

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

Vliv stresu suchem na složení lýka smrku ztepilého –
profilování pomocí plynové chromatografie spojené
s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Diplomová práce

Bc. Zuzana Šemberová

Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.

2023

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Zuzana Šemberová

Lesní inženýrství

Název práce

Vliv stresu suchem na složení lýka smrku ztepilého – profilování pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Název anglicky

Influence of drought stress on Norway spruce phloem composition – volatiles profiling using gas chromatography-mass spectrometry

Cíle práce

Cílem diplomové práce je vyhodnotit zastoupení těkavých látek obsažených ve floému smrku ztepilého (*Picea abies*, L.) pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostně spektrometrickou detekcí s průletovým hmotnostním analyzátořem (GC-TOF-MS). Provedeno bude porovnání zjištěných profilů těkavých látek i porovnání obsahu nejvíce zastoupených sloučenin v souvislosti s mírou stresu, kterému pokusné stromy byly vystaveny.

Metodika

Ze stromů rostoucích pod střechou a ze stromů rostoucích mimo zastřešenou oblast budou vzorkovány výseky kůry s lýkem. Po homogenizaci budou extrahovány n-hexanem. Pro měření bude použita klasická – jednorozměrná, i dvourozměrná plynová chromatografie.

Naměřená data budou zpracována jednak jako výsledky kvantitativní analýzy, kde pro určité cílové látky bude vypočten jejich obsah v lýku a jednak jako profilovací data, kde všechny sloučeniny obsažené ve vzorcích vytvoří matici pro další zpracování. Po normalizaci a transformaci této matice dat budou použity vhodné chemometrické postupy multivariační statistické analýzy (PCA, OPLS-DA), aby byly zjištěny případné rozdíly mezi skupinami vzorků a byly identifikovány sloučeniny, nejvíce zodpovědné za tyto rozdíly.

Doporučený rozsah práce

40-60 stran

Klíčová slova

smrk ztepilý, GC-MS, metabolomika, profilování látek, multivariační analýza

Doporučené zdroje informací

- Adamová T, Hradecký J, Pánek M. Volatile Organic Compounds (VOCs) from Wood and Wood-Based Panels: Methods for Evaluation, Potential Health Risks, and Mitigation. *Polymers*. 2020; 12(10):2289.
- Krokene, P. (2015). Conifer defense and resistance to bark beetles. In *Bark Beetles* (pp. 177-207). Academic Press.
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., & Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant physiology*, 129(3), 1003-1018.
- Schiebe, C., Hammerbacher, A., Birgersson, G., Witzell, J., Brodelius, P. E., Gershenzon, J., ... & Schlyter, F. (2012). Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia*, 170(1), 183-198
- Sigrid Netherer, Dineshkumar Kandasamy, Anna Jirosová, Blanka Kalinová, Martin Schebeck & Fredrik Schlyter , Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought
- Tranchida, P. Q., Franchina, F. A., Dugo, P., & Mondello, L. (2016). Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: recent evolution and current trends. *Mass spectrometry reviews*, 35(4), 524-534.
- Zhao, T., Krokene, P., Hu, J., Christiansen, E., Björklund, N., Långström, B., ... & Borg-Karlson, A. K. (2011). Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner. *PLoS One*, 6(10), e26649.
- Zulak, K. G., Lippert, D. N., Kuzyk, M. A., Domanski, D., Chou, T., Borchers, C. H., & Bohlmann, J. (2009). Targeted proteomics using selected reaction monitoring reveals the induction of specific terpene syntheses in a multi-level study of methyl jasmonate-treated Norway spruce (*Picea abies*). *The Plant Journal*, 60(6), 1015-1030.
-

Předběžný termín obhajoby

2022/23 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Elektronicky schváleno dne 24. 3. 2023

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 28. 3. 2023

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 28. 03. 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "**Vliv stresu suchem na složení lýka smrku ztepilého – profilování pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostně spektrometrickou detekcí**" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5.4. 2023

Bc. Zuzana Šemberová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucímu práce Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za jeho vstřícnost, čas a trpělivost, kterou mi během psaní diplomové práce věnoval. Také děkuji své rodině, která mě při vytváření této práce podpořila.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá analýzou volatilních organických látek smrku ztepilého (*Picea abies*, L.) ve stresových podmínkách způsobených absencí srážek. Dále popisuje smrk ztepilý, jeho úlohu v lesnictví a jeho současnou situaci v souvislosti se změnou klimatu. Práce charakterizuje těkavé látky, zkoumá disturbance a stres stromů a uvádí potenciální mechanismy obrany proti působení abiotických a biotických stresorů.

Cílem práce bylo posoudit, jaké je zastoupení těkavých chemických látek ve floému smrku ztepilého s využitím plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí pomocí průtokového hmotnostního analyzátoru. (GC-TOF-MS).

Odběr vzorků proběhl ve dvou dnech v červenci roku 2023, na studijních plochách Fakulty lesnické a dřevařské u Kostelce nad Černými lesy. Celkem se jednalo o pět ploch, z nichž každá byla rozdělena na čtyři sekce. V jedné z nich byly smrky umístěny pod střechou. Po provedení odběru vzorků ze studovaných stromů byla provedena homogenizace jejich lýka v laboratoři za účelem získání čistého extraktu. Získané profily těkavých látek byly statisticky vyhodnoceny pomocí PCA a OPLS-DA, přičemž u některých složek byla porovnána koncentrace mezi zastřešenými a kontrolními stromy.

Zjištěné profily obsažených těkavých chemických látek a obsah nejčastěji se vyskytujících sloučenin byly porovnány v závislosti na stresu suchem, kterému byly stromy vystaveny. Mezi zastřešenými a kontrolními stromy se neprokázal žádný podstatný rozdíl v koncentracích těkavých chemických látek. Pro rozdělení mezi plochami byly nejvýznamnějšími látkami methyldehydroabietát, limonen, verticilol a terpineol acetát.

Klíčová slova: smrk ztepilý, GC-MS, metabolomika, profilování látek, multivariační analýza

Abstract

This thesis focuses on the analysis of volatile organic compounds of Norway spruce (*Picea abies*, L.) under stress conditions caused by the absence of precipitation. It also describes the Norway spruce, its role in forestry and its current situation in the context of climate change. The paper characterises volatiles, examines disturbance and tree stress and presents potential defence mechanisms against abiotic and biotic stressors.

The aim of the work was to assess the abundance of volatile chemicals in the phloem of Norway spruce using gas chromatography combined with mass spectrometric detection using a flow-through mass analyzer (GC-TOF-MS).

Sampling was carried out on two days in July 2022, on the study areas of the Faculty of Forestry and Wood Technology near Kostelce nad Černými lesy. In total, there were five plots, each divided into four sections. In one of them, spruces were placed under the roof. After sampling of the trees under study, their bark was homogenized in the laboratory to obtain a pure extract. The volatile profiles obtained were statistically evaluated by PCA and OPLS-DA, and for some components, the concentrations were compared between the roofed and control trees.

The observed volatile chemical profiles and the content of the most abundant compounds were compared as a function of the drought stress to which the trees were exposed. There was no significant difference in volatile chemical concentrations between the canopied and control trees. For the distribution between plots, the most significant compounds were methyldehydroabiethate, limonene, verticillol and terpineol acetate.

Keywords: Norway spruce, GC-MS, metabolomics, substance profiling, multivariate analysis

Obsah

1	Úvod	11
2	Cíl práce.....	12
3	Literární řešerše	13
3.1	Smrk ztepilý	13
3.1.1	Zařazení a charakteristika.....	13
3.2	Smrk a disturbance	15
3.2.1	Klimatická změna a sucho.....	17
3.3	Metabolomika.....	20
3.4	Primární a sekundární metabolity	21
3.4.1	Terpeny.....	23
3.4.2	Fenoly.....	25
3.4.3	Alkaloidy	26
3.5	Volatilní organické látky a jejich funkce.....	27
3.6	Analýza přírodních látek	29
3.6.1	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	30
4	Metodika	32
4.1	Odběr vzorků	32
4.2	Laboratorní zpracování	32
4.2.1	Pomůcky	32
4.2.2	Postup	32
4.3	Analýza pomocí plynové chromatografie	33
4.4	Zpracování dat	34
5	Výsledky.....	35
6	Diskuze.....	42
7	Závěr	44
8	Literatura.....	45

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Vlevo: Mapa rozšíření populace smrku, zelená je původní oblast druhu a oranžová je oblast, kde byl druh zavlečen a skutečně naturalizován (syntetizován) (Caudullo et al., 2016). Vpravo: Současná vhodnost stanoviště pro <i>P. abies</i> s použitím období 1990-2020 jako referenčního období (Mauri et al. 2022).	15
Obrázek č. 2: Koncepční schéma interakcí mezi <i>Picea abies</i> , <i>Ips typographus</i> a symbiotickými ofiostomatoidními houbami v podmínkách sucha (adaptováno z Netherer et al.,2021)	17
Obrázek č. 3: Uhlíkový skelet isopentanu	23
Obrázek č. 4: Hydroxylová funkční skupina	25
Obrázek č. 5: Struktura alkaloidu – nikotin.....	26
Obrázek č.6: Syntéza sekundárních metabolitů z primárního metabolismu a následný vznik terpenů, fenolických látek a dusíkatých látek (Taiz a Zeiger, 2003).	27
Obrázek č. 7: Zobrazení plynové chromatografie.....	35
Obrázek č. 8: Graf odezvy kvantifikační hmoty látky/ odezva kvantifikační hmoty ISTD (Chybové úsečky jsou $\pm 1xSD$	36
Obrázek č. 9: Graf vybraných sloučení po aplikaci rovnice externí kalibrační křivky (Chybové úsečky jsou $\pm 1xSD$)	36
Obrázek č. 10: PCA graf komponentního skóre, modře – kontrolní vzorky, zeleně vzorky ze zastřešených stromů, červeně označeny vzorky odlehlé, které se v dalším grafu analýzy již nepoužily	37
Obrázek č. 11 : PCA graf komponentního skóre, modře – kontrolní vzorky, zeleně vzorky ze zastřešených strom	37
Obrázek č. 12: PCA graf komponentního skóre, barvy rozdělené podle ploch sběru (1-zelená; 2-modrá; 5-červená; 7-žlutá; 8-světle modrá)	38
Obrázek č. 13: OPLS-DA graf komponentního skóre (modře – kontrolní vzorky, zeleně - vzorky ze zastřešených stromů)	38
Obrázek č. 14: Graf vlivů umělé proměnné a jedné reálně změřené proměnné – terpineol acetátu.	39
Obrázek č. 15: PCA graf komponentního skóre podle ploch sběru (1- zelená; 2- modrá; 5-červená; 7-žlutá; 8-světle modrá).....	39
Obrázek č.16: Variable importance plot-zastoupení methyldehydroabitátu, limonenu a terpinol acetátu v jednotlivých plochách.....	40
Obrázek č.17: OPLS-DA grafu komponentního skóre dvou ploch (2 – modrá; 5 – červená)	41
Obrázek č.18: OPLS-DA grafu komponentního skóre dvou ploch (7 – žlutá; 8 – světle modrá).....	41

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Rozdělení terpenů	23
Tabulka č. 2: Nastavení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru	33

Seznam použitých zkratk

GC – plynová chromatografie

MS – hmotnostní spektrometr

TOF – průletový detektor

VOC – volatilní organické látky

RI – retenční index

NIST – Národní institut standardů a technologie

PCA – analýza hlavních komponent

OPLS-DA – ortogonální diskriminační analýza částečně nejmenších čtverců

1 Úvod

V posledních desetiletích bylo prokázáno, že klimatické změny mají významný vliv na zdraví a růst rostlin, zejména v extrémních podmínkách, jako je suché období. Stres ze sucha je jedním z nejzávažnějších faktorů ovlivňujících fyziologické procesy rostlin, včetně akumulace a transportu primárních a sekundárních metabolitů. V důsledku toho mohou být změny v podmínkách růstu rostlin patrné v složení jejich tkání.

Cílem této diplomové práce je analyzovat vliv tohoto stresu na složení lýka smrku ztepilého (*Picea abies*), což je jedna z nejdůležitějších hospodářských dřevin v Evropě. V rámci této práce bude použita plynová chromatografie spojená s hmotnostně spektrometrickou detekcí a průletovým hmotnostním analyzátozem v módu kompletní dvourozměrné chromatografie (GCxGC-TOF-MS), která umožní identifikaci a kvantifikaci různých chemických sloučenin přítomných v extraktech lýka. Konkrétně budou v necíleném režimu sledovány nepolární metabolity (alkoholy, aldehydy, těkavé organické kyseliny, terpeny a jejich deriváty).

Výsledky této práce mohou přispět k lepšímu porozumění mechanismů, které ovlivňují složení dřeva smrku ztepilého při stresu ze suchého období. Tyto poznatky mohou mít důležité důsledky pro zlepšení zemědělských postupů, například v oblasti lesnictví a dřevařského průmyslu, a mohou pomoci při navrhování opatření na zmírnění dopadů klimatických změn na lesy a celkovou krajinu.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je posoudit zastoupení těkavých chemických látek ve floému smrku ztepilého (*Picea abies*, L.) s využitím plynové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí pomocí průtokového hmotnostního analyzátoru. (GC-TOF-MS). Zjištěné profily těkavých chemických látek budou porovnány, stejně jako obsah nejčastěji se vyskytujících sloučenin v závislosti na míře stresu, kterému byly experimentální stromy vystaveny.

3 Literární rešerše

3.1 Smrk ztepilý

Pro lesnictví ve střední Evropě je smrk uváděn jako jedna z nejvýznamnějších produkčních dřevin, která představuje důležitou podporu dřevařského průmyslu, a to nejen pro své příznivé vlastnosti při zpracování a pěstování. Lesnický zájem o tento druh stromu je dán několika faktory: rovným a souvislým kmenem bez silných větví a uzlů, rychlým růstem a relativně nízkými nároky na pěstování. Dřevní surovina je navíc snadno zpracovatelná, kvalitní a všestranná (Novotný et al., 2020). Majitelé lesů proto upřednostňují tento druh, a proto můžeme smrk najít i mimo jeho přirozený areál ((Mansfeld, 2011), zejména v nížinných oblastech, na úkor původních listnatých druhů (Klím et al., 2000). Dominance smrkových lesů je vedle výše uvedeného také výsledkem protipatření k řešení vážného nedostatku dřeva způsobeného ničením přirozených lesů a degradací půdy v důsledku rozvoje pastvy a exploatací (Spiecker, 2003).

Takovýto nepřirozený a extrémně široký ekologický rozsah zvyšuje dopad změny klimatu na tyto rozšířené smrkové plantáže (Altman et al., 2017). Kromě toho středoevropské lesy čelily dalšímu antropogennímu tlaku v důsledku vysoké acidifikace atmosféry, především od 70. do počátku 90. let 20. století z důvodu intenzivní průmyslové produkce (Kopáček et al., 2016). To přímo vedlo ke snížení růstu, změnám v dynamice růstu, poškození asimilačních orgánů a odumírání lesů, zejména v horských oblastech v 70. a 80. letech 20. století (Kolář et al., 2015). Narušené a oslabené stromy jsou náchylné k napadení hnilobnými houbami, jako je *Heterobasidion annosum* a *Armillaria* nebo kůrovci rodu *Ips* (Caudullo et al., 2016).

Podle Zprávy o stavu lesů z roku 2021 současná skladba lesů skládá ze smrkových porostů z 48,1 %. Celková plocha jehličnatých porostů se, ale nadále snižuje. Naproti tomu se pozvolna zvyšuje podíl listnatých dřevin. V roce 2021 ustupuje smrk o 0,5 %, a stále více se objevuje buk, dub, popřípadě i javor. Možné je i přispění vlivu disturbancí v ČR (Zpráva o stavu lesů, 2021).

3.1.1 Zařazení a charakteristika

Smrk ztepilý (*Picea abies* L.)

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Pinophyta* (pinofyty)

třída: *Pinopsida* (jehličnany)

řád: *Pinales* (borovicotvaré)

čeleď: *Pinaceae* (borovicovité)

Koruna je celkově kuželovitá, sloupovitá, vroubkovaná, s krátkými, tlustými větvemi, horní vrstva stoupá a spodní klesá. Pupeny jsou červenohnědé, 5 mm dlouhé, s ostrými špičkami. Jehlice jsou 1-2,5 cm dlouhé, na průřezu čtyřhranné, tvrdé, světle až tmavě zelené, s jemnými bílými znaky. Druh je jednodomý, jednopohlavní květy se

obvykle objevují ve věku 20-30 let, v hustých porostech však až ve 40 letech (Skrøppa et al., 1997).

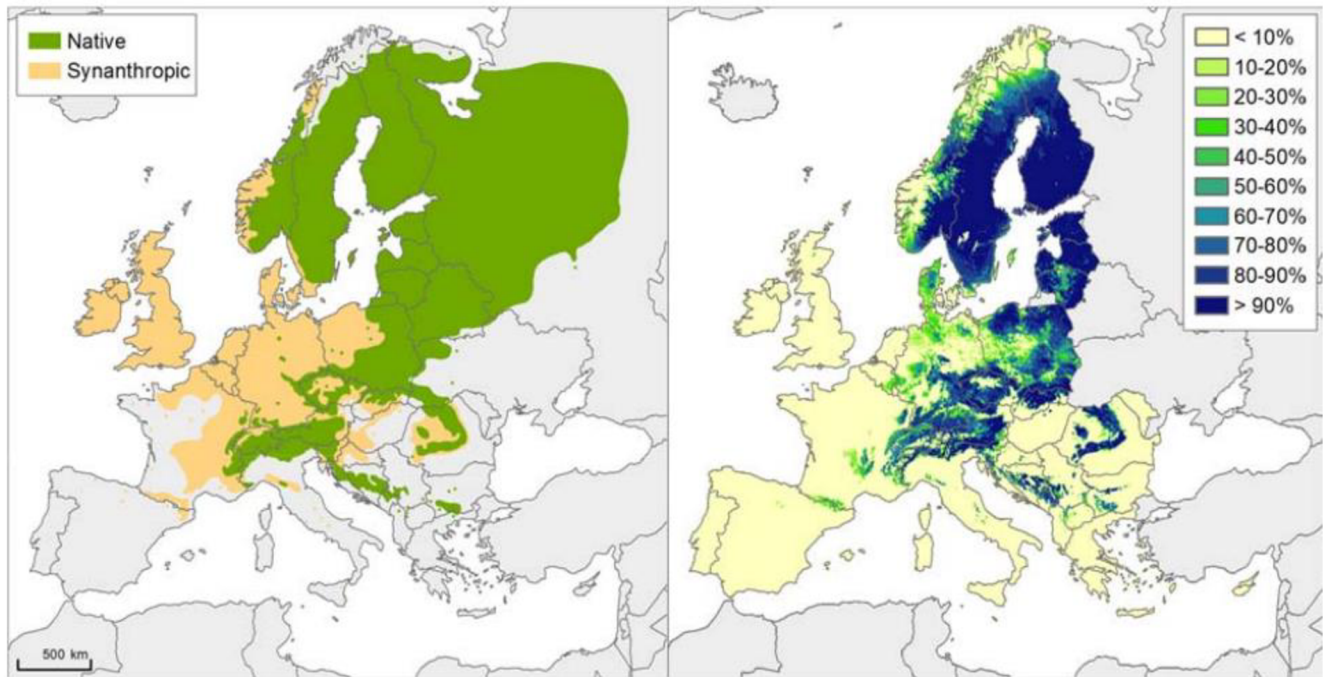
Smrk je velmi plastická dřevina s charakteristickými ekologickými nároky. Rozlehlý areál smrku je určen především jeho vztahem k teplotě. Dobře snáší nízké teploty, zimní mrazy ho málokdy poškozují, trpí pouze v mrazových kotlinách. Je však velmi citlivý na vysoké teploty, zejména v období sucha. Vyšší teploty podporují růst pouze v případě, že je k dispozici dostatek vody. V chladnějším podnebí jim vyhovuje méně srážek. Smrk můžeme dále zařadit do polostinných dřevin, tedy stín tolerující (Jakuš et al., 2015).

Smrk potřebuje pro své životní procesy mírný pohyb vzduchu, obvykle stačí jen závan ($0,5 - 1,5 \text{ ms}^{-1}$). Tvar terénu má zásadní vliv na zranitelnost smrkových lesů větrem, stejně jako charakter půdy a hladina podzemní vody. Smrk je nenáročný na minerální složení půdy. Je však velmi citlivý na nedostatek kyslíku v půdě a vyžaduje půdy především kyselé s hodnotou pH 4–5 (Jakuš et al., 2015). Smrk má výraznou schopnost okyselovat půdu (Augusto et al., 2002). Ve správném klimatu může růst i na velmi chudých půdách, nicméně jeho převážně mělce uspořádané kořenové soustavě vyhovují půdy s dostatečnou a rovnoměrnou vlhkostí (Jakuš et al., 2015). Symbiotický vztah mezi kořenovými a mykorrhizními houbami je důležitý pro smrkové lesní ekosystémy, zejména za suboptimálních růstových podmínek, jako je sucho a okrajová stanoviště (Caudullo et al., 2016).

Smrk je dřevina proměnlivá a velmi plastická, proto u něj nejsou silně vyhraněné klimaty. Důkazem pro jeho proměnlivost je množství prostorově diferencovaných a stanovištně adaptovaných ekotypů, které se vyskytují v areálu rozšíření smrku (Jakuš et al., 2015). V boreálních lesích roste s břízou (*Betula spp.*), s osikou (*Populus remola*) a s vrbou (*Salix spp.*) podél břehů potoků a jezer. V Alpách, kde není jasný porost, se ve vyšších polohách (asi 1800-2100 m) vyskytuje v modřinu evropském (*Larix decidua*) a borovici švýcarské (*Pinus cembra*), v buku lesním (*Fagus sylvatica*) a jedle bělokoré. (*Abies alba*) v čerstvých podmínkách v mírných nadmořských výškách (800-1800 m) a v sušších podmínkách s borovici lesní (*Pinus sylvestris*) (Caudullo et al., 2016).

Smrk ztepilý je dominantním druhem v boreálních a subalpínských jehličnatých lesích, od střední (horské) přes severní a východní Evropu až po pohoří Ural, kde se mísí se sibiřským smrkem (*Picea obovata*), který občas je považován za poddruh *Picea* (Filer et Farjon, 2013). Výškový rozsah se pohybuje od hladiny moře v severní Evropě do 2400 metrů nad mořem v Alpách, kde roste především v zakrslých formách. Nyní je přirozeně

naturalizovaný v mnoha evropských regionech mimo svůj původní areál, včetně Británie a Pyenejí (Ellenberg, 1988).



Obrázek č. 1: Vlevo: Mapa rozšíření populace smrku, zelená je původní oblast druhu a oranžová je oblast, kde byl druh zavlečen a skutečně naturalizován (syntetizován) (Caudullo et al., 2016). Vpravo: Současná vhodnost stanoviště pro *P. abies* s použitím období 1990-2020 jako referenčního období (Mauri et al. 2022).

3.2 Smrk a disturbance

Disturbance můžeme rozdělit na abiotické a biotické. Z abiotických vlivů, které sužují smrk ztepilý v posledních letech v České republice jedná o větrné polomy a přetrvávající působení sucha. Ovšem nejvyšší počet poškození je způsobeno přemnoženým podkorním hmyzem (Zpráva o stavu lesů, 2021). Objem nahodilých těžeb přepočtený na celorepublikové měřítko dosáhl v roce 2021 přibližné hodnoty 26,3 mil. m³. Když jsou stromy zdravé a vitální, jejich indukovaná obrana obvykle sama přispívá k regulaci kůrovce populace na nízkých, endemických úrovních. Nicméně různé další rušivé faktory mohou stromy stresovat a zvyšovat jejich náchylnost k poškození (Krokene, 2015). Podle Krokeneho (2015) jsou kůrovci, kteří napadají stromy, hlavní příčinou mortality mnoha druhů jehličnanů a ničí více stromů než jakýkoli jiný přírodní faktor.

Existující výzkumy naznačují jasný vztah mezi transformací korun smrku (vyjádřenou celkovou defoliací, defoliací primární struktury a počtem sekundárních výhonů), tj. jeho reakcí na synergické působení stresových faktorů, a jeho reakcí na napadení kůrovcem a mortalitou (Jakuš et al, 2015).

Přírodní disturbance, jako jsou požáry, výskyty hmyzu a větrné poruchy, jsou nedílnou součástí dynamiky lesních ekosystémů po celém světě. Vyskytují se jako

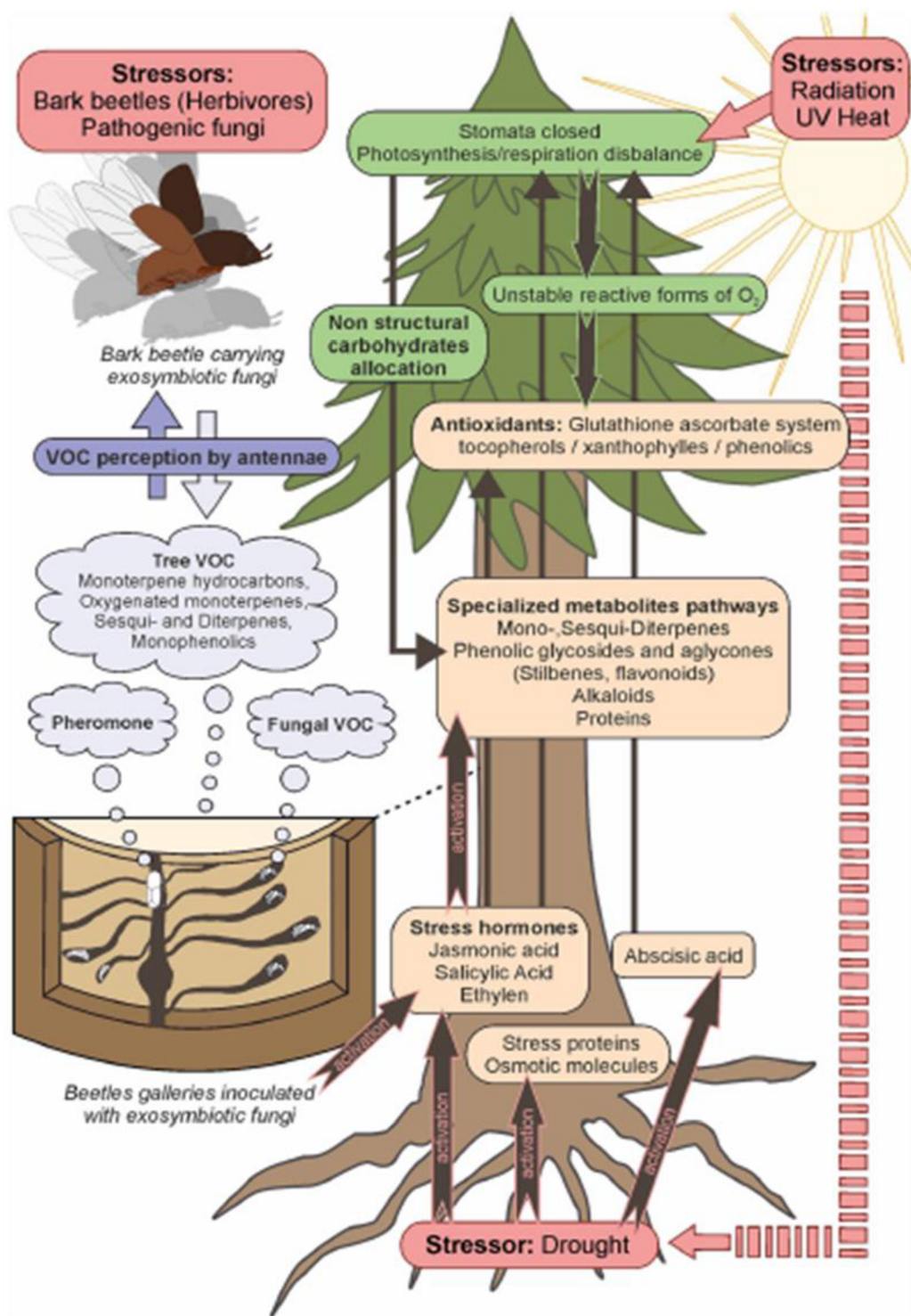
relativně diskrétní události a tvoří charakteristické vzorce typické frekvence, velikosti a závažnosti narušení v rozšířených prostorových a časových měřících. Disturbance narušují strukturu, složení a funkci ekosystému, a tak mění dostupnost zdrojů (Pickett et White, 1985). Tím vytvářejí heterogenitu krajiny, podporují širokou rozmanitost druhů, a iniciují obnovu nebo reorganizaci ekosystémů (Thom et Seidl, 2016; Thom et al., 2017).

V posledních letech prošly disturbance mnoha lesních ekosystémů zásadními změnami a jako hlavní zdroj změn je uváděno změna klimatu (Seidl et al., 2017). Tyto změny disturbančních režimů mají potenciál silně ovlivnit schopnost lesů poskytovat ekosystémové služby společnosti (Thom et Seidl, 2016). Kromě toho může klimaticky podmíněné zvýšení narušování překonat ekologickou odolnost lesů, což vede k trvalým změnám ekosystémů nebo přesunům do nelesních ekosystémů, když je překročen bod zlomu (Johnstone et al., 2016).

Naše znalosti dynamiky disturbancí v reakci na změnu klimatu jsou však stále nedostatečné, zejména pokud jde o velkoplošné vzorce, interakční efekty a tlumící zpětné vazby. Teplejší a sušší podmínky podporují požáry, sucho a hmyzí disturbance, zatímco teplejší a vlhčí podmínky podporují větrné a patogenní disturbance. Vztahy mezi jednotlivými složkami pravděpodobně posílí disturbance, ačkoli nepřímé vlivy klimatu, jako jsou změny vegetace, mohou dlouhodobou citlivost disturbancí na klima snížit. Nadcházející disturbance se pravděpodobně nejvíce projeví v jehličnatých lesích a boreálním biomu (Seidl et al., 2017)

V Eurasii je smrk těžce poškozován lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus* L.). Kůrovci napadají jehličnany a způsobují tak značné ekonomické ztráty, mění koncentraci CO² a v konečném důsledku z důvodu nucených těžeb a následného zalesňování i celkovou krajinu (Kurz et al., 2008). Velké plochy smrkového porostu mohou být zničeny populacemi *I. typographus* kolonizujícími pokácené nebo vážně poškozené hostitelské stromy, k čemuž často dochází během vichřic nebo vleklých období sucha (Långström et al., 2003). Rychle generovaný agregační feromon 3-methyl-2-butenol (Birgersson et al., 1984), může přilákat desítky tisíc brouků na jeden strom během několika hodin nebo dnů, a způsobit překonání obranyschopnosti stromu vůči kůrovci. Tento proces pokračuje, dokud se nevyčerpá zásoba rozptylujících se brouků v dosahu feromonového oblaku nebo dokud nevhodné letové podmínky nezabrání připojení dalších brouků (Birgersson et al., 1984).

Napadené stromy jsou často vidět ve skupinách podél hranic lesů vystavených slunci a na jiných místech vystavených suchu nebo jiným stresorům (Wermelinger, 2004). I v těchto ohniscích výskytu poškození se však mohou vyskytovat přeživší jedinci, což znamená, že některé stromy jsou přirozeně imunní vůči napadení (Wallin et Raffa, 2004). Přetrvává otázka, zda existují predispozice, např. z hlediska složení metabolitů, které by byly zodpovědné za jejich přežití, nebo se jedná o náhodný rozptyl.



Obrázek č. 2: Koncepční schéma interakcí mezi *Picea abies*, *Ips typographus* a symbiotickými ofiostomatoidními houbami v podmínkách sucha (adaptováno z Netherer et al., 2021)

3.2.1 Klimatická změna a sucho

Zvyšující se emise skleníkových plynů jsou nyní vědeckou komunitou do značné míry považovány za hlavní zdroj nedávného zvýšení průměrné globální teploty (přibližně

o 0,5 °C od roku 1970) a změn v globálním hydrologickém cyklu (IPCC, 2007), včetně rozšíření tropického pásu Země (Seidel et al., 2007).

I podle konzervativních scénářů budou budoucí změny klimatu pravděpodobně zahrnovat další zvýšení průměrné teploty (celosvětově asi o 2-4 °C za následujících n let), výrazné vysušování v některých regionech a zvýšení četnosti a závažnosti extrémních such, extrémních veder a vln veder (Christensen et al., 2007; Seager et al., 2007). V důsledku suchých a teplých podmínek v 90. letech 20. století se úhyn lesů v Evropě obloukovitě rozšířil do středomořských oblastí a v roce 2000 bylo ve středomořských lokalitách pozorováno rostoucí odumírání řady druhů dřevin. Jiní se domnívají, že současné ukazatele úmrtnosti lesů jsou nedostatečné pro určení, zda dochází ke globálním tendencím, a to z důvodu neexistence spolehlivého a konzistentního celosvětového monitorovacího systému (Allen et al., 2010).

Klimatické faktory kategorizujeme jako důležité faktory určující druhovou skladbu lesních ekosystémů a dále ekofyziologické a produkční procesy přímo související s celkovou funkcí a stabilitou porostu. Případné globální změny v atmosféře (klimatické změny, změny chemismu ovzduší) mohou vést k určitým změnám v lesních ekosystémech. Vždy je třeba brát v úvahu časové aspekty těchto změn a jejich velikost a variabilitu. Dlouhodobá přírodní variabilita má podstatný vliv na druhové složení lesních ekosystémů, přičemž současný zdravotní stav, fyziologie a produkční procesy reagují na krátkodobé změny (Jakuš et al., 2015).

Záleží především na intenzitě sucha, ale také závisí na druhu dřeviny nebo konkrétních funkčních vlastnostech (Greenwood et al., 2017). Smrk je jedním z nejcitlivějších druhů dřevin v Evropě kvůli svému mělkému kořenovému systému a náročnosti na vodu (Maaten-Theunissen et al., 2013). Stres suchem začíná, když výdej vody dlouhodoběji převyšuje příjem, tedy je negativní vodní bilance. Vodní deficit závisí na relativním poměru absorpce a transpirace, a nejen od samotné absorpce. Stanovištní podmínky také výrazně ovlivňují vodní bilanci typem podloží, půdním typem a odtokovými poměry stanoviště. Pokles obsahu vody v půdě je vyvoláván mj. zvýšením teplot, což vede k výrazným změnám vztahu mezi klimatickými parametry a šířkou letokruhů. Dostupnost vody byla a je hlavním faktorem zesilujícím úbytek lesů (Čermák et al., 2019).

Existují dále důkazy o metabolických vazbách mezi biogenními emisemi VOC a fotosyntetickou aktivitou (Sharkey et al., 1991). Tato práce se ale zabývala listnatými dřevinami, nikoliv jehličnany. Emise VOC nemusí být vždy lineárně spojeny s rychlostí asimilace CO² a ve skutečnosti bylo často pozorováno, že emise isoprenoidů se výrazně zvyšují v reakci na zvýšení teploty současně s měřitelným poklesem rychlosti fotosyntézy (Funk et al., 2004). Podle Beck (2005), může fotorespirace pomáhat udržovat emise VOC v podmínkách, kdy je maximální účinnost fotosyntézy omezena, jako jsou vysoké teploty. Avšak tato práce se zabývala pouze červcovými vzorky, a proto by musela být studie dlouhodobější, aby se tyto hypotézy potvrdily nebo vyvrátily vzhledem ke studovaným porostům.

Dle Koláře et al., (2020) smrk reagoval negativně na nedávné teplejší a sušší klima. Odráželo se to v růstových trendech i ve vizuálním hodnocení jedinců. Zatímco jedle (*Abies alba* Mill.) a buk (*Fagus sylvatica* L.) s největší pravděpodobností těžily z výrazného zvýšení teplot, smrk vykázal pokles růstu. Přestože růstové trendy u všech druhů od roku 2000 výrazně poklesly, což naznačuje, že častější klimatické extrémy omezují radiální růst všech druhů, zdá se, že smrk je za těchto podmínek nejzranitelnější, a to i ve smíšeném porostu (Jakuš et al., 2015). Proto se dá předpokládat scénáře změny klimatu, včetně opakujících se extrémů teplot, budou pro smrk vážným problémem (Kolář et al., 2020). Nejvýraznější negativní roli hraje sucho v nižších polohách, naopak pozitivní vliv vyšších teplot byl zjištěn ve vyšších polohách. Jako rozhodující prvky ovlivňující vazbu mezi růstem stromů a klimatem byly zjištěny zvýšená úroveň kyselé depozice a regionální charakteristiky. Vazbu mezi klimatem a růstem výrazně ovlivňovalo také stáří stromů, jejich velikost a půdní vlastnosti (Altman et al., 2017).

Za očekávaných klimatických změn, předpokládaných nedostatků srážek, zejména ve vegetačním období a zvýšených teplot, je smrk zvláště ohroženou lesní dřevinou, a to nejen v oblastech mimo svůj přirozený areál, ale i lokálně, kde se přirozeně vyskytuje. Předpokládá se, že ztráty způsobené suchem se v mnoha částech světa výrazně zvýší (Jakuš et al., 2015). Změna klimatu má za následek zvýšenou frekvenci a závažnost horkých a suchých období, měnící rozložení stromů a jejich náchylnost k různým abiotickým a biotickým stresorům (Allen et al., 2010; Jactel et al., 2012). Pochopení dopadu změny klimatu na obrannou chemii smrku ztepilého, populační dynamiku *I. typographus* a interakce s ostatními organismy, jako jsou například ophiostomatoidní houby poskytují základ pro spolehlivé předpovědi budoucích ohnisek (Kirisits, 2004); Kandasamy et al., 2019).

Přítomnost hmyzu a patogenů (primární vs. sekundární patogeny), napadená složka stromu a závažnost vodního stresu jsou jednoznačnými indikátory budoucího biotického poškození stromů vystavených vodnímu stresu. V důsledku toho Jactel et al., (2012) doporučuje kombinovat tyto tři parametry k odhadu potenciálního rizika poškození stromů v reakci na delší nebo častější sucha, která budou podle prognóz doprovázet změnu klimatu. Další zjištění ukazují, že intenzita vodního stresu by měla být posuzována ve vztahu k vnitřní odolnosti konkrétního druhu dřeviny vůči suchu, kterou lze hodnotit pomocí xylémového tlaku způsobujícího 50% snížení hydraulické vodivosti (P50) (Jactel et al., 2012).

Bylo zaznamenáno vyšší množství útoků u stromů, s nízkým vodním stresem a vysokým množstvím pryskyřice, přičemž množství účinných útoků stoupalo s vodním stresem stromů. I přes možné spouštěcí účinky nedostatku srážek stále chybí hmatatelný důkaz spojující fyziologický stres stromů vyvolaný suchem a jejich náchylnost k napadení kůrovcem (Netherer et al., 2015).

Existuje mnoho nejistot ohledně dopadu vodního stresu na produkci chemických obranných látek rostlin, ale existují silné důkazy, že produkce obranných látek na bázi uhlíku i dusíku je během dlouhotrvajícího velkého sucha snížena. Zejména stres ze sucha ovlivňuje vstup uhlíku do růstu rostlin a udržování život udržujících mechanismů, jako je dýchání a obrana (McDowell et al., 2008). Stresory, jako je teplo a sucho, aktivují stresové hormony syntetizující stresové proteiny, což způsobuje uzavření průduchů aktivací kyseliny abscisové. Uzavření průduchů a snížená fotosyntetická aktivita spouští řadu metabolických událostí ve stromu, které zahrnují cesty pro výrobu antioxidantů a specializovaných metabolitů z nestrukturálních sacharidů (Netherer et al., 2021). Snížená fotosyntetická aktivita v důsledku uzavření stomatu snižuje dostupnost uhlíku pro primární a sekundární metabolismus. Studie a experimenty s rostlinami kulturních plodin, stejně jako výzkumy toho, jak úroveň vodního deficitu ovlivňuje intenzitu sucha, pomohou pochopit chemii rostlin s nedostatkem vody. Vztah mezi změnami ve fyziologii rostlin a změnami v aktivitě hmyzu během období sucha zůstává nedostatečně pochopen (Gely et al., 2020).

Ve smíšených porostech jsou smrky odolnější vůči nepříznivým podmínkám prostředí (znečištění a extrémní klimatu) než monokultury. Z hlediska změny klimatu je potřeba podporovat odolnost lesů vůči extrémním výkyvům klimatu zvyšováním strukturální rozmanitosti a ochranou druhové bohatosti. Lesní hospodáři by měli využít potenciálu adaptace na změnu klimatu s maximální účastí na přírodních procesech. Tyto lesnické metody by měly vést k udržitelnému, ekologicky a socioekonomicky přijatelnému rozvoji budoucích lesů (Vacek et al., 2019).

Množství nedávných případů odumírání stromů v důsledku sucha a horka z celého světa ukazuje, že žádný typ lesa ani klimatická zóna nejsou imunní vůči klimatickým změnám, i v místech, která nejsou často považována za místa s nedostatečným množstvím vody. Současný vývoj poznatků o procesech odumírání stromů naznačuje, že lesy mohou být kromě samotného sucha obzvláště zranitelné i v důsledku nárůstu teploty, zejména za situace, kdy je dominantní příčinou odumírání stromů spíše hlad po uhlíku než hydraulické selhání. Nicméně v současné době nám chybí schopnost předvídat o odumírání druhů stromů a typů lesů na základě specifických kombinací faktorů prostředí (Allen et al., 2010).

3.3 Metabolomika

Velké množství metabolitů, jako například cukry, organické kyseliny a aminokyseliny, jsou běžně přítomny v živých organismech. Lze je nalézt i v makromolekulárním komplexu, kde se podílejí na životně důležitých životních procesech. Ačkoli některé z těchto sloučenin jsou přijímány buňkami, naprostá většina z nich jsou vedlejší produkty nebo meziprodukty metabolických činností (Tomita et Nishioka, 2005). Metabolomika si klade za cíl identifikovat změny v endogenních metabolitech biologických systémů v reakci na vnitřní a vnější faktory. Necílené a semi-

cílené přístupy se obvykle používají ve studiích generování hypotéz (s cílem změřit co nejvíce metabolitů), zatímco cílené přístupy analyzují relativně malou podskupinu biochemicky důležitých a relevantních metabolitů zjištěných již dříve (Beale et al., 2018).

Místo specifických (cílových) metabolitů zkoumá metabolomika úplný metabolom – soubor všech detekovaných molekul s nízkou a střední molekulovou hmotností. V předmětu metabolomika se používá mnoho metodologií, jako je profilování metabolitů a metabolický fingerprinting (Goodacre et al., 2004). Metabolické profilování je detekce specifického souboru metabolitů, zatímco metabolický fingerprinting je kategorizace vzorků na základě biologického významu nebo původu (Beale et al., 2018).

Komplexní analýza metabolomu organismu, tkáně či buňky ve specifickém fyziologickém nebo vývojovém stádiu, je zvláště důležitá pro pochopení buněčné funkce, protože odráží aktuální stav buňky, který bývá vysoce dynamický (Goodacre et al., 2004). Je však nutné metabolity a jejich koncentrace sledovat, jelikož hladiny metabolitů nejsou pouze odpovědí na genovou expresi, ale také na environmentální a vývojové podněty. Pochopení dynamického chování metabolismu je nemožné bez znalosti množství a typů jednotlivých sloučenin, které se vyskytují v živých organismech, popřípadě v jejich buňkách, za různých podmínek (Tomita et Nishioka, 2005). V celém sortimentu metabolitů lze očekávat extrémní variabilitu chemické struktury a fyzikálně-chemických vlastností. Některé metabolity se účastní velkého počtu metabolických drah, zatímco jiné se účastní pouze několika. Dále mohou některé kolísat v závislosti na prostředí a některé jsou v buňce zastoupeny pouze ve stopovém množství (Musilová et Glatz, 2011). Z výše uvedeného plyne nutnost používat pro vyhodnocení multivariační statistické metody, namísto běžných univariálních.

3.4 Primární a sekundární metabolity

Primární metabolity hrají důležitou roli při fotosyntéze a dýchání, nepřítomnost sekundárních metabolitů vede spíše k dlouhodobému zhoršení života organismu. Jejich zásadní funkcí je obrana rostlin. Sekundární metabolity rostlin jsou chemikálie s nízkou molekulovou hmotností, které nemají žádnou potvrzenou účast na udržování základních životních procesů v rostlinách, které je syntetizují, ale hrají zásadní roli v interakci rostliny s jejím prostředím (Oksman-Caldentey, 2004). Vyznačují se strukturální rozmanitostí a jsou odvozeny z malého souboru biosyntetických prekurzorů, které zahrnují fosfoenolpyruvát, pyruvát, acetát, aminokyseliny a atd. Ačkoli bylo předloženo několik vysvětlení tvorby sekundárních metabolitů, žádné není zcela adekvátní. Pochopení souhry mezi rostlinami a prostředím však vyžaduje znalost jejich biosyntézy (Robards et al., 1999). Syntéza těchto chemikálií je často minimální (méně než 1 % sušiny) a je závislá na fyziologickém a vývojovém stádiu rostliny. Sekundární metabolity mají velkou chemickou rozmanitost a každý druh má svou víceméně jedinečnou sbírku sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity rostlin jsou široce považovány za klíčové pro přežití rostlin a v jejich prostředí jejich antimikrobiální a insekticidní vlastnosti odpuzují možné predátory, odrazují konkurenční druhy rostlin, nebo přitahují

opylovače nebo symbionty (Dixon, 2001). Sekundární metabolity již dlouho vzbuzují u lidí zvědavost, jelikož jsou to typické látky zodpovědné za příchut', vůni, barvu. Vedle toho jsou vzorem pro syntézu insekticidů a léků, stejně jako jsou nezbytné pro růst rostlin.

Sekundární metabolity, na rozdíl od primárních metabolitů (aminokyseliny, nukleotidy, cukry, acyllipidy), mají v rostlinné říši omezenou distribuci. To znamená, že sekundární metabolity jsou často přítomny pouze v jednom rostlinném druhu nebo skupině druhů, zatímco primární metabolity jsou rozšířeny po celém rostlinném světě ((Taiz et Zeiger, 2003).

Sekundární metabolity představují širokou škálu přírodních sloučenin, které byly vyrobeny. Pro jejich klasifikaci se používá biosyntéza většiny těchto molekul, jako jsou terpeny, fenolové sloučeniny a alkaloidy. Často jsou spojeny s malým počtem druhů v rámci fylogenetické skupiny, kde pak vytvářejí bioaktivní složku v léčivých aromatických rostlinách (Agostini-Costa, 2012).

Výzkum sekundárních metabolitů u rostlin má různé praktické využití. Některé z těchto sloučenin se využívají díky svým biologickým účinkům na býložravce a mikroorganismy. Díky svým biologickým účinkům na býložravce a bakterie se mnohé z těchto látek využívají komerčně jako insekticidy, fungicidy a léčiva, zatímco jiné se používají jako parfémy, aromata, léčiva a průmyslové materiály.

Vliv stresových a obranných reakcí na fyziologii rostlin spojený s biosyntézou sekundárních metabolitů je komplikovaný a současný výzkum ukazuje, že důležitou roli při jejich produkci hrají stresové signalizační systémy. Mnoho studií naznačuje, že sekundární metabolity v rostlinách hrají roli ve stresových a obranných reakcích. Jejich výzkum je obtížný, protože reakce vznikají na subatomární úrovni. V důsledku toho zůstává nejrozšířenější strategií použití biochemických a metabolických ukazatelů k odvození vlivu stresových a obranných reakcí na biomasu a sekundárních metabolitů na okolnosti vývoje rostlin (Isah, 2019).

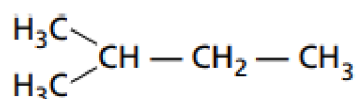
Tykadla *I. typographus* mají silně specifická čichová čidla pro detekci pachových signálů, které jsou tvořeny volatilními organickými látkami uvolňovanými hostitelskými i nehostitelskými stromy, jako jsou terpenoidy nebo alkoholy ze zelených listů. Čichový systém lýkožrouta smrkového navíc reaguje na okysličené těkavé látky hostitele spojené se stresem stromu, které mohou fungovat jako odpuzující nebo přitažlivé signály pro výběr hostitele (Schiebe et al., 2019). Pachové receptory lýkožrouta reagují nejen na pachy stromů a složky feromonů, ale také na okysličené monoterpeny a fuselové alkoholy generované jeho houbovými symbionty (Kandasamy et al., 2016). Společenstva ofiostomatoidních hub *I. typographus* zahrnují řadu druhů s různou mírou virulence vůči smrku ztepilému, přičemž některé z nich pomáhají broukům při překonání a následném vyčerpání obranných mechanismů hostitele a napomáhají tak odumírání stromů (Krokene, 2015).

U *I. typographus* byla zjištěna významná souvislost mezi indukcí terpenů po inokulaci houbami a kolonizací stromů s umělými feromony u brouků (Zhao et al., 2011). Předchozí výzkum obranných schopností jehličnanů se téměř výhradně zaměřoval na monoterpenové složky hostitele. Nicméně fenolickým chemickým látkám (největší třída

chemických látek v kůře) byla věnována jen malá pozornost, přestože jsou považovány za indikátory rezistence a jsou prospěšné jako inhibitory žíru (Lieutier, 2004; Zhao et al., 2011). Navíc bylo prokázáno, že i v malém množství obsahují smrková pletiva drobné množství alkaloidů, které jsou známé jako antifeedanty hmyzu (Kamm et al., 1998).

Podle Schiebe et al. (2012), ovlivňuje účinnost osídlení hostitele houbou *I. typographus* spíše schopnost stromů mobilizovat indukovanou obranu než kvalitativní a kvantitativní vlastnosti konstituční biochemie, tj. chemické látky a jejich koncentrace před napadením. Schiebe provedl svou studii na řadě stromů, z nichž odebral vzorky před napadením lýkožroutem. Stromy, které byly kolonizovány a uhynuly, měly nižší celkovou indukci obranných chemických látek a výrazně menší vývoj TRD (traumatických pryskyřičných kanálků) než stromy, které byly neúspěšně napadeny a přežily. Kromě toho je *I. typographus* spojen s různými symbionty ophiostomatoidních hub, které mají různé dopady na životní cyklus brouka.

3.4.1 Terpeny



Obrázek č. 3: Uhlíkový skelet isopentanu

Terpeny obecně označují molekuly uhlovodíků, terpenoidy jsou modifikované terpeny, například přidáním kyslíku. Všechny terpeny jsou odvozeny ze spojení pětiuhlíkatých prvků, které mají rozvětvený uhlíkový kostru isopentanu. Terpenoidy jsou největší a nejrozmanitější skupinou přírodních produktů, které se strukturně liší od lineárních po polycyklické molekuly a velikostně od pětiuhlíkových hemiterpenů po přírodní polymery, např. pryž, obsahující tisíce izoprenových jednotek. Terpenoidy jsou vytvářeny syntézou prostřednictvím kondenzace izoprenových jednotek (C5) a jsou rozděleny podle počtu pětiuhlíkových jednotek, které se vyskytují ve struktuře jádra ((Mahmoud et Croteau, 2002).

Tabulka č. 1: Rozdělení terpenů

počet uhlíků	počet isoprenů	klasifikace
10	2	monoterpen
15	3	sesquiterpen
20	4	diterpen
25	5	sesterterpen
30	6	triterpen - steroidy
40	8	tetraterpen
45 a více	n	polyterpeny

Jehličnany vytvářejí rozmanité spektrum pryskyřic na bázi terpenoidů, které jsou již dlouho zkoumány pro svou komerční hodnotu a také pro svou funkci v boji proti herbicidům a chorobám. Pryskyřice jehličnanů obsahuje nižší podíl seskviterpenů a skládá se z přibližně stejného molárního množství monoterpenů (10 atomů uhlíku), diterpenů (20 atomů uhlíku) a malé množství seskviterpenů (15 atomů uhlíku) (Trapp et Croteau, 2001).

Mnoho rostlin má esenciální oleje, což jsou kombinace těkavých monoterpenů a seskviterpenů, které dodávají jejich listům a dalším tkáním charakteristickou vůni. Mezi rostliny s vysokým obsahem silic patří máta, citron, bazalka a šalvěj. Mentol je hlavní monoterpenovou složkou mátového oleje, zatímco limonen je hlavní monoterpenovou složkou citronového oleje. Repelentní vlastnosti esenciálních olejů vůči hmyzu jsou široce zdokumentovány (Taiz et Zeiger, 2003). Antibakteriální, antimykotické, antioxidační a cytotoxické účinky silice z jehličnanů jsou také dobře známy. Antimikrobiální aktivita byla přisuzována několika těkavým složkám esenciálního oleje *Picea abies* (alfa -, beta- pinen...) (Radulescu et al., 2011).

Smrk ztepilý vytváří oleoresin, kombinaci netěkavých diterpenových kyselin a podstatné (20-50 %) těkavé složky mono – a seskviterpenů, který může jehličnany chránit před býložravci a chorobami. Oleoresin se nachází v pryskyřičných kanálcích v kůře a floému kmenů smrku ztepilého. Jehličnany, které tuto pryskyřici uchovávají, jsou významným zdrojem těkavých organických látek (VOC), v nichž převažují těkavé monoterpeny (Martin et al., 2002; Sallas et al., 2003). Stromy využívají pryskyřici k zacelování mechanických poškození, obraně proti podkornímu hmyzu (mechanická i chemická obrana). Navíc, při napadení hmyzem, houbami i mechanickému poškození dochází v rostoucím sekundárním xylému (dřevě) k de novo produkci traumatických pryskyřičných kanálků (Martin et al., 2002). Oleoresin se také ve zvýšeném množství vytváří po ošetření hormonem methyljasmonátem (MeJA) (Franceschi et al., 2002). MeJA indukuje terpensyntázovou genovou expresi, čímž zvyšuje tvorbu pryskyřice v traumatických pryskyřičných kanálcích a dále enzymatickou aktivitu následovanou akumulací terpenoidů v kůře a xylémových tkáních smrku sitka (*Picea sitchensis*) i smrku ztepilého (Martin et al., 2002; Zulak et al., 2009).

Mezi hlavní monoterpeny nalezené ve smrku, v intaktních i MeJA indukovaných tkáních, patří alfa-pinen, kapfen, beta-pinen, myrcen, limonen a další (Martin et al., 2002). Limonen je jedním z široce rozšířených monoterpenů i v potravinách, zejména v citrusových produktech nebo produktech s citrusovým aroma. Primárně se používá v potravinářské praxi jako látka zvýrazňující chuť a vůni v potravinách, mýdlech a parfémeh (Whysner et Williams, 1996). Ve studii, kde byly používány jehlice borovice montereyská (*Pinus radiata*), byly změřeny čtyři koncentrace monoterpenů, ať už byly napadeny *Tomicus piniperda* (L.), nebo ne. Byla zjištěn korelace terpenů s vyšší teplotou.

Terpineoly jsou nenasycené monocyklické monoterpenoidní alkoholy, které se přirozeně vyskytují v rostlinách, jako je například majoránka, v oleji z citronové kůry,

pryskyřice jehličnatých stromů a také v různých květenstvích. Alfa – terpineol je jednou z nejrozšířenějších vonných složek, která má specifickou levandulovou vůni. Je využíván v mýdlech a kosmetice (Bauer et al., 2001). Alfa – terpineol je běžně dostupný v přírodních materiálech, ale může se získat pomocí frakční destilace z více než 150 esenciálních olejů (Surburg et Panten, 2016). Přírodní výskyt beta-, gama- a delta-terpineolů je mnohem méně častý (Bauer et al., 2001). Byly zjištěny případy, kdy se množství terpenoidů obsažených v silicích příležitostně značně liší, a je tedy otázkou, nakolik je to dáno variabilitou rostlin a odchylkami v procesu izolace (Bauer et al., 2001).

Kromě terpenů produkovaných rostlinami v reakci na napadení nebo stres, bylo také naznačeno, že rostliny mohou produkovat terpenoidy k přilákání opylujícího hmyzu (Maimone et Baran, 2007). Zajímavé také je, že terpenoidy mohou přitahovat užitečné roztoče, kteří se živí býložravým hmyzem (Kappers et al., 2005). Cheng et al. (2007), Podle vědců mohou terpeny působit také jako chemický messenger ovlivňující expresi genů zapojených do obranných systémů rostlin, a dokonce i schopnost ovlivňovat expresi genů v okolních rostlinách.

Emise monoterpenů, byla pozorována větší než rozsah uváděný pro smrk sitka, což naznačuje, že smrk ztepilý je více závislý na teplotě, než bylo dříve uváděno pro jiné druhy. Exponenciální nárůst emisí monoterpenů s teplotou lze vysvětlit jednak zvýšením aktivity monoterpenové syntézy u tohoto druhu, který má teplotní optimum 40 °C (Fischbach et al., 2000).

3.4.2 Fenoly



Obrázek č. 4: Hydroxylová funkční skupina

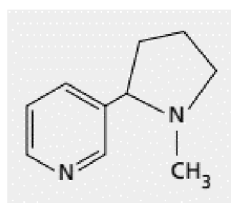
Fenoly jsou v přírodě široce rozšířeny. Rostliny vytvářejí širokou škálu sekundárních produktů s fenolovou skupinou – hydroxylovou funkční skupinou na aromatickém kruhu. Jejich chemické struktury se mohou velmi lišit, včetně jednoduchých fenolů (C₆), jako jsou deriváty kyseliny hydroxybenzoové, stejně jako polymery s dlouhým řetězcem s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou katecholové melaniny (C₆)₆, ligniny (C₆-C₃)_n a taniny (C₆-C₃-C₆)_n. Stilbeny (C₆-C₂-C₆) a flavonoidy (C₆-C₃-C₆) jsou fenolické sloučeniny se střední molekulovou hmotností, které obsahují mnoho farmakologické a biologické aktivity (Agostini-Costa, 2012).

Fenolické metabolity jsou často spojovány s obrannými mechanismy rostlin proti přirozeným nepřítelům, jako jsou patogenní houby (Hammerschmidt, 2005). Nejpersvědčivější důkazy podporující antifungální funkci fenolických látek pocházejí ze studií na rostlinách, jako je tabák, které byly získány pokročilými molekulárními

metodami (Maher et al., 1994). U dřevin byly fenolické látky studovány jako markery rezistence vůči patogenům.

Fenoly byly méně indukovány než terpeny, ale skutečnost, že některé fenolické látky (estragol, flavanoidy, myricetin a laricitrin) se odchýlily od fenolického vzoru a vykazovaly významně silnější indukci přežití než u usmrcených stromů, což je v souladu s dřívějšími zprávami navrhuujícími fenolické látky jako markery rezistence (Schiebe et al., 2012). Ukázalo se, že jejich indukovatelnost koreluje s odolností proti kůrovcové houbě *Ceratocystis polonica* a v biologických testech byly prokázány vlastnosti některých fenolických látek proti *I. typographus* (Faccoli et Schlyter, 2007).

3.4.3 Alkaloidy

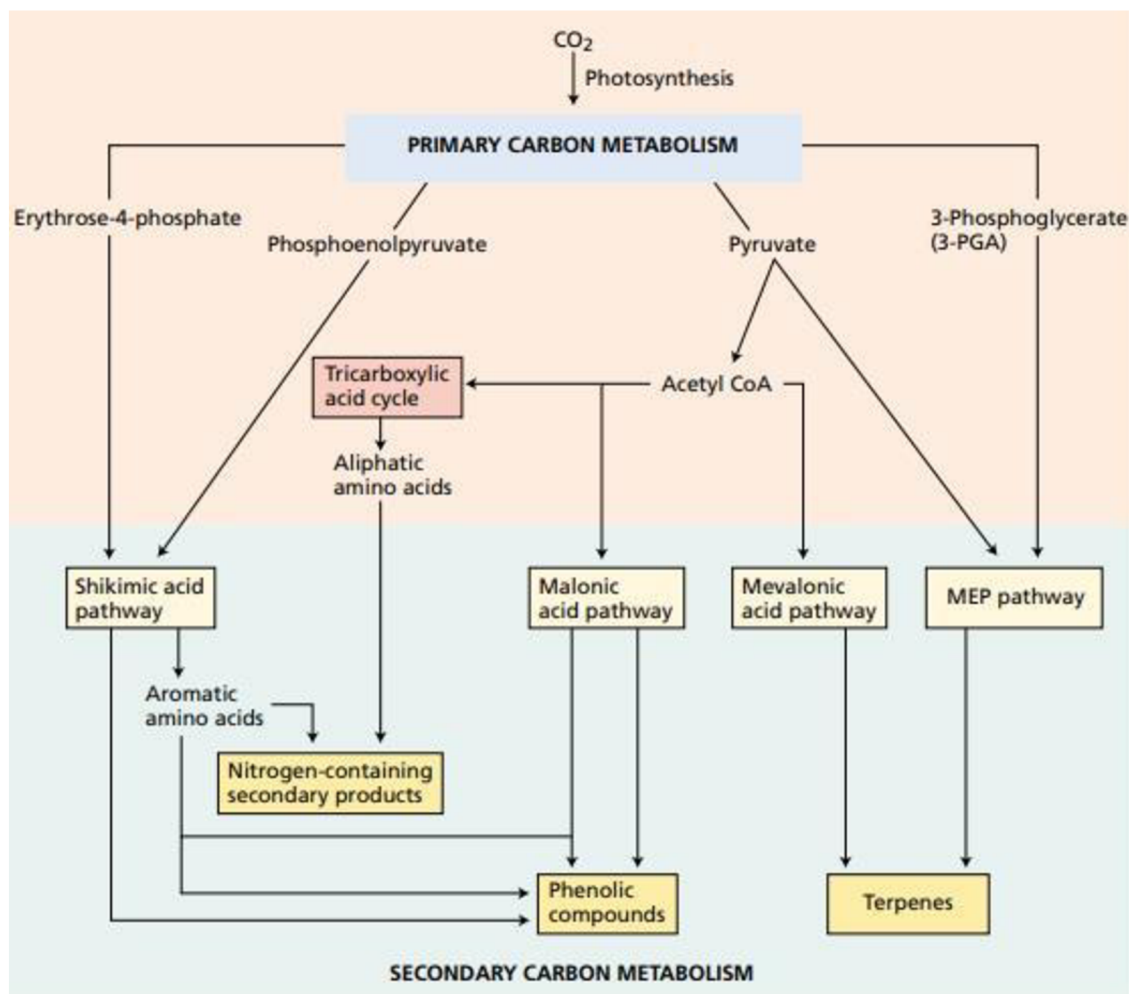


Obrázek č. 5: Struktura alkaloidu – nikotin

Alkaloidy definujeme jako základní sloučeniny, které jsou syntetizované živými organismy, které obsahují jednu nebo více heterocyklických atomů dusíku, odvozených od aminokyselin (až na některé výjimky) a farmakologicky aktivní. Název třídy souvisí s tím, že téměř všechny alkaloidy jsou základní (alkalické) sloučeniny. Alkaloidy jsou velmi rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů, přičemž bylo izolováno více než 12 000 látek. Obrovská rozmanitost strukturního vzorce, pocházející z různých biosyntetických drah a farmakologická aktivita je pro tuto skupinu metabolitů (Briemann et al., 2006).

Ačkoli byla u různých rezistentních rostlin zaznamenána silná indukce alkaloidů, jejich vysoká diverzita činí vyvozování definitivních závěrů ohledně jejich podílu na rezistenci stromů obtížným. O alkaloidech je všeobecně známo, že mají antifeedativní účinek proti hmyzu, ale o jejich podílu na ochraně *Picea* spp. je toho známo málo (Kamm et al., 1998).

V současné době se předpokládá, že většina alkaloidů má funkci obrany proti predátorům, zejména savcům, kvůli jejich obecné toxicitě (Hartmann, 1996). Velký počet úmrtí hospodářských zvířat je způsoben požitím rostlin obsahujících alkaloidy. Téměř všechny alkaloidy jsou pro člověka v dostatečném množství toxické. Při nižších dávkách jsou však mnohé z nich farmakologicky užitečné. Morfín, kodein a skopolamin jsou jen některé z rostlinných alkaloidů, které se v současnosti používají v lékařství. Jiné alkaloidy, včetně kokainu, nikotinu a kofeinu, mají širokou škálu nelékařských použití jako stimulanty nebo sedativa (Taiz et Zeiger, 2003).



Obrázek č. 6: Syntéza sekundárních metabolitů z primárního metabolismu a následný vznik terpenů, fenolických látek a dusíkatých látek (Taiz a Zeiger, 2003).

3.5 Volatilní organické látky a jejich funkce

Termín biogenní těkavé organické sloučeniny (biogenní VOC) zahrnuje organické atmosférické látky (Kesselmeier et Staudt, 1999).

Biogenní VOC zahrnují izoprenoidy (izopren a monoterpeny), stejně jako alkany, alkeny, karbonyly, alkoholy, estery, ethery a kyseliny. Emisní inventáře ukazují izopren a monoterpeny jako nejvýznamnější sloučeniny. Alkoholy a karbonyly následují po izoprenoidech jako nejvíce převládající skupiny (Kesselmeier et Staudt, 1999). U jehličnanů převažují mono-, di- a seskviterpeny, zatímco u listnatých stromů triterpeny a steroly (Adamová et al., 2020). Tyto směsi mohou obsahovat až 200 chemických látek a různé jejich podskupiny ovlivňují interakci rostliny s různými členy společenstva. Masožravci, býložravci, opylovači, patogeny, vzdálenější pletiva v rámci jedné rostliny a sousední rostliny mohou využívat indukované rostlinné těkavé organické látky jako signály k ovlivnění svého chování a výkonnosti. Rozdíly v rámci jednoho rostlinného druhu mohou odrážet rozdílné selekční tlaky v různých prostředích (Dicke et Baldwin, 2010). Obsah těkavých organických látek ve dřevě se odvíjí především od druhu dřeva, podílu jádrového a bělového dřeva, stáří stromu, místa jeho vývoje a následného

technického postupu při zpracování dřeva, zejména při jeho sušení. Použitá analytická metoda může mít rovněž významný vliv na variabilitu celkového množství zjištěných chemických látek (Adamová et al., 2020).

Těkavé organické látky představují širokou škálu sloučenin s body varu od méně než 0 °C do přibližně 400 °C. Klasifikace byla na základě těkavosti sloučeniny rozdělena do čtyř kategorií. VOC existují hlavně v plynné fázi v rozsahu teplot a vlhkosti, se kterými se setkáváme v interiéru. (Wolkoff, 1995). Chemická stavba těchto látek je různorodá, stejně jako jejich schopnost nosit konkrétní informace o fyziologickém stavu a stresu rostlin (Dicke et Loreto, 2010).

Rostliny vytvářejí širokou škálu chemických látek, včetně ethylenu, methanolu, složitých terpenoidů a alkaloidů obsahujících dusík. Dlouhou dobu se výzkum těkavých látek rostlin soustředil především na těkavé látky květů, ale v poslední době se zvýšil zájem o chemické látky replikované z vegetativních tkání rostlin. Rostliny emitují do svého okolí značné objemy těkavých organických látek (VOC), a to nejen prostřednictvím nadzemních pletiv, ale také prostřednictvím svých kořenů. Tyto těkavé látky jsou důležité v ekologii rostlin a jsou ovlivňovány abiotickými a biotickými stresory. Rostliny žijí ve složitých společenstvech a mají vyvinuté obranné systémy proti chorobám a parazitům. Současně mají schopnost příznivě působit na jiné organismy, například na opylovače. Abiotické stresory (vysoká teplota) mohou navíc ovlivnit tvorbu těkavých chemických látek a přímo ovlivnit jejich biosyntézu, stejně jako narušit hlavní metabolismus rostlin (Dicke et Loreto, 2010). Silná souvislost mezi emisemi monoterpenů spolu s emisemi hexanalů a hexanolů ve vztahu k teplotě podporuje hypotézu, že tvorbu a uvolňování těchto sloučenin zajišťují enzymatické procesy (Cojocariu et al., 2004).

Rostliny si během milionů let vyvinuly obranu proti býložravcům a mikrobiálním útokům. Vzhledem k tomu, že dobře chráněné rostliny mají tendenci zanechávat více přeživších než rostliny slabě chráněné, rozšířila se schopnost vyrábět účinné obranné produkty po celém rostlinném světě (Dicke et Loreto, 2010). Naslouchání signálům, které vysílají přátelé i protivníci, vyžaduje použití receptorového systému. Podle dostupných důkazů mohou mít rostliny proteiny vázající odoranty (OBP). VOC jsou pomocí OBPs přenášeny k neidentifikovaným čichovým receptorům (OR), které aktivují transdukční dráhu vedoucí k vnímání VOC. Rostliny nicméně postrádají nervové buňky a antropocentrický systém vnímání pachů nemusí být kompatibilní s jejich základní biochemií. Rostliny nemusí potřebovat OBP a OR při detekci konstitutivních VOC, které nejsou generovány stresory a neobsahují informace o hrozícím stresu. Mnoho živočichů interaguje s rostlinami prostřednictvím produkce těkavých organických sloučenin (VOC) (Loreto et D'Auria, 2022). Rostlinné těkavé organické látky mohou hrát určitou roli v konkurenceschopnosti rostlin. Rostliny detekují své sousedy, se kterými soupeří o světlo a živiny, prostřednictvím změn poměru světla, ale svou roli pravděpodobně hrají i rostlinné těkavé látky. To dobře souvisí s dřívějším výzkumem vztahů mezi rostlinami, například mezi parazitickými rostlinami a jejich hostiteli nebo mezi sousedními

rostlinami, které naslouchají znakům poškození od svých sousedů (Kegge et Pierik, 2010).

Změna klimatu již zvýšila emise VOC a další velké nárůsty lze očekávat s navýšením globálních teplot (Peñuelas et Staudt, 2010). Tvrdí však, že v dopadu změny klimatu na emise VOC mohou existovat značné regionální rozdíly, zejména při srovnání boreálních a středomořských oblastí. Navzdory některým alarmujícím trendům zůstává naše chápání dopadu změněných emisí na funkci a strukturu biosféry, stejně jako na narušení biosféry a atmosféry, poměrně omezené. Znečištění ovzduší a další abiotické faktory mohou měnit interakce mezi rostlinnými druhy zprostředkované těkavými organickými látkami, a tím ovlivňovat dynamiku společenstev. Toho lze dosáhnout selektivním omezením přirozených obranných schopností rostlin využitím indukovaných VOC jako obecných nebo specializovaných repelentů nebo jako atraktantů specifického a užitečného hmyzu (Holopainen et Gershenzon, 2010).

3.6 Analýza přírodních látek

Člověk se již od starověku snažil porozumět a analyzovat produkty přírodního světa kolem něj. Ve dvacátém století, kdy byly rostliny primárním zdrojem většiny léčiv, bylo hlavní technikou kontroly kvality pozorování typických strukturních charakteristik rostlin pod mikroskopem, přičemž chemická analýza obsahu cílových látek hrála malou roli. S tím, jak se vyjasnil význam příspěvku konkrétních přírodních produktů k farmakologickým a biologickým aktivitám organismu, rostla potřeba vhodnějších kvalitativních a kvantitativních analytických postupů (Marston et Hostettmann 2009).

Metabolity byly tradičně měřeny pomocí spektrofotometrických testů nebo jednoduchou chromatografickou separací směsí s nízkou složitostí. V posledních desetiletích bylo vyvinuto několik metod, které umožňují analyzovat mimořádně matrice s velkou přesností a citlivostí. Příkladem těchto metod jsou spojené techniky hmotnostní spektrometrie a plynové chromatografie (GC-MS), hmotnostní spektrometrie a kapalinové chromatografie (LC-MS), hmotnostní spektrometrie a kapilární elektroforézy (CE-MS) nebo hmotnostní spektrometrie pomocí iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR-MS) (Lindon, 2003). Pokud jde o nástroje analytických technik pro stanovení těkavých organických látek, nejčastěji se k separaci a detekci používá plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Předcházející kroky – extrakce těkavých látek a způsoby zavedení vzorku do analytického systému jsou silně ovlivněny cílem analýzy. Pro analýzu pevných vzorků se používají různé extrakční postupy. Obvykle zahrnují extrakci pevná látka/kapalina, která je často podpořena teplem nebo ultrazvukem, a následné zavedení extraktu do GC-MS. V případě těkavých látek uvolňujících se ze vzorku se používá odběr vzdušného vzorku v prostém prostoru nebo častěji rovnovážné postupy, po nichž následuje termální desorpce odebraných chemických látek do analytického přístroje. Tato metoda se často

používá pro monitorování vnitřního ovzduší nebo míry emisí sloučenin z různých materiálů (Wajs et al., 2006; Roffael, 2006; Adamová et al., 2019).

Charakterizace metabolitů v komplexních směsích vyžaduje sofistikované techniky, které by měly poskytovat dobrou citlivost a selektivitu, jakož i strukturní informace o složkách, které jsou předmětem zájmu. Základním kamenem fytochemického výzkumu je izolace složek rostlinného extraktu v dostatečných koncentracích pro spektrální a biologické výzkumy (Kumar et Sivaperumal, 2016).

Nejpočetnější chemickou třídou ve zkoumaných extraktech z lýka jehličnanů, popsanych v literatuře jsou tak monoterpeny (monoterpenové uhlovodíky: 22,89 %; monoterpeny s vázaným kyslíkem: 19,34 %), následované seskviterpeny (seskviterpenové uhlovodíky: 6,61 %; seskviterpeny s vázaným kyslíkem: 8,79 %) a diterpeny (diterpenové alkoholy: 14,79 %) (Schoss et al., 2022). Baath et al. (2009), zjistili, že alfa-pinen, kamfen, limonen a bornyl-acetát jsou čtyři nejhojněji zastoupené složky silice u 16 různých druhů jehličnanů, včetně *P. abies*. Primárními složkami analyzovanými pomocí GC-MS ve výzkumu Garzoliho et al. (2021) byly sloučeniny beta-pinen (44,7 %), alfa-pinen (20,2 %), limonen (14,2 %) a kamfen (7,2 %). Silice z jehlic estonského smrku obsahuje až 70 % kyslíkatých terpenů a současně více limonenu a eukalyptolu než jiné druhy smrku *Picea abies* (Orav et al., 1996).

3.6.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Pro identifikaci jednotlivých nízkomolekulárních sloučenin ve složitých směsích je v současnosti nejvýznamnější analytickou technikou v organické chemické analýze plynová chromatografie (GC). K identifikaci chemických látek lze použít hmotnostní spektrometrie (MS), což je univerzální a citlivá detekční technologie, která poskytuje údaje pro identifikaci i kvantifikaci složek, jelikož poskytuje kvantifikační i konfirmační ionty při jedné analýze (Lovestead et al., 2019). Kompletní dvourozměrná plynová chromatografie (GC × GC) zvyšuje citlivost kombinací dvou kolon, často s rozdílnou polaritou, a modulačním krokem, při němž je analyt z první kolony před nástřikem na druhou kolonu kryofokusován. Látky ze vzorku tak mohou být lépe rozlišeny od složek matrice i od dalších cílových molekul. Ke stejnému účelu je možno použít i delší kolony, které však pro dosažení alespoň obdobné separace neúměrně prodlužují celkovou délku trvání analýzy (Adamová et al., 2020). Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC-MS) je jednou z nejúčinnějších, reprodukovatelných a široce používaných možností pro výzkum metabolomiky. To je hlavně způsobeno robustností, reprodukovatelností a selektivitou této techniky a také velkou a dobře zavedenými knihovnami hmotnostních spekter, které umožňují následnou identifikaci metabolitů (Tranchida et al., 2014; Beale, 2018).

Při hodnocení vzorků pomocí GC-MS se v praxi používají dva základní přístupy – cílený a necílený. "Necílená" metoda je taková, která primárně detekuje co nejvíce

sloučenin ve vzorcích z co nejvíce chemických tříd. Současně by měla umožňovat následnou identifikaci těchto látek, pokud se ukáže jejich důležitost pro řešení studovaného problému. Necílená analýza mnohdy znamená snahu o zkoumání všech analytů ve všech chromatogramech z často velmi rozsáhlého souboru vzorků (Beale et al., 2018; Song et al., 2020). Naproti tomu "cílené" techniky se soustředí na detekci a zpravidla i kvantifikaci určitého souboru známých sledovaných analytů. Vzhledem k tomuto faktu lze analytickou metodu optimalizovat tak, aby nabízela selektivitu pouze tyto sloučeniny a zvýšila se tak její citlivost. Z hlediska detekce a následného zpracování dat, je tento postup jednodušší. Cílová analýza zpravidla poskytuje malé množství informací o kompletním složení vzorku a nevyužívá plně informační kapacitu, kterou GC-MS systém může poskytnout. Naproti tomu necílenými studii mezi vzorky lze dosáhnout různých výsledků: autentizace vzorků na základě zjišťování charakteristických profilů látek, monitoring zpracovatelských nebo pěstitelských technologií a jejich vliv na metabolity, identifikace látek, které mají největší význam pro separaci vzorků dle jiných parametrů v multidimenzionálním zpracování dat (Reichenbach et al., 2012).

GC-MS je v současné době široce používanou analytickou technikou, protože kombinuje vysokou separační účinnost s velmi dobrou citlivostí detekce. GC-MS byla jednou z prvních metod vývoje metabolomiky a nadále si drží dominantní postavení při zkoumání těkavých, tepelně stabilních a nízkomolekulárních molekul. Sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností nebo silně polární sloučeniny je nutno stanovovat pomocí LC-MS nebo pro GC analýzu upravovat jejich strukturu – derivatizovat. Nicméně, derivatizace je často náročná na provedení. GC-MS také hraje důležitou roli v kvantifikačních studiích, především kvůli své selektivitě a dostatečnému lineárnímu rozsahu pro metabolity v širokém rozsahu koncentrací.

Pro jednoduché laboratorní analýzy často stačí běžný kvadrupólový hmotnostní spektrální analyzátor. Nicméně sofistikované analyzátory, jako jsou analyzátory stanovující dobu letu iontů (TOF), mohou poskytnout výhodné vlastnosti v případě necílové analýzy. Vzhledem k tomu, že pro chromatografickou separaci lze použít rychlejší gradient, může větší rozlišovací schopnost detekce zvýšit celkovou průchodnost vzorku (Adams, 2007). Vzhledem k tomu, že počáteční identifikace chemických sloučenin může být založena na podobnosti hmotnostních spekter s vestavěnými hmotnostními knihovny nebo i s více online zdroji, používá se při hmotnostně spektrometrické detekci standardizovaná ionizace nárazem elektronů při 70 eV. K potvrzení identifikace lze využít retenční doby různých standardů nebo porovnat předpokládané Kovatsovy retenční indexy (KI) s literárními údaji (Adamová et al., 2019).

4 Metodika

4.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků probíhal dva dny 12- 13. 7. 2022 na výzkumných plochách Lesnické a dřevařské fakulty u Kostelce nad Černými lesy. Celkově bylo 5 ploch a každá byla rozdělena na 4 části. V jedné byly smrky pod střechou, umístěnou 1-2 m nad zemí s tím že kmeny prostupují skrz střechu, v dalších byly stromy pro tento experiment považovány za kontrolní. V rámci kontrolních stromů byly ještě označeny stromy, které jsou na porostním okraji. Vzorky byly získávány pracovníky Extemit-K pomocí trubičkového průbojníku o průměru 9 mm, přičemž vždy byly vyraženy tři plátky kůry a lýka z plochy nepoškozené kůry. Odběrová místa tvořila vrcholy trojúhelníku o straně cca 10–15 cm. Vzorek byl poté v kryovialce ihned vložen do baňky s tekutým dusíkem. Stejný postup byl použit v celé výzkumné oblasti, přičemž všechny vzorky byly odebrány do tekutého dusíku a po příjezdu na FLD byly až do dalšího zpracování v laboratoři uchovávány v mrazničce při teplotě -80 °C.

4.2 Laboratorní zpracování

4.2.1 Pomůcky

V následujícím textu jsou uvedeny nezbytné pomůcky a chemikálie pro popsané zpracování vzorků v laboratoři:

- Rukavice
- Vialky o objemu 2 ml
- Laboratorní pinzeta
- Skalpel
- Plastová podložka
- Třecí miska s tloučkem
- Tekutý dusík
- Laboratorní váha
- Laboratorní lžička
- Digestoř
- Pipeta (1–10 ml)
- n-hexan

4.2.2 Postup

Po odebrání vzorků z výzkumných stromů byly tyto vzorky uloženy do mrazničky při teplotě -80 °C. Vzorky byly odebrány z mrazničky při teplotě -80 °C, zpravidla po 16 kusech, a přeneseny do laboratoře v polystyrenovém termoboxu, kde byly po požadovanou dobu krátce uloženy v mrazničce o teplotě -20 °C. Vždy byl zpracován pouze jeden vzorek, ostatní byly uchovávány při -20 °C.

Prvním cílem bylo homogenizovat lýko. Ze vzorku byl vyříznut plátek lýka, ostatní tkáň (borka a případně přítomné bělové dřevo) byly skalpelem odděleny. Lýko bylo skalpelem nasekáno na malé kousky (asi 1 x 2 mm) a vložena do třecí misky s tloučkem. Vzorky byly zalévány tekutým dusíkem, aby se umožnila homogenizace zmrzlého materiálu a zabránilo se tepelnému poškození zkoumaného materiálu. Z jemného prášku bylo naváženo 90mg do 2ml vialky pro extrakci. Poté byla lahvička uzavřena a uložena do mrazničky o teplotě -20 °C. Stejně se postupovalo i u zbývajících vzorků.

Po homogenizaci a zvážení všech 170 vybraných vzorků následovalo přidání 1 ml n-hexanu obsahujícího 5ug/ml 1-brom dodekanu a extrakce ultrazvukem, při níž byla sada 16 lahviček vystavena ultrazvuku po dobu 10 minut. Voda v ultrazvuku byla před každou dávkou vyměněna za novou studenou vodu (cca 10 °C).

Posledním krokem postupu bylo vložení vzorků do odstředivky na 10 minut při 4000 otáčkách. Následně se pomocí pasterovy pipety převedl výsledný čistý extrakt do vialek s popiskem.

4.3 Analýza pomocí plynové chromatografie

Analýza byla uskutečněna za použití plynového chromatografu typu Agilent 7890 B a hmotnostního spektrometru Leco Pegasus 4D s průtokovým detektorem. Vzorky byly nastříkovány pomocí multifunkčního autosampleru (MPS, Gerstel, USA) do split/splitless nástřikového prostoru. Pro separaci byla použita kolona HP 5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25µm; délka, vnitřní průměr, tloušťka filmu stacionární fáze) spojená v modulátoru s 1,5m středně polární kolony VF17 MS (0,1 mm x 0,1 µm). Teplotní program vypadal, jak uvedeno v tabulce č. 2 níže.

Tabulka č. 2: Nastavení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE GC	
Nástřík	Cold Splitless (do 20 °C) vyhřáto grad 8 do 275 °C
Teplota pece	40 °C (2 min), 10 °C/min do 100 °C a 5 °C/min do 320 °C
Sekundární pec	teplotní program kopíroval program primární pece s odstupem + 5 °C
Modulátor teploty	teplotní program kopíroval program primární pece s odstupem + 15 °C
Nosný plyn	Helium
Rychlost průtoku	1 mL/min
Teplota transferline	280 °C

Hmotnostní spektrometrie MS	
Ionizace	Electron Impact (-70 eV)
Hmotnostní rozsah	35–500 m/z
Solvent delay	550 s
Akviziční hmotnost	100 spekter /s
Iontový zdroj	250 °C

4.4 Zpracování dat

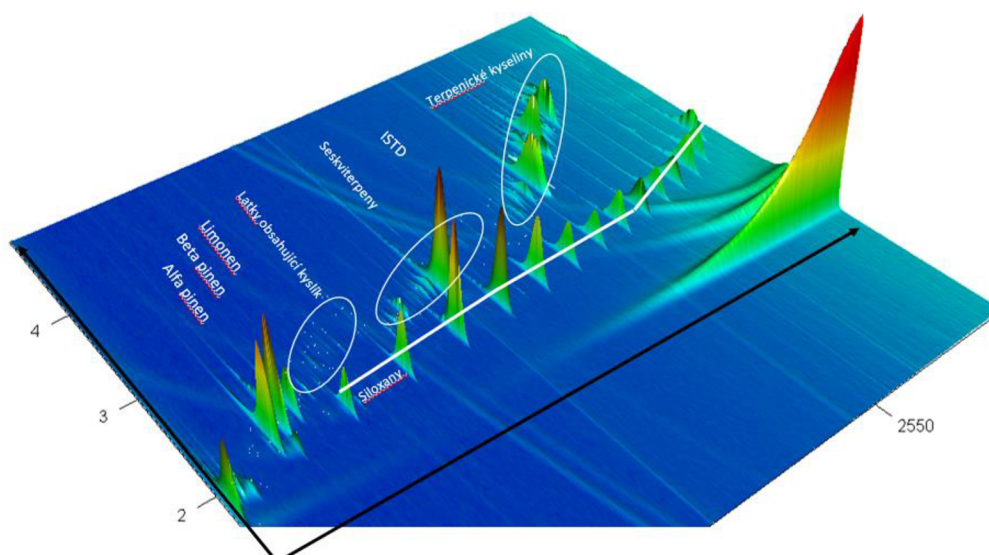
Změřená data byla zpracována v softwaru přístroje Chroma TOF (LECO, USA). V tomto programu byly automaticky vzhledány signály větší než S/N 25, provedena spektrální dekonvoluce jejich hmotnostních spekter a sloučeniny seřazeny ve všech vzorcích do jedné tabulky. Pro přepsání signálu, resp. jeho plochy do tabulky byl použit parametr porovnání v ostatních vzorcích. Porovnávala se shoda retenčního času – ten musel být +/- 1 modulační perioda (5 s) shodný. V tomto rozsahu retenčního času musel být pro přepsání přítomen signál, jehož hmotnostní spektrum se na 65 % shodovalo s hmotnostními spektry dříve zpracovaných signálů v ostatních vzorcích v tomto retenční čas.

Předběžná identifikace látky byla provedena na základě porovnání dekonvulovaného hmotnostního spektra se spektry uvedenými v databázi NIST (NIST 2017). Následné potvrzování identity bylo prováděno pouze u látek, které jsou dále v textu zmiňovány. V ten případ se porovnával retenční čas a hmotnostní spektra s naměřeným roztokem standardních látek nebo retenční indexy změřené (vypočtené porovnáním s retenčními časy řady alkanů) s retenčními indexy ve sbírce knihovny NIST.

Tabulka byla převedena do aplikace MS Excel, byly z ní odstraněny znečišťující látky (rozpouštědla, migranty kolon a apod.) a hodnoty všech ploch všech látek byly vyděleny plochou kvantifikační hmoty vnitřního standardu. Tím byla zkorigována teoreticky možná chyba změn citlivosti stanovení v průběhu měření. Dále takováto data umožňují posouzení rozdílů v kvantitách sloučeniny v jednotlivých vzorcích. Z důvodu automatického výběru unikátních kvantifikačních hmot pro jednotlivé sloučeniny ale získaná data neumožňují posuzovat rozdíly v kvantitách látek v jednom vzorku. Dále byla provedena normalizace na sumu (všechny zkorigované odezvy byly vyděleny sumou všech zkorigovaných odezev v jednom vzorku). Přenásobením takto vzniklých hodnot koeficientem 100 bylo získáno procentické zastoupení látky, resp. její redukované plochy vzniklé integrací specifické hmoty, ve vzorku. Pro úplnost byla provedena i transformace CLR (Centred log ratio transformation). Na extrahované látkové profily se použilo statistické vyhodnocení pomocí PCA a OPLS-DA.

5 Výsledky

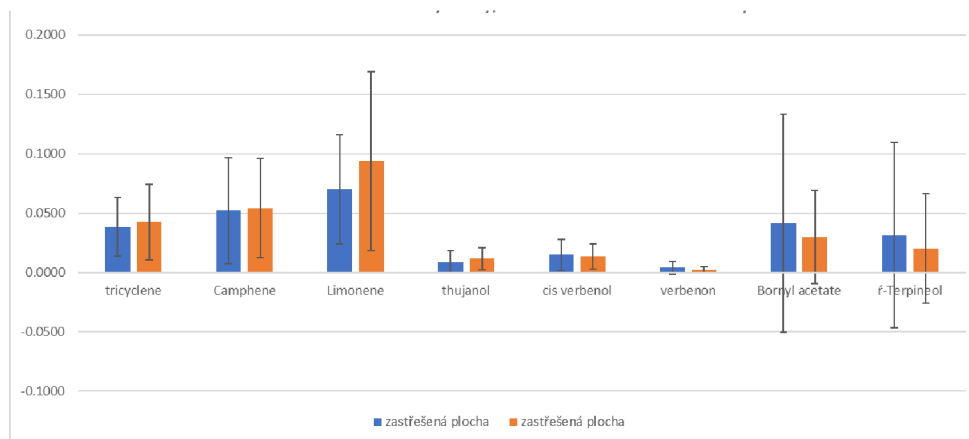
Pro separaci a následnou identifikaci látek byla použita pokročilá instrumentace dostupná na FLD, konkrétně dvourozměrná plynová chromatografie spojená s průletovou hmotnostní spektrometrií. Charakteristický výstup z této techniky ukazuje Obr. 7. Tradiční separace na nepolární koloně je doplněna separací na středně polární a výrazně kratší koloně, která umožňuje oddělit složky vzorku, které by při jednorozměrné chromatografii zůstaly v koeluci. Toto se týká cílových látek (terpenické sloučeniny atd) i necílových – separovaných siloxanů i nespecifického tzv. „bleedu“ z kolony. Výsledkem použití kompletní dvoudimenzionální chromatografie je tedy lepší separace což v důsledku má význam v lepší možnosti identifikace, resp. Kvantifikace látek z důvodu 1) čistších hmotnostních spekter a 2) vyšší citlivosti, dosažené modulací signálů.



Obrázek č. 7: Zobrazení plynové chromatografie

Pro komplexnější posouzení odlišností mezi vzorky byla ve zbytku po extrakci zjištěna sušina. Mírně nižší sušina, tedy větší obsah vody (55 % vs 52 %) ve vzorcích z kontrolních ploch není vzhledem k standardní odchylce statisticky prokazatelný (95% interval spolehlivosti).

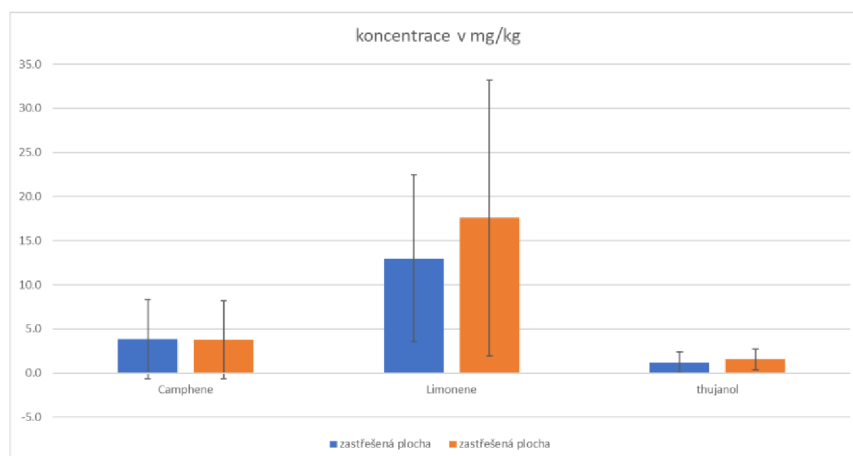
Z hlediska posouzení obsahu terpenických látek byly porovnávány průměrné hodnoty ve skupině zastřešených a nezastřešených stromů. Hodnoty byly normalizovány odezvou vnitřního standardu a upraveny, tak aby vyjadřoval, hodnotu na sušinu. Takto lze prezentovat a porovnávat i sloučeniny pro které nejsou dostupné analytické standardy. Graf ukazující porovnání vybraných, takto zpracovaných odezev ukazuje Obr. 8.



Obrázek č. 8: Graf odezvy kvantifikační hmoty látky/ odezva kvantifikační hmoty ISTD (Chybové úsečky jsou $\pm 1xSD$)

Jelikož alfa – i beta- pinen byl svou odezvou mimo lineární rozsah detekce, resp. kvantifikace, nebyl v následujícím posuzování použit. Pro tricyklen, terpenickou sloučeninu s nejnižší retencí, byla zjištěna mírně vyšší koncentrace ve vzorcích referenčních, nicméně obdobně jako u sušiny není tento rozdíl statisticky významný (hladina významnosti 0,05).

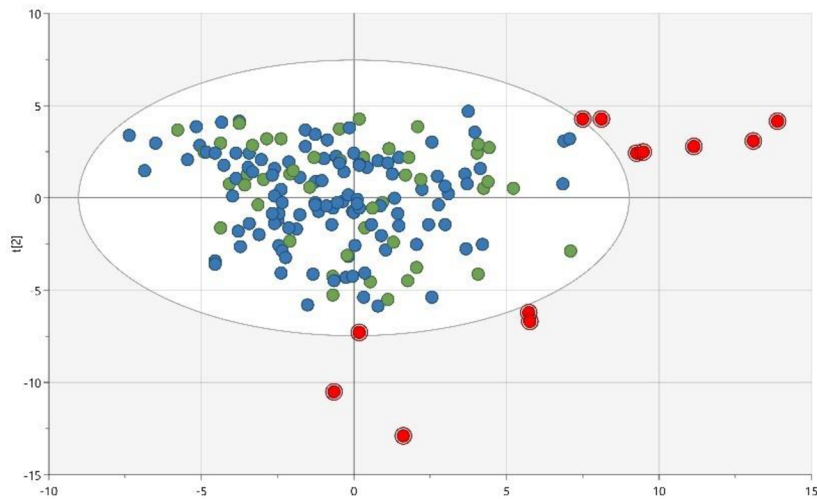
Platnost tohoto postupu ilustruje následující graf, který u vybraných sloučení ukazuje kvantitu, získanou z dat z Obr. 9 po aplikaci rovnice externí kalibrační křivky, vzniklé proměšením roztoku standardní látky o různých koncentracích za přítomnosti vnitřního standardu o stejné koncentraci jako ve vzorcích. Zjištěný rozdíl v koncentracích je v obou případech stejný.



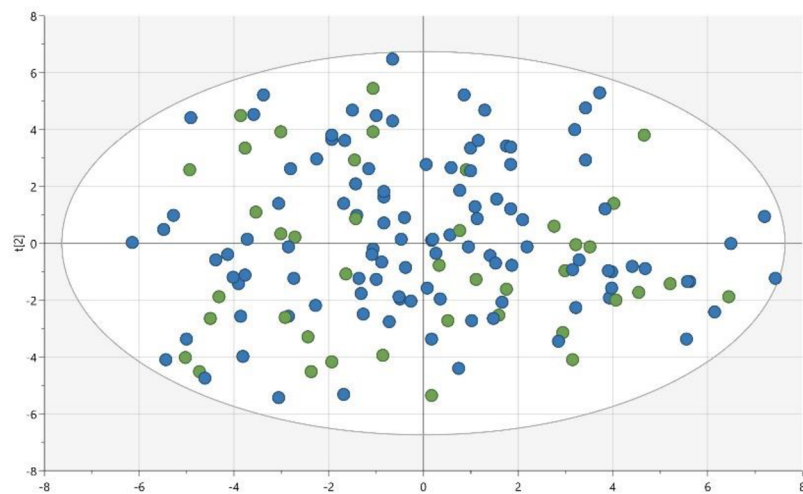
Obrázek č. 9: Graf vybraných sloučení po aplikaci rovnice externí kalibrační křivky (Chybové úsečky jsou $\pm 1xSD$)

Po základním zpracování dat – nalezení chromatografických signálů, jejich spektrální dekonvoluci a alignmentu, byla získaná tabulka zredukována o signály, které příslušely látkám, jejichž původ nelze předpokládat ve vzorcích. Jednalo se zejména o siloxany, migranty z plastů, případně z rozpouštědla. Po přečištění dat byla tabulka normalizovaných odezvy zpracována pomocí analýzy hlavních komponent PCA s cílem

identifikovat potenciální seskupení vzorků na základě jejich vzájemné podobnosti a identifikovat vzorky, které se těmito podobnostem vymykaly. Vzorky jsou v základním zobrazení znázorněny ve dvourozměrném prostoru ohraničujícím obdélníkem zvaným Hotellingova elipsa (nastavena interval spolehlivosti 95 %). Jako odlehlé jsou označeny vzorky, které se nacházejí mimo tento kruh (Obr. 10). U těchto vzorků byl zjištěn důvod jejich odlehlosti – tyto vzorky obsahovaly výrazně vyšší množství terpenických látek. Obrázek komponentního skóre vysvětluje 24% variance v datech. Ve snaze dosáhnout vyššího vysvětlení (a hlavně zjištění, zda dojde k separaci dle námi očekávaných skupin vzorků) byly odlehlé vzorky odstraněny. Po dvojnásobném odstranění odlehlých vzorků další PCA analýza provedená na takto upraveném datasetu ukázala lepší vysvětlení ($R^2_{\text{cum}} = 79\%$). Dalším odstraňováním odlehlých vzorků se vysvětlovací schopnost modelu nezlepšovala.

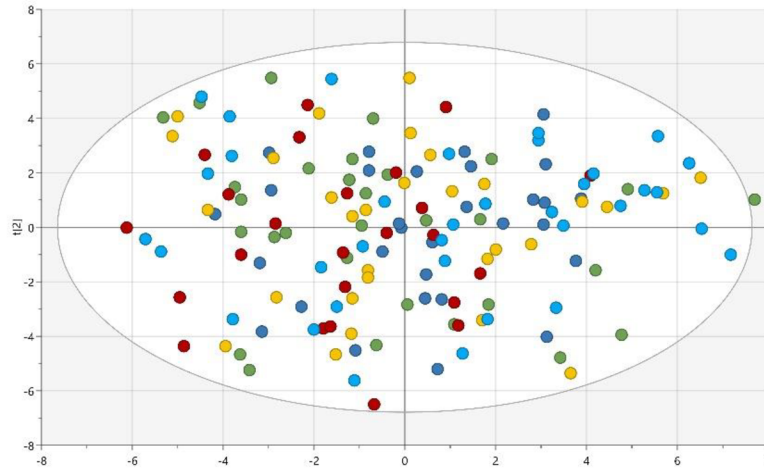


Obrázek č. 10: PCA graf komponentního skóre, modře – kontrolní vzorky, zeleně vzorky ze zastřešených stromů, červeně označeny vzorky odlehlé, které se v dalším grafu analýzy již nepoužily



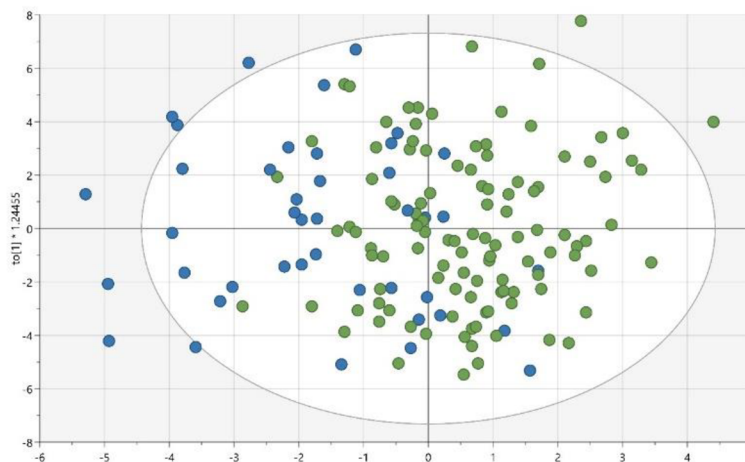
Obrázek č. 11 : PCA graf komponentního skóre, modře – kontrolní vzorky, zeleně vzorky ze zastřešených stromů

V konečném zobrazení výsledků PCA analýzy (Obr. 11) jsme nezjistili, že by separace souhlasila s jakýmkoli dalšími dostupnými informacemi o vzorcích. Konkrétně nedošlo k separaci ani podle zastřešení (pod střechou vs kontrolní) ani podle umístění stromů (pod střechou / na kraji lesa / kontrolní v lese bez střechy), ani podle čísla plochy, kde byly vzorky odebírány (Obr. 12).



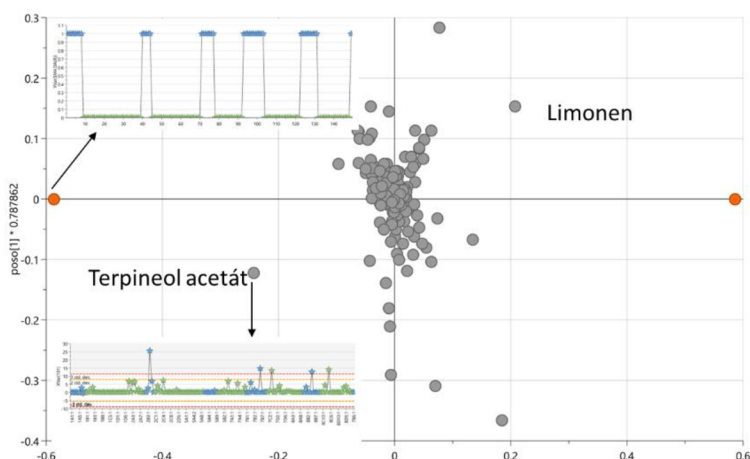
Obrázek č. 12: PCA graf komponentního skóre, barvy rozdělené podle ploch sběru (1-zelená; 2-modrá; 5-červená; 7-žlutá; 8-světle modrá)

Z tohoto datasetu byla dále vytvořena OPLS-DA s cílem vylepšit separaci na základě dodané informace o třídivé příslušnosti vzorků (zastřešení, číslo plochy). Ačkoli grafický výstup z této analýzy (Obr. 13) ukazuje částečnou separaci stromů zastřešených (zelené body), parametry modelu $R^2X_{cum}=0.15$, $R^2Y_{cum}=0.35$, $Q^2_{cum}=-0,01$ ukazují, že model nepasuje dobře na data a predikční schopnost zjištěná vnitřní mnohonásobnou křížovou validací dosahuje hodnoty blízko 0. Cluster v obou třídách je rozsáhlý (R^2X) a kvalita separace tříd od sebe (R^2Y) dosahuje pouze 35 %, čemuž odpovídá značný překryv skupin vzorků. Predikční schopnost potom ukazuje, že tento model, na základě dříve řečeného nijak překvapivě, nebude schopen správně určit neznámý vzorek.



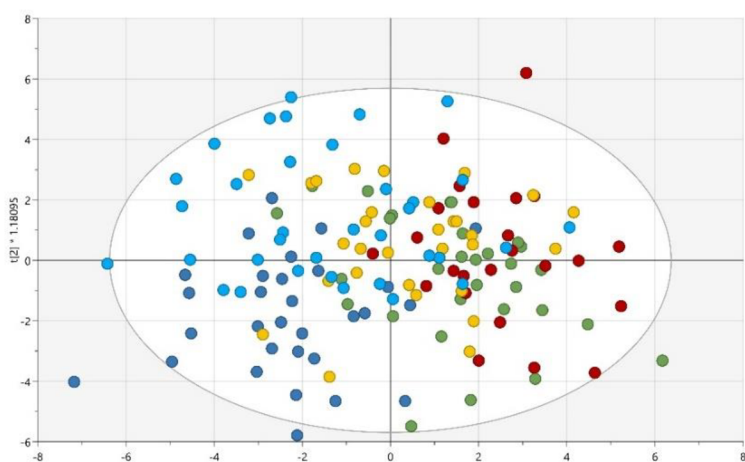
Obrázek č. 13: OPLS-DA graf komponentního skóre (modře – kontrolní vzorky, zeleně - vzorky ze zastřešených stromů)

Pro tento graf komponentního skóre byl vyexportován i graf vlivů (Obr. 14), který ukazuje, že dalece největší význam pro uvedenou separaci měly uměle dodané proměnné (oranžově – unikátní pro každou ze tříd). V tomto OPLS-DA grafu komponentního skóre dvou ploch (2 – modrá; 5 – červená) jsou vnořeny průběhy umělé proměnné, charakteristické pro zastřešené stromy a jedné reálně změřené proměnné – terpineol acetátu. Je vidět že vypovídací schopnost relativního zastoupení této látky je malá – vyskytuje se jen v málo vzorcích a její průběh není ve zvolených skupinách opakovatelný.



Obrázek č. 14: Graf vlivů umělé proměnné a jedné reálně změřené proměnné – terpineol acetátu.

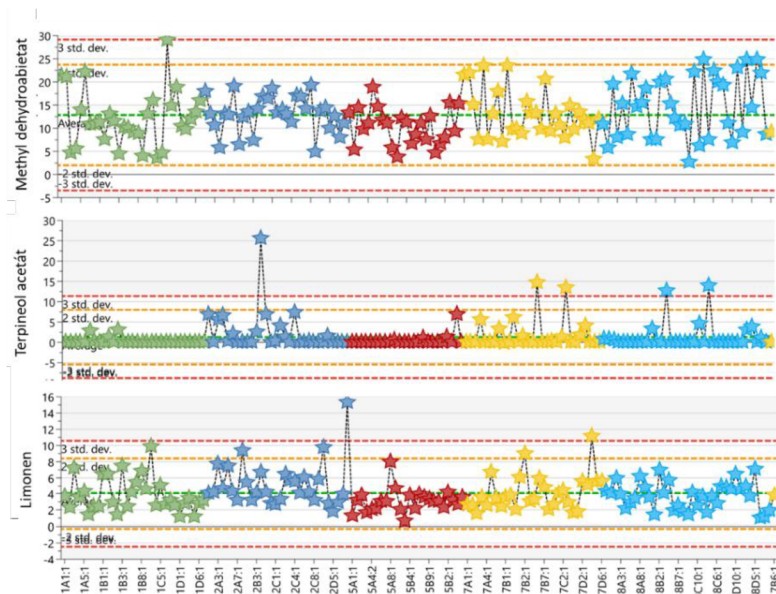
Nicméně, pokud použijeme jako označení tříd čísla ploch, ze kterých byly vzorky odebrány, dosáhneme separace, jak je uvedeno na obrázku 15. Parametry modelu nejsou nijak přesvědčivé $R^2X_{cum}=0,27$, $R^2Y_{cum}=0,38$, $Q^2_{cum}=0,20$. To odpovídá velké variabilitě v profilech látek, změřených ve vzorcích odebraných ze stromů na všech plochách.



Obrázek č. 15: PCA graf komponentního skóre podle ploch sběru (1- zelená; 2-modrá; 5-červená; 7-žlutá; 8-světle modrá)

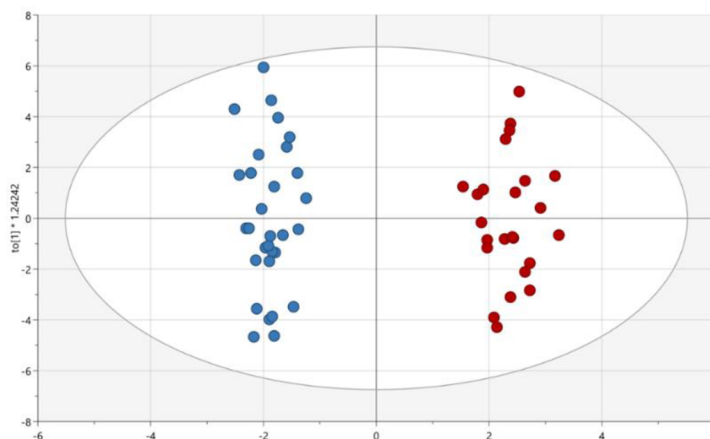
Pomocí variable importance plot zobrazení byly vybrány pro další zkoumání látky, které mají největší význam pro uvedenou separaci. Jednalo se o metyl dehydroabietát,

terpineol acetát a limonen – jejich variable line plots ukazující jejich výskyt ve vzorcích ukazuje obrázek 16. Je vidět, že hladiny methyl dehydroabietátu a limonenu oscilují okolo průměru hodnot v celém datasetu (zelená čárkovaná čára), nicméně např. u limonenu je většina hodnot u vzorků z plochy 5 pod průměrem, stejně jako v případě methyl dehydroabietátu. Zastoupení terpineol acetátu bylo popsáno dříve.



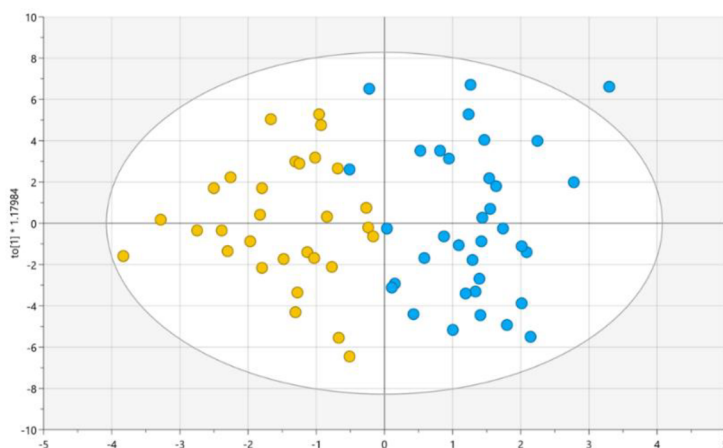
Obrázek č.16: Variable importance plot-zastoupení methyldehydroabietátu, limonenu a terpinol acetátu v jednotlivých plochách

Vzhledem k tomu, že v OPLS-DA grafu komponentního skóre je patrná tendence ke shlukování, zejména vzorků z plochy 2 a z plochy 5, byl dataset zúžen pouze na tyto dvě skupiny, s cílem určit za tuto separaci zodpovědné látky. Výsledné parametry ($R^2X_{cum}=0.49$, $R^2Y_{cum}=0.97$, $Q^2_{cum}=82$) i grafické vyobrazení výsledku ukazují dobrou separaci mezi skupinami i dobrou spolehlivost modelu ověřenou vnitřní křížovou validací (Obr. 17). Nejvíce zodpovědné látky jsou v pořadí důležitosti pro separaci methyldehydroabietát, limonen, verticilol, terpineol acetát.



Obrázek č.17: OPLS-DA grafu komponentního skóre dvou ploch (2 – modrá; 5 – červená)

Bylo testováno, zda se podaří výše uvedeným postupem získat markery i pro méně dobře separované skupiny z plochy 7 a 8 (viz Obr. 12). Zde sice bylo dosaženo graficky zajímavého výsledku (Obr. 18), nicméně predikční síla modelu byla blízko 0, a proto nebyly zodpovědné látky dale identifikovány.



Obrázek č.18: OPLS-DA grafu komponentního skóre dvou ploch (7 – žlutá; 8 – světle modrá)

6 Diskuze

Na výzkum vzorků byla použita dvourozměrná plynová chromatografie spojená s hmotnostně spektrometrickou detekcí a průletovým hmotnostním analyzátozem. Tato technika se ukázala jako vhodná pro tento účel. Jelikož jsme se soustředili na necílovou analýzu, s výhodou byla použita hmotnostně spektrometrická detekce – podařilo se touto technikou identifikovat látky na základě porovnání získaných spekter se spektry ve spektrálních knihovnách.

Analyzovány byly extrakty lýka ze smrku ztepilého. Kvalitativní a kvantitativní složení těchto sloučenin závisí na řadě faktorů, včetně anatomické části stromu (jehličí, větve nebo šišky), genetických faktorů a zdravotního stavu rostlin, stejně jako na prostředí, lokalitě, kvalitě světla, sezónních změnách a použitých technikách stanovení (Figueiredo et al., 2008; Visan et al., 2021). z výše uvedeného můžeme předpokládat, že u každé rostliny bude složení extrahovatelných látek do jisté míry jedinečné. V této práci bylo použito lýko smrku ztepilého z předem vybraných stromů, které se vyskytovaly na velmi podobných lokalitách.

Těkavé sloučeniny jehličnatých dřevin jsou monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny (Visan et al., 2021). Tato studie smrku ztepilého s tímto tvrzením souhlasí. Nejpočetnější chemickou třídou ve zkoumaných extraktech popsanych v literatuře jsou tak monoterpeny následované diterpeny a seskviterpeny (Schoss et al., 2022).

Smrky, které byly vzorkovány v této studii se vyskytovaly pod zastřešením přes jeden celý rok. Vzorky použité v této práci byly sbírány v první polovině července roku 2022. Při komplexním posouzení odlišností mezi vzorky byly zjištěny vysoké koncentrace monoterpenů, zejména alfa a beta pinenu, běžných složek oleoresinu smrku (Martin et al., 2002; Sallas et al., 2003). Dle Cojocariu et al. (2004), se porovnávání složení silice *Picea abies* množství monoterpenů a seskviterpenů v jednotlivých ročních obdobích může statisticky odlišovat.

Z hlediska kvantitativního nebyla v koncentraci vybraných terpenů zjištěna významná odlišnost mezi stromy kontrolními a zastřešenými. Naproti tomu např. Kainulainen et al. (2011), při výzkumu vlivu podmáčení a stresu suchem zjistil vyšší koncentrace tricyklénu, alpha-pinenu a kamfénu u stromů vystavených suchu než u stromů kontrolních (hladina významnosti 0,05). Celkový obsah terpenů byl rovněž vyšší u stromů vystavených stresu. Je možné se domnívat, že extrémní klimatické jevy, jako jsou například dlouhodobá období sucha a vlny vysokých teplot, již ovlivňují stav porostů ve střední Evropě (IPCC, 2007; Seidl et al., 2017), což pravděpodobně zvýší riziko napadení hmyzem a úhynu stromů v lesním prostředí, které je adaptováno na mírné vegetační podmínky. Je možné, že se stres suchem na obsahu těkavých látek zkoumaných stromů ještě neprojevil, nebo naopak jsou stromy již probíhajícími extrémními podmínkami „imunizované“ a proto jejich reakce v tomto parametru neodpovídá ve starší literatuře nalezeným výsledkům.

Z hlediska necílové analýzy, bylo zjišťováno, které látky z celého naměřeného profilu v extraktech nejvíce souhlasí s popisem vzorků z hlediska zastřešení. Nutno podotknout, že velká variabilita v zastoupení látek v jednotlivých stromech neumožnila

vytvořit pomocí multivariační statistické analýzy model, který by měl přijatelné validační parametry pro dané rozdělení. Proto nebylo ani možno identifikovat látky, které by na takové rozdělení měly vliv.

Nicméně, vzhledem k přijatelnému procentu vysvětlené variance v datech zpracovaných pomocí PCA bylo dále zkoumáno, s jakou známou vlastností vzorků toto souvisí. Jak již bylo řečeno, nejednalo se o zastřešení/ nezastřešení a ani o přítomnost/nepřítomnost vzorkovaných stromů na rozhraní lesa/paseky. V případě použití ploch jako třídových identifikátorů se objevil náznak separace při použití OPLS-DA právě podle toho ze které sublokality na Kostelecku byly vzorky odebrány. Na výsledcích OPLS-DA analýzy při rozdělování dobře a nedokonale separovaných skupin vzorků již v PCA je vidět, že není možno se pouze spokojit s grafickým výstupem z programu, ale je nutné také posoudit výsledné parametry modelu, zejména predikční sílu spočítanou vnitřní krosvalidací.

Jako nejvíce určující látky, u přijatelných modelů, byly identifikovány limonen, terpineol acetát a methyl dehydroabietat. Ve studiích na borovice montereyské (*Pinus radiata*) bylo zjištěno, že limonen snižoval pro škůdce *T. piniperda* atraktivitu stromů i lapačů. V důsledku těchto výsledků reagovaly nenapadené stromy na vyšší teploty příznivěji, co se obsahu terpenů týče (Romon et al., 2017). Limonen může být jedním z primárních inhibitorů mikroorganismů. Je tedy možné, že stromy na ploše číslo 2 by mohly, v případě antiatraktivních vlastností limonenu i proti *Ips typographus* být více chráněné. Limonen je uváděn pro *Ips typographus* jako obzvláště toxická chemická látka, spolu s myrcenem a-3-karenem. Jako jejich účinky můžeme uvést omezení hloubení chodeb nebo kladení vajíček (Wallin et Raffa, 2002). Limonen může dále potlačovat in vitro vývoj *Endoconidiophora polonica*, což je houbový symbiont *I. typographus*. (Novak et al., 2013).

Alfa-terpineol acetát je p-menthanový monoterpenoid odvozený od kardamomové kyseliny. Vypadá jako bezbarvá látka s jemnou vůní. V přítomnosti katalyzátorů typu H-beta zeolitu lze syntetizovat alfa-terpineol z alfa-pinenu (Surburg et Panten, 2016).

Methyldehydroabietát je v literatuře zmiňován jako diterpenová složka oleoresinu, (Zeneli et al., 2006). (Burčová et al., 2018) prezentuje mikrobicidní účinky této sloučeniny in vitro, zatímco Marešová et al. (2020), uvádí jeho vyšší odezvy v extraktech smrkového lýka do souvislosti s umístěním stromu ve vnitřním porostu lesa. Relativní množství methyldehydroabietátu bylo nadprůměrně vysoké u stromů nacházejících se v interiéru lesa a nadprůměrně nízké u stromů nacházejících se na okraji lesa.

Verticiol je monoterpenový alkohol. Běl u napadených stromů *Picea abies* houbou druhu *Heterobasidion* obsahovala podstatně více této látky (Nagy et al., 2022). Antifungální účinky této látky byly dále potvrzeny v práci Karličic et al. (2021), při výzkumu kůry *Pinus sylvestris*, jako i antibakteriální a antioxidační vlastnosti. Rozdílné složení lýka, zejména ve souvislosti s antinutričními látkami může mít vliv na akceptanci stromu pro kolonizaci lýkožroutem a jeho následný vývoj v lýku, nicméně sledování této souvislosti nebylo zadáním této práce.

7 Závěr

Práce se zabývala analýzou volatálních organických látek smrku ztepilého (*Picea abies*, L.) ve stresových podmínkách suchem, způsobených jejich zastřešením.

Vzhledem k současnému stavu klimatu a stále se zvyšujícímu výskytu suchých období je důležité porozumět, jak stromy reagují na stresové podmínky. Diplomová práce poskytuje poznatky o těkavých organických látkách ve floému smrku ztepilého, které mohou hrát důležitou roli v ochraně stromů proti stresovým podmínkám.

Hlavním cílem bylo posoudit, jaké je zastoupení těkavých chemických látek ve floému smrku ztepilého. Z výsledků necílové analýzy prostřednictvím metod PCA a OPLS-DA založených na změřených vzorcích vyplývá, že zastoupení těkavých organických látek ve floému není významně ovlivněno stresovými podmínkami způsobenými suchem. V rámci studovaných oblastí nebyl zjištěn žádný podstatný rozdíl v obsahu těkavých látek mezi smrky zastřešenými a smrky v přirozeném prostředí. Ukázalo se, že zastoupení látek je v lýku odebraném ze smrků pěstovaných na různých plochách různé. Největší rozdíly byly zjištěny u čtyř látek, a to methyldehydroabitátu, verticilolu, limonenu a terpinol acetátu.

Přestože zastoupení těkavých látek ovlivněné stresovými podmínkami nebylo patrné diplomová práce nabízí popis těchto látek a zkoumá možné mechanismy obrany stromů proti různým stresorům. Práce přináší poznatky pro další výzkum v této oblasti. V tom by bylo záhodno propojit získaná data s dalšími měřeními na stejných stromech – analýzu netěkavých látek, a fyziologická měření, což by do budoucna mohlo lépe porozumět vlivu stresu suchem na strom. Tyto poznatky by potom mohly pomoci lesnickým a ochranářským organizacím v plánování opatření na ochranu lesů v době klimatické změny a zvyšujícího se sucha.

8 Literatura

ADAMOVIÁ, Tereza, HRADECKÝ, Jaromír a PÁNEK, Miloš. Volatile Organic Compounds (VOCs) from Wood and Wood-Based Panels: Methods for Evaluation, Potential Health Risks, and Mitigation. *Polymers*, 2020, Vol. 12, no. 10, 2289. DOI 10.3390/polym12102289

ADAMOVIÁ, Tereza, HRADECKÝ, Jaromír a PRAJER, Marek. VOC emissions from spruce strands and hemp shive: In search for a low emission raw material for bio-based construction materials. *Materials*. 2019. Vol. 12, no. 12. DOI 10.3390/ma12122026.

ADAMS, Robert. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. 2005 Carol Stream. 16. 65-120. ISBN 9780931710858

ALLEN, Craig D, MACALADY, Alison K, CHENCHOUNI, Haroun, BACHELET, Dominique, MCDOWELL, Nate, VENNETIER, Michel, KITZBERGER, Thomas, RIGLING, Andreas, BRESHEARS, David D, HOGG, E H (Ted), GONZALEZ, Patrick, FENSHAM, Rod, ZHANG, Zhen, CASTRO, Jorge, DEMIDOVA, Natalia, LIM, Jong-Hwan, ALLARD, Gillian, RUNNING, Steven W, SEMERCI, Akkin a COBB, Neil. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management. online*. 2010. Vol. 259, no. 4, pp. 660–684. DOI 10.1016/j.foreco.2009.09.001.

ALTMAN, Jan, FIBICH, Pavel, SANTRUCKOVA, Hana, DOLEZAL, Jiri, STEPANEK, Petr, KOPÁČEK, Jiří, HUNOVA, Iva, OULEHLE, Filip, TUMAJER, Jan a CIENCIALA, Emil. Environmental factors exert strong control over the climate-growth relationships of *Picea abies* in Central Europe. *Science of The Total Environment*. 2017. Vol. 609, pp. 506–516. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.07.134.

AUGUSTO, Laurent, RANGER, Jacques, BINKLEY, Dan a ROTHE, Andreas. Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Ann. For. Sci*, 2002. Vol. 59, no. 3, pp. 233-253. DOI: 10.1051/forest:2002020

BAATH, M. H. a BURZO, I. Quantitative and qualitative seasonal variation of volatile oil from 16 conifer species. *An. Stiintifice Univ. Al. I. Cuza Iasi*, 2009, Vol.55, pp 103- 110.

BAUER K., GARBE D., SURBURG H., *Common Fragrance and Flavor materials: Preparations, properties, and uses*, 4th ed., Wiley, New York, 2001 ISBN: 978-3-527-61237-6

BEALE, David J, PINU, Farhana R, KOUREMENOS, Konstantinos A, POOJARY, Mahesha M, NARAYANA, Vinod K, BOUGHTON, Berin A, KANOJIA, Komal, DAYALAN, Saravanan, JONES, Oliver A H a DIAS, Daniel A. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 2018. Vol. 14, no.11, pp. 152. DOI 10.1007/s11306-018-1449-2.

BECK, Christoph F. Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta*, 2005, Vol. 222, no.5, pp. 743-756.

BIRGERSSON, Göran, SCHLYTER, Fredrik, LÖFQVIST, Jan a BERGSTRÖM, Gunnar. Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology*. online. 1984. Vol. 10, no. 7, pp. 1029–1055. DOI 10.1007/BF00987511.

CAUDULLO, Giovanni, TINNER, Willy a DE RIGO, Daniele. *Picea abies* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J.; de Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston Durrant, T.; Mauri, A. (eds.) *European Atlas of Forest Tree Species* (pp. 114-116). Luxembourg: Publication Office of the European Union 2016. ISBN 9789279367403.

COJOCARIU, Cristian, KREUZWIESER, Jürgen a RENNENBERG, Heinz. Correlation of short-chained carbonyls emitted from *Picea abies* with physiological and environmental parameters. *New Phytologist*, 2004, Vol. 162, no. 3, pp. 717-727.

ČERMÁK, Petr, KOLÁŘ, Tomáš, ŽID, Tomáš, TRNKA, Miroslav a RYBNÍČEK, Michal. Norway spruce responses to drought forcing in areas affected by forest decline. *Forest Systems*. 2019. Vol. 28, no. 3. DOI 10.5424/fs/2019283-14868.

AGOSTINI-COSTA, Tânia, Roberto, VIEIRA, Bizzo, HUMBERTO, Damaris, SILVEIRA a GIMENES, Marcos. Secondary Metabolites. *Chromatography and Its Applications. InTech*. 2012. DOI 10.5772/35705.

DICKE, Marcel a BALDWIN, Ian T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. *Trends in Plant Science*. online. 2010. Vol. 15, no. 3, pp. 167–175. DOI [10.1016/j.tplants.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.002).

DICKE, Marcel a LORETO, Francesco. Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends in plant science*, 2010. Vol. 15 no. 3, pp. 115–117. DOI 10.1016/j.tplants.2010.01.007

DIXON, Richard A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. online. 2001. Vol. 411, no. 6839, pp. 843–847. DOI 10.1038/35081178.

FACCOLI, Massimo a SCHLYTER, Fredrik. Conifer phenolic resistance markers are bark beetle antifeedant semiochemicals. *Agricultural and Forest Entomology*. 2007. Vol. 9, no. 3, pp. 237–245. DOI 10.1111/j.1461-9563.2007.00339.x.

FILER, Denis a FARJON, Aljos. *An Atlas of the World's Conifers: An Analysis of their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status*. ISBN 978-90-04-21180-3.

FIGUEIREDO, A. Cristina, José G. BARROSO, Luis G. PEDRO a Johannes J. C. SCHEFFER. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2008, Vol. **23**, no. 4, pp. 213–226. ISSN 0882-5734. DOI 10.1002/ffj.1875

FISCHBACH, R. J., ZIMMER, I., STEINBRECHER, R., PFICHNER, A., a SCHNITZLER, J. P. (). Monoterpene synthase activities in leaves of *Picea abies* (L.) Karst. and *Quercus ilex* L. *Phytochemistry*, 2000. Vol. 54, no.3, pp. 257–265. DOI10.1016/s0031-9422(00)00119-9

FRANCESCHI, Vincent R, KREKLING, Trygve a CHRISTIANSEN, Erik. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (*Pinaceae*) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. *American Journal of Botany*. 2002. Vol. 89, no. 4, pp. 578–586. DOI 10.3732/ajb.89.4.578.

FUNK, J. L., MAK, J. E. a LERDAU, M. T. Stress-induced changes in carbon sources for isoprene production in *Populus deltoides*. *Plant, Cell & Environment*, 2004, Vol. 27, no.6, pp. 747-755.

GARZOLI, Stefania, MASCI, Valentina Laghezza, CARADONNA, Valentina, TIEZZI, Antonio, GIACOMELLO, Pierluigi a OVIDI, Elisa. Liquid and Vapor Phase of Four Conifer-Derived Essential Oils: Comparison of Chemical Compositions and Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Pharmaceuticals* [online]. 2021, Vol. **14**, no.2, pp. 134. ISSN 1424-8247. DOI 10.3390/ph14020134

GELY, Claire, LAURANCE, Susan G W a STORK, Nigel E. How do herbivorous insects respond to drought stress in trees? *Biological Reviews*. 2020. Vol. 95, no. 2, pp. 434–448. DOI 10.1111/brv.12571.

GILMORE, A R. Effects of soil moisture stress on monoterpenes in loblolly pine. *J Chem Ecol*. 1977. Vol. 3, pp. 667–676. DOI 10.1007/BF00988066

GOODACRE, Royston, VAIDYANATHAN, Seetharaman, DUNN, Warwick B, HARRIGAN, George G a KELL, Douglas B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*. online. 2004. Vol. 22, no. 5, pp. 245–252. DOI 10.1016/j.tibtech.2004.03.007.

GREENWOOD, Sarah, RUIZ-BENITO, Paloma, MARTÍNEZ-VILALTA, Jordi, LLORET, Francisco, KITZBERGER, Thomas, ALLEN, Craig D, FENSHAM, Rod, LAUGHLIN, Daniel C, KATTGE, Jens, BÖNISCH, Gerhard, KRAFT, Nathan J B a JUMP, Alistair S. Tree mortality across biomes is promoted by drought intensity, lower wood density and higher specific leaf area. *Ecol Lett*, 2017. Vol. 20. pp. 539–553. DOI 10.1111/ele.12748

HAMMERSCHMIDT, Ray. Phenols and plant–pathogen interactions: The saga continues. *Physiological and Molecular Plant Pathology – PHYSIOL MOLEC PLANT PATHOL*. 2005. Vol. 66, pp. 77–78. DOI 10.1016/j.pmpp.2005.08.001.

HARTMANN, Thomas. *Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view*. online. 1996. Springer Netherlands. ISBN 978-94-009-1720-0.

HOLOPAINEN, Jarmo K a GERSHENZON, Jonathan. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*. online. 2010. Vol. 15, no. 3, pp. 176–184. DOI 10.1016/j.tplants.2010.01.006.

HÜBSCHMANN, H.-J. *Handbook of GC-MS—Fundamentals and Applications*, 3rd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2015.

CHENG, A X, LOU, Y G, MAO, Y B, LU, S, WANG, L J a CHEN, X Y. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. online. 2007. Vol. 49, no. 2, pp. 179–186. DOI 10.1111/j.1672-9072.2006.00395.x.

CHRISTENSEN, Jens, HEWITSON, Bruce, BUSUIOC, Aristita, CHEN, Anthony, GAO, Xiaoqing, HELD, Isaac, JONES, R, KOLLI, Rupakumar, KWON, Won-Tae, LAPRISE, René, RUEDA, Valery, MEARNES, Linda, MENÉNDEZ, Claudio, RÄISÄNEN, Jouni, RINKE, Annette, SARR, Abdoulaye a WHETTON, Penny. *Regional climate projections. In: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. pp. 847–940. ISBN 978-0-521-70596-7.

ISAH, Tasiu. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological research*. 2019. Vol. 52, no.1, pp, 39. DOI 10.1186/s40659-019-0246-3

JACTEL, Hervé, PETIT, Jérôme, DESPREZ-LOUSTAU, Marie Laure, DELZON, Sylvain, PIOU, Dominique, BATTISTI, Andrea a KORICHEVA, Julia. Drought effects on damage by forest insects and pathogens: A meta-analysis. *Global Change Biology*. 2012. Vol. 18, no. 1, pp. 267–276. DOI 10.1111/j.1365-2486.2011.02512.x.

JAKUŠ, Rastislav, BLAZENEC, Miroslav, GURTSEV, Alexander, HOLUSA, Jaroslav, HROŠŠO, Branislav, KRENOVA, Zdenka, LONGAUEROVA, Valeria, RESNEROVÁ, Karolina, MAJDÁK, Andrej, MEZEI, Pavel a SLIVINSKÝ, Ján. *Princípy ochrany dospelých smrekových porastov pred podkôrným hmyzom*. 2015. ISBN 978-80-89408-21-4.

JOHNSTONE, Jill F, ALLEN, Craig D, FRANKLIN, Jerry F, FRELICH, Lee E, HARVEY, Brian J, HIGUERA, Philip E, MACK, Michelle C, MEENTEMEYER, Ross K, METZ, Margaret R, PERRY, George L W, SCHOENNAGEL, Tania a TURNER, Monica G. Changing disturbance regimes, ecological memory, and forest resilience. *Front Ecol Environ* 2016. Vol. 14, no. 7, pp. 369–378, DOI [10.1002/fee.1311](https://doi.org/10.1002/fee.1311)

KAINULAINEN, P, OKSANEN, Jari, PALOMAKI, V, HOLOPAINEN, Jarmo a HOLOPAINEN, Toini. Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany*. 2011. Vol. 70, pp. 1613–1616. DOI 10.1139/b92-203.

KAMM, Chantel D, TAWARA, Jeanne N a STERMITZ, Frank R. Spruce budworm larval processing of piperidine alkaloids from spruce needles. *Journal of chemical ecology*, 1998 Vol. 24, pp. 1153-1160.

KANDASAMY, Dineshkumar, GERSHENZON, Jonathan a HAMMERBACHER, Almuth. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology*. online. 2016. Vol. 42, no. 9, pp. 952–969. DOI 10.1007/s10886-016-0768-x

KANDASAMY, Dineshkumar, GERSHENZON, Jonathan, ANDERSSON, Martin N a HAMMERBACHER, Almuth. Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *ISME Journal*. březen 2019. Vol. 13, no. 7, pp. 1788–1800. DOI 10.1038/s41396-019-0390-3.

KAPPERS, Iris F, AHARONI, Asaph, VAN HERPEN, Teun W J M, LUCKERHOFF, Ludo L P, DICKE, Marcel a BOUWMEESTER, Harro J. Genetic Engineering of Terpenoid Metabolism Attracts Bodyguards to Arabidopsis. *Science*. online. 2005. Vol. 309, no. 5743, pp. 2070–2072. DOI 10.1126/science.1116232.

KARLIČIĆ, Vera, ZLATKOVIĆ, Milica, JOVIČIĆ-PETROVIĆ, Jelena, NIKOLIĆ, Milan P., ORLOVIĆ Saša a RAIČEVIĆ, Vera. Trichoderma spp. from Pine Bark and Pine Bark Extracts: Potent Biocontrol Agents against Botryosphaeriaceae. *Forests* [online]. 2021, Vol. 12, n.12, 1731. ISSN 1999-4907. DOI 10.3390/f12121731

KEGGE, Wouter a PIERIK, Ronald. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science*. online. 2010. Vol. 15, no. 3, pp. 126–132. DOI 10.1016/j.tplants.2009.11.007.

KESSELMEIER, J a STAUDT, M. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry*. online. 1999. Vol. 33, no. 1, pp. 23–88. DOI 10.1023/A:1006127516791.

KIRISITS, T. Fungal associates of european bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: LIEUTIER F, DAY K, BATTISTI A, GRÉGOIRE JC, EVANS H (eds) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. 2004. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 181–236

KLIMO, E., HAGER, H., a KULHAVÝ, J. *Spruce monocultures in central Europe: problems and prospects*. 2000. Vol. 33. Joensuu, Finland: European Forest Institute. ISSN 1237-8801

KOLÁŘ, Tomáš, ČERMÁK, Petr, TRNKA, Miroslav, KOŇASOVÁ, Eva, SOCHOVÁ, Irena a RYBNÍČEK, Michal. Dendroclimatic study of a mixed spruce-fir-beech forest in the Czech Republic. *Les/Wood*. březen 2020. Vol. 69, no. 1, pp. 21–32. DOI 10.26614/les-wood.2020.v69n01a02.

KOPÁČEK, Jiří, HEJZLAR, Josef, KAŇA, Jiří, PORCAL, Petr a TUREK, Jan. The sensitivity of water chemistry to climate in a forested, nitrogen-saturated catchment recovering from acidification. *Ecological Indicators*. online. 2016. Vol. 63, pp. 196–208. DOI 10.1016/j.ecolind.2015.12.014.

KROKENE, Paal. *Conifer Defense and Resistance to Bark Beetles*. In: *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. Elsevier Inc. pp. 177–207. ISBN 9780124171732.

KUMAR, A Ramesh a SIVAPERUMAL, P. Analytical methods for the determination of biomarkers of exposure to phthalates in human urine samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. online. 2016. Vol. 75, pp. 151–161. DOI 10.1016/j.trac.2015.06.008.

KURZ, Werner A, STINSON, Graham, RAMPLEY, Gregory J, DYMOND, Caren C a NEILSON, Eric T. Risk of natural disturbances makes future contribution of Canada's forests to the global carbon cycle highly uncertain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. Vol. 105, no. 5, pp. 1551–1555. DOI 10.1073/pnas.0708133105

TAIZ L. a ZEIGER E. *Plant physiology*. 5. vydání. *Sunderland. Sinauer Associates*. 2010. pp 782. ISBN 0878938664

LÅNGSTRÖM, B O, LINDELÖW, Åke, SCHROEDER, Martin, BJÖRKLUND, Niklas a ÖHRN, Petter. *The spruce bark beetle outbreak in Sweden following the January-storms in 2005 and 2007*. I/In: IUFRO Forest Insect and Disease Survey in Central Europe, September 15-19 2008, Štrbské Pleso, Slovakia.

LIEUTIER, François. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe : a synthesis*. Kluwer Academic Publishers. ISBN 9781402022401.

LINDON, John C. HPLC–NMR–MS: past, present and future. *Drug Discovery Today*. online. 2003. Vol. 8, no. 22, pp. 1021–1022. DOI 10.1016/S1359-6446(03)02843-5.

LORETO, Francesco a D'AURIA, Sabato. How do plants sense volatiles sent by other plants? *Trends in Plant Science*. online. 2022. Vol. 27, no. 1, pp. 29–38. DOI 10.1016/j.tplants.2021.08.009.

LOVESTREAD, Tara a URNESS, Kimberly. Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). online. březen 2019. ASM Handbook, Volume 10: Materials Characterization. Získáno z:
https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=926655

MAATEN-THEUNISSEN, Marieke Van Der, KAHLE, Hans Peter a MAATEN, Ernst Van Der. Drought sensitivity of Norway spruce is higher than that of silver fir along an altitudinal gradient in southwestern Germany. *Annals of Forest Science*. březen 2013. Vol. 70, no. 2, pp. 185–193. DOI 10.1007/s13595-012-0241-0.

MAHER, E A, BATE, N J, NI, W, ELKIND, Y, DIXON, R A a LAMB, C J. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. online. 1994. Vol. 91, no. 16, pp. 7802–7806. DOI 10.1073/pnas.91.16.7802.

MAHMOUD, Soheil S a CROTEAU, Rodney B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*. online. 2002. Vol. 7, no. 8, pp. 366–373. DOI 10.1016/S1360-1385(02)02303-8.

MAIMONE, Thomas J a BARAN, Phil S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nature Chemical Biology*. online. 2007. Vol. 3, no. 7, pp. 396–407. DOI 10.1038/nchembio.2007.1.

MANSFELD, V. Norway spruce in forest ecosystems of the Czech Republic in relation to different forest site conditions. *Journal of Forest Science*. online. 2011. Vol. 57, no. 11, pp. 514–522. DOI 10.17221/14/2011-JFS.

MAREŠOVÁ, Jana, MAJDÁK, Andrej, JAKUŠ, Rastislav, HRADECKÝ, Jaromír, KALINOVÁ, Blanka a BLAŽENEC Miroslav. The short-term effect of sudden gap creation on tree temperature and volatile composition profiles in a Norway spruce stand. *Trees* [online]. 2020, Vol.34, no.6, pp. 1397–1409. ISSN 0931-1890. DOI 10.1007/s00468-020-02010-w

MARSTON, Andrew a HOSTETTMANN, Kurt. Natural product analysis over the last decades. *Planta medica*, 2009. Vol. 75, no. 7, pp. 672–682. DOI 10.1055/s-0029-1185379

MARTIN, Diane, THOLL, Dorothea, GERSHENZON, Jonathan a BOHLMANN, Jörg. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiology*. 2002. Vol. 129, no. 3, pp. 1003–1018. DOI 10.1104/pp.011001.

MAURI, Achille, GIRARDELLO, Marco, STRONA, Giovanni, BECK, Pieter S A, FORZIERI, Giovanni, CAUDULLO, Giovanni, MANCA, Federica a CESCATTI, Alessandro. EU-Trees4F, a dataset on the future distribution of European tree species. *Scientific Data*. březen 2022. Vol. 9, no. 1. DOI 10.1038/s41597-022-01128-5.

MCDOWELL, Nate, POCKMAN, William T, ALLEN, Craig D, BRESHEARS, David D, COBB, Neil, KOLB, Thomas, PLAUT, Jennifer, SPERRY, John, WEST, Adam, WILLIAMS, David G a YEPEZ, Enrico A. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?.. *New Phytologist*, 2008. Vol. 179, pp. 719-739. DOI 10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x

METSÄMUURONEN, Sari a SIRÉN, Heli. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Reviews* [online]. 2019, Vol.18, no. 3, pp. 623–664. ISSN 1568-7767. DOI 10.1007/s11101-019-09630-2

MUSILOVÁ, Jindra a GLATZ, Zdeněk, *Metabolomika-Základní Pojmy, Strategie A Metodologie*. Chem. Listy 2011. Vol. 105, no. 10, pp. 745–751.

NAGY, Nina Elisabeth, NORLI, Hans Ragnar, FONGEN, Monica, ØSTBY, Runa Berg, HELDAL, Inger M., DAVIK, Jahn a HIETALA, Ari M. Patterns and roles of lignan and terpenoid accumulation in the reaction zone compartmentalizing pathogen-infected heartwood of Norway spruce. *Planta* [online]. 2022, Vol. 255, no. 3. ISSN 0032-0935. DOI 10.1007/s00425-022-03842-1

NETHERER, Sigrid, KANDASAMY, Dineshkumar, JIROSOVÁ, Anna, KALINOVÁ, Blanka, SCHEBECK, Martin a SCHLYTER, Fredrik. Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. *J Pest Sci.* 2021. Vol. 94, pp. 591–614. DOI 10.1007/s10340-021-01341-

NETHERER, Sigrid, MATTHEWS, Bradley, KATZENSTEINER, Klaus, BLACKWELL, Emma, HENSCHKE, Patrick, HIETZ, Peter, PENNERSTORFER, Josef, ROSNER, Sabine, KIKUTA, Silvia, SCHUME, Helmut a SCHOPF, Axel. Do water-limiting conditions predispose Norway spruce to bark beetle attack? *New Phytologist.* 1 únor 2015. Vol. 205, no. 3, pp. 1128–1141. DOI 10.1111/nph.13166.

NINEMETS, Ülo. Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences. *Trends in plant science.* březem 2009. Vol. 15, pp. 145–153. DOI 10.1016/j.tplants.2009.11.008.

NOVAK, Metka, RAJNC, Andreja Urbanek K, LAH, Ljerka, ZUPANEC, Neja, KRAŠEVEC, Nada, KRIŽMAN, Mitja, BOHLMANN, Joerg a KOLEM, Radovan. Low-density *Ceratocystis polonica* inoculation of Norway spruce (*Picea abies*) triggers accumulation of monoterpenes with antifungal properties. *European Journal of Forest Research* [online]. 2014, Vol.133, no.4, pp. 573–583. ISSN 1612-4669. DOI 10.1007/s10342-013-0772-4

OKSMAN-CALDENTY, Kirsi-Marja. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science.* březem 2004. Vol. 9, pp. 433–440. DOI 10.1016/j.tplants.2004.07.006.

ORAV, A., KAILAS, T. a LIIV, M. Analysis of terpenoid composition of conifer needle oils by steam distillation/extraction, gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* [online]. 1996, Vol. 43, n. 3-4, pp. 215–219. ISSN 0009-5893. DOI 10.1007/bf02292955

PEÑUELAS, Josep a STAUDT, Michael. BVOCs and global change. online. 2010. Vol. 15, no. 3, pp. 133–144. DOI 10.1016/j.tplants.2009.12.005.

PICKETT, Steward T a WHITE, P S. *The ecology of natural disturbance and patch dynamics.* Academic Press. ISBN 0125545207.

RADULESCU, Victorita, SAVIUC, Crina, CHIFIRIUC, Mariana, OPREA, Eliza, VISAN, Diana – Carolina, MARUTESCU, L a LAZAR, Veronica. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Shoots Spruce (*Picea abies* L). *Revista de Chimie.* březem 2011. Vol. 62, pp. 69–74.

REICHENBACH, Stephen E, TIAN, Xue, CORDERO, Chiara a TAO, Qingping, 2012. Features for non-targeted cross-sample analysis with comprehensive two-dimensional chromatography. *Journal of Chromatography A*. online. 2012. Vol. 1226, pp. 140–148. DOI 10.1016/j.chroma.2011.07.046.

ROBARDS, Kevin, PRENZLER, Paul D, TUCKER, Greg, SWATSITANG, Prasan a GLOVER, William. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. online. 1999. Vol. 66, no. 4, pp. 401–436. DOI 10.1016/S0308-8146(99)00093-X.

ROFFAEL, Edmone. Volatile organic compounds and formaldehyde in nature, wood and wood based panels. *Holz als Roh- und Werkstoff*. online. 2006. Vol. 64, no. 2, pp. 144–149. DOI 10.1007/s00107-005-0061-0.

ROMON OCHOA, Pedro, APARICIO, Domitila, PALACIOS, Francisco, ITURRONDOBEITIA, Juan, HANCE, Thierry a GOLDARAZENA, Arturo. Seasonal Terpene Variation in Needles of *Pinus radiata* (*Pinales: Pinaceae*) Trees Attacked by *Tomicus piniperda* (*Coleoptera: Scolytinae*) and the Effect of Limonene on Beetle Aggregation. *Journal of Insect Science*. 30 září 2017. Vol. 15, pp. 1–6. DOI 10.1093/jisesa/iex066.

SALLAS, Leena, LUOMALA, Eeva-Maria, ULTRIAINEN, Jarkko, KAINULAINEN, Pirjo a HOLOPAINEN, Jarmo. Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. *Tree physiology*. březen 2003. Vol. 23, pp. 97–108. DOI 10.1093/treephys/23.2.97.

SEAGER, Richard, TING, M, HELD, Isaac, KUSHNIR, Yochanan, LU, Jian, VECCHI, Gabriel, HUANG, Huei-Ping, HARNIK, Nili, LEETMAA, Ants, LAU, Ngar-Cheung, LI, Cuihua, NAKAMURA, Jennifer a HENDERSON, Naomi. Model Projections of an Imminent Transition to a More Arid Climate in Southwestern North America. *Science (New York, N.Y.)*. březen 2007. Vol. 316, pp. 1181–1184. DOI 10.1126/science.1139601.

SEIDEL, Dian, FU, Qiang, RANDEL, William a REICHLER, Thomas. Widening of the tropical belt in a changing climate. *Nature Geoscience*. březen 2007. Vol. 1, pp. 21–24. DOI 10.1038/ngeo.2007.38.

SEIDL, Rupert, THOM, Dominik, KAUTZ, Markus, MARTIN-BENITO, Dario, PELTONIEMI, Mikko, VACCHIANO, Giorgio, WILD, Jan, ASCOLI, Davide, PETR, Michal, HONKANIEMI, Juha, LEXER, Manfred J, TROTSIUK, Volodymyr, MAIROTA, Paola, SVOBODA, Miroslav, FABRIKA, Marek, NAGEL, Thomas A a REYER, Christopher P O. Forest disturbances under climate change. *Nature climate change*, 2017. Vol.7, pp. 395–402. DOI 10.1038/nclimate3303

SHARKEY, T. D., LORETO, F. a DELWICHE, C. F. High carbon dioxide and sun/shade effects on isoprene emission from oak and aspen tree leaves. *Plant, Cell & Environment*, 1991, Vol.14, no.3, pp. 333-338.

SCHIEBE, Christian, HAMMERBACHER, Almuth, BIRGERSSON, Göran, WITZELL, Johanna, BRODELIUS, Peter E, GERSHENZON, Jonathan, HANSSON, Bill S, KROKENE, Paal a SCHLYTER, Fredrik. Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia*. březen 2012. Vol. 170, no. 1, pp. 183–198. DOI 10.1007/s00442-012-2298-8.

SCHIEBE, Christian, UNELIUS, C Rikard, GANJI, Suresh, BINYAMEEN, Muhammad, BIRGERSSON, Göran a SCHLYTER, Fredrik. Styrene, (+) -trans-(1R,4S,5S)-4-Thujanol and Oxygenated Monoterpenes Related to Host Stress Elicit Strong Electrophysiological Responses in the Bark Beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology*. online. 2019. Vol. 45, no. 5, pp. 474–489. DOI 10.1007/s10886-019-01070-8.

SCHOSS, Katja, KOČEVAR GLAVAČ Nina a KREFT Samo. Volatile Compounds in Norway Spruce (*Picea abies*) Significantly Vary with Season. *Plants* [online]. 2023, Vol. 12, no.1, pp. 188. DOI 10.3390/plants12010188

SONG, Xuebo, JING, Si, ZHU, Lin, MA, Chenfei, SONG, Tao, WU, Jihong, ZHAO, Qiangzhong, ZHENG, Fuping, ZHAO, Mouming a CHEN, Feng. Untargeted and targeted metabolomics strategy for the classification of strong aroma-type baijiu (liquor) according to geographical origin using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*. online. 2020. Vol. 314. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.126098.

SPIECKER, Heinrich. Silvicultural management in maintaining biodiversity and resistance of forests in Europe—temperate zone. *Journal of Environmental Management*. online. 2003. Vol. 67, no. 1, pp. 55–65. DOI 10.1016/S0301-4797(02)00188-3.

SURBURG, H., a PANTEN, J. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. (H. Surburg & J. Panten, Eds.) *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses* (6nd ed.). Weinheim: Wiley-VCH. (2016).DOI 10.1002/9783527693153.

THOM, Dominik, RAMMER, Werner a SEIDL, Rupert. Disturbances catalyze the adaptation of forest ecosystems to changing climate conditions. *Global Change Biology*. březen 2017. Vol. 23, no. 1, pp. 269–282. DOI 10.1111/gcb.13506.

THOM, Dominik a SEIDL, Rupert. Natural disturbance impacts on ecosystem services and biodiversity in temperate and boreal forests. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. březen 2016. Vol. 91, no. 3, pp. 760–781. DOI 10.1111/brv.12193.

TOMITA, Masaru a NISHIOKA, Takaaki. *Metabolomics: the frontier of systems biology*. Springer-Verlag Tokyo. 2005 ISBN 4431251219.

TRANCHIDA, Peter Q., FRANCHINA, Flavio A., DUGO, Paola a MONDELLO, Luigi. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: Recent evolution and current trends. *Mass Spectrometry Reviews*. 1 červenec 2016. Vol. 35, no. 4, pp. 524–534. DOI 10.1002/mas.21443.

TRAPP, Susan a CROTEAU, Rodney. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. online. 2001. Vol. 52, no. 1, pp. 689–724. DOI 10.1146/annurev.arplant.52.1.689.

KOSKI, Veikko, Skrøppa, Tore, PAULE, Ladislav, H, Wolf a J, Turok, 1997. *Technical Guidelines for Genetic Conservation of Norway Spruce (Picea abies (L.) Karst.)*. ISBN 92-9043-331-X. [online]. Dostupné z: <https://www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/detail/technical-guidelines-for-genetic-conservation-of-norway-spruce-picea-abies-l-karst/>

VACEK, Zdeněk, VACEK, Stanislav, SLANAŘ, Jiří, BÍLEK, Lukáš, BULUŠEK, Daniel, ŠTEFANČÍK, Igor, KRÁLÍČEK, Ivo a VANČURA, Karel. Adaption of Norway spruce and European beech forests under climate change: From resistance to close-to-nature silviculture. *Central European Forestry Journal*. březen 2019. Vol. 65, no. 2, pp. 129–144. DOI 10.2478/forj-2019-0013.

VISAN, Diana-Carolina, OPREA, Eliza, RADULESCU, Valeria, VOICULESCU, Ion, BIRIS, Iovu-Adrian, COTAR, Ani Ioana, SAVIUC, Crina, CHIFIRIUC, Mariana Carmen a MARINAS, Ioana Cristina. Original Contributions to the Chemical Composition, Microbicidal, Virulence-Arresting and Antibiotic-Enhancing Activity of Essential Oils from Four Coniferous Species. *Pharmaceuticals* [online]. 2021, Vol. 14, no. 11, 1159. ISSN 1424-8247. DOI 10.3390/ph14111159

WAJS, Anitra, PRANOVICH, A., REUNANEN, M., WILLFÖR, S. a HOLMBOM, B. Characterisation of volatile organic compounds in stemwood using solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis*. březen 2006. Vol. 17, no. 2, pp. 91–101. DOI 10.1002/pca.891.

WALLIN, Kimberly F. a RAFFA, Kenneth F. Density-mediated responses of bark beetles to host allelochemicals: a link between individual behaviour and population

dynamics. *Ecological Entomology* [online]. 2002, Vol.27, no.4, pp. 484–492. ISSN 0307-6946. DOI 10.1046/j.1365-2311.2002.00431.x

WALLIN, Kimberly F a RAFFA, Kenneth F. Feedback between individual host selection behavior and population dynamics in an eruptive herbivore. *Ecological Monographs*. 2004. Vol. 74, no. 1, pp. 101–116. DOI 10.1890/02-4004.

WERMELINGER, Beat. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*—a review of recent research. *Forest Ecology and Management*. online. 2004. Vol. 202, no. 1, pp. 67–82. DOI 10.1016/j.foreco.2004.07.018.

WHYSNER, John a WILLIAMS, Gary M. d-Limonene mechanistic data and risk assessment: Absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacology & Therapeutics*. online. 1996. Vol. 71, no. 1, pp. 127–136. DOI 10.1016/0163-7258(96)00065-4.

WOLKOFF, Peder. Volatile organic compounds. *Indoor Air, Suppl*, 1995. Vol. 3, pp. 1-73.

ZENELI, Gazmend, KROKENE, Paal, CHRISTIANSEN, Erik, KREKLING, Trygve a GERSHENZON, Jonathan. Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree physiology*. 2006. Vol. 26, pp. 977-88. DOI 10.1093/treephys/26.8.977.

ZHAO, Tao, KROKENE, Paal, HU, Jiang, CHRISTIANSEN, Erik, BJÖRKLUND, Niklas, LÅNGSTRÖM, Bo, SOLHEIM, Halvor a BORG-KARLSON, Anna Karin. Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, no. 10. DOI 10.1371/journal.pone.0026649.

ZULAK, Katherine G, LIPPERT, Dustin N, KUZYK, Michael A, DOMANSKI, Dominik, CHOU, Tina, BORCHERS, Christoph H a BOHLMANN, Jörg. Targeted proteomics using selected reaction monitoring reveals the induction of specific terpene synthases in a multi-level study of methyl jasmonate-treated Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Journal*. březen 2009. Vol. 60, no. 6, pp. 1015–1030. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.04020.x.

