

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci – EXTEMIT-K



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

Diplomová práce

**Stanovení nestrukturálních sacharidů v lýku akutně
suchem stresovaných smrků ztepilých a vztah jejich
obsahu k obranyschopnosti stromu v kontextu
biotických činitelů**

Autor: Bc. Josef Ludík

Vedoucí práce: Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Josef Ludík

Lesní inženýrství
Lesní inženýrství

Název práce

Stanovení nestrukturálních sacharidů v lýku akutně suchem stresovaných smrků ztepilých a vztah jejich obsahu k obranyschopnosti stromu v kontextu biotických činitelů

Název anglicky

Determination of the content of non-structural carbohydrates in the phloem of the acutely drought-stressed Norway spruces in the context of their vulnerability to biotic attack

Cíle práce

Ve střední Evropě se monokultury smrku ztepilého (*Picea abies* L.) stávají čím dál častěji terčem napadení lýkožroutem smrkovým *Ips typographus*. Důvodem jsou mimo jiné následky klimatických změn, jako je akutní či dlouhodobé sucho, jehož následkem stromy ztrácí obranyschopnost proti kůrovcům. Obrana stromů proti hmyzu zahrnuje síť biochemických mechanismů. Klíčovým je rozdělení nestrukturálních sacharidových substrátů, jako zdrojů uhlíku a energie do primárního metabolismu (růst a rozmnožování), a do sekundárního metabolismu (syntéza obranných látek). Cílem této diplomové práce je v rešeršní části shrnout poznatky o distribuci nestrukturálních sacharidů v suchem stresovaných smrcích a jejich vztah k obranným schopnost stromů. Dále vyvinout metodiku stanovení obsahu vybraných nestrukturálních klíčových krátkých sacharidů v kůře a lýku akutně suchem stresovaných smrků a porovnat ji s obsahem ve smrcích přirozeně zavlažovaných. Na základě výsledků potom diskutovat jejich roli v reakci stromů na akutní stres z hlediska ukládání a distribuce nestrukturálních sacharidů.

Metodika

Experimentální vzorky byly sesbírány na ploše, kde jsou smrky ztepilé vystaveny kontrolovaným podmínkám sucha v okrese Praha-východ v Kostelci nad Černými lesy v lesích Lesů ČZU. Na třech plochách je instalováno zastřešení zamezující přívodu vody k vybraným monitorovaným stromům a stromy kontrolní bez zastřešení. Vzorky pro určení obsahu nestrukturálních sacharidů byly odebrány po 5 a 7 měsících zastřešení, kdy stromy již trpěly akutním stresem suchem. Nestrukturální sacharidy jako glukóza, fruktóza, sacharóza, rafinóza atd. budou stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC/MS). Vzorky floému (N=100) budou po odebrání skladovány při teplotě -80 °C a před analýzou drceny v kapalném dusíku, prášek bude lyofilizován a po extrakci extrahován HPLC qTOF-MS (kvalitativní tandemová kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií). Data budou podrobena statistické analýze. Data byla sesbírána v sezoně 2021, vzorky jsou zpracovány a analyzovány v roce 2023 v srpnu až prosinci, literární rešerše bude napsána do konce roku 2023 a konečné kompilování práce bude probíhat v lednu až dubnu 2024.

Doporučený rozsah práce

40-50 stran

Klíčová slovanestrukturální sacharidy, stress suchem, smrk ztepilý, *Picea abies***Doporučené zdroje informací**

- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H.T., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manage.* 259, 660–684.
- Bansal, S., Germino, M.J., 2009. Temporal variation of nonstructural carbohydrates in montane conifers: similarities and differences among developmental stages, species and environmental conditions. *Tree Physiol.* 29, 559–568.
- Bréda, N., Huc, R., Granier, A., Dreyer, E., 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Ann. For. Sci.* 63, 625–644.
- Ditmarová, L., Kurjak, D., Palmroth, S., Kmeť, J., Střelcová, K., 2010. Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree Physiol.* 30, 205–213.
- Erbilgin, N., Zanganeh, L., Klutsch, J.G., Chen, S., Zhao, S., Ishangulyeva, G., Burr, S.J., Gaylord, M., Hofstetter, R., Keefover-Ring, K., 2021. Combined drought and bark beetle attacks deplete non-structural carbohydrates and promote death of mature pine trees. *Plant. Cell Environ.* 44, 3636–3651.
- Hartmann, H., Moura, C.F., Anderegg, W.R.L., Ruehr, N.K., Salmon, Y., Allen, C.D., Arndt, S.K., Breshears, D.D., Davi, H., Galbraith, D., 2018. Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. *New Phytol.* 218, 15–28.
- Hartmann, H., Ziegler, W., Trumbore, S., 2013. Lethal drought leads to reduction in nonstructural carbohydrates in Norway spruce tree roots but not in the canopy. *Funct. Ecol.* 27, 413–427.
- Hermes, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67, 283–335
- Huang, J., Kautz, M., Trowbridge, A.M., Hammerbacher, A., Raffa, K.F., Adams, H.D., Goodsman, D.W., Xu, C., Meddens, A.J.H., Kandasamy, D., 2020a. Tree defence and bark beetles in a drying world: carbon partitioning, functioning and modelling. *New Phytol.* 225, 26–36.
- Netherer, S., Kandasamy, D., Jirosová, A., Kalinová, B., Schebeck, M., Schlyter, F., 2021. Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. *J. Pest Sci.* (2004). 1–24

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ochrany lesa a entomologie

Konzultant

Sara Basile

Elektronicky schváleno dne 26. 2. 2024

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 27. 2. 2024

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 03. 04. 2024

1906

Prohlášení autora závěrečné práce

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „**Stanovení nestrukturálních sacharidů v lýku akutně suchem stresovaných smrků zteplých a vztah jejich obsahu k obranyschopnosti stromu v kontextu biotických činitelů**“ a citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil, a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů. Jsem si vědom, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědom, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne datum odevzdání _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval lidem, bez nichž by se tato práce nenapsala. To především pro jejich trpělivost, ochotu, vstřícnost a také čas, který mi tímto věnovali. Jako první bych chtěl poděkovat paní Ing. Anně Jirošové, Ph.D. jenž vůbec souhlasila s tím, že povede tuto práci, také mě vedla při psaní a vždy mi poradila. Velké díky také patří mé konzultantce MSc. Sáře Basile, která mě vedla při realizaci praktické části v analytické laboratoři. Dále také musím poděkovat Ing. Barboře Stříbrské Ph.D. za ochotu a pomoc v průběhu realizace. V neposlední řadě můj velký dík patří také mému bratru Janu Ludíkovi za podporu.

Abstrakt

Předkládaná práce shrnuje v rešeršní části současné znalosti o vlivu stresu suchem na fyziologii, metabolismus a obranu na stromy a rostliny. Následně v praktické části se pak zabývá měřením přírůstu kmene, a obsahu klíčových nutričních nestrukturálních sacharidů a tím, jak brouci akceptovali akutně suchem stresované smrky ztepilé o pěti až sedmi měsících bez přísunu srážkové vody. Přísunu srážkové vody se zamezilo zastřešením skupiny stromů ve výši 1 až 2 metrů kmene. Jednotlivé cíle pak byly: vyhodnocení vlivu akutního stresu suchem na obsah nestrukturálních sacharidů v lýku, vyhodnocení vlivu změn v radiálním přírůstu kmene (zpomalení) na obsah nestrukturálních sacharidů a akceptováním samců lýkožrouta smrkového *Ips typographus*, těchto akutně suchem stresovaných stromů, v souvislosti s obsahem nestrukturálních sacharidů. V první části rešerše je věnována pozornost vodnímu potenciálu v souvislosti s rostlinami a dopadu na transport látek, dále pak mechanismům, jakým rostliny na stres způsobený suchem reagují, a následně syntéze a distribuci nestrukturálních sacharidů v rostlinách a stromech. V praktické části je stanovených cílů pak dosaženo měřením obsahu nestrukturálních sacharidů v lýku pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, měřením radiálního přírůstu kmene dendrometry a nevýběrovými testy akceptování stromů s lýkožroutem smrkovým. Byly porovnány stromy zastřešené a kontrolní, které měly přirozený přísun srážkové vody. Vzorky na analýzu obsahu nestrukturálních sacharidů byly odebírány z lýka. Samotná kvalitativní a kvantitativní analýza probíhala spřaženou metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie s vysokým rozlišením (HPLC) společně s hmotnostní spektrometrií s kvadrupólovým analyzátozem doby průletu (qTOF-MS). Ke kalibraci byly použity čisté standardy sledovaných látek společně s trehalózou. Na základě výsledků bylo zjištěno, že akutní stres suchem zvyšuje koncentraci glukózy a fruktózy v lýku. Dále, že koncentrace těchto dvou sacharidů negativně koreluje s radiálním přírůstem kmene a nakonec, že akutním suchem stresované stromy byly více akceptovány *Ips typographus* po 6ti měsících zastřešení než stromy přirozeně zavlažované. Akceptování stromů brouky, pozitivně korelovalo s obsahem glukózy a fruktózy.

Klíčová slova: Nestrukturální sacharidy, Stres suchem, Smrk ztepilý, *Picea abies*

Abstract

The present work summarizes in a research section the current knowledge on the effects of drought stress on physiology, metabolism and defense on trees and plants. Then, in the practical part, it discusses the measurement of stem growth, and the content of key nutritional non-structural carbohydrates, and how beetles accepted acutely drought-stressed the Norway spruce trees after five to seven months without rainwater supply. Rainwater inflow was prevented by shading a group of trees at 1 to 2 m of trunk height. The individual objectives were then: to evaluate the effect of acute drought stress on the content of non-structural carbohydrates in the litter, to evaluate the effect of changes in radial stem growth (slowing) on the content of non-structural carbohydrates and the acceptance of male spruce bark beetle *Ips typographus*, these acutely drought-stressed trees. in relation to non-structural carbohydrate content. The first part of the review focuses on water potential in relation to plants and its impact on substance transport, followed by the mechanisms by which plants respond to drought stress, and then the synthesis and distribution of non-structural carbohydrates in plants and trees. In the practical part, the objectives are then achieved by measuring the content of non-structural carbohydrates in phloem using high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometer, measuring radial trunk growth with dendrometers and by non-choice bioassay tests of the Norway spruce trees with bark beetle. Comparisons were made between roofed area and control trees that had natural rainfall water supply. Samples for analysis of non-structural carbohydrate content were taken from the phloem. The qualitative and quantitative analysis itself was carried out by a coupled high-performance liquid chromatography (HPLC) with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (qTOF-MS). Pure standards of the analytes of interest were used for calibration together with trehalose. Based on the results, it was found that acute drought stress increased the concentration of glucose and fructose in phloem. Further, that the concentration of these two carbohydrates negatively correlated with radial stem growth and finally that acute drought stressed trees were more accepted by *Ips typographus* after 6 months of roof cover than naturally irrigated trees. Tree acceptance by beetles, was positively correlated with glucose and fructose content.

Keywords: Non-structural carbohydrates, Drought stress, Norway spruce, *Picea abies*

Obsah

1 Úvod	11
2 Cíle	13
3 Literární přehled	14
3.1 Reakce rostlin na stres.....	14
3.1.1 Vodní deficit a stres.....	16
3.2 Tvorba cukrů.....	24
3.2.1 Glukoneogeneze u rostlin, fotosyntéza.....	25
3.3 Chřadnutí smrku ztepilého (<i>Picea abies</i> (L.) karst.).....	28
3.3.1 Ekologie smrku.....	30
3.3.2 Chřadnutí smrkových porostů.....	30
3.3.3 Hospodaření stromů s NSC.....	32
3.3.4 Lýkožrout smrkový <i>Ips typographus</i>	35
3.4 Chemická analýza.....	37
3.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	37
3.4.2 Chromatografický proces.....	38
3.4.3 Hmotnostní spektrometrie.....	39
3.4.4 Time-of-Flight.....	41
4 Metodika	42
4.1 Charakteristika porostu.....	42
4.2 Měření vodního potenciálu a přírůstu kmene stromu.....	43
4.3 Odběr, zpracování a chemická analýza vzorků.....	43
4.3.1 Chemická analýza vzorků.....	45
4.4 Nevýběrový biotest pro zjištění akceptování smrků lýkožroutem smrkovým, <i>Ips typographus</i>	47
4.5 Statistická analýza.....	47
5 Výsledky	49
5.1 Porovnání vodního potenciálu.....	49
5.2 Porovnání množství cukrů zastřešených a kontrolních ploch.....	50
5.3 Porovnání přírůstu kmene u stromů vystavených akutnímu suchu a přirozeně zavlažovaných.....	53
5.3.1 Korelace přírůstu a cukrů.....	54
5.4 Nevýběrové biologické testy, akceptování akutně suchem stresovaných stromů kůrovci.....	55
6 Diskuze	57
6.1 Půdní vodní potenciál jednotlivých ploch.....	57
6.2 Nestrukturální sacharidy.....	57
6.3 Radiální přírůst kmene.....	58

6.4	Vliv akutního vodního stresu na akceptování smrku <i>Ips typographus</i>	59
7	Závěr	60
8	Seznam použitých zdrojů	61

1 Úvod

Klimatické změny, v současnosti hlavně ty spojené s globálním oteplováním, patří k událostem, kterým se věnuje velké množství výzkumů. Děje se tak především proto, že jejich důsledky pocítují mnohá odvětví, lesnictví nevyjímaje (Lac, McHenry, 2014). K tomuto jevu dochází nejspíše z důvodu zvyšující se koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, což souvisí s industrializací probíhající rozsáhleji od první poloviny 19. století, kdy se výrazně proměnil způsob průmyslové výroby v důsledku průmyslové revoluce, radikálně se zintenzivnila zemědělská výroba a způsoby dopravy (IPCC, 2014). Se související změnou se předpokládá nárůst globální teploty o 2-4 °C vedoucí k častějším a silnějším suchům. Tyto trendy představují výzvy pro udržitelné poskytování ekosystémových služeb a zachování biodiverzity v lesích (Allen et al., 2010). Růst teploty, popřípadě změna distribuce srážek také může ovlivňovat populační dynamiku hmyzu a nepřímo ovlivnit růst stromů včetně jejich obraných mechanismů vůči různým patogenům (Hart et al., 2014). Reakce jehličnanů na tyto změny jsou různé, což je dáno rozdíly v jejich schopnosti odolávat stresu ze sucha. Rovněž postrádají účinné mechanismy, které by se vyrovnávaly s proměnlivým vodním režimem, a tudíž je to činí náchylnějšími k napadení kůrovci (Peet a Christensen, 1987) Smrk ztepilý (*Picea abies* L.), hospodářsky nejvýznamnější jehličnan v Evropě, který je často vysazován jako monokultura, se v posledním desetiletí potýká s rozsáhlým napadením kůrovcem spolu se saprofytickými houbami. V Česku nahodilá těžba kůrovcového dříví dosáhla vrcholu v letech 2019 a 2020, kdy objem dříví byl cca. 20 milionů m³ za dva roky.

Obranyschopnost jehličnanů proti atakům kůrovců je tvořena složitým komplexním systémem biochemických procesů produkující sekundární obranné metabolity, mezi které se řadí terpeny tvořící podstatnou část pryskyřice a rozpustné fenolické látky. Tyto metabolity mají v jehličnanech konstitutivní charakter, popřípadě po napadení patogenem je jejich biosyntéza indukovaná na genové úrovni (Franceschi et al., 2005). Produkce těchto metabolitů je do značné míry závislá na vyvážené distribuci zdrojů uhlíku, jenž je biosyntézou přeměňován na nestrukturální sacharidy (NSC, z anglického *non-structural carbohydrates*). Ty jsou ale důležité v procesech růstu, respirace, skladování a odbourávání reaktivních forem kyslíku (ROS, z anglického *reactive oxygen species*) způsobených stresem (Huang et al., 2020).

V momentě, kdy jsou stromy vyčerpané stresem ze sucha s následnou odpovídající odezvou takto čelí biotickým atakům, dostupnost a alokace NSC se střídají a obranyschopnost stromů je narušena (Netherer et al., 2021).

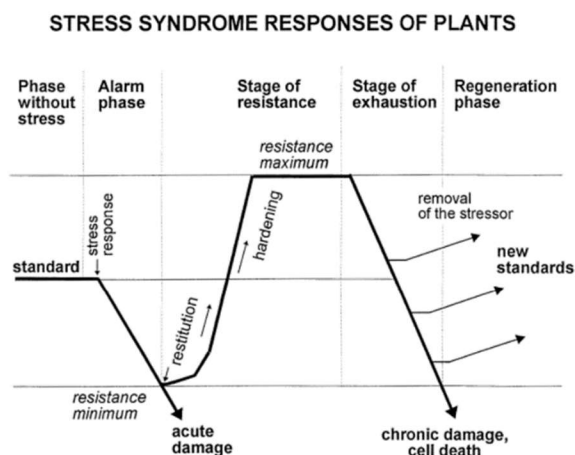
2 Cíle

Cílem této diplomové práce je v rešeršní části shrnout poznatky o tvorbě, distribuci a alokování mezi růst, rozmnožování a obranu nestrukturálních sacharidů v suchem stresovaných smrcích a jejich vztah k obranným schopnostem stromů proti herbivorům. V praktické části pak vyvinout metodiku stanovení obsahu vybraných nestrukturálních klíčových, krátkých sacharidů v lýku akutně suchem stresovaných smrků a porovnat ji s obsahem ve smrcích přirozeně zavlažovaných. Dále porovnat obsah těchto nestrukturálních sacharidů se změnami v přírůstu akutně stresovaných smrků, a potvrdit tak teorie distribuce sacharidů v podmínkách stresu u stromů. V nevyběrových biotestech pak porovnat akceptování suchem stresovaných stromů s obsahem sacharidů.

3 Literární přehled

3.1 Reakce rostlin na stres

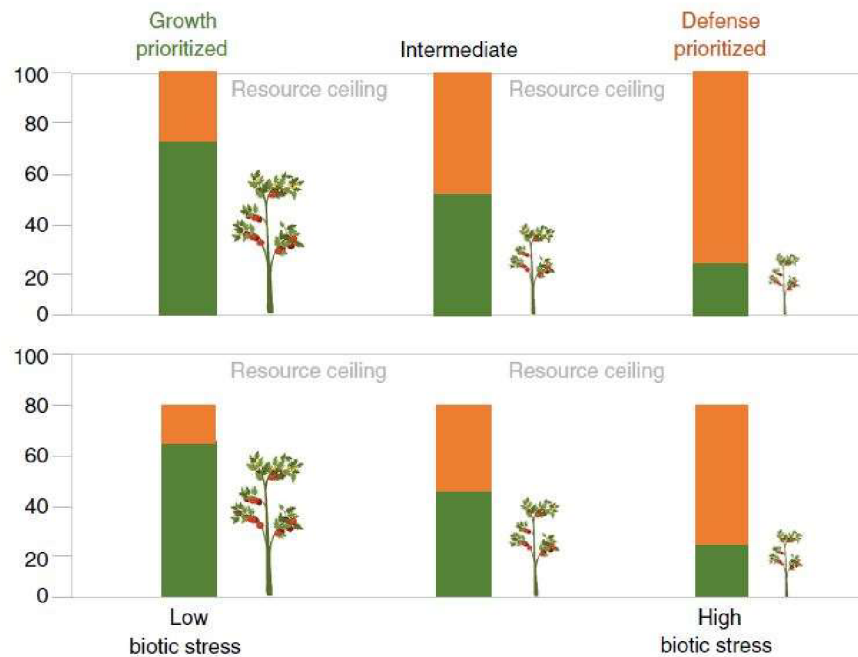
Rostliny v průběhu svého života bývají vystaveny řadě nepříznivých faktorů vnějšího prostředí, které mohou zpomalovat jejich životní funkce a v řadě případů vést také k jejich úhynu. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí označujeme jako stresory. Pojem stres rostlin používáme pro souhrnné označení stavu, v němž se rostlina nachází, přitom se nejedná o ustálený stav, ale o dynamický soubor mnoha reakcí. Stresové faktory se zpravidla rozdělují na abiotické (fyzikálně-chemické) a biotické (herbivorní živočichové, patogenní mikroorganismy nebo vzájemné ovlivňování). Odezva rostlin na stres se označuje jako stresová reakce. V jejím průběhu rozlišujeme pět fází (**Obr. 1**). První takzvaná poplachová fáze začíná probíhat ihned po narušení buněčných struktur a funkcí. K druhé fázi dojde v případě, že síla nepříznivého vlivu nepřekročí smrtící úroveň a dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů. Fáze třetí rezistentní vede ke zvýšení odolnosti rostliny vzhledem k působení stresového činitele. Toto zvýšení ovšem nemusí mít trvalý charakter. Při přetrvávajícím a intenzivním působením stresového činitele může dojít na fázi vyčerpání. Pokud nedojde k zastavení stresového činitele, může dojít k úhynu rostliny (Procházka, 1998).



Obrázek 1: Obecný koncept fázových sekvencí a reakcí vyvolaných u rostlin vystavených stresu. Rostliny pod vlivem stresu začínají ve standardních fyziologických podmínkách reagovat a přizpůsobovat se. Jsou aktivovány odlišné reakce a obranné mechanismy. Po odeznění stresorů mohou být dosaženy nové standardy fyziologie rostliny v závislosti na době odstranění a také na délce a intenzitě stresu.

(Lichtenthaler, 1998).

Samotný stres u rostlin je komplikovaný z důvodů přisedlého způsobu života, velkou mezidruhovou variabilitou a heterogenitou vnitřního prostředí (buněk, pletiv). V přírodě rostliny rostou za podmínek ne vždy příznivých a faktory prostředí obklopující tyto rostliny mohou kolísat v rozsáhlých mezích, mnohdy až na hranici existenčního minima. Navíc kterýkoliv rostlinný druh od svého vzniku prochází spletitým selekčním sítím rozmanitých kombinací vnějších podmínek. Tato selekce probíhala na úrovni fenotypových projevů celého organismu. Prosperující druhy proto nemusejí mít nejlepší parametry v určitém znaku považovaném za nejdůležitější, rozhodujícím kritériem bývá často vyrovnanost ve vícero znacích. Limitujících vlivů působících na rostlinu během krátké doby je obvykle více a přizpůsobení se k nim může klást protikladné požadavky na funkční i strukturní změny. Oscilace vlivů prostředí (vody, teploty nebo záření) je rozmanitá a nepravidelná, tudíž jednoznačné ideální přizpůsobení není možné. Přizpůsobením chápeme veškeré modifikace funkcí a struktury rostliny pod působením určitého typu prostředí zvyšující jejich zdatnost. Přizpůsobení může mít povahu kvalitativní například syntéza látek nové struktury nebo kvantitativní syntézou většího množství již dříve přítomných sloučenin. (Gloser, 1998). V ekologické fyziologii kompromisy, například mezi růstem a obranou, označujeme pojmem *Growth-defense trade-offs* popř. *cost-benefit analysis* (**Obr. 2**). Důsledkem je rozhodnutí o alokaci zdrojů rostlin, což má za následek udržet optimální kondici a zároveň reagovat na proměnlivé prostředí (Züst a Agrawal, 2017).



Obrázek 2: Hypotézy interpretující kompromis mezi růstem a obranou. Vrchní část určuje kompromis mezi růstem (zelená) a obranou (oranžová) při omezených zdrojích. Spodní část je kompromis nezávisle na zdrojích. Hypotézy se vzájemně nevylučují a mohou působit v různých vnějších prostředích. Levá osa označuje celková procenta dostupných rostlinných zdrojů použité k růstu nebo obraně (He et al., 2022).

3.1.1 Vodní deficit a stres

Voda je nezbytnou součástí rostlinných buněk sloužící jako transportní médium, při výměně elektronů a jako rozpouštědlo. Vodní deficit můžeme označit mírnější formu vodního stresu, kdy v rostlinách dochází jenom k malým změnám obsahu vody. Vodní stres může být způsoben okolnostmi, mezi které patří samo o sobě sucho, vysoké koncentrace solí v půdě a také chlad, kdy je možný nedostatek disponibilní vody a hrozí vyčerpání transpirací. Tento nedostatek se projevuje v rostlině řadou fyziologických změn: koncentrováním rozpustných látek v cytoplazmě, snížením turgoru buněk projevujícím se vadnutím, destabilizací a změnou propustnosti membrán. Nedostatek vody má také vliv na biochemické reakce (Bray, 1997). Pro posouzení toho, jak velkému vodnímu stresu je rostlina vystavena, se využívá charakteristik vycházejících ze stavu vody v rostlině (vodní potenciál buněk). To poskytuje spolehlivější data, než

která lze získat z údajů o vodě v prostředí např. vlhkost půdy a vzduchu (Procházka, 1998).

3.1.1.1 Vodní potenciál rostlin

Suchozemské rostliny jsou obvykle vystaveny výparným podmínkám, protože vodní potenciál vody ve vzduchu v blízkosti listů je zpravidla velmi nízký. Vodu si rostliny dlouhodobě nezadržují, neboť nemohou mít povrch listů neprodyšně uzavřený. Rostliny musí ze vzduchu přijímat oxid uhličitý a také výparem vody vyrovnávat teplotní rozdíly, čímž se ochlazují. Hlavními faktory působícími na vodní potenciál u rostlin je koncentrace osmoticky aktivních látek, tlak a gravitace. Vodní potenciál (Ψ_w) se udává v jednotkách tlaku, obvykle v MPa. Počítá se jako suma dílčích potenciálů: *osmotického* neboli koncentračního (Ψ_s), *tlakového* (Ψ_p), *gravitačního* (Ψ_g) a *matričního* (Ψ_m). Obvykle se vychází z matematického vztahu

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m \text{ [Pa]} \quad (1)$$

Ψ_s *osmotický* nebo také *solutový potenciál* závisí na koncentraci, přesněji na aktivitě osmoticky aktivních látek v buněčném roztoku a na teplotě. Rozpuštěné látky snižují volnou energii vody. V případě nízkého osmotického tlaku kapacita protoplastu klesá až přestane vyplňovat prostor ohraničený buněčnou stěnou a dochází tzv. plazmolýze (Pavlová, 2005).

Tlakový (turgorový) potenciál Ψ_p představuje tlak buněčné stěny z vnějšku na protoplast. Udává rozdíl mezi tlakem v buňce a atmosférickým tlakem.

Ψ_g *gravitační potenciál* souvisí s působením gravitace a pozicí vody v gravitačním poli vzhledem k poloze, jenž je považována za referenční

Matriční potenciál Ψ_m je kapacita vrstvy vody o tloušťce 1–2 molekuly, která se uchovává v kapilárních prostorech buněčných stěn, suché půdy, suchých semen nebo silně lne k povrchům bobtnajících koloidů (Špinlerová, 2014).

U častých mezofytních druhů rostlin hodnoty mírného vodního stresu. Prahová hodnota pro růst nastává při poklesu turgoru obvykle od $-0,3$ až $-0,4$ MPa. Středně velký stres nastává, když hodnoty dosahují $-0,5$ až $-1,5$ MPa. V buňkách listu se zvyšuje koncentrace kyseliny abscisové, která má za následek uzavírání průduchů, a

tím ovlivňuje výměnu plynů. Okolo hodnoty $-1,0$ MPa dochází k osmotickému přizpůsobení tvorbou aminokyseliny prolinu, betainu a některých cukrů. Při dalším snížení vodního potenciálu do $-2,0$ MPa dochází k závažným metabolickým změnám a jedná se o stres velmi silný (Procházka, 1998).

Tabulka 1: Minimální hodnoty vodního potenciálu asimilačních orgánů různých ekologicky odlišných skupin rostlin. Převzato z odborné literatury (Scholander et al., 1965; Merin et al., 1976; Berger et al., 1978; Richter, 1976).

Skupina rostlin	Ψ_{\min} [MPa]
Vodní rostliny	$-1,2$
Bažinné rostliny	$-1,5$
Polní plodiny	$-1,5$ až $-2,5$
Trávy	$-2,0$ až $-2,2$ ($-4,5$)
Dřeviny mírného pásma	
Opadavé stromy a keře	$-1,5$ až $-2,5$
Jehličnany	$-1,8$ až $-2,5$ ($-6,0$)
Rostliny oblastí s periodickým suchem	
Tvrdoolisté druhy	$-3,5$ až $-7,0$
Druhy buše	$3,5$ až $-8,0$
Rostliny "garrigue"	$-4,0$ až $-8,0$
Pouštní rostliny	
Keře	$-5,5$ až $-9,0$ ($-16,0$)
Sukulenty	$-1,8$ až $-2,0$
Rostliny mangrovů	$-5,0$ až $-6,0$
Halofyty	$-3,0$ až $-5,5$ ($-9,0$)

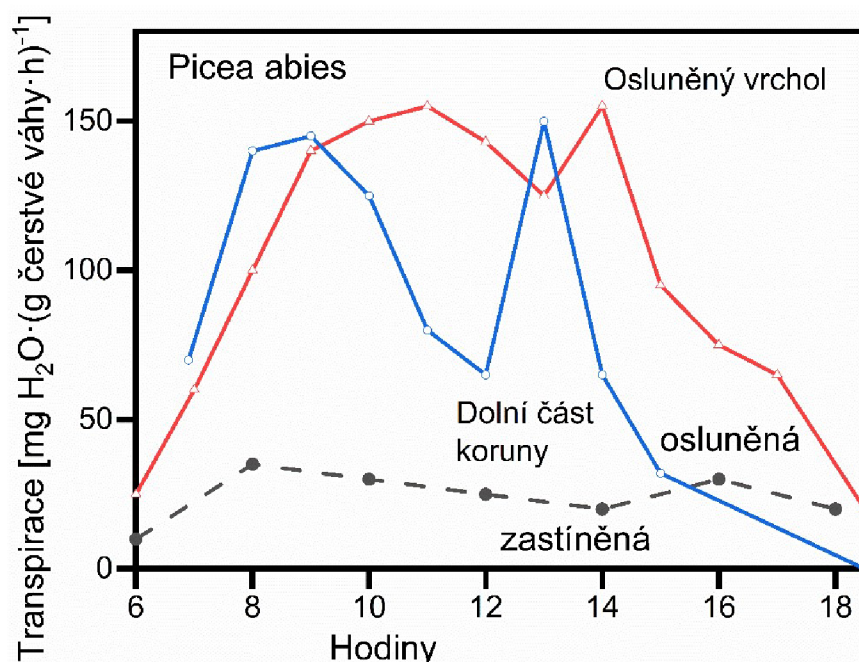
*V závorkách jsou uvedeny extrémní hodnoty.

Pro posouzení vody v rostlinách se vychází z vodní bilance rostlin (2), která je dána rozdílem mezi rychlostí příjmu vody a rychlostí její ztráty:

$$\text{Vodní bilance} = \text{absorpce} - \text{transpirace.} \quad (2)$$

Předpokladem je, že transpirace slouží jako měřítko výdeje vody. Její rychlost se obvykle vyjadřuje v jednotkách množství vody na jednotku čerstvé hmotnosti fytohmoty. Alternativně se může vztahovat absorpce a transpirace k obsahu vody v rostlině a vyjadřovat obrát vody při transpiraci v mg vypařené vody na g obsahu vody. Rychlost vody udává procentuální podíl obsahu v rostlině, jenž rostlina ztrácí za určitý časový interval a který je potřeba znovu přijmout z půdy, jestliže si má zachovat rovnovážnou vodní bilanci. Tu může rostlina udržet jen tehdy pokud se rychlost příjmu, vedení a výdeje vody vzájemně vyrovnávají. Záporná bilance nastává, jakmile přestane příjem vody vyrovnávat potřebu transpirace. Rostlina z důsledku nedostatku vody zúží štěrbinu stomat, poklesne rychlost transpirace a ustaví se nová rovnováha. Vodní bilance tedy osciluje mezi zápornými a kladnými odchylkami v závislosti na množství vody a oslunění. U oscilací se musí však rozlišovat mezi krátkodobými a dlouhodobými porušeními této pohyblivé rovnováhy. Krátkodobé kolísání je spjato s běžným režimem rostliny, významnější odchylky od rovnováhy nastávají v průběhu dne, kdy mají rostliny na přirozených stanovištích většinou zápornou vodní bilanci, která se obnovuje až v noci. Také během období sucha, kdy se obsah vody v rostlině nestihne obnovit ani za celou noc a tím vodní deficit vzrůstá až do období, kdy přijdou srážky, což se může označit za sezonní kolísání vodní bilance (Larcher, 1988).

Z pohledu vodní bilance podle odlišného vodního režimu se rozdělují rostliny do dvou základních skupin na hydrostabilní (izohydrické) a rostliny hydrolabilní (anizohydrické). Izohydrické druhy jsou schopny udržovat optimální obsah vody ve svých pletivech po většinu dne, což vede k udržení vodní bilance těchto rostlin téměř na nule. Tyto rostliny projevují vysokou citlivost průduchů na nedostatek vody a jejich kořenové systémy jsou obvykle velmi rozsáhlé. Dalším činitelem stabilizující obsah vody v protoplazmě jsou rezervy vody uložené v zásobních orgánech kořenů, dřeva a listech. K izohydrickým druhům náleží stromy (příklad transpirace pro smrkové výhony zobrazen na **(Obr. 3)**), některé trávy, stínomilné rostliny a sukulenty. Anizohydrické druhy naopak tolerují velké ztráty vody a zvýšení koncentrace buněčné šťávy. Protoplazma snáší rychlé a rozsáhlé výkyvy vodního potenciálu bez poškození. K anizohydrickým druhům patří hlavně cévnaté rostliny eurohydrického charakteru (Larcher, 1988).



Obrázek 3: Průběh transpirace smrkových výhonů za jasného srpnového dne, kterému předcházelo období sucha přibližující (dva transpirační vrcholy) se schématickému diagramu izohydrických druhů rostlin (Berger-Landefeldt, 1936). Popisuje snižování transpirace při deficitu vody. Nejdříve snižují transpiraci stinné větve na bázi koruny, poté osluněné větve na okrajích spodní části koruny a nakonec větve na slunném vrcholu koruny (Tranquillini, 1979).

3.1.1.2 Reakce rostlin na stres ze sucha

Primární stresy způsobené abiotickými činiteli přispívají ke vzniku sekundárních stresů, např. expozice ozonu vede k produkci ROS a reaktivních forem dusíku (RNS, z anglického *reactive nitrogen species*). Sucho nebo mráz u rostlin zase vedou k osmotickému stresu z vnějšího prostředí, který poté způsobuje osmotický stres i ve vnitřním prostředí rostliny. Z tohoto důvodu nelze zcela správně posoudit intenzitu primárního stresu s ohledem na celou rostlinu, protože spousta stresorů způsobuje podobnou fyziologickou odezvu a rozdílné stresory mohou mít společné signální dráhy. Vrozená nebo získaná snášenlivost k jednomu stresoru může znamenat i zvýšenou odolnost vůči stresoru jinému, např. suchovzdornost a mrazuvzdornost (Tomášková, 2016). Sekundární stres způsobuje narušení nebo změnu mnoha fyziologických procesů v rostlině ovlivňujících stabilitu bílkovin nebo RNA, iontový transport, spojení reakcí, nebo jiné buněčné funkce. Jakékoliv primární narušení může signalizovat rostlině, že

došlo ke změně podmínek v prostředí a že je čas reagovat změnou existujících cest nebo aktivací cesty reakce na stres. V dostupných zdrojích je rozlišováno alespoň pět různých mechanismů na vnímání stresu. *Fyzické vnímání* se vztahuje na mechanické účinky stresu na strukturu rostliny nebo buňky. Například na smršťování plazmatické membrány od buněčné stěny během sucha. *Biofyzikální vnímání* může zahrnovat změny v proteinové struktuře nebo enzymatické aktivitě. Při suchu inhibicí různých enzymů. *Metabolické vnímání* vychází obvykle z detekce vedlejších produktů hromadících se v buňkách v důsledku rozpojení enzymatických nebo elektronových přenosových reakcí, hlavně ROS. *Biochemické vnímání* zahrnuje přítomnost specializovaných proteinů, které se vyvinuli k vnímání určitého stresu. Například otevření vápníkových kanálů, jenž mohou být v endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně, tonoplastu a transportují Ca^{2+} ionty do cytosolu, kde se na lokalizovaných místech vyskytuje daný enzym, který má být aktivován. *Epigenetické vnímání* se vztahuje na modifikace struktury DNA nebo RNA neměnicí genetické sekvence jako jsou změny v chromatinu, které se vyskytují během teplotního stresu. Každý z těchto mechanismů vnímání stresu může působit samostatně nebo v kombinaci k aktivaci signálních transdukčních drah. K nejčastějším společným změnám vedoucím ke zvýšení odolnosti vůči stresovým faktorům, respektive odpovědi na vjemy rostlin způsobenými stresem, se může zařadit tvorba stresových proteinů, zhášení ROS, tvorba stresových fytohormonů a tvorba osmoregulačních sloučenin (Taiz et al., 2015).

Stresové proteiny jsou konstitutivní proteiny patřící k pravidelné výbavě všech genotypů. Za stresu se jejich četnost mnohonásobně zvyšuje z důvodu vzrůstu počtů defektních proteinů. Většina těchto proteinů je indukována nespecificky, tedy různými typy stresorů. Podle funkce se můžou zařadit do tří skupin:

- 1) *Molekulární chaperony* sloužící k řízení změn konformace proteinů při transporthách přes membrány a při mírném poškození jsou schopny opravy.
- 2) *Ubiviktin* označující defektní proteiny většího rozsahu.
- 3) *Proteázy* rozkládající vadný protein na aminokyseliny. Syntéza jiných stresových proteinů může být indukována některými dalšími specifickými stresovými faktory (Procházka, 1998).

ROS mají v rostlinných systémech dvojí roli. Slouží jako signální molekuly pro expresi genu, anebo to jsou toxické meziprodukty aerobního metabolismu způsobující poškození či zánik buňky. ROS mohou paralyzovat enzymy, oxidovat proteiny a poškozovat DNA a RNA. Toho rostlina může využít při takzvané hypersensitivní reakci, kdy je buňka napadena nějakým patogenem (např. houbovým) a rostlina cíleně eliminuje buňky po kontaktu houbové hyfy, čímž se vytvoří ochranná nekróza a patogen dále nemá kam pokračovat. V rostlině jsou ROS tvořeny cestou enzymových a neenzymových reakcí (Piterková, 2005).

Zhášení ROS probíhá za pomoci neenzymatických antioxidantů jejichž výsledkem jsou nereaktivní molekuly se sdruženými valenčními elektrony a antioxidační enzymy. Významnými antioxidanty jsou karotenoidy, které mají zásadní vliv ve fotosyntéze, tokoferol (vitamín E) rozpustný v lipidech membrán, askorbát (vitamín C), polyaminy a flavonoidy. K antioxidačním enzymům patří především superoxid dismutáza (SOD), jež se vyskytuje v různých podobách (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) a ve většině buněčných organel. Superoxid katalyzuje na peroxid vodíku, který je dále přeměňován katalázou především v peroxizomech a glyoxyzomech nebo askorbátperoxidázou v chloroplastech, popřípadě v cytozolu (Procházka, 1998).

Fytohormony jsou přirozeně vznikající metabolity rostlin regulující růst, vývoj, metabolismus rostlin a podílí se na odolnosti vůči stresu. Hlavní funkce fytohormonů jsou buď stimulační nebo tlumící, což v řadě případů závisí na koncentraci hormonu (Tomášková, 2016). Účinek fytohormonu je vázán na receptor v podobě bílkoviny, který je umístěn na membráně buňky a poté je přenášen systémem druhých posílů nebo proniká přímo do buňky a váže se na rozpustný receptor v cytoplazmě, kde poté vzniklý komplex proniká do jádra. Zde se následně vyvolá exprese některých genů (Procházka, 1998). Rozlišujeme pět hlavních „klasických“ skupin fytohormonů podle chemické povahy molekuly, úlohy, popř. účinku a to *auxiny*, *cytokininy*, *gibereliny*, *kyselina abscisová* a *etylén*. Vedle těchto hormonů existují látky s růstově regulační aktivitou. Mezi ně patří zejména *brassinosteroidy*, *polyaminy*, *kyselina jasmonová*, *oligosacharidy* a skupina *fenolických látek*. Kromě těchto látek může ovlivňovat

rostliny často s interakcí s hormony izoprenoidy, sloučeninami obsahujícími dusík a alifatickými sloučeninami (Kozłowski et al., 1997).

Tvorbou osmoregulačních sloučenin se rostlina osmoticky přizpůsobuje vysychající půdě hromaděním rozpustných látek tak, aby se voda mohla pohybovat půda-rostlina-atmosféra. Při snížení vodního potenciálu rhizosféry týkající se mikroprostředí obklopující kořen sníženého v důsledku vodního deficitu, rostliny mohou pokračovat v příjmu vody jen tak dlouho, dokud je Ψ_w menší než v půdní vodě. Osmotická adaptace je schopnost rostlinných buněk akumulovat rozpuštěné látky a využívat je ke snížení vodního potenciálu (Ψ_w) během osmotického stresu. Přizpůsobení zahrnuje pouze zvýšení obsahu rozpuštěných látek v buňce, které je nezávislé na objemových změnách, jenž je důsledkem ztráty vody. Rostlina může přijímat ionty z půdy nebo může transportovat ionty z jiných rostlinných orgánů do kořene, a tím se zvyšuje koncentrace rozpuštěných látek v kořenových buňkách. Při transportaci iontů například ze zasolených půd, kde jsou ionty K^+ , Ca^+ , Na^+ dobře dostupné musí být příjem těchto kationtů elektricky vyvážen příjmem anorganických aniontů Cl^- nebo produkcí a vakuolární akumulací organických kyselin jako je malát nebo citrát. Některé ionty jako je sodík nebo chlorid jsou v nízkých koncentracích nezbytné pro růst rostlin, ale ve vyšších koncentracích mohou mít škodlivý vliv na buněčný metabolismus. Ionty draslíku jsou potřebné ve větším množství ale ve vysokých koncentracích mohou mít na rostlinu neblahý vliv narušením plazmatických membrán nebo proteinů.

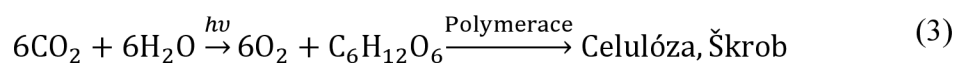
Hromadění iontů během osmotické úpravy je převážně omezeno na vakuoly, kde jsou ionty udržovány mimo kontakt s cytosolickými enzymy nebo organelami. Po zvýšení koncentrace iontů ve vakuole se začne zvyšovat koncentrace také v cytosolu, aby se zachovala jejich koncentrace vodního potenciálu mezi oběma částmi. Koncentraci v cytosolu zvyšují látky nazývané se kompatibilní osmolity. Jsou to organické sloučeniny, které jsou v buňce osmoticky aktivní a ve vysokých koncentracích nedeaktivizují membránu a nenarušují funkci enzymů. Rostlinné buňky tolerují vysoké koncentrace těchto sloučenin bez škodlivých účinků na metabolismus. Mezi běžné kompatibilní osmolity patří aminokyseliny (prolin, betain, glycin) a cukerné alkoholy (sorbitol, mannitol) (Taiz et al., 2015).

3.2 Tvorba cukrů

Mezi výše popsané změny metabolismů u rostlin zapříčiněné suchem na úrovni buněk, biosyntézu polyamidů a antioxidantů, změny typu a obsahu osmotik, syntézu fytohormonů, změny vlastností membrán nastává změna vztahu mezi buněčným dýcháním a fotosyntézou myšleno zvýšení podílu ADP/ATP (snížení produkce ATP oproti ADP) čímž dochází k vyčerpání organismu a nedostatek okamžité dostupné energie (Špinlerová, 2014).

Cukry, též sacharidy nebo uhlohydráty (Otto, 1907) se vyskytují ve všech živých organismech. Různě modifikované je pak lze najít jako ochranné povlaky okolo buněk nebo živočichů (např. chitin), jiné modifikace pak lze též nalézt v nukleové kyselině nebo v léčivech (např. remdesivir). Pojem karbohydráty (carbohydrates) nebo též uhlovodany (dnes již zastaralé (Kodíček et al., 2018)) vzešel ze skutečnosti, že glukóza jakožto první sacharid, který byl získán v čisté formě a jehož sumární vzorec je $C_6H_{12}O_6$, byl původně mylně považován za hydratovaný uhlík, tedy $C_6(H_2O)_6$. Od tohoto pohledu bylo brzy opuštěno, nicméně název přetrval do dnes. V současnosti se pod pojmem karbohydráty označuje široké spektrum polyhydroxylovaných aldehydů a ketonů běžně označovaných jako cukry (McMurry, 2000).

Cukry jsou syntetizovány v zelených rostlinách během fotosyntézy, což je složitý fotochemický proces, při kterém jsou voda a oxid uhličitý pomocí světla redukovány na glukózu. Velmi zjednodušeně lze reakci zapsat následovně (McMurry, 2000).



Cukry se obecně dělí do dvou skupin, a to na jednoduché a komplexní. Jednoduché cukry nebo také monosacharidy jsou uhlovodíky jako glukóza nebo fruktóza, které již není možné hydrolýzou rozdělit na menší cukry. Komplexní cukry jsou pak tvořeny dvěma a více jednotkami cukru spojenými glykosidickou vazbou jako například celulóza (McMurry, 2000). Alternativně lze cukry rozdělit do tří jen nepatrně odlišných skupin na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Monosacharidy představují jednoduché, dále nehydrolyzovatelné chemické jednotky. Oligosacharidy reprezentují mezistupeň, kde jsou spojeny dvě až několik desítek monosacharidových

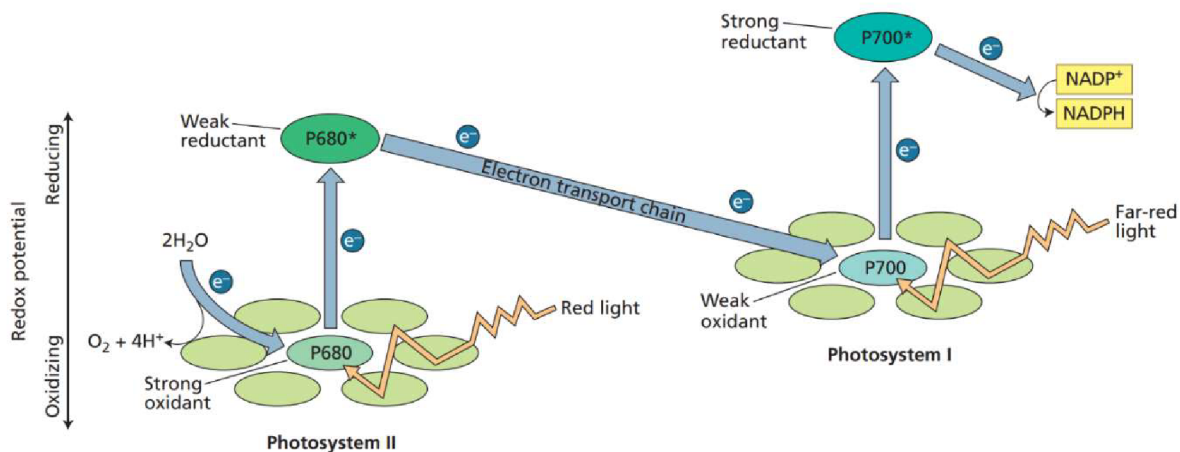
jednotek. Do této skupiny pak patří třeba sacharóza a rafinóza. Polysacharidy představují dlouhé řetězce skládající se z několika stovek až mnoha tisíců sacharidových jednotek a patří sem již zmíněná celulóza a škroby. (Kodíček et al., 2018).

Z hlediska této práce jsou však nejdůležitější tyto cukry: glukóza, fruktóza, rafinóza, sacharóza a mannitol.

3.2.1 Glukoneogeneze u rostlin, fotosyntéza

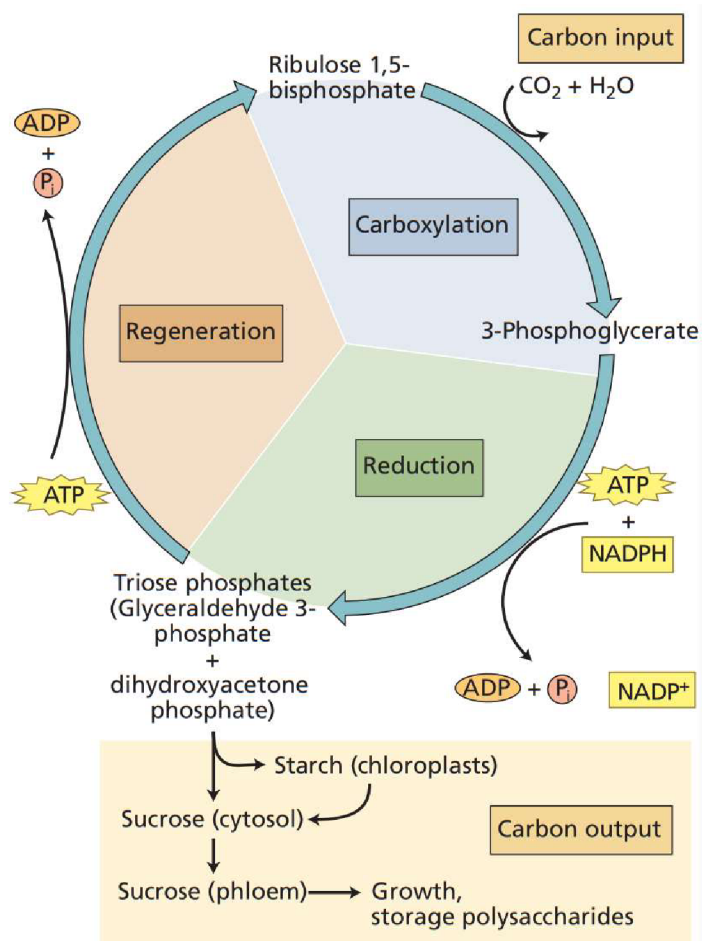
Z fyzikálně chemického hlediska je planeta Země uzavřeným systémem., aby takový systém nedosáhl maxima entropie, a nakonec nešlo k zastavení látkovým výměnám a toku hmoty obecně, je třeba do tohoto systému neustále dodávat energii. Jako zdroj této energie slouží sluneční záření, kdy fotosyntetizující organismy pohltnou přibližně $3 \cdot 10^{21}$ Joulů z dopadající energie za rok. Tato energie je pak ukládána v chemických sloučeninách jako jsou cukry (Taiz et al., 2015).

Fotosyntéza je z chemického hlediska oxidačně-redukční nebo též redoxní reakce. V průběhu této reakce slouží jeden z reaktantů jako redukční činidlo, poskytuje tedy své elektrony a zvyšuje svoje oxidační číslo, a tudíž se oxiduje. V případě fotosyntézy je CO_2 ve svém nejvyšším oxidačním stavu. V rámci světelné fáze fotosyntézy pak pomocí energetických fotonů probíhá syntéza vhodného a dostatečně silného redukčního činidla schopného redukovat CO_2 . V tomto případě se jedná o nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP), respektive o jeho redukovanou formu NADPH. Jako zdroj elektronů umožňující redukci NADP^+ v tomto případě slouží voda a jako vedlejší produkt je uvolňován kyslík. Celý proces je schematicky naznačen na **Obr. 5**. Reakce probíhá z velké části v tylakoidech a účastní se jí dva systémy, které jsou v závislosti na absorbované vlnové délce označovány jako fotosyntetický systém 1 a fotosyntetický systém 2 (PSI, PSII) (Taiz et al., 2015).



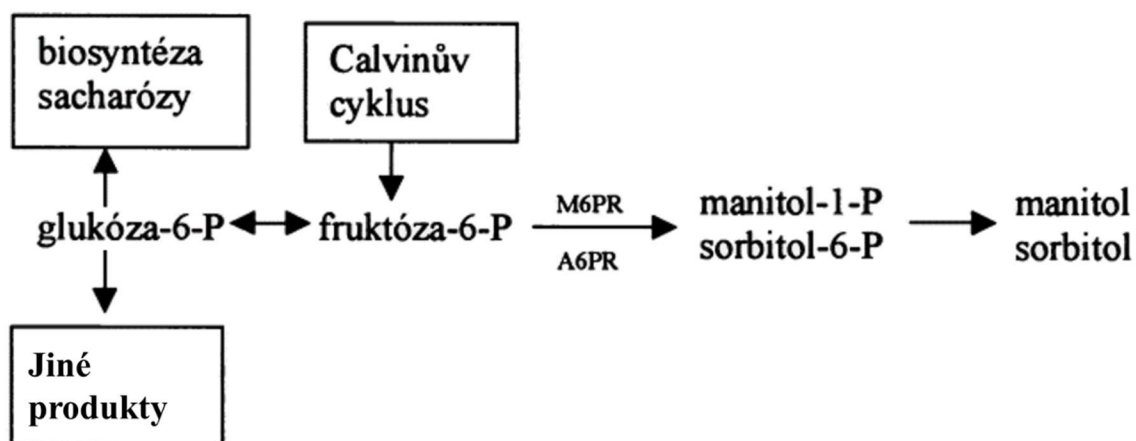
Obrázek 4: “Zet“ schéma fotosyntézy. Červené světlo absorbované fotosystémem II (PSII) produkuje silný oxidant a slabý reduktant. Červené světlo s větší vlnovou délkou absorbované fotosystémem I (PSI) vytváří slabý oxidant a silný reduktant. Silný oxidant produkovaný PSII oxiduje vodu, zatímco silný reduktant produkovaný PSI redukuje NADP⁺ (Taiz et al., 2015).

Takto, ve světelné fázi, připravené redukční činidlo NADPH již může vstupovat do reakcí v rámci Calvinova–Bensonova cyklu a podílet se na redukci a fixaci atmosférického CO₂ do strukturálních i nestrukturních sacharidů. Calvinův–Bensonův cyklus je opět schematicky vyznačen na obrázku 6. Z hlediska syntézy cukrů jsou pak v rámci Calvinova–Bensonova cyklu (**Obr. 6**) klíčové dva kroky, a to vznik kyseliny 3-fosfoglycerová (3-fosfoglycerátu) a její následná konverze na glyceraldehyd-3-fosfát.



Obrázek 5: Calvinův-Bensonův cyklus probíhá ve třech fázích: (1) karboxylace, která kovalentně spojuje atmosférický uhlík (CO_2) s uhlikatým skeletem; (2) redukce, při níž vzniká sacharid (Glyceraldehyd-3-fosfát) na úkor fotochemicky generovaného ATP a redukčních ekvivalentů ve formě NADPH; a (3) regenerace, při níž se obnovuje akceptor CO_2 ribulóza 1,5-bisfosfát. V ustáleném stavu se vstup CO_2 rovná výstupu triosových fosfátů. Ty slouží buď jako prekurzory biosyntézy škrobu v chloroplastu, nebo proudí do cytosolu. Pro biosyntézu sacharózy a další metabolické reakce. Sacharóza se ukládá do floémové mízy a využívá se k růstu nebo na biosyntézu polysacharidů v jiných částech rostliny (Taiz et al., 2015).

Látky vzniklé v těchto procesech pak již poskytují prekurzory pro relativně přímou syntézu zájmových sloučenin jako je glukóza, fruktóza, sacharóza, rafinóza a mannitol (Taiz et al., 2015). Rafinóza a mannitol vznikají také z trióz získaných ve fotosyntéze ale v konsektivních biosyntetických drahách. Syntézu těchto látek zjednodušeně schematicky popisuje následující **Obr. 7**. Mannitol je jedním z nejvíce rozšířených cukerných alkoholů v přírodě a jeho syntéza probíhá v cytosolu. Podílí se také při vzniku sacharidů rafinózové řady (Kozłowski et al., 1997), které pak slouží jako transportní nebo zásobní NSC stejně jako sacharóza (Šuťáková, 2006).



Obrázek 6: Mannitol a sorbitol vznikají z poolu glukózy-6-fosfátu/fruktózy-6-fosfátu prostřednictvím manitol-1-fosfát dehydrogenázy (MtIDH) nebo aldóza-6-fosfát reduktázy (StIDH) za vzniku manitol-1-fosfátu nebo sorbitol-6-fosfátu. (Šuťáková, 2006) původně převzato, upraveno a zkráceno z (Bohnert et al., 1995).

3.3 Chřadnutí smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) karst.)

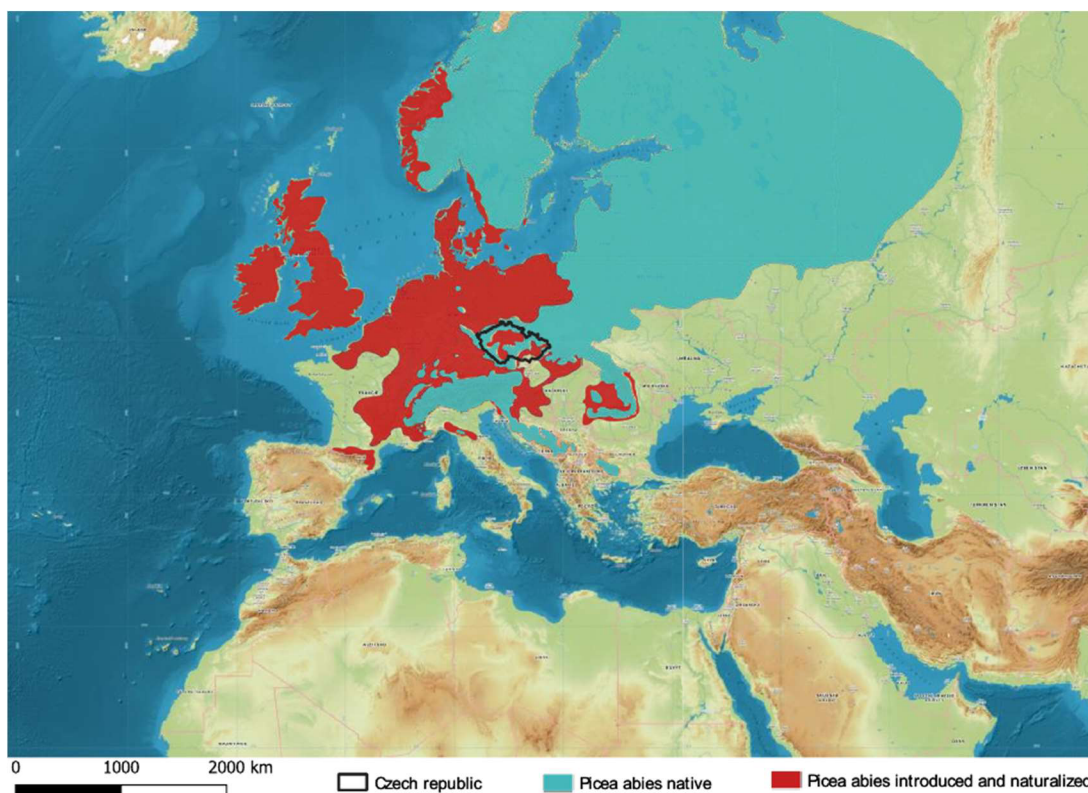
Smrk ztepilý je všeobecně jedna z nejdůležitějších hospodářských dřevin střední a severní Evropy v dřevařském průmyslu, která je pěstovaná i mimo svůj přirozený výskyt. Zastoupení smrku v dnešních českých lesích tvoří 54 %, zatímco zastoupení v přirozených lesích by činilo pouze 11 %. Strom dosahuje velkých rozměrů s výškou dosahující kolem 50 m a průměrem kmene až 1,5 m. Obvykle může dosáhnout věku mezi 350–400 let. Ovětvení bývá pravidelné, přeslenité s kuželovitou korunou. V horských oblastech může být koruna štíhlá s jemným ovětvením. Jehličí přetrvává nejčastěji v rozmezí od 6 do 9 let. Jehlice jsou čtyřhranné, zašpičatělé, leskle zelené, dlouhé 1-3 cm. Jedná se o jednodomou rostlinu. Samčí šištice jsou drobné s červenou barvou po odkvetení však žloutnou, samičí jsou zelené nebo také červené rostoucí

vzpřímeně avšak po oplození převisají a vyvíjejí se v šišky visící směrem dolů (**Obr. 8**). Šišky jsou převislé, válcovitého tvaru, které se nerozpadají, dozrávají v prvním roce. Po vypadnutí semen opadají i šišky v celku (Musil, 2003).



Obrázek 7: *Picea abies* (L.) Karst. (Department of Plant Sciences, University of Oxford).

V Evropě se smrku vyskytuje ve dvou oblastech: v *středoevropsko-balkánské oblasti*, kde se rozlišují další čtyři podoblasti (*hercynsko-karpatská, alpská, dinárská, rodopská*) a v *severoevropské oblasti*, která je plošně větší při započítání i oblastí, vyskytující se s hybridy se smrkem sibiřským. Tudíž smrk pak svým areálem zasahuje do rozsáhlých území evropské části Ruska (**Obr. 8**). V Česku je těžiště výskytu smrku v oreofytiku a mezofytiku. ve vegetačních stupních podle Skalického, 1988 submontánní, montánní a supramontánní (Musil, 2007). Oproti původnímu zastoupení smrku je současně zastoupení asi 5-násobně vyšší za cenu smíšených jedlo-bukových a bukových lesů, kde byl smrk původně jen vtroušen. V první polovině 19. století se smrk stal vzhledem rychlosti růstu a technickým přednostem dřeva hlavní dřevinou vysokokmenného kulturního lesa. Tento vývoj, pěstování smrku přetrvával dodnes, ačkoliv na nevhodných stanovištích, která byla smrku vnucena, docházelo k rozvoji chorob a škůdců (lýkožrout, mniška) s pozdějšími kalamitními následky velkých rozsahů (Úradníček 2003)



Obrázek 8: Rozšíření smrku ztepilého v původním i nepůdním areálu (Caudullo et al. 2017).

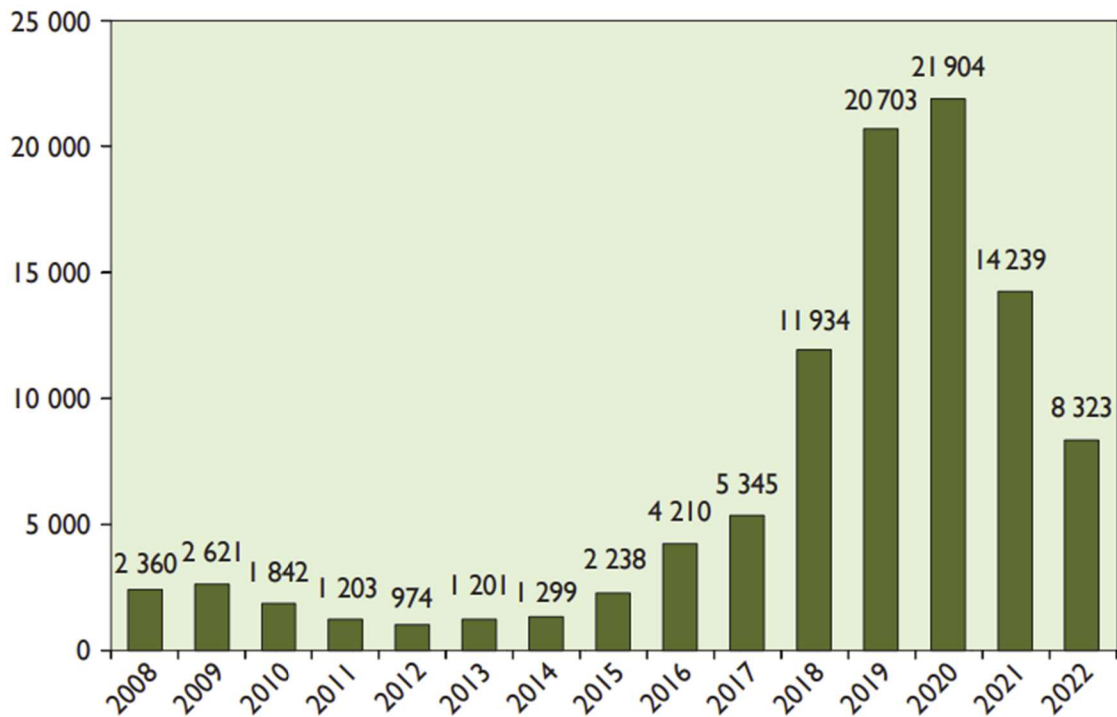
3.3.1 Ekologie smrku

Smrk je světlomilná dřevina, v mládí s tolerancí k zástínu, avšak tato tolerance se mění s věkem a stanovištními podmínkami. Obecně platí, že stromy rostoucí na dobrých stanovištích mají vyšší toleranci k zastínění než stromy na horších stanovištích a stromy vyššího věku. Tepelné nároky smrku jsou relativně nízké, při nárůstu tepla však zvyšuje svou produkci, ale za předpokladu dostatečného zásobení vodou. K vysokým teplotám je citlivější než k nízkým. Jako optimum se ve střední Evropě udává: průměrná roční teplota 6 °C srážky 490-580 mm, teplotní amplituda nejchladnějšího a nejteplejšího měsíce nad 19 °C (Úradníček 2003).

3.3.2 Chřadnutí smrkových porostů

Intenzivní žloutnutí jehlic, defoliace letorostů, morfologické změny korun smrků, samostatně odumírající stromy plošně rozprostřené v porostech a tím snížené zakmenění, dále zvýšený výskyt kůrovců (*Curculionidae*, *Scolytinae*) projevující se

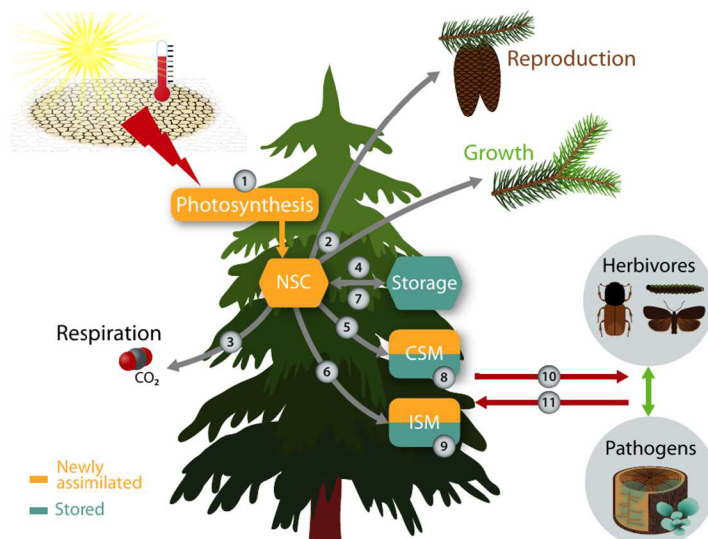
smolením kmene a také symptomy napadení houbovými nákazami (*Armillaria*, *Heterobasidion*) jako plodnice, zduřelé báze kmene, uhnílé kořeny, přítomnost rhizomorf, to vše jsou projevy chřadnutí smrkových porostů. Hlavní příčiny jsou přisuzovány nepůvodnosti smrkových porostů a klimatickým anomáliím způsobující zejména nižší srážkové úhrny nebo také jejich změnou distribuce ve vegetačním období (Holuša, Liška, 2002). Odumírání lesů způsobené změnou klimatu je globálním problémem, který postihuje lesní ekosystémy po celém světě (Allen et al., 2010). V evropském kontextu není problematika odumírání smrku neobvyklým jevem. Jsou zaznamenány události chřadnutí smrkových porostů ze západní a střední Evropy. V Německu, v letech po suchém období 2018-2019 v oblasti Spessart a Hassberge byl úhyn 50 % stromů (Obladen et al., 2021). Porosty na hranicích Slovenska, Polska a Česka sledované v literatuře (Hlásny, 2010), z oblastí Norska v letech 1992-2000 (Solberg, 2004). či v Beskydech (Hlásny et al., 2011) prezentují obdobně nepříznivý vývoj, což označují jako jednu z hlavních oblastí úpadku smrkových lesů v Evropě. V rámci základních charakteristik „současného úpadku smrkových porostů“ autoři popisují jeho výskyt v nadmořských výškách 400 až 1000 m n. m., v porostech všech věkových tříd, s poměrně chronickým průběhem. Patologické příznaky zahrnují změny v barvě a ztrátu jehličí, zkracování jehličí a výhonů, nekrózy kmene, výtoky pryskyřice, časté výskyty houbových infekcí (*Armillaria*, *Heterobasidion*) a napadení podkorního hmyzu. Ze *Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství (2022)* je patrné, že vlivem teplotně nadprůměrných let 2014, 2015, 2018, 2019 se zvýšila těžba smrkového kůrovcového dříví (**Obr. 9**).



Obrázek 9: Evidovaný objem vytěženého kůrovcového dřeva smrku ztepilého v období 2008-2022 tis.m³ (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky, 2023).

3.3.3 Hospodaření stromů s NSC

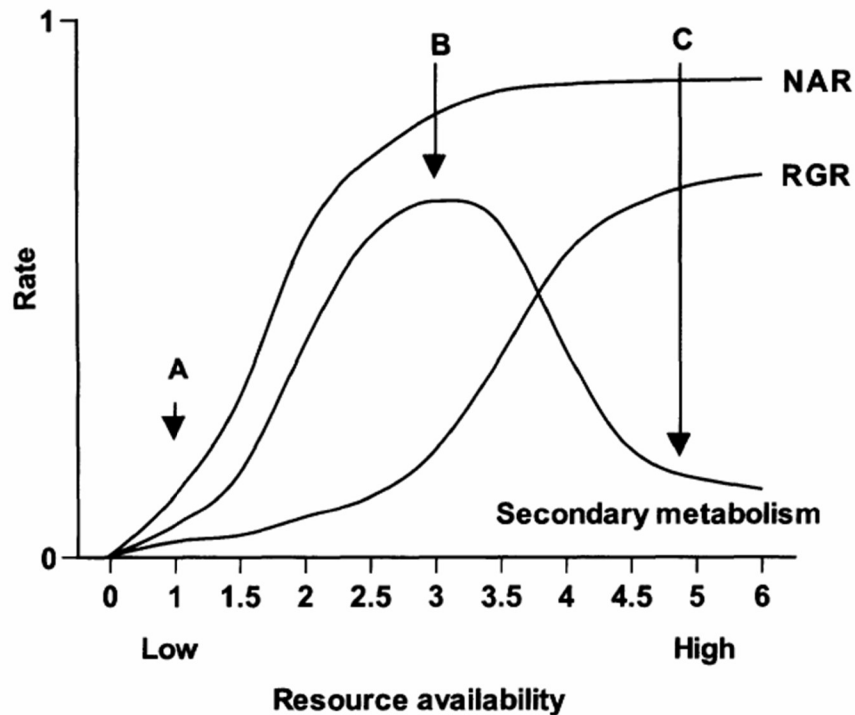
Způsoby, jakým stromy vyvažují své zdroje mezi růstem, ukládáním a obranou a jak jehličnany mění své zásoby během sucha a napadení kůrovcem, jsou omezené, ale zásadní pro předvídání reakce stromů na abiotické a biotické stresy (Huang et al., 2019). Při trvalém deficitu vody a neustále potřebě sacharidů k produkci sekundárních sloučenin a udržení metabolismu se zásoby vyčerpají, což vede k neschopnosti reagovat na napadení kůrovcem (McDowell, 2011) Pro zjednodušení představy o zisku energie tedy NSC a jejich alokaci znázorňuje **Obr. 10**.



Obrázek 10: Schématické zobrazení alokace uhlíku u stromů a jejich interakce s biotickými činiteli, jako jsou kůrovci a jiné patogeny. Za stresových podmínek jako je sucho a teplo, stromy koordinují dodávku uhlíku pomocí fotosyntézy (1), požadavky na růst a reprodukci (2), dýchání (3), skladování nestrukturálních sacharidů (NSC) (4), produkci konstitutivních sekundárních metabolitů (CSM) (5) a indukovaných sekundárních metabolitů (ISM) (6). Nicméně dlouhodobý silný stres může výrazně omezit fotosyntézu a tím i remobilizaci skladovaných látek (7), což může hrát důležitou roli při alokaci na obranu stromů. Produkce CSM poskytuje první linii obrany, která umožňuje odpuzování popřípadě neutralizování hmyzu a jiných patogenů (8), zatímco investice do ISM probíhá po biotických útocích (9). Stromy integrují konstitutivní a indukovanou obranu k posílení odolnosti vůči komplexu kůrovců a hub (10), kteří naopak bojují s obranou stromů (Huang et al., 2020).

Sekundární metabolity (SM) jsou látky, které se přímo neúčastní primárních metabolických aktivit např. růstu a reprodukce, ale často plní důležité funkce jako je detoxikace, odpudivost pro herbivory a obraných funkcí proti patogenům. Biosyntéza takovýchto sloučenin může být při omezených zdrojích nákladná, protože odvádí zdroje z jiných sinků a tím i zdroje primárních metabolických aktivit (růstu) (Huang et al., 2019). Distribuci zdrojů, ať už pro primární nebo sekundární aktivity osvětluje mnoho ekologických studií v kontextu teorií obrany rostlin. V člancích (Coley et al., 1985) navrhuje hypotézu dostupnosti zdrojů, kdy rostliny s pomalým růstem investují do protiherbivorní obrany. (Bryant et al., 1983) navrhuje hypotézu uhlíkové živinové

rovnováhy. Existuje také hypotéza rovnováhy růstu a diferenciaci (Herms a Mattson, 1992), s tím, že alokace sekundárních metabolitů závisí na dostupnosti NSC, jenž závisí na dostupnosti a rovnováze uhlíku a dusíku za předpokladu získávání uhlíku prostřednictvím fotosyntézy (**Obr. 11**).



Obrázek 11: Vztah asimilační rychlosti (NAR), relativního růstu (RGR) a diferenciaci sekundárního metabolismu napříč gradientem zdrojů. (A) Růst i fotosyntéza jsou omezeny nízkou dostupností zdrojů. (B) Růst je omezen více než fotosyntéza a proto je více prostředků alokováno na diferenciaci sekundárního metabolismu. (C) Růst je méně omezený čímž se do něho alokuje se více prostředků (Herms a Mattson, 1992).

Tyto hypotézy potvrzují novější studie, tím že stromy během stresu suchem upřednostňují alokaci uložených zásob uhlíku před růstem, aby udržely dýchání a obranu před patogeny (Berini et al., 2018). Pokud náklady na dýchání převyšují míru asimilace uhlíku, může u stromů dojít k záporné uhlíkové bilanci, což vyžaduje využití uložených nestrukturálních sacharidů (NSC) z glukózy a škrobu k podpoře metabolismu (McDowell et al., 2008). Distribuce sacharidů v orgánech stromů je ovlivňována abiotickými stresory, genetickými faktory a také minulými stresovými zkušenostmi stromu často vykazujícími nelineární vztahy. Tyto vztahy jsou ovlivněny různými faktory jako jsou charakteristiky stromu, rostlinných orgánů, přítomnost

biotických činitelů a také načasování a intenzitě stresu (Hartmann et al., 2018). Při mírném stresu ze sucha mohou jehličnaté stromy akumulovat NSC k udržení ochranných opatření proti patogenům (Ferrenberg et al., 2015). Také se NSC využívají k opravě a rekonvalescenci metabolismu způsobených stresem a biosyntéze sekundárních metabolitů jako jsou fenolové a terpenové sloučeniny, místo aby při stresu stromy investovaly do růstu (Hartmann et al., 2018). Mezi sekundární metabolity patří terpenové sloučeniny, které jsou součástí pryskyřice. Pryskyřice smrku ztepilého obsahují především monoterpenové uhlovodíky, jako jsou např. : α -pinen, β -pinen, β -phellandren, myrcen, limonen aj. (Netherer et al., 2021).

3.3.4 Lýkožrout smrkový *Ips typographus*

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L.) se řadí mezi zástupce řádu brouci (Coleoptera) čeledě nosatcovití, podčeledi kůrovcovití. Dospělí jedinec dosahuje svým vzrůstem cca. 4,8 – 5,5 mm a šířkou 1,9 mm. Tělo brouka je válcovitého charakteru pokrývající tmavohnědé zbarvení, na němž jsou drobně chloupky. Přední část pronota je šikmo vykrojená a pod ústním ústrojím jsou podélné rýhy. V zadní části na lesklých elytrách tvořící charakteristický límcový tvar jsou řady s důlky. Zakončení okrajů tvoří charakteristické čtyři zuby z nichž třetí je kapkovitého tvaru. Samičky kladou vajíčka jednotlivě do výklenků po obou stranách mateřské chodbičky. Jedna matečná chodbička průměrně obsahuje 50 vajíček, jejichž velikost je menší jak 1 mm. Larvy jsou bílé s malou hnědou chitinovou hlavou a hnědými krovkami. Úplný vývoj jedné generace od fáze vajíčka přes fázi larvy a kukly k dospělému jedinci trvá šest až deset týdnů. Z toho utváření mateřské chodbičky a kladení vajíček trvá 7-10 dnů. Doba larválního vývoje je do značné míry závislá na teplotních podmínkách. V teplém počasí délka může proběhnout za 7 dnů, ale v případě chladného se může vývoj protáhnout až na 40 až 50 dnů. Fáze kukly může být také proměnlivá avšak v průměru trvá okolo 8. dnů (Skuhřavý a Zahradník 2002).



Obrázek 12: Zobrazuje Lýkožrouta smrkového Ips typographus převzato (Stejskal et al. 2021)

Lýkožrout smrkový přežívá na vrub stromů. V Evropě je nejvážnějším škůdcem smrkových porostů. Je polygamní tzn. jeden samec oplodní více samic. Při vytváření matečných chodeb a při žíru larev způsobuje poškození rostlinných pletiv hlavně pak těch vodivých, floémových, vedoucích k odumření stromů. Mezi vhodné stromy se řadí hlavně ty oslabené, například vyvrácené a rozlámané větrem, sněhem nebo také ledovkou popřípadě oslabené od houbových patogenů či suchem stresované, kde nalézá lýkožrout optimální podmínky v zavádajícím lýku a rychle se přemnoží. Lýkožrout smrkový obvykle mývá dvě rojení za rok. V případě teplotně nadprůměrného roku, popřípadě optimálních podmínek může mít až tři pokolení do roku. Při přemnožení se lýkožrout stává vážným škůdcem a ohrožením pro smrkové porosty. Vylíhlí jedinci dalších generací nenalézající zavadlé stromy za účelem dalšího vývoje, z důvodu odumřelých, zaschlých, popřípadě strávených předchozí generací, se vrhají i na stromy zdravé. Ty se sice mohou bránit výtokem pryskyřice, v níž zahyne část nalétajících lýkožroutů, avšak při přetrvávajícímu náporu zdravý strom lýkožroutům podlehne (Zumr, 1995)

3.4 Chemická analýza

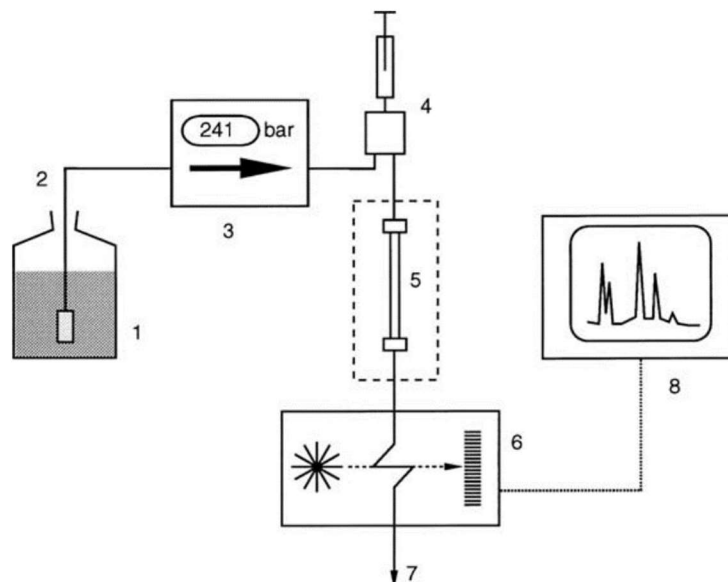
Rostliny jsou při růstu a dalších fyziologických funkcích, jako je dýchání, osmotická regulace a obrana, závislé jak na nově asimilovaném uhlíku ve formě CO₂, tak na uložených zásobách nestrukturálních sloučenin uhlíku (NCC). Tyto nestrukturální sloučeniny uhlíku pak zahrnují škroby, rozpustné cukry a v případě některých bylin také fruktany. Tyto látky jsou označovány jako nestrukturální sacharidy NSC. Nestrukturální sloučeniny uhlíku pak dále mohou zahrnovat i neutrální tuky (Martínez-Vilalta et al., 2016). Přestože NSC představují celou škálu látek pozornost bude věnována zejména sacharidům neboli cukrům, které v rámci NSC reprezentují největší podíl uhlíku. Zároveň také do určité míry reprezentují výměnu respektive tok uhlíku mezi stromem a jeho okolím (Hartmann a Trumbore, 2016).

Postupů chemické analýzy mono a oligosacharidů je celá řada. Mezi tyto postupy lze zařadit například plynovou chromatografii, různé typy spektroskopií (např. fotoakustickou spektroskopií (Aloraynan et al., 2022), blízkou infračervenou spektroskopií (Simeone et al. 2017; Kemsley et al. 1992), Ramanovu spektroskopií (Mrozek a Weaver 2002), atd...), polarimetrie a konečně kapalinová chromatografie. V rámci předkládané diplomové práce byla použita spřažená metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) spolu s hmotnostní spektrometrií doby letu (time-of-flight mass spectrometry, TOF-MS).

3.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále jen HPLC je analytická metoda, schopná poskytnout kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Kvalitativní informace vyplývá z rozdílných elučních/retenčních časů zatímco kvantitativní informace plyne z intenzity respektive z plochy pod píkem (Meyer, 2010). HPLC využívá vysokého tlaku, který působí na rozpouštědlo, jež v důsledku tohoto tlaku prochází kolonou. Systém HPLC se skládá z mnoha součástí. Standardně však lze mezi tyto součásti zařadit autosampler (automatický vzorkovač/dávkovač), systému pro dodávku rozpouštědla, vstřikovací ventil vzorku, vysokotlaké chromatografické kolony a hmotnostního spektrometru, který slouží jako detektor. Kolona je umístěna v peci, jejíž dvířka jsou normálně zavřená, aby se udržovala konstantní teplota kolony. Obvyklejší je volba plynové chromatografie místo kapalinové, protože plynová

chromatografie je levnější a vzniká při ní mnohem méně odpadu (Harris, 2010). V případě analýzy cukrů lze očekávat, že kapalinová chromatografie bude mít přednost, neboť mnoho cukrů nemusí být pro plynovou chromatografii dostatečně těkavých nebo mohou při analýze podléhat rozkladu.



Obrázek 13: Schématické znázornění HPLC systému. 1 – zásobník rozpouštědla; 2 – potrubní řada s fritou; 3 – čerpadlo s manometrem; 4 – injektor vzorku; 5 – termostatovaná kolona; 6 – detektor; 7 – zásobník na odpad; 8 – sběrnice dat (Meyer, 2010).

3.4.2 Chromatografický proces

Chromatografie je separační proces, při kterém je směs vzorků rozdělena mezi dvě fáze v chromatografickém loži (koloně nebo destičce). Jedna fáze je stacionární, zatímco druhá prochází chromatografickým ložem. Stacionární fáze je buď pevný, porézní, povrchově aktivní materiál ve formě malých částic, nebo tenký film kapaliny nanesený na pevný nosič nebo stěnu kolony. Mobilní fází je plyn nebo kapalina. Pokud se používá plyn, proces se nazývá plynová chromatografie. V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina, včetně tenkovrstvé chromatografie. V závislosti na typu interakce mezi vzorkem unášeným mobilní fází a stacionární fází pak lze chromatografický proces rozdělit do mnoha skupin například na adsorbční nebo gelovou permeační chromatografii. Nicméně existují i relativně netradiční typy chromatografií jako například iontově výměnná chromatografie, chromatografie s chemicky vázanými fázemi, iontově párová chromatografie atd. (Meyer, 2010).

Fázová preference vzorku lze vyjádřit tzv. distribučním koeficientem K_X . Ten je dán podílem aktivity vzorku obsaženém ve stacionární fázi a aktivity vzorku v mobilní fázi. Aktivita vzorku však bývá obvykle aproximována koncentrací vzorku. Analogicky lze fázovou preferenci vyjádřit pomocí kapacitního faktoru kde jsou koncentrace nahrazeny látkovým množstvím

$$K_X = \frac{c_{X,stat}}{c_{X,mobil}} \quad (4)$$

Stacionární fáze se obvykle skládá z velmi malých částic s velkým povrchem. Obvyklá velikost částic u HPLC se pohybuje mezi 1,7 do 5 μm . V principu platí, že čím menší velikost částic tím lepší je rozlišení, případně tím kratší lze použít kolonu při zachování stejného rozlišení. Menší velikost částic však komplikuje průchod mobilní fáze a tím pádem k potřebě vyššího tlaku v aparatuře aby byl zajištěn správný průchod mobilní fáze (Harris, 2010).

3.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Základním principem hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry, MS) je generování iontů z anorganických nebo organických sloučenin jakoukoli vhodnou metodou následná separace těchto iontů ve vhodných polích podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) a konečně jejich kvalitativní a kvantitativní detekce podle příslušných m/z a množství. Analyt může být ionizován tepelně, elektrickým polem, chemicky nebo dopadem energetických elektronů, iontů nebo fotonů. Ionty mohou být jednotlivé ionizované atomy, klastry, celé molekuly nebo jejich fragmenty či asociáty. Separace iontů se provádí pomocí statických nebo dynamických elektrických nebo magnetických polí. Ionizaci vzorku lze však provádět i exotickými metodami jako jsou vysoce energetické neutrální atomy, elektronicky excitované atomy, masivní klastrové ionty, a dokonce lze k ionizaci použít i elektrostaticky nabitě mikrokapičky. Zajímavostí může být, že separace iontů nemusí nutně využívat různých variant polí ale lze separaci iontů podle m/z provádět také v oblastech bez pole, za předpokladu, že ionty mají na výstupu z ionizátoru dobře definovanou kinetickou energii dráhy letu (Gross, 2011). Toho lze docílit použitím molekulových paprsků (Pysanenko et al., 2021).

Hmotnostní spektrometr obsahuje celou řadu komponent, nicméně existuje jednoduché schéma, které musí každý hmotnostní spektrometr splňovat. Hmotnostní spektrometr se skládá ze zdroje iontů, hmotnostního analyzátoru a detektoru, které pracují ve vysokém vakuu, aby nedošlo k deionizaci vzorku.

Hmotnostní analyzátor je zařízení, které dokáže oddělit jednotlivé species, tj. atomy, molekuly nebo klastry podle jejich hmotnosti. Separace by měla být rovněž nezávislá na chemické konformaci. Všechny v současnosti používané hmotnostní analyzátory jsou založeny na elektromagnetismu, takže k dosažení separace jsou zapotřebí ionty. Proto musí být k analyzátoru připojen zdroj iontů. Analyzátor pak rozdělí ionty přicházející ze zdroje podle jejich m/z . Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů používaných v hmotnostně spektrometrickém výzkumu a lze je rozdělit do různých kategorií, jako jsou magnetické nebo čistě elektrické, skenovací nebo neskenovací (založené na impulsech) a záchytové nebo nezáchytové analyzátory. Do těchto skupin pak patří následující typy hmotnostních analyzátorů: magnetický/elektrický sektorový, kvadrupólový hmotnostní filtr, kvadrupólová iontová past, orbitrap, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací a také technika akceleračtorové hmotnostní spektrometrie (AMS), jako poslední pak analyzátor času letu (TOF) (Gross, 2011), který je stěžejní pro tuto práci.

3.4.4 Time-of-Flight

Princip toho detektoru je v principu jednoduchý a spoléhá se na měření rozdílu v délkách průletu jednotlivých fragmentů. Nezbytnou součástí TOF-MS je dobře definovaný počáteční impulz, který jednak udává počátek měření času, ale také slouží jako zdroj iontů. Analyzátoři TOF jsou proto velmi vhodné v kombinaci s pulzními iontovými zdroji, jako je MALDI, kde lze ke spuštění měření času použít laserový pulz, který vytváří ionty v plynné fázi. Obvykle je na desku se vzorkem přiveden vysoký kladný nebo záporný potenciál, obvykle 5 až 30 kV, a jak je vzorek ionizován a ionty vstupují do plynné fáze, jsou urychlovány směrem k nulovému respektive nižšímu potenciálu. Když opouštějí oblast urychlování tj oblast mezi „repelerem“ a „extraktorem“, mají všechny nepoškozené ionty se stejným nábojem v ideálním případě stejnou kinetickou energii, ale různé, na hmotnosti závislé rychlosti. To však v obecném případě neplatí, neboť by všechny ionizované fragmenty musely vždy startovat ve stejném směru, v důsledku toho pak dochází k rozmytí píků. Ionty pak volně prochází oblastí bez pole směrem k detektoru. Časový rozdíl mezi startovacím signálem a impulsem generovaným při dopadu iontu na detektor je doba letu (TOF) a lze jej vyjádřit jako:

$$t_{TOF} = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qU_a}} \propto \sqrt{\frac{m}{z}}, \quad (5)$$

kde L je délka oblasti bez potenciálového driftu, v je velikost rychlosti po urychlení, m je hmotnost iontu a q je elektrický náboj a U_a je rozdíl potenciálů mezi repelerem a extraktorem (Gross, 2011).

4 Metodika

V rámci dosažení cílů, jež si klade tato práce, bylo provedeno terénní měření půdního vodního potenciálu, odběr vzorků z kmene stromů, měření přírůstu kmene a také nevýběrový biologický test s cílem zjistit akceptování smrku ztepilého v podmínkách sucha lýkoužroutem smrkovým *Ips typographus*. V analytické laboratoři pak byla provedena série chemických analýz za účelem stanovení obsahu nestrukturálních sacharidů na zvoleném vzorku suchem stresovaných a přirozeně zavlažovaných stromů.

4.1 Charakteristika porostu

Místo odběru vzorků bylo provedeno v lese nedaleko obce Krymlov., zde byla lokalizována plocha rozdělená na dílčí čtyři zkusné plochy (**Obr. 14**). V březnu 2021 bylo na jedné zkusné ploše postaveno jedno dřevěné zastřešení o rozměrech (21 x 12 m). Kontrolních zkusných ploch bez zastřešení tedy byly tři. Průměrná roční teplota je 7,6 °C, průměrný roční úhrn srážek je 665 mm. Langův dešťový faktor (LDF) je 87,6. (Meteorologická stanice Českého hydrometeorologického ústavu v Ondřejově za období 1961-2000). Zkusné plochy se nacházejí v nadmořské výšce 440 m n. m. Matečná hornina je granodiorid – Říčanská žula součástí Středočeského plutonu, rozkládajícího se mezi oblastmi Říčany, Klatovy a Tábořem. V lokalitě převládá typ půdy I95 ilimerizovaná se zvětraliny slepenců a brekcií (<https://app.geology.cz>). Porost je tvořen převážně stoletou smrkovou monokulturou, rostoucí v neoptimálních fyziologických podmínkách. Plochy jsou situovány v rovině nebo mírném svahu. Na zastřešené ploše bylo sledováno šest stromů, na dílčích plochách bez zastřešení pak byl sledován jejich ekvivalent s ohledem na fenotypovou podobnost.



Obrázek 14: Umístění tři kontrolních zkusných ploch a jednu zastřešenou zkusnou plochu.

4.2 Měření vodního potenciálu a přírůstu kmene stromu

Pro měření vodního potenciálu půdy se od května do září 2021 na pokusných plochách instalovaly senzory Teros 21 od firmy Meter Group s měřicím rozsahem 0–100 MPa. Senzory byly umístěny cca. 20 cm pod povrchem půdy, jež zaznamenávaly data za každou hodinu.

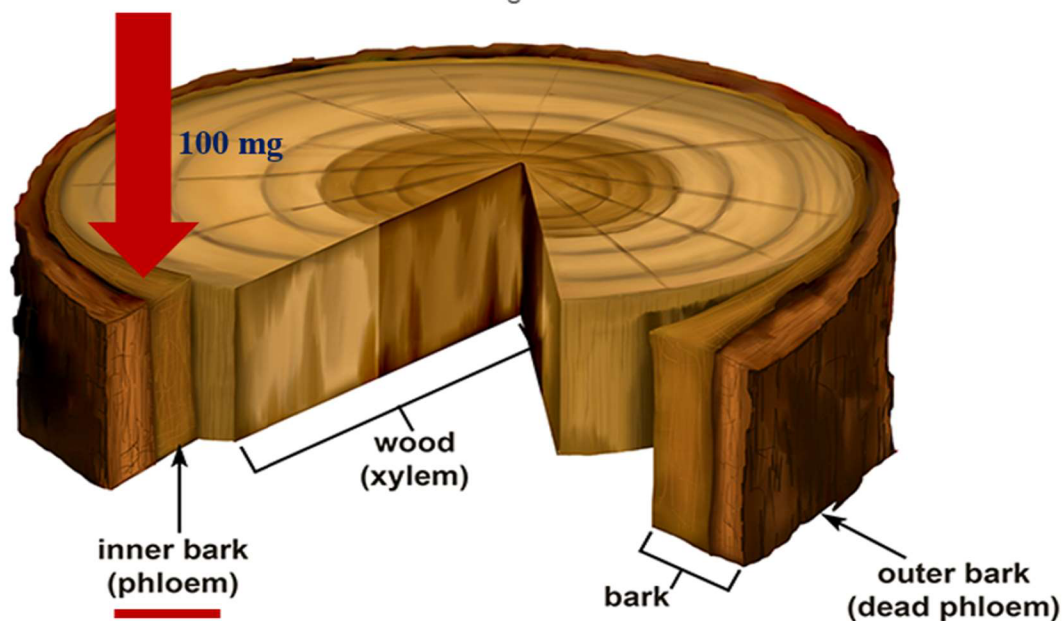
Přírůsty kmene byly měřeny u všech sledovaných stromů na kmeni ve výšce 3,5 m na zemi pomocí dendrometru DR26E od firmy Enviromental Measuring Systems s.r.o. Dendrometr zaznamenával změny obvodu každých pět minut s tím, že výsledky byly převedeny na hodinové průměry. Dendrometr byl propojen se záznamníkem dat (dataloggerem) GreyBox N2N od téže firmy, jenž byl vybaven GSM konektivitou a umožňoval propojení s cloudovým systémem. Pro usnadnění statistické analýzy se průběžně zaznamenaná data průměrovala za den nebo na konkrétní časový interval.

4.3 Odběr, zpracování a chemická analýza vzorků

V zastřešeném i nezastřešeném porostu byly provedeny odběry vzorků lýka. Samotný odběr byl proveden pomocí kladiva tak, že byl dutý děrovač / průrazník na odběr vzorku vtlačěn do stromu ve výšce zhruba 200 cm od země a zasahoval až do běle (**Obr. 15**). Odběr byl prováděn na jižní straně kmene, kde se nenacházely žádné výrazné povrchové a růstové malformace. Následně byl obsah děrovače kovovou tyčinkou vytlačen do připravené kryovialky. Z každého sledovaného stromu bylo odebráno 5 vzorků o průměru 8 mm rozmístěných 15 cm od sebe. Po dokončení odběru

každého vzorku byly kryovialky ihned umístěny do chladicího zařízení s tekutým dusíkem. Po dokončení celého odběru vzorků byly převezeny a uloženy o teplotě -80°C ve skladovacích prostorách fakulty Lesnické a dřevařské v Dřevařském pavilonu. Při terénním odběru vzorků bylo sesbíráno celkem 60 vzorků z 12 stromů.

V rámci mechanického zpracování a přípravy vzorků dřevní hmoty na chemickou analýzu byly výseky vyjmuty z kryovialek a pomocí skalpelu byly ze vzorku odseparovány tvrdé a z hlediska této práce nežádoucí části vzorku, tj. borka, běl a části pryskyřičných kanálků. Kousky čistého floému byly následně rozkrájeny na malé části. Takto připravené částičky vzorku byly poté v třecí misce rozdrčeny na jemný prášek vhodný k analýze. Pro usnadnění drcení byl ke vzorku přidáván tekutý dusík dle potřeby. Z třecí misky bylo pomocí lžičky a analytické laboratorní váhy odváženo 100 mg homogenizovaného vzorku a umístěny do 1 ml kuželové odstředivé zkumavky označované též falkonka. Během práce v laboratoři nebo při jejím přerušení bylo dbáno na to, aby byly vzorky v případech, kdy s nimi není manipulováno umístěny v chladicím zařízení. V horní části takto připravených falkonek byla jehlou vytvořena malá dírka sloužící k odchodu par vody, respektive sublimátu vznikajícího při sušení lyofilizační metodou. Lyofilizace probíhala týden. Po sušení byly vzorky opět váženy a byl sledován úbytek hmotnosti, respektive vlhkosti. Falkonka byla opatřena novým uzávěrem a uložena do mrazicího zařízení s teplotou -20°C . V tomto stádiu byly taktéž připraveny vzorky, kde byly přidány cukry jako standardní přídavek usnadňující kvantitativní chemickou analýzu.



Obrázek 15: Místo odběru vzorků a následného zpracování.

K takto připraveným a usušeným vzorkům bylo pipetou přidáno 1200 μ l metanolu a 300 μ l deionizované vody, následně byly vzorky promíchány ve vírovém mixéru. Poté byly takto promíchané vzorky umístěny po dobu 30 minut do třepačky a byl zapnut ohřev na 60 °C. Frekvence třepání byla nastavena na 1000 otáček za minutu. Následně byl vzorek umístěn do centrifugy na 5 minut. Rychlost otáčení byla nastavena na 135 000 otáček za minutu a teplota na 20 °C. Po dokončení centrifugace byly vzorky přefiltrovány pomocí injekčních stříkaček opatřených stříkačkovými filtry z PVDF o velikosti pórů 0,2 μ m. Po dokončení této procedury byly falkonky se vzorky opět umístěny do mrazicího zařízení s teplotou -80 °C v již zmíněných skladovacích prostorách v Dřevařského pavilonu. Zde vzorky setrvaly, než došlo k chemické analýze na chromatografu.

4.3.1 Chemická analýza vzorků

Koncentrace nestrukturálních sacharidů byly naměřeny pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie spřažené s kvadrupolovým time-of-flight (LC-qTOF-MS/MS) spektrometrem od firmy Agilent Technologies (USA). Analytický proces byl ve shodě s Šulcem a kol. (Šulc et al. 2021). Konkrétní typ chromatografického zařízení byl Agilent 1290 Infinity II jež byl spřažen se spektrometrem od stejného výrobce Agilent 6546 LC/MS QTOF. K rozdělení NSC byla použita separační chromatografická kolona

Supelco apHera NH₂, s kovalentně vázanými primárními aminoskupinami. Kolona (150·2 mm) byla naplněna částicemi o velikosti 5 μm a během měření byla temperována na 30 °C. Separace NSC proběhla použitím tzv. gradientové eluční metody, přičemž jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody a počáteční složení odpovídalo poměru 80/20 (A/V). V průběhu měření se pak složení mobilní fáze měnilo následovně 0,5–13 min 55/45 (A/V), 14–15 min 80/20 (A/V). Během měření byl udržován konstantní průtok mobilní fáze na hodnotě 0,2 ml·min⁻¹. Množství vzorku při nástřiku do aparatury byl 1 μl. Analyzátor spektrometru pracoval v negativním ionizačním módu a jeho parametry byly optimalizovány pomocí standardů měřených NSC, tedy glukóza, fruktóza, rafinóza, sacharóza, mannitol a trehalóza. Měřený rozsah byl 100–1000 *m·z*⁻¹, teplota sušícího plynu byla 280 °C, průtok plynu v plášti byl 12 l·min⁻¹ a jeho teplota byla 400 °C, kapilární napětí bylo 2 kV a napětí v extraktoru 120 V. Během měření byly současně měřeny dva referenční standardy 112,9855 *m/z* a 922,0098 *m/z* za účelem korekce výsledných hodnot. Ke zpracování takto získaných dat byl použit software *Agilent Mass Hunter Acquisition*.

4.4 Nevýběrový biotest pro zjištění akceptování smrků lýkožroutem smrkovým, *Ips typographus*

Během práce byly také zkoumány preference *I. typographus* v závislosti na koncentracích NSC obsažených ve stromu, respektive floému. Byl proveden biologický test bez možnosti volby (No-choice bioassays by placing individual beetles in Eppendorf tubes) založený na principech původní předlohy dle Turčániho et al. (Turčáni a Nakládal, 2007) respektive jeho vylepšená metoda útočných boxů dle Stříbrské (Stříbrská et al., 2022).

Samci *I. typographus* byli jednotlivě umístěni do 2 ml Eppendorfových zkumavek s několika větracími otvory a byly vyplněny proužkem filtračního papíru. Bylo použito deset Eppendorfových zkumavek se samci *I. typographus* a ty byly připevněny na sledovanou stranu kmene stromu v prsní výšce a byly přichyceny páskou. Takto připravení brouci byli ponecháni ve zkumavkách po dobu 24 h. Následně bylo zkoumáno a počítáno množství brouků, kteří se úspěšně zavrtali, byli vyhnáni nebo eliminováni pryskyřicí anebo se pokusili zavrtat do kůry, ale tuto činnost nedokončili. Všichni brouci, kteří vykazovali tyto aktivity, byli zařazeni do kategorie „aktivní brouci“. Někteří brouci zůstali neaktivní a tito byli označeni jako „neaktivní brouci“. Vyskytla se rovněž malá skupina brouků, kterým se podařilo ze zařízení uniknout. Eppendorfova biologická zkouška byla provedena dvakrát.

4.5 Statistická analýza

Ke statistickému zpracování dat byl použit software *Statistica 14*. K vytvoření grafů reprezentující statistická data pak byl použit program *MS Excel*.

Jedním z cílů práce bylo posoudit, zda se koncentrace jednotlivých vybraných NSC statisticky významně liší, respektive zda jsou střední hodnoty koncentrace cukrů skutečně rozdílné, a nejen výsledkem náhodné variability. V rámci statistického zpracování bylo nejprve zjištěno, zda se jedná o normální rozdělení. K tomu byl použit Shapiroův-Wilkův test. Přestože, bylo na základě Shapirova–Wilkova testu u některých cukrů prokázáno normální rozdělení teoreticky umožňující použití silnějších parametrických testů, bylo pro následné srovnání středních hodnot využito neparametrického Mann-Whitneyova pořadového testu. Důvod volby tohoto testu byl,

že tento test je vhodnější pro porovnání datových řad s rozdílným rozdělením, a hlavně s malým počtem datových záznamů. Nakonec k vyhodnocení výsledků nevýběrového biologického testu byl použit Kruskalův–Wallisův jednofaktorový neparametrický test. Opět z důvodu spolehlivé neprůkaznosti normálního rozdělení. Výsledkem použitého testu jsou pak standardní hodnoty p -veličiny jako u parametrických testů.

V rámci práce byl pak také vyhodnocován vliv množství nestrukturálních sacharidů na přírůst sledovaného jedince. Korelace mezi těmito dvěma veličinami byla posouzena užitím Spearmanova korelačního koeficientu, jež je schopen odhalit i nelineární korelaci mezi sledovanými veličinami. Spolehlivost testu byla standardně, tak jako v předchozím případě, posouzena na základě hodnoty p -veličiny.

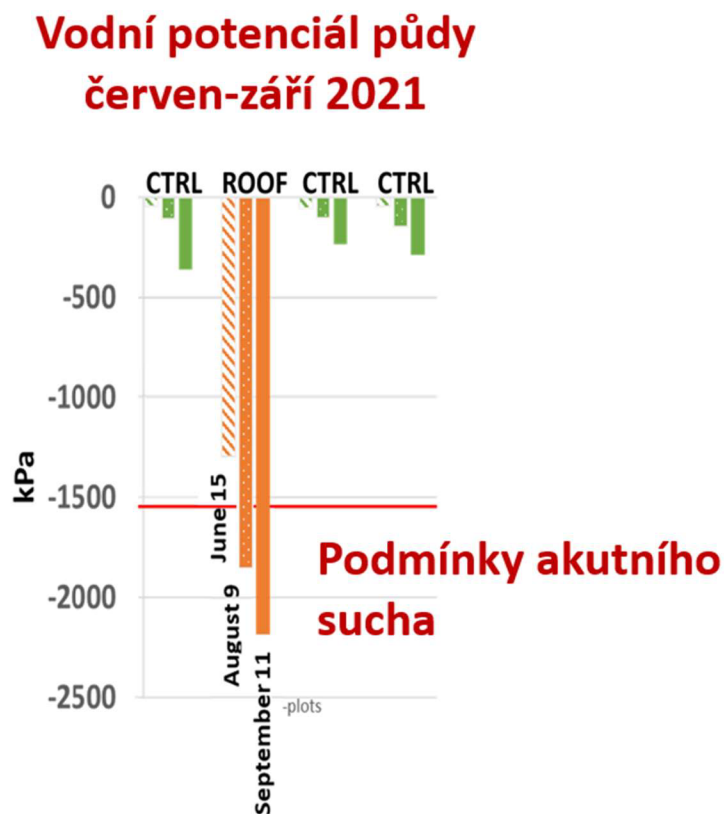
Výsledky statistického zpracování jsou prezentovány ve formě tzv. krabicových grafů (boxplot), kde černá čára v „krabici“ reprezentuje medián. Krabice znázorňuje rozpětí od prvního do třetího kvartilu (IQR – interquartil range; vnitrokvartilové rozpětí) matematicky:

$$IQR = \widetilde{x}_{75} - \widetilde{x}_{25}. \quad (6)$$

Rozsahy, vzpěry nebo též vousky a znázorňují minimální a maximální hodnoty a v tomto případě to jsou hodnoty, které nepřesahují vzdálenost $1,5 \times IQR$.

5 Výsledky

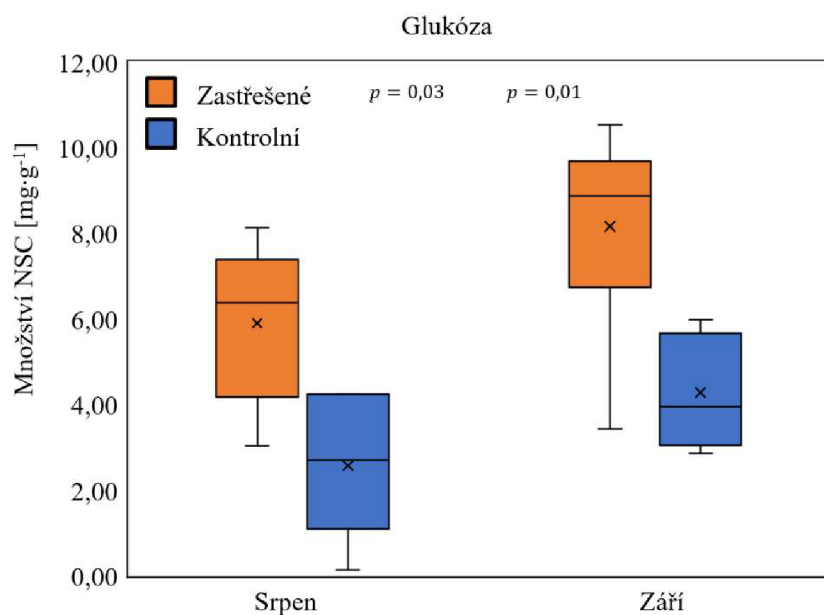
5.1 Porovnání vodního potenciálu



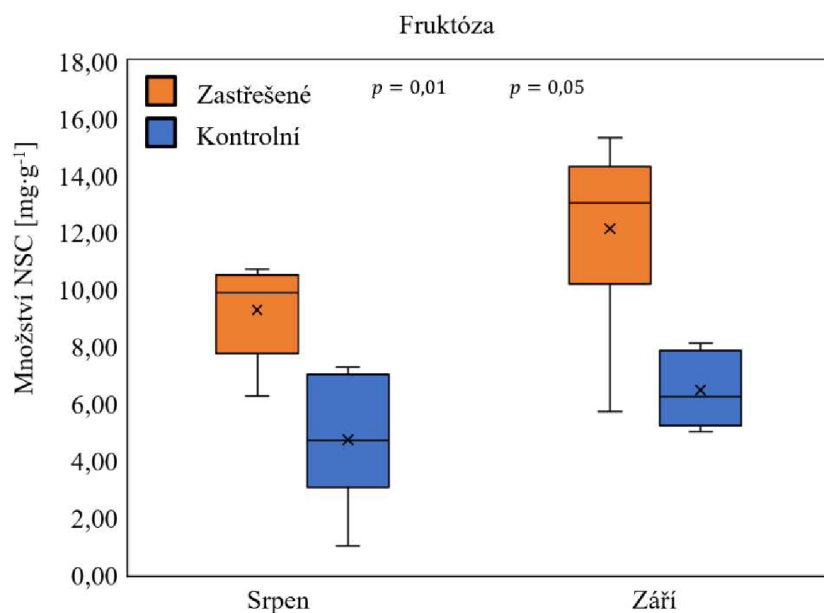
Obrázek 16: Hodnoty vodního potenciálu zastřešené plochy a kontrolních nezastřešených ploch za měsíce červen, srpen a září.

Hodnoty vodního půdního potenciálu charakterizují vliv zastřešení a kontrolních ploch (**Obr. 16**). Vodní potenciál kontrolních ploch je dán přirozenou distribucí srážek. U zastřešených ploch je vidět nízký vodní potenciál ještě pořád ve fázi rezistence s hodnotou přesahující přes -1.5 MPa v měsících srpen a září.

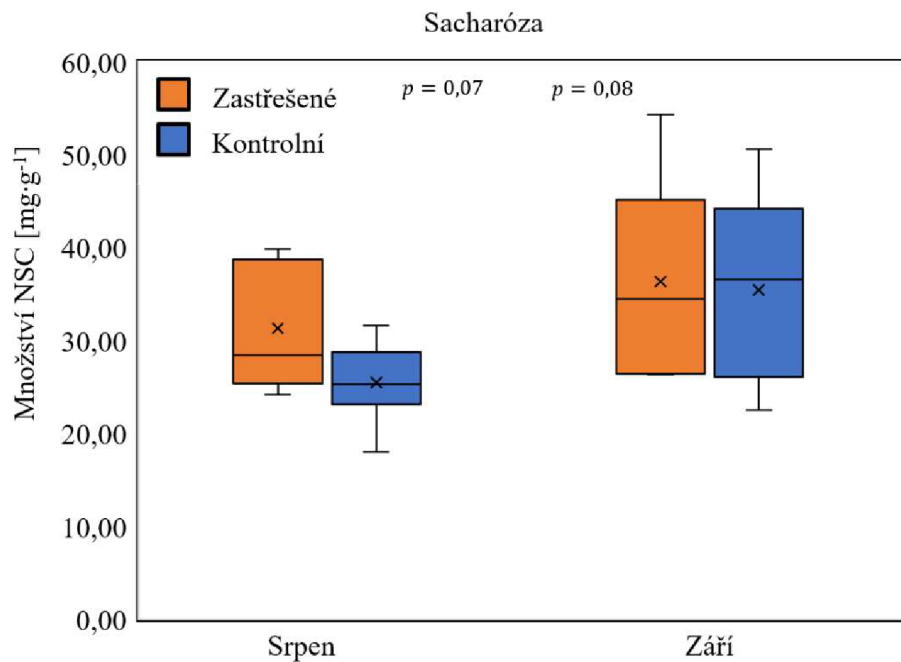
5.2 Porovnání množství cukrů zastřešených a kontrolních ploch



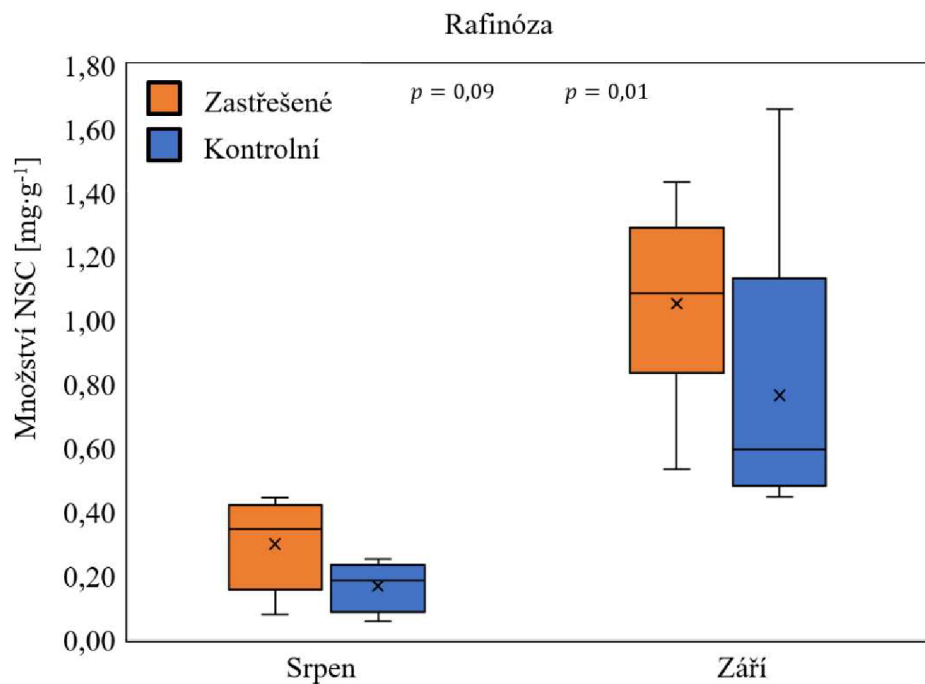
Obrázek 17: Hladiny glukózy v měsíci srpnu a září pokusných ploch. Koncentrace glukózy na zastřešené ploše byly zvýšené v porovnání s kontrolními plochami v obou měsících (v mg/g sušiny).



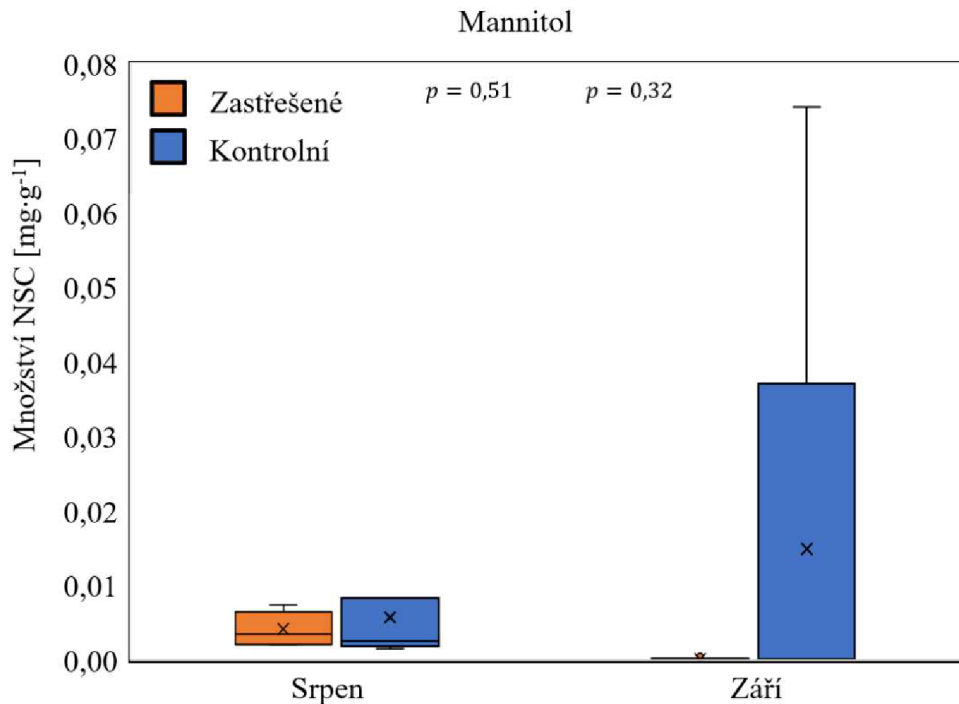
Obrázek 18: Hladiny fruktózy v měsících srpnu a září pokusných ploch. Koncentrace fruktózy na zastřešené ploše byly opět významně zvýšené ve srovnání s kontrolou v obou měsících (v mg/g sušiny).



Obrázek 19: Hladiny sacharózy v měsících srpnu a září pokusných ploch. Ačkoliv to není statisticky významné koncentrace sacharózy byly o něco vyšší na zastřešené ploše (v mg/g sušiny).



Obrázek 20: Hladiny rafinózy v měsících srpnu a září pokusných ploch. V srpnu byly hladiny rafinózy mírně vyšší ale opět statisticky bezvýznamné. V září však došlo k významnému zvýšení v porovnání s kontrolou (v mg/g sušiny).

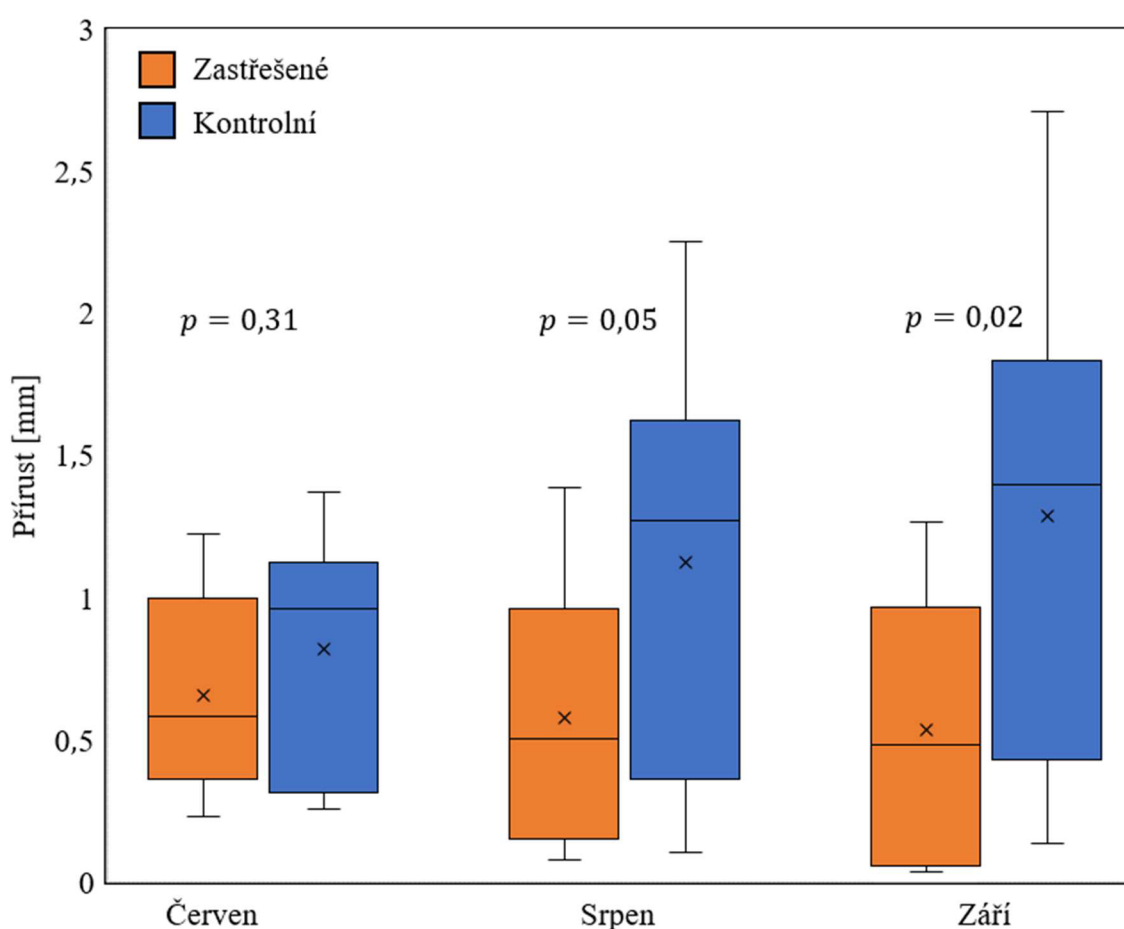


Obrázek 21:: Hladiny mannitolu v měsících srpnu a září pokusných ploch. V srpnu byly koncentrace mírně vyšší u kontrolních. V září sice došlo ke zvýšení koncentrace, avšak statisticky bezvýznamně. Trend je ale opačný než u ostatních cukrů, kdy koncentrace byly vyšší u zastřešených (v mg/g sušiny).

Na základě předkládaných výsledků lze ukázat, že akutní sucho má, metodami statistické matematiky, postihnutelný vliv na nestrukturní sacharidy (cukry, NSC). V srpnu vykazovala skupina stromů, jež byly zastřešeny po sedm měsíců mnohem vyšší hladinu glukózy v porovnání se skupinou, jež takto ošetřena nebyla na hladině významnosti ($p = 0,03$). Pokračování tohoto trendu je patrné i v září, kdy opět stromy bez přístupu vody opatřené zastřešením vykazovaly významně vyšší hodnoty koncentrací glukózy ($p = 0,01$). Analogicky i hladiny fruktózy byly srpnu ($p = 0,01$) i v září ($p = 0,04$) výrazně vyšší u skupiny zastřešených stromů než u kontrolní skupiny. V případě rafinózy v srpnu došlo pouze k mírnému zvýšení hladiny její koncentrace u skupiny se zastřešením ve srovnání se skupinou kontrolní a toto zvýšení nebylo z hlediska výsledků testu statisticky signifikantní ($p = 0,09$), naproti tomu v září byla již hladina rafinózy ve skupině opatřené střechem výrazně vyšší než v kontrolní (nezastřešené) skupině ($p = 0,01$). Na základě výsledků se pak porovnání středních hodnot sacharózy nejeví statisticky významně vyšší než v kontrolní skupině ($p = 0,07$), podobný trend je pak opět patrný v září, kdy u zastřešené skupiny ve srovnání s kontrolní byl pozorován ještě méně signifikantní rozdíl s hodnotou p -veličiny 0,08. V

srpnu byla hladina sacharózy vyšší ve skupině ošetřené střechou ve srovnání s kontrolou. V srpnu byly hodnoty koncentrace sacharidového alkoholu mannitolu s funkcí osmotické molekuly vyšší v kontrolní skupině ($p = 0,51$). V září byly hladiny mannitolu v kontrolní skupině rovněž vyšší, ale rozdíl opět nebyl statisticky významný ($p = 0,32$). Vysoké hodnoty p -veličiny lze v tomto případě částečně vysvětlit malým počtem vzorků zastřešených stromů.

5.3 Porovnání přírůstu kmene u stromů vystavených akutnímu suchu a přirozeně zavlažovaných



Obrázek 22: Porovnání radiálního přírůstu v jednotlivých měsících na zastřešené ploše a kontrolních ploch.

Přírůsty kmene stromů nevykazovaly významný rozdíl v červnu a srpnu mezi plochami se střechou a kontrolními, v září však došlo k významnému zvýšení tloušťkového přírůstu v rámci kontrolní plochy (**Obr. 22**).

5.3.1 Korelace přírůstu a cukrů

Tabulka 4: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů ukazují, že hodnoty koncentrací cukrů signifikantně nekorelují, ale trend ukazuje potenciální zápornou korelaci pro glukózu, fruktózu v září tedy čím menší přírůst, tím je více cukrů v lýku.

Korelace cukrů a přírůstu	Srpen	Září
	Průměr přírůstu za týden [mm]	Průměr přírůstu za týden [mm]
Glukóza	-0,10	-0,41
Sacharóza	-0,10	0,06
Rafinóza	-0,30	-0,05
Fruktóza	0,10	-0,50
Mannitol	-	-

Grafu zobrazuje hodnoty korelačních koeficientů mezi radiálními přírůsty kmene a obsahem cukrů ve floému, Z hodnot vyplývá, že hodnoty vykazují významnou zápornou korelaci mezi radiálními přírůsty v kmeni pro dva specifické cukry, a to pro glukózu a fruktózu, Jestliže tedy strom obsahoval více těchto cukrů byl snížený radiální přírůst kmene.

5.4 Nevýběrové biologické testy, akceptování akutně suchem stresovaných stromů kůrovci

Tabulka 5: Počet aktivních lýkožroutů (vrtajících, zavrtaných, pokoušející se vrtat do stromu) v nevyběrovém biologickém testu v Ependorfových vialkách za měsíc srpen a září na zastřešené a kontrolních plochách.

Typ	Vzorek	Srpen	Září
		Počet aktivních jedinců	Počet aktivních jedinců
Zastřešené	5B	4	5
	5B	8	6
	5B	9	4
	5B	5	5
	5B	6	6
	5B	7	2
	5C	4	6
Kontrolní	5C	3	4
	5D	2	6
	5D	0	5
	5D	2	5
	5D	0	3

Tabulka 6: Sumarizuje aktivních lýkožroutů na zastřešené a nezastřešených plochách v jednotlivých měsících. Neparametrické rozdělení, počítáno Kruskallovým-Walisovým testem.

Měsíc		Aktivní
Srpen	Zastřešené	39
	Kontrolní	11
	Kruskall-Wallis	p=0,005
Září	Zastřešené	28
	Kontrolní	29
	Kruskall-Wallis	p=0,54

Tabulky č. 3 a č. 4 zobrazují výsledky nevýběrového biologického testu. Tabulka č. 3 reprezentuje konkrétní počty jedinců kůrovců v srpnu a v září. V této tabulce jsou zobrazeny konkrétní počty jedinců, kteří se zavrtali, vrtajících a pokoušejících se zavrtat do skupiny aktivních. Hodnoty Kruskalova Wallisova testu potvrzují významnou preferenci suchem stresovaných stromů v srpnu. Naproti tomu v září již tento test tuto preferenci nepotvrdil. Tabulka č. 4. pak shrnuje celkové počty všech aktivních brouků dohromady ve všech sledovaných stromech společně s hodnotu p-veličiny Kruskalova Wallisova testu.

Tabulka 7: Hodnoty Spearmanových koeficientů pořadové korelace mezi obsahem NSC a počtem aktivních jedinců *Ips typographus*.

Měsíc	Typ	Typ NSC				
		Glukóza	Sacharóza	Rafinóza	Fruktóza	Mannitol
Srpen	Exp2-EP-IT-Active	0,72	0,45	0,47	0,66	-
Září	Exp3-EP-IT-Active	0,13	0,32	0,62	0,13	-

Tabulka č. 5 zobrazuje hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů v srpnu a září, mezi sledovanými cukry a počtem jedinců *Ips typographus*. Hodnoty vykazují v měsíci srpnu statisticky významnou korelaci pro glukózu a fruktózu. Tyto hodnoty však

v následujícím měsíci nemají statisticky významnou korelaci pro tyto dva cukry. Naopak se statisticky významná korelace ukazuje u rafinózy

6 Diskuze

Cílem praktické části práce bylo zjistit, zda zastřešení má vliv na ukládání nestrukturálních sacharidů, dále zda stromy vlivem zastřešení a tím i vystavení akutnímu stresu způsobeného suchem má vliv na přírůst a zda a v jaké míře byly NSC investovány do zásob. V neposlední řadě bylo cílem práce také zjistit, jestli *Ips typographus* vykazuje větší aktivitu na takto akutně suchem stresovaných stromech.

6.1 Půdní vodní potenciál jednotlivých ploch

Výsledky měření půdního vodního potenciálu vykazovaly, že zahájení stresového období u zastřešených stanovišť nastalo již v červnu. Data týkající se koncentrací NSC a přírůstků získaných v tomto období nebyly v této práci sledovány, a tudíž jim nebyla věnována větší pozornost.

Z **Obr. 16**, jež znázorňuje průběh půdního vodního potenciálu, je patrné, že jeho hodnoty kontrolních vzorků se pohybují v rozmezí 0 až $-0,5$ MPa. Oproti tomu stromy, jež byly zastřešené, se svými hodnotami pohybují v okolí v září $-1,5$ MPa. To dokazuje, že střešní systém splnil úkol, a to vyvolávání akutního stresu. V červnu jsou hodnoty pod touto hranicí, a naopak v září se již pohybují pod hranicí -2 MPa. Tyto hodnoty pak v porovnání s **Tabulkou 1** korespondují s hodnotami minimálních půdních vodních potenciálů pro jehličnaté stromy jež se pohybují mezi hodnotami 1,8 až 2,5 MPa. Dle literatury (Cochard, 1992), jež se zabývá studiem hodnot vodního potenciálu pro různé dřeviny včetně smrku ztepilého jsou minimální hodnoty vodního potenciálu, při kterém začíná docházet ke kavitaci a suchem indukované embolii, vyjma extrémních hodnot, pro většinu sledovaných dřevin kolem hodnoty $-2,5$ MPa. To naznačuje, že zkoumané zastřešené vzorky se pohybují ve fázi rezistence nicméně jsou blízko hranici vyčerpání.

6.2 Nestrukturální sacharidy

Stěžejním cílem práce bylo měření a stanovení koncentrací jednotlivých NSC u zastřešené a kontrolní skupiny stromů. Výsledky ukazují, že u tří z pěti sledovaných NSC, konkrétně u sacharózy rafinózy a sacharidového alkoholu mannitolu, nebyl vliv zastřešení statisticky významný. U rafinózy se pak její koncentrace statisticky

významně lišila jen v září. Zbylé dva nestrukturální sacharidy, tedy glukóza a fruktóza se statisticky významně lišily v obou měsících. Uvedená zjištění jsou ve shodě s literaturou (Hartmann et al., 2013), který analogicky uvádí, že koncentrace glukózy a fruktózy se u stromů vystavených opakovanému akutnímu suchu a následném zavlažení významně liší. Stejně tak nepozoroval statisticky významné rozdíly u jiných NSC. Dle téže studie byly hladiny sacharózy v kořenech stromů vystavených cyklickému stresu významně nižší a zásoby škrobu byly téměř vyčerpány. Toto tvrzení však na základě naší studie nelze dementovat, neboť odběry vzorků probíhaly v prsní výšce kmene. Dále dle práce (Erbilgin et al. 2021) v níž byly stromy vystaveny suchu obnažováním kořenů a dvěma typům biotického ošetření (feromonem a inokulace houbami) měly významný vliv na zásoby NSC. Naopak zanedbatelný úbytek NSC byl přisuzován obnažení kořenů. Kombinace obou vlivů měla pak za následek odumření 6 z 8 sledovaných stromů (Erbilgin et al., 2021). Tomasella et al. 2019 ve své práci uvádí, že sazenice smrku ztepilého, jež byly podrobeny dvěma cyklům sucha a zavlažování, které proběhly ve dvou po sobě následujících letech, nevykazovaly během druhého cyklu procentuální ztrátu hydraulické vodivosti v kmenu a obsah NSC žádné setrvávající vlivy z předchozího sucha, což svědčí o úplné obnově. Druhé ošetření suchem neovlivnilo celkový obsah NSC, zatímco škrob byl v kůře přeměněn na rozpustné cukry. Po týdenním opětovném zavlažování byly zásoby NSC ochuzeny, pouze ve dřevě, přibližně 30 %. Údaje naznačují, že smrk dokáže napravit xylémovou embolizaci, a že při nově dostupné vodě mohou být NSC uloženy v xylémovém parenchymu krátkodobě mobilizovány pro udržení respirace anebo pro procesy podílející se na obnově xylémového transportu. To by však mohlo znamenat závislost na zásobách NSC v bělovém dřevě, zejména pokud se vyskytnou častá období sucha.

6.3 Radiální přírůst kmene

Z hlediska přírůstů na kmeni se ukázalo, že v srpnu a září došlo ke statisticky významnému snížení přírůstu kmene na zastřešené ploše v porovnání s plochami zavlažovanými přirozeně. Tento rozdíl ukazuje významný vliv faktorů prostředí, tedy snížené dostupnosti vody, na radiální přírůst. Tato pozorování jsou v souladu s předchozími studiemi, které prokázaly citlivost růstu stromů na vodní stres. (Krejza et al, 2021) ve své práci uvádí, že změny přírůstu kmene s vysokým časovým rozlišením jsou vhodným signálem pro bioindikaci stresu ze sucha a přírůstu tloušťky kmene v

reakci na místní podmínky prostředí. Silný stres suchem pak vedl k dřívějšímu sezónnímu ukončení radiálního růstu kmene stromů.

6.4 Vliv akutního vodního stresu na akceptování smrku *Ips typographus*

V rámci nevýběrového biologického testu aktivity byla zkoumána preference *Ips typographus* na stromech akutně stresovaných suchem a stromech kontrolních. Samci *Ips typographus* statisticky signifikantně prokázali vyšší aktivitu na stromech akutně stresovaných suchem avšak pouze v srpnu. Výsledek korelačního testu ukázal, že stromy stresované suchem vykazují vyšší atraktivitu pro *Ips typographus*, jež měly vyšší koncentraci glukózy a fruktózy v obou měsících naproti tomu rafinózu jen v září. Hodnoty korelačních koeficientů ukazují na významnou korelaci s obsahem glukózy a fruktózy v srpnu a dále pak významnou korelaci s obsahem rafinózy v září. Z hlediska celkového obsahu NSC pak výsledky naznačují, že *Ips typographus* preferuje jednotlivce s vysokým obsahem sacharidů ve floému. Tento výsledek je pak v relativní shodě s (Erbilgin et al., 2021), jež naznačuje, že oslabené stromy jsou tímto broukem preferovány.

7 Závěr

Předkládaná práce v rešeršní části shrnuje současné poznatky o suchem vyvolaného stresu na stromy. Dále se věnuje vodnímu potenciálu u rostlin a jejich dopad na transport látek, reakčních mechanismech rostlin na stres a jejich syntéze a distribuci nestrukturálních sacharidů hlavně pak glukózy, fruktózy, sacharózy rafinózy a také alkoholového cukru mannitolu.

V průběhu metodické části bylo v rámci vyvíjené metodiky na zastřešené ploše odebrány vzorky floému a také ve smrcích přirozeně zavlažovaných, v práci označovaných jako kontrolní. Druhá část vyvíjené metodiky se pak soustředila na kvantitativní analýzu vybraných klíčových nestrukturálních sacharidů ve floému. Na základě získaných výsledků společně se statistickým zpracováním pak byly interpretovány výsledné odpovědi na stěžejní cíle této práce.

Prvním z cílů bylo určit, zda se stromy akutně stresované suchem (zde simulovaných zastřešením) upřednostňují ukládání sacharidů v porovnání se stromy přirozeně zavlažovanými. Výsledky ukazují, že suchem stresované stromy skutečně preferují ukládání nestrukturálních sacharidů. Statisticky významně však lze toto tvrzení podepřít jen u glukózy a fruktózy v obou sledovaných měsících. U rafinózy však pouze v září.

Druhým cílem bylo určit, zda koncentrace nestrukturálních sacharidů v lýku měla vliv na radiální přírůst kmene. Toto tvrzení se v rámci sledovaných měsíců statisticky významně neprojevilo ani v srpnu ani v září, ale je viditelný trend, který by mohl být potvrzen při větším množství vzorků.

Posledním cílem pak bylo určit, zda koncentrace cukrů ve floému a akutní vodní stres mají souvislost s počtem jedinců *Ips typographus*, kteří akceptovali stresované smrky. Tato souvislost se opět prokázala na obsahu glukózy a fruktózy jen v srpnu. U rafinózy pak výsledky ukazují významnou korelaci v září.

Porovnání s dostupnou literaturou bylo v souladu s výsledky tak, že stromy stresované suchem měly vyšší koncentrace sacharidů v lýku nicméně jen glukózy a fruktózy, suchem stresované stromy pak měly nižší radiální přírůst kmene.

8 Seznam použitých zdrojů

ALLEN, Craig D., Alison K. MACALADY, Haroun CHENCHOUNI, Dominique BACHELET, Nate MCDOWELL, Michel VENNETIER, Thomas KITZBERGER, Andreas RIGLING, David D. BRESHEARS, E.H. (Ted) HOGG, Patrick GONZALEZ, Rod FENSHAM, Zhen ZHANG, Jorge CASTRO, Natalia DEMIDOVA, Jong-Hwan LIM, Gillian ALLARD, Steven W. RUNNING, Akkin SEMERCI a Neil COBB, 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* [online]. **259**(4), 660–684. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2009.09.001

ALORAYNAN, Abdulrahman, Shazzad RASSEL, Chao XU a Dayan BAN, 2022. A Single Wavelength Mid-Infrared Photoacoustic Spectroscopy for Noninvasive Glucose Detection Using Machine Learning. *Biosensors* [online]. **12**(3), 166. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios12030166

BERINI, John L., Stephen A. BROCKMAN, Adrian D. HEGEMAN, Peter B. REICH, Ranjan MUTHUKRISHNAN, Rebecca A. MONTGOMERY a James D. FORESTER, 2018. Combinations of Abiotic Factors Differentially Alter Production of Plant Secondary Metabolites in Five Woody Plant Species in the Boreal-Temperate Transition Zone. *Frontiers in Plant Science* [online]. **9**, 1257. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.01257

BOHNERT, H. J., D. E. NELSON a R. G. JENSEN, 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell* [online]. 1099–1111. ISSN 1040-4651, 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.7.7.1099

BRAY, Elizabeth A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* [online]. **2**(2), 48–54. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/S1360-1385(97)82562-9

BRYANT, John P., F. Stuart CHAPIN a David R. KLEIN, 1983. Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos* [online]. **40**(3), 357. ISSN 00301299. Dostupné z: doi:10.2307/3544308

CAUDULLO, Giovanni, Erik WELK a Jesús SAN-MIGUEL-AYANZ, 2017. Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief* [online]. **12**, 662–666. ISSN 23523409. Dostupné z: doi:10.1016/j.dib.2017.05.007

COCHARD, H., 1992. Vulnerability of several conifers to air embolism. *Tree Physiology* [online]. **11**(1), 73–83. ISSN 0829-318X, 1758-4469. Dostupné z: doi:10.1093/treephys/11.1.73

COLEY, Phyllis D., John P. BRYANT a F. Stuart CHAPIN, 1985. Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science* [online]. **230**(4728), 895–899. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.230.4728.895

ERBILGIN, Nadir, Leila ZANGANEH, Jennifer G. KLUTSCH, Shih-hsuan CHEN, Shiyang ZHAO, Guncha ISHANGULYYEVA, Stephen J. BURR, Monica GAYLORD, Richard HOFSTETTER, Ken KEEFOVER-RING, Kenneth F. RAFFA a Thomas KOLB, 2021. Combined drought and bark beetle attacks deplete non-structural carbohydrates and promote death of mature pine trees. *Plant, Cell & Environment* [online]. **44**(12), 3866–3881. ISSN 0140-7791, 1365-3040. Dostupné z: doi:10.1111/pce.14197

FERRENBURG, S., J. M. KANE a J. M. LANGENHAN, 2015. To grow or defend? Pine seedlings grow less but induce more defences when a key resource is limited. *Tree Physiology* [online]. **35**(2), 107–111. ISSN 0829-318X, 1758-4469. Dostupné z: doi:10.1093/treephys/tpv015

FRANCESCHI, Vincent R., Paal KROKENE, Erik CHRISTIANSEN a Trygve KREKLING, 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* [online]. **167**(2), 353–376. ISSN 0028-646X, 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x

GLOSER, Jan, 1998. Fyziologie rostlin. 2. rozš. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN isbn80-210-1789-9.

GROSS, Jürgen H., 2011. *Mass spectrometry: a textbook*. 2. ed. Berlin Heidelberg: Springer. ISBN 978-3-642-10709-2.

HARRIS, Daniel C., 2010. *Quantitative chemical analysis*. 8th ed. New York: W.H. Freeman and Co. ISBN 978-1-4292-1815-3.

HART, Sarah J., Thomas T. VEBLEN, Karen S. EISENHART, Daniel JARVIS a Dominik KULAKOWSKI, 2014. Drought induces spruce beetle (*Dendroctonus rufipennis*) outbreaks across northwestern Colorado. *Ecology* [online]. **95**(4), 930–939. ISSN 0012-9658, 1939-9170. Dostupné z: doi:10.1890/13-0230.1

HARTMANN, Henrik, Catarina F. MOURA, William R. L. ANDEREGG, Nadine K. RUEHR, Yann SALMON, Craig D. ALLEN, Stefan K. ARNDT, David D. BRESHEARS, Hendrik DAVI, David GALBRAITH, Katinka X. RUTHROF, Jan WUNDER, Henry D. ADAMS, Jasper BLOEMEN, Maxime CAILLERET, Richard COBB, Arthur GESSLER, Thorsten E. E. GRAMS, Steven JANSEN, Markus KAUTZ, Francisco LLORET a Michael O'BRIEN, 2018. Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. *New Phytologist* [online]. **218**(1), 15–28. ISSN 0028-646X, 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.15048

HARTMANN, Henrik a Susan TRUMBORE, 2016. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist* [online]. **211**(2), 386–403. ISSN 0028-646X, 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.13955

HARTMANN, Henrik, Waldemar ZIEGLER a Susan TRUMBORE, 2013. Lethal drought leads to reduction in nonstructural carbohydrates in Norway spruce tree roots but not in the canopy. *Functional Ecology* [online]. **27**(2), 413–427. ISSN 0269-8463, 1365-2435. Dostupné z: doi:10.1111/1365-2435.12046

HE, Zuhua, Shanice WEBSTER a Sheng Yang HE, 2022. Growth–defense trade-offs in plants. *Current Biology* [online]. **32**(12), R634–R639. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2022.04.070

HERMS, Daniel A. a William J. MATTSON, 1992. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* [online]. **67**(3), 283–335. ISSN 0033-5770, 1539-7718. Dostupné z: doi:10.1086/417659

HLÁSNY, T., J. HOLUŠA, P. ŠTĚPÁNEK, M. TURČÁNI a N. POLČÁK, 2011. Expected impacts of climate change on forests: Czech Republic as a case study. *Journal*

of Forest Science [online]. **57**(10), 422–431. ISSN 12124834, 1805935X. Dostupné z: doi:10.17221/103/2010-JFS

HLÁSNY, Tomáš a Zuzana SITKOVÁ, ed., 2010. Spruce forests decline in the Beskids: Hynutie smrekových porastov v Beskydoch. Zvolen: Národné lesnícke centrum. ISBN 978-80-8093-127-8

HOLUŠA J. a LIŠKA J. 2002: Hypotéza chřadnutí a odumírání smrkových porostů ve Slezsku (Česká republika). *Zprávy lesnického výzkumu*, 47 (1): 9–15.

HUANG, Jianbei, Almuth HAMMERBACHER, Alexander WEINHOLD, Michael REICHEL, Gerd GLEIXNER, Thomas BEHRENDT, Nicole M. VAN DAM, Anna SALA, Jonathan GERSHENZON, Susan TRUMBORE a Henrik HARTMANN, 2019. Eyes on the future – evidence for trade-offs between growth, storage and defense in Norway spruce. *New Phytologist* [online]. **222**(1), 144–158. ISSN 0028-646X, 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.15522

HUANG, Jianbei, Markus KAUTZ, Amy M. TROWBRIDGE, Almuth HAMMERBACHER, Kenneth F. RAFFA, Henry D. ADAMS, Devin W. GOODSMAN, Chonggang XU, Arjan J. H. MEDDENS, Dineshkumar KANDASAMY, Jonathan GERSHENZON, Rupert SEIDL a Henrik HARTMANN, 2020. Tree defence and bark beetles in a drying world: carbon partitioning, functioning and modelling. *New Phytologist* [online]. **225**(1), 26–36. ISSN 0028-646X, 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.16173

IPCC. (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In *Mitigation of climate change*, R.K. Pachauri and L.A. Meyer, eds (Geneva, Switzerland).

KEMSLEY, E.K., Li ZHUO, M.K. HAMMOURI a R.H. WILSON, 1992. Quantitative analysis of sugar solutions using infrared spectroscopy. *Food Chemistry* [online]. **44**(4), 299–304. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/0308-8146(92)90054-6

KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK, 2018. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 2. přepracované vydání*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-013-3.

KOZLOWSKI, Theodore Thomas, Stephen G. PALLARDY a Paul Jackson KRAMER, 1997. *Physiology of woody plants*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. ISBN 978-0-12-424160-2.

KREJZA, Jan, Emil CIENCIALA, Jan SVĚTLÍK, Michal BELLAN, Estelle NOYER, Petr HORÁČEK, Petr ŠTĚPÁNEK a Michal V. MAREK, 2021. Evidence of climate-induced stress of Norway spruce along elevation gradient preceding the current dieback in Central Europe. *Trees* [online]. **35**(1), 103–119. ISSN 0931-1890, 1432-2285. Dostupné z: doi:10.1007/s00468-020-02022-6

LARCHER, Walter, 1988. *Fyziologická ekologie rostlin*. Praha: Academia.

LICHTENTHALER, Hartmut K., 1998. The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **851**(1 STRESS OF LIF), 187–198. ISSN 0077-8923, 1749-6632. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x

Lýkožrout smrkový - biologie, prevence a metody boje / Václav Zumr, . - Vyd. 1. - Písek : Matice lesnická, 1998. - 131 s.: 23 fot., 9 tab., 25 obr.; 21 cm. - (Dobové spisky; č. 1)

MARTÍNEZ-VILALTA, Jordi, Anna SALA, Dolores ASENSIO, Lucía GALIANO, Günter HOCH, Sara PALACIO, Frida I. PIPER a Francisco LLORET, 2016. Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. *Ecological Monographs* [online]. **86**(4), 495–516. ISSN 0012-9615, 1557-7015. Dostupné z: doi:10.1002/ecm.1231

MCDOWELL, Nate, William T. POCKMAN, Craig D. ALLEN, David D. BRESHEARS, Neil COBB, Thomas KOLB, Jennifer PLAUT, John SPERRY, Adam WEST, David G. WILLIAMS a Enrico A. YEPEZ, 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* [online]. **178**(4), 719–739. ISSN 0028-646X, 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x

MCDOWELL, Nathan G., 2011. Mechanisms Linking Drought, Hydraulics, Carbon Metabolism, and Vegetation Mortality. *Plant Physiology* [online]. **155**(3), 1051–1059. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.110.170704

MCMURRY, John, 2000. *Organic chemistry*. 5th ed. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole. ISBN 978-0-534-37366-5.

MEYER, Veronika, 2010. *Practical high-performance liquid chromatography*. 5th ed. Chichester, U.K: Wiley. ISBN 978-0-470-68218-0.

MROZEK, Melissa F. a Michael J. WEAVER, 2002. Detection and Identification of Aqueous Saccharides by Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. **74**(16), 4069–4075. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac020115g

MUSIL, Ivan a Jan HAMERNÍK, 2007. Jehličnaté dřeviny: přehled nahosemenných i výtrusných dřevin : lesnická dendrologie 1. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1567-9

NETHERER, Sigrid, Dineshkumar KANDASAMY, Anna JIROSOVÁ, Blanka KALINOVÁ, Martin SCHEBECK a Fredrik SCHLYTER, 2021. Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. *Journal of Pest Science* [online]. **94**(3), 591–614. ISSN 1612-4758, 1612-4766. Dostupné z: doi:10.1007/s10340-021-01341-y

OBLADEN, Nora, Pia DECHERING, Georgios SKIADAREISIS, Willy TEGEL, Joachim KESSLER, Sebastian HÖLLERL, Sven KAPS, Martin HERTEL, Choimaa DULAMSUREN, Thomas SEIFERT, Mareike HIRSCH a Andrea SEIM, 2021. Tree mortality of European beech and Norway spruce induced by 2018-2019 hot droughts in central Germany. *Agricultural and Forest Meteorology* [online]. **307**, 108482. ISSN 01681923. Dostupné z: doi:10.1016/j.agrformet.2021.108482

OTTO, J., 1907. *Ottův slovník naučný: Illustrovaná encyklopaedie obecných vědomostí* [online]. B.m.: J. Otto. Ottův slovník naučný: Illustrovaná encyklopaedie obecných vědomostí, díl 26. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=OJgYAAAAIAAJ>

PAVLOVÁ, Libuše, 2005. Fyziologie rostlin. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0985-1.

PITERKOVÁ, J.; TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*. 2005, 99, č. 7, s. 455-466. ISSN 0009-2770.

PROCHÁZKA, Stanislav, 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2.

PEET, Robert K. a Norman L. CHRISTENSEN, 1987. Competition and Tree Death. *BioScience* [online]. **37**(8), 586–595. ISSN 00063568, 15253244. Dostupné z: doi:10.2307/1310669

PYSANENKO, Andriy, Ivo S. VINKLÁREK, Michal FÁRNÍK a Viktoriya POTERYA, 2021. Generation of (H₂O₂)_N clusters on argon and ice nanoparticles. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. **461**, 116514. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2020.116514

SIMEONE, Maria Lúcia F., Rafael A.C. PARRELLA, Robert E. SCHAFFERT, Cynthia M.B. DAMASCENO, Michelle C.B. LEAL a Celio PASQUINI, 2017. Near infrared spectroscopy determination of sucrose, glucose and fructose in sweet sorghum juice. *Microchemical Journal* [online]. **134**, 125–130. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2017.05.020

SKUHRAVÝ, Václav a Petr ZAHRADNIK, ed., 2002. *Lýkožrout smrkový (Ips typographus L.) a jeho kalamity: = Der Buchdrucker und seine Kalamitäten*. Praha: Agrospoj. ISBN 978-80-7084-238-6.

SOLBERG, S., 2004. Summer drought: a driver for crown condition and mortality of Norway spruce in Norway. *Forest Pathology* [online]. **34**(2), 93–104. ISSN 1437-4781, 1439-0329. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0329.2004.00351.x

STEJSKAL, Václav, Jonáš. HNÁTEK, Tomáš. VENDL, Jan VOKNĚR, Jakub KADLEC a Radek AULICKÝ, 2021. *Metodika ošetření napadeného dříví lýkožroutem smrkovým (Ips typographus) pomocí přípravku EDN®: metodika pro pracovníky v lesnictví a DDD*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ISBN 978-80-7427-349-0.

STŘÍBRSKÁ, Barbora, Jaromír HRADECKÝ, Jaroslav ČEPL, Ivana TOMÁŠKOVÁ, Rastislav JAKUŠ, Roman MODLINGER, Sigrid NETHERER a Anna JIROŠOVÁ, 2022. Forest margins provide favourable microclimatic niches to swarming bark beetles, but Norway spruce trees were not attacked by *Ips typographus* shortly after edge creation in a field experiment. *Forest Ecology and Management* [online]. **506**, 119950. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2021.119950

ŠPINLEROVÁ, Zuzana, 2014. Ekofyziologie dřevin. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-158-1.

ŠULC, Miloslav, Ivana TOMÁŠKOVÁ, Anna KREJZKOVÁ, Michal SAMEK, Alina DIUZHEVA, Jaromír HRADECKÝ a Vítězslava PEŠKOVÁ, 2021. Trehalose determination in Norway spruce (*Picea abies*) roots. Analytics matters. *MethodsX* [online]. **8**, 101280. ISSN 22150161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2021.101280

ŠUŤÁKOVÁ, Lenka, 2006. *Reakce na abiotický stres u rostlin s velkou diverzitou fotosyntetických produktů*. B.m. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.

TAIZ, Lincoln, Eduardo ZEIGER, I. M. MØLLER a Angus S. MURPHY, ed., 2015. *Plant physiology and development*. Sixth edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. ISBN 978-1-60535-255-8.

TOMASELLA, Martina, Elisa PETRUSSA, Francesco PETRUZZELLIS, Andrea NARDINI a Valentino CASOLO, 2019. The Possible Role of Non-Structural Carbohydrates in the Regulation of Tree Hydraulics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(1), 144. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010144

TOMÁŠKOVÁ, Ivana a Jiří KUBÁSEK, 2016. Fyziologie lesních dřevin I.: fyziologie, produkce a stresy rostlin. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin. ISBN 978-80-213-2608-8.

TRANQUILLINI, Walter, 1979. *Physiological Ecology of the Alpine Timberline: Tree Existence at High Altitudes with Special Reference to the European Alps* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Ecological Studies [vid. 2024-03-12]. ISBN 978-3-642-67109-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-67107-4

TURČÁNI, M. a O. NAKLÁDAL, 2007. The results of manipulated experiments with inoculation of *Ips typographus* (L., 1758) to spruce trees under various levels of water stress. *Journal of Forest Science* [online]. **53**(Special Issue), 25–30. ISSN 12124834, 1805935X. Dostupné z: doi:10.17221/2159-JFS

ÚRADNÍČEK, Luboš, 2003. *Lesnická dendrologie I.: (Gymnospermae)*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-80-7157-643-3.

ZÜST, Tobias a Anurag A. AGRAWAL, 2017. Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annual Review of Plant Biology* [online]. **68**(1), 513–534. ISSN 1543-5008, 1545-2123. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-arplant-042916-040856

Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky: Report on the state of forests and forestry in the Czech Republic : stav, [2023]-. Praha: Ministerstvo zemědělství v nakladatelství Lesnická práce. ISBN 978-80-7434-703-0.