

T A  
Č R



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV  
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

VUOS a.s.

**METODIKA DETEKCE FOSFONÁTŮ  
V ROSTLINNÝCH ČÁSTECH JÁDROVIN  
S OHLEDEM NA JEJICH CHOVÁNÍ**

Aneta Bílková a kol.



**CERTIFIKOVANÁ  
METODIKA  
2022**





VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
VUOS a.s.

# METODIKA DETEKCE FOSFONÁTŮ V ROSTLINNÝCH ČÁSTECH JÁDROVIN S OHLEDEM NA JEJICH CHOVÁNÍ

Aneta Bílková a kol.



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
2022

Autorský kolektiv:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
RNDr. Aneta Bílková, Ing. Pavlína Knapová, Ing. Michal Skalský, Ph.D.

VUOS a.s.

Ing. Jiří Kwiecien Ph.D., Ing. Martina Svárovská

Název:

Metodika detekce fosfonátů v rostlinných částech jaderovin s ohledem na jejich chování

Vydal:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,  
Holovousy 129, 508 01 Hořice

Vydáno v roce 2022

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: Aneta.Bilkova@vsuo.cz

Foto: RNDr. Aneta Bílková

Oponenti:

Odborný oponent z oboru:

Ing. Jana Kloutvorová

Oponent ze státní správy:

Ing. Radim Štěpán Ph.D.

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury ČR, je výstupem řešení projektu TJ04000245 „Studium chování fosfonátů s cílem snížení ztrát v rostlinných produktech“. Při zpracování metodiky byla rovněž využita infrastruktura projektu DKRVO 1522.

Ministerstvo zemědělství ČR schválilo publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučilo ji pro využití v zemědělské praxi. Publikaci bylo uděleno Osvědčení číslo 59698/2022 MZE-13120 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

# OBSAH

ANOTACE.....	7
ANNOTATION .....	7
1. ÚVOD.....	9
2. CÍL METODIKY .....	10
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY .....	10
3. 1. Integrovaná produkce ovocných plodin .....	10
3. 2. Aplikace pesticidů ve výsadbě jaderovin .....	11
3.3. Analytické stanovení reziduí fosfonátů.....	22
3.3.1. Optimalizace MRM přechodů pro sledované analyty .....	22
3.3.2. Výběr vhodných vnitřních standardů (IS) pro kvantifikaci kyseliny fosfonové a fosetylu.....	23
3.3.3. Chromatogramy a retenční časy sledovaných analytů a vnitřních standardů .....	24
3.3.4. Kvantifikace metodou vnitřního standardu .....	26
3.3.5. Příprava vzorku k chemické analýze, přístroj a podmínky analýzy.....	27
3.3.6. Validace analytické metody pro stanovení fosfonátů ve vybraných matricích .....	29
3. 4. Hodnocení degradace reziduí fosfonátů .....	31
3.4.1. Analyzované vzorky dřeva .....	33
3.4.2. Analyzované vzorky listů a výhody .....	48
3.4.3. Analyzované vzorky plodů a zpracovatelských produktů (křížal).....	65
3.4.4. Vývoj koncentrace reziduí v částech výsadby bez nové aplikace postřiku .....	66
3.4.5. Vývoj koncentrace reziduí v mladším a starším dřevě, varianta 5 .....	69
3.4.6. Páté varianty – pozorovaný průběh obsahů fosfonátů .....	70
3.5 Celkové hodnocení.....	71
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ .....	72
5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY .....	72
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY .....	73
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	74
8. PUBLIKACE PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE .....	75
9. PŘÍLOHY .....	76
9. 1. Obsahy reziduí pesticidů v jednotlivých variantách přípravku Luna Care (LV1-LV5) a Delan Pro (DV1-DV5) .....	76
9. 2. Fotodokumentace.....	86



## **ANOTACE**

Předkládaná publikace shrnuje získané poznatky výskytu fosfonátů v rostlinných částech ovocných plodin z hlediska jejich chování v rostlině. Metodika obsahuje jak základní informace o popisu přípravků obsahujících fosfonáty, tak i nové poznatky získané v rámci realizovaného projektu, především pak ty, které jsou zaměřeny na degradaci těchto látek s ohledem na dobu aplikace přípravků. Metodika zahrnuje výsledky podrobného monitoringu degradace reziduí fosfonátů v rostlinných částech ovocných stromů jádrovín a ve zpracovatelských produktech (křížalách). Metodika je určena především pro ovocnáře, kteří mají zájem o informaci chování fosfonátů v rostlinných matricích jádrovín a zároveň získat informaci a odbourávání těchto látek z hlediska aplikace postřiku.

## **ANNOTATION**

The presented publication summarizes the knowledge obtained on the occurrence of phosphonates in plant parts of fruit crops from the point of view of their behavior in the plant. The methodology contains both basic information about the description of preparations containing phosphonates, as well as new knowledge obtained within the implemented project, especially those that are focused on the degradation of these substances with regard to the time of application of the preparations. The methodology includes the results of detailed monitoring of the degradation of phosphonate residues in the plant parts of fruit trees and in processing products (cross-breeds). The methodology is primarily intended for fruit growers who are interested in information on the behavior of phosphonates in plant matrixes of cores and at the same time to obtain information and degradation of these substances from the point of view of application of spraying.





## 1. ÚVOD

Fosfonáty jsou skupinou systémových fungicidů používaných převážně v zemědělství, které zahrnují Fosetyl-Al a draselné, sodné nebo amonné fosfonátové soli (Aberton a kol., 1999; Ali a Guest, 1998; Anderson a Guest, 1990; FAO, 2017). Fosetyl-Al je ISO název hlinité soli ethylfosfonátu, tj. tris-(ethylfosfonátu hlinitého) podle nomenklatury IUPAC. Účinná látka Fosetyl-Al se prodává pod různými obchodními názvy, pravděpodobně nejběžnější je přípravek Aliette®. Fosetyl-Al byl poprvé komercializován jako zemědělský systémový fungicid v roce 1977 a je registrován pro použití na více než 100 plodinách (FAO, 2015). K-Na-fosfonáty jsou soli vznikající reakcí kyseliny fosfonové  $\text{HPO}(\text{OH})_2$  s hydroxidy draselnými nebo sodnými, zatímco fosfonáty  $\text{NH}_4$  jsou amonné soli. První studie o použití kyseliny fosfonové a jejích derivátů začaly v poválečném období s cílem nalézt alternativy k fosfátovým hnojivům. Testy však ukázaly, že nejsou tak účinné jako konvenční zdroje fosforu, tj. jako jsou deriváty kyseliny fosforečné (Manghi *et al* 2021). Jednoduché soli kyseliny fosfonové, např. fosfonát draselný, však nebyly považovány za fungicidy, dokud nebylo zjištěno, že Fosetyl-Al je v rostlinách odbouráván a fosfonátový aniont je aktivní složkou. V posledních letech se objevilo několik diskusí ohledně těchto produktů kvůli detekci reziduí v ovoci a zelenině z ekologického zemědělství, které tyto pesticidy zakazuje (Trinchera *et al.*, 2020).

Akumulace fosfonátů v plodinách nebyla způsobena výhradně nepovoleným používáním pesticidů, ale souvisela i s jejich přítomností v hnojivech povolených v ekologickém zemědělství. Použití zakázaných látek v ekologickém zemědělství by mohlo být buď neúmyslné z důvodu přítomnosti kontaminace v hnojivech, nebo by mohlo odrážet záměr některých výrobců zvýšit účinnost hnojiv v produktu pomocí ochrany rostlin, aniž by museli platit náklady na registrace jako pesticid. Dne 25. června 2019 bylo Evropským parlamentem a Radou vyhlášeno nové nařízení EU o hnojivech a pozměňující nařízení (EU-FPR) 1009/2019, které stanoví pravidla pro trh pro dodávání hnojivých výrobků EU a mění předchozí nařízení (ES 1069/2009 a ES 1107/2009) a kterým se zrušuje nařízení (ES) 2003/2003 (Evropská unie, 2019 b). Příloha 2, část II, bod 6 nařízení 1009/2019 stanoví, že „fosfonáty nesmějí být záměrně přidávány do žádného hnojivého produktu EU. Neúmyslná přítomnost fosfonátů nesmí překročit 0,5 % hmotnostních“.

Možné provedení tohoto posledně uvedeného bodu je však sporné, protože nová směrnice má některé zásadní problémy, které by měly být jasně řešeny, aby se předešlo nesprávnému výkladu. Zaprvé v této věci panuje obecný zmatek, protože v běžném jazyce a vědeckých dokumentech se používá obecný název „fosfit“ namísto „fosfonátu“, což je podle nomenklatury IUPAC správnější. Za druhé, EU-FPR neuvádí referenční postup pro kvantitativní analýzu fosfonátů v hnojivech (Damhus *et al.*, 2005). V neposlední řadě není jasné, zda mají fosfonáty pro rostliny nutriční roli, aby ospravedlnila jejich přítomnost nebo použití jako hnojivo, nebo zda mohou být fosfonáty produkovány přímo rostlinou, s výjimkou toho, že přítomnost reziduí je výsledkem aplikace pesticidů.

K vychytávání fosfátů a jejich redistribuci v rostlině dochází prostřednictvím specifických transportérů, proteinů plazmatické membrány kódovaných geny patřícími do rodiny Pht (Phosphate transporter) (Varadarajan *et al.*, 2002). Malusá a Tosi (2005) zkoumali mobilizaci fosfátů v jabloních a zbytky byly nalezeny v ovoci pouze týden po ošetření Ali-ette®. Tato druhá studie také prokázala, že koncentrace reziduí pozitivně korelovala s množstvím aplikovaného fosfonátu a že dlouhodobé ošetření v průběhu let navíc zvyšuje koncentraci rezidua v ovoci. Zbytky fosfonátů byly nalezeny v plodech, pupenech a kořenech až dva roky po přerušení postřiku. To naznačuje fakt, že fosfonáty mohou být remobilizovány ze zásobních orgánů rostlin, transportovány do jiných orgánů během vegetačního období a případně znovu akumulovány v ovoci.

## 2. CÍL METODIKY

Jedním z cílů projektu „Studium chování fosfonátů s cílem snížení ztrát v rostlinných produktech“ byl vývoj a optimalizace metody pro monitoring reziduí fosfonátů v rostlinných částech jádřovin. Znalosti o chování fosfonátů v částech rostlin jsou klíčové pro analýzu rizika reziduí fosfonátů ve zpracovatelských produktech.

Cílem naší metodiky bylo osvětlit chování fosfonátů v rostlinných částech jádřovin a zjistit vzájemné korelace. Za tímto účelem byla navržena a validována optimalizovaná metoda pro stanovení kyseliny fosfonové a fosetylu-Al (forma fosetylu). Analýza reziduí byla provedena metodou kapalínové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Nedílnou součástí metodiky je důkladný monitoring degradace reziduí fosfonátů v rostlinných částech jádřovin a ve zpracovatelských produktech s ohledem na dobu aplikace přípravků. Tato metodika bude předána k využití pěstitelům, ovocnářům, ale i zpracovatelům ovoce pro možné využití při monitorování výskytu reziduí jednak v čerstvém ovoci, ale i zpracovatelských produktech, s cílem dodržení běžné kontroly potravin, včetně produktů ekologického zemědělství.

## 3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

V této metodice jsou zahrnuty výsledky monitoringu reziduí fosfonátů - přípravků, které jsou běžně využívány v ochraně jádřovin. V metodice je přiložen modelový postřikový plán včetně termínů aplikací. Jsou porovnány dvouleté výsledky a degradační křivky reziduí fosfonátů.

### 3. 1. Integrovaná produkce ovocných plodin

Mezi přípravky obsahující fosfonáty dále patří Alginure, BFA1-14, Merplus, Mildicut. Tyto přípravky se používají v ochraně proti strupovitosti, bakteriální spále růžovitých a chorobám způsobených oomycety („fire blight“). Původcem této bakteriální choroby je *Erwinia amylovora*. Příznaky poškození jsou: vadnutí a nekróza pletiv, tvorba bakteriálního exudátu. Napadené květy tmavnou a mění barvu

do hněda až černá. Stejně tak napadené výhony hnědnou, až černají a na vrcholech výhonů se vytváří charakteristický hákovitý ohyb. Listy na těchto výhonech vadnou. Bakteriální infekce se z květů a výhonů může roznést na větev, kmen i podnož. V případě, že je infikována i podnož, dochází ve většině případech k uhynutí jedince (Oušedníčková *et al.* 2021).

Pro omezení šíření a snížení rizika způsobených škod bakteriální spálou, jsou prováděna různá ochranná opatření, která zahrnují i aplikaci přípravků obsahujících fosfonáty. A to především přípravku Aliette 80 WG, účinná látka Fosetyl-Al (800 g/kg) s registrací do jabloní i hrušní v dávce 2-3 kg/ha (OL 28 dní). K tomuto ošetření se doporučuje přistoupit při vlhkém a velmi teplém počasí, což bývá z pravidla v letním období. Výsledky různých výzkumů a průzkumů detekujících obsah reziduí v ovoci naznačují, že perzistence fosfonátů v rostlinách je i víceletá. To může pěstitelům ovoce způsobovat významné problémy při uplatnění na trhu u řetězců, které vyžadují přesně stanovené množství reziduí účinných látek.

### 3. 2. Aplikace pesticidů ve výsadbě jádřovin

Přípravky s fosfonáty byly aplikovány v experimentální výsadbě jabloní na odrůdě 'Idared' ve VŠUO Holovousy s.r.o. Aplikace přípravků byly zahájeny přibližně půl roku před sklizní plodů s ohledem na klimatické podmínky a očekávaný termín dozrávání. Meteorologické údaje klimatických podmínek z let 2020 a 2021 jsou uvedeny níže v této kapitole. Pokusná výsadba byla rozdělena do 5 variant, v nichž byly aplikovány 2 vybrané přípravky. Jednotlivé varianty se od sebe lišily termínem počátku postřiku. V první variantě došlo k první aplikaci postřiku zhruba půl roku před sklizní plodů, varianty 2 – 4 byly posunuty cca o měsíc déle, tzn. u 4. varianty došlo k aplikaci přípravku cca měsíc před sklizní plodů. Pátá varianta byla směšnou variantou, kdy byly vždy v termínu postřiku variant 1 – 4 aplikovány i postřiky zároveň na variantu 5. Aplikace pesticidů probíhala pomocí traktorového postřikovače NP 400S (AKP), který byl vybaven postřikovým rámem v délce 200 cm. Na aplikačním rámu bylo celkem umístěno 7 trysek typu ALBUZ ATR ve vzdálenosti 25 cm, které zajišťovaly rovnoměrné pokrytí stromů postřikovou kapalinou. Pojezdová rychlost traktoru při aplikaci přípravků byla 8 km/h. Termíny aplikací včetně typů odebraných vzorků v daných termínech – přípravek Delan Pro a Luna Care jsou podrobně popsány v **Tabulce 1 – 5**. Vždy byly odebírány i vzorky den před aplikací pro získání degradační křivky.

Tabulka 1: Termíny aplikací včetně typů odebraných vzorků v daných termínech – přípravek Delan Pro a Luna Care pro variantu 1

1. varianta	19. 5.	20. 5.	27. 5.	3. 6.	10. 6.	17. 6.	15. 7.	12. 8.	14. 10.	konec října		počet vzorků
	den před aplikací	den aplikace	týden po aplikaci	14 dní po aplikaci	3 týdny po aplikaci	končí OL 1 měsíc	2 měsíc	3 měsíc	sklizeň	před opadem listů	-	
Listy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Dřevo 2 leté	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Plod	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	22
Zpracovatelský produkt	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Tabulka 2: Termíny aplikací včetně typů odebraných vzorků v daných termínech – přípravek Delan Pro a Luna Care pro variantu 2

2. varianta	23. 6.	24. 6.	1. 7.	8. 7.	15. 7.	22. 7.	19. 8.	15. 9.	14. 10.	před opadem listů		počet vzorků
	den před aplikací	den aplikace	týden po aplikaci	14 dní po aplikaci	3 týdny po aplikaci	končí OL 1 měsíc	2 měsíc	3 měsíc	sklizeň	před opadem listů	-	
Listy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Dřevo 2 leté	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Plod	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	22
Zpracovatelský produkt	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Tabulka 3: Termíny aplikací včetně typů odebraných vzorků v daných termínech – přípravek Delan Pro a Luna Care pro variantu 3

3. varianta	28. 7.	29. 7.	5. 8.	12. 8.	19. 8.	26. 8.	15. 9.	14. 10.		počet vzorků
								před opadem listů	sklizeň	
Materiál	den před aplikací	den aplikace	týden po aplikaci	14 dní po aplikaci	3 týdny po aplikaci	končí OL 1 měsíc	2. měsíc			
Listy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Dřevo 2 leté	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Plod	-	-	-	-	-	-	-	1	-	20
Zpracovatelský produkt	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

Tabulka 4: Termíny aplikací včetně typů odebraných vzorků v daných termínech – přípravek Delan Pro a Luna Care pro variantu 4

4. varianta	15. 9.	16. 9.	23. 9.	30. 9.	7. 10.	14. 10.	14. 10.		počet vzorků
							končí OL 1 měsíc	před opadem listů	
Materiál	den před aplikací	den aplikace	7 dní po aplikaci	14 dní po aplikaci	21 dní po aplikaci	končí OL 1 měsíc			
Listy	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Dřevo 2 leté	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Plod	1	1	1	1	1	1	1	-	21
Zpracovatelský produkt	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Tabulka 5: Termíny aplikací včetně typů odebraných vzorků v daných termínech – přípravek Delan Pro a Luna Care pro variantu 5

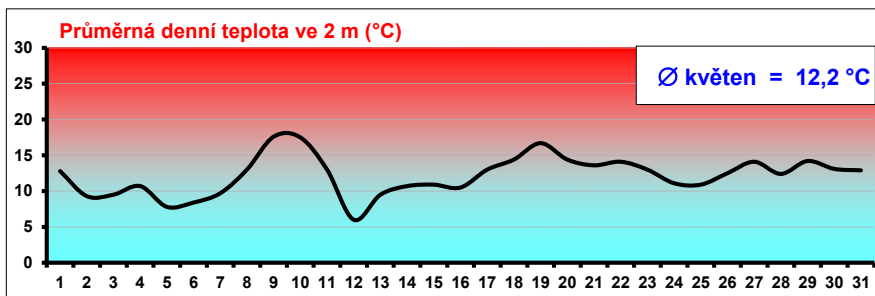
5. varianta (směšná aplikace)	19. 5.	20. 5.	27. 5.	3. 6.	10. 6.	23. 6.	24. 6.	1. 7.	8. 7.	15. 7.	28. 7.	29. 7.
	před 1. aplikací	den 1. aplikace	týden po 1. aplikaci	14 dní po 1. aplikaci	3 týdny po 1. aplikaci	před 2. aplikací	2. aplikace	týden po 2. aplikaci	14 dní po 2. aplikaci	3 týdny po 2. aplikaci	před 3. aplikací	3. aplikace
Listy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dřevo 2 leté	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1
Plod	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zpracovatelský produkt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dřevo - víceleté	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1

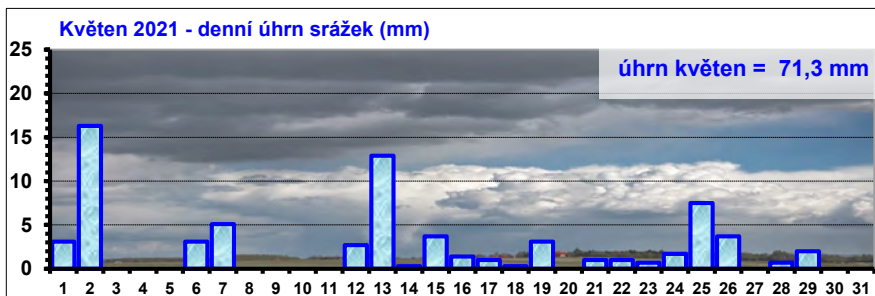
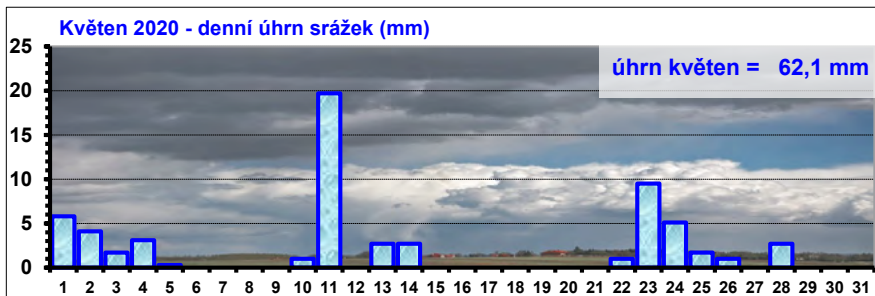
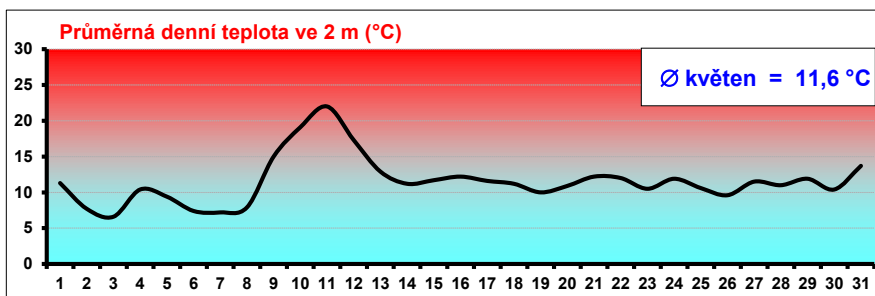
5. 8. týden po 3. aplikaci	12. 8.	19. 8.	15. 9.	16. 9.	23. 9.	30. 9.	7. 10.	14. 10.	před opadem listů	počet vzorků
	14 dní po 3. aplikaci	3 týdny po 3. aplikaci	před 4. aplikací	4. aplikace	týden po 4. aplikaci	14 dní po 4. aplikaci	3 týdny po 3. aplikaci	sklizeň		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	44
-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Meteorologická data pro rok 2020 a 2021** měřena automatickou meteorologickou stanicí *MeteoUNI (VŠÚO Holovousy s.r.o. - parcela Kamenec)*

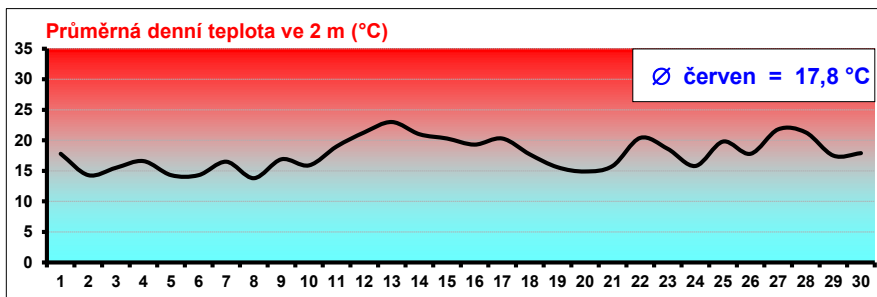
**Květen 2020**



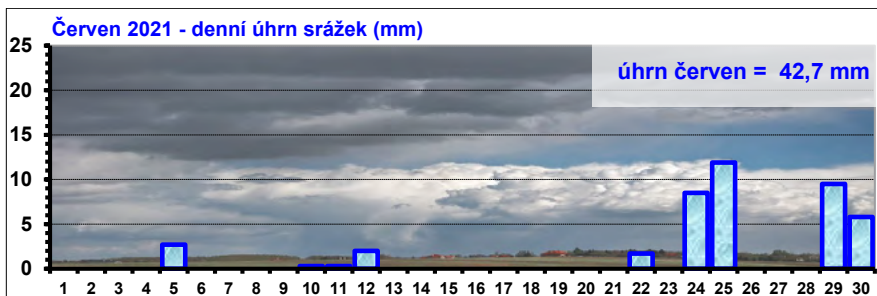
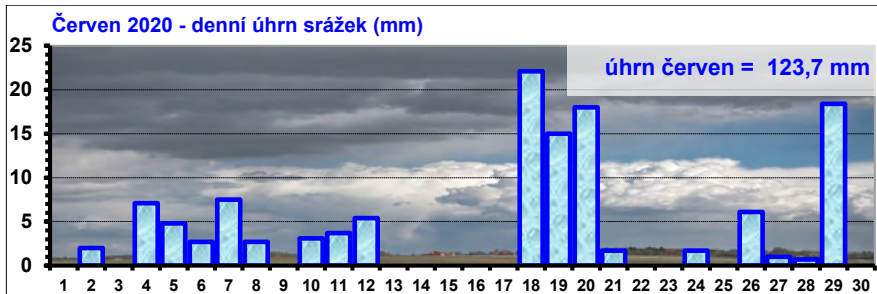
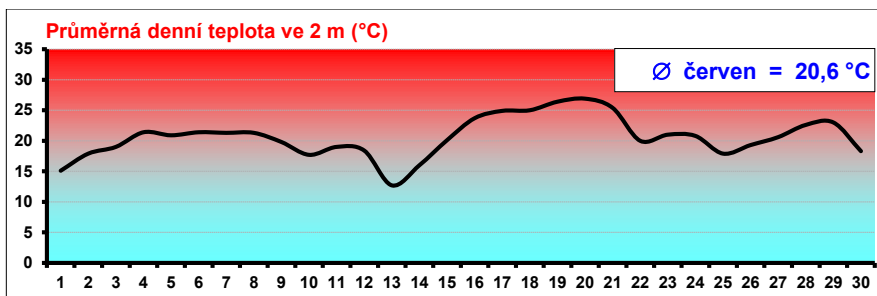
**Květen 2021**



## Červen 2020

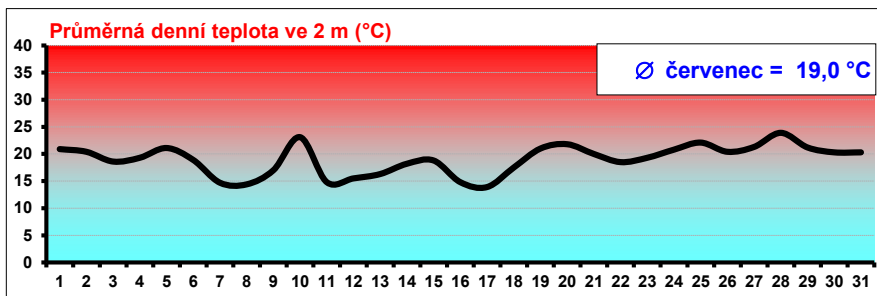


## Červen 2021

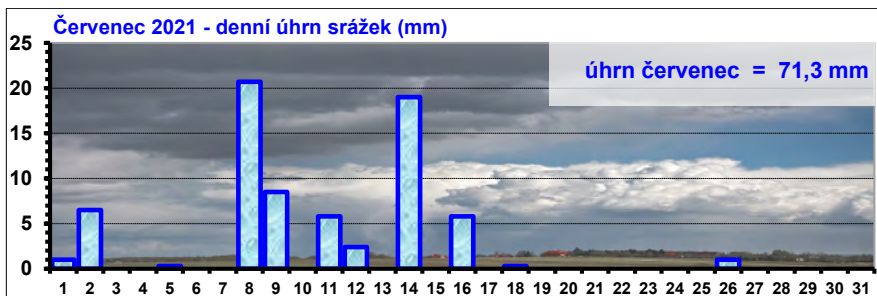
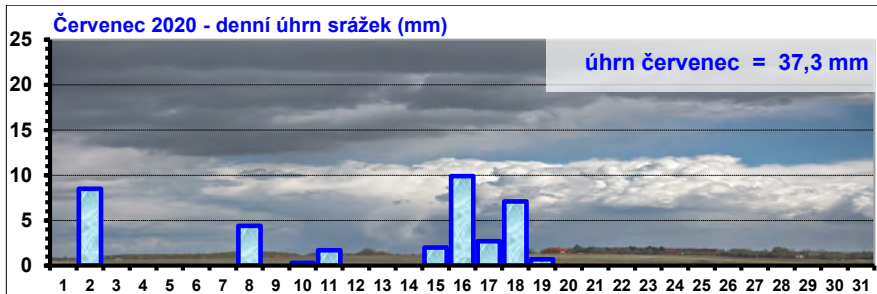
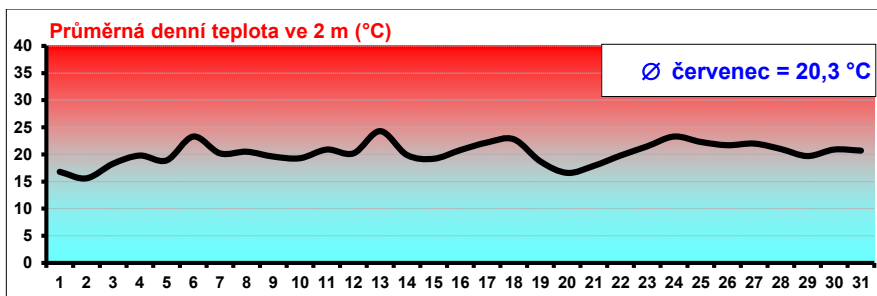




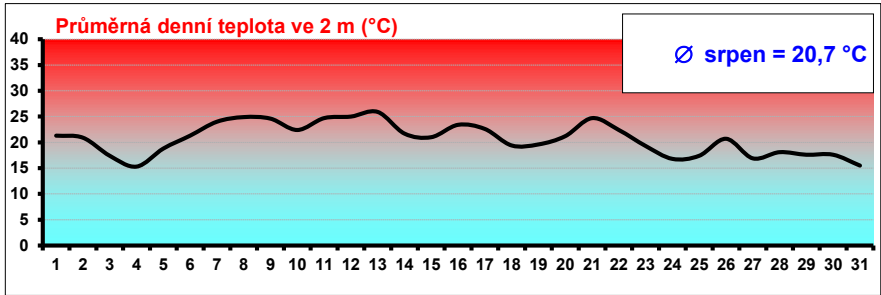
## Červenec 2020



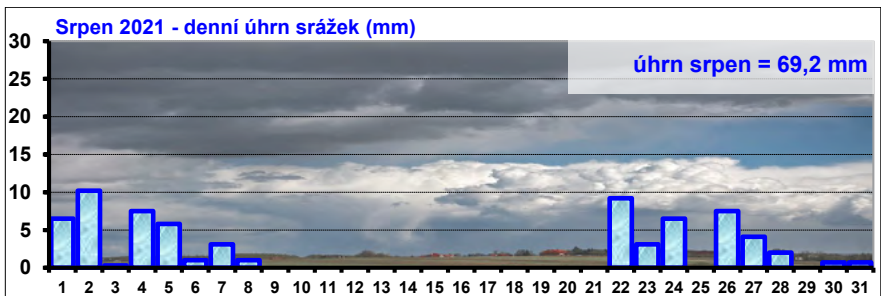
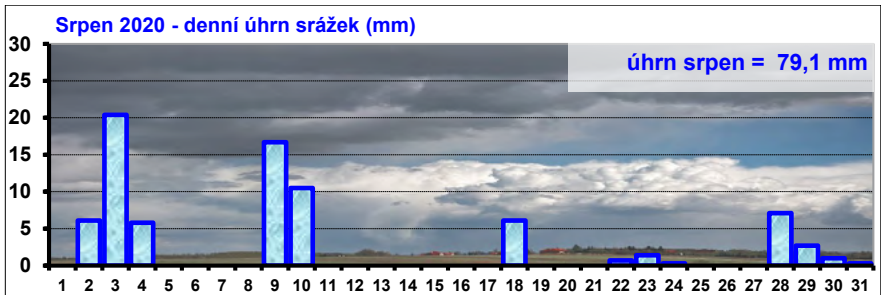
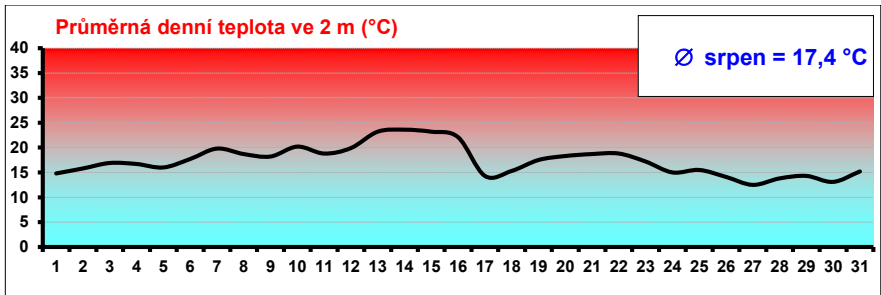
## Červenec 2021



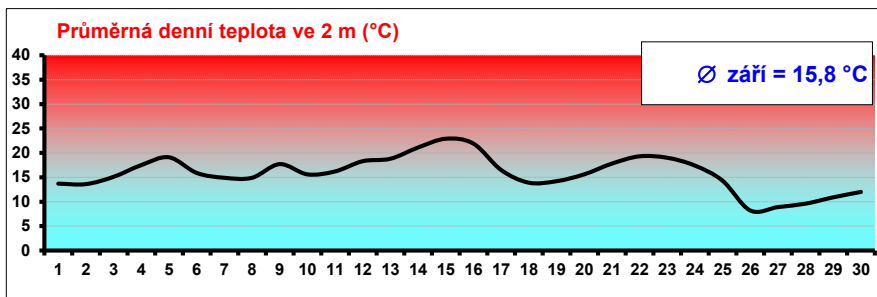
### Srpen 2020



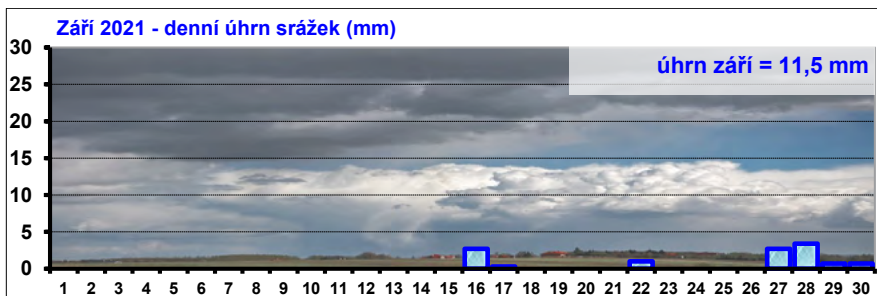
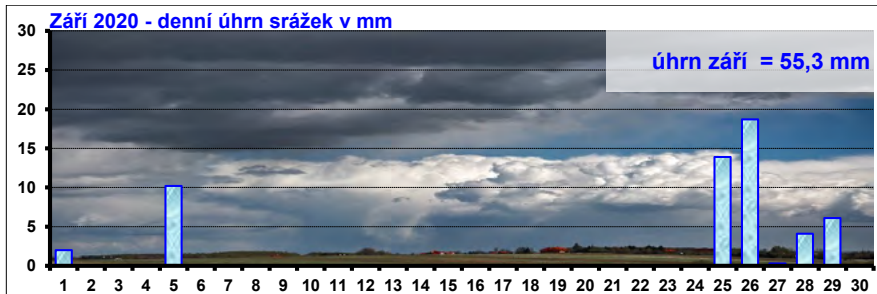
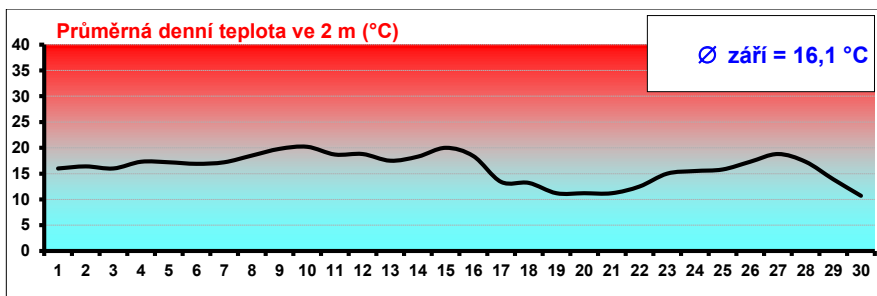
### Srpen 2021



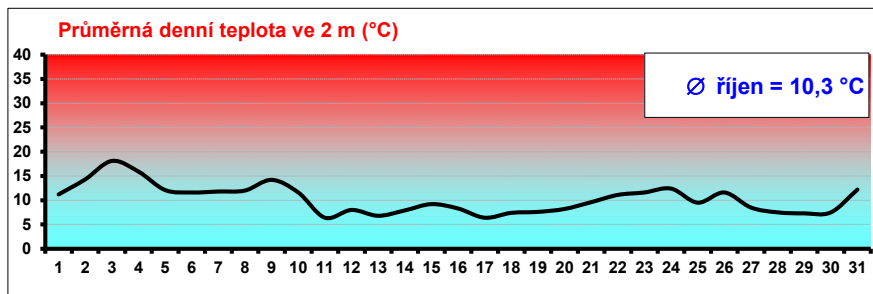
### Září 2020



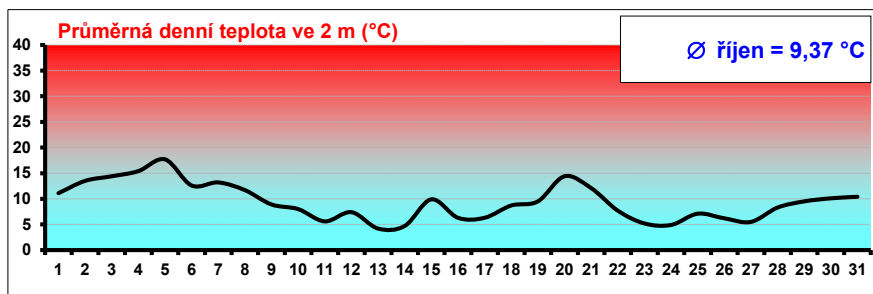
### Září 2021



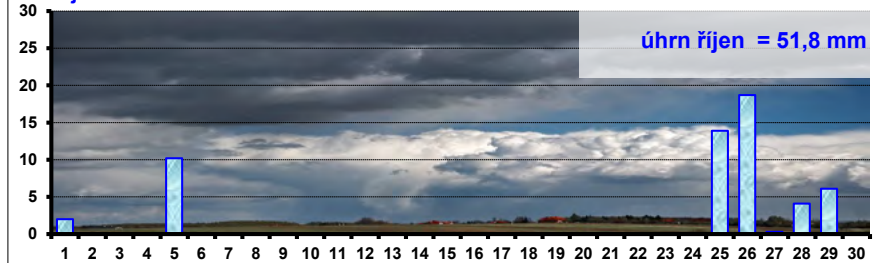
## Říjen 2020



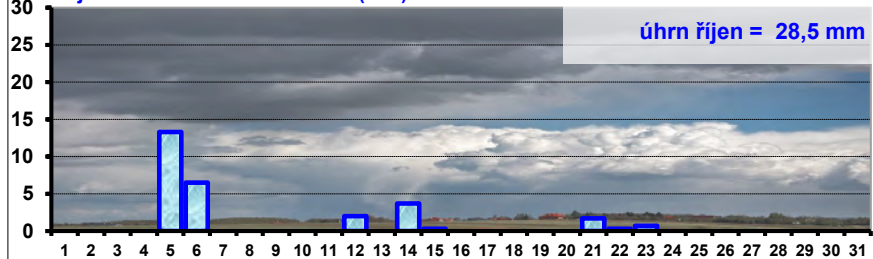
## Říjen 2021



## Říjen 2020 - denní úhrn srážek v mm



## Říjen 2021 - denní úhrn srážek (mm)



## **Aplikované přípravky a účinné látky**

Pro výzkum chování a degradace reziduí fosfonátů byly vybrány 2 přípravky s účinnými látkami, které jsou popsány v následujícím textu.

### **Delan® Pro**

Fungicidní přípravek ve formě suspenzního koncentrátu k ochraně jaderovin proti strupovitosti a k ochraně révy proti plísní révové a černé hnilobě. Účinné látky tohoto přípravku jsou dithianon (125 g) a fosfonáty draselné. Aplikovaná dávka na jabloně je 2,5 l/ha.

Dithianon je kontaktní látka s preventivním účinkem, která působí na sulfanylovou (SH) skupinu nacházející se v aminokyselině cystein. V rostlině není účinná látka translokována. Fosfonáty draselné působí systemicky, a to primárně přímou inhibicí patogena, tj. zpomalením jeho růstu, omezením tvorby a uvolňování spor. Nepřímo inhibují patogena stimulací obrany hostitele.

### **Luna Care**

Fungicidní přípravek ve formě vodorozpuštěných granulí k foliární ochraně jabloně a hrušně, proti houbovým chorobám. Účinné látky tohoto přípravku jsou fluopyram a fosetyl-Al. Aplikovaná dávka na jabloně je 3 kg/ha.

Luna® Care působí proti houbovým chorobám dvěma odlišnými mechanismy účinku. Zasahuje do respiračního řetězce enzymu sukcinát dehydrogenázy, kdy inhibuje přenos elektronů a současně ovlivňuje metabolismus aminokyselin, skladbu bílkovin a posiluje odolnost rostlinných pletiv vůči infekci. Ve vývojovém cyklu houbových chorob omezuje klíčení zoosporangia, inhibuje růst klíčnicích vláken a etablování haustorií, blokuje růst mycelia a částečně omezuje sporulaci. Luna® Care účinkuje především proti houbám z tříd Ascomycetes a Oomycetes a některým bakteriím (*Pseudomonas spp.*, *Erwinia*). Působí systémově, pohyb v rostlině je akropetální (xylémem) i bazipetální (floémem). Přípravek je přijímán jak nadzemními částmi rostlin, tak i kořeny. Účinkuje především preventivně, nejlépe působí v době aktivního růstu rostlin, vyznačuje se dlouhodobým účinkem. Velmi dobře chrání mladé části rostlin.

Fungicid Luna® Care je možné využít ke spolehlivé ochraně jak proti strupovitosti, tak i padlí jabloňovému. Navíc vykazuje vedlejší účinnosti proti nektriové rakovině a bakteriální spále jabloně a hrušně a proti rakovinnému odumírání větví hrušně (pseudomonádová spála hrušně).

Při dodržení uvedených aplikačních dávek a aplikačních podmínek může být přípravek Luna® Care použit v integrovaných systémech ochrany rostlin za současného respektování aktuálních pravidel systému IP.

### 3.3. Analytické stanovení reziduí fosfonátů

Stanovení kyseliny fosfonové a fosetylu ve vzorcích plodů (jablka), dřeva, listů a půdy probíhalo technikou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Je to vysoce selektivní instrumentace pro sledování nízkých koncentrací analytů. Selektivita detekce je zvýšena díky využívání MRM techniky měření, kdy z iontů (mateřských iontů) produkovaných ESI iontovým zdrojem v MS detektoru díky fragmentacím po kolizi s molekulami dusíku vznikají dceřiné ionty, charakteristické pro dané analyty. Správná identifikace sloučeniny je tak dána retenčním časem, hmotou mateřských iontů a detekcí vznikajících dceřiných iontů.

Výchozí metodou pro zpracování vzorků a analytickou koncovku byla QuPPE metoda (Anastassiades *et al.*, 2019).

Místo izotopově značených standardů byly z důvodu nižší finanční náročnosti na pořízení využity strukturálně podobné látky jako interní standardy, které se přidávaly ke vzorku již po navážení. Se vzorky byly připravovány i kontrolní fortifikované vzorky na úrovních LOQ (obecně 1 µg/g), 10 x LOQ a 100 x LOQ pro stanovení relativního odezvového faktoru.

#### 3.3.1. Optimalizace MRM přechodů pro sledované analyty

Kyselina fosfonová (H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> – kyselina trihydrogenfosforitá)

Fosetyl ([C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OPO<sub>2</sub>]-3-(hydroxymethylphosphinoyl propionová kyselina)

Fosetyl byl aplikován v podobě fosetyl-Al [C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OPO<sub>2</sub>]<sub>3</sub>Al. Kyselina fosfonová byla aplikována jako fosfonát draselný.

Kyselina fosfonová a fosetyl byly sledovány v **negativním módu** ionizace. V metodě byly sledovány následující prekurzorové → a jejich produktové ionty za příslušných kolizních energií.

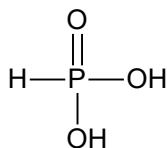
Získání a optimalizace MRM přechodů pro sledované analyty bylo provedeno pomocí aplikace Agilent Optimizer, který je součástí softwaru přístroje.

Analyt: **kyselina fosfonová**

sumární vzorec: H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>

Mw: 81,98 Da

Strukturální vzorec:



Prekurzorový ion [M-H]<sup>-</sup> = **81 Da**

Produktový ion → **79 Da** (-2H) CE = **14**

Prekurzorový ion [M-H]<sup>-</sup> = **81 Da**

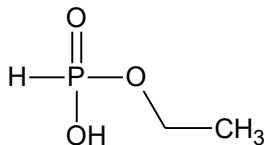
Produktový ion → **63 Da** (-H<sub>2</sub>O) CE = **34**

Analyt: **fosetyl**

sumární vzorec:  $C_2H_7O_3P$

Mw: 110,01 Da

Strukturní vzorec:



Prekurzorový ion  $[M-H]^- = 109$  Da      Produktový ion  $\rightarrow 63$  Da (-EtOH)      CE = 34

Prekurzorový ion  $[M-H]^- = 109$  Da      Produktový ion  $\rightarrow 81$  Da (-ethylen)      CE = 10

### 3.3.2. Výběr vhodných vnitřních standardů (IS) pro kvantifikaci kyseliny fosfonové a fosetylu

Obecně je vhodným vnitřním standardem pro kvantifikaci sledovaného analytu látka, která je co možná nejvíce podobná svými vlastnostmi analytu a měla by se rovněž podobně chovat na koloně (retenční čas blízký analytu) včetně dobré ionizace v módu, ve kterém je rovněž příslušný analyt sledován.

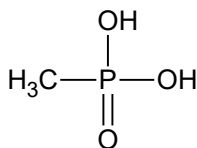
Pro kvantifikaci fosfonové kyseliny byl vybrán jako nejvhodnější vnitřní standard methylfosfonové kyseliny sledovaný v negativním módu ionizace.

IS: **kyselina methyfosfonová**

sumární vzorec:  $CH_3O_3P$

Mw: 96,02 Da

Strukturní vzorec:



Prekurzorový ion  $[M-H]^- = 95$  Da      Produktový ion  $\rightarrow 79$  Da      CE = 14

Prekurzorový ion  $[M-H]^- = 95$  Da      Produktový ion  $\rightarrow 63$  Da      CE = 46

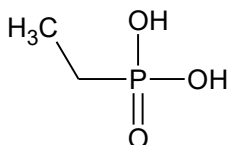
Pro kvantifikaci fosetylu-Al byl vybrán jako nejvhodnější vnitřní standard ethylfosfonové kyseliny (izobarická sloučenina) sledovaný v negativním módu ionizace.

IS: **kyselina ethylfosfonová**

sumární vzorec:  $C_2H_7O_3P$

Mw: 110,06 Da

Strukturní vzorec:



Prekurzorový ion  $[M-H]^- = 109$  Da      Produktový ion  $\rightarrow 79$  Da      CE = 14

### 3.3.3. Chromatogramy a retenční časy sledovaných analytů a vnitřních standardů

#### Kyselina fosfonová

Přechody: 81 → 79

Retenční čas: 2,87 min

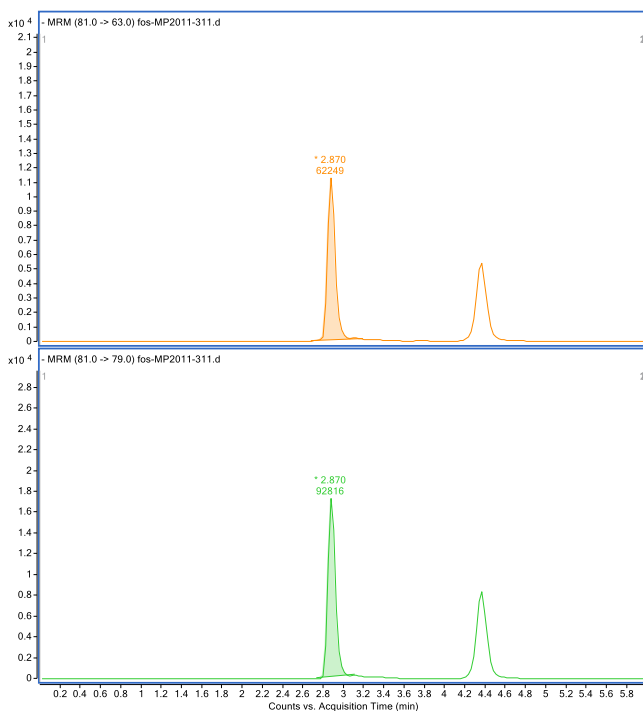
81 → 63

#### IS – Kyselina methylfosfonová

Přechody: 95 → 63

Retenční čas: 2,99 min

95 → 79



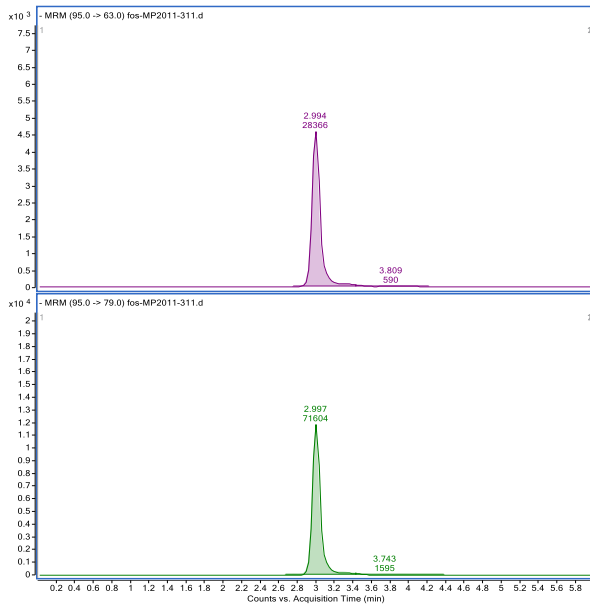
#### IS – Kyselina methylfosfonová

Přechody: 95 → 63

Retenční čas: 2,99 min

95 → 79



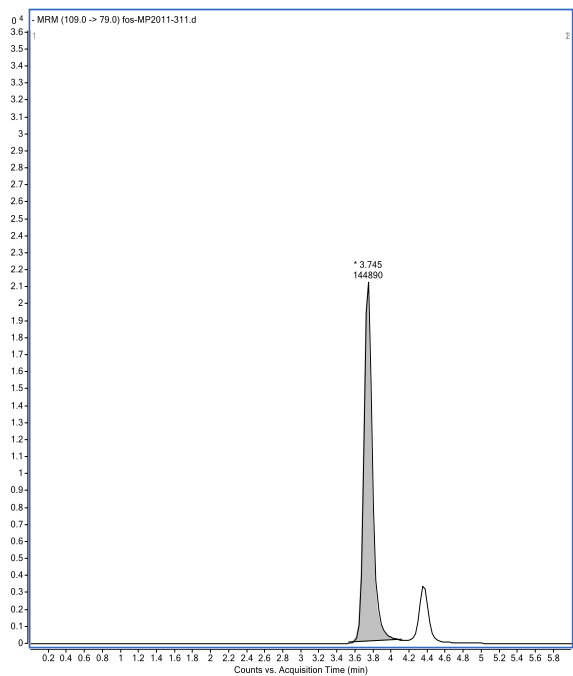


## IS – Kyselina ethylfosfonová

Přechod:

109 → 79

Retenční čas: 3,75 min

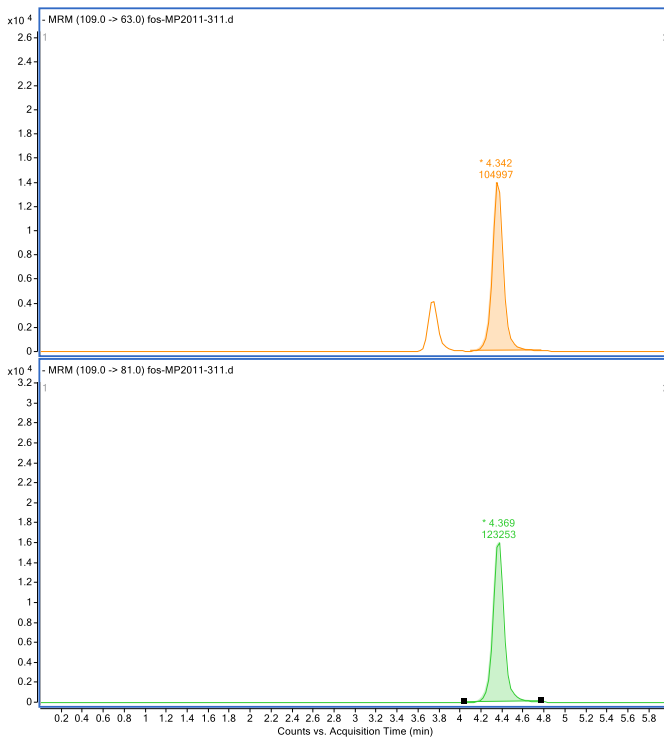


## Fosetyl-Al (forma fosetyl)

Přechody: 109 → 63

Retenční čas: 4,34 min

109 → 81



### 3.3.4. Kvantifikace metodou vnitřního standardu

Fortifikace na úrovni LOQ, 10 x LOQ a 100 x LOQ se využívají pro určení relativního odezvového faktoru  $f$  a zároveň aby se kontrolovala jejich konstantnost napříč koncentračními hladinami.

$$f = \frac{\frac{A_{IS}}{c_{IS}}}{\frac{A_A}{c_A}}$$

Ze získaných hodnot odezvoových faktorů byla počítána průměrná hodnota, která byla použita pro výpočet koncentrace analytu ve vzorku na základě vyhodnocených odezov (ploch píků) analytů a přidávaných vnitřních standardů do vzorků na úrovni 100 x LOQ.

$$c_A = \frac{A_A}{A_{IS}} \cdot c_{IS} \cdot f$$

f.....relativní odezvoový faktor  
 A\_A.....plocha stanovovaného analytu  
 A\_IS.....plocha vnitřního standardu  
 c\_A.....koncentrace stanovovaného analytu  
 c\_IS.....koncentrace vnitřního standardu

Celkový přepočít koncentrací sledovaných analytů na fosetyl

1 mg/kg kyseliny fosfonové ~ 1,34 mg/kg fosetylu

1 mg/kg fosetylu-Al ~ 0,93 mg/kg fosetylu

koncentrace přepočtená na fosetyl =  $c_{\text{kys.fosfonové}} \cdot 1,34 + c_{\text{fosetylu-Al}} \cdot 0,93$

### 3.3.5. Příprava vzorku k chemické analýze, přístroj a podmínky analýzy

Vzorky plodů (jablek), listů a zeminy byly homogenizovány ve VŠÚO Holovousy, zmrazeny a dodány do VUOS a.s. Zde byly vzorky listů homogenizovány pomocí mletí se suchým ledem (dle SOP 201/2). Vzorky dřeva byly homogenizovány pomocí elektrického kávového mlýnku.

Extrakce probíhala podle modifikovaného extrakčního postupu EURL-SRM–QuPpe-Method (Anastassiades, 2019). Jedná se o metodu vhodnou pro pesticidní látky polárního charakteru, které není možné analyzovat běžnou multireziduální metodou.

- Navážka 10 g homogenizovaného vzorku s tolerancí  $\pm 0,5$  g do uzavíratelné plastové zkumavky o objemu 50 ml.
  - Do vzorků zemin a plodů přidáno 10 ml okyseleného methanolu (1 % FA v MeOH).
  - Do vzorků listů a dřeva přidavek 30 ml okyseleného methanolu (1 % FA v MeOH), aby bylo zajištěno dobré smočení celé navážky vzorku extrakčním solventem.
- Intenzivní třepání 10 minut na vertikální třepače Spex - 800 rpm
- Centrifugace po dobu 5 minut 3500 rpm.
- Extrakt vzorků zemin a plodů zředěn 10krát do HPLC vialky (900  $\mu$ l MeOH s 0,1% FA + 100  $\mu$ l extraktu), poté vzorek následně připraven k analýze na LC-MS/MS.
- Extrakt vzorků listů a dřeva zředěn 5krát do HPLC vialky (800  $\mu$ l MeOH s 0,1 % FA + 200  $\mu$ l extraktu), takto je vzorek připraven k analýze na LC-MS/MS.

Měřicí systém (LC-MS/MS):	Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem SCIEX 6500+ a kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II. HPLC		
<b>HPLC podmínky</b>			
Software	Analyst software 1.7.2; SCIEX OS 2.0.1.48692		
Kolona	Synergi Hydro- RP 250x 4.6 mm, velikost částic 4µm		
Teplota na koloně	30 °C		
Teplota v autosampleru	4 °C		
Injektovaný objem	1µl		
Průtok	1 ml/min		
<b>Eluční program</b>	<b>čas (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
Mobilní fáze A (voda s 0,1% HCOOH)	0,0	95	5
	4,6	85	15
	4,7	40	60
Mobilní fáze B (methanol)	7,0	40	60
	7,1	95	5
	11,0	95	5
<b>Přibližné retenční časy</b>	<b>(min)</b>		
Fosfonová kyselina	2,9		
Methylfosfonová kyselina	3,0		
Ethylfosfonová kyselina	3,5		
Fosetyl	4,0		

## MS podmínky

	Monitorované přechody (amu)	DP (volt)	EP (volt)	CE (volt)	CXP (volt)	Polarita	Dwell Time (msec)
Fosetyl	109→81	-45	-10	-18	-11	negativní (ESI-)	150
	109→63	-45	-10	-38	-5	negativní (ESI-)	150
Ethylfosfonová kyselina	109→79	-65	-10	-28	-7	negativní (ESI-)	150
Fosfonová kyselina	81→79	-35	-10	-24	-11	negativní (ESI-)	150
	81→63	-35	-10	-40	-7	negativní (ESI-)	150
Methylfosfonová kyselina	95→79	-40	-10	-30	-37	negativní (ESI-)	150
	95→63	-40	-10	-58	-27	negativní (ESI-)	150

Parametr nastavení iontového zdroje Turbo Spray IonDrive	Hodnota
Curtain Gas (CUR)	40
Collision Gas (CAD)	9
IonSpray Voltage (IS)	-4500
Temperature (TEM)	400
Ion Source Gas 1 (GS1)	60
Ion Source Gas 2 (GS2)	60
Scan type	MRM

### 3.3.6. Validace analytické metody pro stanovení fosfonátů ve vybraných maticích

**Limit kvantifikace** stanovený na **1 mg/kg** (5 mg/kg u matrice křížal) odpovídal při testování metody 50 ng/ml kalibračního bodu přímky. Tento limit byl na počátku projektu nastaven na této hodnotě z důvodu vyšších očekávaných reziduí a příprava vzorku a ředění bylo upraveno tak, aby pro tento limit splňovala odezva detektoru minimálně poměr signál/šum = 10.

**Limit detekce**, kdy poměr signál/šumu byl zachován stále nad  $\geq 3/1$  byl stanoven na 0,2 mg/kg, což odpovídalo při testování metody 10 ng/ml kalibračního bodu

přímky. Limit detekce je skutečná analytická hodnota pro látku s nejhorší odezvou a daný extrakční postup a je od nastaveného limitu kvantifikace 5krát nižší (standardně se požaduje minimálně 3násobek).

### **Lineární kalibrační rozsah**

Kalibrační řada obsahovala **8 kalibračních bodů** v rozsahu od **10 ng/ml** do **7000 ng/ml** pro všechny matrice. Parametry linearit u všech matic byly vyšší než  $R^2 > 0,99$ .

Procentuální odchylka zpětně vypočtené koncentrace od skutečné koncentrace daného měřeného kalibračního bodu byla od **1–6 %**. Tento parametr byl hodnocen pouze pro vnitřní standardy a fosetyl. Důvodem, proč parametr nebyl vyhodnocován pro kyselinu fosfonovou je, že se nepodařilo sehnat matici, ve které by žádná kyselina fosfonová nebyla přítomna, tudíž i blanková matrice způsobuje viditelné nežádoucí pozadí kyseliny fosfonové. Všechny parametry byly pod  $\leq 20$  % zpětných výpočtů koncentrací.

### **Opakovatelnost nástřiku**

Opakovatelnost nástřiku pro všechny matrice vyjádřená jako RSD ploch píků byla na úrovni **2,5 %**. Případné odchylky v opakovatelnosti nástřiku byly kompenzovány přidávkou vnitřních standardů.

### **Matriční efekt**

Vliv matričního efektu byl vypočten ze směrnice kalibrační přímky % porovnáním solventní a matriční kalibrace. Jedná se o hodnotu vlivu matrice oproti solventní kalibraci. Matriční efekt se oproti solventní kalibraci projevoval od **1–48 %**. Vysoký matriční efekt byl pozorován především u kyseliny fosfonové.

### **RSD pro odezvosé faktory kvantifikačních přechodů f**

Odezvosé faktory (f) byly vypočítávány pro každou matici zvlášť, tudíž každá matrice měla své odezvosé faktory pro kvantifikaci kyseliny fosfonové a fosetylu. Následně byla pro odezvosé faktory jako doplněk vypočtena RSD napříč všemi čtyřmi maticemi (vždy pro odezvosý faktor kvantifikačního přechodu). RSD pro odezvosý faktor kvantifikačního přechodu kyseliny fosfonové napříč maticemi činil **9 %**, pro fosetyl činil **12 %**.

### **Výtěžnost**

Výtěžnost byla vypočítána z fortifikačních roztoků, které se fortifikují na stanovený limit LOQ, poté 10násobek LOQ a 100násobek LOQ. Procentuální výtěžky analytů z fortifikovaných vzorků by měly být v rozsahu 80–120 %. Rozsah výtěžnosti pro fosetyl byl **93–100 %** ve všech maticích. Kyselina fosfonová měla výtěžnostní

rozsah 68–97 % v závislosti na typu matrice. Z důvodu nedostatečných výtěžností pro všechny analyty ve všech maticích bylo přistoupeno ke kvantifikaci pomocí vnitřních standardů, které současně korigovaly vliv rozdílných obsahů vody ve vzorcích, maticích efektů a opakovatelnosti nástřiku.

Každá úroveň fortifikací byla připravována v pěti opakováních následně byly vypočteny RSD pro každou úroveň fortifikace a typ matrice. Nejvyšší hodnota RSD byla na úrovni 4 %.

Nejistota stanovení vypočtená na základě validace metody a po rozšíření koeficientem  $k = 2$  je 9 % jako úhrnný ukazatel pro stanovení fosetylu i kyseliny fosfonové v maticích dřeva, listí, plod a křížaly.

### 3. 4. Hodnocení degradace reziduí fosfonátů

Z dosažených výsledků vyplývá, že koncentrace zájmových látek u neošetřených variant (zejména kyseliny fosfonové) je nejvyšší v listech i dřevě na jaře a v průběhu vegetačního roku se dále přirozeně snižuje. Naopak u plodů dochází k zvyšování koncentrace až do doby sklizně. Při průkazu použití fosetylu při ochraně rostlin lze vycházet i z toho, že koncentrace fosetylu (jako chemického individua) v přirozených ročních cyklech je proti koncentraci kyseliny fosfonové zanedbatelná. Byla-li zjištěna zvýšená koncentrace fosetylu-Al nad detekčním limitem analytické metody (zde cca 0,2 mg/kg) je v celku jasné, že v nedávné době došlo k použití např. přípravku Luna Care.

Také se ukazuje, že pokud v minulosti byly postřiky na bázi fosetylu (včetně fosfonátů) na daném území používány, pak je ovlivněna i požadová úroveň zejména kyseliny fosfonové, se kterou rostlina během vegetačního období „hospodář“. Na druhou stranu je nutno uvést, že MRL hodnoty pro sumu fosetylu (fosetylu a fosfonátů) pro jablka je vysoká. Je stanovena na 150 mg/kg. Taková koncentrace v jablkách nebyla během pokusů dosažena ani při opakovaném postřiku přípravky na bázi fosfonátů i fosetylu-Al. Bude-li však pro ekologickou produkci ovoce a dětskou výživu vyžadována obecně přijímaná hranice reziduí pesticidů 0,010 mg/kg, pak z provedených analýz vyplývá, že nemůže být s největší pravděpodobností splněna.

### *Vyjádřování koncentrací*

Přípravek Delan Pro obsahuje jako účinnou látku fosfonáty draselné. Ty se analyticky stanovují jako kyselina fosfonová. Přípravek Luna Care je založen na hlinité soli fosetylu. Tato látka je velmi nestabilní a rozkládá se (chemicky, fotochemicky) na degradační produkty – fosetyl a fosfonáty.

Analýzou LC/MS/MS lze rozeznat jednotlivé formy, avšak limity pro tuto skupinu látek (MRL) se uvádějí jako suma jednotlivých forem vyjádřená jako mg/kg fosetylu. Toto je vhodné i pro výzkumné účely, neboť se eliminuje faktor chemických přeměn jednotlivých forem.

### ***Vyhodnocení a modelování průběhu koncentrací zájmových látek v čase***

Během vyhodnocovací fáze byla snaha o vytvoření jednoduchého kinetického modelu pro časový vývoj koncentrací jednotlivých látek v jednotlivých částech rostliny (zejména pravidelně odebíraných vzorcích dřeva a listů). Vycházelo se přitom z modelů reakční kinetiky reakce 1. řádu opraveného o rovnovážnou koncentraci. Tento přístup byl poměrně úspěšný pro první experimentální rok a analýzy kyseliny fosfonové v listech a s menší úspěšností ve dřevě.

Matematický zápis této představy:

$$R_t = (R_0 - R_\infty) \cdot e^{-k \cdot t} + R_\infty$$

kde  $R_t$  je reziduum (analytická koncentrace v matrici) v čase  $t$  od postřiku,

$R_0$  je reziduum v době postřiku,  $t = 0$ ,

$R_\infty$  je koncentrace rezidua v rovnovážném stavu,

$k$  je rychlostní konstanta úbytku rezidua

Modelování průběhu časové závislosti koncentrace fosetylu-Al bylo neúspěšné kvůli rapidnímu úbytku po postřiku a malému počtu experimentálních dat. Toto mělo být zlepšeno v druhém roce experimentování, kdy přibýly odběrové časy zejména v první fázi po postřiku. Zde se ale projeví další efekty. Koncentrace kyseliny fosfonové v listech v raných odběrech lze nahradit touto závislostí, avšak dále se projevuje to, že rovnovážná koncentrace není konstantní. Modelování tohoto procesu by vyžadovalo podstatně více experimentálních bodů a musely by se uvažovat i transporty analytu mezi jednotlivými částmi rostliny. Pro jednoduchost a za účelem pouze aproximování chování ve sledovaném čase plně postačuje nahrazení rovnovážné koncentrace statistickou lineární funkcí (klesající v čase; pro listy a dřevo). Tímto modelem nelze predikovat hodnoty po ukončení pokusů.

Matematický zápis:

$$R_t = (R_0 - R_\infty) \cdot e^{-k \cdot t} + R_\infty + k_\infty \cdot t$$

kde  $R_t$  je reziduum (analytická koncentrace v matrici) v čase  $t$  od postřiku,

$R_0$  je reziduum v době postřiku,  $t = 0$ ,

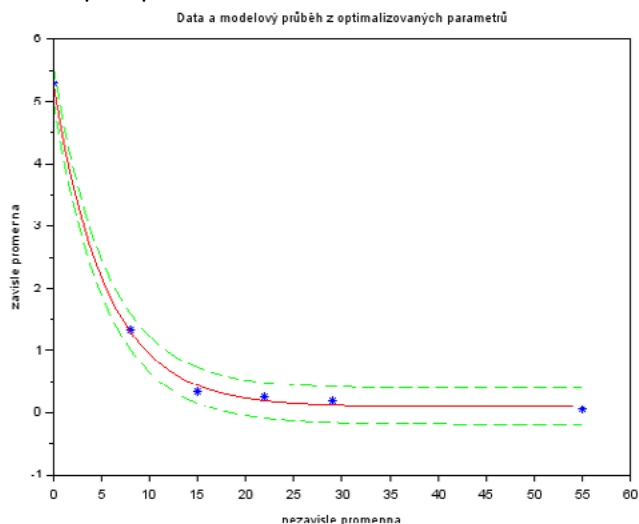
$R_\infty$  je hypotetická koncentrace rezidua v rovnovážném stavu,

$k$  je rychlostní konstanta úbytku rezidua (rozklad + transport z matrice),

$k_\infty$  je rychlostní konstanta dosahování nového rovnovážného stavu



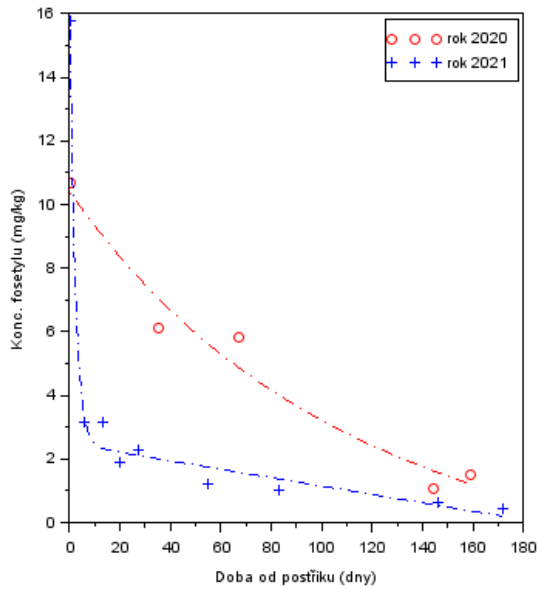
Poznámka: Z pohledu matematického modelování statistickou funkcí je jedno, zda model obsahuje závorku ( $R_0-R_\infty$ ) nebo je-li nahrazen jiným parametrem, např.  $R$ . Počet optimalizovaných parametrů zůstává stejný. Výhoda zvoleného řešení je schopnost oddělit od sebe dva faktory: přirozenou změnu koncentrace ve vegetačním období aproximovanou lineární funkcí a faktor gradientu vložený poruchy danou novým postřikem aproximovanou exponenciálním úbytkem z teorie reakční kinetiky. Jednoduchý kinetický model se naopak velmi osvědčil pro sledování koncentrace fosetylu- $Al$  ve variantě pokusu 4 v matici listů. V tomto pokusu byly stromy ošetřovány až v závěrečné fázi vegetačního období, úbytek této látky probíhá sice stále rychle ale přesto výrazně pomaleji než v jiných variantách, transport do jiných částí rostliny lze zanedbat, rovnovážná koncentrace je prakticky nulová (statisticky nevýznamná).



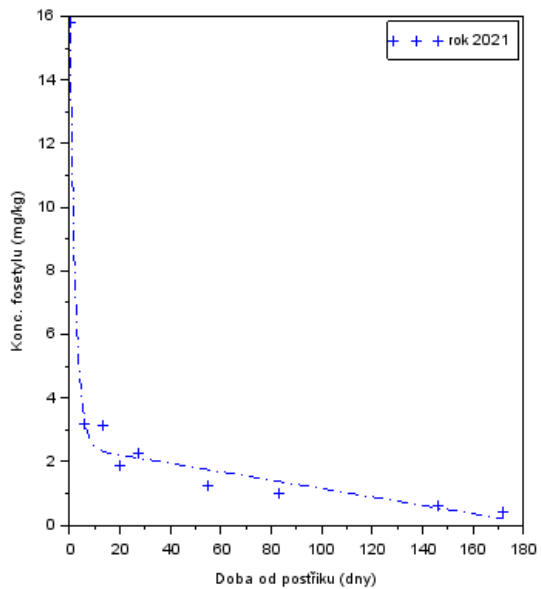
### 3.4.1. Analyzované vzorky dřeva

Bylo ukázáno, že koncentrace sumárního fosetylu ve dřevě po postřicích je obecně nižší než v listech. U vzorků s vyšším podílem dřevní hmoty (víceleté dřevo) jsou tyto koncentrace ještě nižší než u mladších větví. Lze vyslovit domněnku, že místo výskytu zájmových látek je lokalizováno spíše na kůru a lýko než na dřevo. Tato domněnka nebyla v našich experimentech testována. Zároveň z časových závislostí koncentrací během pokusů bylo zjištěno, že okamžik postřiku bývá pouze pro větve pouze „drobnou“ poruchou v přirozeném vývoji hladin koncentrací během vegetačního období (viz dále kapitola o průkazu používání látek typu fosetylu při ochraně rostlin). Koncentrace zájmových látek totiž velmi rychle, již během několika prvních dní po postřiku, klesá. Dochází tak pravděpodobně k rychlé absorpci účinných látek z povrchu a transportu do dalších částí rostliny. Větve lze v daném kontextu vnímat i jako transportní cestu zájmových látek mezi zásobárnou (kmen, kořeny) a koncovými částmi rostlin (plody a listy) a k transportu zřejmě dochází oběma směry.

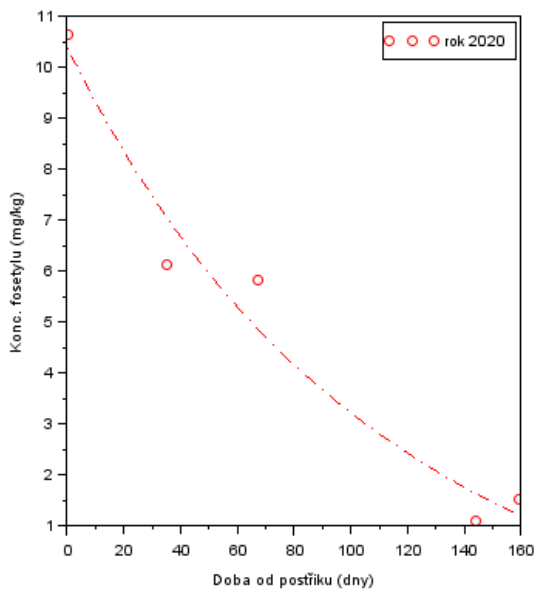
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV1



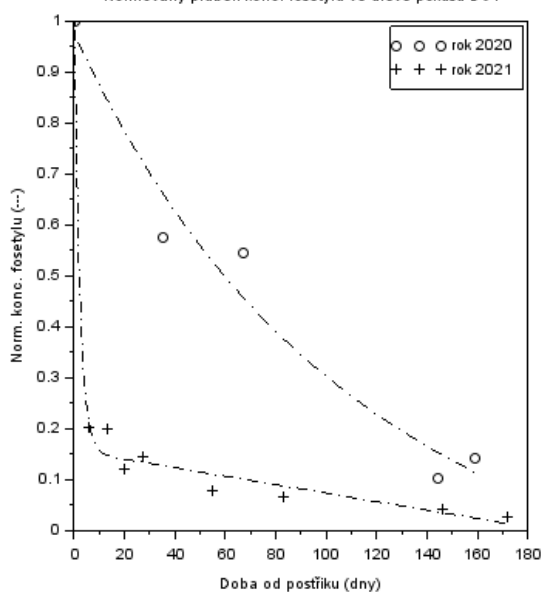
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV1



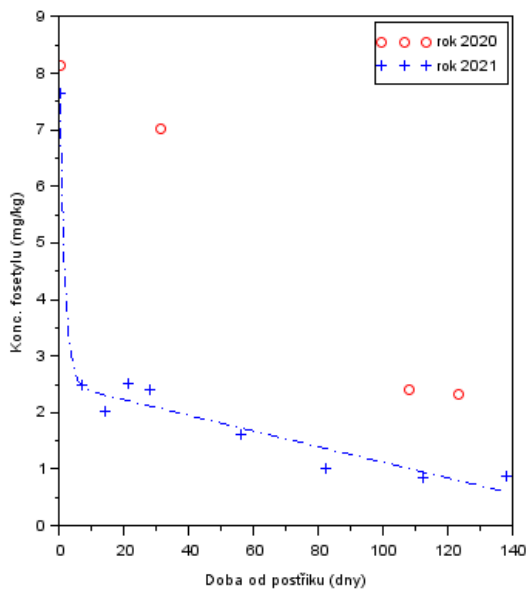
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV1



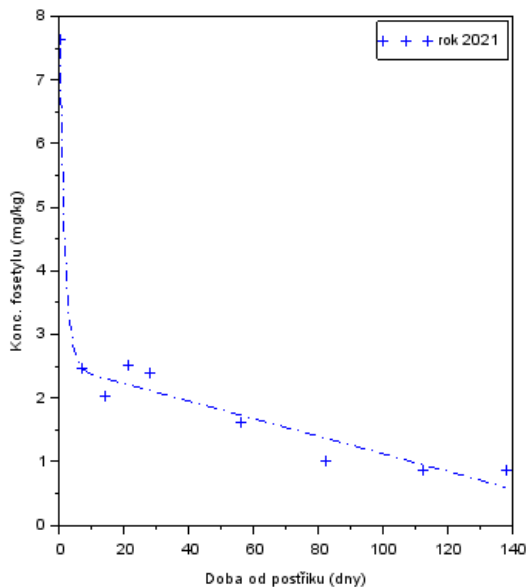
Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV1



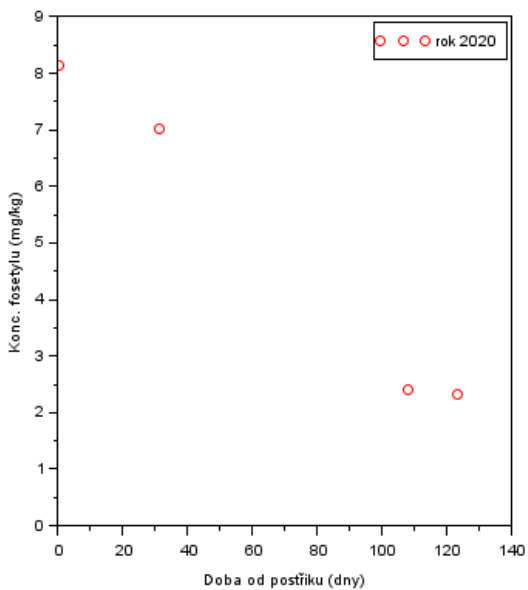
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV2



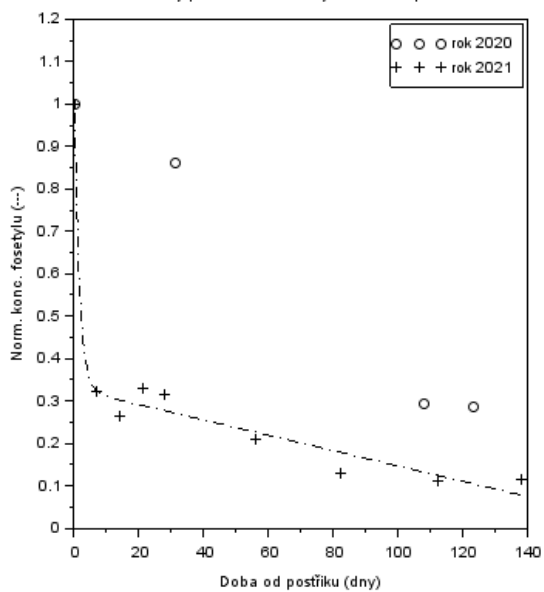
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV2



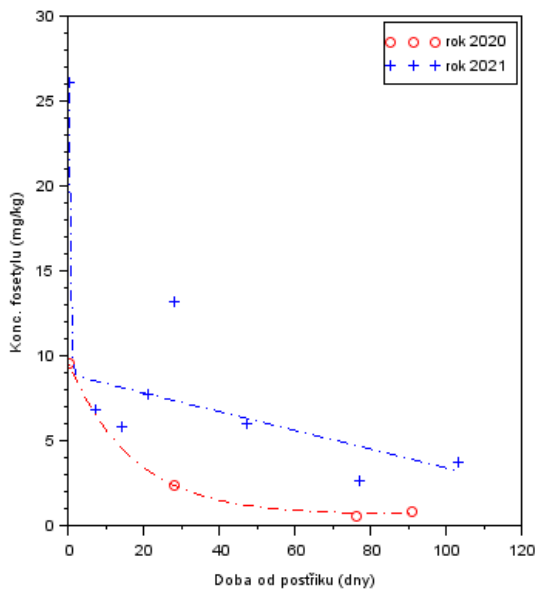
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV2



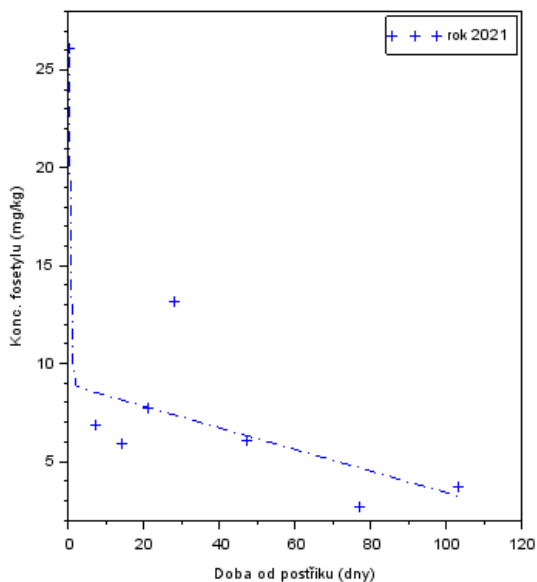
Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV2



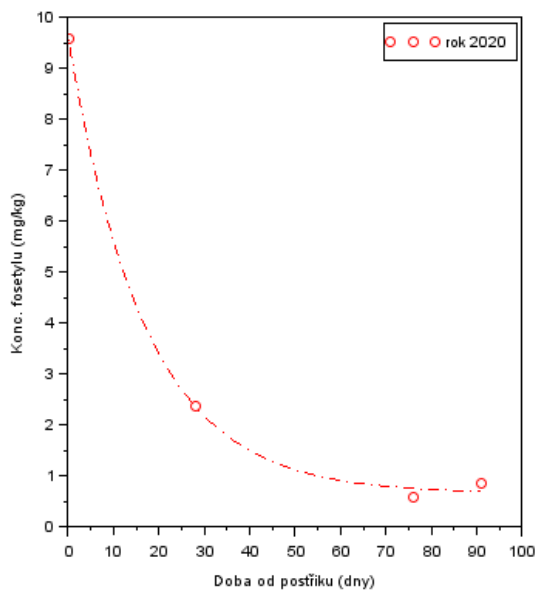
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV3



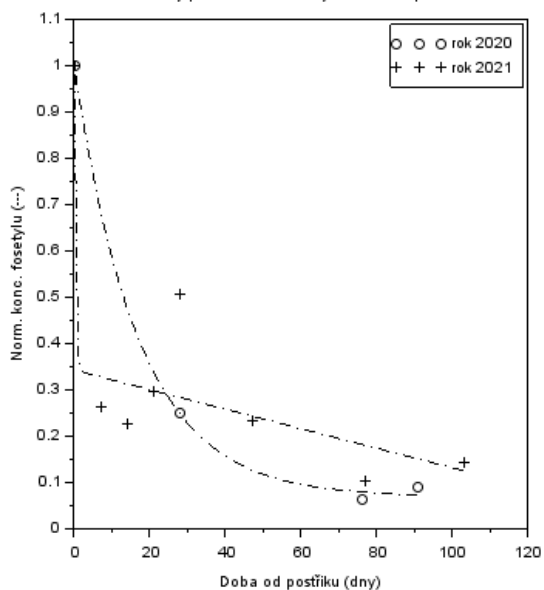
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV3



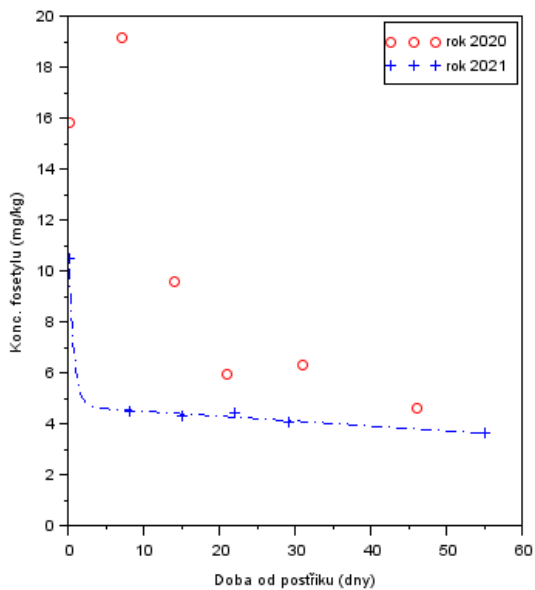
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV3



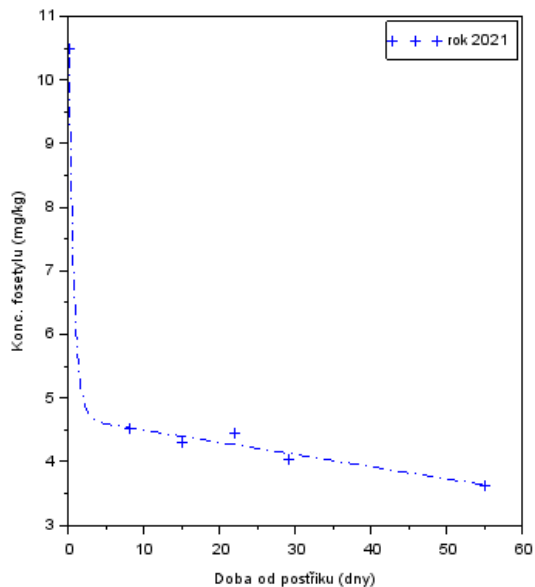
Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV3



Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV4

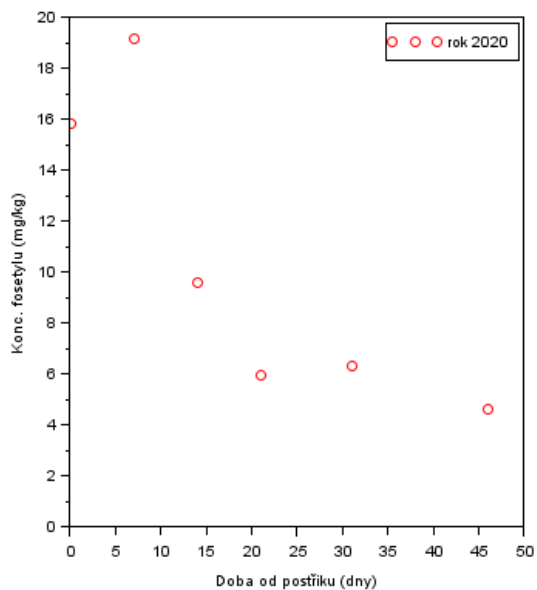


Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV4

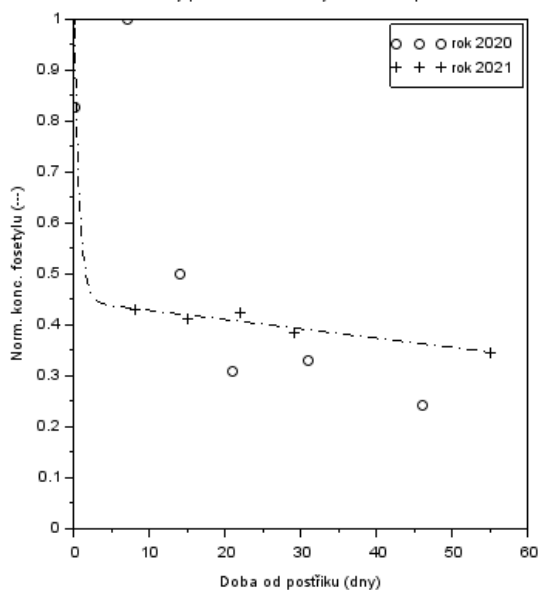




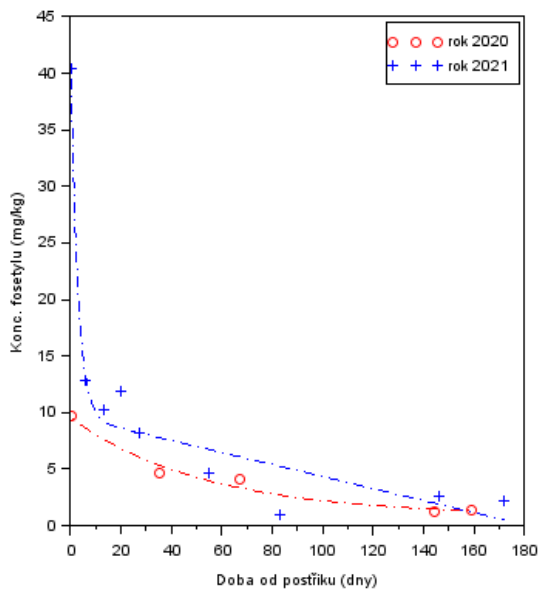
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV4



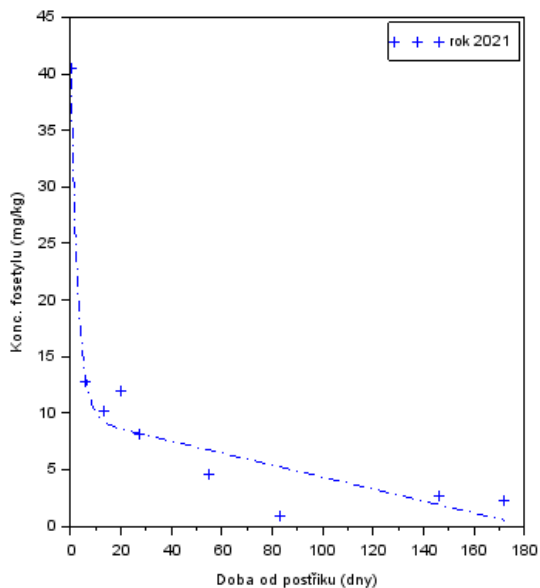
Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu DV4



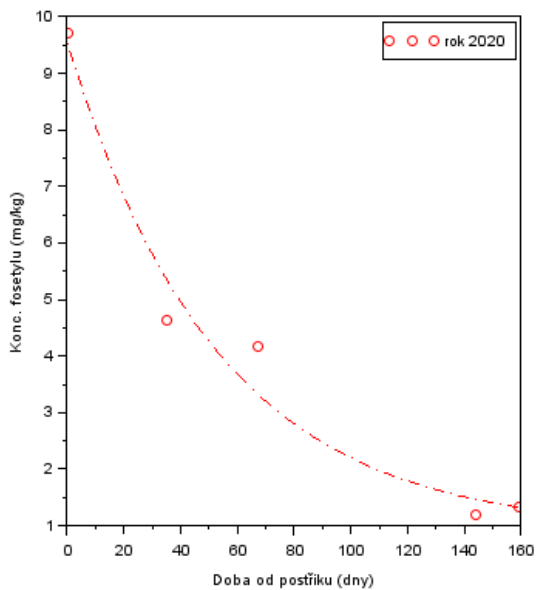
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV1



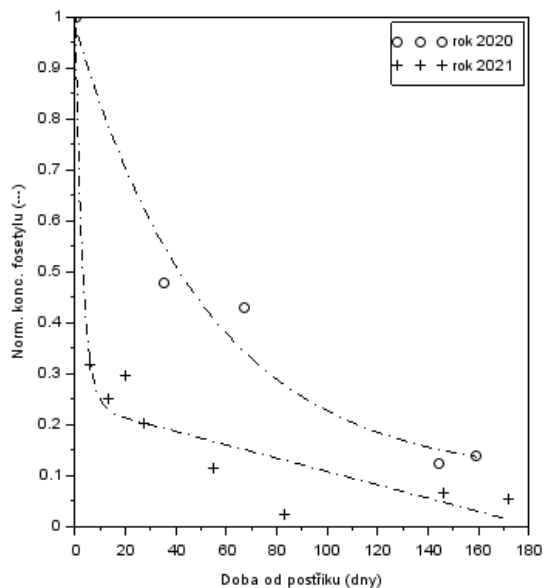
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV1



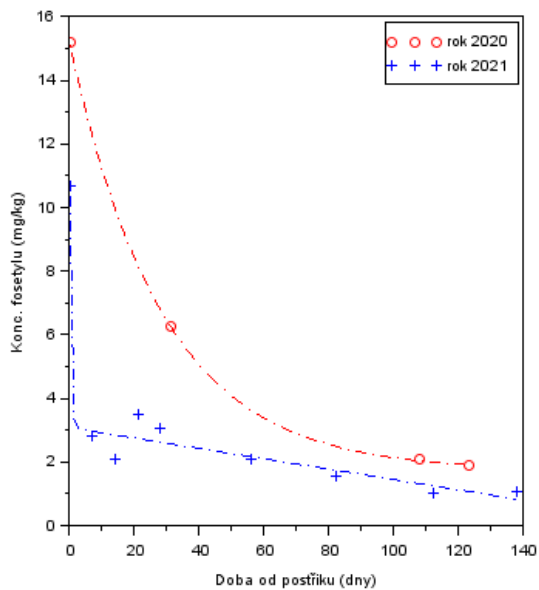
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV1



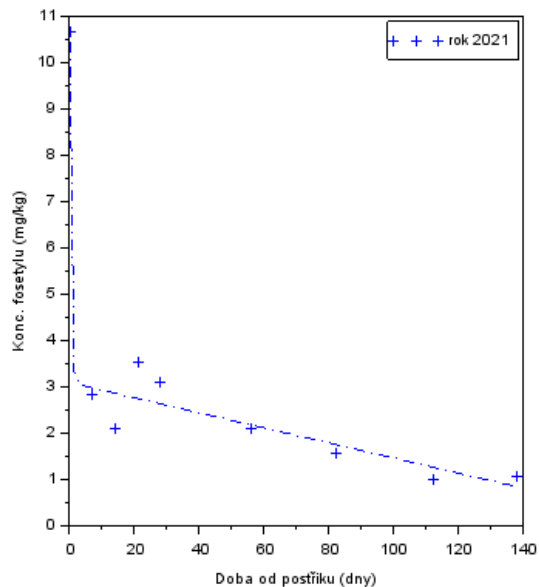
Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV1



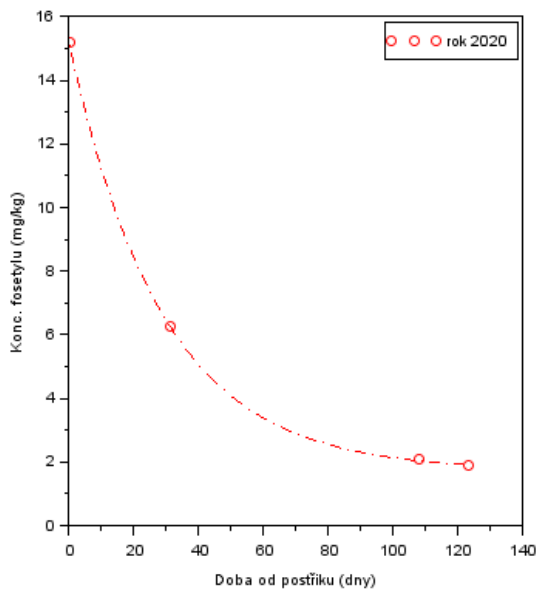
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV2



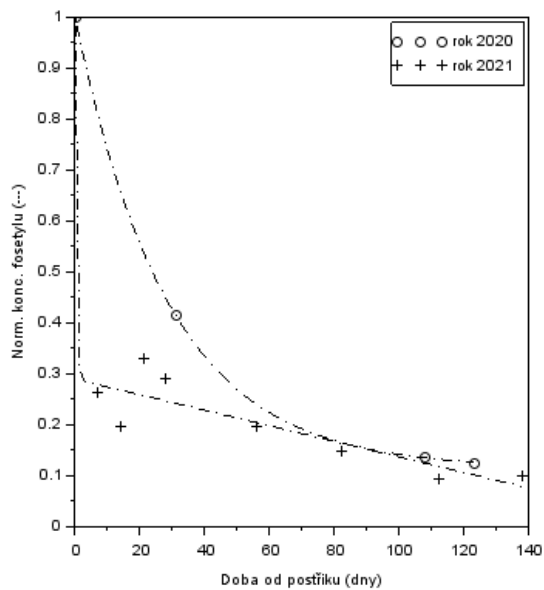
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV2



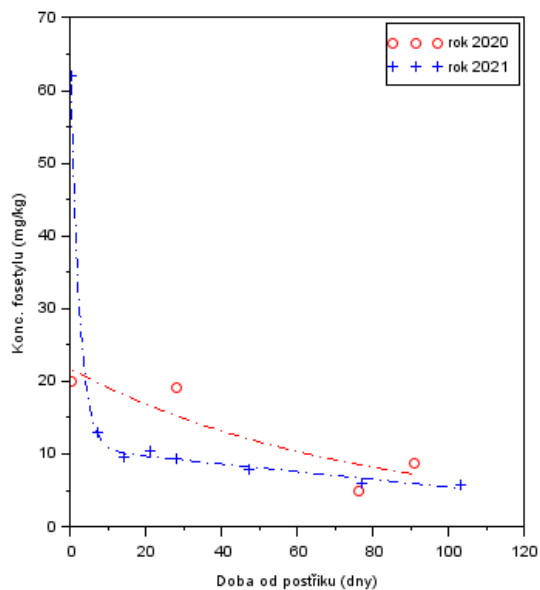
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV2



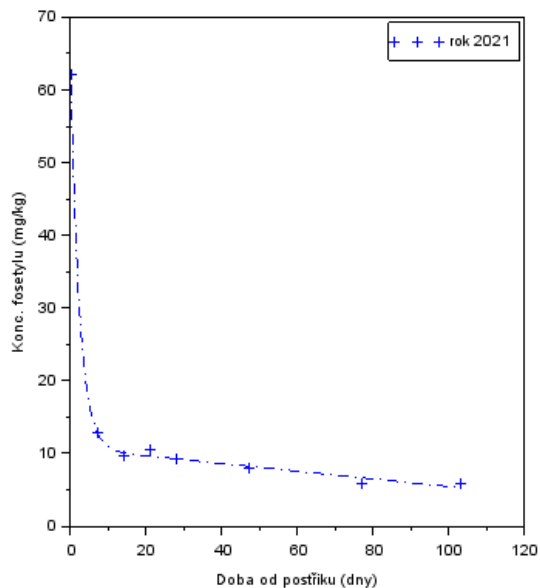
Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV2



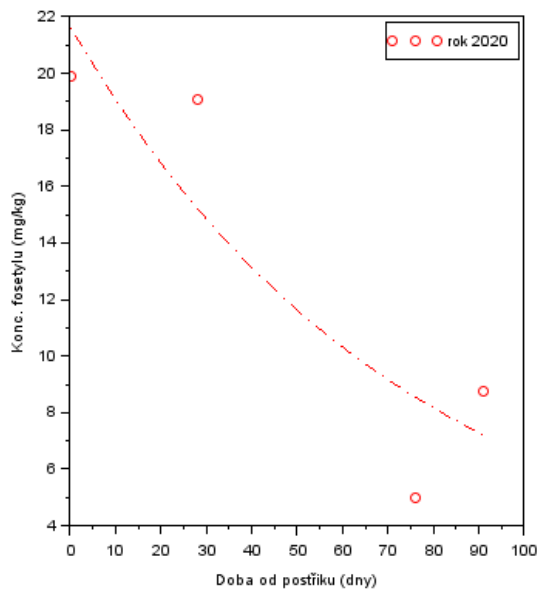
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV3



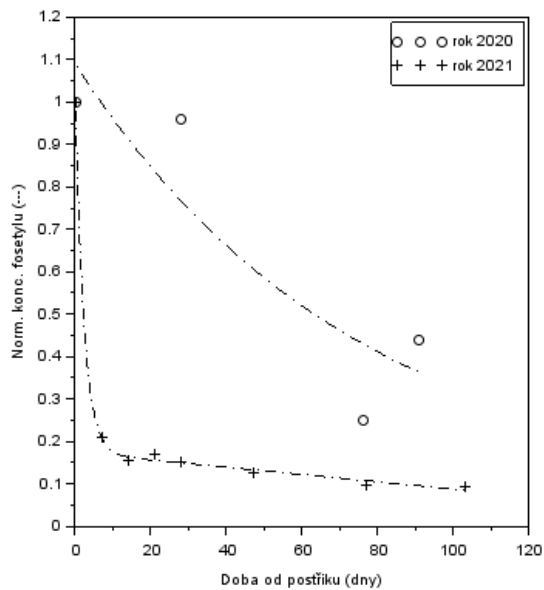
Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV3



Časový průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV3



Normovaný průběh konc. fosetylu ve dřevě pokusu LV3

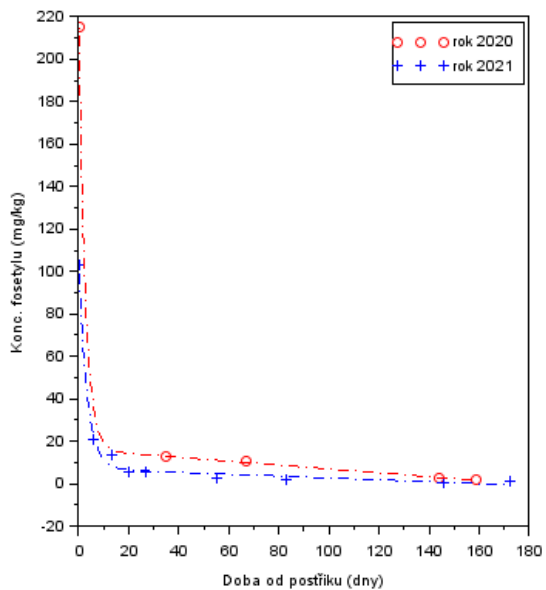


### 3.4.2. Analyzované vzorky listů a výhody

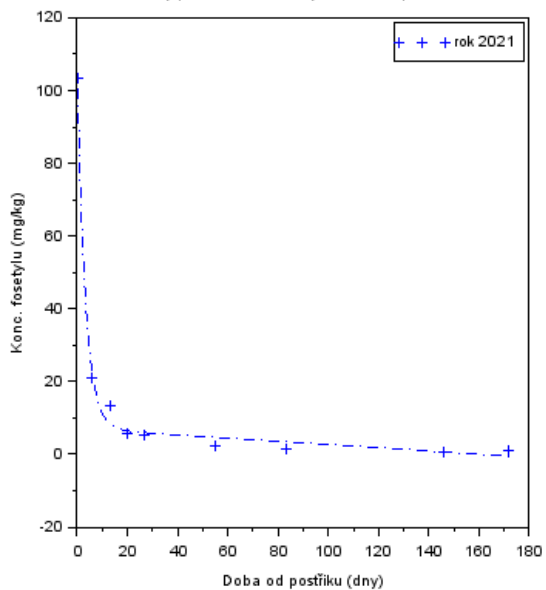
Oproti vzorkům dřeva jsou listy prakticky stejné na celé rostlině (homogenní materiál) a jeho vlastnosti se mění ve vegetačním období pouze málo. K největším změnám dochází při vývoji listů a před opadem (lze očekávat zvyšování sušiny). Koncentrace analytů jsou vzhledem k velké ploše a malému objemu vysoké, lze prokázat nedávný postřik (vysoká vypovídající schopnost). Koncentrace se od postřiku v čase velmi výrazně mění. Existuje jistá korelace obsahu fosetylu v plodech a listech, ovšem až v delších odstupech od postřiku. Jednoduché pořízení vzorku, sběr lze provést i na více místech stromu se zárukou homogenity, dále jednoduchá homogenizace, zmenšování vzorku (listy lze jednoduše nasekat na drobné části nebo mlít se suchým ledem a dále množství odebraného materiálu vhodně zmenšovat), dostupnost rostlinného materiálu během celého vegetačního období jsou výhodami odběru vzorků listů.



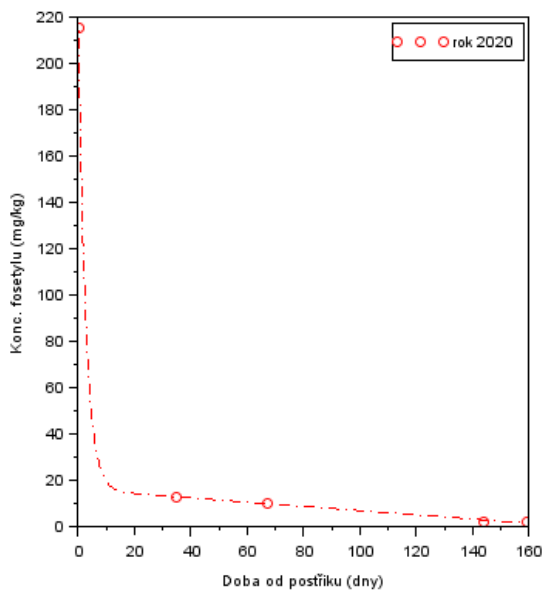
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV1



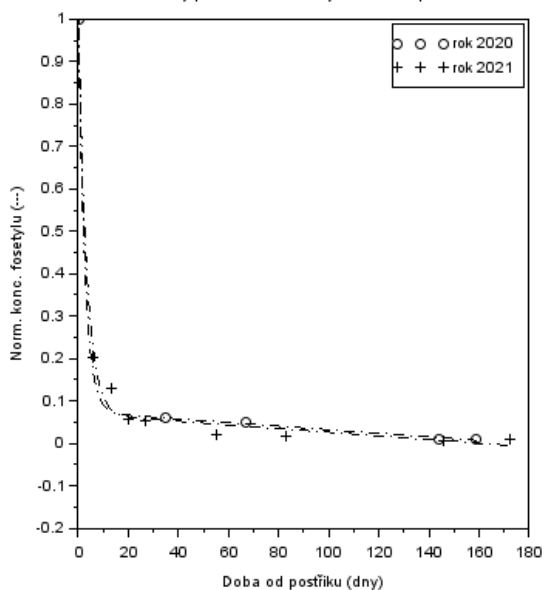
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV1



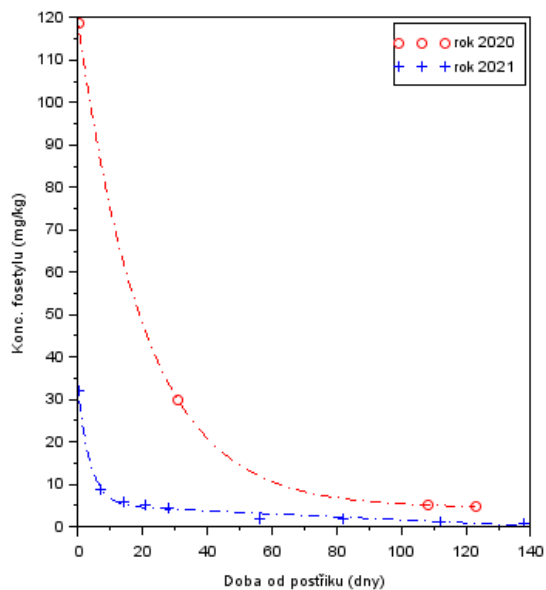
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV1



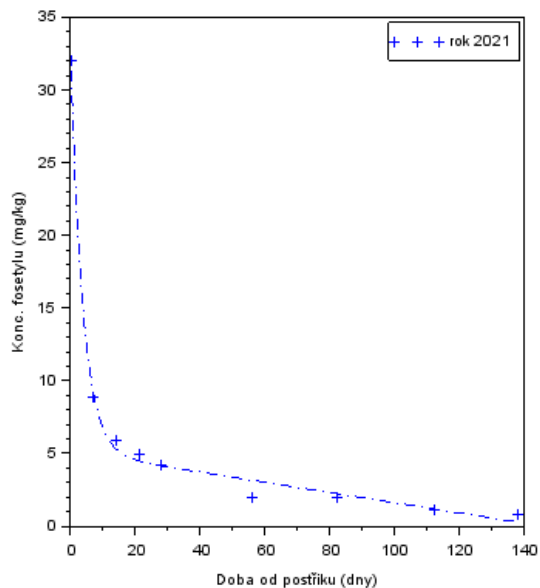
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV1



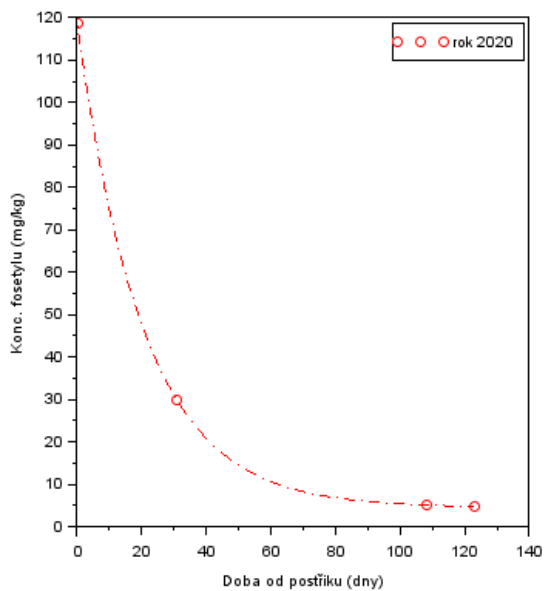
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV2



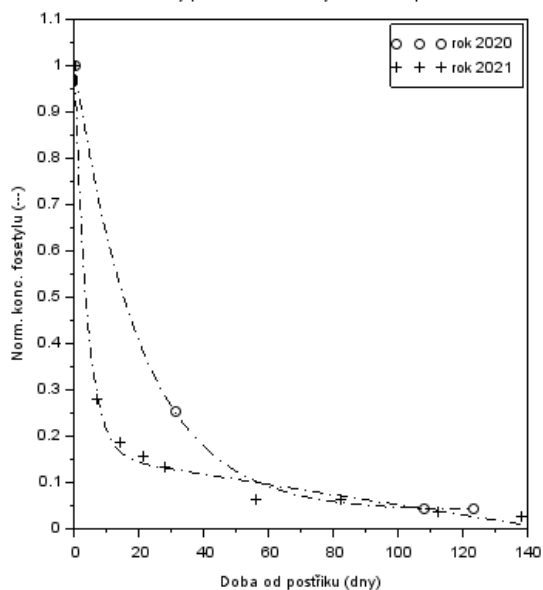
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV2



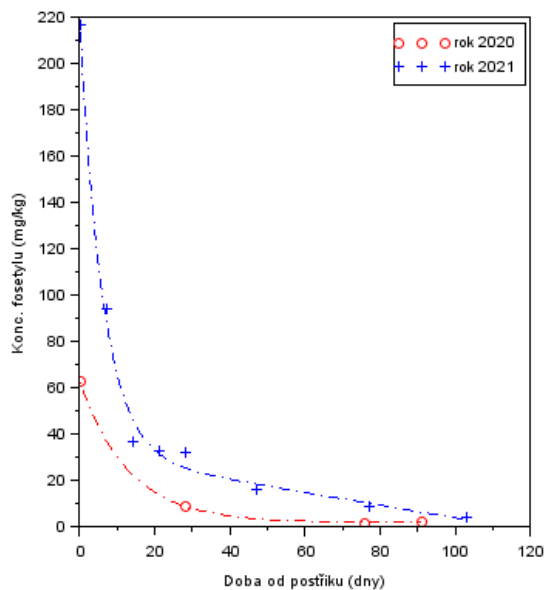
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV2



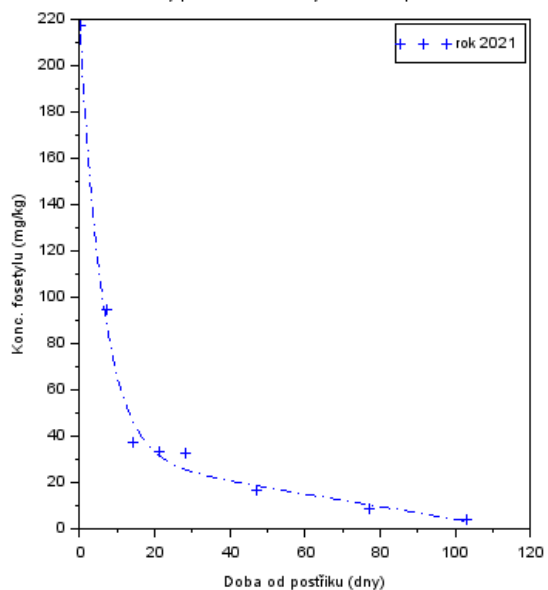
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV2



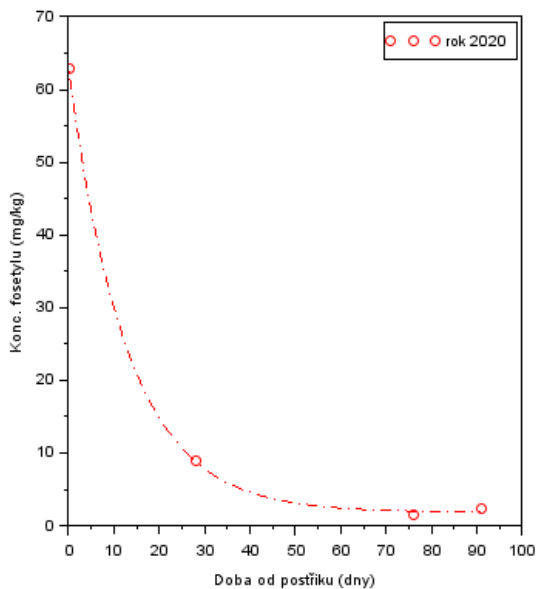
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV3



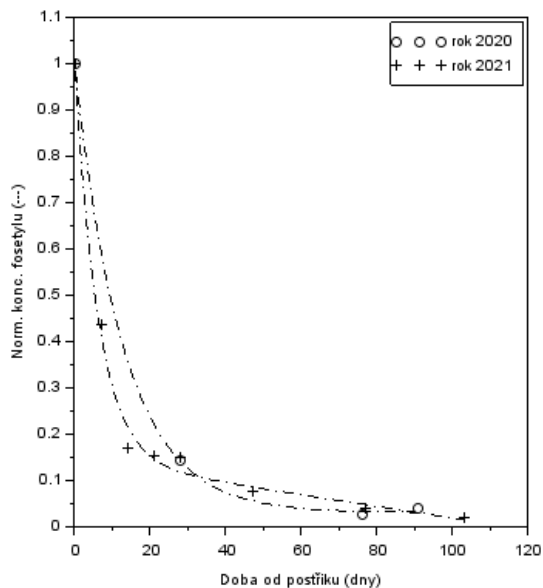
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV3



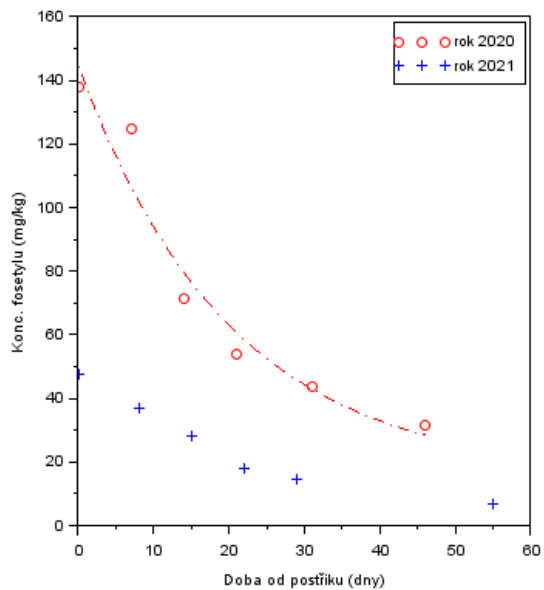
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV3



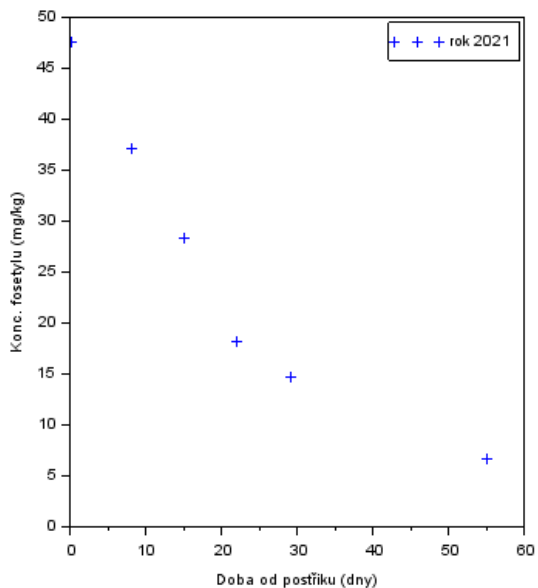
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV3



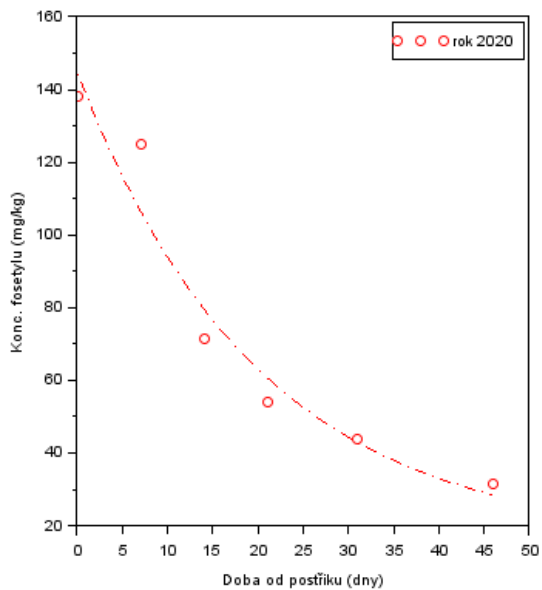
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV4



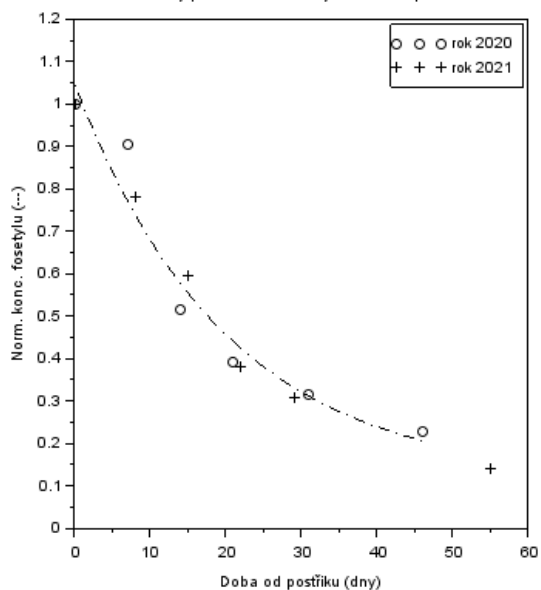
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV4



Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV4

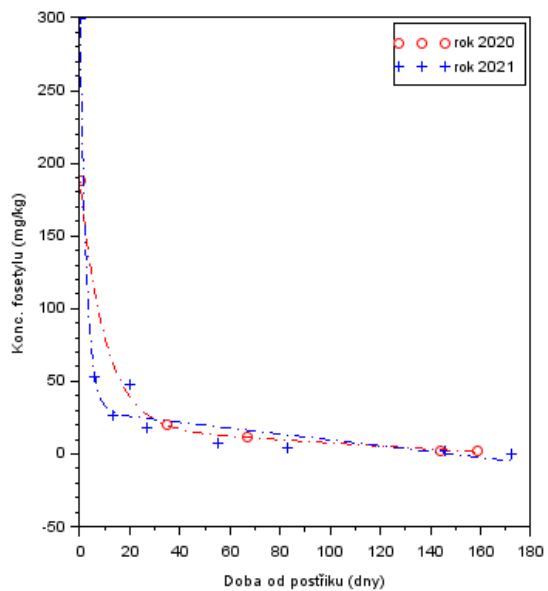


Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu DV4

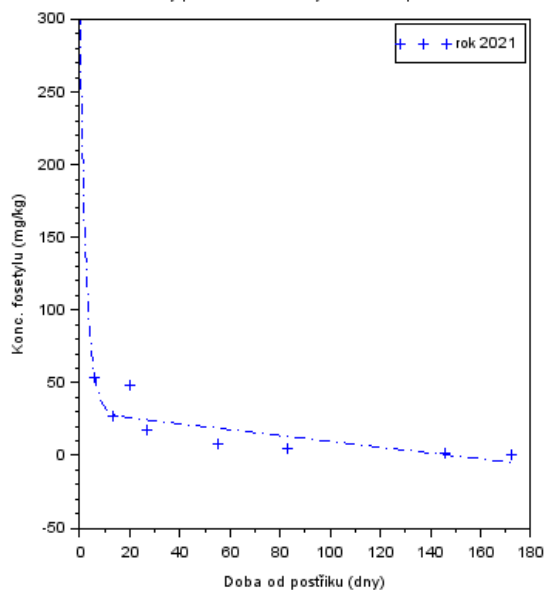




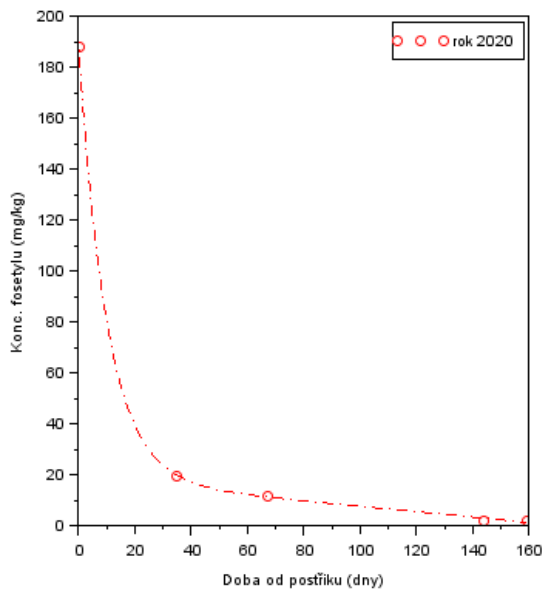
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV1



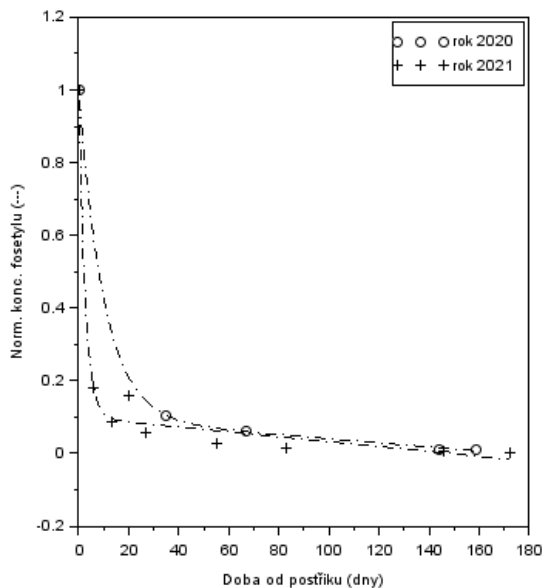
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV1



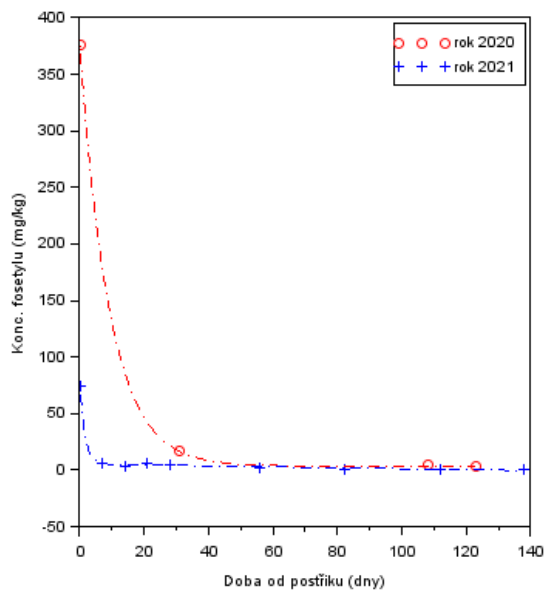
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV1



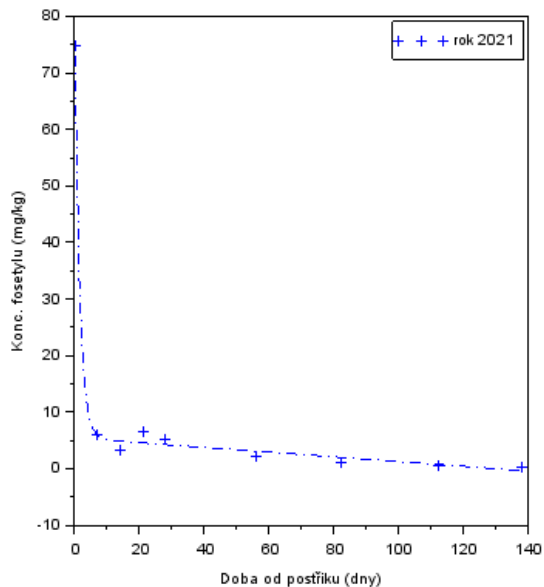
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV1



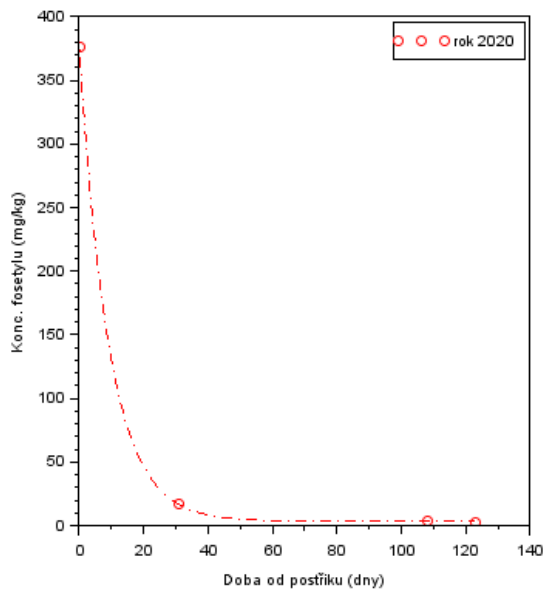
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV2



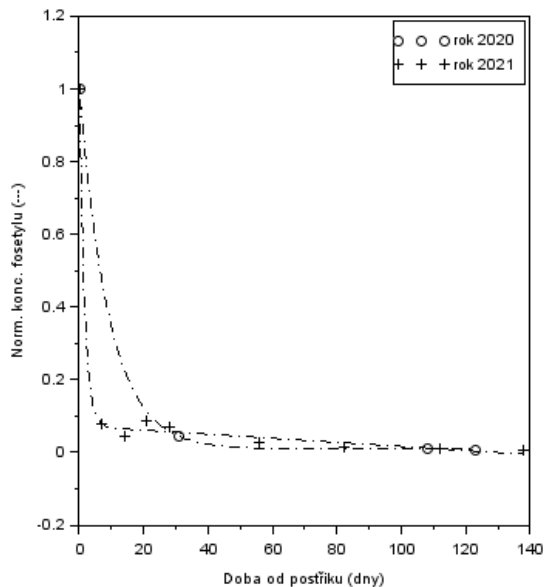
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV2



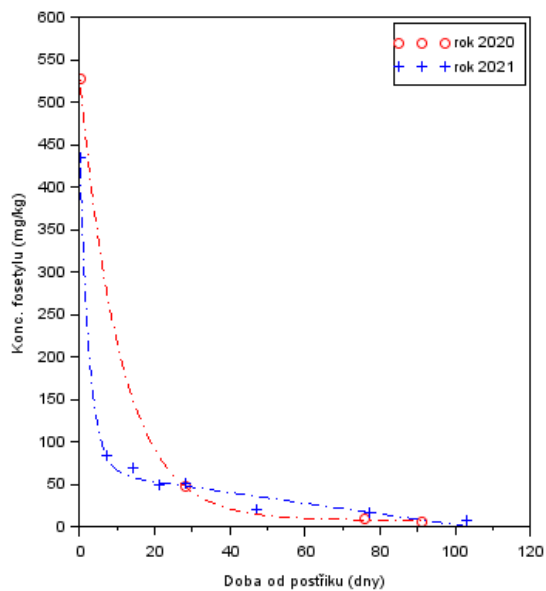
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV2



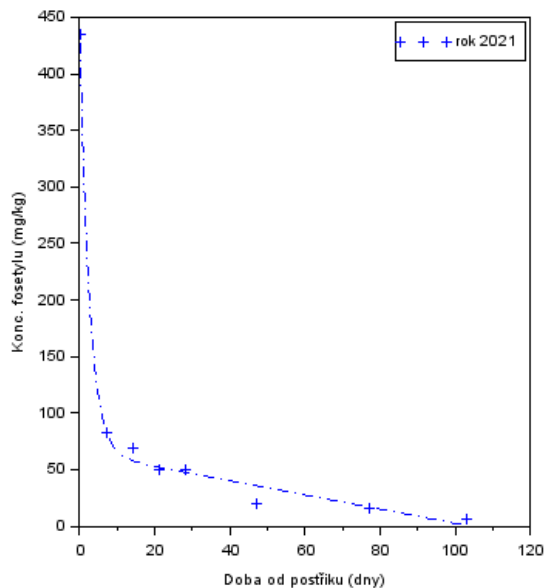
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV2



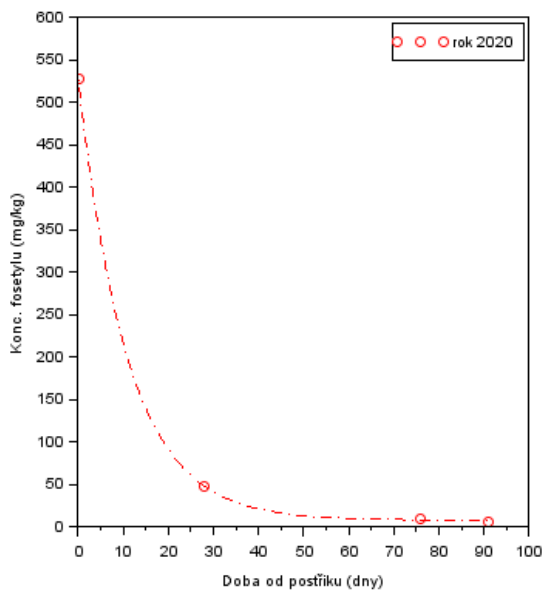
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV3



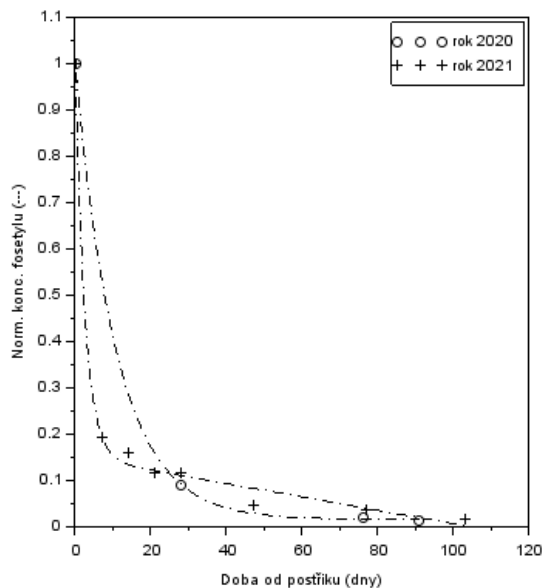
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV3



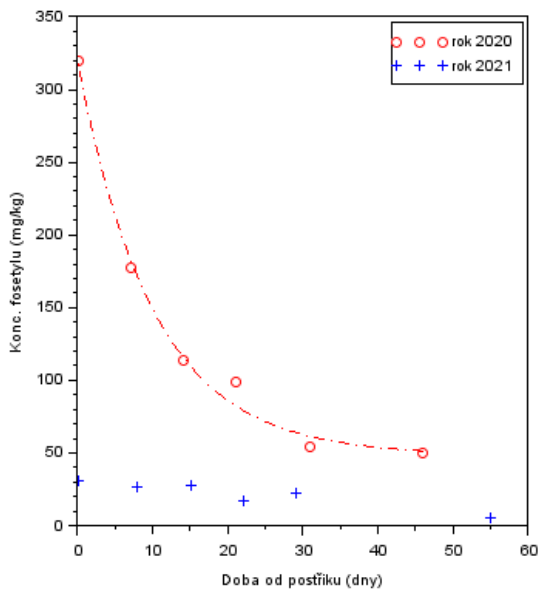
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV3



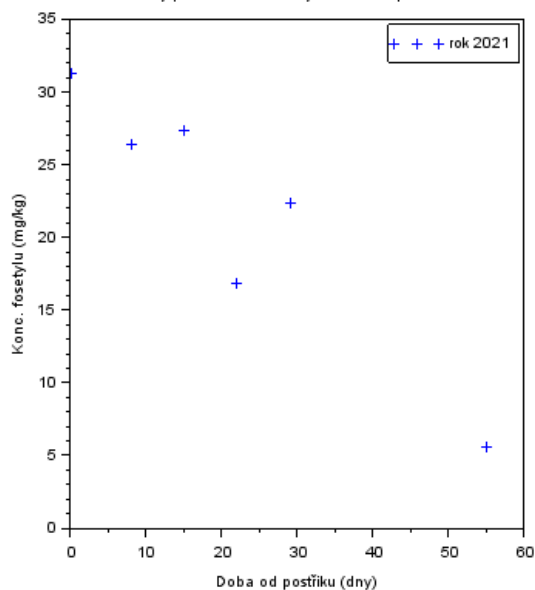
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV3



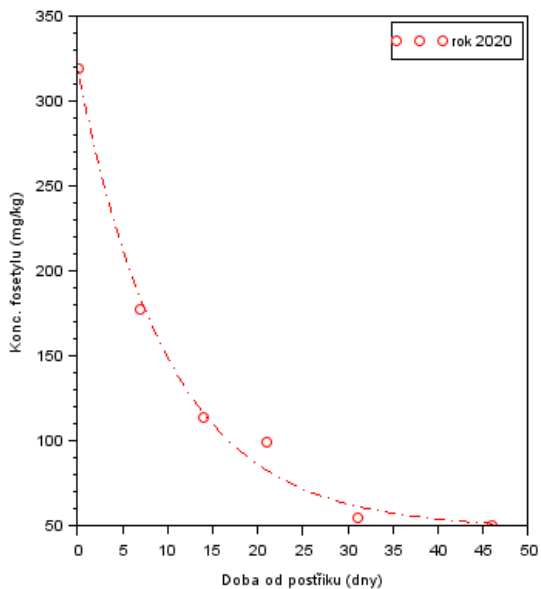
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV4



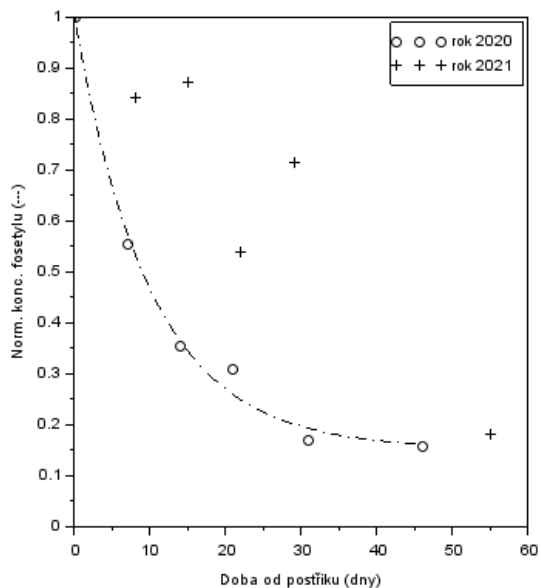
Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV4



Časový průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV4



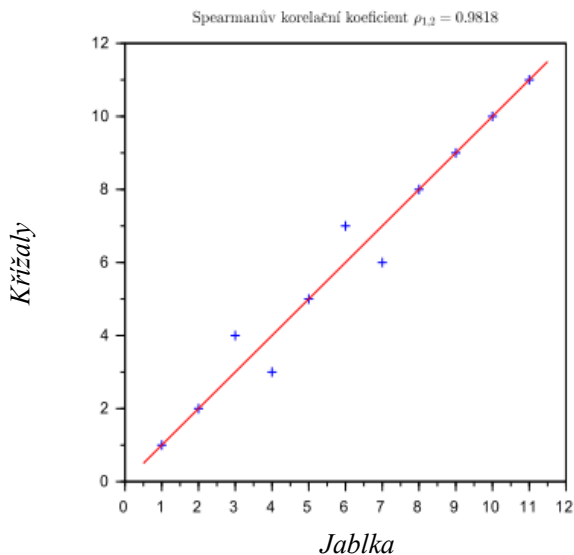
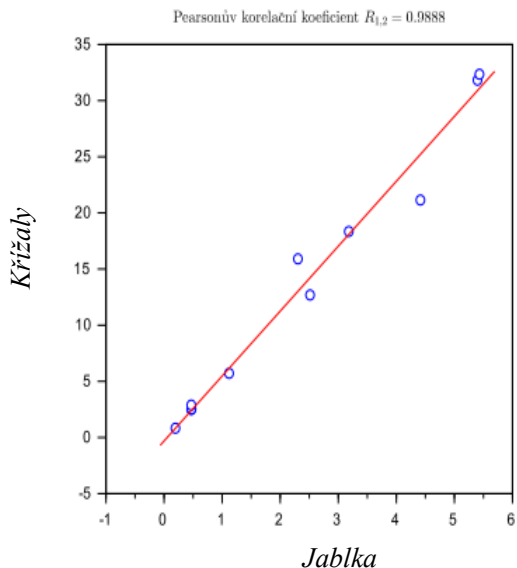
Normovaný průběh konc. fosetylu v listech pokusu LV4





### 3.4.3. Analyzované vzorky plodů a zpracovatelských produktů (křížal)

Získané výsledky analýz plodů a sušených zpracovatelských produktů ukazují na velmi silnou korelaci mezi obsahem fosetylu v čerstvých plodech a sušených plodech (křížalách). Během sušení nedochází k degradaci analytu. Vzhledem k odstranění vody během sušení je koncentrace analytů v křížalách vyšší. Lze navažovat nižší množství vzorku. Výhodou analyzovaných sušených vzorků je vyšší stabilita při skladování. Vzorek bude méně náchylný k degradaci než vodnaté matrice.



### 3.4.4. Vývoj koncentrace reziduí v částech výsadby bez nové aplikace postřiku

V rámci pokusů mezi variantami 1 a 5 u obou postřikových programů byly vyčleněny pokusné stromy, které byly v předchozím roce 2020 součástí pokusů 1 nebo 5 a v následujícím roce 2021 nebyly ošetřovány. Zájmem bylo zjistit, jak se bude vyvíjet koncentrace reziduí v roce následujícím. Pro každý ze čtyř pokusů: dva postřikové plány pro dva typy postřiku a vždy ve dvou maticích (dřevo, listy) bylo získáno 5 bodů: hodnota rezidua fosetylu před opadem listů z předešlého roku, hodnota před prvním postřikem v daném roce (společný bod pro obě linie: postřikované a nepostřikované) a tři odběry na vyčleněných stromech bez postřiku v daném roce.

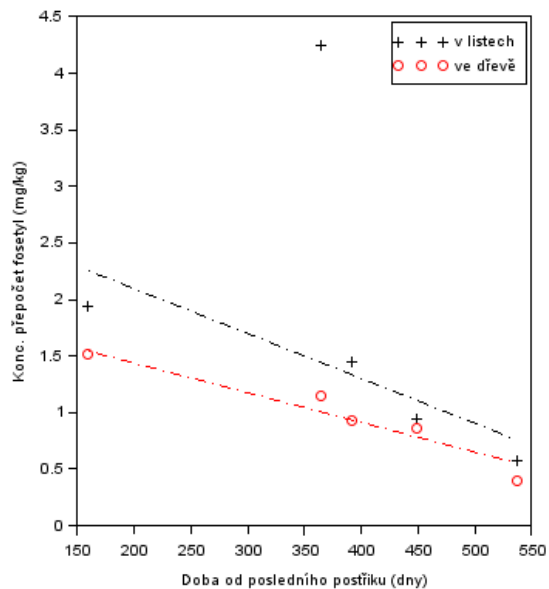
Konzistentnější výsledky trendů dává matrice dřevo. 3 ze 4 pokusů naznačují, že od konce roku předcházejícího až do vegetačního konce roku aktuálního koncentrace fosetylu klesá. Pokles lze aproximovat lineární závislostí. U listů sledujeme tentýž trend, avšak hodnoty jsou zatíženy vyšším šumem. Zároveň platí, že se na koncentracích nepochybně podepisuje historie ošetření, v našem případě absolutní množství postřiků z minulého roku. Porovnáme-li také finální dosahované koncentrace proti koncentracím v kontrolních vzorcích bez historie ošetřování přípravky na bázi sloučenin fosforu, pak mají tyto neošetřované kontroly i o řád nižší hodnoty reziduí.

Po provedených pokusech roku 2020 byla část výsadby variant 1 a 5 (1 – jednorázový postřik v rané fázi, 5 – opakovaný směsný postřik) vyčleněna pro sledování vývoje koncentrací v následujícím roce 2021 bez dalšího postřiku. Ve čtyřech intervalech byly odebrány a analyzovány vzorky listů a dřeva.

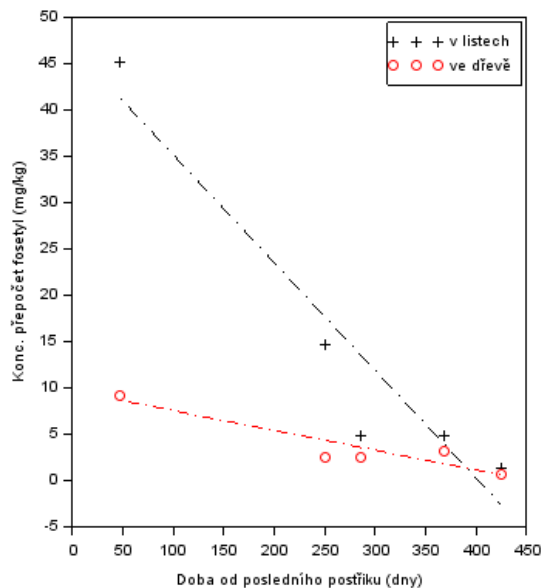
V následujícím obrázku jsou vyneseny průběhy zjištěných koncentrací fosfonátů po přepočtu na fosetyl ve všech čtyřech variantách pokusů v obou analyzovaných maticích. Na ose x je vynášena doba od posledního provedeného postřiku a první body grafů jsou referenční hodnoty z posledního odběru vzorků roku 2020. Proložené přímkové trendy byly získány váženou variantou metody nejmenších čtverců (k omezení vlivu odlehlých hodnot).

Na první pohled je vidět výrazný rozdíl hodnot reziduí mezi variantami 1 a 5. Ve variantě 1 jsou rezidua velmi nízká, naopak ve variantě 5 až několikanásobně vyšší. Toto pozorování lze jednoznačně přisuzovat intenzivnějšímu postřiku v roce 2020. Také lze vidět, že rezidua v nepostřikovém roce během vegetačního období jeví klesající tendenci, kterou lze aproximovat přímkovým trendem (vyjma pokusů LV1, kde nízké hodnoty reziduí ve spojení s rozptylem získaných hodnot lze spíše vyhodnotit jako konstantní hodnotu). Trend v reziduálních hodnotách je stabilnější spíše u matrice dřeva, v matici listy se objevují častěji odlehlé hodnoty. Při sledování v delším časovém horizontu než jednoho roku se dá očekávat, že aproximace přímkovou závislostí již bude nedostatečná a bylo by ji třeba nahradit jinou limitující závislostí.

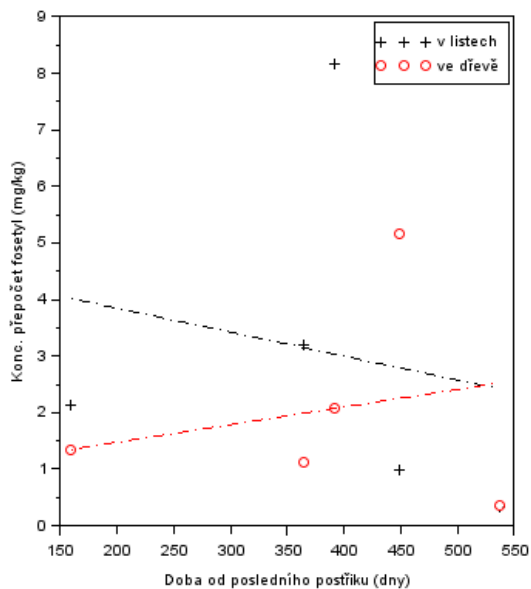
Reziduum - vývoj bez postřiku ve variantě DV1



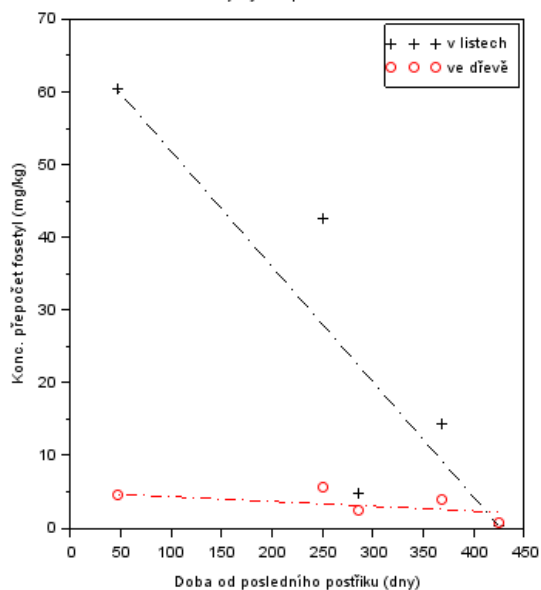
Reziduum - vývoj bez postřiku ve variantě DV5



Reziduuum - vývoj bez postřiku ve variantě LV1



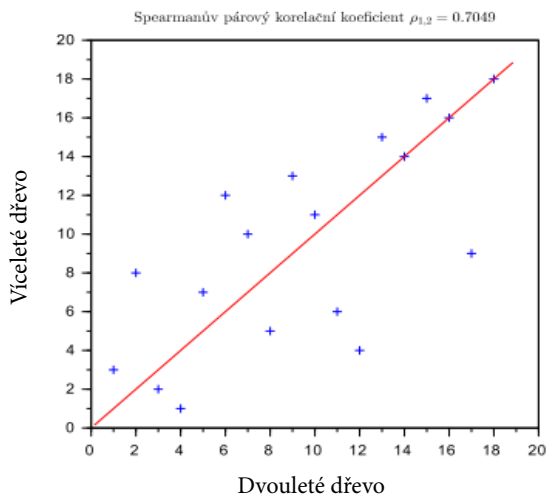
Reziduuum - vývoj bez postřiku ve variantě LV5



Co se týče ostatních variant sledovaných kombinací postřiků a časů, můžeme porovnávat pouze 4 časové úseky, a to ještě je systém ovlivněn provedeným postřikem: (1) hodnotu reziduí před vůbec prvním postřikem našeho experimentování, (2) hodnotu reziduí před opadem listů (konec vegetační doby roku předcházejícího), hodnotu reziduí před prvním postřikem roku aktuálního (3) a (4) hodnotu reziduí na konci vegetační doby roku aktuálního. První a třetí bod představují koncentrace reziduí před postřikem daného roku. V mnoha případech hodnot reziduí zjišťovaných ve dřevě zjišťujeme velmi dobře si odpovídající hodnoty, zejména ve variantě Luna Care, ve variantě Delan Pro se vyskytují odlehlá pozorování. Pro rezidua mezi 2 a 3 bodem byly pozorovány velmi rozdílné scénáře. Rezidua mohou klesat – a to i velmi rapidně například u varianty 4 s nejzazším datem postřiku a též v kombinaci s předpokládanou nižší biologickou aktivitou. Mohou také stagnovat jako například u varianty LV2. Mezi prvním a druhým stejně jako třetím a čtvrtým bodem došlo k postřiku, a i zde jsou trendy dány spíše vzdálenostmi okamžiků odběru vzorků.

### 3.4.5. Vývoj koncentrace reziduí v mladším a starším dřevě, varianta 5

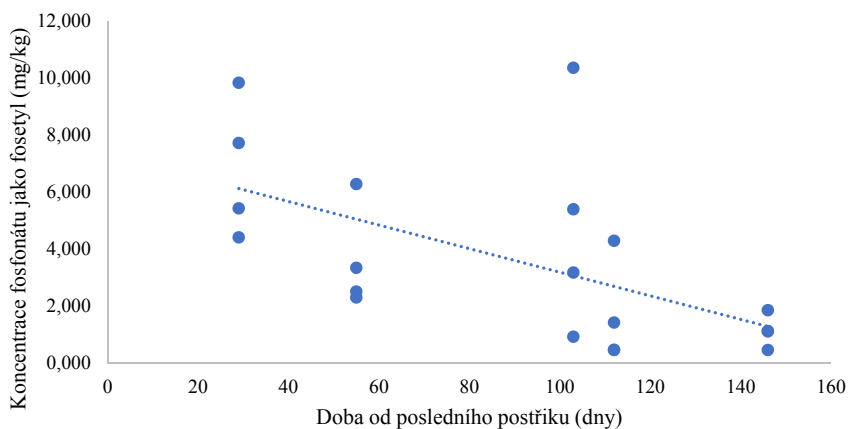
Novým experimentem roku 2021 bylo odebrání dvou typů vzorků dřeva – mladšího (větvě, výhony o stáří přibližně 2 roky) a staršího (přibližně pětileté větve). Data byla sbírána u obou variant pokusu 5, po přepočtu na fosetyl. Korelační analýza ukazuje na významné hodnoty s Pearsonovým párovým korelačním koeficientem kolem 0,91, avšak tento výsledek silně ovlivňuje heteroskedasticita dat a jedna extrémní hodnota, což způsobuje i vícerozměrnou nenormalitu dat. Pravdivější hodnotu vzájemné vazby tak dává spíše párový Spearmanův koeficient pořadové korelace, který má hodnotu kolem 0,7. Existuje zde tedy pozitivní korelační vztah, avšak ne příliš silný. Vysvětlení lze hledat v heterogenitě odebíraného materiálu, poměru dřevní hmoty a kůry atp. Koncentrace ve starším dřevu je statisticky nižší než v mladším. Ukazuje se, že odběr dřeva a následná analýza na fosfony je sice průkazná, ale na rozdíl od analýzy listů či plodů je zatížena i vlivem vnitřní variability vzorku.



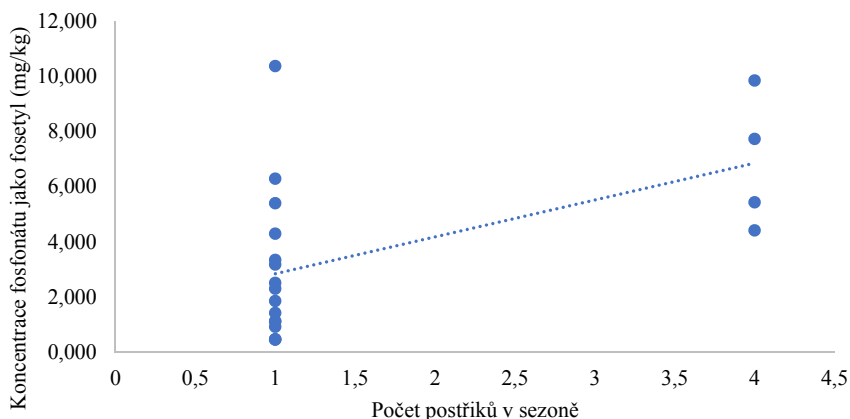
### 3.4.6. Páté varianty – pozorovaný průběh obsahů fosfonátů

Páté varianty pokusů představují několikanásobnou aplikaci fosfonátových přípravků ve vegetačním období. Jednotlivé aplikace byly prováděny v přibližně měsíčních odstupech. V roce 2020 byly odebírány vzorky těsně před postřikem a po postřiku – získané závislosti přepočtené koncentrace reziduí fosetylu na čase mají pilovitý tvar. Lokální maxima odpovídají vzorkům odběru těsně po postřiku. Jsou uvedeny grafy pro závislosti v matricích listy a dřevu.

Vliv koncentrace rezidua fosfonátů v jablku na době od posledního postřiku (data roku 2020 a 2021)



Vliv koncentrace rezidua fosfonátů v jablku na době od posledního postřiku (data roku 2020 a 2021)



### 3.5 Celkové hodnocení

Pro hodnotu rezidua fosfonátů v jablkách či křížalách bylo identifikováno několik důležitých faktorů

1. Historická zátěž a vliv prostředí – je prvotním vlivem na koncentraci reziduí fosfonátů v plodech dané lokality pěstování
2. Intenzivní využívání fosfonátových přípravků – časté použití těchto přípravků zvyšuje okamžitě „dostupné“ množství těchto látek v rostlině, a to se projevuje i vysokou hodnotou reziduí v plodech
3. Doba použití fosfonátových přípravků – s delším odstupem postřiku před sklizní se významně snižuje i koncentrace reziduí
4. Vliv počasí – patrně další významný mnohoúrovňový faktor, který lze však vyhodnocovat až v několikaletém pozorování, neboť tento vliv nelze experimentálně postihnout.

#### Význam použití matematických modelů pro sledování reziduí

- Jeden z inovativních hodnocení reziduí fosfonátů v rostlinných částech jádřovin
- Jedná se o snahu postihnout vývoj koncentrací fosfonátů v jednotlivých matricích po postřiku nelineárním modelem.
- Dle formulace modelu odlišit přirozenou změnu koncentrací od té vyvolané postřikem
- Lze aproximovat koncentrační vývoj a odfiltrovat část variability dat způsobených nedokonalým odběrem vzorku a analytickým stanovením.
- Při dostatečném experimentálním rozsahu lze korelovat získané parametry s identifikovanými vlivy (proměnnými) a činit o nich závěry co do významnosti.

## 4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Naše metodika popisuje na základě experimentální práce degradaci reziduí fosfonátů v různých částech rostlinného materiálu. Jsou zde popsány nové poznatky a informace o chování fosfonátů, které byly získány v rámci řešení výzkumu monitoringu reziduí fosfonátů.

Použití značených standardů je bráno jako ten nejlepší možný způsob kvantifikace v MS metodách. Při použití naší metody bylo o této skutečnosti uvažováno, ale problém byl v jejich získání. Buď byly nedostupné, nebo velmi finančně náročné. V této metodice jsme se tedy vydali způsobem použití chemicky velmi podobných sloučenin, u kterých se dalo očekávat podobné chování jako u zájmových molekul. Kyselina methylfosfonová a ethylfosfonová byly pro potřeby kvantitativního stanovení jako vnitřní standardy zcela dostačující (blízké fyzikálně-chemické vlastnosti, podobné retenční chování na separační koloně, alkyl-fosfonové kyseliny využívány jako IS v publikacích). Pro ně toto bylo samozřejmě testováno a počítány byly odezvové faktory. Odezvové faktory vnitřních standardů řešily do značné míry i nedostatky metody např. eliminovaly vliv neznámého množství vody napříč všemi dodanými vzorky.

Finální kvantifikaci sledovaných analytů nebylo možné provést s využitím průměrného odezvového faktoru ze série kalibračních standardů připravených do matričního roztoku, a to z důvodu velmi nízkých výtěžností zejména u matic půdy a dřeva. Po řadě neúspěšných pokusů zvýšit výtěžnosti sledovaných analytů v kontrolních fortifikačních vzorcích, bylo nutno uvažovat o již zmíněné kvantifikační metodě pomocí vnitřních standardů. Takto byly i metody validovány na obvyklé validační parametry.

V běžných stanoveních je samozřejmě možné postupovat i metodou kalibračních přímk. Zde však byl problém získat matici bez zájmových analytů (hlavně bez kyseliny fosfonové), taktéž matrice např. dřevo byla velmi variabilní a nemohlo se předpokládat stejné matriční chování pro všechny vzorky. Kvantifikační metodou vnitřního standardu tak byly kvantifikovány všechny analyzované matrice (plody, dřevo, listí a půda).

## 5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Pro účely ovocnářů je dobré znát osud chování reziduí v částech rostlin společně s vývojem degradačních křivek během dozrávání plodů do doby sklizně. Fosfonáty jako takové nejsou z hlediska bezpečnosti potravin nebezpečné, nicméně z hlediska legislativy je pro ovocnáře důležité mít informaci o tom, zda obchodní řetězec bude vyžadovat pro přijetí ovoce počet reziduí nebo limit. Pokud by se jednalo o počet reziduí, je nutné, aby ovocnář v rámci ochrany ovoce na tuto skutečnost myslel, jelikož je hodnota MLR pro sumu fosetylu (fosetylu a fosfonátů) pro jablka až extrémně vysoká. Je stanovena na 150 mg/kg. Taková koncentrace v jablkách nebyla během pokusů dosažena ani při opakovaném postřiku přípravky na bázi



fosfonátů i fosetylu-Al. Bude-li však pro ekologickou produkci ovoce a dětskou výživu vyžadována obecně přijímaná hranice reziduí pesticidů 0,010 mg/kg, pak z provedených analýz vyplývá, že nemůže být s největší pravděpodobností v roce postřiku a také v letech následujících po poslední aplikaci splněna.

Metodika je určena především pěstitelům jaderovin, kteří využívají v rámci integrované ochrany rostlin přípravky na bázi fosfonátů, ale je zajímavá též pro chemické laboratoře, které mohou nabídnout vyvinuté metody šlechtitelům formou služby, nebo pro výzkumné ústavy či univerzity, které se zabývají kromě šlechtění i analýzami fosfonátů v ovoci.

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Na základě dosažených výsledků bylo zjištěno, že rezidua fosfonátů jsou velmi pomalu odbourávána, zůstávají dlouhodobě ve dřevě ovocných stromů. I když jsou detekovatelná v nízkých dávkách a pro běžné pěstitele splňují požadované limity MLR, pro dětskou výživu však požadované limity mohou přesahovat. Z tohoto důvodu je nutné všechny přípravky s účinnou látkou na bázi fosfonátů zcela vyloučit z aplikací v produkci jablek určených k dětské výživě, a to i v případě aplikace pouze na začátku vegetační sezóny. Pro producenty jablek určených pro zpracování k dětské výživě je to z ekonomického hlediska velmi cenný poznatek. V případě použití přípravků s obsahem fosfonátů v ochraně ovocných plodin, nelze produkci jablek výhodně zpeněžit jako surovinu pro dětskou výživu a pro ovocnáře je to značná finanční ztráta.

Cena analýzy jednoho vzorku z přímých i nepřímých nákladů je velmi složitá, běžně se postupuje odhadem časové náročnosti administrace, přípravy vzorku, analýzy a reportování, které se násobí cenou jedné člověkohodiny/strojohodiny, která zohledňuje všechny ekonomické faktory dané laboratoře jako jsou například mzdové náklady, odpisy zařízení, energetické náklady na uchování, zpracování vzorků a provoz zařízení, nákup spotřebních materiálů a chemikálií, administrativní podporu a předpokládaný zisk. Tento parametr je dlouhodobě vyhodnocován a lze používat obecně.

Je-li metoda na pracovišti zavedena a příslušná instrumentace k dispozici, pak časová náročnost v minutách jednotlivých kroků je přibližně následující

- Přejímka a administrace příjmu vzorku 20 minut
- Vážení standardů a příprava pracovních roztoků 90 minut
- Homogenizace vzorku 20 minut
- Vážení vzorku včetně vzorků na kontrolu kvality (QA) analytického procesu 15 minut
- Zpracování vzorku/extrakce, příprava k analýze 25 minut
- Příprava instrumentální techniky k měření 120 minut.

- Vlastní analýza vzorku (sekvence ustalovacích nástřiků, vzorku, QA vzorků, proplachu) 140 minut
- Vyhodnocení sekvence a tvorba jednoduchého protokolu 30 minut
- Dezinfekce a čištění prostorů a zařízení a použitého nádobí 30 minut

Úhrnem cca 490 minut, což při ceně hodiny například 1400 Kč dává odhad ceny za ojedinělý vzorek 11433 Kč.

Je pochopitelné, že při analýze většího množství vzorků najednou pouze některé časové položky jsou aditivní, velká část úkonů však jde provádět pro více vzorků najednou, během jednoho pracovního dne. Zároveň také cenu analýzy jednoho vzorku může snižovat i celková velikost zakázky, kdy některé z činností lze pro několik měřených sekvencí lze provést jen jednou.

Kalkulace na zavedení analytické metody se opírá o předcházející způsob výpočtu a předpokládá možnost přesné replikace analytických podmínek (instrumentace, pracovního postupu). Minimálně by měl proběhnout transfer metody či její validace a její rozsah je dán specifickými laboratorními předpisy pro zajišťování kvality. Obecně lze odhadnout, že časová náročnost tohoto procesu jsou 3–4 pracovní dny. Do ceny je nutno zahrnout i náklady na pořízení speciálních chemikálií jako jsou analytické standardy.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Aberton, M.J., Wilson, B.A., Cahill, D.M., 1999. The use of potassium phosphonate to control *Phytophthora cinnamomi* in native vegetation at Anglesea, Victoria. *Australas. Plant Pathol.* 28 (3), 225–234.
- Ali, Z., Guest, D.I., 1998. Potassium phosphonate controls root rot of *Xanthorrhoea australis* and *X. minor* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australas. Plant Pathol.* 27 (1), 40–44.
- Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Wachtler, A.-K., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., Cerchia, G., 2019. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS Involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPpe-Method) I. Food of Plant Origin (QuPpe-PO-Method). Version 10 (09.01.2019). Available at [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm\\_meth\\_QuPpe\\_PO\\_V10.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V10.pdf)
- Anderson, R.D., Guest, D.I., 1990. The control of black pod, canker and seedling blight of cocoa, caused by *Phytophthora palmivora*, with potassium phosphonate. *Australas. Plant Pathol.* 19 (4), 127–129.
- Damhus, T., Hartshorn, R., Hutton, A.T., 2005. Nomenclature of inorganic chemistry – IUPAC recommendations 2005. *Chem. Int.*

- FAO, 2017. Joint FAO/WHO meeting on pesticide specifications (JMPS). Fosetylaluminium, phosphonic acid. Available at [http://www.fao.org/fleadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation2017/FOSETYL-ALUMINIUM\\_302\\_\\_PHOSPHONIC\\_ACID\\_301\\_.pdf](http://www.fao.org/fleadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation2017/FOSETYL-ALUMINIUM_302__PHOSPHONIC_ACID_301_.pdf).
- FAO, 2015. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides - chlorothalonil. Fao. Available at: [http://www.fao.org/fleadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/Fosetyl\\_AI\\_2013.pdf](http://www.fao.org/fleadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Fosetyl_AI_2013.pdf).
- Malusá, E., Tosi, L., 2005. Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: results of field trials. *Food Addit. Contam.* 22 (6), 541–548.
- MANGHI, Maria Chiara, Mauro MASIOL, Riccardo CALZAVARA, Pier Luigi RAZIANO, Elisabetta PERUZZI a Bruno PAVONI. The use of phosphonates in agriculture. Chemical, biological properties and legislative issues. *Chemosphere* [online]. 2021, 283 [cit. 2022-07-13]. ISSN 00456535. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R1009&from=CS> <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=GA> <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R1009&from=EN>
- Trinchera, A., Parisi, B., Baratella, V., Rocuzzo, G., Soave, I., Bazzocchi, C., Fichera, D., Finotti, M., Riva, F., Mocciaro, G., Briigliadori, M., Lazzeri, L., 2020. Assessing the origin of phosphonic acid residues in organic vegetable and fruit crops: the BioFosf project multi-actor approach. *Agronomy* 10 (3), 421.
- Varadarajan, D.K., Karthikeyan, A.S., Matilda, P.D., Raghothama, K.G., 2002. Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol.* 129 (3), 1232–1240.

## 8. PUBLIKACE PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE

V rámci projektu byl postup prací a dosažené výsledky dokumentován do odborných zpráv. Byly odeslány 2 odborné zprávy (rok 2020 a 2021), ke kterým bylo sepsáno stanovisko zpravodaje. V roce 2022 byla odevzdána a oponentována závěrečná zpráva k projektu.

## 9. PŘÍLOHY

### 9. 1. Obsahy reziduí pesticidů v jednotlivých variantách přípravku Luna Care (LV1-LV5) a Delan Pro (DV1-DV5)

1. varianta	LUNA CARE	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočítáno na fosetyl)					
Varianta LV1 2021			Listy	Dřevo 2leté	Plod	Zpracovatelský produkt	Listy - kontrola	Dřevo - kontrola
1 den před aplikací	20. 05. 2021	-1	3,20	1,12	---	---	---	---
v den aplikace	21. 05. 2021	0	300	40,4	---	---	---	---
týden po aplikaci	27. 05. 2021	6	53,5	12,8	---	---	---	---
14 dní po aplikaci	03. 06. 2021	13	26,6	10,2	---	---	---	---
3 týdny po aplikaci	10. 06. 2021	20	47,9	11,9	---	---	---	---
končí OL 1 měsíc*	17. 06. 2021	27	17,7	8,18	---	---	8,18	2,08
2. měsíc	15. 07. 2021	55	7,78	4,64	---	---	---	---
3. měsíc	12. 08. 2021	83	4,41	0,95	---	---	0,97	5,15
sklizeň	14. 10. 2021	146	1,82	2,60	1,12	---	---	---
před opadem listů	09. 11. 2021	172	0,37	2,20	---	---	0,32	0,34
příprava křížal	27. 10. 2021	159	---	---	---	5,71	---	---

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

2. varianta	LUNA CARE	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v maticích v mg/kg (přepočet na fosetyl)			
			Listy	Dřevo 2leté	Plod	Zpracovatelský produkt
Varianta LV2 2021						
1 den před aplikací	23. 06. 2021	-1	2,68	2,01	---	---
v den aplikace	24. 06. 2021	0	74,7	10,7	---	---
týden po aplikaci	01. 07. 2021	7	5,91	2,81	---	---
14 dní po aplikaci	08. 07. 2021	14	3,23	2,08	---	---
3 týdny po aplikaci	15. 07. 2021	21	6,46	3,51	---	---
končí OL 1 měsíc*	22. 07. 2021	28	5,16	3,08	---	---
2. měsíc	19. 08. 2021	56	2,12	2,09	---	---
3. měsíc	14. 09. 2021	82	1,14	1,56	---	---
sklizeň	14. 10. 2021	112	0,63	1,00	0,47	---
před opadem listů	09. 11. 2021	138	0,32	1,05	---	---
příprava křížal	27. 10. 2021	125	---	---	---	2,89

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

3. varianta	LUNA CARE	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočet na fosetyl)			
			Listy	Dřevo 2leté	Plod	Zpracovatelský produkt
Varianta LV3 2021						
1 den před aplikací	28. 07. 2021	-1	2,34	2,47	---	---
v den aplikace	29. 07. 2021	0	435	62,1	---	---
týden po aplikaci	05. 08. 2021	7	83,0	13,0	---	---
14 dní po aplikaci	12. 08. 2021	14	69,5	9,62	---	---
3 týdny po aplikaci	19. 08. 2021	21	49,7	10,5	---	---
končí OL 1 měsíc*	26. 08. 2021	28	50,4	9,33	---	---
2. měsíc	14. 09. 2021	47	20,3	7,91	---	---
sklizeň	14. 10. 2021	77	15,7	5,93	5,40	---
před opadem listů	09. 11. 2021	103	6,57	5,85	---	---
příprava křížal	27. 10. 2021	90	---	---	---	31,8

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

4. varianta	LUNA CARE	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v maticích v mg/kg (přepočten na fosetyl)			
			Listy	Dřevo 2leté	Plod	Zpracovatelský produkt
Varianta LV4 2021						
1 den před aplikací	14. 09. 2021	-1	1,80	1,92	0,62	---
v den aplikace	15. 09. 2021	0	31,3	6,69	0,92	---
7 dní po aplikaci	23. 09. 2021	8	26,3	5,23	2,85	---
14 dní po aplikaci	30. 09. 2021	15	27,3	4,63	1,01	---
21 dní po aplikaci	07. 10. 2021	22	16,8	2,73	2,85	---
končí OL 1 měsíc*	14. 10. 2021	29	22,4	5,69	2,51	---
před opadem listů	09. 11. 2021	55	5,60	2,45	---	---
příprava křížal	27. 10. 2021	42	---	---	---	12,7

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

5. varianta	LUNA CARE	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfanátů v matricích v mg/kg (přepočít na fosetyl)						
			Listy	Dřevo 2leté	Dřevo víceleté	Plod	Zpracovatelský produkt	Listy - kontrola	Dřevo - kontrola
Varianta LV5 2021									
před 1. aplikací	20. 05. 2021	-1	42,5	5,54	---	---	---	---	---
den 1. aplikace	21. 05. 2021	0	179	15,9	8,17	---	---	---	---
týden po 1. aplikaci	27. 05. 2021	6	51,9	---	---	---	---	---	---
14 dní po 1. aplikaci	03. 06. 2021	13	35,4	---	---	---	---	---	---
3 týdny po 1. aplikaci	10. 06. 2021	20	20,0	---	---	---	---	---	---
před 2. aplikací	23. 06. 2021	33	35,0	10,8	7,32	---	---	4,72	2,46
2. aplikace	24. 06. 2021	0	59,0	16,0	8,03	---	---	---	---
týden po 2. aplikaci	01. 07. 2021	7	19,1	---	---	---	---	---	---
14 dní po 2. aplikaci	08. 07. 2021	14	9,46	---	---	---	---	---	---
3 týdny po 2. aplikaci	15. 07. 2021	21	23,6	---	---	---	---	---	---
před 3. aplikací	28. 07. 2021	34	13,7	7,01	6,98	---	---	---	---
3. aplikace	29. 07. 2021	0	338	54,8	39,3	---	---	---	---
14 dní po 3. aplikaci	12. 08. 2021	14	58,0	9,62	---	---	---	---	---
3 týdny po 3. aplikaci	19. 08. 2021	21	44,8	---	---	---	---	---	---
před 4. aplikací	14. 09. 2021	47	25,3	7,69	5,82	---	---	14,4	3,90
4. aplikace	15. 09. 2021	0	123	19,4	17,3	---	---	---	---
týden po 4. aplikaci	23. 09. 2021	8	79,6	---	---	---	---	---	---
14 dní po 4. aplikaci	30. 09. 2021	15	66,0	---	---	---	---	---	---
3 týdny po 3. aplikaci	07. 10. 2021	22	45,7	---	---	---	---	---	---
Skizeň	14. 10. 2021	29	29,6	12,0	6,15	5,43	---	---	---
před opadem listů	09. 11. 2021	55	18,3	9,26	4,83	---	---	0,38	0,81
příprava křížal	27. 10. 2021	42	---	---	---	---	32,3	---	---

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc



1. varianta	DELAN PRO	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočít na fosetyl)					
			Listy	Dřevo žleté	Plod	Zpracovatelský produkt	Listy - kontrola	Dřevo - kontrola
Varianta DV1 2021								
1 den před aplikací	20. 05. 2021	-1	4,25	1,14	---	---	---	---
v den aplikace	21. 05. 2021	0	103	15,8	---	---	---	---
týden po aplikaci	27. 05. 2021	6	21,1	3,18	---	---	---	---
14 dní po aplikaci	03. 06. 2021	13	13,4	3,14	---	---	---	---
3 týdny po aplikaci	10. 06. 2021	20	5,88	1,88	---	---	---	---
končí OL 1 měsíc*	17. 06. 2021	27	5,50	2,27	---	---	1,44	0,93
2. měsíc	15. 07. 2021	55	2,28	1,22	---	---	---	---
3. měsíc	12. 08. 2021	83	1,59	1,01	---	---	0,95	0,86
sklizeň	14. 10. 2021	146	0,54	0,63	0,47	---	---	---
před opadem listů	09. 11. 2021	172	1,10	0,42	---	---	0,57	0,39
příprava křížal	27. 10. 2021	159	---	---	---	2,48	---	---

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

2. varianta	DELAN PRO	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočít na fosetyl)			
			Listy	Dřevo zleté	Plod	Zpracovatelský produkt
Varianta DV2 2021						
1 den před aplikací	23. 06. 2021	-1	0,99	0,68	---	---
v den aplikace	24. 06. 2021	0	32,0	7,64	---	---
týden po aplikaci	01. 07. 2021	7	8,92	2,47	---	---
14 dní po aplikaci	08. 07. 2021	14	5,88	2,02	---	---
3 týdny po aplikaci	15. 07. 2021	21	4,95	2,53	---	---
končí OL 1 měsíc*	22. 07. 2021	28	4,25	2,40	---	---
2. měsíc	19. 08. 2021	56	2,00	1,60	---	---
3. měsíc	14. 09. 2021	82	2,01	1,00	---	---
sklizeň	14. 10. 2021	112	1,10	0,85	0,47	---
před opadem listů	09. 11. 2021	138	0,81	0,87	---	---
příprava křížal	27. 10. 2021	125	---	---	---	2,54

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

3. varianta	DELAN PRO	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočten na fosetyl)			
			Listy	Dřevo 2leté	Plod	Zpracovatelský produkt
Varianta DV3 2021						
1 den před aplikací	28. 07. 2021	-1	0,85	0,64	---	---
v den aplikace	29. 07. 2021	0	217	26,1	---	---
týden po aplikaci	05. 08. 2021	7	94,3	6,86	---	---
14 dní po aplikaci	12. 08. 2021	14	37,0	5,87	---	---
3 týdny po aplikaci	19. 08. 2021	21	32,9	7,70	---	---
končí OL 1 měsíc*	26. 08. 2021	28	32,2	13,2	---	---
2. měsíc	14. 09. 2021	47	16,4	6,05	---	---
sklizeň	14. 10. 2021	77	8,65	2,65	3,18	---
před opadem listů	09. 11. 2021	103	3,87	3,73	---	---
příprava křížal	27. 10. 2021	90	---	---	---	18,3

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

4. varianta	DELAN PRO	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočet na fosetyl)			
			Listy	Dřevo 2leté	Plod	Zpracovatelský produkt
Varianta DV4 2021						
1 den před aplikací	14. 09. 2021	-1	1,18	1,66	0,54	---
v den aplikace	15. 09. 2021	0	47,5	10,5	1,09	---
7 dní po aplikaci	23. 09. 2021	8	37,1	4,52	1,86	---
14 dní po aplikaci	30. 09. 2021	15	28,2	4,31	2,29	---
21 dní po aplikaci	07. 10. 2021	22	18,2	4,44	1,90	---
končí OL 1 měsíc*	14. 10. 2021	29	14,6	4,04	2,31	---
před opadem listů	09. 11. 2021	55	6,68	3,63	---	---
příprava křížal	27. 10. 2021	42	---	---	---	15,9

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

5. varianta	DELAN PRO	Počet dní po poslední aplikaci	Koncentrace fosfonátů v matricích v mg/kg (přepočet na fosetyl)						
			Listy	Dřevo zleté	Dřevo víceleté	Plod	Zpracovatelský produkt	Listy - kontrola	Dřevo - kontrola
Varianta DV5 2021									
před 1. aplikací	20. 05. 2021	-1	14,7	2,42	---	---	---	---	---
den 1. aplikace	21. 05. 2021	0	212	23,8	5,66	---	---	---	---
týden po 1. aplikaci	27. 05. 2021	6	59,0	---	---	---	---	---	---
14 dní po 1. aplikaci	03. 06. 2021	13	28,6	---	---	---	---	---	---
3 týdny po 1. aplikaci	10. 06. 2021	20	14,9	---	---	---	---	---	---
před 2. aplikací	23. 06. 2021	33	9,76	3,47	3,92	---	---	4,75	2,40
2. aplikace	24. 06. 2021	0	60,2	14,3	4,70	---	---	---	---
týden po 2. aplikaci	01. 07. 2021	7	22,8	---	---	---	---	---	---
14 dní po 2. aplikaci	08. 07. 2021	14	13,1	---	---	---	---	---	---
3 týdny po 2. aplikaci	15. 07. 2021	21	9,46	---	---	---	---	---	---
před 3. aplikací	28. 07. 2021	34	7,25	4,86	3,92	---	---	---	---
3. aplikace	29. 07. 2021	0	156	21,4	10,5	---	---	---	---
14 dní po 3. aplikaci	12. 08. 2021	14	58,2	10,6	---	---	---	---	---
3 týdny po 3. aplikaci	19. 08. 2021	21	37,2	---	---	---	---	---	---
před 4. aplikací	14. 09. 2021	47	20,0	6,15	5,13	---	---	4,71	3,03
4. aplikace	15. 09. 2021	0	63,4	12,8	5,12	---	---	---	---
týden po 4. aplikaci	23. 09. 2021	8	35,1	---	---	---	---	---	---
14 dní po 4. aplikaci	30. 09. 2021	15	21,8	---	---	---	---	---	---
3 týdny po 3. aplikaci	07. 10. 2021	22	16,0	---	---	---	---	---	---
sklizeň	14. 10. 2021	29	15,7	4,58	5,45	4,41	---	---	---
před opadem listů	09. 11. 2021	55	11,4	5,24	3,82	---	---	1,20	0,59
příprava křížal	27. 10. 2021	42	---	---	---	---	21,1	---	---

\* končí ochranná lhůta přípravku 1 měsíc

## 9. 2. Fotodokumentace







**Obr. 1:** Experimentální výsadba odrůdy 'Idared' s jednotlivými variantami postřikového plánu



**Obr. 2:** Zhomogenizované části rostlinného materiálu (listy, dřevo, zemina, plody)



Ministerstvo zemědělství, odbor rostlinných komodit, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

59698/2022-MZE- 13120

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: Metodika detekce fosfonátů v rostlinných částech jaderovin s ohledem na jejich chování

Autoři: Aneta Bílková a kol.

Název organizací: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., VUOS a.s.

Místo vydání: Holovousy

Rok vydání: 2022

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu č. TJ04000245 „Studium chování fosfonátů s cílem snížení ztrát v rostlinných produktech“

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Zdeněk Trmka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitel odboru rostlinných komodit



V Praze dne: 20.10.2022

.....  
podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZE:

V Praze dne



.....  
Mgr. Jan Radoš  
ředitel odboru precizního  
zemědělství, výzkumu a vzdělávání

## **Metodika detekce fosfonátů v rostlinných částech jádřovin s ohledem na jejich chování**

Autoři: RNDr. Aneta Bílková, Ing. Pavlína Knapová, Ing. Michal Skalský, Ph.D.  
Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING  
Tisk: Reprint s.r.o.

**ISBN 978-80-87030-86-8**



