro*, 2005, 5, s. 70-71
- [131] VONDRA, V.; REISOVÁ, M.; KOTĚŠOVEC, F.; NOŽIČKA, J.; VITNEROVÁ, N.; PLANEROVÁ, D. Prevalence alergických rým u 14- až 15letých ve dvou městských a ve venkovském okrese české republiky. *Praktický Lékař*, 1997, 77, s. 121 – 123
- [132] VŠÚP TROUBSKO, OSEVA. Trvání semenářství současných čs. Odrůd a jejich využití pro pícninářské a trávnickové účely. *Větrov: Sborník přednášek při příležitosti 50. výročí založení ŠS Větrov*. 1988, s. 46 – 47
- [133] WACHS, M.; PROUD, D.; LICHTENSTEIN, L. M.; KAGEY-SOBOTKA, A.; NORMAN, P. S.; NACLEIRO, R. M. Observations on the pathogenesis of nasal priming. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 1989, 84, s. 492 – 501
- [134] von WAHL, P. G.; PULS, K. E. The emission of mugwort pollen (*Artemisia vulgaris* L.) and its flight in the air. *Aerobiologia*, 1989, 5, s. 55 – 63
- [135] WASSERMANN, S. I. Mediators of immediate hypersensitivity. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 1983, 72, s. 101 – 115
- [136] WELLIVER, R. C.; DUFFY, L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7–8 years. *Pediatric Pulmonology*, 1993, 15, s. 19 – 27
- [137] WRIGHT, A. L.; HOLBERG, C. J.; MARTINEZ, F. D.; HALONEN, M.; MORGAN, W. Taussig LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics*, 1994, 6, s. 895 – 901
- [138] WÚTHRICH, B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl*, 1989, 90, s. 3 – 10

10 SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Dusík dodaný hnojením a jeho export sklizní
Tab. 2	Fosfor dodaný hnojením ($32 \text{ kg P} \cdot \text{ha}^{-1}$) a jeho export sklizní
Tab. 3	Výživa travních porostů, dávky a poměr N : P : K
Tab. 4	Export draslíku sklizní při stupňovaných dávkách dusíku
Tab. 5	Úroveň výnosů dle způsobu využití a stanoviště
Tab. 6	Doporučené dávky dusíku ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)
Tab. 7	pH a obsah základních makroprvků v půdě ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), střední půdy, Mehlich III)
Tab. 8	Doporučené dávky fosforu ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)
Tab. 9	Doporučené dávky draslíku ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)
Tab. 10	Doporučené dávky hořčíku ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)
Tab. 11	Vliv minerálních a statkových hnojiv na výnos a kvalitu píce
Tab. 12	Průměrný přívod živin do půdy ve statkových hnojivech ($\text{kg} \cdot \text{t}^{-1}$)
Tab. 13	Preference použití statkových hnojiv na travních porostech
Tab. 14	Vliv hnojení na travní porost (dlouhodobý pokus – 23 roků, výsledky jsou průměry z posledních deseti let)
Tab. 15	Rozbory upraveného pylu – mikroskopická analýza – 1. rok - 2010
Tab. 16	Rozbory upraveného pylu – mikroskopická analýza – 2. rok - 2011
Tab. 17	Rozbory upraveného pylu – mikroskopická analýza – 3. rok - 2012
Tab. 18	Velikost pylových zrn (μm)
Tab. 19	Identifikace 8 sledovaných látek dle analýz HPLC a LC - MS
Tab. 20	HPLC analýzy – 1. rok – 2010
Tab. 21	HPLC analýzy – 2. rok – 2011
Tab. 22	ELISA test – 1. rok - 2010
Tab. 23	ELISA test – 2. rok - 2011
Tab. 24	ELISA test – 3. rok – 2012
Tab. 25	Sklizeň semen z 1 parcelky (tj. 10 m^2) v kg

11 SEZNAM OBRÁZKŮ (v textu)

- Obr. 1 Travní biom v ČR
- Obr. 2 Struktura semenářských porostů
- Obr. 3 Rozložení stanic PIS
- Obr. 4 Pylové zrno
- Obr. 5 Schema struktury pylového zrna
- Obr. 6 Schema pokusu
- Obr. 7 Sušení pylu na topných deskách
- Obr. 8 a), b) Upravený pyl ve vialkách
- Obr. 9 Detail pylového zrna
- Obr. 10 Obsah tryptofanu a 7 fenolických látek v závislosti na různé úrovni hnojení dusíkem (průměr roku 2010 a 2011)
- Obr. 11 Spektra látek
- Obr. 12 HPLC separace extraktu z pylu. Popis vrcholů 1 - 8 viz Tab. 19
- Obr. 13 Tryptofan
- Obr. 14 Příklady - sigmoidy extraktu (2010), standard a vzorky A1, A3, A5
- Obr. 15 SDS – PAGE – elektroforeogram – proteinový profil z extraktů pylu (kDa)

12 PUBLIKACE

Journal: Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology
Title: Grass pollen pollution from biofuels farming
Manuscript ID: PED-2013-0273.R1
Manuscript Type: Original Research
Keyword: Aeroallergens, Allergies

13 SEZNAM PŘÍLOH

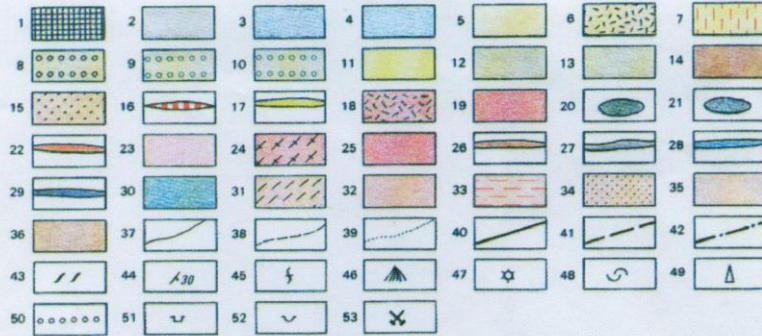
1. Geologická mapa oblasti – I.
2. Geologická mapa oblasti – II. (legenda)
3. Mapa – pozemkový katastr
4. Protokol o zkoušce – rozbory půdy před zásevem pokusu P, K, Mg, Ca, pH
5. Protokol o zkoušce – rozbory půdy před zásevem pokusu N (vzorek inkubovaný)
6. Protokol o zkoušce – rozbory půdy před zásevem pokusu N
(vzorek neinkubovaný)
7. Protokol o zkoušce – rozbory N v nadzemních částech rostlin
1. rok pokusu – 2010
8. Protokol o zkoušce – rozbory N, P, K, Ca, Mg, pH v nadzemních částech rostlin
2. rok pokusu - 2011 - nehnojeno N
9. Protokol o zkoušce – rozbory N, P, K, Ca, Mg, pH v nadzemních částech rostlin
2. rok pokusu - 2011 - ½ dávka N
10. Protokol o zkoušce – rozbory N, P, K, Ca, Mg, pH v nadzemních částech rostlin
2. rok pokusu - 2011 - plná dávka N
11. Kostřava červená - pokus
12. Kostřava červená – trs
13. Kostřava červená – lata
14. Kostřava červená - pyl
15. Kostřava červená – sklizeň semene – I.
16. Kostřava červená - sklizeň semene – II.
17. Kostřava červená - sklizeň semene – III.

14 PŘÍLOHY

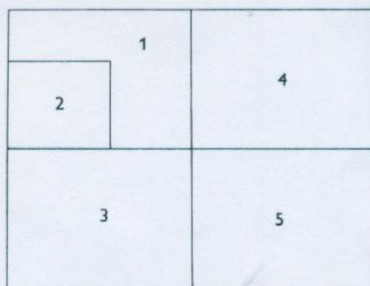
1. Geologická mapa oblasti – I.



2. Geologická mapa oblasti – II. (legenda)



KVARTÉR, holocén: 1 – antropogenní uloženiny; 2 – organogenní sedimenty; 3 – fluvální písčito-jílovité sedimenty včetně sedimentů umělých vodních nádrží; 4 – deluviofluvální písčité a jílovité sedimenty;
holocén – pleistocén: 5 – deluvální písčité hlíny a hlinité písky; 6 – deluvální hlinitokamenité sedimenty;
pleistocén: 7 – sprašové hlíny, místy s úlomky hornin; 8 – fluvální písčité štěrky (svrchní pleistocén, wurm); 9 – fluvální písčité štěrky (střední pleistocén, riss); 10 – fluvální písčité štěrky (střední pleistocén, mindel);
TERCIÉR, neogén: 11 – zelenošedé a červenofialové (=pestré) jíly; s polokovalnými - subangulárními valouny převážně křemene (nečleněný neogén); 12 – mydlovarské souvrství, svrchní část: šedo zelené jíly, písky a diatomové sedimenty (spodní baden); 13 – mydlovarské souvrství, spodní část: šedo zelené jíly a písky (karpat); pískovce, slepence (na bázi);
PALEZOIKUM, perm: 14 – chýnovské vrstvy - pestré slepence, arkóзовé a drobové pískovce, zčásti vápnité, méně i jílovce; v aleuropelitech kalcitické konkrece (spodní autun); 15 – lhotické vrstvy - rudé, zčásti i šedé, vápnité prachovce, polohy jílovců, vrstvy s kalcitickými konkrecemi, čočkovité vložky písčitých vápenců, vložky pískovců (spodní autun);
PALEZOIKUM, středoečeský pluton: 16 – žilný křemen; 17 – aplit, pegmatit; 18 – biotiticko-pyroxenický melanokratický, zčásti porfyrický tábořský syenit; 19 – syenodiorit až diorit - okrajová facie tábořského syenitu;
PREKAMBRIUM ?, moldanubikum: 20 – serpentit a přeměněný peridotit; 21 – eklogit; 22 – dvojslídny žilný granit až metagranit; 23 – muskoviticko-biotitická ortorula s turmalínem; 24 – biotitická ortorula; 25 – dvojslídny a leukokratický ortorula až metagranit; 26 – kvarcit; 27 – grafitický kvarcit; 28 – krystalický vápenec a dolomit; 29 – erian; 30 – amfibolit; 31 – muskovit-biotitická a dvojslídny pararula místy s polohami svorů (m.j. "chýnovské svory"); 32 – muskovit-biotitická pararula; 33 – dvojslídny pararula místy s polohami kvarcitické ruly a kvarcitu; 34 – migmatizované biotitické až dvojslídny pararuly; 35 – biotitická až dvojslídny pararula se sillimanitem; 36 – biotitická a sillimanit biotitická pararula, místy s polohami kvarcitu a kvarcitických rul; 37 – zjištěná hranice stratigrafických jednotek a hornin; 38 – pravděpodobná hranice stratigrafických jednotek a hornin; 39 – litologický a petrografický přechod hornin; 40 – zlom ověřený; 41 – zlom předpokládaný nebo nepřesně lokalizovaný; 42 – zlom zakrytý mladšími útvary; 43 – katakláza, mylonitizace; 44 – foliace metamorfitu; 45 – fosilní zvětraliny; 46 – výplavový kužel; 47 – sluhák; 48 – kryoturba; 49 – hranice; 50 – valouny v ornici; 51 – lom v provozu, opuštěný; 52 – hlinišť; 53 – opuštěné stříbrné doly.

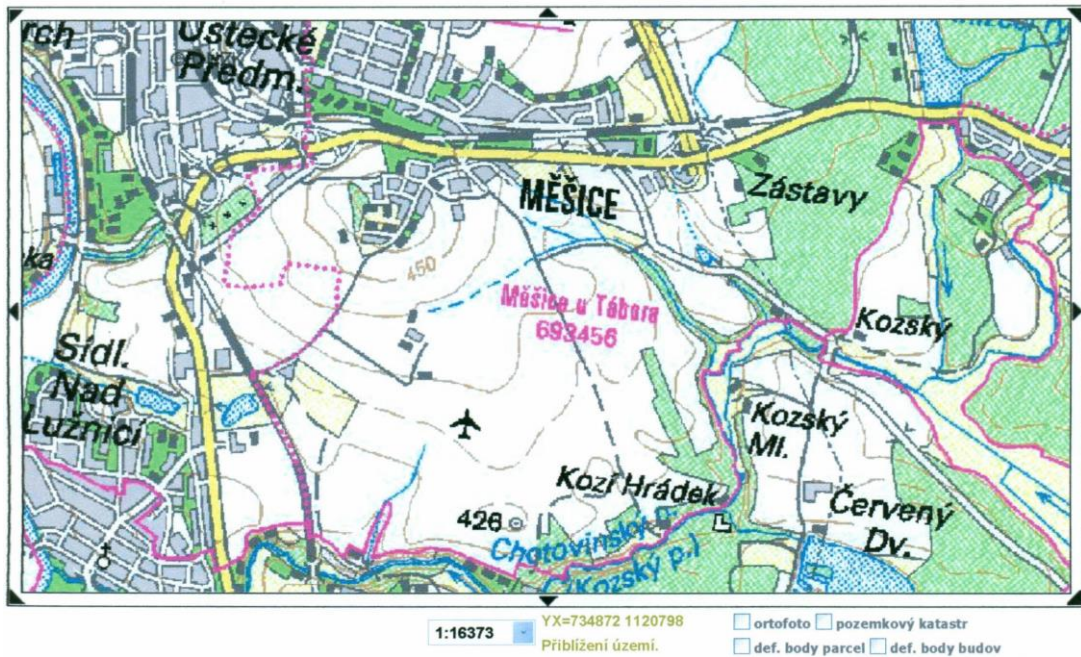


Přehled mapových podkladů:

- geologické mapy GPUP 1:50 000, listy M-33-90-A, M-33-90-B, M-33-90-D; reambulováno M. Opletal, M. Novák ČGÚ 1994
- geologická mapa 1:25 000 list M-33-90-C-b /Tábor, - Pražské předměstí/ Vladimír Cech - ÚUG 1963 reambulováno M. Opletal ČGÚ 1994
- rukopisná geologická mapa 1:25 000 list 23-133 Tábor, M. Suk 771, reambulováno M. Opletal, M. Novák ČGÚ 1994
- základní geologická mapa ČSSR 1:25 000, list 23-132 Cetoraz; ÚUG Praha 1980
- základní geologická mapa ČSSR 1:25 000, list 23-134 Černovice; ÚUG Praha 1980

kvartér na celém území listu reambulován P. Havlíček, ČGÚ 1994

3. Mapa – pozemkový katastr



4. Protokol o zkoušce – rozborů půdy před zásevem pokusu P, K, Mg, Ca, pH

"AGRO-LA", spol. s r.o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III, 377 01 Jindřichův Hradec
tel:384 321 011-12, fax:384 320 558, mail: laborator@agrola.cz



Protokol o zkoušce č. 405-P-2009/J

List číslo : 1
Počet listů: 1

Zákazník : **Ing. Alena Ratajová**

Vzorek číslo : 405-P
Materiál : půda
Místo odběru : Ing. Alena Ratajová
Odebral : zákazník
Poznámka : P,K,Mg,Ca - výluh dle Mehlicha III
Typ rozboru : dle objednávky
Datum příjmu : 7.12.2009 Období zpracování vzorku : 7.12.2009 - 21.12.2009

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Nejistota měření	Použitá metoda
Fosfor (P) ²⁾	154	mg/kg	±20%	SOP 43 (JPP AP I kap. 3, JPP AR kap. 3, JPP ZK I kap. 7, ČSN 46 7092-11)
Draslík (K) ²⁾	407	mg/kg	±20%	SOP 42 (JPP AP I kap. 3)
Hořčík (Mg) ²⁾	125	mg/kg	±15%	SOP 42 (JPP AP I kap. 3)
Vápník (Ca) ²⁾	1385	mg/kg	±20%	SOP 42 (JPP AP I kap. 3)
pH (CaCl ₂)	5.15	-	±0.10 ⁸⁾	SOP 44 (JPP AP I kap. 2.3, ČSN ISO 10523, ČSN ISO 10390)

Pozn.: Metody nepodléhající akreditaci ČIA jsou označeny (N) před kódem SOP, (SA) akreditovaná subdodávka, (SN) neakreditovaná subdodávka, 1) údaj v původní hmotě, 2) údaj ve 100 % sušiny 8) údaj v jednotkách pH
Uvedená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření k=2, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí asi 95 %
Nezahrnuje nejistotu vzorkování. Jednotlivé postupy metod jsou uloženy v laboratoři k nahlédnutí.

Prohlášení: Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r.o. jinak než celý. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty. Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, že byl odběr proveden zadavatelem.

V J.Hradci dne: 21.12.2009

Jméno, funkce, podpis, razítko :

Ing. Martina Šulcová

"AGRO-LA", spol. s r.o.
Středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630 / III
J. Hradec 377 01

5. Protokol o zkoušce – rozborů půdy před zásevem pokusu N (vzorek inkubovaný)

"AGRO-LA", spol. s r. o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III, 377 01 Jindřichův Hradec
tel: 384 321 011-12, fax: 384 320 558, mail: laborator@agrola.cz



Protokol o zkoušce č.KŠ3-P-2010/J

List číslo : 1
Počet listů: 1

Zákazník : **Ing. Jiří Boček**

Vzorek číslo : KŠ3-P
Materiál : půda
Místo odběru : Ing. Jiří Boček, Ing. Ratajová, inkubovaný
Odebral : zákazník
Typ rozboru : dle objednávky
Datum příjmu : 27. 1.2010 Období zpracování vzorku : 27. 1.2010 - 22. 2.2010

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Nejistota měření	Použitá metoda
N-NH ₄ ¹⁾	7.00	mg/kg	-	(N) SOP 76
N-NO ₃ ¹⁾	21.3	mg/kg	-	(N) SOP 77

Pozn.: Metody nepodléhající akreditaci ČIA jsou označeny (N) před kódem SOP, (SA) akreditovaná subdodávka, (SN) neakreditovaná subdodávka, 1) údaj v původní hmotě, 2) údaj ve 100 % sušině

Uvedená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření k=2, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí asi 95 %
Nezahrnuje nejistotu vzorkování. Jednotlivé postupy metod jsou uloženy v laboratoři k nahlédnutí.

Prohlášení: Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r. o. jinak než celý. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty. Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, že byl odběr proveden zadavatelem.

V J.Hradci dne: 22. 2.2010

Jméno, funkce, podpis, razítko :

Ing. Martina Šulcová

"AGRO-LA", spol. s r. o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III
377 01 Jindřichův Hradec

①

6. Protokol o zkoušce – rozborů půdy před zásevem pokusu N (vzorek neinkubovaný)

"AGRO-LA", spol. s r.o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III, 377 01 Jindřichův Hradec
tel: 384 321 011-12, fax: 384 320 558, mail: laborator@agrola.cz



Protokol o zkoušce č.KŠ2-P-2010/J

List číslo : 1
Počet listů: 1

Zákazník : **Ing. Jiří Boček**

Vzorek číslo : KŠ2-P
Materiál : půda
Místo odběru : Ing. Jiří Boček, Ing. Ratajová, neinkubovaný
Odebral : zákazník
Typ rozboru : dle objednávky
Datum příjmu : 27. 1.2010 Období zpracování vzorku : 27. 1.2010 - 22. 2.2010

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Nejistota měření	Použitá metoda
N-NH ₄ ¹⁾	4.90	mg/kg	-	(N) SOP 76
N-NO ₃ ¹⁾	19.4	mg/kg	-	(N) SOP 77

Pozn : Metody nepodléhající akreditaci ČIA jsou označeny (N) před kódem SOP, (SA) akreditovaná subdodávka, (SN) neakreditovaná subdodávka, 1) údaj v původní hmotě, 2) údaj ve 100 % sušine

Uvedená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření k=2, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí asi 95 %
Nezahrnuje nejistotu vzorkování. Jednotlivé postupy metod jsou uloženy v laboratoři k nahlédnutí.

Prohlášení: Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r.o. jinak než celý. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty. Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, že byl odběr proveden zadavatelem.

V J.Hradci dne: 22. 2.2010

Jméno, funkce, podpis, razítko :

Ing. Martina Šulcová

"AGRO-LA", spol. s r. o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III
377 01 Jindřichův Hradec



7. Protokol o zkoušce – rozbor N v nadzemních částech rostlin – 1. rok pokusu - 2010

P R O T O K O L O Z K O U Š E Ć . 121-R-10

*
* Dodavatel: "AGRO-LA", spol. s r.o., Jindřichův Hradec *
*
* Zákazník :4005 Ing. Jiří Boček *
*
* Datum příjmu : 4. 5.2010 *
* Vzoroval : zákazník *
*
* Strana/počet : 1/1 *


Číslo vz.	Plodina	Půdní blok	Sušina [%]	Dusík [%]
121 R	Pokus TAGRO, kostřava červená,	bez hnojení	18.5	2.03
122 R	Pokus TAGRO, kostřava červená,	1/2 dávka N	16.3	3.19
123 R	Pokus TAGRO, kostřava červená,	plná dávka N	16.1	3.60

Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r.o. jinak než celý. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty.

Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, že byl odběr proveden zadavatelem.

Datum výpočtu : 7. 5.2010 Zpracoval(a) : Ing. Milan Kopeneč

"AGRO-LA", spol. s r. o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III
377 01 Jindřichův Hradec
①



8. Protokol o zkoušce – rozbor N, P, K, Ca, Mg, pH v nadzemních částech rostlin
– 2. rok pokusu - 2011 - nehnojeno N

"AGRO-LA", spol. s r.o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III, 377 01 Jindřichův Hradec
tel: 384 321 011-12, fax: 384 320 558, mail: laborator@agrola.cz



Protokol o zkoušce č. 200-R-2011/J

List číslo : 1
Počet listů: 1

Zákazník : "AGRO-LA", spol. s r.o.
Jiráskovo předměstí 630/III
377 01 Jindřichův Hradec

Vzorek číslo : 200-R
Materiál : Kostřava červená
Místo odběru : "AGRO-LA", spol. s r.o., nehnojeno
Odebral : zákazník
Poznámka : Typ mineralizace: mineralizace na mokré cestě
Typ rozboru : dle objednávky
Datum příjmu : 4. 5.2011 Období zpracování vzorku : 4. 5.2011 - 6. 5.2011

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Nejistota měření	Použitá metoda
Dusík (N) ²⁾	2.39	%	±20%	SOP 55
Fosfor (P) ²⁾	0.35	%	±20%	SOP 43-1 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-11)
Draslík (K) ²⁾	3.01	%	±20%	SOP 41 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Vápník (Ca) ²⁾	0.24	%	±20%	SOP 41 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Hořčík (Mg) ²⁾	0.20	%	±15%	SOP 41 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Sušina	24.0	%	±15%	SOP 39-1 (ČSN ISO 11465)

Pozn.: 1) údaj v původní hmotě 2) údaj ve 100 % sušiny

Uvedená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření $k=2$, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí asi 95 %. Nezahrnuje nejistotu vzorkování. Jednotlivé postupy metod jsou uloženy v laboratoři k nahlédnutí.

Prohlášení: Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r.o. jinak není celý. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty. Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, kdy byl odběr proveden zadavatelem.

V J.Hradci dne: 6. 5.2011

Jméno, funkce, podpis,
razítko :

Ing. Martina Šulcová

9. Protokol o zkoušce – rozbor N, P, K, Ca, Mg, pH v nadzemních částech rostlin
– 2. rok pokusu - 2011 - ½ dávka N

"AGRO-LA", spol. s r.o.
středisko laboratoř

Jiráskovo předměstí 630/III, 377 01 Jindřichův Hradec
tel: 384 321 011-12, fax: 384 320 558, mail: laborator@agrola.cz



Protokol o zkoušce č. 198-R-2011/J

List číslo : 1
Počet listů: 1

Zákazník : "AGRO-LA", spol. s r.o.
Jiráskovo předměstí 630/III
377 01 Jindřichův Hradec

Vzorek číslo : 198-R
Materiál : Kostřava červená
Místo odběru : "AGRO-LA", spol. s r.o., ½ dávka N
Odebral : zákazník
Poznámka : Typ mineralizace: mineralizace na mokré cestě
Typ rozboru : dle objednávky
Datum příjmu : 4. 5.2011 Období zpracování vzorku : 4. 5.2011 - 6. 5.2011

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Nejistota měření	Použitá metoda
Dusík (N) ²⁾	2.50	%	±20%	SOP 55
Fosfor (P) ²⁾	0.32	%	±20%	SOP 43-1 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-11)
Draslík (K) ²⁾	3.04	%	±20%	SOP 41 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Vápník (Ca) ²⁾	0.26	%	±20%	SOP 41 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Hořčík (Mg) ²⁾	0.04	%	±15%	SOP 41 (JPP ZK 1 kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Sulfát	23.2	%	±15%	SOP 39-1 (ČSN ISO 11465)

Pozn.: 1) údaj v původní hmotě 2) údaj ve 100 % sulfátu

Uvedená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření $k=2$, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí asi 95 %. Nezahrnuje nejistotu vzorkování. Jednotlivé postupy metod jsou uloženy v laboratoři k nahlédnutí.

Prohlášení: Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r.o. jinak nepochopitelně. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty. Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, kdy byl odběr proveden zadavatelem.

V J.Hradci dne: 6. 5.2011

Jméno, funkce, podpis,
razítko :

Ing. Martina Šulcová

10. Protokol o zkoušce – rozborů N, P, K, Ca, Mg, pH v nadzemních částech
rostlin – 2. rok pokusu - 2011 - plná dávka N

199R

Stránka č. 1 z 1

"AGRO-LA", spol. s r.o.
středisko laboratoř
Jiráskovo předměstí 630/III, 377 01 Jindřichův Hradec
tel: 384 321 011-12, fax: 384 320 558, mail: laborator@agrola.cz



Protokol o zkoušce č. 199-R-2011/J

List číslo : 1
Počet listů: 1

Zákazník : "AGRO-LA", spol. s r.o.
Jiráskovo předměstí 630/III
377 01 Jindřichův Hradec

Vzorek číslo : 199-R
Materiál : Kostřava červená
Místo odběru : "AGRO-LA", spol. s r.o., plná dávka N
Odebral : zákazník
Poznámka : Typ mineralizace: mineralizace na mokré cestě
Typ rozboru : dle objednávky
Datum příjmu : 4. 5.2011 Období zpracování vzorku : 4. 5.2011 - 6. 5.2011

Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Nejistota měření	Použitá metoda
Dusík (N) ²⁾	2.55	%	±20%	SOP 55
Fosfor (P) ²⁾	0.34	%	±20%	SOP 43-1 (JPP ZK I kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-11)
Draslík (K) ²⁾	3.09	%	±20%	SOP 41 (JPP ZK I kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Vápník (Ca) ²⁾	0.26	%	±20%	SOP 41 (JPP ZK I kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Hořčík (Mg) ²⁾	0.04	%	±15%	SOP 41 (JPP ZK I kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15)
Sulfát	23.2	%	±15%	SOP 39-1 (ČSN ISO 11465)

Pozn.: 1) údaj v původní hmotě 2) údaj ve 100 % sušiny
Uvedená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření $k=2$, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí asi 95 %. Nezahrnuje nejistotu vzorkování. Jednotlivé postupy metod jsou uloženy v laboratoři k nahlédnutí.

Prohlášení: Tento protokol nesmí být reprodukován bez písemného souhlasu laboratoře "AGRO-LA", spol. s r.o. jinak nepochopitelně. Výsledky se týkají pouze předmětu zkoušky a nenahrazují jiné dokumenty. Laboratoř neručí za správnost odběru v případě, kdy byl odběr proveden zadavatelem.

V J.Hradci dne: 6. 5.2011

Jméno, funkce, podpis,
razítko :

Ing. Martina Šulcová

11. Kostřava červená - pokus



12. Kostřava červená – trs



13. Kostřava červená – lata



14. Kostřava červená - pyl



15. Kostřava červená – sklizeň semene – I.



16. Kostřava červená - sklizeň semene – II.



17. Kostřava červená - sklizeň semene – III.

