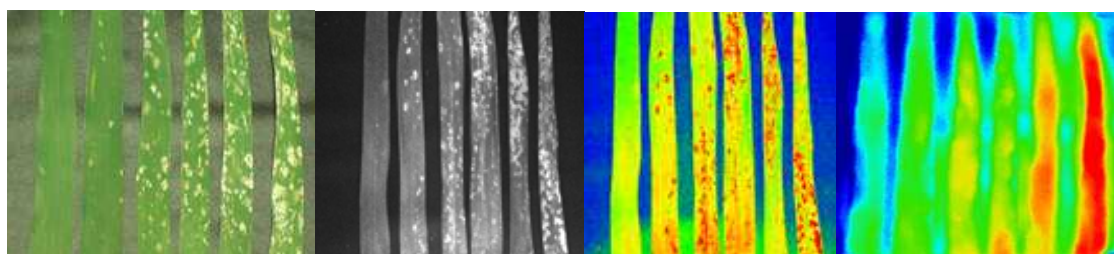


2018

Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metody detekce houbových chorob využitelné ve fenotypování rostlin a dálkovém průzkumu



Karel Klem^{1*}, Barbora Veselá¹, Petr Holub¹, Otmar Urban¹, Jiří Mezera²

¹ Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno

² Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

*Korespondující autor, E-mail: klem.k@czechglobe.cz

ISBN: 978-80-87902-24-0

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu QJ1530373 s názvem: Integrovaná ochrana obilnin proti patogenům, plevelům a škůdcům pro udržitelné produkce potravin, krmiv a surovin. KK, PH a OU byli podpořeni z projektu NPU I č. LO1415.

Oponenti

Ing. Iveta Svobodová

Vedoucí laboratoře mykologie

Odbor diagnostiky

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Šlechtitelů 773/23, Holice, Olomouc, 77900

Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Katedra experimentální biologie rostlin

Přírodovědecká fakulta

Univerzita Karlova

Viničná 1965/5

128 43 Praha

Metodika byla certifikována Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ), pod Osvědčením:

Abstrakt

Tato metodika shrnuje poznatky z porovnání tří perspektivních metod detekce houbových chorob využitelných pro dálkový průzkum a fenotypování rostlin se zaměřením na odolnost vůči chorobám. Jedná se o metody měření spektrální odrazivosti, infračerveného termálního zobrazování a modro-zelené zobrazovací fluorescence. Na příkladu napadení rostlin ozimé pšenice padlím travním, rzí plevovou a rzí pšeničnou metodika demonstruje jejich přednosti a nedostatky z pohledu detekce jednotlivých chorob, přičemž je zřejmé, že všechny tři metody jsou pro nedestruktivní detekci houbových chorob potenciálně využitelné, ale jejich praktické použití se může lišit. Pod pojmem nedestruktivní rozumíme, bez nutnosti odebírat vzorek z rostliny - je tedy možno měřit na celistvých rostlinách. Testování indexů spektrální odrazivosti pro detekci napadení houbovými chorobami ukazuje především vysokou spolehlivost detekce u indexů založených na odrazivosti v red-edge a zeleném pásmu vlnových délek, jako jsou například integrální index ANMB₆₅₀₋₇₂₅, jednoduchý poměrový index ZM nebo fotochemický index PRI. Současně je ale nezbytná kalibrace metody s použitím nelineární sigmoidní závislosti. Infračervené termální zobrazování prokázalo vysokou přesnost detekce u napadení padlím travním, případně rzí pšeničnou, ale již nižší u rzi plevové. Termální zobrazování je velmi citlivé na změnu vnějších podmínek a proto je důležité provádět měření pokud možno za stabilních podmínek ozáření, proudění, teploty a vlhkosti vzduchu a současně používat diferenci (rozdíl) teploty listu vzhledem k teplotě okolního vzduchu. Modro-zelená fluorescence představuje velmi dobrý nástroj rovněž pro vyhodnocení prostorové distribuce napadení listu. Tato metoda je však využitelná, vzhledem k nutnosti UV excitace, pouze na krátké vzdálenosti a nalezne tedy použití spíše ve fenotypování než při detekci stresu v polních podmínkách.

Klíčová slova: spektrální odrazivost; infračervená termografie; modro-zelená fluorescence; pšenice ozimá; *Triticum aestivum*; houbové choroby rostlin; padlí travní; rez plevová; rez pšeničná, detekční metody, diagnostické metody, nedestruktivní metody.

Abstract

This methodology summarises findings from a comparison of three perspective methods of fungal disease detection applicable for remote sensing and plant phenotyping of fungal disease resistance. These methods are spectral reflectance, infrared thermal imaging, and blue-green fluorescence imaging. On the example of winter wheat infection with powdery mildew, stripe rust and brown rust the strengths and weaknesses of individual methods were demonstrated. From these results it is evident that all three methods are potentially applicable for non-destructive fungal disease detection, but their practical use may vary. Under non-destructive detection we understand a detection on intact plants, without necessity to cut a plant sample. Testing of spectral reflectance indices for the detection of fungal diseases showed particularly the high detection reliability of the red-edge and green band based spectral vegetation indices, such as the integral index $ANMB_{650-725}$, the simple ratio index ZM or the photochemical index PRI. At the same time, it was necessary to calibrate the detection method using nonlinear sigmoid relationship. Infrared thermal imaging has shown high detection accuracy for powdery mildew and brown rust, but lower for stripe rust. Thermal imaging is very sensitive to changing environmental conditions, so it is important to perform measurements, if possible, under stable conditions of irradiance, wind, air temperature and air humidity, and at the same time to use the leaf temperature difference from ambient air temperature. Blue-green fluorescence seems to be also a very promising tool for evaluating the spatial distribution of infection on a leaf level, however, this method is applicable only for small proximity measurements due to the need to use UV excitation and hence it will rather find its use in phenotyping rather than in field detection.

Keywords: spectral reflectance; infrared thermography; blue-green fluorescence; winter wheat; *Triticum aestivum*; fungal plant diseases; powdery mildew; stripe rust; brown rust; detection methods; diagnostic methods; non-destructive detection.

Obsah

1	Cíl metodiky.....	6
2	Vlastní popis metodiky	6
2.1	Úvod	6
2.2	Rostlinný materiál použitý pro kalibraci metod detekce	8
2.3	Spektrální odrazivost	9
2.3.1	Základní charakteristiky spektrální odrazivosti porostu	9
2.3.2	Metodika měření spektrální odrazivosti.....	11
2.3.3	Výsledky detekce chorob pomocí spektrální odrazivosti.....	13
2.4	Infračervené termální zobrazování	22
2.4.1	Základní principy a využití infračerveného termálního zobrazování v detekci stavu porostu a chorob	22
2.4.2	Metodika měření teploty listů pomocí infračervené termální kamery	23
2.4.3	Výsledky detekce chorob pomocí infračerveného termálního zobrazování	23
2.5	Modro-zelená zobrazovací fluorescence	27
2.5.1	Základní principy a využití modro-zelené fluorescence při detekci chorob	27
2.5.2	Metodika měření modro-zelené fluorescence	27
2.5.3	Výsledky detekce chorob pomocí modro-zelené zobrazovací fluorescence.....	28
2.6	Shrnutí dosažených výsledků a přínosy pro praxi	32
3	Srovnání novosti postupů.....	33
4	Popis uplatnění metodiky.....	34
5	Ekonomické aspekty uplatnění metodiky	35
6	Seznam použité související literatury	35
7	Seznam publikací, které předcházely metodice	37

1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je shrnout poznatky z ověřování metod spektrální odrazivosti, infračerveného termálního zobrazování a modro-zelené zobrazovací fluorescence pro nedestruktivní detekci houbových chorob u obilnin a prezentovat možnosti, přednosti a nedostatky jednotlivých metod na příkladech napadení ozimé pšenice padlím travním, rží plevovou a rží pšeničnou. Pod pojmem nedestruktivní rozumíme, bez nutnosti odebírat vzorek z rostliny – je možno měřit na intaktních, celistvých rostlinách. Metodika má za cíl poskytnout podklady pro využití uvedených metod v dálkovém průzkumu a ve fenotypování rostlin, přičemž jejich primární využití se předpokládá ze strany podniků služeb poskytujících data v dálkovém průzkumu, přímo zemědělských subjektů hospodařících na orné půdě, šlechtitelů a do značné míry také firem zabývajících se vývojem senzorů a technologií pro dálkový průzkum. Cílem metodiky je vybrat (zejména v případě spektrální odrazivosti) vegetační indexy a parametry poskytující nejspolehlivější detekci jednotlivých chorob a také poskytnout závislosti k úrovni napadení, které umožní interpretaci naměřených dat.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvod

Probíhající změna klimatu a s ní spojená zvyšující se četnost meteorologických extrémů negativně ovlivňuje rostlinnou produkci nejen přímo, tedy vlivem na výnos a kvalitu, ale do značné míry také nepřímo prostřednictvím zvyšujícího se výskytu škodlivých organismů (Evans et al. 2008). Podmínky prostředí měnící se v důsledku změny klimatu ovlivňují populační dynamiku škodlivých organismů tedy zejména původců chorob, škůdců a částečně také plevelů. Historie ukazuje, že dopady těchto nepřímých efektů mohou být i několikanásobně vyšší než v případě přímého působení (Luck et al. 2011). Změna klimatu prostřednictvím vlivu na rychlé změny v populacích škodlivých organismů dále přispívá k poklesu životnosti nových odrůd, která je již nyní poloviční oproti situaci před několika desetiletími (Tilman et al. 2002), k nárůstu zdravotních a environmentálních rizik v důsledku kontaminace mykotoxiny (Paterson a Lima 2010), či ke zvyšování četnosti aplikace pesticidů, a zrychlení vývoje rezistence k pesticidům (Shaw a Osborne 2011). Důsledkem může být kombinace hospodářských,

zdravotních a environmentálních škod několikanásobně převyšující přímé efekty změny klimatu na výnos a kvalitu zemědělských plodin.

Včasná detekce houbových chorob v počátečních fázích epidemie představuje jedno z nejslabších míst pro uplatnění rozhodovacích pravidel v rámci integrované ochrany rostlin a současně také při výběru a hodnocení genotypů v procesu šlechtění. Významnější rozšíření integrovaných metod ochrany proti chorobám u zemědělských plodin bude kromě pokroku v diagnostických metodách vyžadovat také dosažení zásadního posunu ve vývoji předpovědních modelů založených na průběhu počasí, uplatněných pěstitelských opatřeních jako je zpracování půdy, osevní sled, výživa rostlin, výsevek apod., a také na klíčových charakteristikách porostu (hustota, množství biomasy, fyziologický stav rostlin). Kombinace diagnostických metod a předpovědních modelů pak umožní vyhodnocení nejen rozvoje škodlivých organismů v průběhu vegetace, ale také jejich prostorové variability na úrovni pozemku. Kombinace těchto dvou metodických přístupů umožní v budoucnu provádět ochranu v optimálním okamžiku z pohledu dosažení účinnosti a pouze na místech, kde je to nezbytně nutné. To přinese nejen úsporu nákladů na ochranu rostlin, ale bude mít také zásadní benefit z pohledu snížení kontaminační zátěže potravin a životního prostředí pesticidy. Ošetření v nejvhodnějším okamžiku pak znamená také omezení případných ztrát způsobených škodlivými organismy v důsledku opožděného nebo naopak příliš včasného ošetření a tím snížené účinnosti respektive kratšího působení přípravku.

Uplatnění těchto metod by se mělo stát součástí uceleného systému tzv. precizního zemědělství, které v sobě zahrnuje diagnostiku, rozhodovací proces s mapovými výstupy (aplikační mapy) a technologie umožňující variabilní aplikace. Precizní zemědělství je rychle se rozvíjející směr současného zemědělství, které využívá mnohé prvky moderních informačních technologií včetně metod dálkového průzkumu pomáhajících farmářům při rozhodování o pěstitelských zásazích (např. rev. Mahlein et al. 2012). Precizní zemědělství se snaží se využívat podrobné, lokálně specifické a prostorově orientované informace o půdě a rostlinách k optimalizaci vstupů podporujících produktivitu plodin. Optimalizace zemědělských vstupů může snížit náklady na produkci plodin, zvýšit ekonomickou efektivnost a snížit riziko vstupu nežádoucích chemických látek do prostředí.

Zkracující se životnost odrůd a nástup nových houbových chorob, či rozšiřování chorob, které měly dříve okrajový význam, povede k tlaku na mnohem flexibilnější odezvu šlechtitelů na takto měnící se podmínky s požadavkem na rychlejší tvorbu odrůd s odolností vůči novým chorobám nebo odrůd odolných vůči přizpůsobeným (rezistentním) patotypům běžných

chorob. Ke zrychlení a zvýšení efektivity šlechtění, reagujícího na měnící se podmínky může významně přispět vývoj metod automatického fenotypování odolnosti k chorobám. V současné době je rozvoj metod automatického fenotypování velmi rychlý, avšak hlavní pozornost je stále zaměřována na odolnost k suchu, případně jiným abiotickým stresům a vývoj metod pro detekci napadení chorobami jsou teprve v počátcích.

Vysoký potenciál pro detekci chorob a monitorování porostů plodin představují v současné době rychle se rozvíjející kontaktní a bezkontaktní techniky, které umožňují nedestruktivní diagnostiku chorob a detekci příznaků napadení těmito chorobami. Mezi nejvhodnější techniky se řadí hyperspektrální senzory založené na odrazivosti, infračervená termografie a zobrazovací fluorescence. Pro detekci chorob a monitoring fyziologického stavu porostů jsou preferovány neinvazivní a zobrazovací techniky před nezobrazovacími, vzhledem k tomu že i heterogenita napadení, nebo šíření choroby ze spodních listových pater na horní jsou velmi důležité informace pro agronoma či šlechtitele. V současné době stále vzrůstá počet dostupných senzorů vhodných pro monitoring stresu a chorob rostlin. V kombinaci s výkonnými metodami analýzy dat budou mít tyto techniky zásadní úlohu v integrované ochraně rostlin a v udržitelné rostlinné výrobě. Vývoj detekčních senzorů a informačních technologií spolu s rozšiřujícími se geografickými informačními systémy tak otevírá nové možnosti pro precizní zemědělství a fenotypování rostlin.

Cílem této metodiky je shrnout přednosti a případné nevýhody či rizika použití jednotlivých metod na příkladu detekce tří houbových chorob ozimé pšenice a demonstrovat tak potenciál použití ve fenotypování rostlin a monitoringu v polních podmínkách.

2.2 Rostlinný materiál použitý pro kalibraci metod detekce

V roce 2016 byly provedeny kalibrační měření na vzorcích ozimé pšenice s rozdílnou úrovní napadení padlím travním (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*), rzí plevovou (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) a rzí pšeničnou (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) pro vyhodnocení potenciálu detekce houbových chorob pomocí spektrální odrazivosti, infračerveného termálního zobrazování a modro-zelené fluorescence. Tyto vzorky s rozdílnou úrovní napadení byly sbírány vždy z jednoho pozemku se stejnou odrůdou. Padlí travní bylo hodnoceno na odrůdě Annie z lokality Koryčany, rez plevová na odrůdě Ostka smolicka z lokality Břest a rez pšeničná na odrůdě Tobak z lokality Prace. Rostliny ozimé pšenice v růstové fázi metání až začátku zrání s různou úrovní napadení (v rámci jedné odrůdy a jednoho pozemku) byly vloženy okamžitě po

odstřížení do vody a znovu odstříženy pod hladinou vody tak aby bylo zabráněno embolismu cévních svazků. Rostliny byly transportovány do 30–40 minut do laboratoře, kde proběhlo vlastní měření odrazivosti, teploty listů pomocí termální kamery a modro-zelené fluorescence pomocí multispektrální fluorescenční kamery. Měření bylo provedeno vždy na praporcových listech pšenice. Rostliny byly před vlastním měřením rozděleny podle napadení tak, aby při každém opakování měření (celkem 5–6 opakování) byly současně měřeny listy bez napadení a listy s napadením odstupňovaným od nejnižšího po nejvyšší (ve většině případů úroveň napadení 0–75%). V každém opakování tak bylo vybráno 6 listů s různou úrovní napadení. Před vlastním měřením byly rostliny umístěny do růstové komory s konstantními mikroklimatickými podmínkami. Příklady jednoho opakování měření pro jednotlivé houbové choroby jsou znázorněny na Obr. 1. Hodnocení napadení listu jednotlivými chorobami bylo provedeno vizuálně podle stupnice metodik EPPO.



Obrázek 1 – Vzorky listů s odstupňovanou úrovní napadení padlím travním (A), rzí plevovou (B) a rzí pšeničnou (C). V každém obrázku je gradient různě napadených listů – vlevo je vždy nenapadený list a vpravo nejvíce napadený list daným houbovým patogenem.

2.3 Spektrální odrazivost

2.3.1 Základní charakteristiky spektrální odrazivosti porostu

Spektrální chování rostlin je dáno odrazivostí elektromagnetického záření na dané vlnové délce. Nejvýznamnějšími rostlinnými pigmenty, které ovlivňuje odrazivost rostlin a porostu, jsou chlorofyly $a + b$, které v oblasti viditelného záření (400 – 700 nm) absorbují nejvíce záření v modré a červené oblasti spektra, naopak nejméně absorbují a tudíž nejvíce odráží v zelené části spektra. Obsah chlorofylů a tím množství absorbovaného záření úzce souvisí s působením stresu a stárnutí. Obsah chlorofylu je velmi těsně korelován s dostupností dusíku a této skutečnosti je velmi často využíváno právě v detekci stavu výživy dusíkem pomocí spektrální odrazivosti. Mezi další významné pigmenty v listech patří karotenoidy, které absorbují

především v modro-zelené oblasti spektra, a jejich celkové množství a složení může být indikátorem působení stresových podmínek, protože karotenoidy plní četné ochranné funkce (zejména při nadměrné ozáření) a jejich akumulace a přeměna je tudíž indukována působením četných stresových faktorů. Dalšími pigmenty plnící ochranné funkce jsou sekundární metabolity antokyany a flavonoidy. Tyto představují skupinu látek vyskytujících se zejména u dospělých a stárnoucích listů, jejichž množství je často odezvou na působení stresu, zejména podmínek vysoké ozáření, UV záření, sucha, nízkých teplot nebo infekce houbovými chorobami.

Významná část záření je odražena rostlinami v blízké infračervené (NIR) oblasti spektra (700–1000 nm), kdy při přechodu z viditelné do blízké infračervené oblasti záření (710–780 nm) dochází u zdravé rostliny k prudkému nárůstu odrazivosti na více než 50 %. Tento jev je typický pro zelené části rostlin a část spektra s takto rychlým nárůstem odrazivosti je označována jako „red-edge“. Odrazivost v oblasti red-edge se stává v posledních letech stále populárnější v monitoringu stavu zemědělských plodin, protože dříve používané spektrální vegetační indexy jako je např. jeden z nejpoužívanějších vegetačních indexů NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), využívající odrazivost v červené oblasti jsou satureovány již při středním množství chlorofylu na jednotku plochy. V praxi to znamená, že tyto indexy nemohou odlišit relativně malý pokles obsahu chlorofylu, který je způsoben nedostatkem ve výživě, působením stresových podmínek (např. sucha) či v důsledku infekce houbovými chorobami. Naopak spektrální indexy založené na odrazivosti v red-edge, případně zeleném pásmu mají mnohem vyšší citlivost v počátečních fázích poklesu obsahu chlorofylu způsobeného nedostatkem živin, působením stresu nebo infekcí houbovými chorobami.

Spektrální chování celého porostu je pak ovlivněno kromě obsahu pigmentů případně vody do značné míry také celkovým množstvím biomasy na jednotku plochy, strukturou porostu a architekturou rostlin (Klem et al. 2014). V průběhu vegetace dochází ke změnám spektrálního chování rostlin. Zdravá vegetace se projevuje nízkou odrazivostí v červené oblasti spektra a vysokou odrazivostí v blízké infračervené oblasti spektra. Naopak stárnoucí vegetace nebo vegetace vystavená stresu se vyznačuje zvyšující se odrazivostí v červené oblasti spektra a nižší odrazivostí v blízké infračervené oblasti spektra (Lukas et al. 2012; Klem et al. 2014).

2.3.2 Metodika měření spektrální odrazivosti

Měření spektrální odrazivosti byla provedena pomocí spektrometru s vysokým rozlišením FieldSpec 4 HiRes (ASD, USA) vybaveným kontaktní sondou se světelným zdrojem a listovou komorou („leaf clip“; též firma ASD, USA). Zdroj světla u reflekační sondy představuje širokospektrální xenonová lampa. Před každým měřením byla provedena kalibrace přístroje s využitím reflektančního standardu Spectralon (Labsphere, USA). Měření odrazivosti bylo provedeno ze svrchní (adaxiální) strany listu na jeho střední části. Z křivek odrazivosti listů ozimé pšenice s rozdílnou úrovní napadení byly vypočítány spektrální indexy využívající vlnových délek z různých oblastí viditelného spektra (VIS), blízkého infračerveného spektra (NIR), případně krátkovlnného infračerveného spektra (SWIR) (Tab. 1). Úroveň napadení byla korelována s vypočítanými spektrálními indexy.

Tabulka 1 – Seznam použitých vegetačních indexů, jejich výpočet a literární zdroj pro každý index. Seznam citací pro všechny uvedené indexy je možno nalézt v publikaci Klem et al. 2018. Detailní vysvětlení zkratk, rovnice pro výpočet a zdrojové citace jsou k dispozici také v centrální databázi indexů: <https://www.indexdatabase.de/>; nebo v review Main et al. 2011, Croft et al. 2014.

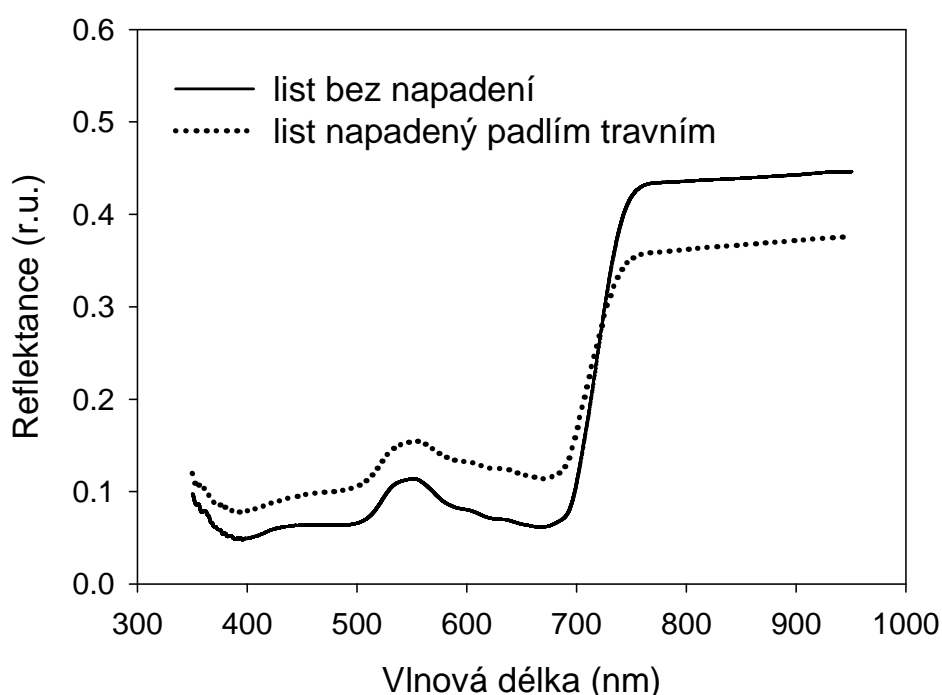
Vegetační index	Vzorec výpočtu	Reference
ANMB ₆₅₀₋₇₂₅	Area under curve (650 - 725nm) normalised to maximal band depth	Malenovský et al. (2006)
NDVI	$NDVI = (R_{780} - R_{670}) / (R_{780} + R_{670})$	Rouse et al. (1973)
NDGI	$NDGI = (R_{780} - R_{550}) / (R_{780} + R_{670})$	Klem unpublished
NRERI	$NRERI = (R_{780} - R_{720}) / (R_{780} - R_{680})$	Klem et al. (2014)
RDVI	$RDVI = (R_{800} - R_{670}) / \sqrt{(R_{800} + R_{670})}$	Roujean and Breon (1995)
MSR	$MSR = ((R_{780} / R_{670}) - 1) / \sqrt{((R_{780} / R_{670}) + 1)}$	Chen (1996)
MTVI1	$MTVI1 = 1.2 * [1.2 * (R_{800} - R_{550}) - 2.5 * (R_{670} - R_{550})]$	Haboudane et al. (2004)
MCARI1	$MCARI1 = 1.2 * [2.5 * (R_{800} - R_{670}) - 1.3 * (R_{800} - R_{550})]$	Haboudane et al. (2004)
TCARI	$TCARI = 3 * [(R_{700} - R_{670}) - 0.2 * (R_{700} - R_{550}) * (R_{700} / R_{670})]$	Haboudane et al. (2002)
OSAVI	$OSAVI = (1 + 0.16) * (R_{800} - R_{670}) / (R_{800} + R_{670} + 0.16)$	Rondeaux et al. (1996)
TCARI/OSAVI	TCARI/OSAVI	Haboudane et al. (2002)
Greenes Index G	$G = (R_{554}) / (R_{677})$	Smith et al. (1995)
TVI	$TVI = 0.5 * [120 * (R_{750} - R_{550}) - 200 * (R_{670} - R_{550})]$	Broge and Leblanc (2001)
ZM	$ZM = (R_{750}) / (R_{710})$	Zarco-Tejada et al. (2001)
SRPI	$SRPI = (R_{430}) / (R_{680})$	Peñuelas et al. (1995)
NPQI	$NPQI = (R_{415} - R_{435}) / (R_{415} + R_{435})$	Barnes et al. (1992)
PRI	$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$	Gamon et al. (1992)
NPCI	$NPCI = (R_{680} - R_{430}) / (R_{680} + R_{430})$	Peñuelas et al. (1994)
SIPI	$SIPI = (R_{800} - R_{450}) / (R_{800} + R_{650})$	Peñuelas et al. (1995)
VOG3	$VOG3 = (R_{734} - R_{747}) / (R_{715} + R_{720})$	Zarco-Tejada et al. (2001)
VOG2	$VOG2 = (R_{734} - R_{747}) / (R_{715} + R_{726})$	Zarco-Tejada et al. (2001)
GM1	$GM1 = (R_{750}) / (R_{550})$	Gitelson and Merzlyak (1997)
GM2	$GM2 = (R_{750}) / (R_{550})$	Gitelson and Merzlyak (1997)
NDI ₂₃₄₀	$NDI_{2340} = (R_{2340} - R_{680}) / (R_{2340} + R_{680})$	Klem unpublished
WI	$WI = (R_{900}) / (R_{970})$	Peñuelas et al. (1997)
WI/NDVI	WI/NDVI	Piñol et al. (1998)

R_{xxx} označuje reflektanci ve vlnové délce xxx vyjádřen v nm

2.3.3 Výsledky detekce chorob pomocí spektrální odrazivosti

2.3.3.1 Padlí travní (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)

Pro detekci napadení padlím travním byla použita především spektrální odrazivost ve viditelném a blízkém infračerveném pásmu (400–1000 nm). Z porovnání křivek spektrální odrazivosti u listu bez napadení padlím a listu napadeného na úrovni přibližně 75% je patrné že napadení padlím zvyšuje odrazivost ve viditelné části spektra a naopak snižuje odrazivost v blízké infračervené části spektra (Obr. 2).



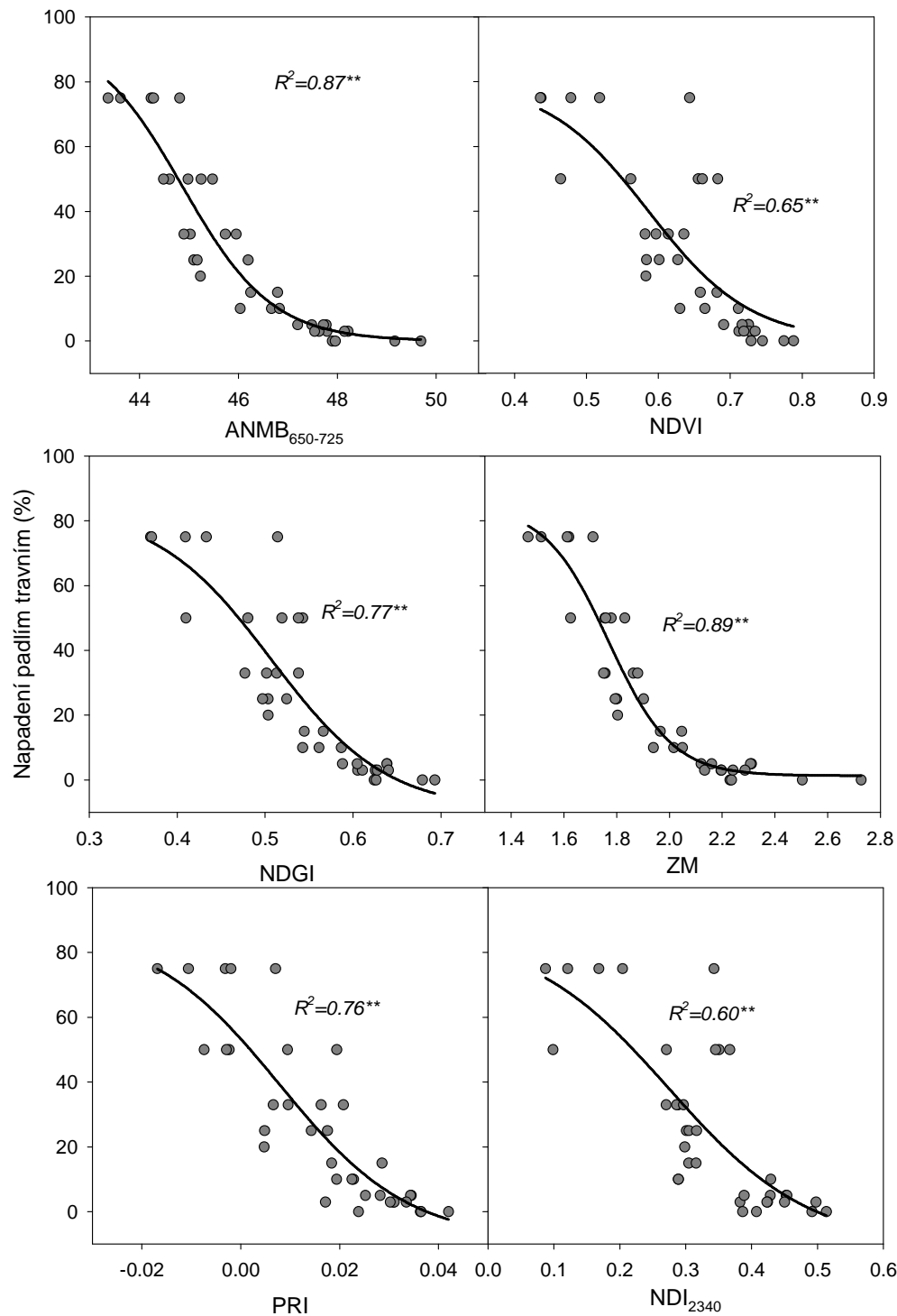
Obrázek 2 - Porovnání křivek spektrální odrazivosti v intervalu vlnových délek 350-950 nm u listu pšenice ozimé bez napadení padlím travním (plná čára) a u listu napadeného padlím travním na úrovni 75 % listové plochy (přerušovaná čára).

Z křivek odrazivosti listů s rozdílnou úrovní napadení padlím travním byly vypočítány spektrální indexy využívající odrazivosti ve vlnových délkách z různých oblastí viditelného a blízkého infračerveného spektra. Úroveň napadení byla korelována s vypočtenými spektrálními indexy. Nejvyšších korelačních koeficientů s hodnotami R vyššími než 0,8 bylo dosaženo pro indexy ANMB₆₅₀₋₇₂₅, NDVI, NDGI, PRI a pro několik indexů využívající odrazivosti v oblasti red-edge (ZM, VOG, GM) (Tab. 2).

Tabulka 2 – Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu pro lineární závislosti mezi jednotlivými indexy spektrální odrazivosti a napadením padlým travním a statistická průkaznost jednotlivých korelací. ** označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině pravděpodobnosti $P=0,01$, * označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině $P=0,05$. Tučně jsou vyznačeny 4 indexy s nejvyššími hodnotami R.

Index spektrální odrazivosti	Pearsonův korelační koeficient (R)	Statistická průkaznost
ANMB ₆₅₀₋₇₂₅	-0,89	**
NDVI	-0,82	**
NDGI	-0,87	**
NRERI	-0,79	**
RDVI	-0,58	**
MSR	-0,81	**
MTVI1	-0,35	*
MCARI1	-0,35	*
TCARI	0,12	
OSAVI	-0,7	**
TCARI/OSAVI	0,56	**
Greenes Index G	-0,61	**
TVI	-0,36	*
ZM	-0,86	**
SRPI	-0,72	**
NPQI	0,24	
PRI	-0,86	**
NPCI	0,73	**
SIPI	-0,8	**
VOG3	0,83	**
VOG2	0,84	**
GM1	-0,84	**
GM2	-0,85	**
NDI ₂₃₄₀	-0,77	**
WI	-0,07	
WI/NDVI	0,79	**

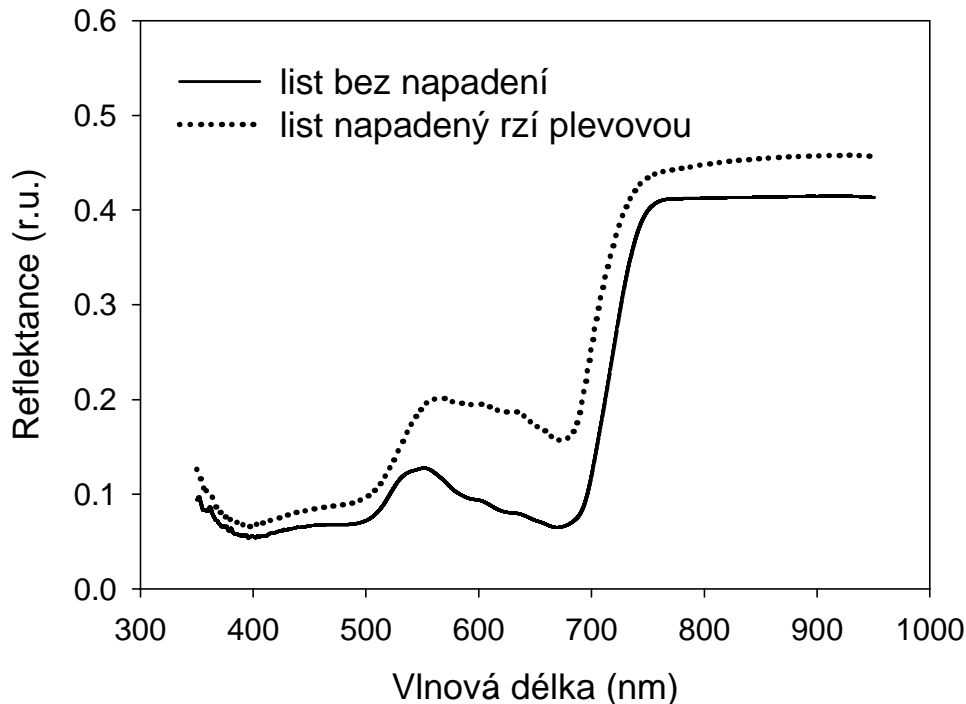
Nejvyššího korelačního koeficientu ($R = -0,89$), bylo dosaženo pro integrální index, který je založený na odrazivosti v červeném a red-edge pásmu (650–725 nm) ANMB₆₅₀₋₇₂₅. Podobně jako pro další indexy odrazivosti je zřejmé, že závislost k úrovni napadení padlým má sigmoidní charakter (Obrázek 3). Proložení dat nelineární sigmoidní křivkou zvyšuje index determinace (R^2) v porovnání s lineární závislostí. Zatímco při lineární závislosti pro index ANMB₆₅₀₋₇₂₅ činí $R^2 = 0,79$, při nelineární sigmoidní závislosti se zvyšuje na 0,87. Ještě výrazněji se zvýšil index determinace pro index ZM, který je založený na red-edge odrazivosti. Tento index dosahuje R^2 při použití sigmoidní závislosti 0,89, zatímco pro lineární závislost činí R^2 pouze 0,74. Pro další spektrální indexy přináší použití sigmoidní funkce jen minimální zlepšení proložení závislosti v porovnání s lineární funkcí a indexy determinace R^2 jsou velmi podobné. Příčinou je především velká variabilita indexů ve vyšších úrovních napadení v rozsahu 50–75 %.



Obrázek 3 – Závislosti mezi vybranými indexy spektrální odrazivosti a napadením listu ozimé pšenice padlím travním (vyjádřeno v % listové plochy). K proložení závislostí byla použita sigmoidní funkce $y=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$. Pro každou závislost je uveden index determinace R^2 . ** označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině pravděpodobnosti $P=0,01$.

2.3.3.2 Rez plevová (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*)

Z křivek spektrální odrazivosti měřených na listech s rozdílnou úrovní napadení rzí plevovou je zřejmé, že napadení rzí plevovou zvyšuje odrazivost v celé viditelné a blízké infračervené oblasti (400–1000 nm), ale nejvýraznější nárůst odrazivosti byl pozorován v červeném pásmu přibližně v rozsahu mezi 580–690 nm (Obr. 4).



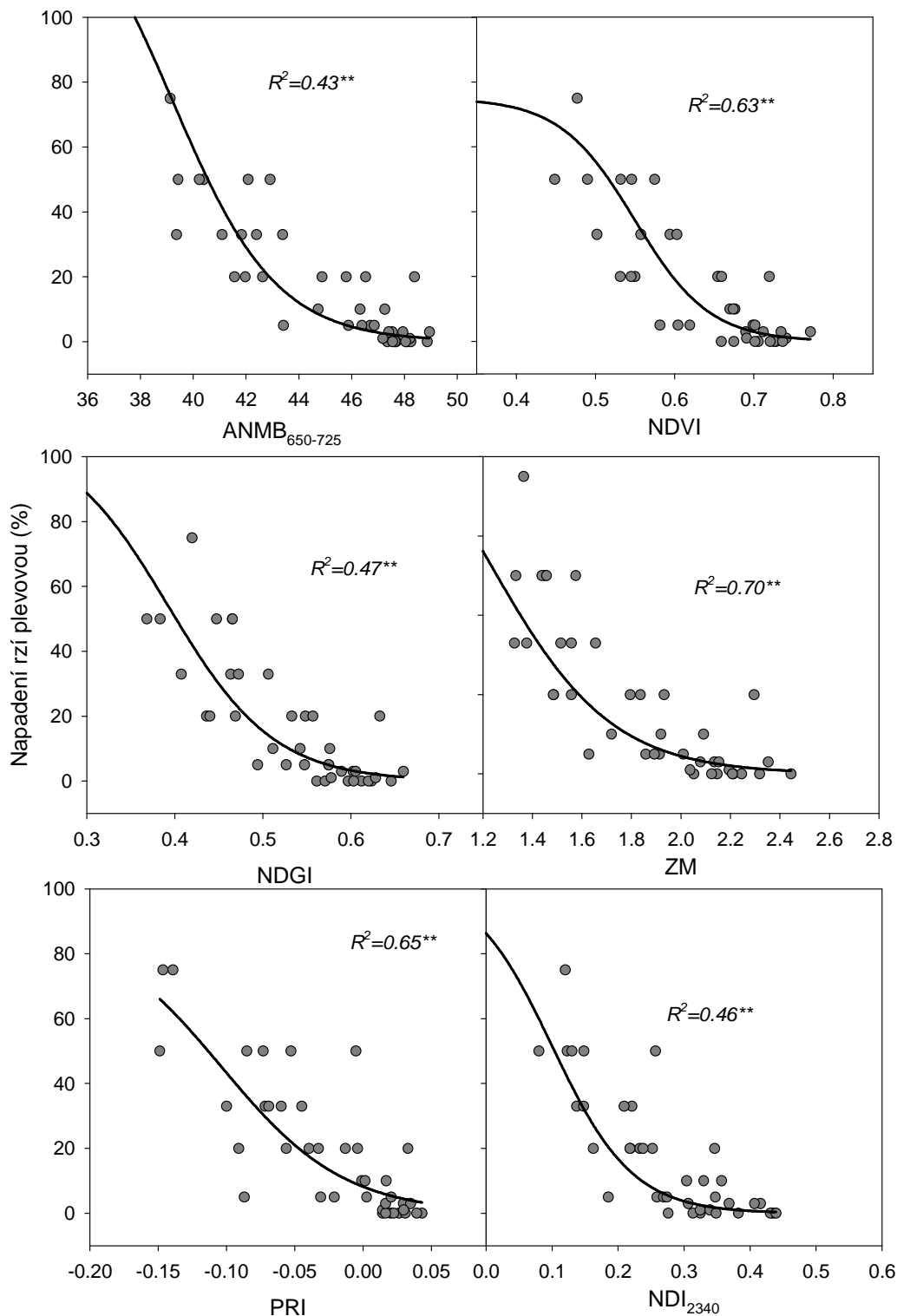
Obrázek 4 – Porovnání křivek spektrální odrazivosti v intervalu vlnových délek 350-950 nm u listu pšenice ozimé bez napadení rzí plevovou (plná čára) a u listu napadeného rzí plevovou na úrovni 75 % listové plochy (přerušovaná čára).

Z křivek odrazivosti listů s rozdílným napadením rzí plevovou byly opět vypočteny spektrální indexy založené na odrazivosti především ve viditelném a blízkém infračerveném pásmu. Úroveň napadení listové plochy hodnocená vizuálně byla korelována s vypočtenými spektrálními indexy. Nejvyšších hodnot korelačních koeficientů s R vyššími než 0,7 bylo dosaženo pro indexy ANMB₆₅₀₋₇₂₅, NDVI, NDGI, NRERI, MSR, PRI, ZM, VOG, GM, NDVI₂₃₄₀, WI/NDVI (Tab. 3).

Tabulka 3 – Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu pro lineární závislosti mezi jednotlivými indexy spektrální odrazivosti a napadením rzí plevovou (vyjádřeno v % listové plochy) a statistická průkaznost jednotlivých korelací. ** označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině pravděpodobnosti $P=0,01$, * označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině $P=0,05$. Tučně jsou vyznačeny 4 indexy s nejvyššími hodnotami R.

Index spektrální odrazivosti	Pearsonův korelační koeficient (R)	Statistická průkaznost
ANMB650-725	-0,78	**
NDVI	-0,73	**
NDGI	-0,73	**
NRERI	-0,75	**
RDVI	-0,59	**
MSR	-0,71	**
MTVII	-0,44	**
MCARI1	-0,44	**
TCARI	0,18	
OSAVI	-0,67	**
TCARI/OSAVI	0,57	**
Greenes Index G	-0,58	**
TVI	-0,43	**
ZM	-0,74	**
SRPI	-0,62	**
NPQI	0,06	
PRI	-0,72	**
NPCI	0,64	**
SIPI	-0,65	**
VOG3	0,73	**
VOG2	0,74	**
GM1	-0,70	**
GM2	-0,73	**
NDI ₂₃₄₀	-0,72	**
WI	0,04	
WI/NDVI	0,71	**

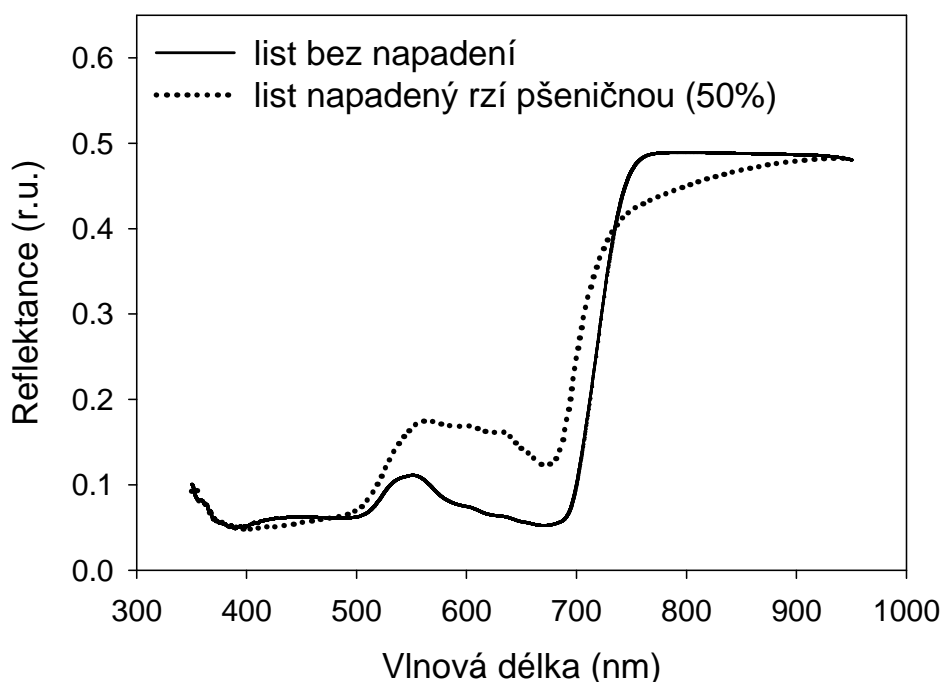
Dosažené hodnoty korelačních koeficientů R jsou obecně nižší pro rez plevovou než pro padlí. Nejvyššího korelačního koeficientu ($R = -0,78$) pro vztah mezi spektrálními indexy a úrovní napadení rzí plevovou bylo dosaženo podobně jako u padlí travního pro integrální index ANMB₆₅₀₋₇₂₅. Z Obr. 5 je patrné, že závislosti mezi napadením a spektrálními indexy mají opět sigmoidní charakter jako v případě padlí travního. Nejvyššího indexu determinace při použití sigmoidní závislosti ($R^2 = 0,70$) bylo dosaženo pro index ZM založený na red-edge odrazivosti.



Obrázek 5 – Závislosti mezi vybranými indexy spektrální odrazivosti a napadením listu ozimé pšenice rzí plevovou (vyjádřeno v % listové plochy). K proložení závislostí byla použita sigmoidní funkce $y=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$. Pro každou závislost je uveden index determinace R^2 . ** označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině pravděpodobnosti $P=0,01$.

2.3.3.3 Rez pšeničná (*Puccinia recondita f. sp. tritici*)

Z porovnání křivek spektrální odrazivosti u listu bez napadení rzí pšeničnou a listu napadeného na úrovni přibližně 50% je patrné že napadení rzí pšeničnou zvyšuje odrazivost podobně jako u rzí plevové zejména v červené části spektra (a částečně také v zelené). V infračervené oblasti spektra je vliv napadení poměrně malý a dochází k mírnému poklesu v oblasti 720–750 nm (red-edge) zatímco ve vyšších vlnových délkách se rozdíly stírají (Obr. 6).



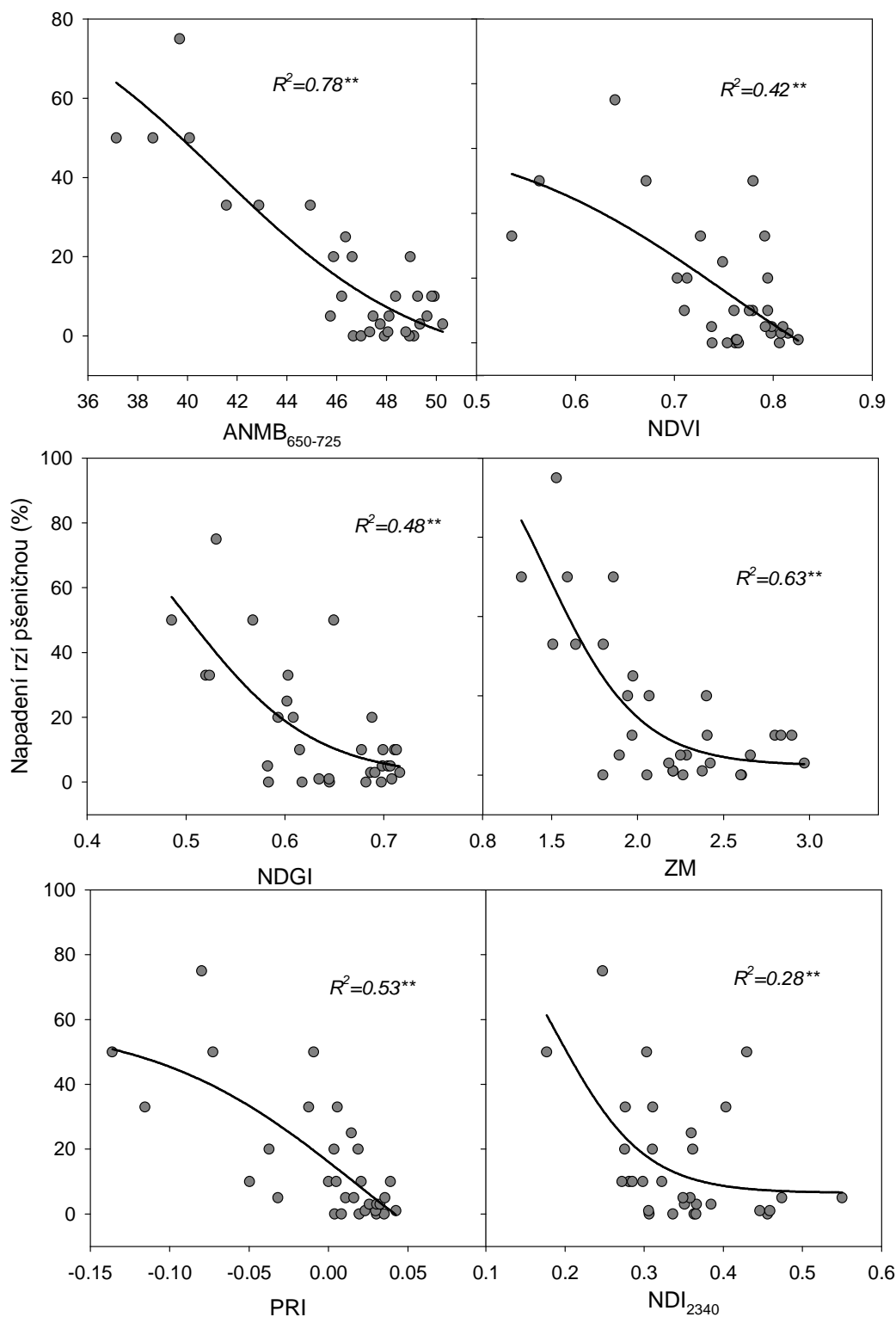
Obrázek 6 – Porovnání křivek spektrální odrazivosti v intervalu vlnových délek 350-950 nm u listu ozimé pšenice bez napadení rzí pšeničnou (plná čára) a u listu napadeného rzí pšeničnou na úrovni 50 % listové plochy (přerušovaná čára).

Nejvyššího korelačního koeficientu pro závislost mezi indexy spektrální odrazivosti a úrovní napadení rzí pšeničnou ($R = -0,87$) bylo dosaženo pro index založený opět na integrální odrazivosti v oblasti mezi 650–725 nm $ANMB_{650-725}$ (Tab. 4). Ve srovnání s padlým travním a rzí plevovou ale u ostatních spektrálních indexů R prudce klesá a druhý nejvýznamnější index z pohledu detekce rzí pšeničné dosahuje hodnoty R jen okolo 0,69 (PRI, NPCI). Jedná se především o fotochemické indexy založené na změně odrazivosti v zeleném pásmu, které charakterizuje konverzi karotenoidů xantofylového cyklu. Proložení dat nelineární křivkou má opět ve většině případů tvar sigmoidy. Všechny vybrané indexy determinace jsou statisticky

průkazné na hladině pravděpodobnosti 0,01 a nejvyššího indexu determinace ($R^2 = 0,78$) bylo dosaženo pro index ANMB₆₅₀₋₇₂₅ a index ZM založený na red-edge odrazivosti ($R^2 = 0,63$).

*Tabulka 4 – Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu pro lineární závislosti mezi jednotlivými spektrálními indexy a napadením rzí pšeničnou a statistická průkaznost jednotlivých korelací. ** označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině pravděpodobnosti $P=0,01$, * označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině $P=0,05$. Tučně jsou vyznačeny 4 indexy s nejvyšší hodnotou R.*

Index spektrální odrazivosti	Pearsonův korelační koeficient R	Statistická průkaznost korelace
ANMB650-725	-0,87	**
NDVI	-0,59	**
NDGI	-0,63	**
NRERI	-0,62	**
RDVI	-0,56	**
MSR	-0,56	**
MTVI1	-0,37	*
MCARI1	-0,37	*
TCARI	0,33	
OSAVI	-0,67	**
TCARI/OSAVI	0,53	**
Greenes Index G	-0,15	
TVI	-0,39	*
ZM	-0,65	**
SRPI	-0,69	**
NPQI	-0,03	
PRI	-0,69	**
NPCI	0,69	**
SIPI	-0,46	**
VOG3	0,58	**
VOG2	0,59	**
GM1	-0,55	**
GM2	-0,68	**
NDI ₂₃₄₀	-0,35	
WI	-0,52	**
WI/NDVI	0,58	**



Obrázek 7 – Závislosti mezi vybranými indexy spektrální odrazivosti a napadením listu ozimé pšenice rzí pšeničnou (vyjádřeno v % listové plochy). K proložení závislostí byla použita sigmoidní funkce $y=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$. Pro každou závislost je uveden index determinace R^2 . ** označuje statisticky průkaznou korelaci při hladině pravděpodobnosti $P=0,01$.

2.4 Infračervené termální zobrazování

2.4.1 Základní principy a využití infračerveného termálního zobrazování v detekci stavu porostu a chorob

Všechna tělesa, jejichž teplota je vyšší než absolutní nula (0 K), vyzařují elektromagnetické vlnění, jehož spektrum závisí na vlastnostech tělesa a jeho teplotě. Detekcí infračerveného záření máme možnost stanovit teplotu povrchu předmětu bez přímého kontaktu. Infračervené termální zobrazování umožňuje stanovit povrchovou teplotu listů, jednotlivých rostlin nebo celých porostů a teplota listů koreluje především se stavem vody v rostlině, mikroklimatem v porostu a změnami transpirace v důsledku infekce rostlinnými patogeny. Emitované infračervené záření v rozsahu 8–12 μm může být detekováno termografickou kamerou a teplotní diference zobrazeny jako intenzita šedé nebo v nepravých barvách (nejčastěji je používána modrá jako nejnižší teplota v použitém rozsahu a červená jako nejvyšší teplota v použitém rozsahu) a každý pixel obrazu pak obsahuje informaci o hodnotě teploty povrchu snímaného objektu. Povrch rostlin je vystaven vlivům prostředí, jako je okolní teplota, sluneční záření, srážky nebo rychlost větru a tyto pak ovlivňují jeho teplotu. Teplota jako taková tedy není přímým indikátorem stavu porostu, ale musíme ji vztáhnout k teplotě okolního vzduchu (obvykle prostá diference) nebo používáme složitější indexy, které pak určují relativní úroveň otevřenosti průduchů jako je například index CSWI. Teplota listu úzce koreluje s transpirací rostliny, která způsobuje ochlazování listu, a jež může být různě ovlivněna patogeny nebo abiotickými faktory. Zatímco listové patogeny, jako jsou listové skvrnitosti nebo rzi, indukují lokální a dobře definovatelné změny, poškození kořenovými patogeny (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp.) nebo systémovými infekcemi (*Fusarium* spp.) často ovlivňuje tok vody a transpiraci v rámci celé rostliny nebo jednotlivých rostlinných orgánů (Mahlein 2016; Mahlein et al. 2012).

Termografie může být aplikována ve formě blízkého nebo dálkového snímání, od mikroskopu přes pozemní až po dálková zařízení. Hlavní výhodou infračerveného termálního zobrazování je, že se jedná o neinvazivní, bezkontaktní a nedestruktivní metodu ke stanovení teploty povrchu listu v krátkém čase (Mahlein et al. 2012).

Aplikaci v polních podmínkách pro detekci chorob provedl např. Nilsson (1991), který našel vysokou korelaci mezi závažností onemocnění různých chorob kořenů a listů pro různé plodiny (ječmen, pšenice, oves, cukr, řepa, brambory). Průměrný teplotní rozdíl jednotlivých listů, rostlin a plodin je důležitým ukazatelem výskytu onemocnění. Dále může být termální zobrazení v polních podmínkách použito k detekci ložisek primární infekce. První výsledky přímé detekce symptomů onemocnění způsobeného patogenem *Fusarium* spp. na klasech ozimé pšenice našli Oerke a Steiner (2010) kdy pomocí infračerveného zobrazení zjistili vyšší teplotu infikovaných klasů v porovnání s neinfikovanými, čehož by mohlo být využito při lokálně specifické sklizni za účelem snížení rizika obsahu mykotoxinů v zrna. Lenthe et al. (2007) využili termální zobrazování ke zkoumání mikroklimatu pšenice a prostorové a časové variability houbových chorob.

2.4.2 Metodika měření teploty listů pomocí infračervené termální kamery

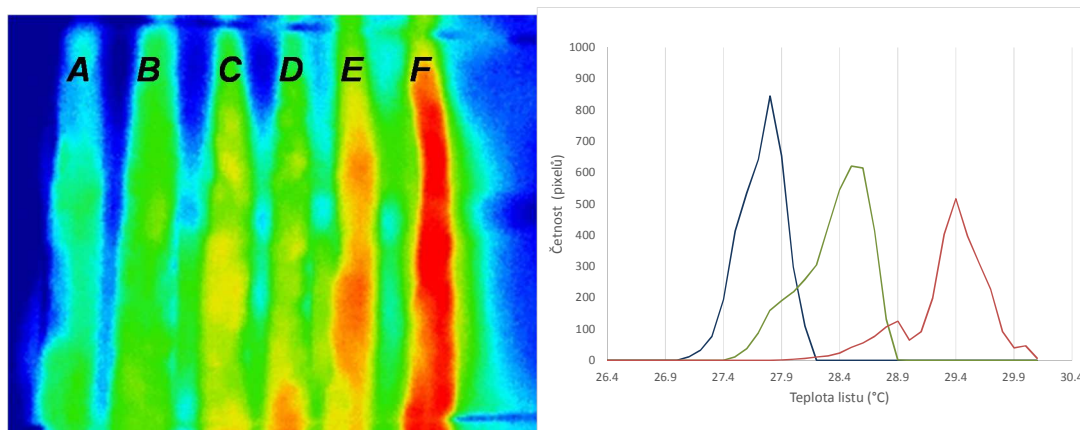
Listy pšenice s rozdílným napadením byly vloženy do růstové komory FS 4400 (PSI, Brno, CZ) s nastavenou teplotou vzduchu 20 °C a intenzitou světla (fotosynteticky aktivní radiace) 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Listy byly adaptovány po dobu 10 minut v těchto podmínkách tak aby došlo ke stabilizaci teploty listu pro dané podmínky a následně bylo provedeno měření teploty listů pomocí infračervené termální kamery SC 660 (FLIR, USA). Kamera byla umístěna na stativu a snímání probíhalo ze vzdálenosti asi 60 cm kolmo k povrchu listu. Zpracování snímků bylo provedeno v software FLIR Tools (FLIR, USA).

2.4.3 Výsledky detekce chorob pomocí infračerveného termálního zobrazování

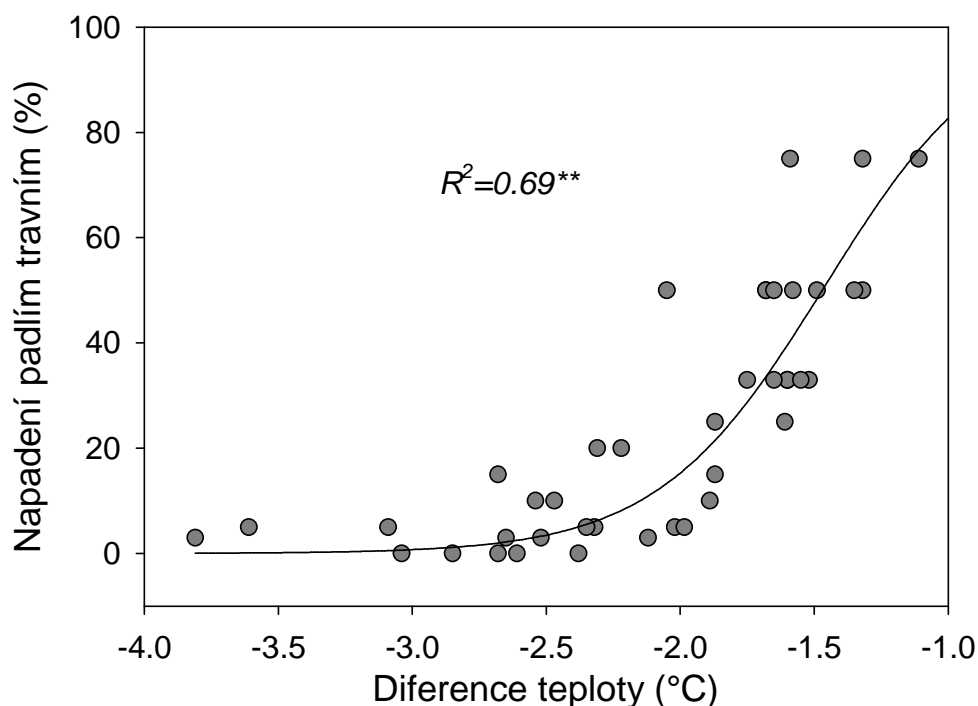
2.4.3.1 Padlí travní (*Blumeria graminis* f. *sp. tritici*)

Výsledky infračerveného termálního zobrazování na listech pšenice infikovaných padlím travním ukazují, že obecně napadení listů houbovými chorobami vede ke zvyšování povrchové teploty listů, které je pravděpodobně zapříčiněno uzavíráním průduchů. Současně také dochází se zvyšováním teploty ke zvyšování prostorové variability, jež je dáno rozmístěním infekce na listu. To potvrzují rozdílné histogramy teploty listu, kdy u zdravého listu je histogram úzký a ostrý (zahrnuje pouze malé rozpětí teplot), u infikovaného listu se histogram nesymetricky rozšiřuje a především rameno nižších teplot je rozšířené a má charakter druhého vrcholu. Tato část histogramu je charakteristická pro neinfikované části listu patogenem. Pro vlastní detekci napadení je tedy vhodné použít nejen samotný rozdíl teplot, ale také jejich histogram. Mezi teplotní diferencí (rozdíl teploty listu a teploty vzduchu) a úrovní napadení padlím travním byla

zjištěna průkazná závislost (index determinace $R^2=0,69$) (Obrázek Obr. 9), přičemž s rostoucí úrovní napadení se snižuje diference teplot mezi teplotou listu a teplotou vzduchu z důvodu snížené transpirace listů. Tato závislost má charakter sigmoidy, což znamená, že teplotní diference v rozsahu mínus 4 až mínus 2,5°C jsou dány spíše přirozenou variabilitou rostlin a teprve až při poklesu teplotní diference pod úroveň mínus 2,5°C odpovídá vlivu napadení.



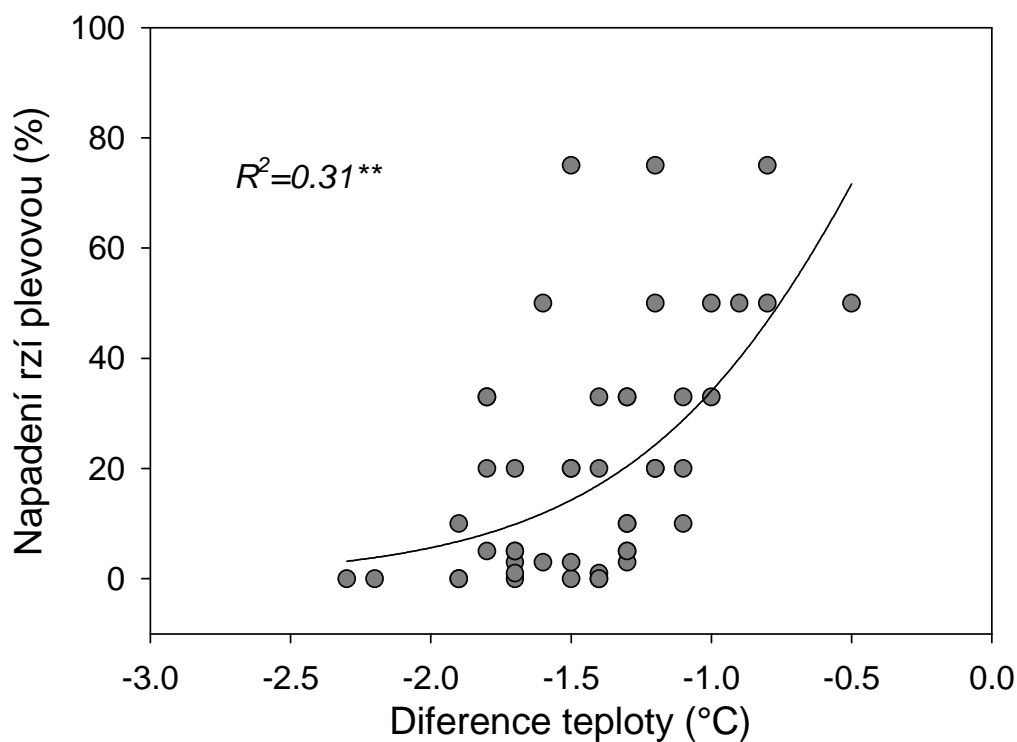
Obrázek 8 – Snímek z infračervené termální kamery snímající teplotu listů s odstupňovanou úrovní napadení padlím travním (vlevo) a histogram rozložení povrchové teploty na listu bez napadení (modrá křivka), se středním napadením (zelená křivka) a vysokým napadením (červená křivka). A – list bez napadení, F- list napadený padlím travním na úrovni 75%.



Obrázek 9 – Závislost mezi diferencí teploty listu ozimé pšenice oproti teplotě okolního vzduchu a napadením padlím travním (vyjádřeno v % listové plochy) s uvedeným indexem determinace R^2

2.4.3.2 Rez plevová (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*)

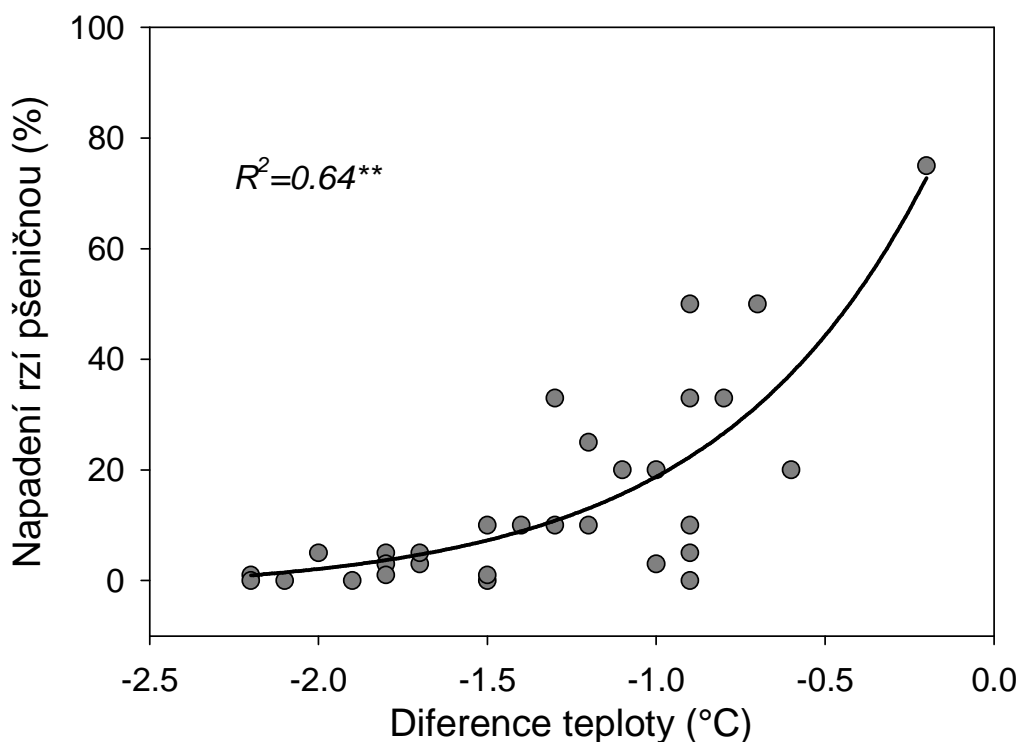
Z výsledků infračerveného termálního zobrazování pro listy pšenice napadené rzí plevovou je opět patrné zvyšování teploty listů s rostoucím napadením podobně jako pro padlí travní. Index determinace pro difference teplot při napadení rzí plevovou (Obrázek Obr. 10) je podstatně nižší než v případě napadení padlím travním, ale i v tomto případě je statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $P = 0,01$ potvrzující vliv napadení na povrchovou teplotu listu. Podobně jako v případě napadení padlím travním má tato závislost nelineární charakter.



Obrázek 10 – Závislost mezi diferencí teploty listu ozimé pšenice oproti teplotě okolního vzduchu a úrovní napadení rzí plevovou (vyjádřeno v % listové plochy).

2.4.3.3 Rez pšeničná (*Puccinia recondita f. sp. tritici*)

Z diferencí teplot listů s odstupňovanou intenzitou napadení rzí pšeničnou oproti teplotě okolního vzduchu je opět patrné zvyšování povrchové teploty listů (tedy pokles difference) s rostoucí úrovní napadení rzí pšeničnou. Index determinace je vysoký a statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti 0,01 ([Obrázek Obr-11](#)).



Obrázek 11 – Závislost mezi diferencí teploty listu ozimé pšenice oproti teplotě okolního vzduchu a napadením rzí pšeničnou (vyjádřeno v % listové plochy) s uvedeným indexem determinace R^2

2.5 Modro-zelená zobrazovací fluorescence

2.5.1 Základní principy a využití modro-zelené fluorescence při detekci chorob

V pletivech zelených rostlin můžeme po excitaci UV zářením detekovat dva typy rostlinné fluorescence, fluorescenci chlorofylu a modro-zelenou fluorescenci. Fluorescence chlorofylu je emitována chlorofylem *a* a je charakterizována dvěma maximy v oblasti červeného záření ve vlnových délkách 670–690 nm a 730–740 nm. Fluorescence chlorofylu může být excitována také vyššími vlnovými délkami až do oblastí překryvu s emitovanou fluorescencí. Modro-zelená fluorescence, která je excitována výhradně UV zářením se vyznačuje se charakteristickými maximy emise kolem 440 nm a 520 nm. Intenzita modro-zelené fluorescence je po excitaci konstantní v krátkém časovém intervalu (minuty) a je velmi citlivá na jednotlivé stresové faktory v rostlinách. Většinou pochází z derivátů kyseliny skořicové a ferulové, různých fenolických látek a jiných sekundárních metabolitů vyskytujících se ve vakuolách a buněčných stěnách rostlin (Ortiz-Bustos et al. 2017; Buschmann et al. 2000).

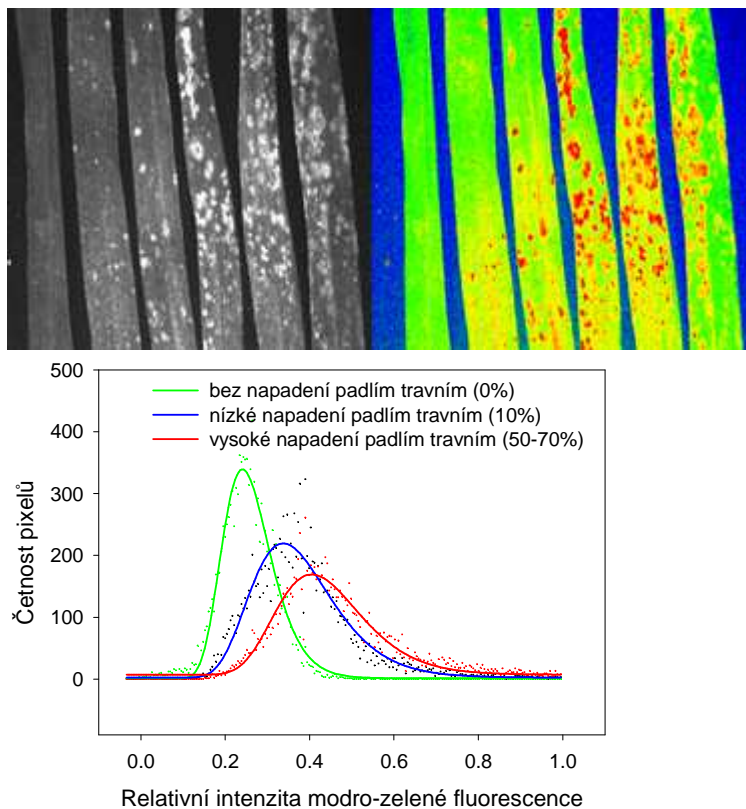
2.5.2 Metodika měření modro-zelené fluorescence

Pro měření modro-zelené fluorescence byla použita fluorescenční kamera FluorCam FC 800-O (PSI, Brno, CZ) vybavená otočným držákem emisních filtrů. Pro měření modro-zelené fluorescence byl použit emisní filtr s maximem propustnosti v 530 nm, a současně byly použity jako zdroj excitačního světla dvě UV lampy PowerMax 365 (Spectroline, USA), osazené každá 16 výkonnými UV LED diodami, produkujícími excitační UV radiaci s maximem ve vlnové délce 365 nm. Snímek modro-zelené fluorescence byl pořízen vždy se standardy bílého a černého filtračního papíru jako snímek v odstínech šedi a také v nepravých barvách (modrá – nízká intenzita a červená – vysoká intenzita). Zpracování snímku probíhalo v software Image J (National Institute of Mental Health, USA), kdy byla intenzita modro-zelené fluorescence jednotlivého listu vztažena relativně k minimu (černý filtrační papír) a maximum (bílý filtrační papír). Relativní hodnota modrozelené fluorescence se pak pohybovala v rozmezí 0–1.

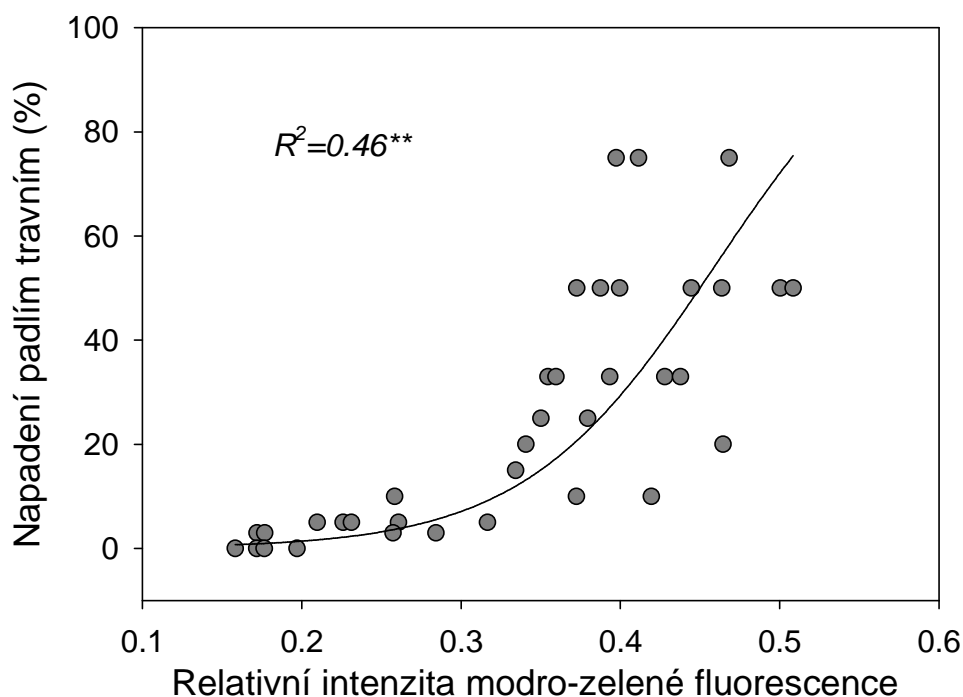
2.5.3 Výsledky detekce chorob pomocí modro-zelené zobrazovací fluorescence

2.5.3.1 Padlí travní (*Blumeria graminis f. sp. tritici*)

V místě infekce dochází k výraznému zvýšení intenzity modro-zelené fluorescence (Obr. 12). To je patrné i z histogramu rozložení intenzity (Obr. 12), kdy se zvyšující se úrovní napadení padlím travním roste intenzita modro-zelené fluorescence, dochází ke snižování četnosti pixelů v maximu intenzity a k roztahování jednotlivých křivek histogramu z důvodu rostoucí prostorové variability intenzity modro-zelené fluorescence na úrovni listu. Index determinace R^2 pro závislost mezi relativní intenzitou modro-zelené fluorescence a úrovní napadení listu je statisticky průkazný a jeho hodnota je 0,46 (Obrázek Obr-13).



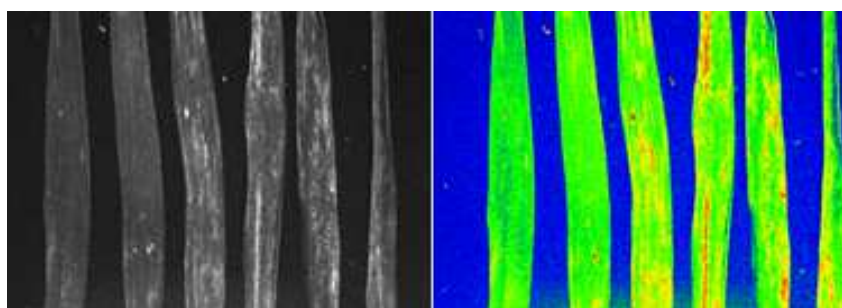
Obrázek 12 – Snímky intenzity modro-zelené fluorescence (vlevo) a zobrazení v nepravých barvách (vpravo) u listů ozimé pšenice s různou úrovní napadení padlím travním od listu bez napadení až po list s napadením 75% listové plochy. Histogram intenzity modro-zelené fluorescence při třech úrovních napadení listu padlím travním



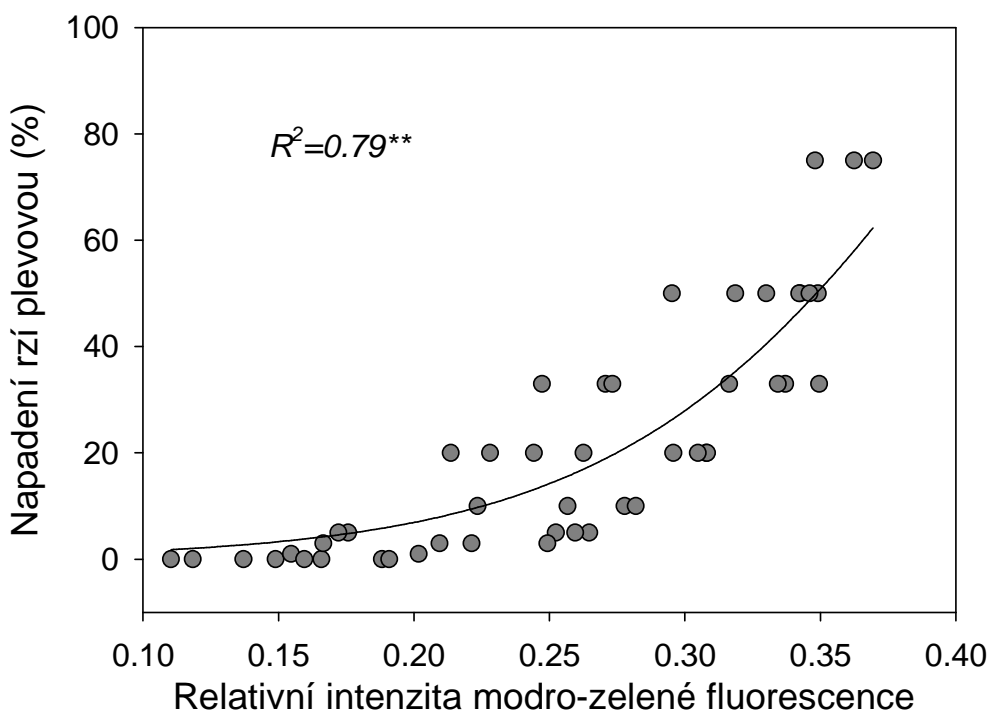
Obrázek 13 – Závislost mezi relativní intenzitou modro-zelené fluorescence a napadením pšenice ozimé padlím travním (vyjádřeno v % listové plochy) s uvedeným indexem determinace R^2

2.5.3.2 Rez plevová (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*)

Z výsledků měření zobrazovací modro-zelené fluorescence na listech s rozdílnou úrovní napadení rzí plevovou je zřejmé, že v místě infekce dochází k významnému zvýšení intenzity modro-zelené fluorescence, což potvrzuje i těsná závislost mezi relativní intenzitou modro-zelené fluorescence a úrovní napadení a velmi vysoká hodnota indexu determinace ($R^2=0,79$) pro tuto závislost (Obr. 15).



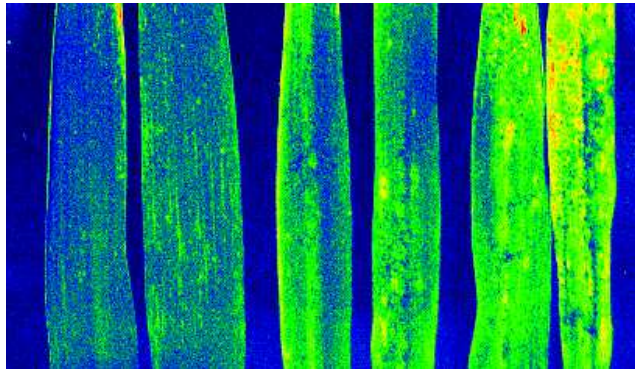
Obrázek 14 – Snímky intenzity modro-zelené fluorescence (vlevo) a zobrazení v nepravých barvách (vpravo) u listů ozimé pšenice s různou úrovní napadení rzí plevovou od listu bez napadení až po list s napadením 75% listové plochy



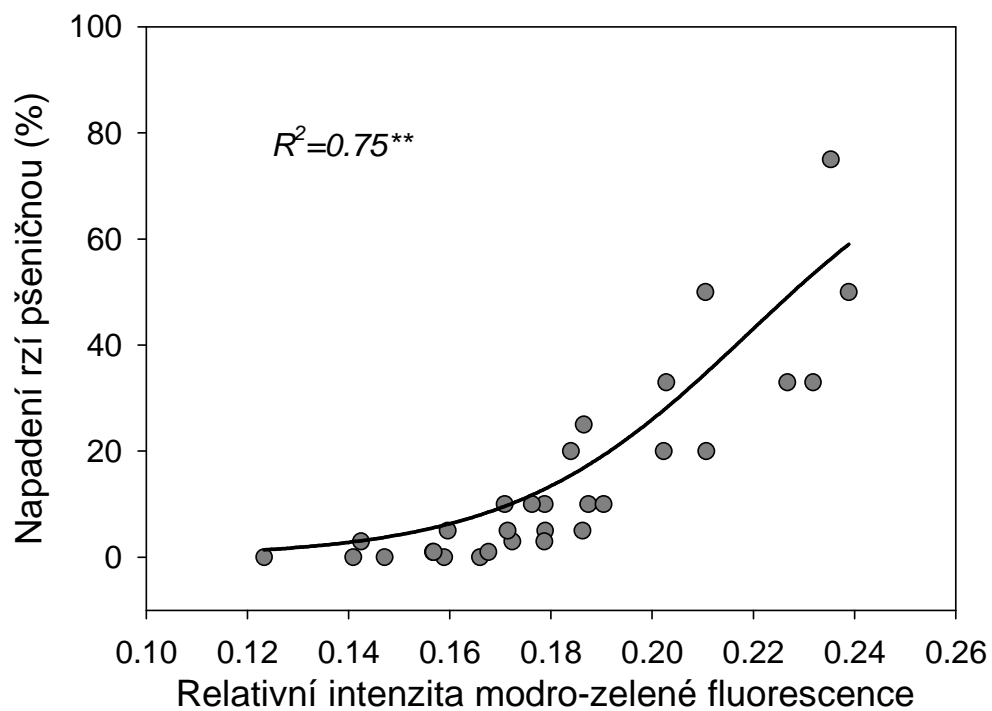
Obrázek 15 – Závislost mezi relativní intenzitou modro-zelené fluorescence a napadením listu ozimé pšenice rzí plevovou (vyjádřeno v % listové plochy) s uvedeným indexem determinace R^2

2.5.3.3 Rez pšeničná (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)

Ve srovnání s padlím travním i rzí plevovou se relativní intenzita modro-zelené fluorescence emitované při 530 nm mění s napadením rzí pšeničnou podstatně méně a změny jsou pouze v jednotkách procent. Poměrně malé změny intenzity modro-zelené fluorescence indikuje snímek (Obr. 16), na kterém je v nepravých barvách znázorněna intenzita modro-zelené fluorescence na listech s odstupňovanou intenzitou napadení rzí pšeničnou. Nicméně vyhodnocení závislosti mezi relativní intenzitou modro-zelené fluorescence a úrovní napadení ukazuje, že i tyto malé změny poměrně dobře indikují napadení rzí pšeničnou (Obr. 17). Charakter závislosti je podobný jako v případě rzí plevové, tedy že v rozmezí relativní intenzity fluorescence přibližně 0,12–0,17 se jedná pouze o vliv variability listů a tyto změny nejsou vyvolány napadením. Pokud se relativní intenzita fluorescence zvedá nad hodnotu 0,17, indikuje pak zvyšující se napadení rzí pšeničnou. Při hodnotách relativní intenzity fluorescence blížících se k 0,25 se pak jedná o vysokou úroveň napadení (okolo 75 % napadení listové plochy).



Obrázek 16 – Snímek intenzity modro-zelené fluorescence v nepravých barvách u listů pšenice ozimé s různou úrovní napadení rzí pšeničnou (0-75%)



Obrázek 17 - Závislost mezi relativní intenzitou modro-zelené fluorescence a úrovní napadení listů pšenice ozimé rzí pšeničnou (vyjádřeno v % listové plochy) s uvedeným indexem determinace R^2

2.6 Shrnutí dosažených výsledků a přínosy pro praxi

Porovnáme-li výsledky získané detekcí pomocí spektrální odrazivosti, celkově lepších výsledků bylo dosaženo při detekci padlí travního, kdy indexy determinace pro všechny zobrazené indexy odrazivosti dosáhly vyšších hodnot než v případě detekce rzi plevové a rzi pšeničné. Nejvyššího indexu determinace bylo v případě detekce napadení padlím travním a rzí pšeničnou dosaženo u indexu $ANMB_{650-725}$ a indexu ZM, v případě detekce rzi plevové bylo nejlepších výsledků dosaženo pouze pro index ZM, jenž je založený na red-edge odrazivosti. Poměrně dobrých výsledků detekce bylo dosaženo i pro další spektrální indexy jako např. pro rez pšeničnou a fotochemické indexy PRI či NPCI. Všechny závislosti mezi vybranými indexy a napadením listové plochy jednotlivými chorobami mají nelineární charakter s proloženou sigmoidní funkcí, což znamená, že závislost v určitém bodě dosahuje horní či dolní asymptoty a v těchto oblastech je detekce méně spolehlivá. Na druhou stranu poskytuje použití nelineární závislosti poměrně spolehlivou detekci napadení. Reflektance se v případě napadení padlím travním a rzí pšeničné zvyšovala ve viditelné části spektra a snižovala v blízké infračervené části spektra. To ovšem neplatí pro reflektanci při napadení rzí plevovou, kdy odrazivost při napadení byla zvýšena v celé oblasti zkoumaného spektra.

Detekcí rzi plevové na listech pšenice pomocí spektrální odrazivosti se zabývali také Bravo et al. (2003), kterým se podařilo detekovat rez se spolehlivostí 96 %. Spolehlivé a přesné detekce rzi plevové na pšenici docílili později i Huang et al. (2007), kteří pro závislost mezi fotochemickým spektrálním indexem PRI (photochemical reflectance index) a napadením dosáhli index determinace mezi 0,91–0,97. V našem případě pro stejnou chorobu činil index determinace 0,65.

Při detekci napadení pomocí infračerveného termálního zobrazování výsledky obecně ukazují, že napadení listů houbovými chorobami vede ke zvyšování povrchové teploty listů z důvodu uzavírání průduchů. Se zvyšováním teploty listů dochází současně také ke zvyšování prostorové variability, jež je dáno rozmístěním infekce na listu patrném i z histogramů teplot. Při hodnocení diferencí teplot oproti teplotě okolního vzduchu v závislosti na úrovni napadení byly nalezeny vysoké indexy determinace pro napadení padlím travním a rzí pšeničnou, avšak i v případě napadení rzí plevovou byl index determinace statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti 0,01 potvrzující rostoucí povrchovou teplotu listu s rostoucí úrovní napadení z důvodu nedostatečné transpirace listů.

Infračerveného termálního zobrazování použili Chaerle et al. (2004) pro popis lokální změny teplot v důsledku infekce patogena nebo obranných mechanismů při virových onemocněních tabáku a pro cercosporovou listovou skvrnitost řepy. Oerke a Steiner (2010) prokázali za použití metody infračerveného termálního zobrazování statisticky významné zvýšení teploty klásků ozimé pšenice napadených patogenem rodu *Fusarium*, což může být využitelné při sklizni za účelem redukce zdraví škodlivých mykotoxinů.

V případě měření relativní intenzity modro-zelené fluorescence vyšly znatelně lepší výsledky pro detekci napadení rzí plevovou a rzí pšeničnou s indexem determinace 0,79 a 0,75 oproti napadení padlím travním s indexem determinace 0,46. Všechny indexy determinace jsou statisticky průkazné na hladině pravděpodobnosti 0,01 prokazující zvyšování intenzity fluorescence v místě infekce s rostoucí úrovní napadení.

Pro účely dálkového průzkumu výskytu chorob je zřejmý vysoký potenciál použití spektrální odrazivosti a infračerveného termálního zobrazování, které mohou být použity vyhodnoceny bez ohledu na vzdálenost od pozemního měření až po satelitní snímkování. Naopak modro-zelená fluorescence vyžaduje homogenní zdroj UV excitace a je tedy využitelná pouze u pozemních senzorů nebo při fenotypování odolnosti rostlin k houbovým chorobám. Uplatnění těchto metod by se mělo stát součástí uceleného pěstebního systému tzv. precizního zemědělství, které v sobě zahrnuje diagnostiku, rozhodovací proces s mapovými výstupy (aplikační mapy) a technologie umožňující variabilní aplikace.

3 Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika shrnuje poznatky získané ověřováním metod detekce napadení obilnin houbovými chorobami založených na spektrální odrazivosti, infračerveném termálním zobrazování a modro-zelené zobrazovací fluorescenci. Spektrální odrazivost je metoda používaná již několik desetiletí pro detekci obsahu chlorofylu, indexu listové plochy, nadzemní biomasy, obsahu dusíku v rostlinách a řady dalších biofyzikálních parametrů porostů polních plodin a to jak z pozemního, leteckého tak i satelitního snímkování. Využití spektrální odrazivosti pro detekci houbových chorob je ovšem i přes velký potenciál této metody spíše ojedinělé a i v celosvětovém měřítku omezené pouze na několik nedávných vědeckých prací. Z tohoto pohledu se jedná o zcela nový postup. Zcela nové je také použití spektrální odrazivosti ve fenotypování rostlin pro detekci odolnosti genotypů k chorobám. Infračervené termální

zobrazování je i přes obecně kratší využívání v zemědělské praxi využíváno pro detekci chorob hojněji. Přesto je v naprosté většině případů infračervené termální zobrazování a to jak v dálkovém průzkumu, tak i ve fenotypování rostlin využíváno hlavně pro detekci odolnosti vůči stresu sucha nebo k monitoringu dopadu sucha v polních podmínkách. Metodika tak ukazuje perspektivu nového použití infračerveného termálního zobrazování také pro detekci chorob ať již samostatně, nebo lépe v kombinaci s některou z dalších metod detekce. Konečně pak modro-zelená fluorescence představuje zcela nový nástroj, který dosud v praxi prakticky nebyl využíván s ohledem na teprve nedávný pokrok ve vývoji UV LED diod, které jsou nezbytné pro excitaci modro-zelené fluorescence. Tato metoda má kromě využití při detekci chorob perspektivu také při detekci stresu, který ve většině případů indukuje akumulaci fenolických sloučenin v rostlinách produkujících modro-zelenou fluorescenci.

4 Popis uplatnění metodiky

Metodika slouží pro několik skupin uživatelů, z nichž hlavními koncovými uživateli jsou zemědělci – pěstitelé obilnin, kterým tyto nové metody přinesou nejen usnadnění a zpřesnění rozhodování v oblasti ochrany proti chorobám, ale umožní také dosáhnout úspor nákladů na aplikaci fungicidů tím, že budou lokálně ošetřovány pouze pozemky a části pozemků s výskytem chorob. Včasná a přesnější detekce chorob a jejich prostorového rozmístění na pozemku i celé farmě zajistí nejen přínos z pohledu úspory nákladů a snížení zátěže životního prostředí, ale umožní také dosažení vyššího výnosu případně lepší kvality produkce. Vzhledem k tomu, že práce s těmito metodami vyžaduje určité zkušenosti a znalosti, lze předpokládat, že přímé uplatnění metodiky zemědělci bude spíše nižší a že více budou tyto metody zprostředkovávány poradenskými službami, které pak budou zemědělcům nabízet hotové produkty, jako jsou například aplikační mapy. Další skupinou uživatelů budou představovat šlechtitelé, a zejména šlechtitelé využívající moderních metod fenotypování rostlin. Tyto metody šlechtitelům umožní automatickou nebo poloautomatickou selekci genotypů z pohledu odolnosti k houbovým chorobám a tudíž usnadní a zrychlí proces šlechtění obilnin na odolnost. Jelikož všechny tři metody v metodice používané jsou náročné na přístrojové vybavení, které je velmi drahé, s velkou pravděpodobností budou koncoví uživatelé využívat tuto metodiku jako službu. Zprostředkovatelem a bezprostředním uživatelem metodiky pak bude firma, která bude dané služby poskytovat koncovým uživatelům. V neposlední řadě pak uživateli metodiky budou výrobci senzorů a technologií pro dálkový průzkum a fenotypování. Metodika detekce

houbových chorob umožní rozšířit aplikační potenciál stávajících senzorů nebo povede k výrobě nových typů senzorů, které budou specializované na detekci chorob a fenotypování odolnosti k houbovým chorobám.

5 Ekonomické aspekty uplatnění metodiky

Hlavní ekonomický přínos metodiky spočívá především v úsporách nákladů na ochranu proti houbovým chorobám u obilnin. Odhadovaná úspora při uplatnění metodik detekce napadení a variabilní aplikace fungicidů představuje podle znalosti o variabilitě napadení a četnosti aplikace fungicidů tzv. naslepo minimálně 20%. Při celkové výměře pěstované ozimé pšenice v České republice asi 880 tis ha, stávajícím stavu aplikací fungicidů na 70% ploch ozimé pšenice, odhadovaných nákladech na jedno fungicidní ošetření v průměru 2000 Kč na ha a uplatnění těchto metodik na 10% ploch by uplatnění metodiky potenciálně mělo přinést v rámci celé ČR přibližně 24 600 tis Kč. K tomu je nutné přičíst zvýšení výnosů přibližně o 2% v důsledku včasné a cílené ochrany proti houbovým chorobám, ceně pšenice 4300 Kč za t a výnosu pšenice 5 t na ha to představuje zvýšení zisku o 26 500 tis Kč. Další přínosy lze očekávat ve vyšší úspěšnosti prodeje nových odrůd s odolností vůči houbovým chorobám (odhadem okolo 700 tis Kč) a ekonomické přínosy dané poskytováním poradenských služeb, výrobou nových senzorů a technologií pro fenotypování (odhadem 1 500 tis Kč).

6 Seznam použité související literatury

- Bravo, C., Moshou, D., West, J., McCartney, A., Ramon, H. (2003). Early disease detection in wheat fields using spectral reflectance. *Biosystems Eng.*, 84: 137–145.
- Buschmann, C., Langsdorf, G., Lichtenthaler, H.K. (2000). Imaging of the blue, green and red fluorescence emission of plants: an overview. *Photosynthetica*, 38(4): 483–491.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R. van der Straeten, D. (2004). Thermal and Chlorophyll-Fluorescence Imaging Distinguish Plant-Pathogen Interactions at an Early Stage. *Plant Cell Physiology*, 45(7): 887–896.

- Croft, H., J.M. Chen, a Y. Zhang. The Applicability of Empirical Vegetation Indices for Determining Leaf Chlorophyll Content over Different Leaf and Canopy Structures. *Ecological Complexity* 17: 119–30.
- Evans, N., Baierl, A., Semenov, M.A., Gladders, P., Fitt, B.D. (2008). Range and severity of a plant disease increased by global warming. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(22): 525–531.
- Huang, W., Lamb, D.W., Niu, Z., Zhang, Y., Liu, L., Wang, J. (2007). Identification of yellow rust in wheat using in-situ spectral reflectance measurements and airborne hyperspectral imaging. *Precision Agriculture*, 8(4–5): 187–197
- Klem, K., Míša, P., Míša, M., Křen, J. (2014). Využití měření spektrální odrazivosti a odvozených specializovaných vegetačních indexů v pěstební technologii jarního ječmene: metodika pro zemědělskou praxi. Kroměříž, Brno, Havlíčkův Brod. ISBN 978-80-87555-12-5.
- Lenthe, J.H., Oerke, E.C., Dehne, H.W. (2007). Digital infrared thermography for monitoring canopy health of wheat. *Precision Agriculture*, 8(1–2): 15–26.
- Luck, J., Spackman, M., Freeman, A., Trębicki, P., Griffiths, W., Finlay, K., Chakraborty, S. (2011). Climate change and diseases of food crops. *Plant Pathology*, 60(1): 113–121.
- Lukas, V., Ryant, P., Neudert, L., Dryšlová, T., Gnip, P., Smutný, V. (2012). Stanovení a optimalizace diferencovaných dávek dusíkatých hnojiv v precizním zemědělství: metodika pro praxi. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-686-4.
- Main, R., Cho M.A, Mathieu R., O’Kennedy M.M., Ramoelo A., Koch S. (2011). An investigation into robust spectral indices for leaf chlorophyll estimation. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 66 (6): 751–61.
- Mahlein, A.K., Oerke, E.C., Steiner, U., Dehne, H.W. (2012). Recent advances in sensing plant diseases for precision crop protection. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1): 197–209.
- Mahlein, A.K. (2016). Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping. *Plant Disease*, 100(2): 241–251.
- Nilsson, H.E. (1991). Hand-held radiometry and IR-thermography of plant diseases in field plot experiments. *International Journal of Remote Sensing*, 12(3): 545–557.
- Oerke, E.C., Steiner, U. (2010). Potential of Digital Thermography for Disease Control. In: Oerke, E.C., Gerhards, R., Menz, G., Sikora, R.A. (eds): *Precision Crop Protection - the Challenge and Use of Heterogeneity*. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 167–182.

- Ortiz-Bustos, C.M., Pérez-Bueno, M.L., Barón, M., Molinero-Ruiz, L. (2017). Use of Blue-Green Fluorescence and Thermal Imaging in the Early Detection of Sunflower Infection by the Root Parasitic Weed *Orobanche cumana* Wallr. *Frontiers in Plant Science* 8: Article 833.
- Paterson, R.R.M., Lima, N. (2010). Toxicology of mycotoxins. In: Luch, A. (eds): *Molecular, clinical and environmental toxicology* Experientia Supplementum, vol 100., Birkhäuser Basel, s. 31–63)..
- Shaw, M.W., Osborne, T.M. (2011). Geographic distribution of plant pathogens in response to climate change. *Plant Pathology*, 60(1): 31–43.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418: 671–677.

7 Seznam publikací, které předcházely metodice

- Klem, K., Míša, P., Míša, M., Křen, J. (2014). Využití měření spektrální odrazivosti a odvozených specializovaných vegetačních indexů v pěstební technologii jarního ječmene: metodika pro zemědělskou praxi. Kroměříž, Brno, Havlíčkův Brod. ISBN 978-80-87555-12-5.
- Mishra, K. B., Mishra, A., Klem, K. (2016). Plant phenotyping: a perspective. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(4), 514-527.
- Klem, K., Rajsnerová, P., Novotná, K., Míša, P., Křen, J. (2014). Changes in vertical distribution of spectral reflectance within spring barley canopy as an indicator of nitrogen nutrition, canopy structure and yield parameters. *Agriculture (Polnohospodárstvo)*, 60(2), 50-59.
- Klem, K., Mishra, K. B., Novotná, K., Rapantová, B., Hodaňová, P., Mishra, A., Kováč, D., Urban, O. (2017). Distinct growth and physiological responses of *Arabidopsis thaliana* natural accessions to drought stress and their detection using spectral reflectance and thermal imaging. *Functional Plant Biology*, 44(3), 312-323.
- Vítek, P., Novotná, K., Hodaňová, P., Rapantová, B., Klem, K. (2017). Detection of herbicide effects on pigment composition and PSII photochemistry in *Helianthus annuus* by Raman

spectroscopy and chlorophyll a fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 170, 234-241.

Klem, K., Záhora, J., Zemek, F., Trunda, P., Tůma, I., Novotná, K., Hodaňová, P., Rapantová, B., Hanuš, J., Vavříková, J., Holub, P. (2018). Interactive effects of water deficit and nitrogen nutrition on winter wheat. Remote sensing methods for their detection. *Agricultural Water Management*, 210, 171-184.