

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Indukovaná obrana smrku ztepilého proti herbivorům
v podmínkách akutního stresu na čerstvé porostní stěně**

Diplomová práce

Autor: Bc. Eliška Sládková

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

2020/2021

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Eliška Sládková

Lesní inženýrství
Lesní inženýrství

Název práce

Indukovaná obrana smrku ztepilého proti herbivorům v podmínkách akutního stresu na čerstvé porostní stěně

Název anglicky

Induced defense of Norway spruce (*Picea abies*) against herbivores in condition of acute stress on fresh forest edge

Cíle práce

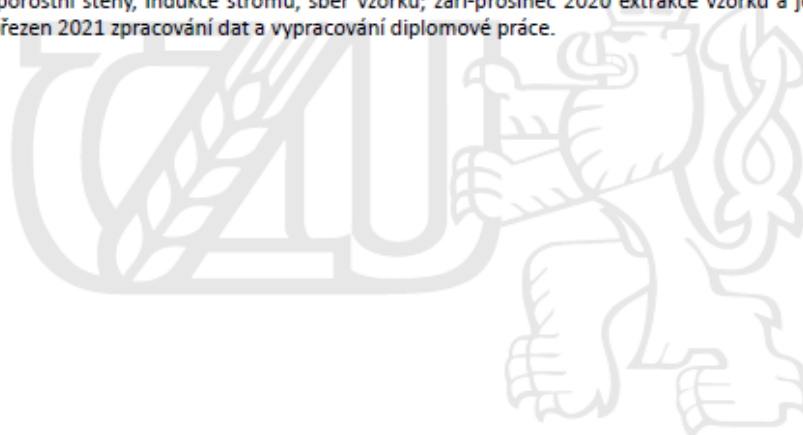
Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.) je agresivní druh kůrovce napadající smrk ztepilý, který v současné době způsobuje ve střední Evropě rozsáhlé kůrovcové kalamity. Jednou z příčin je snížená obranyschopnost smrků vystavených různým druhům stresu, jako náhlé oslunění, zvýšená teplota nebo sucho. Při náletu lýkožrouta smrkového na smrk indukují zavrtávající se brouci lokální obranu stromu, kdy v místě závrtu dochází k aktivaci biosyntézy sekundárních obranných metabolitů (terpenů, fenolických látek), které jsou pro brouky toxické. Tyto děje jsou regulovány rostlinným hormonem kyselinou jasmonovou. Schopnost indukované obrany je jedním z nástrojů resistance smrku proti ataku brouků a závisí krom dalších jako je porostní, stanovištní a genetický faktor především na míře a průběhu stresu, kterému je strom vystaven. Běžnou příčinou akutního stresu v lesních ekosystémech je vznik čerstvé porostní stěny, ať již po těžbě, nebo po polomech. Smrky na porostních stěnách jsou pak často prvním cílem náletu kůrovců, odkud se napadení šíří do zapojeného lesa.

Cílem diplomové práce bude porovnat schopnost indukované obrany vzrostlých (60-100 let starých) smrků, které byly vystaveny akutnímu stresu z náhlého oslunění po vykácení čerstvé porostní stěny s indukovanou obranou stromů v zapojeném lese. Dalším úkolem bude určit, zda se indukované obranné metabolity lišily u stromů, které byly později napadeny lýkožroutem smrkovým. V diskuzi potom zhodnotit, zda náhlý vznik porostní stěny oslabuje schopnost indukované obrany těchto smrků proti napadení kůrovcem a zda napadené stromy měly nižší schopnost indukce obranných látek než stromy resistentní.

Metodika

Pokus je situován do lokality ŠLP Kostelec nad Černými Lesy, kde v porostu dospělých smrků jsou vykáceny jižně orientované porostní stěny, čítající 3 až 6 monitorovaných stromů v první linii. Stromy na porostních stěnách a na porostních stanovištích v zapojeném lese se lokálně injektují methyl jasmonátem, analogem rostlinného hormonu, vyvolávajícím místní indukovanou obranu smrku. Po 3 týdnech se odebírají 3 sekce kůry s lýkem o průměru 8 mm v okolí indukce, a na kontrolním úseku stromu, neovlivněném methyl

jasmonátem. Vzorke budou v laboratoři extrahovány a obsah terpenických a dalších nízkomolekulárních obranných látek bude analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Po zpracování příslušnými softwary bude určena jak relativní kvantita obranných metabolitů, tak bude porovnáno jejich složení a bude zhodnoceno, zda se lišily v závislosti na ošetření. Harmonogram: duben-červen 2020, vykácení porostní stěny, indukce stromů, sběr vzorků; září-prosinec 2020 extrakce vzorků a jejich analýza; leden-březen 2021 zpracování dat a vypracování diplomové práce.



Doporučený rozsah práce

50-60 stran

Klíčová slova

smrk ztepilý, indukovaná obrana, terpeny, porostní stěna, Lýkožrout smrkový

Doporučené zdroje informací

- Diane Martin, Dorothea Tholl, Jonathan Gershenzon, and Jorg Bohlmann: Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems. *Plant Physiol.* Vol. 129, 2002, 15.5.2020-16-17,6. sber.
- Christian Schiebe, Almuth Hammerbacher, Göran Birgersson, Johanna Witzell, Peter E. Brodelius, Jonathan Gershenzon, Bill S. Hansson, Paal Krokene, Fredrik Schlyter Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia* (2012) 170:183–198 DOI 10.1007/s00442-012-2298-8
- Markus Kautz, Reinhard Schopf & Joachim Ohser The "sun-effect": Microclimatic alterations predispose forest edges to bark beetle infestations, *Eur J Forest Res* (2013) 132:453-465 DOI 10.1007/s10342-013-0685-2
- Nadir Erbilgin Ć Paal Krokene Ć Erik Christiansen, Gazmend Zeneli Ć Jonathan Gershenzon Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces host colonization by the bark beetle *Ips typographus* *Oecologia* (2006) 148: 426–436 DOI 10.1007/s00442-006-0394-3
- Pavel Mezei 1,*, Mária Potterf 1,2, Jaroslav Škvarenina 3, Jakob Gulddahl Rasmussen 4 and Rastislav Jakuš 1,5 Potential Solar Radiation as a Driver for Bark Beetle Infestation on a Landscape Scale, *Forests* 2019, 10, 604; doi:10.3390/f10070604
- Yingnan Li, Wanmo Kang, Yiwen Han, Youngkeun Song: Spatial and temporal patterns of microclimates at an urban forest edge and their management implications *Environ Monit Assess* (2018) 190: 93 <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6430-4>
-

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Ing. Barbora Stříbrská, Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2020

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 16. 4. 2021

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 16. 04. 2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Indukovaná obrana smrku ztepilého proti herbivorům v podmínkách akutního stresu na čerstvé porostní stěně vypracovala samostatně pod vedením Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a použila jsem jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Tato diplomová práce by nevznikla bez pomoci lidí, kteří mě nejen vedli, ale i morálně podporovali. Mé velké díky patří vedoucí práci Ing. Anně Jirošové, Ph.D., která se mnou měla až neskonalou trpělivost a zároveň mě dokázala odborně dovést až k úspěšnému konci. Za velmi cenné rady děkuji Ing. Barboře Stříbrské, která mě lidsky, ale i odborně dokázala provést celou diplomovou prací. Poslední poděkování patří mé rodině a přátelům.

Abstrakt

L. smrkový se řadí mezi kalamitní škůdce hlavně na smrku ztepilém (*Picea abies*), který se v našich podmínkách využívá jako hlavní hospodářská dřevina. Obranaschopnost smrku ovlivnil nárůst průměrných teplot, mírné zimy a sucho způsobené nedostatkem srážek.

Tato diplomová práce se zabývá výzkumem indukované obrany smrku při náhlém vystavení akutnímu stresu, který byl způsobem vykácením části porostu a vznikem čerstvé porostní stěny, která byla orientována na jižní stranu. Experiment se zakládal na lokální aplikaci rostlinného hormonu methyl jasmonátu (MeJA) do lýka smrků. MeJA spouští indukci obranných látek, které stromy produkují na obranu proti herbivorům (včetně 1. smrkového) a patogenům. Analýza látek byla provedena metodou GC/MS a k porovnání složení byl použit metabolický přístup srovnání látek v chromatogramech pomocí PCA analýzy, vybrané látky byly kvantifikovány.

Výsledky komplexní analýzy potvrdili rozdílný obsah obranných látek ve vzorcích ovlivněných aplikací MeJA oproti kontrolním vzorkům, což potvrdilo úspěšnost indukce. Na čerstvé porostní stěně se složení obranných látek signifikantně dle PCA analýzy nesePARovalo od obranných látek ze stromů ve vnitřním lese. Určovali jsme rovněž schopnost indukované obrany na stromech, které byly následně napadeny 1. smrkovým. Složení obranných látek na následně napadených stromech se nelišilo od složení látek na stromech rezistentních. Kvantita vybraných monoterpenů se v rámci různých skupin nelišila signifikantně, ale lze pozorovat trend nižší produkce na porostní stěně a u napadených stromů 1. smrkovým. Fyziologicko-biochemické změny se ve stromech na 2 měsíce staré porostní stěně signifikantně neprojevíly ve schopnosti produkce obranných látek.

Klíčová slova

Smrk ztepilý (*Picea abies*), indukovaná obrana, terpeny, porostní stěna
Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*),

Abstract

Bark beetle belongs to the calamity pest chiefly on the Norway spruce which is being used in our environment as the main source of timber. The resistance of spruce has been affected by the rise of average temperatures, mild winters and draughts caused by low precipitation.

The thesis deals with the research of induced defence of spruce at a sudden exposure to acute stress caused by clearing part of the forest and by development of a new forest edge that was oriented towards south. The experiment was based on local application of the plant hormone methyl jasmonate (MeJA) into the bast of spruces. MeJA triggers the induction of the defensive substances which the trees produce in order to defend against the herbivores (including the spruce bark beetle) and pathogens. The analysis of the substances was carried out by the GC/MS method and for the compositional comparison the metabolic approach of contrasting of substances in chromatograms using the PCA analysis was employed; selected substances were quantified.

The results of the complex analysis confirmed different content of defensive substances in samples modified by MeJA application versus the test sample, which confirmed the success rate of induction. According to the PCA analysis, the composition of the defensive substances of the new forest edge did not considerably significantly separate from the defensive substances of the trees in the inner forest. Also the capability of the induced defence of the trees that were subsequently infested by the spruce bark beetle was determined. The composition of the defensive substances in the subsequently infested trees did not differ from the composition of the substances on the resistant trees. The quantity of selected monoterpenes in various groups was not significantly different but a trend of lower production on the forest edge and in the trees invaded by bark beetles can be observed. There were no significant physiological-biochemical changes in the ability to produce the defensive substances in the trees in the 2-months old forest edge.

Key words

Norway spruce (*Picea abies*), induced defense, terpenes, forest edge, bark beetle (*Ips typographus*),

Obsah

1. Úvod.....	13
2. Cíl.....	15
3. Literární rešerše	16
3.1 Smrk ztepilý.....	16
3.2 Klimatické změny.....	18
3.3 Mikroklima	19
3.4 Lýkožrout smrkový.....	20
3.5 Indukovaná obrana	22
3.5.1 Metyl jasmonát	25
3.6 Metody a analýzy přírodních látek.....	26
3.6.1 Plynová chromatografie.....	26
3.6.2 Hmotnostní spektrometrie	27
3.6.3 Statistické metody	28
4. Metodika.....	29
4.1 Experimentální plocha	29
4.2 Metodický postup při sběru teplotních dat v terénu.....	30
4.3 Sběr vzorků v terénu	30
4.4 Metodický postup při zpracování dat v laboratoři.....	32
4.5 Zpracování dat z GC/MS.....	34
5. Výsledky	35
5.1 Chemické měření	35
5.2. Teplotní měření.....	42
6. Diskuze	44
7. Závěr.....	46
8. Literární zdroje	48

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázky:

Obr. č. 1 Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*); Deml Miroslav 2019, str. 21.

Obr. č. 2 Alpha-pinen, beta-pinen, str. 25.

Obr. č. 3 Mapa zkusných ploch číslo 3 a 4 (Surový, 2020), str. 29.

Obr. č. 4 měřicí senzory umístěné na smrku ztepilém (Extemit, 2020), str. 30.

Obr. č. 5 - Vzorek 4B5T – plocha č. 4, subplocha B, strom č. 5 a odběr treatment, str. 31.

Obr. č. 6 - Vzhled odebraného vzorku před zpracováním. (Sládková) 1. borka; 2. floém (lýko); 3. dřevo, str. 32.

Tabulky:

Tab. č. 1 Zastoupení dřevin na území ČR 2011-2015, (Czech forest, 2018), str. 16.

Tab. č. 2 zastoupení monoterpenů ve vzorcích porostní stěny, zapojených jedinců a subplochy 4 C, str. 40.

Grafy:

Graf č. 1 - Průměrné měsíční teploty vzduchu na území ČR v roce 2019 ve srovnání s normálem 1981–2010; (ČHMÚ, 2019), str. 19.

Graf č. 2 – rozdělení ovlivnění MeJA vs. kontrolní dle PCA analýzy, $R^2X=15\%$, str. 36.

Graf č. 3 – rozdělení ovlivnění MeJA vs. kontrolní dle OPLS-DA metody. $R^2X=15\%$, str. 36

Graf č. 4 – rozdělení chemických sloučenin dle jejich zastoupení ve srovnání s analýzou OPLS-DA, $R^2X = 15\%$, str. 37

Graf č. 5 – porostní stěna vs. vnitřní les pomocí PCA analýzy $R^2X= 20\%$, str. 38

Graf č. 6 – napadení (4 C) vs. nenapadení (4 D, 3 C, 3 D) PCA $R^2X=20\%$, str. 39

Graf č. 7 - napadení (4 C) vs. nenapadení (4 D, 3 C, 3 D) PCA $R^2X=20\%$, str. 39

Graf č. 8 – zastoupení monoterpenů z tabulky č. 2, str. 42

Graf č. 9 - průběh teplot na ploše 3 od 27. 5. 2020 – 16. 6. 2020, str. 43

Graf č. 10 – průběh teplot na ploše 4 od 27. 5. 2020 – 16. 6. 2020, str. 44

Seznam zkratk:

MeJA – methyl jasmonát

JA – kyselina jasmínová

PCA - principal component analysis

GC/MS – gas chromatography/mass spectrometry

ŠLP – školní lesní podnik

RSD – relativní směrodatná odchylka

OPLS – DA ortogonal partial least squares – diskriminant analysis

MLR - multiple linear regression

ILS - inverse least squares

CLS - classical least squares

1. Úvod

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) (Linnaeus, 1758) je dnes velmi diskutované téma z důvodu kůrovcové kalamity. Mezi hlavní důvody rozšíření l. smrkového v takovém množství je skladba lesních porostů a klimatické změny (nárůst teplot, ubývání vody) (Franklin et al, 2021).

Dalším důvodem rychlého šíření l. smrkového jsou klimatické změny, které jsou výrazné v posledních desítkách let. Jedná se o úbytek srážek, celkový úbytek podzemní vody, mírné zimy a zvýšení teplot. Množství vody v půdě ovlivňuje strom především z hlediska tzv. sap flow, což je směr a rychlost proudění vody uvnitř rostliny, které má za účel rozvádět potřebné látky po celé rostlině pro zabezpečení jejího správné fungování (Maseda, 2006). Při menší dostupnosti vody je strom oslabený a jeho obranyschopnost se ještě snižuje, pokud je vystaven oslunění (Netherer et al, 2015). Mezei et al, 2019 zkoumali atraktivitu stromů pro l. smrkového, kdy v podmínkách Vysokých Tater dokázali, že jedinci smrku na více osluněných místech byly napadány jako první. Podobný výzkum probíhal i v Německu, kdy bylo zjištěno, že predispozice k napadení l. smrkovým mají čerstvé porostní stěny orientované na jižní, osluněnou, stranu. Méně atraktivní oproti čerstvé stěně pak byly sousedící stromy/porosty nacházející se kolem nezpracovaného, napadeného, kůrovcového kolečka, ale mnohem více lákavé, než stálé porostní stěny nebo stromy zapojené uvnitř zdravého porostu. Zde lze vidět, že sluneční záření je rozhodující faktor z hlediska predispozice napadení l. smrkovým (Kautz et al, 2013). Právě porostní stěna je velmi důležitou součástí lesních porostů, která může vzniknout přirozeně či z úmyslných a nahodilých těžeb. Přirozená porostní stěna se vyvíjí postupně a stromy jsou přizpůsobené větší zátěži ze stran abiotických i biotických vlivů. Stěna vzniklá z těžby je problematičtější, protože pro stromy představuje náhlý stresový faktor, který ovlivní mikroklima. Za mikroklimatem se pak schovává celá řada důležitých procesů jako je např. udržování vyšší vlhkosti, vody v půdě či snížení teplot (Franklin et al, 2021).

Naše planeta je jedna velká chemická laboratoř, v které se dějí neuvěřitelné věci, které se lidé snaží prozkoumávat a pochopit je. Velmi složité chemické reakce se dějí i v rostlinách, které se díky nim mohou rozmnožovat, komunikovat spolu, ale také se bránit či předem odradit nepřítele od napadení. Tyto obranné procesy nazýváme jako indukovanou obranu rostliny. V indukované obraně hrají nejdůležitější roli terpeny, což je velká skupina sloučenin tvořících se v mevalonátovém cyklu. Z pohledu smrku v boji s l. smrkovým jsou pro nás důležité monoterpeny alpha-pinen, beta-pinen, limonen, beta-phellandren, myrcen a caren. Terpeny jsou tzv. volatilní látky, což jsou těkavé organické sloučeniny, které snadno přechází do plynné fáze. Existuje celá řada dalších terpenů, nicméně ne všechny jsou vědci schopní zjistit z důvodu technologického omezení. Teprve v polovině 20. století vznikla chromatografická metoda na separaci a identifikaci terpenů (Kirchner et al, 1957). Nově využívaný plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrií se zakládá na dvou fázích – první z nich je rozdělení a identifikace jednotlivých složek ze směsi, v druhé fázi pak stanovení hmotnosti jednotlivých částic (Klouda, 2003).

Podstatnou roli v indukované obraně hraje také kyselina jasmonová, která se řadí mezi růstové regulátory a podílí se na fyziologické odpovědi a adaptaci rostliny na stres a reakci na něj. Ester kyseliny jasmínové je methyl jasmonát (MeJA), což je významný buněčný regulátor zprostředkovávající vývojové procesy a obranné reakce rostliny (Jong-Joo et al, 2003).

2. Cíl

Cílem této práce bylo porovnat schopnost indukované obrany vzrostlých smrků ztepilých (*Picea abies*), které byly vystaveny akutnímu stresu z náhlého oslunění po vykácení čerstvé porostní stěny s indukovanou obranou stromů v zapojeném lese. Produkce obranných metabolitů byla indukována rostlinným hormonem methyl jasmonátem. Úkolem bylo analyzovat složení indukovaných obranných látek metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a analýzou PCA komplexních chromatogramů a kvantifikací vybraných látek, zjistit rozdíly mezi stromy na čerstvé porostní stěně a stromy ve vnitřním lese. Dalším úkolem bylo určit, zda se indukované obranné metabolity lišily u stromů, které byly později napadeny lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*). Následně bylo hodnoceno, zda náhlý vznik porostní stěny oslabuje schopnost indukované obrany těchto smrků proti napadení kůrovcem a zda napadené stromy měly nižší schopnost indukce obranných látek než stromy resistantní umístěné v zapojených porostech.

3.Literární řešerše

3.1 Smrk ztepilý

Smrk ztepilý (*Picea abies*) patří do čeledi borovicové (*Pinaceae*) a je jednou z nejrozšířenějších dřevin na území České republiky, kdy jeho zastoupení tvoří 43,1 % z celkového množství 57,8 % zastoupení jehličnatých dřevin, viz tabulka č. 1 (Czech forest, 2018). Jeho vysoké zastoupení je způsobené hojným využíváním k hospodářským účelům díky rychlým přírůstům a krátké době obměty (80 let). Již od 16. století se využíval ke stavebním účelům a jako hlavní zdroj pro tvorbu tepla, k tomu se následně přidal papírenský průmysl a houslařství (Lenoch, 2014).

Skupina dřevin	Zastoupení [%]	Skupina dřevin	Zastoupení [%]
Jehličnany	57,8	Listnáče	42,2
Smrk ztepilý	43,1	Buk lesní	10,5
Jedle bělokorá	0,9	Duby	8,2
Borovice lesní	9,6	Habr obecný	2,4
Modřín evropský	3,2	Javory	4,1
Ostatní jehličnaté	0,9	Jasany	1,6
		Olše	2,4
		Břízy	4,2
		Ostatní list. tvrdé	3,9
		Ostatní list. měkké	4,9

Tab. č. 1 – zastoupení dřevin na území ČR 2011-2015, (Czech forest, 2018)

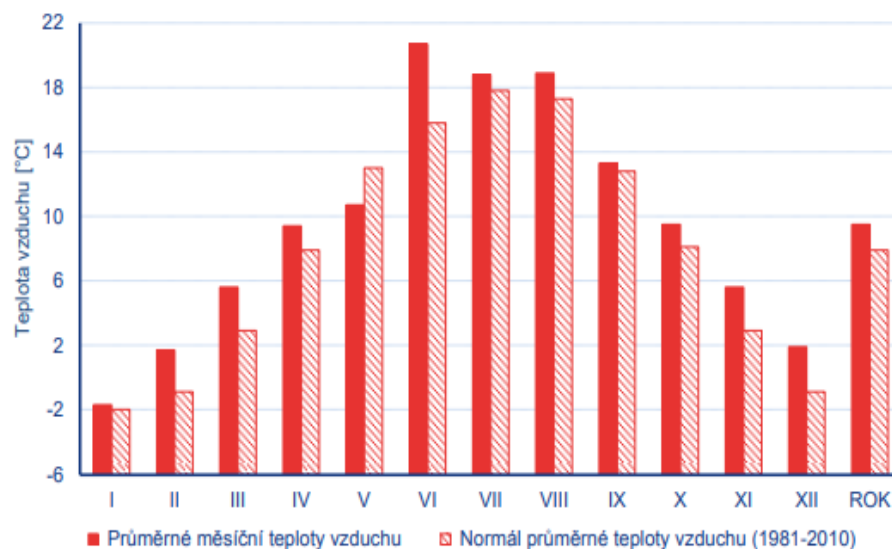
Smrk je stálezelený jehličnan, který dosahuje výšky 30-50 m a jeho přirozený habitat spadá do podhůří a hor Evropy, Běloruska a Povolží. Dožívá se 200–300 let, kdy je schopný rozmnožování přibližně od 60 let věku v periodách čtyř až pěti let. Vyznačuje se pravidelností kmene a kuželovitou korunou, která je často ovlivněna

klimatickými podmínkami. Smrk může být zavětven až k zemi, v případech, kdy stojí sám jako solitér nebo tvoří stěnu porostu. Co se fyziologie týče, pak je to jehličnan s pryskyřičnými kanálky, které mu pomáhají v boji s biotickými útočníky (Hamerník, Musil, 2007).

Na rostliny se musí koukat a zkoumat je více do hloubky než pouhým okem. Zaměříme-li se na pochopení smrku z mikroskopického hlediska, zjistíme, že se jedná o složitý a dobře fungující organismus skládající se z mnoha skupin buněk, kdy každá má svou funkci. Svazky více buněk dohromady tvoří rostlinná pletiva, která se dělí na dělivá a trvalá. Mezi dělivé pletivo se řadí původní, které se nachází na vrcholcích stonků a kořenů. Prvotní, jež se časem mění na pletivo trvalé, druhotné a skryté. Trvalé pletivo se pak dělí dle funkce na krycí (pokožka, průduchy), vodivé (cévní svazky s dřevní částí (xylém) a lýkem (floém), základní (zajišťuje fotosyntézu) a zpevňovací. Dělení dle tloušťky buněk je na parenchym (tenkostěnné buňky), kolenchym (nepravidelně ztlustělé stěny buňky) a sklerenchym (silně ztlustělé stěny buňky). Z hlediska indukované obrany smrku je důležité především trvalé vodivé pletivo – xylém a floém. Xylém neboli dřevo je pletivo zajišťující rozvádění minerálních látek z kořenového systému do celé rostliny. Je tvořen odumřelými buňkami. Floém neboli lýko je naproti tomu pletivo nacházející se přímo pod borkou a jeho funkcí je rozvádění organických živin a produktů fotosyntézy po celé rostlině. Je tvořen výhradně živými buňkami. Všem těmto živinám a produktům se říká míza (Kincl et al, 2005). Mezi hlavní škůdce smrku ztepilého patří výše zmíněný lýkožrout smrkový (*Ips typographus*), bekyně mniška (*Lymantria monacha*), obaleč modřínový (*Zeiraphera griseana*), obaleč smrkový (*Epinotia tedella*), pilatka smrková (*Pristiphora abietina*), ploskohřbetka smrková (*Cephalcia abietis*), lýkoužrout severský (*Ips duplicatus*) a lýkoužrout lesklý (*Pityogenes chalcographus*), (Novotný, 2003). Vyjma obaleče smrkového a pilatky smrkové se všichni řadí mezi kalamitní škůdce podle vyhlášky Ministerstva zemědělství 101/1996 Sb., k zákonu č. 289/1995 Sb., o lesích, ve znění novely č. 236/2000 Sb.

3.2 Klimatické změny

Každý organismus na planetě pro své přežití musí umět rychle reagovat na vnější biotické a abiotické stresory. Mezi abiotické patří např. vítr, sluneční záření, oheň nebo voda, jejíž nedostatek způsobuje dlouhodobé sucho. V České republice, která se nachází v mírném podnebném pásu, páchá nejvíce problémů vítr a nedostatek vody. Vítr má dvě podoby – horizontální a vertikální, kdy vertikální se projevuje především v podobě tornáda a horizontální jako nárazový vítr. V České republice se vyskytuje především horizontální, nárazový, vítr. Především škodám na porostech můžeme správným pěstováním lesa. Námraza se pak objevuje hlavně na jaře a na podzim a jedná se o kapky vody, které po dopadu na větve zmrznou. Celý strom je křehký a stačí menší nárazový vítr, aby nám způsobil zlomy a poškozené celé porosty. S vodou je spojený i další stresor, a to je sucho. Nedostatek srážek a úbytek spodních vod způsobuje dlouhodobý nedostatek vody, jež se projevuje na snížené obranyschopnosti smrku (Novotný, 2003). Sucho má hned několik příčin, mezi hlavní patří nadprůměrné teploty, kdy Český hydrometeorologický ústav zveřejnil zprávu, v které uvádí, že v roce 2019 byla průměrná teplota 9,5 °C, což je o 1,6 °C více než normál mezi roky 1987 a 2010 (viz graf č. 1). Rok 2019 je tedy druhým nejteplejším rokem od roku 1961. V roce 2019 byla nejen zvýšená průměrná teplota, ale také se jednalo o druhý nejsušší rok z pohledu mělkých vrtů a pramenů. Nejsušším rokem dosud zůstává rok 2018 (ČHMÚ, 2019).



Graf č. 1 - Průměrné měsíční teploty vzduchu na území ČR v roce 2019 ve srovnání s normálem 1981–2010; (ČHMÚ, 2019)

3.3 Mikroklima

Velmi důležitá součást lesního ekosystému je tzv. mikroklima, které vzniká na menším území a je ovlivňováno více faktory. Mikroklima je důležité z mnoha důvodů, tím hlavním je lepší udržení vody v dané části porostu a vyšší stabilní vlhkost, nicméně je to velmi křehký systém, v kterém probíhají nejrůznější transpirace, snižování teplot a bránění vysychání půdy. V dnešní době je velmi diskutované téma porostních stěn, kde se vědci snaží podloženými fakty dokázat, že vznikem holin a otevřených stěn lesních porostů dochází k silnému narušení mikroklimatu a vysušování půdy. Pro les je tedy vhodnější podrostní způsob pěstování s velkým procentem využití přirozené obnovy, kdy nám nevznikají velké otevřené plochy (Franklin et al, 2021). Mikroklima dokáže ovlivnit i druhovou konkurenci schopnost, především pak v období sucha či jiného stresu. Ve Španělsku byla zkoumána borovice lesní (*Pinus sylvestris*) v průběhu 35. letého období, kdy byly hodnoceny přírůsty v souvislosti s mikroklimatem. Bylo dokázáno, že se od roku 2005 začínali měnit vzorce přírůstů a nejvýraznější byl pak rok 2012, kdy bylo největší sucho (Marques et al, 2021). Souvislost potvrdil i Krautz et al (2013) v Německu, kde pro výběr hostitelského stromu si l. smrkový vybíral

stromy vystavené náhlému stresu nejen z vyššího dopadu slunečních paprsků, ale také razantní změně mikroklima.

Změny mikroklima se projevují nejvíce právě na okrajích lesa a také v určité časové období dne, kdy nejvýraznější snížení vlhkosti nadchází kolem 16:00. Ovlivnění mikroklima nezasáhne přímo jen okraj lesa, ale dokonce 15 metrů do porostu (Li et al, 2018).

Z hlediska fyziologie rostliny působí mikroklima na udržení vody, která je tak důležitá pro strom z hlediska rozvádění organických i anorganických látek. Množství vody ovlivňuje i proudění pryskyřice díky které může smrk tzv. zalít l. smrkového při jeho začínající kolonizaci. Pokud smrk nemá dostatek vody, pak se mu nejenom nedostává potřebného množství pryskyřice, ale také se zpomalí tvorba obranných látek (Netherer et al, 2015). Mikroklima zahrnuje i teploty kůry, které jsou důležitým aspektem pro l. smrkového z ohledu letové aktivity a následného vývoje pod kůrou. V rámci výzkumu v rakouském Kalkalpenu byl vytvořen model PHENIPS, který zohledňuje mikroklima dané oblasti v souvislosti s průměrnou teplotou. Tento model by měl být schopný předpovědět invazi l. smrkového s odchylkou necelých 2 dnů (Baier et al, 2007).

3.4 Lýkožrout smrkový

Lýkožrout smrkový, (*Ips typographus*), (Linnaeus, 1758) je malý nenápadný brouk dorůstající 4–5 milimetrů patřící do řádu brouci, *Coleoptera*, čeledi nosatcovití, (*Curculionidae*) a rodu kůrovcovití, (*Ips*). Kůrovcovití dnes patří k nejrozmanitějším skupinám hmyzu s téměř 6 000 zástupci, kdy na území České republiky se jich vyskytuje 104 zástupců tohoto druhu (Hudec et al., 2019). Mezi nejvýznamnější z lesnického hlediska pak můžeme zmínit již výše psaného lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), dále pak lýkožrout vrcholkový (*Ips acuminatus*), lýkožrout menší (*Ips amitinus*), lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) a lýkožrout borový (*Ips sexdentatus*) (Křístek, Urban, 2013). Zástupce l. smrkového pak můžeme vidět na obrázku č. 1.



Obr. č. 1 – Dospělec Lýkožrouta smrkového, *Ips typographus* (Linnaeus, 1758), (Deml Miroslav, 2019).

Mezi hostitelské dřeviny l. smrkového se řadí smrk (*picea*), případně potom borovice (*pinus*) či modřín (*larix*). Smrk je pro něj primární dřevinou, kterou napadá nejvíce, a tudíž nejvíce škod je způsobených na smrkových porostech, kdy při normálním stavu se zaměřuje především na zlomy, polomy a odumírající jedince. Při přemnožení pak napadá i zdravé jedince, které nakonec udolá svým velkým počtem (Novotný, 2003). Pokud již propukl kalamitní stav, musíme si uvědomit několik věcí, které nám mohou pomoci v boji s l. smrkovým, jako je např. zamření se na porostní stěny, které jsou ohroženější. L. smrkový vyhledává méně smrkové porosty, v kterých je zastoupena např. bříza, či zase naopak se zaměřuje na smrky s vyšším objemem z důvodu většího množství potravy a prostoru pro následný vývoj (Kärvelo et al, 2016).

V našich podmínkách má l. smrkový obvykle dvě generace, v horských oblastech pouze jednu. Za příznivých podmínek, které jsou v posledních letech, může mít i tři až čtyři generace, na horách dvě. Jarní rojení probíhá na přelomu dubna a května, na horách to poté většinou s měsíční prodlevou. Letní rojení je zhruba od poloviny června do přelomu července a srpna (Novotný, 2003).

První kontakt smrku a l. smrkového přichází ve chvíli, kdy sameček vyhledává vhodný strom, kdy je lákán monoterpeny, nejdůležitějším je pak alfa-pinen. Tyto monoterpeny následně hrají důležitou roli při tvorbě feromonů, které se tvoří ne začátku prokousávání se do kůry v zaživacím ústrojí brouka (Skuhravý, 2002). Na vybraném stromu během 2 až 4 dnů vytvoří snubní komůrku a během tvorby pomocí feromonů naláká samičku. Samička vytvoří matečné chodbičky, kam naklade průměrně 60 vajíček, která se vyvíjí 6-18 dní, čas vývoje je závislý na vnějších podmínkách. Předposlední vývojové stádium je kukla, jejíž vývoj je přibližně 8 dní. Následně se vylíhne bílý brouk, který postupně zlátne a na vývojovém vrcholu je tmavě hnědý až černý. Úživný žír trvá 2 až 3 týdny, kdy můžeme začít pozorovat na smrku typické loupání kůry a žloutnutí jehlic (Pfeffer, 1955).

Pohlavní dimorfismus není znatelný pouhým okem, proto můžeme popsat samičku i samečka jako brouka válcovitého tvaru těla, který je cca 4,8 – 5,5 mm velký. Dospělý jedinec je pak ukázán na obrázku č. 1. Na zadní části krovek se nachází 4 páry zoubků, přičemž třetí pár je největší (Jakuš, 2015).

3.5 Indukovaná obrana

Biotické stresory jsou tvořeny rozmanitou skupinou živočichů a hub, včetně antropogenních vlivů. Poškození smrku nemusí být způsobeno pouze hmyzem, ale také velkými savci jako je například zvěř srnčí či jelení nebo také zajíci. Při tomto mechanickém loupání či okusování dochází k poškození kůry a otevřeným zraněním, kterého využívají různé druhy patogenických hub. U smrku je to např. václavka smrková (*Armillaria ostoyae*), která způsobuje odumírání smrku v průběhu desítek let a následnou nestabilitu porostu (Novotný, 2003).

Z pohledu indukované obrany smrku v boji s l. smrkovým jsou důležité monoterpeny alpha-pinen, beta-pinen, limonen, beta-phellandren, myrcen a caren. Terpeny se nacházejí jak ve floému, tak i v podobě těkavých látek ve vzduchu těsně nad kůrou. Nepříznivě dokáže ovlivnit obranu smrku i stres, který je způsobený náhlým odkrytím stabilního porostu za vzniku porostní stěny, kdy jedinci původně

zapojení a zvyklý na své mikroklima jsou vystaveni vyššímu slunečnímu ozáření (Tomášková, 2016).

Jedna z prvních studií zkoumající spojitost mezi indukovanou obranou a množstvím monoterpenů obsažených ve floému proběhla v roce 2011, kde do 20 vzrostlých smrků byla vložena houba *Ceratocystis polonica*, která pozitivně působí na celkový výsledek kolonizace l. smrkového. Po napadení smrku l. smrkovým byly naměřeny vyšší hodnoty terpenů u stromů, které byly napadeny (Zhao, 2011). Byla pozorována zvýšená koncentrace terpenů ve vzduchu a zvýšené sap flow (Marešová et al, 2020). Mezei et al, 2019 se rozhodl zkoumat souvislosti mezi nebývalým nárůstem l. smrkového v Tatrách za posledních deset let a kalamitou způsobenou vichřicí v roce 2004, po které bylo poničeno více než 10 000 hektarů lesního porostu. Přispěl k potvrzení teorie o větší atraktivitě l. smrkového vůči stromům vystaveným náhlému slunečnímu záření. Zvýšenou atraktivitou pro l. smrkového se zabýval i výzkum v německém Bavorsku, který se zaměřoval nejen na náhlý vznik čerstvé porostní stěny, ale také na náchylnost stabilních porostních stěn a, nebo sousedících porostů nacházejících se hned vedle vykáceného ohniska napadení l. smrkového. Nejlákavější byla jižně orientována čerstvá porostní stěna, porosty sousedící s nezpracovaným aktivním kůrovcovým dřívím byly méně atraktivní, nicméně o trochu více vyhledávané oproti stálé a stabilní porostní stěně (Kautz et al, 2013).

Sucho a vyšší teploty způsobují zvýšenou teplotu kůry, skrze kterou smrk vypouští do svého okolí terpeny a fenolické látky, tzv. volatilní látky. Vyšší teplota kůry zapříčiňuje vyšší těkavost těchto látek, které l. smrkový dokáže vycítit a je lákán na strom. Nejružnější houbové patogeny působící na rostlinu mohou snižovat množství obranných látek a tím usnadní přístup a kolonizaci hmyzu. Děje se tak i v případě rostlin rodu huseniček (*Arabidopsis*), které byli infikovány plísní šedou (*Botrytis cinerea*). Plíseň dokázala snížit okus způsobený býložravci z důvodu ovlivnění stimulačních cest kyseliny jasmonové a tvoření těkavých látek v okolí rostliny. Na druhou stranu pomohla k přilákání a snadnější kolonizaci kněžicí zelnou (*Eurydema oleracea*) (Ederli et al, 2021). Ophiostomatické druhy hub pomáhají kůrovci při

kolonizaci smrku, kdy mu pomáhají s indukovanou obranou a tvoří chemické látky prospěšné pro brouka (Netherer, 2021).

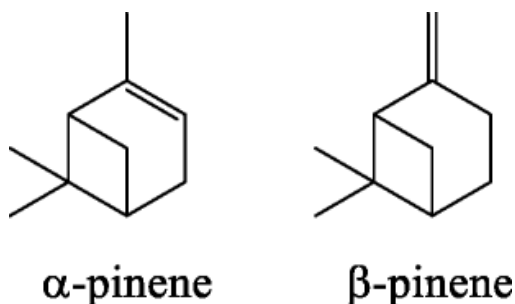
V kanadské provincii Alberta se rozšířili druhy kůrovců napadajících především borovici Banksovu (*Pinus banksiana*) a borovici pokroucenou (*Pinus contorta*). Část jedinců byla inokulována houbou *Grosmannia clavigera*. Všeobecně borovice pokroucená vykazovala vyšší množství monoterpenů než borovice banksova, zejména pak ovlivnění jedinci borovice pokroucené (Lusebrink et al, 2016). Kooperace mezi l. smrkovým a houbami může mít nejen pozitivní účinek, kdy houba je pomocník v prolamování obranných látek smrku, ale může působit i jako repelent. Vztah l. smrkového a hub je velmi složitý a nelze využívat houby jako prevenci či účelné nalákání l. smrkového do jedné části porostu za úplné kontroly lesníkem. Působení hub je individuální na každém stromu, může být ovlivněno počasím nebo také životním cyklem l. smrkového (Kandasamy et al, 2016).

Velký výzkum s pozitivními výsledky provedl Schiebe et al 2012, který se rozhodl zkoumat odolnost smrku z pohledu chemické obrany. Rozdělil skupiny stromů na napadené a usmrcené, napadené, ale přeživší a bez napadení. Zjistil, že rozdíl mezi napadenými a usmrcenými oproti napadeným, ale přeživším, je velký především v produkci monoterpenů, seskviterpenů, diterpenů a několika fenolických látek. Tyto látky jsou důležitou součástí indukované obrany, a proto lze říci, že schopnost tvorby většího množství těchto obranných látek určuje obranschopnost smrku. Měřena byla obranschopnost, kdy smrky byly ovlivněny MeJA, pro určení sloučenin. Podařilo se prokázat rozdílnost mezi kontrolními vzorky a vzorky ovlivněnými MeJa, kdy stejné sloučeniny vykazovali i bránící se a přeživší smrky.

Pokud hodláme mluvit o obraně rostlin, musíme si uvědomit, že existují metabolity, které se dělí na primární a sekundární. Primární metabolity zajišťuje základní funkce rostliny jako jsou růst, rozmnožování či správný vývoj. Z hlediska obrany rostlin a její adaptaci na stresové faktory jsou nicméně důležitější sekundární metabolity, které slouží k adaptaci na stres, útoky hmyzu, patogenních hub či velkým herbivorům. Do skupiny sekundárních metabolitů patří hlavně alkaloidy, terpeny,

glykosidy a fenoly. Sekundární metabolity jsou velká a složitá skupina aromatických kyselin, kdy nejčastěji se jedná o kyselinu salicylovou a jasmonovou. Některé tyto sekundární metabolity bývají tzv. indukční, což znamená, že jsou v těle rostliny méně aktivní a jejich větší nárůst můžeme zaznamenat ve chvíli poranění rostliny jako odpověď. Ve většině případů mají sekundární metabolity za úkol preventivní odrazení býložravce, hmyzu či rychlou reakci při poranění, nicméně ani nepřátelé rostlin nezůstávají pozadu a někteří se naučili využívat právě těchto aromatických látek k určení místa, kde se hostitel nachází (Richard et al, 1994).

Terpeny patří mezi isoprenoidy, protože se skládají z izoprenových jednotek, a rozdělujeme je podle počtu jednotek na monoterpeny (2 molekuly izoprenu), seskviterpeny (3 molekuly izoprenu), diterpeny (4 molekuly izoprenu), triterpeny (6 molekul izoprenu), tetraterpeny (8 molekul izoprenu) a polyterpeny obsahující více molekul izoprenů. Z pohledu smrku v boji s l. smrkovým jsou pro nás důležité monoterpeny α -pinen, β -pinen, limonen, β -phellandren, myrcen a caren (Harinder et al, 2007).



Obr. č. 2 – *alpha-pinen; beta-pinen*

3.5.1 Metyl jasmonát

Methyl jasmonát (MeJA) vzniká z kyseliny jasmínové jako její ester. Kyselina jasmínová je důležitý růstový regulátor podílející se na adaptaci rostliny na krátkodobý i dlouhodobý stres. Spolu s kyselinou salicylovou se řadí kyselina

jasmínová mezi fytohormony, které rostlina produkuje při napadení patogeny (Creelman, 1995).

Pomocí MeJA dokážeme studovat indukovanou obranu rostlin, protože při poškození rostliny je to právě MeJA, který aktivuje stimulaci terpenoidů, především mono a seskvi terpenů. Při aplikaci MeJA na mladé stromky smrku ztepilého bylo naměřeno pětinašobné zvýšení emitovaných terpenů z jehlic s dominancí oxidovaných monoterpenů (Martin, 2003). Martin et al 2002 zkoušel i MeJA aplikovat do smrku ztepilého (*Picea abies*), kdy pomocí chemických analýz dokázali sledovat zvýšenou indukivní obranu s ohledem na množství terpenů.

MeJA můžeme také považovat za spouštěč komunikace mezi rostlinami, kdy si rostliny pomocí kořenového či jiného fyzického kontaktu předávají informace o nastalém stresu způsobeným abiotickým či biotickým činitelem. Ve výzkumu byl využit čirok obecný, který si dokonce opakovanou umělou aplikaci MeJA dokázal určitým zapamatovat (Yamashita et al, 2021). Po ošetření rostliny starčeka přímětníka (*Jacobeia vulgaris*) MeJA a kyselinou salicylovou bylo jasně prokázáno, že ošetřené části rostlin vykazovali vyšší emitaci obranných látek a při výběru býložravců byly méně okusované než kontrolní rostliny (Wei et al, 2021).

3.6 Metody a analýzy přírodních látek

Teprve v polovině 20. století vznikla chromatografická metoda na separaci a identifikaci terpenů (Kirchner et al, 1957). Nově využívaný plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrií se zakládá na dvou fázích – první z nich je rozdělení a identifikace jednotlivých složek ze směsi, v druhé fázi pak stanovení hmotnosti jednotlivých částic (Klouda, 2003).

3.6.1 Plynová chromatografie

Chromatografie je označení pro soubor fyzikálně-chemických separačních metod, při nichž lze rozdělit směs na jednotlivé složky a následně je identifikovat.

„Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdržují složky, které jsou stacionární fázi poutány silněji. Tímto se postupně složky od sebe separují.“ (Klouda, 2003). K rozdělení a identifikaci terpenů se využívá od poloviny 20. století (Kirchner et al, 1951), nicméně do dnešní doby neexistuje přístroj, který by dokázal identifikovat všechny terpeny, především ty s více izopreny. Chromatografie se rozděluje do více skupin, dle skupenství mobilní fáze na kapalinovou a plynovou chromatografii, dále pak podle uspořádání stacionární fáze, na kolonovou a podle plošné techniky (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a poslední je rozdělení dle povahy děje, který převládá při separaci – rozdělovací, adsorpční, gelová, afinitní a iontově-výměnná chromatografie (Klouda, 2003).

Ke zpracování vzorků v této diplomové práci byla využita plynová chromatografie, kde se vzorek dávkuje do proudu plynu, a proto je mobilní fáze nazývána jako nosný plyn. Vzorek se musí ihned přeměnit na plyn, aby mohl být mohl být transportován. Aby bylo dosaženo přeměny na plyn, je nutné separovat látky, které jsou tepelně stálé, jejich relativní molekulová hmotnost není menší než 1000 a mají dostatečný tlak syté páry (Klouda, 2003).

3.6.2 Hmotnostní spektrometrie

„Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z .“ (Klouda, 2003). Jednotlivé kroky jsou: odpaření vzorku – ionizace – akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru – separace iontů hmotnostním filtrem – detekce iontů. Celý tento proces probíhá ve vakuu (Klouda, 2003).

Základní spektrometr obsahuje vstup vzorku – iontový zdroj – hmotnostní analyzátor – detektor a vyhodnocovací zařízení (Klouda, 2003).

3.6.3 Statistické metody

Pro analýzu dat získaných z nejrůznějších měřících přístrojů existuje celá řada možností, často využívanou bývá analýza hlavních komponent PCA (principal component analysis), která má za účel zjednodušit velmi početnou skupinu znaků, které jsou na sebe lineárně závislé a utvořit z nich hlavní komponenty. Výhodou této metody je zpracování velkého množství dat bez ztráty jejich významu. Hlavní komponenta je charakteristická především svojí variabilitou, rozptylem, kdy v následném vyhodnocení se řadí do grafu dle klesajícího rozptylu od největšího k nejmenšímu. PCA je používána jako první průzkumný krok ve studiích, kde výsledkem je velký objem dat, kdy dokáže vytvořit srozumitelné zobrazení multidimenzionálních dat do roviny. PLS (partial least square) je analytická metoda částečných nejmenších čtverců a její varianta OPLS (ortogonal partial least square) zahrnují lineárně regresivní postupy vycházející z PCA. Pro přesnější klasifikaci vzorků se pak využívá OPLS – DA (ortogonal partial least square – diskriminant analysis), což je metoda diskriminační analýzy (Muselík, 2012).

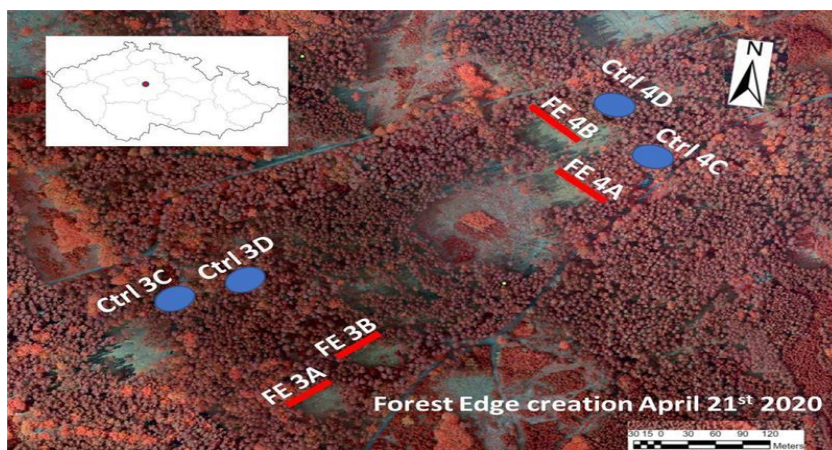
Další možnosti analýzy dat je PCR metoda (principal component regression) založená na regrese dat, MLR (multiple linear regression) vícenásobná lineární regrese, ILS (inverse least squares) inverzní metoda nejmenších čtverců a pak ještě např. CLS (classical least squares) klasická metoda nejmenších čtverců (Muselík, 2012).

4. Metodika

4.1 Experimentální plocha

Data byla sbírána v porostech spravovaných ŠLP v Kostelci nad Černými lesy, kdy porosty se nacházely mezi vesnicemi Stříbrná skalice a Oplany. Porosty jsou dle hospodářské knihy staré mezi 80-85 lety, vhodné pro lýkožrouta smrkového. Experiment probíhal na dvou výzkumných plochách excelentního týmu pro mitigaci (EXTEMIT). Na obou plochách byly 21.4.2020 vykáceny celkem čtyři osluněné porostní stěny, kdy každá měřila přibližně 120 metrů na délku.

Měření probíhalo na ploše číslo 3 a 4, která byla rozdělena na 4 subplochy označené A, B, C a D, což lze vidět na obrázku č. 3. V zapojeném vnitřním lese byly vybrány čtyři kontrolní plochy (3 C, 3 D, 4 C, 4 D). Na porostních stěnách, které nesly označení 3 A, 3 B, 4 A a 4 B, bylo monitorováno po třech stromech, celkem 12 stromů, uvnitř porostu na kontrolních plochách bylo rovněž vybráno k výzkumu celkem dvanáct stromů. Zkoumáno bylo, zda stresování stromů pomocí MeJA má vliv na následnou lákavost a chutnost pro lýkožrouta smrkové oproti stromům zapojeným v porostu, proto subplocha A a B byly čerstvě vykácené porostní stěny, označené jako forest edge, a subplochy C a D byly zapojené ve stabilních porostech, kdy nesly označení control.



Obr. č. 3 – Mapa zkusných ploch číslo 3 a 4 (Surový, 2020)

4.2 Metodický postup při sběru teplotních dat v terénu

Sběr teplotních dat probíhal na identických stromech a ploše jako sběr MeJA. Na strom se umístili senzory APOGE, které měřily povrchovou teplotu kůry z jižní a severní strany kmene, ve výšce přibližně 3 metrů. Měření probíhalo nepřetržitě, ale pro tuto diplomovou práci byla použita data v rozmezí od 27.5.2020 do 17.6.2020, což je doba trvání pokusu s indukcí MeJA. Hodnotili jsme, jak teplota kmene během experimentu mohla ovlivnit množství terpenů. Na obrázku č. 4 lze vidět měřící přístroj, který snímá teplotu v průběhu celého dne.



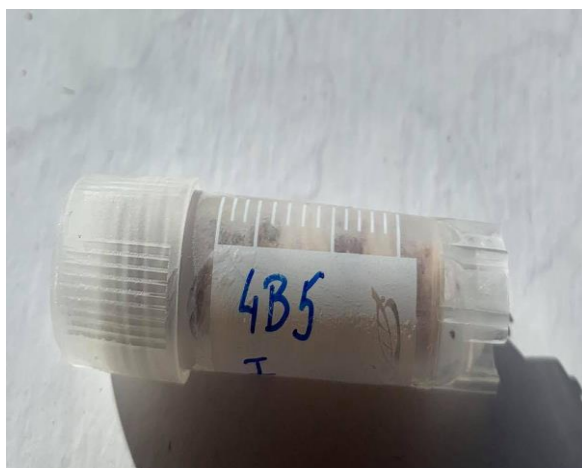
Obr. č. 4 – měřící senzory umístěné na smrku ztepilém (Extemit, 2020)

4.3 Sběr vzorků v terénu

Na každý strom, tedy celkem 88 jedinců, byl aplikován MeJA dne 27.5.2020. Do stromu byla vyklepána díra pomocí korkovrtu, do které se vložil za pomoci pinzety filtrační papírek namočený do roztoku MeJA. Vývrt, který nám zůstal v korkovrtu se vrátil do stromu a tím bylo zajištěno zachování papírku i jistota, že se MeJA bude působit, jak má. Následně bylo pro lepší orientaci označeno blízké místo aplikace.

Sběr vzorků probíhal 17.6.2020, působení MeJA bylo necelé tři týdny. Samotný sběr byl uskutečněn ve skupině dvou lidí, kdy jeden nesl nádobu s kapalným dusíkem a druhý sbíral vzorky z kůry, které ukládal do kryovialky a ukládal je do nádoby s dusíkem.

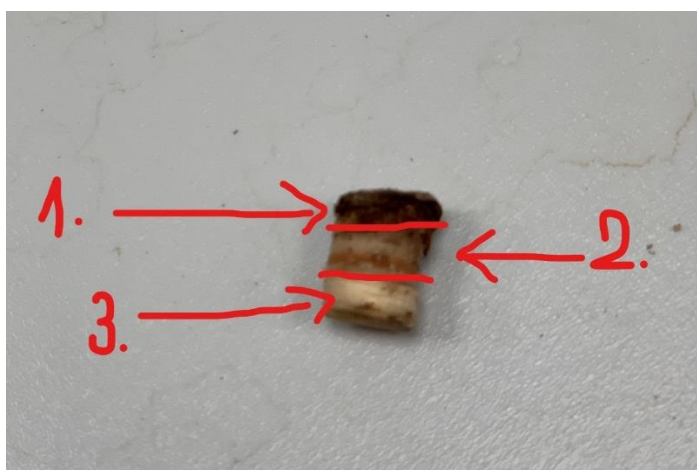
Odebíralo se minimálně 6 vzorků z každého stromu za pomoci korkovrtu o průměru 3 mm, aby bylo zajištěno dostatečné množství floému (200 g) při následném laboratorním zpracování. Tři vzorky se odebraly bezprostředně vedle umístění MeJA, aby bylo znatelné ovlivnění, a tři kontrolní minimálně 40 centimetrů nad bez ovlivnění MeJA. Pokaždé byly vzorky vloženy z korkovrtu do předem označené kryovialky bezprostředně po odběru, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku a záměně. Označení kryovialky bylo stejné jako označení stromu. Aby vzorky byly správně označené, tak vzorky v bezprostřední blízkosti aplikace MeJA nesly označení T – treatment a vzorky ze vzdálenější části C – control. Vzorky v označených kryovialkách se následně po každém odběru vkládaly do nádoby s tekutým dusíkem pro zachování „čerstvosti“. Celý postup následně probíhal na všech subplochách studované plochy. Po převezení do laboratoře se kryovialky roztrídili do nadepsaných krabiček pro lepší dohledání, které se následně umístili do mrazáku při teplotě -80 °C z důvodu zachování „čerstvosti“, dokud nedošlo k dalšímu jejich zpracování. Kryovialek bylo využito z důvodu větší odolnosti proti mrazu, klasické vialky praskali.



Obr. č. 5 - Vzorek 4B5T – plocha č. 4, subplocha B, strom č. 5 a odběr treatment.

4.4 Metodický postup při zpracování dat v laboratoři

Vzorky museli být celou dobu uchovávané v mrazáku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby, než se začalo s jejich zpracováním z důvodu zachování kvality vzorku, tudíž po vyndání z mrazáku se dali do mrazáku přímo v laboratoři na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ke zpracování vzorků jsme využili skalpel, případně nůž, achátovou misku s tloučkem, nádobu na kapalný dusík, nabírací skleněnou nádobku na dusík a nabírací lžičku. Prvním krokem byl zápis názvu zorku do sešitu pro případnou kontrolu při nepřesnostech a zabránění záměny vzorku při následném zpracování. Lihovou fixou byla nadepsána skleněná vialka (o velikosti 20ml) s „kódem vzorku“. Po vyndání vzorku z kryovialky bylo nutné očistit vzorek tak, aby nám zbyl pouze floém (lýko).



Obr. č. 6 - Vzhled odebraného vzorku před zpracováním. (Sládková)

1. borka; 2. floém (lýko); 3. dřevo

Po oddělení námi potřebného floému se vzorek pomocí skalpelu nakrájel na malé kousky $2 \times 2\text{ mm}$ a následně dal do hmoždíře. Pro kvalitnější rozdrčení byl přilíván tekutý dusík, protože bylo nutné floém rozdrtit na homogenizovaný prášek.

Pro navážení 200 mg prášku nám sloužila velmi citlivá laboratorní váha, která se po zapnutí nechávala zkalibrovat. Skleněnou vialku s označením vzorku jsme vložili na váhu a před vážením prášku jsme ji vytárovali. Možná odchylka při navažování byla ± 5 mg.

Do naváženého vzorku byly pomocí pipety přidány 2 ml roztoku vnitřního standardu hexanu (C_6H_{14}) obohaceného o antioxidanty. Vnitřní standard se dával z důvodu korekce citlivosti vzorky při měření, odezvy, na GC-MS. Vialka se uzavřela víčkem se septem, které se muselo silně utáhnout z důvodu vysoké těkavosti hexanu. Pro bezpečné zacházení s chemickými látkami byla využívána laboratorní digestoř pro zabránění vdechnutí chemických látek. Takto zpracovaný vzorek se uložil do mrazáku na -20 °C, aby se nepoškodil. Po nasbírání 15-18 vzorků se umístili do ultrazvukové lázně na 10 minut při teplotě 30 °C, aby se řádně protřepali. Pro kontrolu se vytvořil jeden tzv. blank vzorek, ve kterém bylo pouze 200 ml vnitřního standardu a hexanu. Činilo se tak z kontroly při zpracování na GC/MS. Následujících 10 minut se využilo na přípravu filtrace vzorků.

Při přípravách, než skončí ultrazvuková lázeň, jsme si připravili injekční stříkačky, filtry a předešli si malé vialky (2ml). Na stříkačku (5ml) se nasadil filtr, který ústil do vialky tak, aby se nedostala dovnitř žádná nečistota. Protřepaný roztok se nalil do hrdla stříkačky, kdy se následný roztok pomocí stlačeného pístu injekční stříkačky přefiltroval přes filtrační terčík. Tak aby ve 2 mililitrové vialce zůstal čirý roztok bez nečistot. Po zpracování všech 15–18 vzorků byly opět přeneseny do mrazáku na -80 °C, kde byly ponechány z důvodu minimalizování poškození vzorku, než se zpracovali na plynovém chromatografu GC/MS.

4.5 Zpracování dat z GC/MS

Záznamy z chromatogramů byly zpracovány dekonvolučním softwarem Chroma TOF od firmy Leco, a byly alignovány a vyčištěny pomocí softwaru Statistical Comapare, výstupem byla matice překopírovaná do excelu, kde počet sloupců odpovídal počtu vzorků a počet řádků počtu analyzovaných sloučenin, které byly zastoupeny nad hladinou trasholdu 10 %. Nastavení GC bylo na Agilent© 7890, kdy nosný plyn bylo helium a rychlost průtoku 1.00 mL/min za teploty transferu 200 °C. Identifikace jednotlivých sloučenin, byla-li nutná, byla provedena po srovnání hmotnostních spekter s programem NIST anebo retenčními časy standardů. MS bylo nastaveno na hmotnostní rozsah 35 – 500 m/z, doba analýzy byla 480 sekund a iontový zdroj tepla se rovnal 250 °C. Byly uvažovány jen sloučeniny s kvantifikační hmotou vyšší než S/N 25. Tabulka ploch píků byla dále relativizovaná dělením plochou píku vnitřního standardu pro každý vzorek. Relativní odezvy pro jednotlivé látky, pak byly logaritmovány. Takto zpracovaná matice výsledků z chromatografických analýz byla statisticky analyzovaná v statistickém programu statistického programu Simca verze 15, kde se použila analytická metoda PCA. Pro tyto data byla PCA analýza nejlepší volbou z důvodu obrovského množství chemických látek, které nám PCA převedlo do komponent, jež můžeme vidět ve výsledcích. Činilo se tak pro lepší přehlednost a lepší interpretaci.

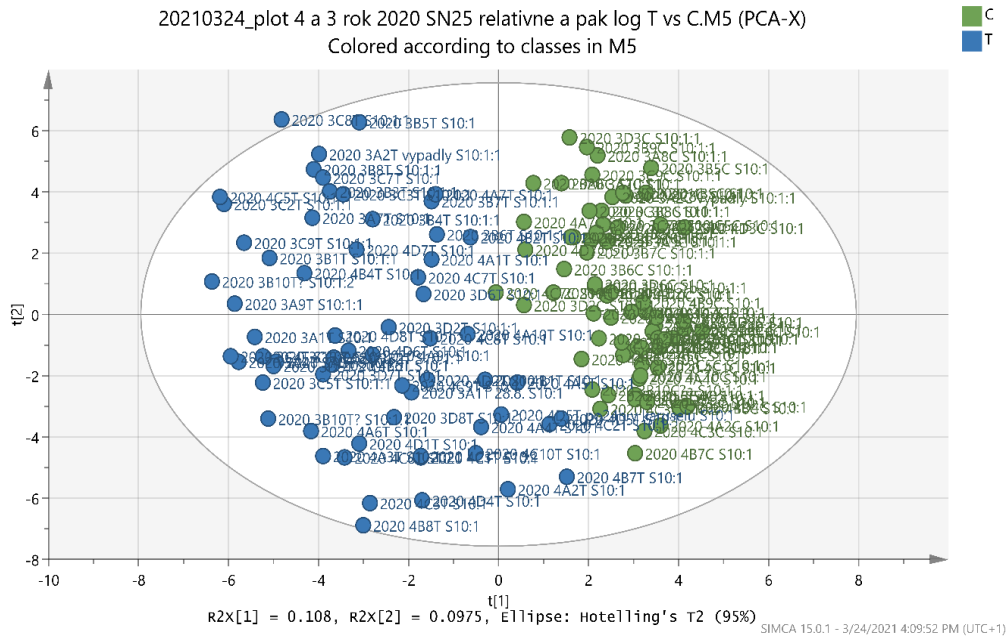
5. Výsledky

5.1 Chemické měření

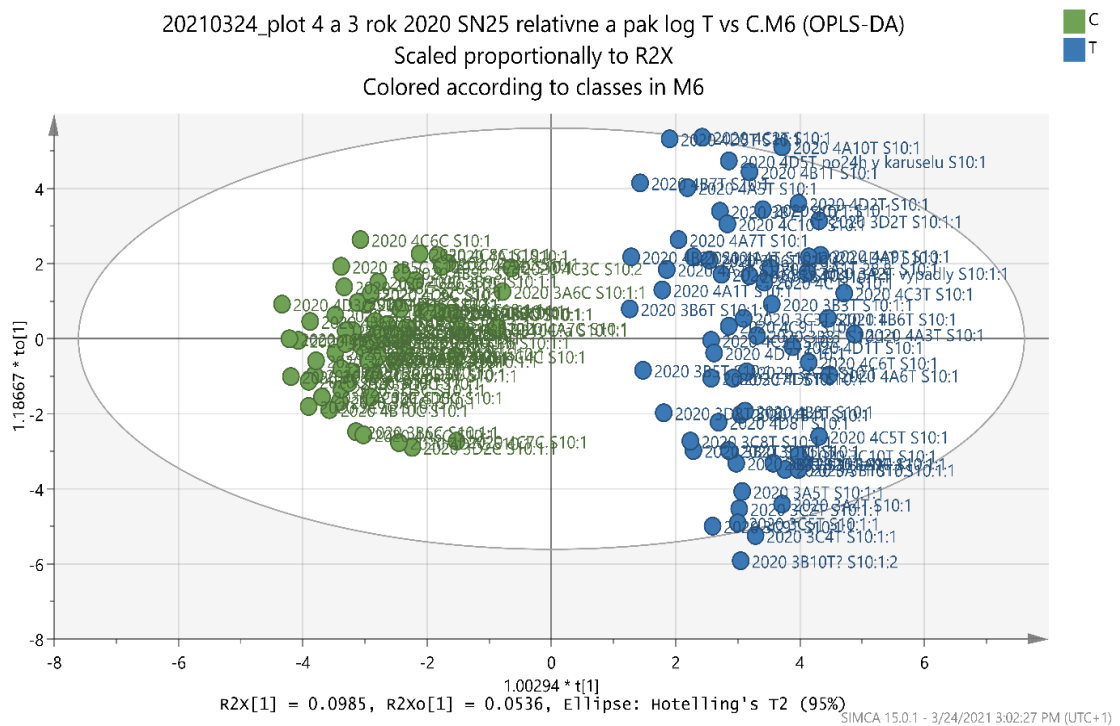
Vzorky se porovnávaly z více hledisek. Hlavním cílem bylo porovnat zastoupení chemických látek v jednotlivých vzorcích, a to po zpracování chromatografů pomocí dekonvolučního softwaru Chromatof a softwaru pro aligment vzorku Statistical Compare, jednotlivé látky byly měřeny na tzv unique mass a porovnávány pomocí PCA analýzy mezi sebou. R2X nám udává možnou variabilitu ve srovnání mezi vzorky.

Prvním výsledkem bylo, že se změnilo složení látek v extraktech z lýka, v okolí inokulace methyl jasmonatem (treatment, T = modrá barva) a dále na stromě tzv. kontrole, kde strom poškozený nebyl (C = zelená barva). Po vynesení zpracované tabulky píků z chromatogramů se na PCA plotu projevila separace obou skupin vzorků jen s překryvy v případě jednotek, což můžeme vidět na grafu č. 2.

Následně při využití OPLS - DA (graf č. 3), která dokáže vyhodnocená data zobrazit rozděleněji než PCA metoda. Lepší rozdělení bylo způsobeno zadáním speciální proměnné, která v našem případě byla specifikace, do jaké skupiny vzorky patří. Rozdělení pomocí OPLS - DA je pak vyhodnocena na grafu č. 3. Graf č. 2 i 3. byly separovány pomocí Log relativní odezvy a oba tyto grafy byly vyhodnoceny při variabilitě R2X 15 %.

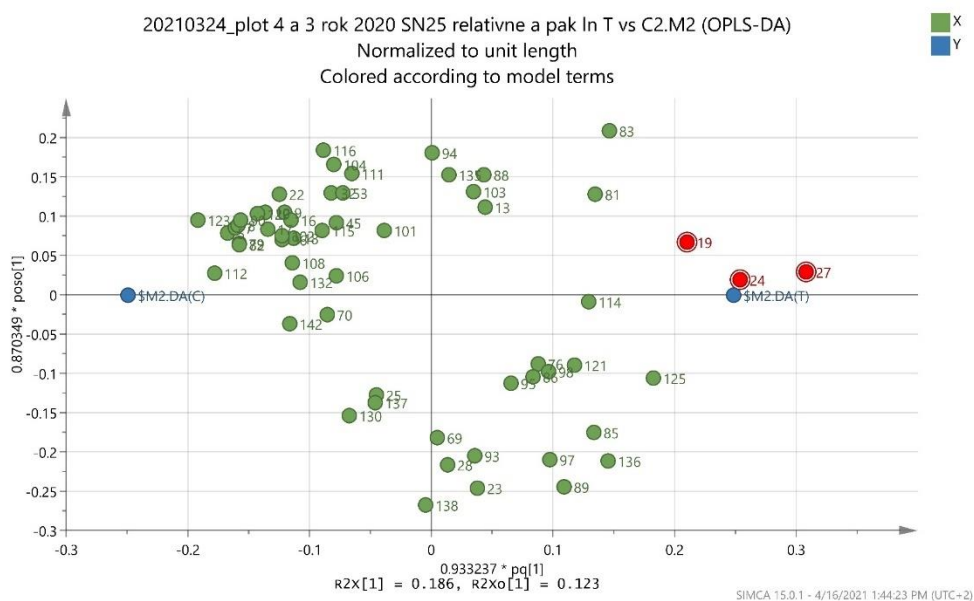


Graf č. 2 – rozdělení ovlivnění MeJA vs. kontrolní dle PCA analýzy, R2X=15 %



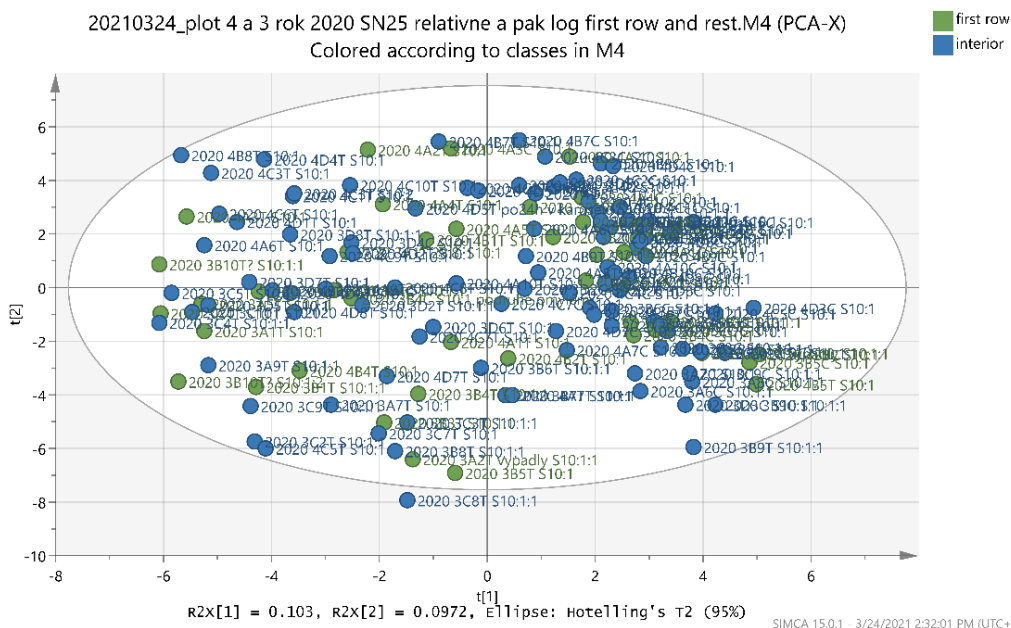
Graf č. 3 – rozdělení ovlivnění MeJA vs. kontrolní dle OPLS-DA metody. R2X=15 %

V grafu č. 4 jsou vyobrazené chemické látky v podobě bodů označených čísly. Nejvzdálenější hodnoty, které jsou vyznačeny červenou barvou, jsou pro nás důležité z hlediska rozdílnosti zastoupení sloučenin. Jedná se o tři látky, díky kterým se vzorky MeJA a kontrolní liší. Sloučenina číslo 19 je eucalyptol, číslo 24 je pinocamphone a třetí sloučenina pod číslem 27 je alpha-terpineol, kdy všechny tři látky se řadí mezi oxidované monoterpeny se známou aktivitou na tykadle I. smrkového. Inokulace methyl jasmonátem tedy vyvolala indukovanou obranu.



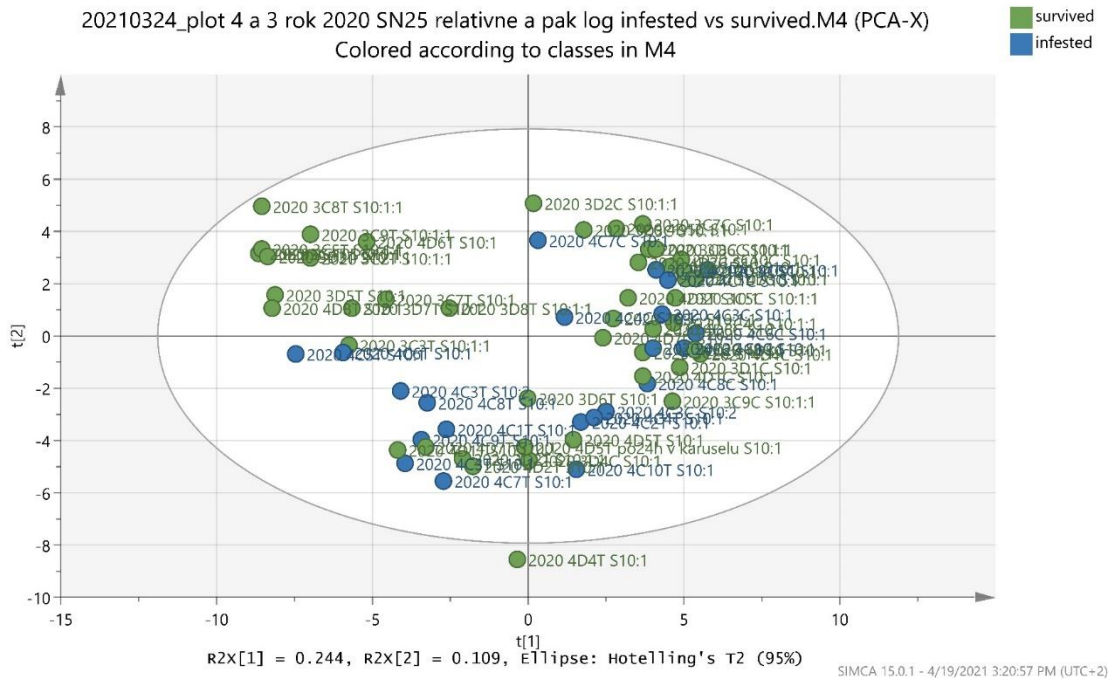
Graf č. 4 – rozdělení chemických sloučenin dle jejich zastoupení ve srovnání s analýzou OPLS-DA, R2X = 15 %

Na grafu č. 5 došlo k porovnání porostní stěny (first row) a vnitřku lesa (interior). Tento graf je hodnocenou PCA analýzou při variabilitě R2X = 20 % a při separaci Log relativních hodnot. Zde nebyla dokázána statistická rozdílnost mezi stromy ovlivněnými stresem v podobě tvorby čerstvé porostní stěny a stromy zapojenými v porostu, vnitřkem lesa.

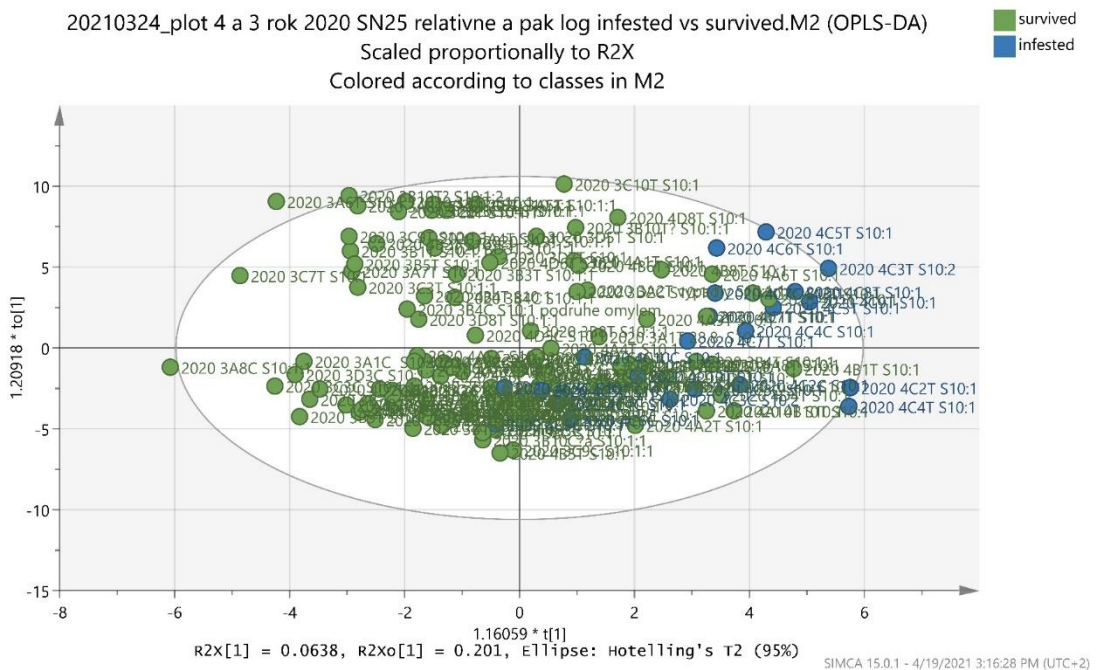


Graf č. 5 – porostní stěna vs. vnitřní les pomocí PCA analýzy $R^2X = 20\%$

Jedním z dalších cílů práce bylo zhodnocení napadených stromů na subploše 4 C (infested) a nenapadených stromů na plochách 4 D, 3 C a 3 D (survived). V prvním kroku, stejně jako u porovnání ovlivnění MeJA a kontrolní, byla použita PCA analýza pro vytvoření hlavních komponent, pod kterými bylo obsaženo velké množství chemických sloučenin. Rozdělení PCA analýzy lze vidět na grafu č. 6, kde nebylo možné prokázat statistický rozdíl v obranyschopnosti napadené plochy a ploch, které zůstali bez napadení l. smrkovým. Druhý krok spočíval ve vytvoření grafu č. 7 pomocí OPLS – DA analýza, kdy ani zde není vidět rozdíl mezi napadenými a nenapadenými plochami. Oba grafy byly hodnoceny při variabilitě $R^2X = 20\%$ a při separaci Log relativních hodnot.



Graf č. 6 – napadení (4 C) vs. nenapadení (4 D, 3 C, 3 D) PCA R2X=20 %

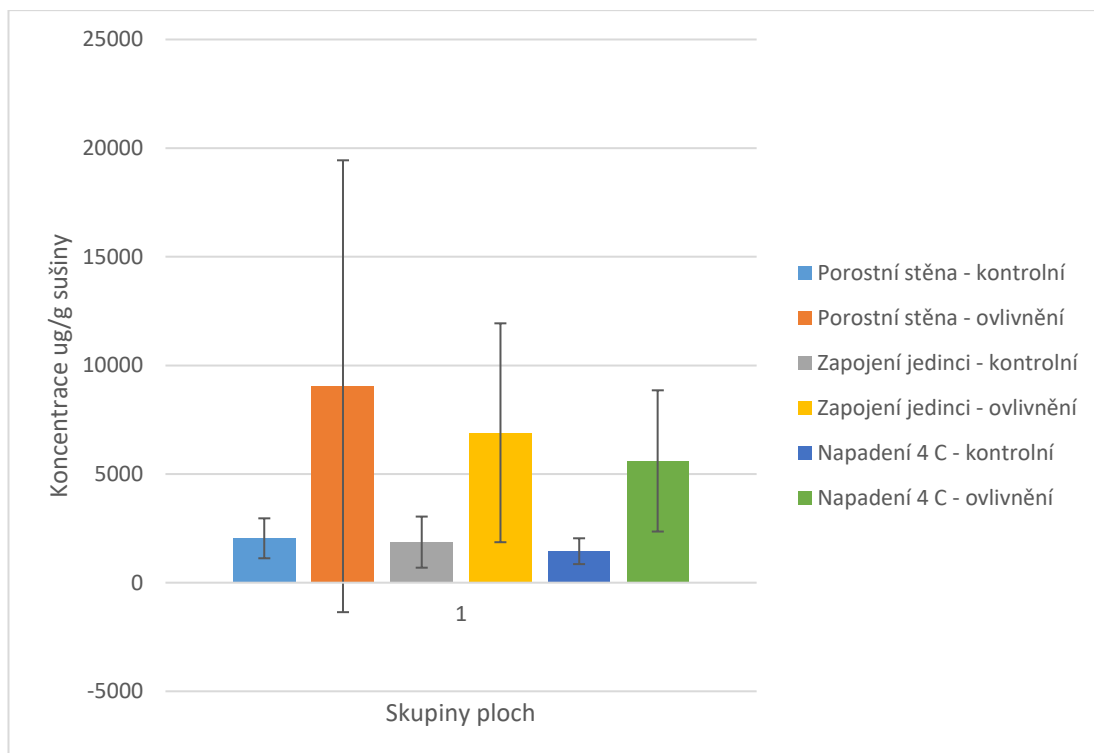


Graf č. 7 - napadení (4 C) vs. nenapadení (4 D, 3 C, 3 D) PCA R2X=20 %

V tabulce č. 2 můžeme vidět rozdílnost v obsahu monoterpenů v jednotlivých vzorcích ug/g sušiny. Vidíme mírně zvýšený obsah monoterpenů na porostní stěně oproti zapojeným jedincům a subploše 4 C, která byla následně napadena. V případě vyhodnocení dat byla použita relativní směrodatná odchylka (RSD) v procentech, která byla natolik velká, že při vyhodnocení nemůžeme potvrdit jasný výsledek rozdílnosti vzorků, nicméně lze vidět mírný trend na grafu č. 8.

koncentrace ve vzorku v ug/g susiny	alpha pinene	Camphene	beta-pinene	3-carene	Limonene	beta phellandren	SUMA MT
	626.7,0	645.2,0	672.1,0	698.5,0	716.5,0	720.1,0	
	627.1,0	645.5,0	672.3,0	698.7,0	716.6,0	720.3,0	
	93	93	93	93	68	93	
	7	8	10	13	17	18	
Porostní stěna - kontrolní	812	7	991	16	77	141	2043
RSD	43	137	59	125	72	71	45
Porostní stěna - ovlivnění	3689	97	3669	180	485	941	9042
RSD	116	169	102	141	145	183	115
Zapojení jedinci - kontrolní	709	5	966	10	48	130	1867
RSD	66	240	62	163	96	79	63
Zapojení jedinci - ovlivnění	2689	55	3193	132	256	575	6899
RSD	85	110	66	104	100	96	73
Napadení 4 C - kontrolní	576	2	726	13	35	98	1449
RSD	41	332	45	104	63	44	41
Napadení 4 C - ovlivnění	2179	38	2628	139	179	440	5604
RSD	74	101	46	81	81	66	58

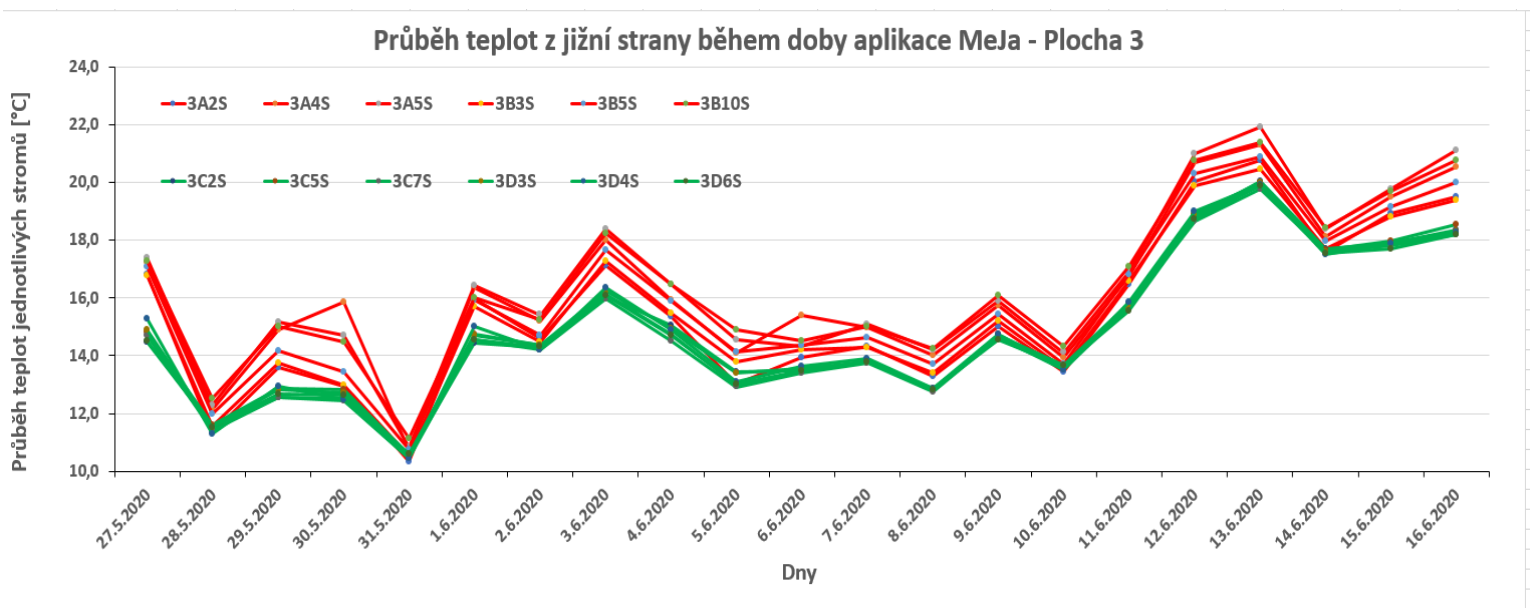
Tab. č. 2 – zastoupení monoterpenů ve vzorcích porostní stěny, zapojených jedinců a později napadené subplochy 4 C



Graf č. 8 – zastoupení monoterpenů z tabulky č. 2

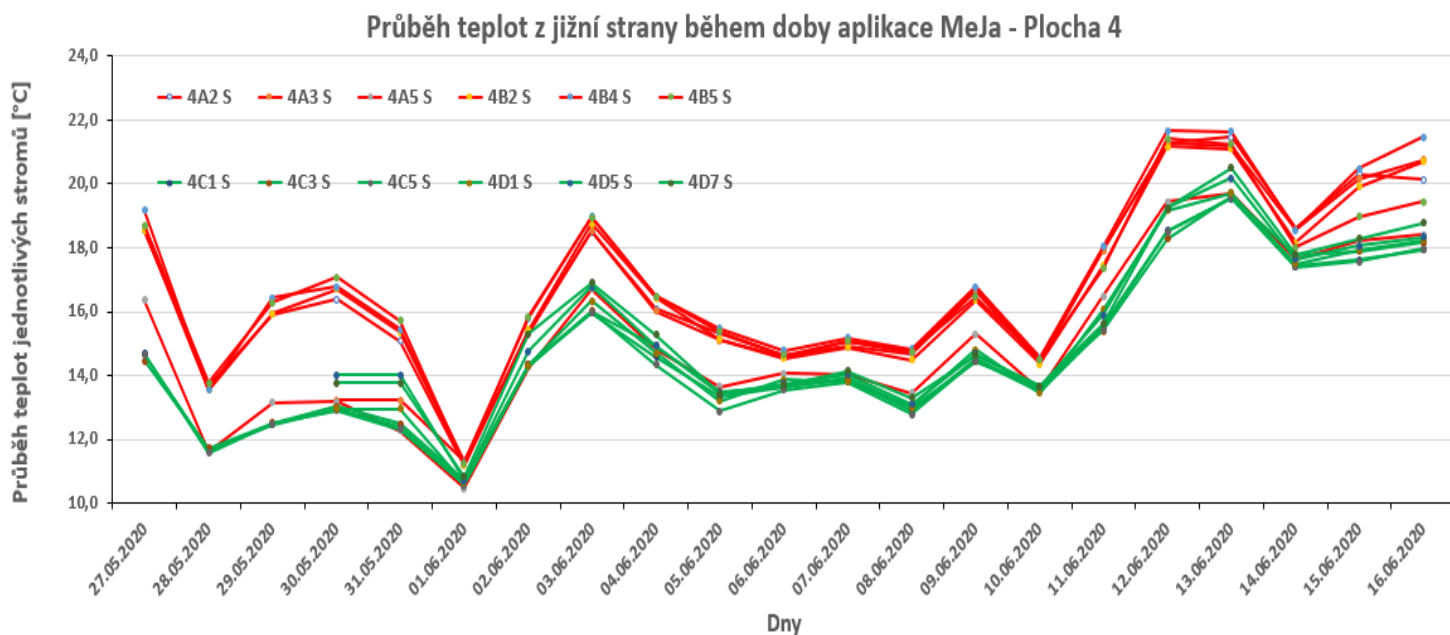
5.2. Teplotní měření

Na základě měřicích přístrojů byly teploty snímány nepřetržitě. Z důvodu této diplomové práce byly využity data od 27. 5. 2020 do 16. 6. 2020, kdy působilo ovlivnění MeJA. Graf č. 9 zobrazuje průběh teplot na ploše č. 3, kdy stromy označené 3 A a 3 B byly vystaveny přímému slunečnímu záření z důvodu umístění na porostních stěnách. Plochy 3 C až 3 D byly umístěny uvnitř zapojeného porostu, a tudíž sloužili jako kontrolní. Zde můžeme vidět teplotní nárůst mezi porostní stěnou a vnitřkem lesa, kdy teplota uvnitř lesa vykazuje stabilní teploty oproti porostní stěně, kde jsou nejen vyšší teploty celkově, ale jsou zde vidět i teplotní výkyvy mezi jednotlivými stromy.



Graf č. 9 - průběh teplot na ploše 3 od 27. 5. 2020 – 16. 6. 2020

Stejné výsledky a trendy můžeme vidět i na ploše č. 4 viz graf č. 10, kde lze ještě lépe vidět rozdílnost mezi porostní stěnou a vnitřkem lesa.



Graf č. 10 – průběh teplot na ploše 4 od 27. 5. 2020 – 16. 6. 2020

6. Diskuze

Bylo provedeno měření na dvou výzkumných plochách č. 3 a 4. Na každé ploše byly vytvořeny subplochy, které byly označeny A-D, přičemž subplochy A a B se nacházely na čerstvě vzniklých porostních stěnách, které byly vytvořeny 21.4.202. C a D byly situovány dovnitř zapojeného porostu, nevystaveny akutnímu stresu.

Tak jako v mnoha jiných výzkumech bylo prokázáno, že při aplikaci MeJA na rostlinu se zvýší produkce obranných látek (Wei et al, 2021; Martin et al, 2002), tak i v případě této práce bylo prokázáno, že smrky ovlivněné MeJA emitovaly více terpenů viz. graf č. 2, kde byla použita PCA metoda, a graf č. 3, kde metoda OPLS - DA.

Oxidované monoterpeny eucalyptol, pinocamphone a alpha-terpineol, které byly zvýšené po inokulaci MeJA, jsou látky se známou aktivitou na tykadle lýkožrouta smrkového Schiebe 2019, euaklayptol je dokonce potentní antiatraktant. Menší napadení stromů ovlivnění MeJA pak dokázal v polních pokusech Erbilgin et al 2006. Předpokladem tedy bylo, že produkce oxidovaných monoterpenů bude nižší na porostní stěně a u stromů, které byly později napadeny kůrovcem. Stejný předpoklad jsme měli i u monoterpenických uhlovodíků, které jsou také známy, jako toxické po požeru brouky. Trendy v kvantitativních výsledcích naše předpoklady zcela nepotvrdili, ale můžeme uvažovat o mírném trendu.

I když byly viditelné teplotní rozdíly na povrchu kůry u stromů na porostní stěně oproti teplotám kůry stromů uvnitř lesa v průběhu většiny dní, kdy experiment probíhal, nebylo profil obranných látek v lýku po indukci možné prokázat. Variabilita jedinců byla mnohem výraznější než reakce na stres. Data z profilu kvantity obranných látek nepotvrdil předpoklad Kautz et al, 2013 nebo Mezei et al, 2019, že nižší obranyschopnost porostních stěn vůči l. smrkovému se projeví v indukované obraně. Bylo to z důvodu narušení mikroklimatu, které je důležité z hlediska udržení vody v porostu a zajištění nižších a stálých teplot (Nethere et al, 2015) a zvýšenému dopadu slunečního záření. Na rozdíl od Marques et al, 2021, který sledoval narušené mikroklima a jeho vliv na borovici lesní (*Pinus sylvestris*) 35 let. Můžeme uvažovat,

že při našem experimentu byl sledován krátký časový interval mezi vykácením porostní stěny a následným sběrem dat.

Dle publikované literatury Baier et al 2007, Heitz et al 2005 a Marešová et al 2020, kteří uvádí, že se zvyšující se teplotou se zvyšuje obsah monoterpenů emitovaných stromem, jejichž profil ovšem neodpovídá monoterpenům ve floému. Marešová et al 2020 uvádí, že obsah monoterpenů ve floému na porostní stěně se signifikantně nezvýšil oproti vnitřnímu lesu. Všichni autoři ovšem studovali emisi a obsah těchto látek bez inokulace MeJa. Vyvodit ovšem můžeme analogii, že změny v produkci terpenů ve floému jsou na teplotě závislé méně, než emise těkavých látek.

Podobnou úvahu lze využít i v případě jednoho z našich cílů, kdy se dalo očekávat vyšší množství obranných látek u smrků na ploše 4 C, které byly během sběru dat napadeny. V našem případě napadl l. smrkový strom těsně před sběrem, a tudíž při odběru vzorků se ještě obranné látky neprojeví v celkovém profilu stromu nebo prvotní napadení probíhalo v jiné části stromu, než je obvyklé, např. v koruně. Otázka, která vyvstává s ohledem na napadenou subplochu 4 C, která měla sloužit jako kontrolní a nevykazovala žádné viditelné predispozice k napadení l. smrkovým, je, zda byl narušen zdravotní stav smrků nebo bylo chování a výběr hostitele l. smrkovým pouze shodou náhod.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo porovnat schopnost indukované obrany vzrostlých smrků ztepilých, které byly vystaveny akutnímu stresu z náhlého oslunění po vykáčení čerstvé porostní stěny s indukovanou obranou stromů v zapojeném lese. Data byla zpracována pomocí GC/MS přístroje a následně vyhodnocena PCA a OPLS – DA analýzou. Byla prokázána rozdílnost v obsahu obranných látek při aplikaci MeJA do smrku a kontrolních odběrech.

Hodnocena byla i rozdílnost mezi smrky vystavenými náhlému oslunění z důvodu vzniku čerstvé porostní stěny oproti smrkům zapojeným ve stabilním porostu. Zde nebyl viděn rozdíl v profilu látek a statisticky nesignifikantní v jejich kvantitě mezi smrky na porostní stěně a v zapojeném porostu, tudíž výsledky nebylo možné považovat za prokazatelné.

Posledním úkolem bylo určit, zda se indukované obranné metabolity lišily u stromů, které byly později napadeny lýkožroutem smrkovým. Při zpracování dat a následném vyhodnocení napadené suplochy 4 C nebyl viděn žádný statisticky významná rozdíl v porovnání s nenapadenými stromy na plochách 3 C, 3 D a 4 D, tudíž v celkovém shrnutí můžeme říci, že množství obranných látek smrku ztepilého napadeného l. smrkovým nebylo možné prokázat.

Lesnictví v dnešní době prožívá velkou krizi způsobenou suchem a na něm profitujícím l. smrkovým (*Ips typographus*). Kůrovcová kalamita je ve stádiu, kdy už ji nelze zastavit, nicméně ji můžeme využít ve zkoumání a pochopení mnoha souvislostí, které by mohli pomoci zpomalit do budoucna jiné hmyzí kalamity. Výsledky této práce nevyšli dle očekávání s ohledem na pozitivní výsledky jiných vědců zabývajících se touto problematikou, ale dávají nám prostor pro úvahy, proč zrovna tento experiment nevyšel. S ohledem na nepříznivý vývoj klimatických změn v souvislosti se suchem by se dalo uvažovat další zaměření výzkumů na schopnost rostlin lépe reagovat na stresové faktory s využitím lidské pomoci.

Doporučuji s ohledem na výsledek této diplomové práce zahrnout do výzkumu větší počet stromů s možností delšího časového období, protože prokazatelné výsledky by mohli být důležité pro pochopení a zpomalení nadcházející kalamity.

8. Literární zdroje

BAIER, P.; PENNERSTORFER, J.; SCHOPF, A. PHENIPS- A comprehensive phenology model of *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytinae) as a tool for hazard rating of bark beetle infestation. *Forest ecology and management*, 2007, no. 249(3), str. 171-186 DOI: 10.1016/j.foreco.2007.05.020

CREELMAN, R.; MULLET, J. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *PNAS*, 1995, no. 92(10), str. 4114-4119, DOI: 10.1073/pnas.92.10.4114

CZECH FOREST. O lesích České republiky dle NIL (online). *Czech forest*, 2018 (cit. 15.03.2021). Dostupné z WWW: <http://www.czechforest.cz/informace-o-lesich>

Česko, Ministerstvo Zemědělství. Vyhláška č. 101 ze dne 28. března 1996, kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor služebního odznaku a vzor průkazu lesní stráže. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 1996, částka 33, s. 1124. ISSN 1211-1244.

ČESKÝ HYDROMETEOROLOGICKÝ ÚSTAV ČR. Roční zpráva o hydrometeorologické situaci v České republice 2019 (online). *Český hydrometeorologický ústav ČR*, 2020 (cit. 01.04.2021). Dostupné z WWW: https://www.chmi.cz/files/portal/docs/hydro/sucho/Zpravy/ROK_2019.pdf

EDERLI, I.; SALERNO, G.; QUAGLIA, M. In the tripartite combination *Botrytis cinerea*-*Arabidopsis*-*Eurydema oleracea*, the fungal pathogen alters the plant-insect interaction via jasmonic acid signalling activation and inducible plant-emitted volatiles. *Journal of plant research*; 2021, DOI: 10.1007/s10265-021-01273-9

ERBILGIN, N.; KROKE, P.; CHRISTIANSEN, E.; GERSHENZON, J. Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces host colonization by the bark beetle *Ips typographus*, *Oecologia*, 2006, no. 148(3), str. 426-436 DOI: 10.1007/s00442-006-0394-3

FRANKLIN, CMA.; HARPER, KA.; CLARKE, MJ. Trends in studies of edge influence on vegetation at human-created and natural forest edges across time and space. *Canadian journal of forest research*, 2021, no. 51(2), str. 274-282, DOI: 10.1139/cjfr-2020-0308

HAMERNÍK, J.; MUSIL, I. *Jehličnaté dřeviny*. 1. vyd. Praha: Academia, 2007, ISBN 9788020015679978-80-200-1567-9

HARINDER PSM.; SIDHURAJU, P.; KLAUS, B. Plant Secondary Metabolites. *Methods in Molecular Biolog*, 2007 DOI: 10.1007/978-1-59745-425-4

HUDEK, K.; KOLIBÁČ, J.; LAŠTŮVKA, Z.; PEŇÁZ, M. *Příroda České republiky: průvodce faunou*, 2019, ISBN: 978-80-200-2993-5

JONG-JOO, CH.; YANG, CH. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in genetic*, July 2003, str. 409-413, DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00138-0

KANDASAMY, D.; GERSHEZON, J.; HAMMERBACHER, A. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark *Beetle Control*. *Journal of chemical ecology*, 2016, no. 42(9), str. 952-969 DOI: 10.1007/s10886-016-0768-x

KÄRVEMO, S.; JOHANSSON, V.; SCHROEDER, M.; RANIUS, T. Local colonization-extinction dynamics of a tree-killing bark beetle during a large-scale outbreak. *Ecosphere*, 2016, no. 7(3), DOI: 10.1002/ecs2.1257

KAUTZ, M.; SCHOPF, R.; OHSER, J. The "sun effect": microclimatic alterations predispose forest edges to bark beetle infestations. *European journal of forest research*, 2013, no. 132(3), str. 453-465, DOI: 10.1007/s10342-013-0685-2

KŘÍSTEK, J.; URBAN, J. *Lesnická entomologie*. 2. vyd. Praha: Academia, 2013. 445 s. ISBN 978-80-200-2237-0.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2

KINCL, L. (2005), *Biologie rostlin*. Fortuna

KIRCHNER, J.; MILLER, J.; KELLER, G. Separation and Identification of Some Terpenes by New Chromatographic Technique, 1951, DOI: 10.1021/ac60051a008

LENOCH, J. *Dějiny lesního hospodářství a dřevozpracujícího průmyslu*, Mendelova univerzita v Brně 2014

LI, Y.; KANG, W.; HAN, Y.; SONG, Y. Spatial and temporal patterns of microclimates at an urban forest edge and their management implications, *Environ Monit Assess*, 2018, DOI: 10.1007/s10661-017-6430-4

LUSEBRINK, I.; ERBILGIN, N.; EVENDEN, ML. The Effect of Water Limitation on Volatile Emission, Tree Defense Response, and Brood Success of *Dendroctonus ponderosae* in Two Pine Hosts, Lodgepole, and Jack Pine. *Frontiers in ecology and evolution*, 2016, no. 4(2), DOI: 10.3389/fevo.2016.00002

MAREŠOVÁ, J.; MAJDÁK, J.; JAKUŠ, R.; HRADECKÝ, J.; KALINOVÁ, B.; BLAŽENEC, M. The short-term effect of sudden gap creation on tree temperature and volatile composition profiles in a Norway spruce stand. *Trees - Structure and Function*, 2020, 34(6), 1397–1409. DOI: 10.1007/s00468-020-02010-w

MARQUES, L.; CAMARERO, JJ.; ZAVALA, MA.; STOFFEL, M.; BALLESTEROS-CANOVAS, JA.; SANCHO-GARCIA, C.; MADRIGAL-GONZALEZ, J. Evaluating tree-to-tree competition during stand development in a relict Scots pine forest: how much does climate matter? *Tree-structure and funktion*, 2021, DOI: 10.1007/s00468-021-02109-8 Early

MARTIN, D.; THOLL, D.; GERSHENZON, J. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant physiology*, 2002, str. 1003-1018, DOI: 10.1104/pp.011001

MARTIN, DM.; GERSHEZON, J.; BOHLMANN, J. Induction of volatile biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant physiology*, 2003, no. 132(3), str. 1586-1599, DOI: 10.1104/pp.103.021196

MASEDA, P. H.; FERNÁNDEZ, R. J. Stay wet or else: three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany*, 2006, no. 57(15), str. 3963-3977, DOI: 10.1093/jxb/erl127

MEZEL, P.; POTTERF, M.; ŠKVARENINA, J.; RASMUSSEN, J.; JAKUŠ, R. Potential Solar Radiation as a Driver for Bark Beetle Infestation on a Landscape Scale, *Forests*, 2019, 604; DOI:10.3390/f10070604

MUSELÍK, J. 'Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze', *Chemické listy*, 2012, 106(1), pp. 10–15.

NETHERER, S.; KANDASAMY D.; JOROSOVA, A.; KALINOVA, B.; SCHEBECK, M.; SCHLYTER, F. Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. *Journal of pest science*, 2021, DOI: 10.1007/s10340-021-01341-y

NETHERER, S.; MATTHEWS, B.; KATZENSTEINER, K.; BLACKWELL, E.; HENSCHKE, P.; HIETZ, P.; PENNERSTORFER, J.; ROSNER, S.; KIKUTA, S.; SCHUME, H.; SCHOPF, A. Do water limiting conditions predispose Norway spruce to bark beetle attack? *New phytologist*, 2015, no. 205(3), str. 1128-1141, DOI: 10.1111/nph.13166

NOVOTNÝ, J.; *Ochrana lesa*. 1. vyd. 2003, ISBN 80-89100-03-1

PFEFFER, A. Fauna ČR. Svazek 6, Kůrovci – Scolytoidea (řád: Brouci – Coleoptera). 1. vyd. Praha, 1995, *Nakladatelství Československé akademie věd*, 324 s.

RICHARD, NB.; ROGER, MW. *Secondary metabolites in plant defence mechanisms* First published, 1994, DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x

SCHIEBE, C.; HAMMERBACHER, A.; BIRGERSOON, G.; WITZELL, J.; BRODELIUS, PE.; GERSHENZON, J.; HANSON, BS.; KROKENE, P.; SCHLYTER, F. Indisibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle, 2012, *Oecologia*, str. 183-198, DOI: 10.1007/s00442-012-2298-8

TOMÁŠKOVÁ, I.; KUBÁSEK, J. *Fyziologie lesních dřevin I. - fyziologie, produkce a stresy rostlin* ISBN: 978-80-213-2608-8, 1. vydání, 2016, vydavatel – CZU

WEI, XQ.; VRIELING, K.; KIM, HK.; MULDER, PPJ.; KLINKHAMER, PGL. Application of methyl jasmonate and salicylic acid lead to contrasting effects on the plant's metabolome and herbivory, *Plant science*, 2021, no. 110784, DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110784

YAMASHITA, F.; RODRIGUES AL.; RODRIGUES, TM.; PALERMO, FH.; BALUSKA, F.; DE ALMEIDA, LFR. Potential Plant-Plant Communication Induced by Infochemical Methyl Jasmonate in Sorghum (*Sorghum bicolor*), *Plant-Basel*, 2021, no. 485, DOI: 10.3390/plants10030485

ZHAO, T.; KROKENE, P.; HU, J.; CHRISTIANSEN, E.; BJORKLUND, N.; LANGSTROM, B.; SOLHEIM, H.; BORG-KALRSON, AK. Induced Terpene Accumulation in Norway Spruce Inhibits Bark Beetle Colonization in a Dose-Dependent Manner, *Journal impact*, 2011, no. e26649, DOI: 10.1371/journal.pone.0026649