

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

**Poměr enantiomerů alpha-pinenu, jako možný znak pro identifikaci
jedinců smrku ztepilého (*Picea abies*) s větší odolností proti útoku
lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)**

Diplomová práce

Autor: Bc. Libor Mikolášek

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

2023

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Libor Mikolášek

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Poměr enantiomerů alpha-pinenu, jako možný znak pro identifikaci jedinců smrku ztepilého (*Picea abies*) s větší odolností proti útoku lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)

Název anglicky

Enantiomeric ratio of alpha-pinene as protentional marker of Norway spruce (*Picea abies*) resistance against European spruce bark beetle attack (*Ips typographus*)

Cíle práce

Jako důsledek klimatické změny jsou smrkové porosty v poslední dekádě vystaveny útokům agresivního kůrovce lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)(L). Ve střední Evropě dochází ke gradacím populace tohoto škůdce, a jeho kalamitní přemnožení způsobuje rozsáhlé ekonomické a ekologické škody. Jedním z preventivních opatření může být selekce stromů pro pěstitelské programy na základě biochemických markerů majících souvislost s odolností stromů proti útoku kůrovců.

Samci lýkožrouta smrkového produkují potentní agregační feromon, pomocí kterého svolávají soudruhy k hromadnému útoku na strom. Jednou z hlavních složek je alkohol cis-verbenol, který se tvoří oxidací v těle samců ze specifického enantiomeru hostitelského monoterpenu (-)-alpha-pinenu, takže stromy s vyšším obsahem tohoto prostorového isomeru jsou pro brouky výhodnějšími hostiteli. Poměr enantiomerů (-)- a (+)- alpha-pinenu tedy může být potencialem znakem k výběru smrků odolnějších proti kůrovci.

Cílem této diplomové práce bude shrnout v literární rešerši poznatky o složení sekundárních metabolitů jehličnanů a jejich spojitosti s odolností vůči herbivorům. V praktické části bude chemickou analýzou určen poměr enantiomerů alpha-pinenu na provenienční ploše smrku ztepilého, kde jsou v klonových řadách pěstování jedinci pocházející z různých nadmořských výšek, které lze klasifikovat do tří skupin tzv. ekotypů. Ze získaných hodnot bude vyhodnoceno, zda je poměr enantiomerů alpha-pinenu znakem opakujícím se v rámci genotypu, popřípadě v rámci ekotypu, či zda to je individuální vlastnost jednotlivých stromů.

Metodika

Výzkum bude prováděn na experimentální provenienční ploše smrku ztepilého v lokalitě Cukrák. Dvakrát za sezónu bude vzorkováno lýko testovaných stromů, vzorky budou hluboce zamrazeny a později budou v laboratoři homogenizovány a extrahovány organickým rozpouštědlem. Extrakty budou analyzovány plynovou chromatografií s instalovanou chirální kolonou s fází schopnou separovat enantiomery. Retenční čas cílových enantiomerů alpha-pinenu bude potvrzen po porovnání s retenčním časem komerčně dostupných standardů. Výsledky budou statisticky vyhodnoceny a bude diskutováno opakování tohoto znaku v rámci genotypů a ekotypů stromů.

Rozvrh: Květen/srpen2021-odběry vzorků na lokalitě + zpracování v laboratoři, Září/prosinec2021-měření vzorků a vyhodnocování výsledků, průzkum odborné literatury, Leden/duben 2022 kompilace výsledků a poznatků z literatury do diplomové práce



Doporučený rozsah práce

40-60

Klíčová slova

smrk ztepilý, alpha-pinene, enantiomer, Ips typographus, lýkožrout smrkový

Doporučené zdroje informací

- Burke JL, Carroll AL. 2016. The influence of variation in host tree monoterpene composition on secondary attraction by an invasive bark beetle: implications for range expansion and potential host shift by the mountain pine beetle. *Forest Ecology and Management* 359: 59– 64.
- Celedon J., Bohlmann J. (2019) Oleoresin defenses in conifers: chemical diversity, terpene synthases and limitations of oleoresin defense under climate change, *New phytologist* 224: 1444–1463
- Erbilgin N., Krokene P., Kvamme T., Christiansen E., (2007), A host monoterpene influences Ips typographus (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) responses to its aggregation pheromone, *Agricultural and Forest entomology* 9, 135–140
- Lindstrom M., Norin T., Birgersson G., Schlyter F. (1989) Variation of enantiomeric composition of alpha-pinene in Norway spruce, Picea abies, and its influence on production of verbenol isomers by Ips typographus in the field, *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2, 542-548.
- Persson M., Sjodin K., Borg Karlsson A-B., Norin T. and Ekberg T (1996) Relative amounts and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of Picea abies, *Phytochemistry*, 42, 5, 1289-1297,
- Schonwitzer Roswitha, Kioos M., Merk L., Ziegler H. (1990) Patterns of monoterpenes stored in the needles of Picea abies (L.) Karst. from several locations in mountainous regions of southern Germany *Trees* 4:27-33
- Tittiger, C. and G. J. Blomquist (2016). Pheromone Production in Pine Bark Beetles. *Pine Bark Beetles*. C. Tittiger and G. J. Blomquist. 50: 235-263

Předběžný termín obhajoby

2021/22 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Jaromír Hradecký
Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.
RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D.
Ing. Barbora Stříbrská

Elektronicky schváleno dne 29. 4. 2021

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 1. 3. 2022

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 03. 04. 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Poměr enantiomerů alpha-pinenu, jako možný znak pro identifikaci jedinců smrku ztepilého (*Picea abies*) s větší odolností proti útoku lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)“ vypracoval samostatně pod vedením Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil, a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědom, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

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

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

V Praze dne

Bc. Libor Mikolášek

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí práce Ing. Anně Jirošové, Ph.D. za vyčerpávající a odbornou pomoc při konzultacích diplomové práce a instruktáž při odběru vzorků lýka v terénu.

Následně chci poděkovat Ing. Barboře Stříbrské za veškerou poskytnutou pomoc, rady a vlídná slova, Ing. Veronice Hammerové za pomoc při odběru vzorků lýka v terénu a Kateřině Fendrychové za pomoc při mechanickém zpracování vzorků v laboratořích.

Mé poděkování patří Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za konzultace a zpracování vzorků na plynovém chromatografu.

Dále chci poděkovat RNDr. Jaroslavu Čeplovi, Ph.D. za obsáhlé a komplexní konzultace týkající se statistického zpracování dat v programu Rstudio.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také rodině, přátelům a pracovnímu kolektivu, kteří mě přese všechny nesnáze podporovali při studiu, inspirovali mě a ukázali mi, že v první řadě by si měl člověk užívat života.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce pojednává o vlivu poměru enantiomerů α -pinenu na odolnost smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) proti útoku lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* (L.)). Stěžejní myšlenkou této práce je stereospecifita detoxikace terpenů lýkožroutem. Za přítomnosti (-)- α -pinenu v lýce lýkožrout během útoku na strom produkuje *cis*-verbenol, který slouží jako jedna z hlavních složek agregačního feromonu. Při vstupu (+)- α -pinenu do stejné reakce je produktem *trans*-verbenol, který agregační funkci postrádá. Stromy s nižším poměrem (-)- α -pinenu oproti druhému enantiomeru mají tak větší šanci odolat útoku lýkožrouta. Poměr enantiomerů α -pinenu byl stanoven pro smrky na lokalitě „Cukrák“. Smrky jsou zde pěstovány na provenienční ploše v klonových řadách, které reprezentují tři základní ekotypy smrku. Byly analyzovány vzorky z extraktů lýka, odebraného na jaře 2019, v létě 2019 a v létě 2021. Poměr enantiomerů byl následně stanoven pomocí plynové chromatografie. Sledovaný znak se lišil napříč genotypy. Mezi ekotypy nebyla pozorována odlišnost. Znak se nelišil mezi jednotlivými odběry pro různé sezóny. U genotypů s příznivou hodnotou poměru enantiomerů je vhodné zvážit jejich zařazení do šlechtitelských programů, jelikož se jedná o dědičný znak.

Klíčová slova: Smrk ztepilý, (-)- α -pinen, *Ips typographus*, Lýkožrout smrkový, dědičný znak

Abstract

The presented thesis discusses influence of an α -pinene enantiomeric ratio on resistance of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) against attack of the European spruce bark beetle (*Ips typographus* (L.)). Key idea of this thesis is the stereospecificity of detoxification of terpenes by the bark beetle. In the presence of (-)- α -pinene in phloem the bark beetle attacking the tree produces a *cis*-verbenol, which serves as one of the basic component of the aggregation pheromone. Upon entry of the (+)- α -pinene into the same reaction the product is a *trans*-verbenol, which lacks the attractive function. Trees with lower ratio of the (-)- α -pinene, compared to the other enantiomer have higher chances of withstanding the bark beetle's attack. The α -pinene enantiomeric ratio was determined for spruce in the location „Cukrák“. Spruce here is cultivated on the provenience growth in clone rows, which represent three basic spruce ecotypes. The phloem extract was analysed, the sampling took place in spring 2019, summer 2019 and summer 2021. The enantiomeric ratio was determined by the gas chromatography. The observed trait varied between genotypes. There was no observed difference between ecotypes. The trait did not differ in between samplings during different seasons. For genotypes with a favourable enantiomeric ratio, it is advisable to consider their inclusion in breeding programmes as this trait is heritable.

Key words: Norway spruce, (-)- α -pinene, *Ips typographus*, European spruce bark beetle, heritable trait

Obsah

1	Úvod	11
2	Cíle práce.....	12
3	Literární rešerše	13
3.1	Smrk ztepilý (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.).....	13
3.1.1	Obecná charakteristika.....	13
3.1.2	Ekotypy smrku ztepilého	13
3.1.3	Reakce Smrku ztepilého na stres	14
3.2	Obranné mechanismy jehličnanů	15
3.2.1	Konstitutivní obrana.....	16
3.2.2	Indukovaná obrana	16
3.2.3	Sekundární pryskyřice.....	17
3.3	Sekundární metabolity jehličnanů.....	19
3.3.1	Chemická povaha terpenů	20
3.3.2	Monoterpeny	23
3.3.3	Pineny.....	24
3.3.4	α -pinen a enantiomerický poměr	24
3.4	Lýkožrout smrkový	27
3.4.1	Charakteristika	27
3.4.2	Hostitelská dřevina.....	27
3.4.3	Reprodukční strategie a životní cyklus	27
3.4.4	Vyhledávání hostitelské dřeviny	28
3.4.5	Feromony	30
3.4.6	Verbenol.....	30
3.4.7	2-methyl-3-buten-2-ol.....	33
3.4.8	Další aktivní látky	33
3.5	Chemická analýza	34
3.5.1	Plynová chromatografie	34
3.5.2	Hmotnostní spektrometrie.....	35
3.6	Shrnutí.....	36
4	Praktická část.....	36
4.1	Metodika	36
4.1.1	Charakteristika porostu	36
4.1.2	Odběr vzorků.....	38
4.1.3	Mechanické zpracování vzorků	39

4.1.4	Chemická analýza	40
4.1.5	Zpracování dat.....	41
4.1.6	Statistická analýza.....	43
4.2	Výsledky	43
4.2.1	Normalita rozdělení.....	43
4.2.2	Rok 2021	48
4.2.3	Jaro 2019	53
4.2.4	Léto 2019	57
4.2.5	Dílčí shrnutí výsledků	61
4.2.6	Souhrnná analýza	61
4.2.7	Dílčí shrnutí výsledků souhrnného testování	72
4.2.8	Shrnutí výsledků	72
5	Diskuze	73
6	Závěr.....	76
7	Seznam použitých zdrojů	77
8	Seznam obrázků.....	86
9	Seznam tabulek.....	89
10	Přílohy.....	90

1 Úvod

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* (L.)) představuje nejzávažnější hrozbu pro české lesní hospodářství, pro které je smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst) stále nejpodstatnější produkční dřevinou. Jedná se sice o sekundárního škůdce, který napadá převážně oslabené stromy, při gradaci však vykazuje agresivní chování a napadá i zdravé porosty (Křístek *et al.*, 2002). Vlivem klimatické změny a výkyvů počasí posledních let jsou porosty smrku oslabovány a snáze podléhají lýkožroutu smrkovému. Jehličnany disponují v boji proti lýkožroutům vyvinutým obranným systémem, založeným na konstitutivní a indukované obraně (Bonello *et al.*, 2006), využívajícím širokou škálu chemikálií známé jako sekundární metabolity (Taiz, Zeigler, 2002). Ve všech pletivech a zejména v pryskyřici jehličnanů se vyskytuje obsáhlá skupina terpenů plnicích širokou škálu funkcí. U jehličnanů představuje většinu složení terpenů α -pinen následovaný β -pinenem. Je to právě α -pinen, jehož enantiomery hrají podstatnou roli v interakci smrku s lýkožroutem.

2 Cíle práce

Cílem práce je v teoretické části shrnout poznatky o sekundárních metabolitech jehličnanů a jejich spojitost s odolností vůči herbivorům. Vzhledem k praktické části je tato teorie založena na odolnosti smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus* (L.)).

V praktické části je cílem práce stanovit poměr enantiomerů α -pinenu na provenienční ploše smrku ztepilého a statisticky vyhodnotit, zda je poměr enantiomerů α -pinenu znakem opakujícím se v rámci ekotypu, genotypu, či zda se jedná o individuální vlastnost jednotlivých stromů.

3 Literární rešerše

3.1 Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.)

Smrk ztepilý je pro lesní hospodářství v Evropě jednou z nejdůležitějších dřevin s bohatou tradicí. Je poměrně nenáročný z hlediska pěstování. Jeho dřevo rychle přirůstá, je kvalitní a univerzálně využitelné. Kvůli svým pozitivním vlastnostem byl často vysazován i mimo svůj přirozený areál (často v monokulturách), což vedlo ke snížení výtěžnosti, ekologickým problémům i ohrožení vitality a stability porostů (Poleno *et al.*, 2009). K těmto problémům se vlivem klimatických změn přidává i gradace škůdců.

3.1.1 Obecná charakteristika

Smrk ztepilý je polostinný až stinný druh s vysokými nároky na vodu a naopak nízkými nároky na teplotu. Smrku vyhovují krátká vegetační období s kratšími a chladnějšími léty. Vysoké teploty společně s nedostatkem vody během vegetační sezóny pro smrk představují limitující faktor. Přirozený výskyt smrku není zásadně limitován nadmořskou výškou, ale spíše chladným kontinentálním klimatem a dobrým vodním režimem (Poleno *et al.*, 2009). Půdní nároky smrku jsou nízké. Souvislé smrkové porosty, obzvláště pěstované monokulturně, zhoršují vlastnosti lesních půd (Kacálek *et al.*, 2017).

Pro smrk je typický plochý kotevní kořenový systém, ve kterém jsou výrazně odlišeny horizontální kosterní a vertikální kořeny. Stavba kořenového systému je závislá na úživnosti půdy a dostupnosti vody. Na chudších a sušších půdách je kořenový systém rozvinutější jak v horizontálním tak, vertikálním směru. Naopak na úživných a podmáčených a stanovištích jsou porosty velice nestabilní a náchylné k bořivým větrům (Kacálek *et al.*, 2017).

3.1.2 Ekotypy smrku ztepilého

Smrk ztepilý se vyznačuje podstatnou morfológickou variabilitou. Variabilita je zapříčiněna fenotypickou adaptací na diverzní klimatické podmínky rozsáhlého areálu. Populace adaptované na lokální podmínky tak vykazují zvýšenou odolnost proti abiotickým faktorům, především sněhu a větru. Morfológická adaptace se projevuje na tvaru koruny nasazení větví, či tvaru jehlic. Mimo to se ekotypy odlišuje také zeměpisným původem, klimatickými nároky a konkurenční vegetací místa původu (Bínová *et al.*, 2020).

V závislosti na rozdílné morfologii rozlišujeme na území České republiky tři základní ekotypy, odlišující se v ekologických nárocích, které jsou pevně spjaty s nadmořskou výškou jejich původu (Čepl *et al.*, 2020).

- Chlumní ekotyp (*acuminata*) se vyznačuje širokou eliptickou až vejčitou korunou, obvykle tmavou borkou. Větve prvního řádu jsou dlouhé a štíhlé, ke kmeni posazené v pravém úhlu. Větve druhého a třetího řádu jsou hřebenité až hřebenitosvazčité. Jehlice jsou dlouhé a řídké. Vyskytuje se v nadmořských výškách do 500 m (až 700 m) (1-5. lesní vegetační stupeň) Vyznačuje se rychlým růstem v mládí.
- Horský ekotyp (*europaea*) se vyznačuje kratší a středně širokou korunou kónického tvaru. Kmen je válcovitý. Větve prvního řádu jsou nasazeny převážně vodorovně. Větve druhého a třetího řádu jsou svazčité, kratší, hustší a převislé. Vyskytuje se v nadmořských výškách 700-1050 m (5 a 6. lesní vegetační stupeň). Z pěstitelského hlediska se jedná o ekotyp dosahující nejvyšších přírůstků.
- Vysokohorský (*obovata*) se vyznačuje štíhlými hustými korunami pyramidového tvaru. Kmen je silně sbíhavý. Větve jsou ploché, napojené blízko kmene silné a převislé. Jehlice jsou husté, tupé a krátké. Tento ekotyp je nejlépe adaptován na silné vrstvy sněhu, silný vítr i námrazu. Přirozeně se vyskytuje v nadmořských výškách přibližně 1100 m až po horní hranici lesa. Vyznačuje se pomalým růstem v mládí.

Popsané charakteristiky ekotypů jsou rámcové a orientační. Znaky jednotlivých ekotypů se mohou prolínat. Znaky se mohou zásadně lišit, pokud se jedná o solitérního, nebo zapojeného jedince. Také by se neměla příslušnost jedinců k ekotypu posuzovat pouze na základě jediného znaku (Šnytr, 2009).

3.1.3 Reakce Smrku ztepilého na stres

Při populační gradaci jsou k napadení lýkožroutem více náchylné stromy pod vlivem stresu. Podstatným stresorem poslední doby je sucho spojené s globální změnou klimatu, která bude mít komplexní dopad na ekosystém a tím pádem i na lesní hospodářství (Trumbore *et al.*, 2015).

Vyšší teploty a sucho postupně snižuje vodní tlak v xylému. Dřeviny náchylné ke stresu z nedostatku vody na to reagují zavřením stomat. Dojde k poklesu fotosyntetické aktivity a klesá i zásoba nestrukturních sacharidů (NSC; non-structural carbohydrates),

zejména základních mono a oligosacharidů a škrobů (Adams *et al.* 2013). Zásoba NSC představuje základní energetický zdroj stromu pro respiraci, růst, reprodukci, uskladnění a produkci konstitučních i indukovaných speciálních (sekundárních) metabolitů. Dostupnost a rozdělení NSC pro syntézu látek s obrannou funkcí se v případě sucha mění nelineárním způsobem v závislosti na druhu metabolitu, načasování a intenzitě stresu (Huang *et al.*, 2020). Jednotlivé stromy často přerozdělují zásoby NSC pro syntézu speciálních metabolitů, určených pro opravu poškození spojeného se stresem, nebo na posilování obrany (Huang *et al.*, 2019).

Syntéza terpenů a emise těkavých látek se u jehličnanů zvyšuje se stupňujícím se stresem ze sucha až do kritického bodu, kdy začne opět klesat vlivem vážného nedostatku vody (Holopainen *et al.*, 2018). Obdobný jev pozorujeme i u pryskyřičných toků, během méně závažného sucha se zvyšují a snižují se a ustávají až při vážném nedostatku vody (Gaylord *et al.*, 2013). Tato skutečnost může poukazovat na to, že prostřednictvím terpenů dávají okolí najevo změny v obranyschopnosti stromu. Celková koncentrace řady dalších speciálních metabolitů (mimo terpeny) se vlivem sucha ve většině případů nemění (Koricheva *et al.*, 1998).

Obrana stromu jako celek je silně závislá na intenzitě, načasování a délce suché periody. Stromy chronicky vystavované stresu jsou odolnější proti útoku lýkožrouta než stromy vystavené akutnímu nedostatku vody. V přírodě může gradace lýkožrouta působit jako přirozený výběr tím, že se vyhne genotypům, které jsou lépe adaptované na teplá a suchá stanoviště (Netherer *et al.*, 2021).

3.2 Obranné mechanismy jehličnanů

Jehličnany mají efektivní obranný systém, který prodělal minimálně 45 milionů let přirozené selekce. Odpuzuje nebo hubí herbivory a chemickou nebo fyzickou cestou brání průniku patogenů (Bonello *et al.*, 2006). Obrana je značně ovlivňována podmínkami prostředí, zejména osluněním a teplotou (Berini *et al.* 2018). Obrana jehličnanů je úrovněná, každý další stupeň obrany je aktivován po selhání předchozího stupně. Prvním prvkem obrany je konstitutivní rezistence, jejímž principem je zadržet nebo odpudit škůdce. Ve druhé fázi se napadená rostlina brání s cílem eliminovat škůdce. Ve třetí fázi regeneruje a zotavuje se ze škod. Ve čtvrté fázi získává vyšší odolnost proti opětovnému napadení konkrétním škůdcem (Bonello *et al.*, 2006). V principu se jedná o dva základní mechanismy: o konstitutivní obranu a indukovanou obranu.

3.2.1 Konstitutivní obrana

Konstitutivní obrana je systém, skládající se z fyzických a chemických bariér, kterými pletivo znesnadňuje napadení. Jedná se o pasivní rezistentní mechanismus z morfologického hlediska zahrnující pryskyřičné kanálky, floémové buňky obsahující fenolické látky a silně lignifikované buňky. Škodlivé organismy napadající jehličnany musí tyto bariéry překonat (Bonello *et al.*, 2006). Z pohledu rostliny byla investována energie na tyto rezistentní prvky již před samotným napadením. Investice energie do konstitutivní obrany zajišťuje zpomalení a umírnění prvotního náporu napadení a poskytuje prostor pro zapojení indukivní obrany (Francesci *et al.*, 2005). Tento typ obrany není cílený na konkrétního škůdce, ale je účinný proti široké škále nepřátelských organismů.

Při pokusu o porušení kůry je vyloučena pryskyřice obsahující toxické terpenoidy a fenolické látky. Primární (konstitutivní) pryskyřice se formuje nepřetržitě a akumuluje se ve speciálních pletivech. Pryskyřičné buňky v různých rodech a druzích jehličnanů nabývají různých podob a jsou různě rozvinuté. Od jednotlivých pryskyřičných buněk až po struktury pryskyřičných kanálků. Konstitutivnost tohoto obranného prvku spočívá ve skutečnosti, že porušením pryskyřičného kanálku a přístupem vzduchu pryskyřice tuhne a brání dalšímu postupu narušitele (Lewinsohn *et al.*, 1991). Smrky se silnější kůrou a hustší sítí pryskyřičných kanálků jsou úspěšnější v odvrácení pokusu o závrt (Wermelinger, 2004).

3.2.2 Indukovaná obrana

Indukovaná obrana je aktivní systém spuštěný po napadení škůdcem, v případě lýkožrouta to je průnik do lýka závrtem. Poškození těla aktivuje určité geny, nebo dochází k translačním úpravám produktů proteosyntézy. Indukovaná obrana může být cílená na konkrétního škůdce. Výsledkem je produkce specifických sloučenin. Strom investuje zdroje po tom, co je napaden cizím organismem (Bonello *et al.*, 2006).

Indukovanou obranu můžeme teoreticky rozdělit do pěti kategorií. V praxi se obranné faktory doplňují a nezávisle na kategorii, do které spadají, doplňují ve vysoce integrovanou a koordinovanou odpověď, kterou dané okolnosti vyžadují (Eyles *et al.*, 2009):

1. Indukovaná chemická obrana produkce toxických, antimikrobiálních, nevyživných a nestravitelných látek s malou molekulární hmotností. Tato skupina zahrnuje alkaloidy fenolické látky a terpenoidy.
2. Indukovaná bílkovinová obrana – produkce bílkovin, peptidů a enzymů s podobným účinkem jako v první kategorii.
3. Indukovaná anatomická obrana – tvorba strukturních překážek
4. Induktivní ekologická nebo nepřímá obrana – vábení přirozeného nepřítele škůdce napadajícího strom
5. Induktivní tolerantní obrana – přerozdělení zdrojů na regeneraci pletiv, přesun zásob do nepoškozených částí těla apod.

V souvislosti s tímto obranným mechanismem lze hovořit o imunitním systému rostliny. Jedná se o schopnost všech buněk hostitele reagovat na poškození, které prodělala část jeho těla. Tato imunita je založena na detekci látek dokazujících přítomnost škůdce (např. oxidované terpeny vyloučené lýkožroutem nebo chemické produkty houby, kterou přenáší lýkožrout) pomocí signálních molekul, které spouští signální kaskádu (Salačová *et al.*, 2015). Rostlina tak dokáže rozpoznat, jestli se jedná o napadení škůdcem, nebo o fyzické poškození (Dvořáková *et al.*, 2011).

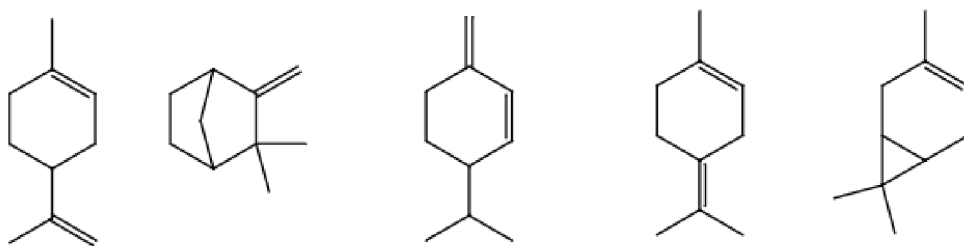
Přežití stromu napadeného podkorním hmyzem závisí v praxi více na induktivní obraně než na konstitutivní (Raffa, 2014).

3.2.3 Sekundární pryskyřice

Příkladem indukované obrany u jehličnanů je tvorba sekundární pryskyřice a traumatických pryskyřičných kanálků (toků) (TRD; Traumatic resin ducts) (Bonello *et al.*, 2006). Sekundární pryskyřice (označovaná také: balzám, oleoresin, oleopryskyřice) je produktem specifických fyziologických procesů a je ukládána ve specializovaných parenchymatických buňkách floému. Jedná se o komplexní směs, jejíž základ je tvořen terpentýnem (turpentine) a smolou (rosin, colophony) (obr. 1). Terpentýn je tvořen monoterpeny a seskviterpeny. Terpentýn je těkavé rozpouštědlo sloužící pro transport látek s vyšší molekulární hmotností obsažených ve smole do míst narušení rostlinného těla. Smola obsahuje diterpeny a pryskyřičné kyseliny. Za přístupu vzduchu se terpentýn odpařuje a smola tuhne, uzavírá rány a často uvězňuje hmyzí škůdce v ráně (Phillips, Croteau, 1999). Monoterpeny ve vysokých koncentracích mají na hmyz repelentní účinek, hubí všechna vývojová stádia podkorního hmyzu a mají slabší fungicidní účinek.

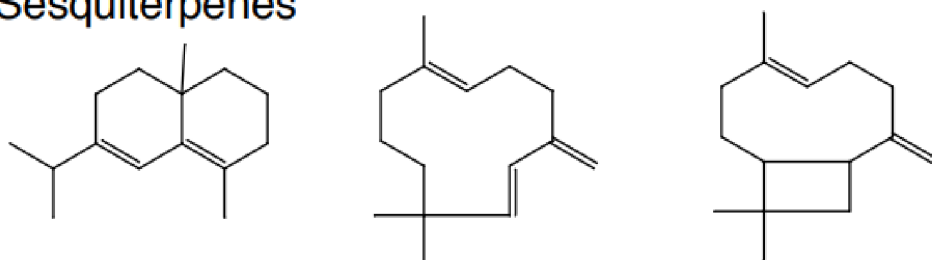
Diterpenické kyseliny mají vysoký fungicidní účinek a menší vliv na aktivitu hmyzu (Raffa, 2014). Traumatické pryskyřičné kanálky zajišťují dodatečný výron pryskyřice. Není vždy možné přesně určit, zda se jedná o traumatické pryskyřičné kanálky (TRD), nebo o konstitutivní pryskyřičné kanálky, rovněž jako není jistá hranice mezi konstitutivní a indukovanou produkcí a složení pryskyřice. V místě poškození se však vždy kumuluje zvýšené množství pryskyřice (Lewinsohn *et al.*, 1991).

Monoterpenes



Limonene Camphene β -Phellandrene Terpinolene 3-Carene

Sesquiterpenes

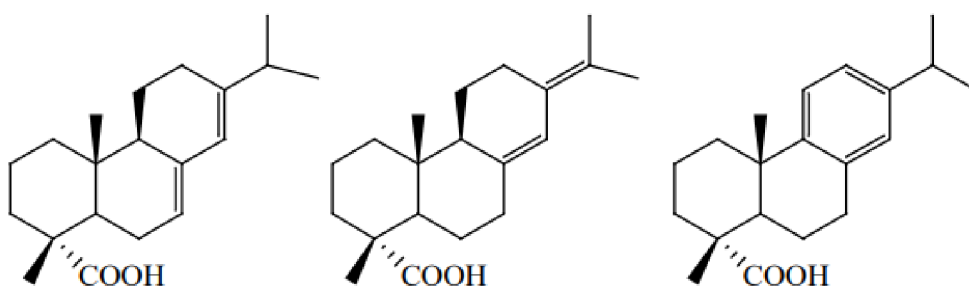


δ -Selinene

γ -Humulene

β -Caryophyllene

Diterpene resin acids



Abietic acid

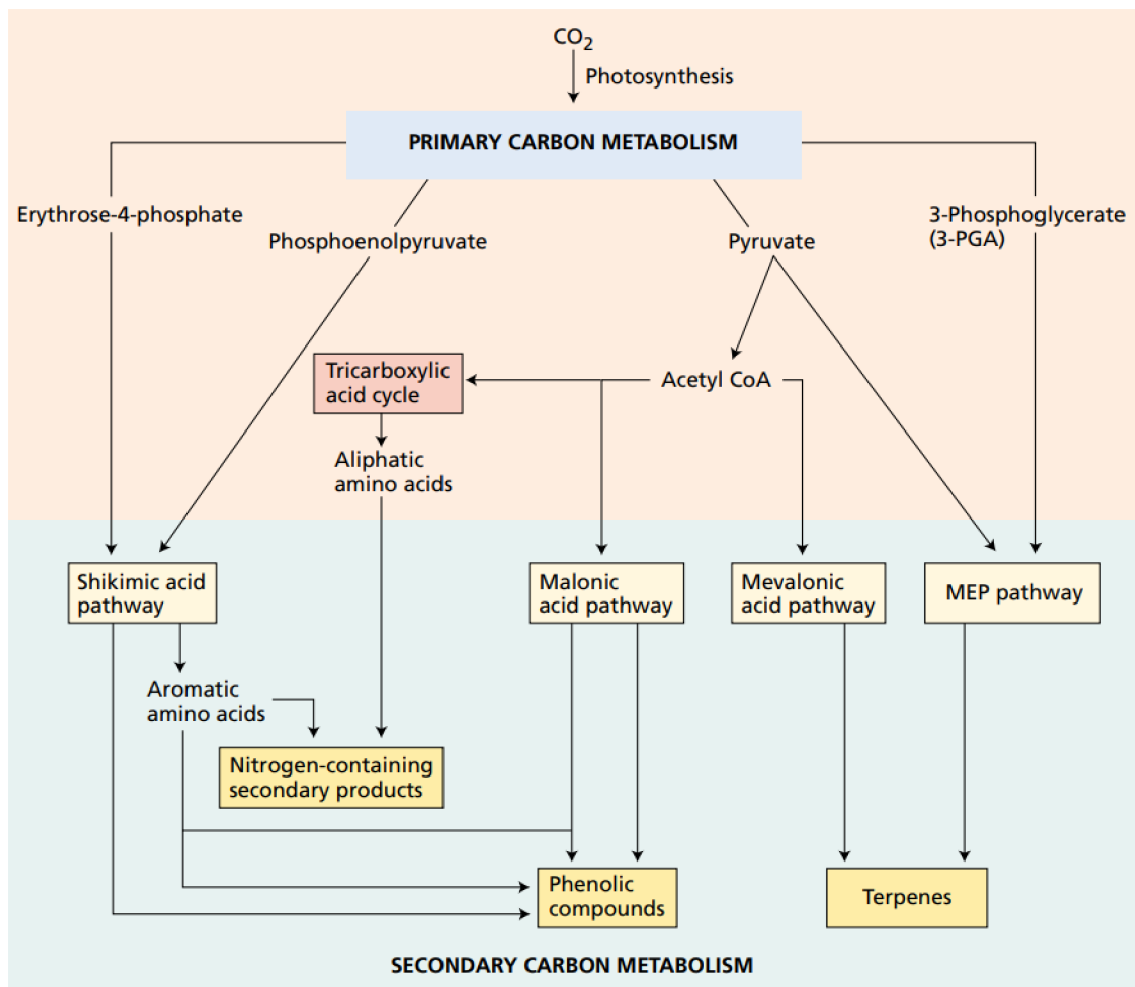
Neoabietic acid

Dehydroabietic acid

Obrázek 1 Základní složky sekundární pryskyřice, terpenyln je zastoupen monoterpeny a seskviterpeny; smola je zastoupena diterpenickými pryskyřičnými kyselinami. Monoterpeny jsou deriváty odvozeny od geranyl difosfátu, seskviterpeny od farnesyl difosfátu a diterpeny od geranyl geranyl difosfátu. Z diterpenů se po dalších oxidativních modifikacích stávají pryskyřičné kyseliny (Phillips, Croteau, 1999).

3.3 Sekundární metabolity jehličnanů

Všechny rostliny produkují značné množství organických látek, které nemají přímý vliv na růst a vývoj, nebo další základní procesy. Tyto látky jsou známé pod označením sekundární metabolity. Oproti primárním metabolitům se konkrétní sekundární metabolity mohou vyskytovat jen v konkrétních řádech, čeledích, rodech i družích rostlin. Podobně jako jejich složení je různorodá i funkce jednotlivých sekundárních metabolitů. Z chemického hlediska můžeme sekundární metabolity rozdělit do tří kategorií: terpeny, fenolické látky a dusíkaté sloučeniny (Taiz, Zeigler, 2002) (obr. 2). Vzhledem k cílům diplomové práce budou podrobněji probrány terpeny, monoterpeny a α -pinen.

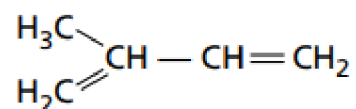


Obrázek 2 Schématické znázornění vzniku sekundárních metabolitů v závislosti na primárním metabolismu (Taiz, Zeigler, 2002)

3.3.1 Chemická povaha terpenů

Terpeny tvoří nejrozšířenější a strukturně nejrozmanitější skupinu sekundárních rostlinných metabolitů. Hrají důležitou roli v interakci rostliny s hmyzem, patogeny a jinými rostlinami (Dudareva *et al.*, 2004). Některé terpeny vykazují vliv na růst a vývoj rostliny, lze je tak v některých případech považovat za primární metabolity spíše než sekundární (Taiz, Zeigler, 2002).

Z chemického hlediska se jedná o látky složené ze dvou nebo více izoprenových jednotek. Izoprenová jednotka představuje pětiuhlíkatou sloučeninu (obr. 3). Terpeny se dělí podle počtu izoprenových jednotek. V rostlinách jsou nejvíce zastoupeny první dvě skupiny: monoterpeny, obsahující 2 jednotky a seskviterpeny, obsahující 3 jednotky. Vyšší terpeny se nachází jak v rostlinném, tak živočišném materiálu. Vyšší terpeny jsou: diterpeny (4 jednotky); triterpeny (6 jednotek) a tetraterpeny (8 jednotek). Jako polyterpeny jsou označovány terpeny tvořeny více než 8 jednotkami (Taiz, Zeigler, 2002).



Obrázek 3 Strukturální vzorec izoprenové jednotky (izopren; 2-methylbuta-1,3-dien), základní stavební jednotky terpenů (Taiz, Zeigler, 2002)

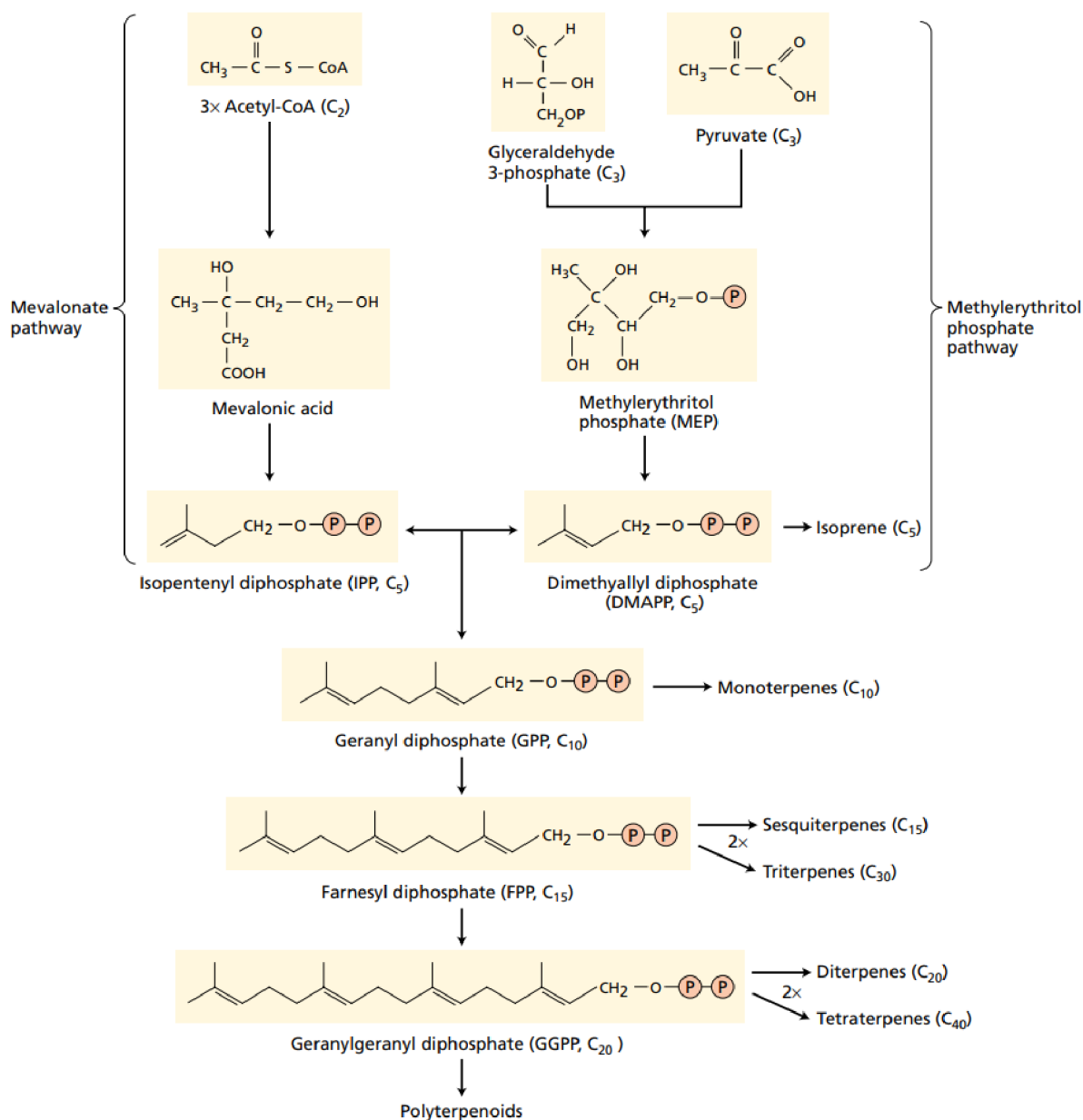
Izoprenové jednotky jsou vázány systémem hlava-pata, hlava-hlava, pata-pata, kde hlava je atom C₍₁₎ a pata atom C₍₄₎. Dle uspořádání řetězce se dělí na alifatické a cyklické. Přítomné dvojně vazby mohou být nasyceny. Podle zastoupení funkčních skupin se jedná o uhlovodíky, nebo jejich deriváty (terpenoidy), nejčastěji alkoholy, aldehydy a ketony (Klouda, 2013).

Biologická syntéza izoprenových jednotek vychází z kombinace isopentenylidifosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP). Oba tyto prekurzory jsou vzájemně strukturní izomery. Tyto dva prekurzory vznikají dvěma různými drahami, reprezentující dvě složité chemické reakce (obr. 4) (Klouda, 2013). Přičemž oba prekurzory jsou produktem obou drah. V obou drahách dochází k syntéze prekurzorů jiným způsobem a produktů obou drah je uplatněno při syntéze různých skupin terpenů (Dvořáková *et al.*, 2011).

První způsob reprezentuje dráha mevalonátové kyseliny (mevalonic acid pathway, MVA), kde jsou zdrojem uhlíku tři molekuly acetyl-CoA. U rostlin jsou prekurzory vzniklé MVA drahou upotřebeny v syntéze seskviterpenů a triterpenů. MVA dráha probíhá v cytosolu buněk (Taiz, Zeigler, 2002).

Druhou drahou je dráha pyruvátová (také označovaná jako Rohmerova) (methylerythrol phosphate pathway, MEP), kde jsou zdrojem uhlíku molekuly glyceraldehyd 3-fosfát a pyruvát (Taiz, Zeigler, 2002). U rostlin jsou prekurzory vzniklé MEP drahou uplatněny při syntéze monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů. MEP dráha probíhá v plastidech buněk. S MEP drahou se setkáváme pouze u rostlin a řas (Dvořáková *et al.*, 2011).

U rostlin není rozdělení způsobu vzniku prekurzorů jednotlivých skupin terpenů striktní. Obě dráhy se mohou propojovat a doplňovat (Dvořáková *et al.*, 2011).



Obrázek 4 Syntéza terpenů. U rostlin jsou pěti-uhlíkaté jednotky terpenů syntetizovány dvěma různými drahami: MVE (vlevo) a MEP (vpravo). IPP a DMAPP jsou zkombinovány do deseti-, patnácti-, a více uhlíkatých terpenů (Taiz, Zeigler, 2002)

Skladba terpenů a enantiomerická struktura jehličnanů je silně podmíněna genetickým původem (Kännaste *et al.* 2012), méně sledovaným pletivem stromu (Borg-Karlson *et al.* 1993) nebo geografickou polohou a podmínkami prostředí (Persson *et al.*, 1996). Změny v koncentracích a složení monoterpenů je spojována se stresem vzniklým interakcí s lýkožroutem.

3.3.2 Monoterpeny

Monoterpeny jsou acyklické, monocyklické nebo bicyklické izoprenoidy se dvěma izoprenovými jednotkami (10 atomů uhlíku). Jsou uplatňovány v regulaci růstu, reprodukčním cyklu obranných mechanismech a přenosu signálu mezi rostlinou a ostatními organismy. Monoterpeny jsou produkovány pouze rostlinami, bakteriemi a některými druhy hmyzu. Nejrozšířenějšími jsou pineny (α -pinen a β -pinen), které tvoří součást pryskyřice jehličnanů. Monoterpeny jsou syntetizovány parenchymatickými buňkami a ukládány ve vakuolách, buněčné stěně nebo pryskyřičných buňkách. Funkce monoterpenů spočívá především v interakci rostliny s prostředím, komunikaci mezi rostlinami, ochraně před vysycháním ochraně před škůdci a vábení opylovačů (Dvořáková *et al.*, 2011).

Zaman (2019) uvádí, že pro smrk ztepilý jsou v konstitutivní obraně nejpodstatněji zastoupeny (-)- α -pinen (přibližně 24 %); (+)- α -pinen (přibližně 29 %) a (-)- β -pinen (přibližně 34 %).

Monoterpeny se vyznačují dualitou ve vztahu k lýkožroutům. Většina je pro hmyz ve velkých dávkách toxická, toxický efekt je navíc umocněn, pokud se ve směsi nachází více monoterpenů (Zaman, 2019). Na druhou stranu si zástupci čeledi *Scolytidae* během evoluce vyvinuli schopnost tyto látky neutralizovat oxidací a produktů detoxikace využívat jako látek pro komunikaci (Birgersson *et al.*, 1984).

Pro některé druhy hmyzu může sloužit emitovaná monoterpenická složka jako hlavní atraktant, dle kterého je vyhledáván hostitel, pro některé druhy mají monoterpeny aditivní efekt k agregačním feromonům (Seybold *et al.*, 2006).

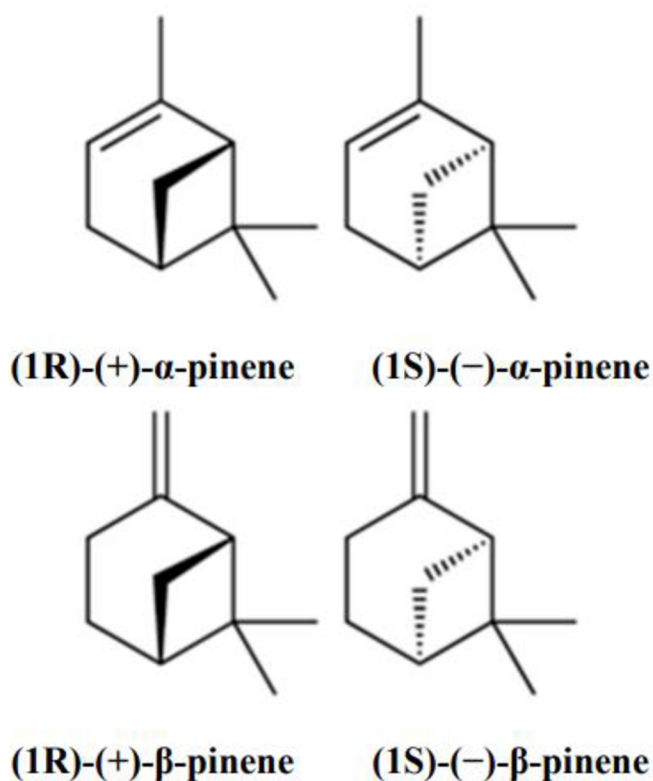
Při napadení lýkožroutem je celková produkce monoterpenů zvýšena (v případě smrku ztepilého zejména α -pinenu) (Ghimire *et al.*, 2016). Zvýšení dávky může přispívat k agregačnímu efektu feromonů (Netherer *et al.*, 2021; Erbilgin *et al.*, 2007).

Hmyz často napadá oslabené stromy produkující menší množství monoterpenů spíše než stromy zdravé, které na napadení dokáží reagovat zvýšením produkce monoterpenů nebo změnou jejich složení. Směs monoterpenů emitovaná rostlinou je často velice složitá a k jejímu uvolňování dochází i v těch částech rostliny, které napadeny nebyly. Výsledné složení tudíž závisí na větším množství faktorů (Dvořáková *et al.*, 2011).

3.3.3 Pineny

Pineny jsou bicyklické uhlovodíky s dvojnou vazbou se sumárním vzorcem $C_{10}H_{16}$. Rozeznáváme dva aktivní konstituční izomery α -pinen a β -pinen, které se liší polohou dvojnó vazby. Oba konstituční izomery se vyskytují ve dvou enantiomerech (+) a (-), v závislosti na konfiguraci chirálních atomů uhlíku (C_1 a C_5) (obr. 5).

Enantiomery jsou jinak nazývány optické izomery. Jedná se o dvě látky, se shodným sumárním i strukturním vzorcem, jejichž zrcadlově převrácené obrazy se nepřekrývají. Jedná se o opticky aktivní látky s minimálně jedním chirálním uhlíkem, schopné stáčet rovinu polarizovaného světla, přičemž znaménko (+) a (-) udává směr stočení (Salehi *et al.*, 2019). Lišit se mohou tyto látky v toxicitě a biologické aktivitě vůči různým organismům. Souhrnně jsou však považovány za fungicidní a insekticidní (Rivada Silva *et al.*, 2012).



Obrázek 5 Strukturní chemické vzorce obou enantiomerů α -pinenu a β -pinenu (Salehi *et al.*, 2019)

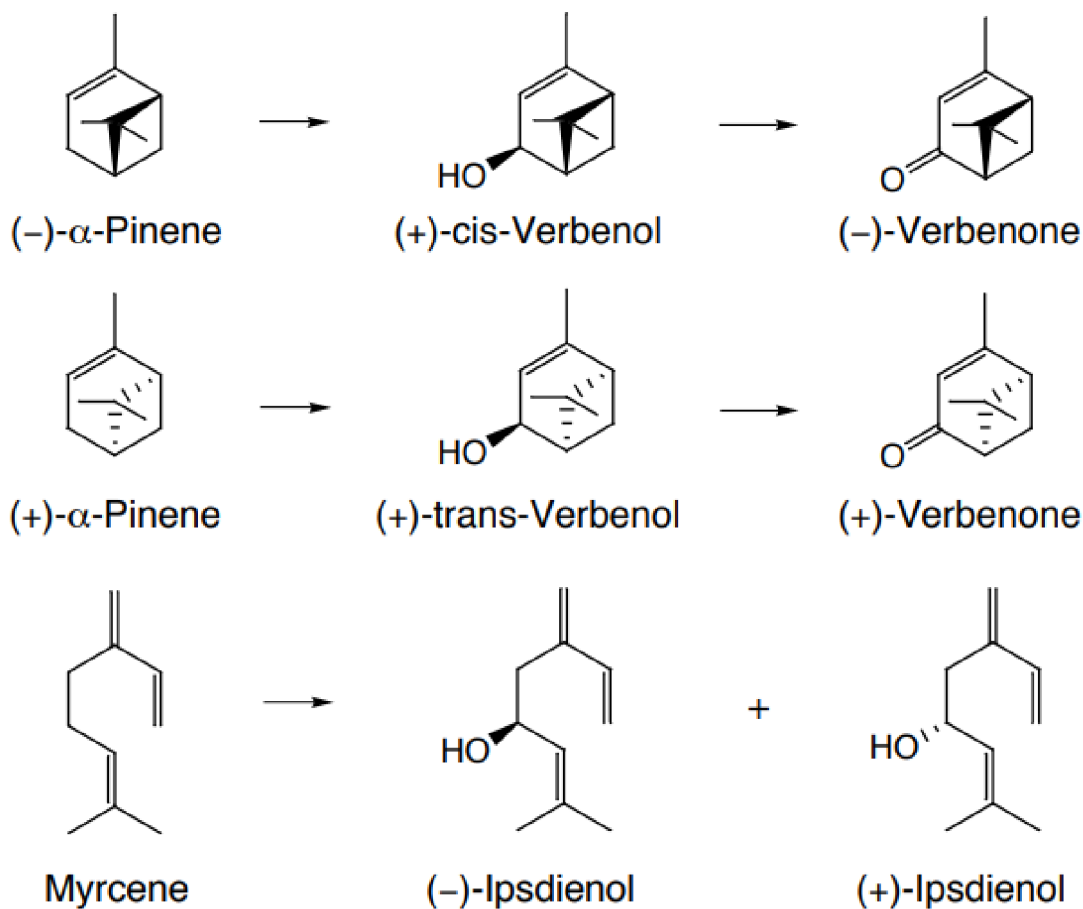
3.3.4 α -pinen a enantiomerický poměr

Pro vztah obrany stromu s lýkožroutem hraje enantiomerický poměr α -pinenu podstatnou roli z několika důvodů. Jedná o nejhojněji zastoupený monoterpen (spolu s β -pinenem). Jedná se o těkavou organickou látku (volatile organic compound; VOC), tato

látka zprostředkovává komunikaci s okolím. Má ve velkém množství toxický účinek vůči hmyzu i jeho symbiotickým houbám (Zaman, 2019). Deriváty α -pinenu o různé chiralitě mají rozdílné funkce.

Detoxikační proces tvorby feromonu lýkožroutem na základě α -pinenu je charakterizován jako stereospecifická hydroxylace (obr. 6), přičemž v případě vstupu (-)- α -pinenu do této reakce je produktem *cis*-verbenol, který je základní složkou agregačního feromonu Lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). Při vstupu (+)- α -pinenu do této reakce je produktem *trans*-verbenol, kterému je přikládána slabá agregační funkce, zanedbatelný efekt, nebo anti-agregační funkce (Zhao *et al.*, 2010; Lindström *et al.*, 1989; Schlyter *et al.*, 1987).

Je prokázáno, že poměr *cis*- a *trans*-verbenolu ve feromonu lýkožrouta koreluje s poměrem enantiomerů α -pinenu hostitele (Lindström *et al.*, 1989), ačkoliv lýkožrouti mohou pro syntézu verbenolů využívat dodatečně i další sloučeniny hostitele (Ramakrishnan *et al.*, 2021; Klimetzek, Francke, 1980).



Obrázek 6 Transformace monoterpenů na feromony. Hydroxylace α -pinenu probíhá stereospecifickým způsobem, následná oxidace cis/trans-verbenolu na verbenon je pozorována ve střeově lýkožrouta i u mikroorganismů zavlečených lýkožroutem (Phillips, Croteau, 1999).

α -pinen je produkován v různém enantiomerickém poměru napříč různými rody jehličnanů (Klimetzek, Francke, 1980), ale i mezi druhy se toto rozpětí pohybuje od téměř čisté produkce (+) do téměř čisté produkce (-) enantiomeru (Linstrom *et al.*, 1989). Pro jeden konkrétní enantiomer nebo sloučeninu se liší syntetická dráha napříč různými druhy a rody produkujícími tuto látku, přičemž je preferováno rozdílné enantiomerické složení (Wang *et al.*, 2022). Objevuje se názor, že zástupci čeledi borovicotvarých (*Pinaceae*) severní Ameriky mají tendenci kumulovat vyšší množství (+) enantiomeru, u evropských a asijských zástupců této čeledi je tomu naopak (Rivas da Silva *et al.*, 2012).

Zastoupení i enantiomerický poměr monoterpenů se podstatně liší v závislosti na sledovaném pletivu. Borg-Karlson *et al.* (1993) mimo α -pinenu sledovali osm dalších monoterpenů (např. β -pinen, limonen) v relativním zastoupení v xylému z kmene; xylému, floému z větví, pryskyřici a jehlicích ze dvou stromů. Zastoupení (-)- α -pinenu

v porovnání s (+) enantiomerem bylo podstatně vyšší v jehlicích (80-90 %), v porovnání s xylémem odebraným z kmene a pryskyřici (40 %).

Enantiomerický poměr α -pinenu hostitele tak ovlivňuje, v jaké koncentraci bude ve feromonu zastoupen *cis*- a *trans*-verbenol, což může být rozhodující faktor úspěšnosti útoku na strom.

3.4 Lýkožrout smrkový

3.4.1 Charakteristika

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je zástupce čeledi nosatcovitých (*curculionidae*), podčeledi kůrovcovitých (*Scolytinae*). Jedná se o hospodářsky nejvýznamnějšího a nejagresivnějšího škůdce na smrkových porostech. Je jedním ze šesti zástupců rodu *Ips*, vyskytujících se na našem území. Společně s lýkožroutem menším (*Ips amitinus*) a lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*) napadá smrk ztepilý, tyto druhy se často vyskytují společně.

Lýkožrout smrkový je sekundárním škůdcem, který napadá čerstvě vytěžené dříví, polomy, nebo fyziologicky oslabené porosty spíše než zdravé stromy. Zvýšený výskyt lýkožrouta se objevuje téměř po každém velkoplošném polomu způsobeném klimatickými činiteli (Křístek *et al.*, 2002). V případě nadbytku vhodného materiálu k množení dochází k populační gradaci (Wermelinger, 2004). Gradace je úzce spjatá s vývojem počasí. Přemnožuje se zejména v porostech IV. a V. věkové třídy.

3.4.2 Hostitelská dřevina

Hlavní hostitelskou dřevinou střední Evropy je smrk ztepilý (*Picea abies* L.). Výjimečně napadá modřín opadavý (*Larix decidua*) a velmi vzácně borovici lesní (*Pinus sylvestris*). Obecně lze tvrdit, že se objevuje na původních i introdukovaných druzích smrku, modřínu, někdy i na borovici nebo jedli (Skuhrový, 2002).

3.4.3 Reprodukční strategie a životní cyklus

V závislosti na počasí a nadmořské výšce pozorujeme až tři generace do roka. Přezimují všechna vývojová stadia mimo vajíček, přičemž většinu tvoří dospělci, ze kterých většina zimuje pod kůrou napadených smrků, preferující ležící dřevo (Matoušek, 2012).

Teplota těla je zásadním faktorem aktivity lýkožrouta. Při teplotách vyšších než 7 °C se začíná pohybovat. Plné aktivity dosahuje až v rozmezí teplot 14-39 °C. Teplotním

optimem je 29 °C. Po překročení hranice 40 °C upadá do strnulosti a při teplotách vyšších než 50 °C hyne (Zumr, 1995). Pro letovou aktivitu kůrovce je stanovena minimální hranice 16,5 °C, optimum náleží do intervalu 22-26 °C. Teplotní suma potřebná pro celý vývoj se pohybuje v intervalu 334 denních stupňů až 365 denních stupňů (Wermelinger, 2004)

Napadení začíná zejména na osluněných suchých a závětrných stanovištích na okrajích porostů pasek a polomů (Křístek *et al.*, 2002). Na stojícím živém stromě začíná nálet zpravidla na hranici suchých a zelených větví a šíří se oběma směry po kmeni, výjimečně zasahuje i do silných větví. Kmen je napadán celý s výjimkou oddenkové části (1-1,5 m). Vršek stromu je napadán do tlouštěk dříví přesahujících 10 cm (Zahradník, Knížek, 2010).

Napadení stromu iniciuje samec tzv. pionýrský. Po nasednutí na strom hloubí snubní komůrku. Po 1-2 dnech od nasednutí začíná produkovat agregační feromony, kterými vábí ostatní jedince obou pohlaví (Schlyter *et al.*, 1987). Při koordinovaném napadení větším počtem lýkožroutů jsou snadno překonány obranné mechanismy stromu (zalití snubní komůrky pryskyřicí), které běžně dokáží hostitele uchránit před napadením jednotlivci (Wood, 1982).

Celkový vývoj od závrtní samce po ukončení zralostního žíru nové generace trvá za ideálních podmínek 6-10 týdnů. Stádium vajíčka trvá 5-14 dní, larvální stádium 24 dní, stádium kukly 12 dní a úživný žír 2-3 týdny (Křístek *et al.*, 2002).

Hostitelská dřevina hyne následkem poškození lýka a také vlivem nákazy patogenními houbami (rody *Ophiostoma*, *Endoconidiophora*, *Grosmannia*), jejichž spory lýkožrout přenáší. Tyto houby napomáhají vysoušení pletiv a celkově snižují obranyschopnost hostitele (Paine *et al.*, 1997). Houby rovněž mají schopnost detoxikovat terpenické a fenolické látky hostitele (Netherer *et al.*, 2021). Mimo jedinců stejného druhu jsou agregačním feromonem vábeny i ostatní druhy lýkožroutů. Strom s pokořenou obranou pro ně poskytuje bezpečné prostředí pro množení. Rovněž jsou vábeny i některé druhy parazitoidů a predátorů lýkožroutů, kteří mohou využít k lokalizaci lýkožrouta smrkového jeho agregačních feromonů (Zhao, 2011).

3.4.4 Vyhledávání hostitelské dřeviny

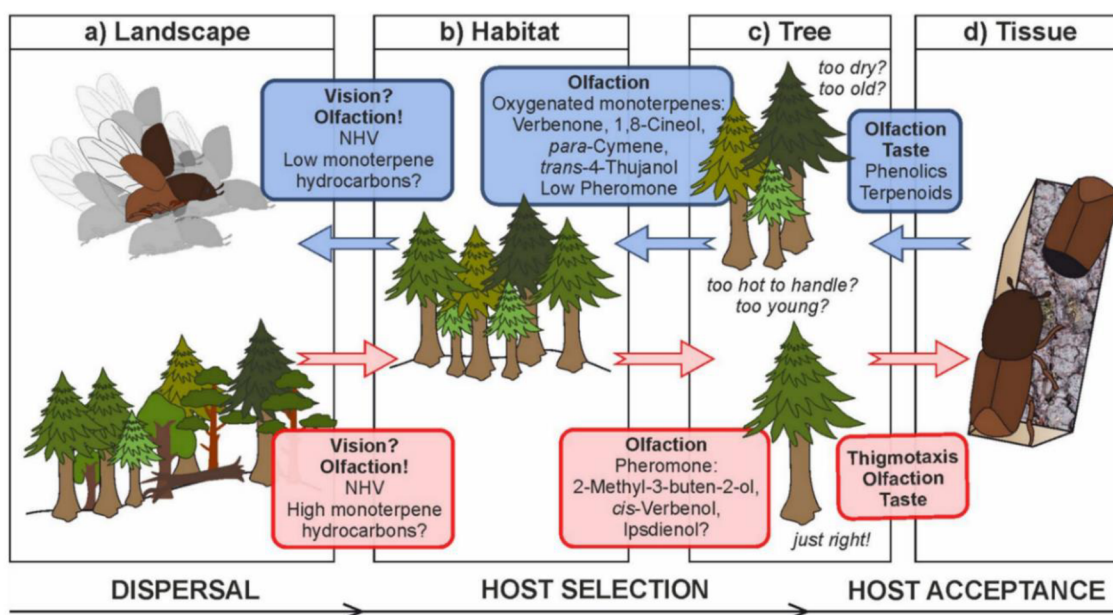
V případě náletu lýkožrouta na strom rozlišujeme dva případy: „primární atrakci“ (lýkožrout je lákán na dřevo vhodné k množení pouze pomocí kairomonů, látek

vypouštěných stromem) a „sekundární atrakci“ (lýkožrout je lákán na již napadený strom zejména agragačními feromony). Agregací feromony koordinují masivní nálet na zdravé stromy, nebo skupiny zdravých stromů. Skutečnost, jestli pionýrství brouci vyhledávají vhodné stromy k množení náhodně, nebo vlivem primární atrakce je předmětem vědecké diskuse (Schiebe, 2012).

Netherer *et al.* (2021) uvádějí, že se lýkožrouti řídí souborem pozitivních a negativních podnětů (obr. 7). Je prokázáno, že tykadlo lýkožrouta smrkového disponuje receptory pro velké množství látek, role jednotlivých složek však není jasná (Schiebe, 2012). Odpověď tykadla samce lýkožrouta smrkového na (-)- α -pinen je nicméně prokazatelně silnější, než na (+) enantiomer (Dickens, 1981).

Wermelinger (2004) přisuzuje těkavým složkám vypouštěným jehličnatými stromy jistou atraktivitu, tento efekt je však mnohem menší než působení agregací feromonu. Zhao *et al.* 2010 zjistili, že smrky atraktivní pro nálet Lýkožroutem smrkovým měly podstatně vyšší poměr (-)- α -pinenu a zároveň nízký poměr (-)-limonenu proti neatraktivním smrkům. V závislosti na dávce a chiralitě může monoterpenická složka posilovat, nebo inhibovat efekt agregací feromonu. V případě lýkožrouta smrkového bylo pozorováno posílení agregací účinku malé koncentrace feromonu přidávkem velkého množství (-)- α -pinenu (524 násobek objemu feromonu) (Erbilgin *et al.*, 2007). Rovněž byl pozorován inhibiční efekt (-)- α -pinenu (200-2000 mg/den) při velké koncentraci feromonu (30 mg/den) (Olenici *et al.*, 2007). Oxidované deriváty (-)- α -pinenu a to zejména (-)-verbenon mají efekt antiagregací (Schiebe, 2012). Dle dalších autorů je vliv terpenických složek pryskyřice na atraktivitu stromu pro nálet kůrovce minimální, nebo zanedbatelný (Byers, 1996; Schlyter, 1987).

Existuje teorie, že lýkožrout nalézá stromy vhodné ke kolonizaci víceméně náhodně při disperzním letu po vylíhnutí. Směr tohoto letu je ovlivňován teplotou a větrem (Byers, 2000). Let je diskontinuální, přerušován periodami odpočinku a úživného žíru. Během přestávek lýkožrout navštíví vícero stromů vhodných ke kolonizaci a jejich potenciál posuzuje na základě chemických informací na krátkou vzdálenost (close-range) (Byers, 1996). Vykonaný disperzní let spojený se ztrátou tukového tělesa vyvolává u lýkožroutů pozitivní odpověď na feromony a kairomony (Byers *et al.* 1998) a začínají vyhledávat vhodné hostitelské stromy.



Obrázek 7 Strategie vyhledávání stromu Lýkožrouta smrkového, na základě pozitivních (modře) a negativních (červeně) podnětů. Důležitost je příkládána agregaci na feromon, produkovaný pionýrským samcem. Jednotlivci postupují na základě sekvence kroků, řízení vizuálními, chemickými a taktilními podněty (Netherer *et al.*, 2021).

3.4.5 Feromony

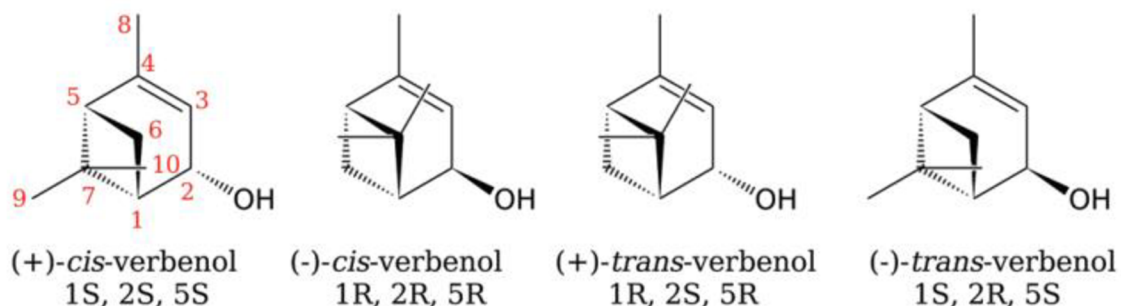
Ve střevě samce lýkožrouta bylo identifikováno celkem devět sloučenin, specifických pro samce v období kolonizace, tedy ve stádiu kdy svolávají ostatní svého druhu ke kolonizaci stromu (Ramakrishnan *et al.* 2021; Birgersson *et al.* 1988).

Základními složkami feromonu jsou 2-methyl-3-buten-2-ol a (4S)-*cis*-verbenol. Tyto sloučeniny mají nejsilnější agregační účinek ze zastoupených látek. Maximální produkce obou těchto látek je dosaženo v momentě, kdy se na jednom stromě nachází větší počet samců, kteří provádějí závrť, nebo budují snubní komůrku, a dosud se nespáříli se samicí (Ramakrishnan *et al.* 2021). Kombinací těchto dvou sloučenin se využívá v komerčně dostupných feromonových odparnicích.

3.4.6 Verbenol

Verbenol (2-pine-4-ol), $C_{10}H_{16}O$, je nenasycený cyklický alkohol, spadající do třídy monoterpenoidů, derivát α -pinenu. Jedná se o *cis*- a *trans*-verbenol v závislosti na relativní poloze C_9 a C_{10} methylových skupin. Vzhledem ke třem chirálním atomům uhlíku (C_1 , C_2 a C_5) pro *cis*- a *trans*-verbenol existují dva enantiomery (+) a (-). Celkově se verbenol vyskytuje ve čtyřech stereoizomerech (obr. 8). Všechny stereoisomery se vyskytují ve feromonech podkorního hmyzu, v závislosti na koncentracích, chiralitě a druhu hmyzu mají různé účinky (Blanco *et al.*, 2020).

Dickens (1981) uvádí, že lýkožrout smrkový má z těchto čtyř izomerů nejsilnější odpověď na (R)-(+)-*trans*-verbenol a (S)-(-)-*cis*-verbenol, testováno ve směsi s 2-methyl-3-buten-2-olem, pomocí elektroantennogramu (EAG).

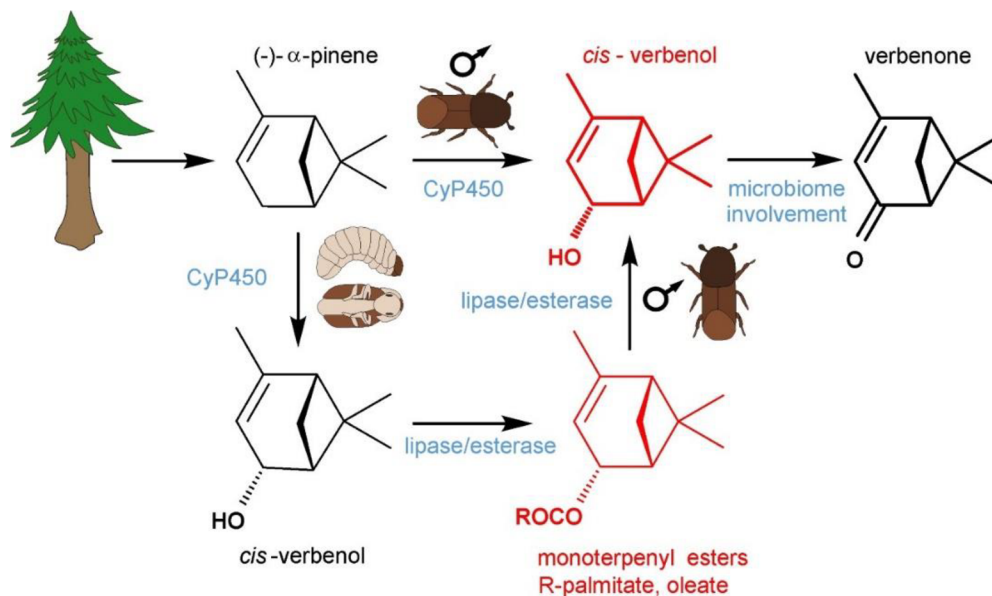


Obrázek 8 Strukturální chemické vzorce čtyř stereoisomerů verbenolu (Blanco *et al.*, 2020)

3.4.6.1 Syntéza verbenolu

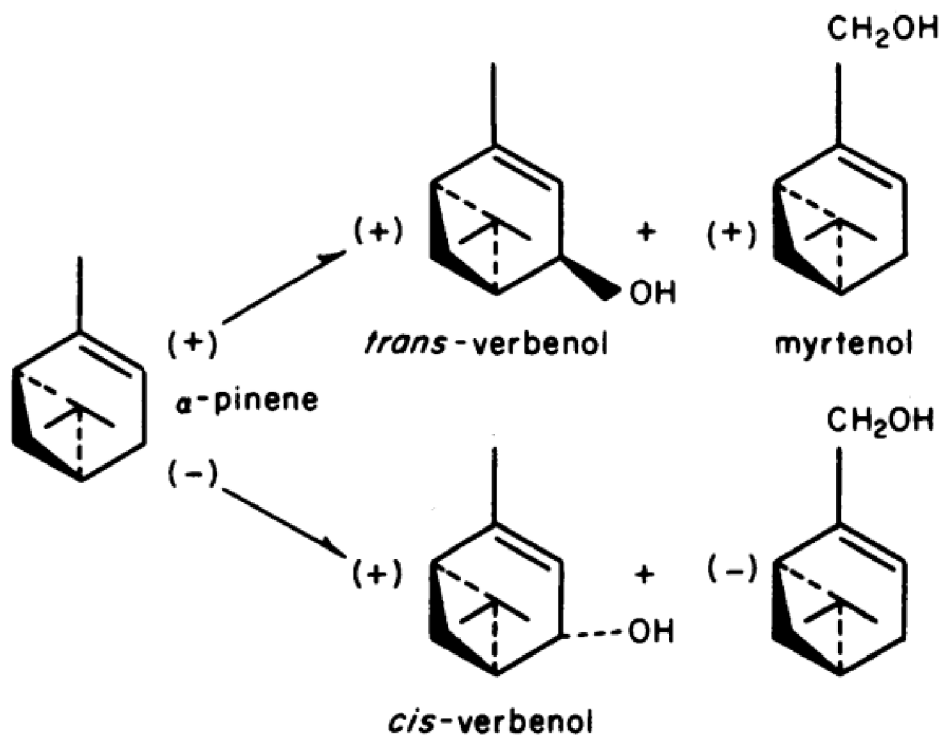
(S)-(-)-*Cis*-verbenol vzniká stereospecifickou hydroxylací (-)- α -pinenu (obr. 10). Tato reakce je katalyzována enzymem cytochrom P450 (CyP450) (Renwick, *et al.*, 1976). Jedná se o formu detoxikace (-)- α -pinenu. Množství vyprodukovaného *cis*-verbenolu přímo souvisí s množstvím (-)- α -pinenu (Erbilgin *et al.*, 2007; Lindström *et al.*, 1989). Nedostatek (-)- α -pinenu v hostitelském stromu může snížit nebo i celkově inhibovat biosyntézu agregačního feromonu (Borg-Karlson *et al.*, 1993). Pionýrství samci budou iniciovat kolonizaci stromu na základě vyššího poměru (-)- α -pinenu, za účelem tvorby agregačního feromonu a lepší odpovědi tykadla na tento enantiomer (Dickens, 1981). *Cis*-verbenol slouží jako základní agregační feromon nebo jeho součást i pro jiné druhy rodu *Ips* (Zumr, 1995).

Cis-verbenol mohou tvořit dospělci i z monoterpenyl esterů, pravděpodobně tvořeným ranými vývojovými stádii lýkožrouta, jako detoxikační konjugát *cis*-verbenolu a uskladněnými v tukovém tělese. V případě nedostatku α -pinenu mohou dospělci přispívat k produkci verbenolu hydrolýzou těchto konjugovaných monoterpenyl esterů. Enzymy katalyzujícími tyto reakce jsou lipázy a esterázy (Ramakrishnan *et al.*, 2021) (obr. 9).



Obrázek 9 Schematické znázornění syntézy *cis*-verbenolu, červeně jsou vyznačena aktivní složka feromonu a monoterpenylový ester, sloužící jako prekurzor pro jeho syntézu, modře jsou vyznačeny enzymy, řídící popisované reakce (Ramakrishnan *et al.*, 2021)

Při vstupu (+)-α-pinenu do potravy lýkožrouta je produktem stereospecifické hydroxylace *trans*-verbenol (Olenici *et al.*, 2007) (obr. 10). Někteřími autory je považován za antiagregační (Zhao, 2011), případně mu je připisován slabý agregační účinek, nebo účinek nejistý a neznámý ve vztahu k chování Lýkožrouta smrkového (Lindström *et al.*, 1989).



Obrázek 10 Schématické znázornění stereospecifické hydroxylace (-)/(+) enantiomerů α -pinenu na *cis*-/*trans*-verbenol a vedlejší oxidace na myrtenol (Renwick *et al.*, 1976)

3.4.7 2-methyl-3-buten-2-ol

2-methyl-3-buten-2-ol (methylbutenol) je hemiterpenální agregační feromon. Je syntetizován *de novo* z mevalonátu, za hormonálních regulací ve střevě lýkožrouta (Ramakrishnan *et al.*, 2021). Produkce tedy závisí na fyziologické kondici a stravě jedince. Methylbutenol je jakožto agregační feromon specifický pro lýkožrouta smrkového (Zumr, 1995). Pravděpodobně se jedná o látku, která slouží k orientaci spíše na kratší vzdálenosti (Ramakrishnan *et al.*, 2021).

3.4.8 Další aktivní látky

Další látkou obsaženou ve feromonu je ipsdienol. Ipsdienol disponuje slabším agregačním účinkem. Agregační efekt je spíše aditivní ke hlavním agregačním složkám. Po přidání racemické směsi ipsdienolu do směsi agregačního feromonu methylbutenolu a *cis*-verbenolu vzrostl odchyt lýkožrouta o 50 % (Birgersson *et al.* 1984). Tuto látku produkuje samec pouze po spáření (Zhao, 2011).

Ipsenol a verbenon jsou látky s antiagregačním účinkem. Ipsenol a verbenon vylučují lýkožrouti v pozdějších fázích útoku s účelem regulace hustoty náletu na

napadený strom (Schlyter *et al.*, 1989). Verbenon vzniká další oxidací verbenolu symbiotickými mikroorganismy ve střevě lýkožrouta (Phillips, Croteau, 1999).

Dalšími identifikovanými látkami jsou myrtenol, *trans*-myrtenol, myrcen a 2-fenylethanol. U těchto látek však nebyla prokázána jejich skutečná funkce a vliv na chování brouků v přírodě (Ramakrishnan *et al.*, 2021). Myrtenol vzniká při oxidaci obou enantiomerů α -pinenu (Zhao, 2011).

3.5 Chemická analýza

Metodika vhodná pro separaci a identifikaci těkavých látek s bodem varu do 300°C se nazývá plynová chromatografie (GC; gas chromatography). Jedná se o laboratorní metodou založenou na fyzikálně chemických principech, sloužící pro rozlišení a kvantifikaci těkavých složek vzorku. Pro kompletní analýzu je zapotřebí pouze malého množství vzorku zkoumané látky (v řádech nanogramů). Plynový chromatograf je zpravidla kombinován s hmotnostním spektrometrem. Spektrometr následně umožňuje identifikaci analytů na základě hmotnosti a náboje iontů tvořící jejich molekuly.

3.5.1 Plynová chromatografie

Princip plynové chromatografie spočívá v rozdělení složek zkoumané směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze je tvořena nosným plynem. Musí se jednat o netečný a nehořlavý plyn, nejčastěji je to helium a dusík. Nosný plyn je z tlakové láhve veden do čistícího zařízení, regulačního systému (regulace rychlosti toku a tlaku plynu) a následně k injektoru. Injektor (dávkovač) slouží k nástřiku vzorku do nosného plynu. K nástřiku vzorku dochází za vysokých teplot, které zajistí jeho okamžité zplynění a vzorek je unášen nosným plynem pod optimálním tlakem do kolony. Kolona je součástí plynového chromatografu, ve které je uložena stacionární fáze, dochází zde k oddělení složek vzorku. Kolona je tvořena jemnou kapilárou stočenou do cívky. Stacionární fáze je tvořena zrněčky pevného nosiče pokrytými mikrofilmem. Během průchodu kolonou jsou jednotlivé složky vzorku různou měrou zpomalovány vazbou na stacionární fázi a liší se tak doba průchodu (retenční čas). Dle povahy zkoumaných analytů je nutné přizpůsobit velikost zrněček a chemické složení mikrofilmu výměnou kolony tak, aby byla zajištěna různá afinita ke složkám vzorku a lišily se tak časy průchodu jednotlivých složek. V detektoru je zaznamenáván časový průběh a intenzita signálu. Výsledkem zkoumání směsi látek na chromatografu je chromatogram. Chromatogram vyjadřuje závislost síly signálu (osa y) na čase průchodu kolonou (retenční čas) (osa x). Jednotlivé

složky tvoří „píky“ (peak – vrchol) podobné Gaussově křivce. Je popsán retenční čas, výška a šířka píku. Střed píku prakticky odpovídá střední hodnotě μ Gaussova rozdělení. Pro kvantifikaci výsledků je podstatným výstupem z chromatogramu plocha pod křivkou reprezentující množství konkrétní sloučeniny (ústní sdělení A. Jirošová, 2021).

3.5.1.1 Chirální kolona

Pro potřeby této diplomové práce byla v chromatografu instalována speciální kolona schopná separovat enantiomery α -pinenu. Stacionární fáze kolony je tvořena cyklodextriny. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené šesti až osmi glukózovými zbytky (glukopyranosové jednotky), uspořádanými do prstence. Vznikají enzymatickou degradací škrobu. Praktické použití pro chromatografii mají cyklodextriny α , β a γ . Cyklodextrin α je tvořen šesti, β sedmi a γ osmi glukopyranosovými jednotkami. Molekuly cyklodextrinu tvoří „kavitky“ (cavity – dutina). Tyto dutiny mají různou afinitu k oběma enantiomerům monoterpenů a umožňují tak separaci těchto látek (Horský, Jindřich, 2013; Lindström *et al.*, 1990).

3.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie. Umožňuje detekci a identifikaci látek na základě jejich hmotnostního spektra. Molekula analytu je po zásahu proudem elektronů rozštěpena fragmenty s nenulovým nábojem neboli ionty. Ionty v plynné fázi jsou ve hmotnostním analyzátoru za vysokého vakua rozděleny dle poměru hmotnosti a náboje (m/z), nejčastěji pomocí zakřivení v elektromagnetickém poli. Poslední součástí je detektor, kde probíhá zaznamenání iontů. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které udává závislost intenzity (absolutní, relativní) (osa y) na poměru m/z (osa x). Po sestavení spekter jsou látky identifikovány na základě koeficientu shody s knihovnou spekter známých látek (ústní sdělení A. Jirošová, 2021).

Hmotnostní spektrometrie je rychlá a citlivá metoda. Ve svém principu, zahrnující destrukci molekuly a analýzu jejích iontů je metodou neschopnou rozlišit optické enantiomery. Studium chirálních látek hmotnostní spektrometrií je možné pouze po jejich převedení na diastereomery tvorbou umělého racemátu (Kosíková, 2012). Hmotnostního spektrometru a jeho nastavení v metodice bylo využito k identifikaci dalších látek vzorku pro jiné výzkumné projekty.

3.6 Shrnutí

Pro Smrk ztepilý je v obraně proti lýkožroutu smrkovému výhodnější větší zastoupení (+)- α -pinenu proti (-) enantiomeru. V případě, že (+) enantiomer převažuje, je pravděpodobnost útoku ze strany pionýrských brouků nižší (nižší atraktivita, nižší odpověď (+) enantiomeru na tykadle). V případě náletu (kalamitní přemnožení) bude pionýrský brouk energeticky zatěžován detoxikací potravy a přitom bude produkovat feromon s nižším agregačním účinkem (méně *cis*-verbenolu). Nižší atraktivita feromonu způsobí nižší nálet a indukční obrana stromu má větší šance na zahubení lýkožroutů a jejich symbiotických hub a mikroorganismů. Strom nadále získává schopnost rychleji a efektivněji reagovat v případě opětovného napadení lýkožroutem.

4 Praktická část

4.1 Metodika

Součástí cílů práce bylo provedení chemické analýzy s cílem stanovení poměru enantiomerů α -pinenu na provenienční ploše smrku ztepilého, kde jsou v klonových řadách pěstování jedinci pocházející z různých nadmořských výšek, které lze klasifikovat do tří skupin tzv. ekotypů a ze získaných hodnot vyhodnotit, zda je poměr enantiomerů α -pinenu znakem opakujícím se v rámci genotypu, případně v rámci ekotypu, či zda to je individuální vlastnost jednotlivých stromů.

Do statistického zpracování byly zahrnuty vzorky, které byly odebrány na jaře 2021 (odběr 9. 6.), na jaře 2019 (odběr 14. 5.) a v létě 2019 (odběr 2. 8.) roku 2019.

Vzorky z roku 2019 byly odebrány Excelentním týmem pro mitigaci v rámci výzkumu schopnosti smrku zvýšit produkci obranných látek po inokulaci methyl jasmonátem. Odběr, zpracování i chemická analýza vzorků z roku 2019 byly provedeny způsobem srovnatelným s odběrem z roku 2021, který byl popsán v této metodice.

4.1.1 Charakteristika porostu

Porost se nachází v okrese Praha-Západ Středočeského kraje, nedaleko televizního vysílače Cukrák, stojícího na vrchu Kopanina (příloha 1). Porost se nachází přibližně 1,5 km vzdušnou čarou severním směrem od obce Jíloviště a přibližně 1,3 km rovněž vzdušnou čarou východním směrem od železniční stanice Černošice-Mokropsy. Souřadnice porostu jsou N 49°56.37', E 14°20.96' systému WGS-84.

Zkoumaným porostem byla provenienční plocha smrku ztepilého. Provenienční plocha (také označována jako klonový archiv) byla založena roku 1970. Jejím zakladatelem byl Ing. Jiří Šindelář, CSc. pod hlavičkou Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (Římanová, 2021).

Jedinci, pěstovaní na provenienční ploše, vznikli roubováním na podnože s cílem udržení genotypů, pro další šlechtitelské programy a pro fenologická pozorování. Jedinci byli vysázeni v klonových řadách po deseti jedincích v rozestupu tří metrů. Vzdálenost mezi řadami činila šest metrů, plocha byla následně prořezána na konečný rozestup 6×6 m. (Čepl, *et al.*, 2020).

Klonové řady zastupují 3 ekotypy, uvedena nadmořská výška původu sadebního materiálu:

- Chlumní (*acuminata*) – 360 m n. m.
- Horský (*europaea*) – 770-775 m n. m.
- Vysokohorský (*obovata*) – 1145-1175 m n. m.

Porost se nachází ve 320-345 m n. m. s mírným severozápadním sklonem a poměrně plochým reliéfem. Průměrné roční srážky (průměr mezi lety 1980-2016) činily 587 mm s průměrnou roční teplotou 8,6 °C (Čepl *et al.*, 2020).

Porost se nachází v přírodní lesní oblasti 10 části b. Lesní vegetační stupeň je stanoven jako 3. Dubobukový. Cílový hospodářský soubor je 43a – kyselá stanoviště středních poloh. Lesní typ porostu je stanoven jako 3II – kyselá hlinitá dubová bučina modální.

Geologické podloží je charakterizováno jako nezpevněný sediment; hlinito-kamenitý, balvanitý až blokový sediment, jílovité fylitické břidlice se sprašovými překryvy a řadí se do soustavy Český masiv – krystalinikum a prevariské paleozoikum do středočeské oblasti – Bohemikum (ČGS 2022). Půdy lze zařadit jako středně hluboké kambizemě bohaté na skelet, ve spodních vrstvách těžší jílovohlinité (Čepl, *et al.*, 2020).

V roce 2016 činila průměrná výška porostu 20,6 m a průměrná prsní tloušťka 33,1 cm. (Čepl, *et al.*, 2020). V době odběru vzorků (2021) měl porost věk 53 let. Jedná se o prostředí nepříliš vhodné pro produkční pěstování smrku, zejména kvůli suchu a vyšší teplotě. Uvnitř porostu se utvořilo kůrovcové kolo, pozorované při odběru roku 2021 a na začátku září téhož roku bylo vytěženo.

Informace z karty katastru nemovitostí o parcele, na které se porost nachází:

Parcelní číslo: 373/1

Obec: Jíloviště (599341)

Číslo LV: 964

Katastrální území: Jíloviště (660175).

Výměra: 3 059 352 m² (3,06 km²).

Druh pozemku: lesní pozemek

Vlastnická práva:

Curryová Eva, Vodičkova 699/30, Nové Město, 11000 Praha 1 podílem 2/3

Spolumajitelé Cukrák s.r.o., Pařížská 68/9, Josefov, 11000 Praha 1 podílem 1/3

4.1.2 Odběr vzorků

V porostu byl proveden odběr vzorků lýka dne 9. 6. 2021. Počasí během odběru: zataženo, občasný mírný déšť, průměrná denní teplota 14 °C.

4.1.2.1 Seznam použitých pomůcek

- Trubkový průrazník průměru 9 mm
- Silný hliníkový drát
- Kladívko
- Šroubovací kryovialky objemu 4 ml
- Nádoba na tekutý dusík
- Přenosná nádoba na tekutý dusík
- Plánek porostu

4.1.2.2 Postup

Odběr lýka provedly dvě dvoučlenné skupiny. Jeden se orientoval v porostu pomocí plánu, nadepisoval kryovialky a nesl přenosnou nádobu s dusíkem. Druhý prováděl zásek do stromu.

Podle shody plánu porostu s označením stromu byl identifikován strom, u kterého proběhl odběr. Označením stromu byla nadepsána kryovialka, do které byly ukládány výseky. Zásek byl proveden pomocí průrazníku a kladívka tak, že zasahoval až do běle. Pomocí drátu byl výsek vystrčen z průrazníku do kryovialky. Pro každý strom bylo provedeno 3-6 záseků v závislosti na tloušťce floému. Odběr měl zajistit takový objem materiálu, ze kterého by bylo možno vytvořit vzorek o hmotnosti minimálně

200 mg. U všech stromů byl zásek proveden přibližně na stejné straně kmene, bez růstových abnormalit a deformací kmene, přibližně ve výšce 1,3-1,7 m. Kryovialky byly uloženy do přenosné nádoby s tekutým dusíkem. Po dokončení terénního odběru lýka byly kryovialky uloženy do mrazicího zařízení o teplotě -80 °C ve skladovacím prostoru dřevařského pavilonu. Celkově byly na ploše odebrány vzorky ze 129 stromů.

4.1.3 Mechanické zpracování vzorků

Mechanické zpracování vzorků proběhlo v laboratořích fakulty ve dnech 30. 6., 1. 7., 2. 7. a 14. 7..

4.1.3.1 Seznam použitých pomůcek

- Tepelně izolovaná nádoba na tekutý dusík
- Tekutý dusík
- Termoboxy
- Šroubovací vialky 20 ml
- Šroubovací vialky 2 ml
- Podložka
- Skalpel
- Třecí miska s tloučkem
- Laboratorní lžička
- Laboratorní váha
- Digestoř
- Pipeta
- n-Hexan
- Ultrazvuková čistička
- Injekční stříkačky 10 ml
- Stříkačkové filtry

4.1.3.2 Postup

Vzorek v podobě výseků byl vyjmut z kryovialky na podložku. U výseků byla skalpelem provedena separace vzorku. Tvrdé části vzorku (borka, běl a části pryskyřičných kanálků) byly odstraněny. Vzorek byl rozkrájen na, pokud možno, nejmenší části. Části vzorku byly vloženy do třecí misky a zality adekvátním množstvím tekutého dusíku. Podchlazený vzorek zkřehl a byl rozetřen tloučkem na velmi jemný prášek. Teplo z tření způsobilo odpaření dusíku a vzorek se stal sypkým. Laboratorní

lžičkou bylo z třecí misky do nadepsané vialky (20 ml) na laboratorních vahách odměřeno 200 mg (tolerance 5 mg) homogenizovaného vzorku. Do vzorku bylo pipetou odměřeno a přidáno 2 ml hexanu. Vialka byla opatřena uzávěrem a uložena do mrazícího zařízení s teplotou -20 °C.

Po přípravě nejvíce 16 vzorků bylo provedeno promíchání a filtrování:

Vialky (20 ml) byly vloženy do ultrazvukové čističky, kde proběhlo promíchání pevné fáze vzorku s rozpouštědlem. Čistička byla nastavena na dobu 10 minut a teplotu 30 °C. Po dokončení cyklu byly vzorky přefiltrovány do vialek (2 ml). Vialky (2 ml) byly nadepsány označením stromů a spolu s injekčními stříkačkami a stříkačkovými filtry připraveny pod digestoř. Tato činnost proběhla v době cyklu ultrazvukové čističky. Z injekční stříkačky byl vyjmut píst a na hrdlo nasazen stříkačkový filtr. Vialka (2 ml) byla přiložena ke druhému konci filtru. Vzorek byl z vialky (20 ml) přelit do komory stříkačky. Do stříkačky byl opět vložen píst a jeho stlačením byl vzorek přefiltrován do vialky (2 ml). Vzorky ve vialkách (2 ml) byly po dokončení práce uloženy do mrazícího zařízení s teplotou -80 °C ve dřevařském pavilonu. Zde byly vzorky uskladněny až do chemické analýzy na chromatografu.

Pevná fáze extrahovaného vzorku byla ve vialce (20 ml) uskladněna k vysušení.

Během denní práce bylo zapsáno označení stromů, jejichž vzorky byly zpracovány a přebytek vzorku lýka přesahující požadovanou hmotnost 200 mg, který byl uložen zpět do původní kryovialky a uložen do mrazícího zařízení.

Pro každý den laboratorní práce byl vytvořen jeden vzorek, ve kterém chyběl homogenizovaný floém, všechny ostatní kroky v přípravě tohoto vzorku proběhly stejně. Tento vzorek nesl označení „blank“ a datum pořízení. Sloužil pro porovnání vzorků a detekci možné systematické chyby vzniklé kontaminací chemickými látkami z vnějšího zdroje.

4.1.4 Chemická analýza

Analýza vzorků byla provedena na chromatografu-hmotnostním spektrometru typu Quadrupole Shimadzu GC-MS QP2010 SE – ultra. Instalována byla chirální kolona Cyklodex B, RT beta dex (30m × 0.25mm × 0.25μm; délka kolony, vnitřní průměr, tloušťka filmu stacionární fáze) Supelco. Zařízení bylo vybaveno multifunkčním autosamplrem (CTC PAL autosampler). Parametry nastavení jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1 Nastavení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem

Plynová chromatografie	
Teplota nástřiku	230 °C
Mód nástřiku	Split (ratio 25)
Teplotní program pece	60 °C (2 min), 10 °C/min do 120 °C, 25 °C/min do 220 °C (7 min)
Nosný plyn	helium
Tlak	57,5 kPa
Celkový průtok	29 mL/min
Průtok kolonou	1 mL/min
Lineární rychlost	36,5 cm/s
Hmotnostní spektrometrie	
Teplota zdroje ionů	200 °C
Teplota rozhraní	230 °C
Čas pro oddělení rozpouštědla	5 min
Start a konec záznamu	6 a 15 min
Rychlost skenování	1666
Rozpětí m/z	35-350

4.1.5 Zpracování dat

Poměr enantiomerů α -pinenu byl stanoven na základě odezvy enantiomerů na chromatogramu. Ve zpracovávaných datech bylo uvedeno číslo, které představuje integrál plochy pod grafem na chromatogramu. Pro stanovení poměru enantiomerů α -pinenu není nutná kvantifikace koncentrace látek ve vzorku (hmotnost látky vztaženou ke hmotnosti sušiny), jelikož jejich poměr bude konstantní před i po kvantifikaci výsledků chromatogramu.

Poměr enantiomerů se dále také označuje pojmem „ratio“ a vždy se v tomto statistickém zpracování jedná o poměr (-/+).

Jednotlivé vzorky byly označeny systematickým číslem a písmenem, které odpovídá označení jedince na provenienční ploše, ze kterého vzorek pochází. Systematické číslo popisuje klonovou řadu. Označeno jako „genotyp“. Podle barvy vyznačení v plánu porostu byly genotypy zařazeny do příslušných ekotypů (příloha 2 a 3). Jednalo se o zkratky „CH“ pro chlumní, „H“ pro horský a „VH“ pro vysokohorský ekotyp (tab. 5). Do tabulky bylo zaneseno jako „ekotyp“. Systematické písmeno popisovalo pořadí klonu v klonové řadě, do tabulky bylo zaneseno jako „klon“. Toto písmeno sloužilo pro kontrolu identifikace stromu, pro statistické testy nemělo praktický význam. Plánek porostu přidělil každému stromu také unikátní identifikační číslo. Identifikační číslo sloužilo pro potvrzení identity stromu.

Z datového souboru byly pro potřeby statistického testování vyloučeny ty genotypy, které byly v datovém souboru zastoupeny pouze jedním jedincem.

Vlastnosti datových souborů jsou uvedeny v tab. 2, 3 a 4.

Tabulka 2 Počet pozorování v souvislosti s příslušností ke genotypům a ekotypům 2021

Rok 2021		
Ekotyp	Počet příslušných genotypů	Počet vzorkovaných jedinců
CH	16	62
H	10	40
VH	3	10
suma	29	115

Tabulka 3 Počet pozorování v souvislosti s příslušností ke genotypům a ekotypům jaro 2019

Jaro 2019		
Ekotyp	Počet příslušných genotypů	Počet vzorkovaných jedinců
CH	14	47
H	9	29
VH	3	10
suma	26	86

Tabulka 4 Počet pozorování v souvislosti s příslušností ke genotypům a ekotypům léto 2019

Léto 2019		
Ekotyp	Počet příslušných genotypů	Počet vzorkovaných jedinců
CH	14	52
H	9	30
VH	3	10
suma	26	92

Tabulka 5 Příslušnost genotypů k ekotypům a vyznačení v grafech

Příslušnost genotypů k ekotypům		
Ekotyp	Barva v boxplot grafech	Příslušné genotypy
CH	Červená	3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 19, 20, 22, 26, 30, 31, 34, 40, 41
H	Zelená	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 33
VH	Modrá	1, 2, 21

4.1.6 Statistická analýza

Statistická analýza dat proběhla v aplikaci Rstudio prostřednictvím programovacího jazyka R. Aplikace Rstudio bylo využito i při tvorbě prezentovaných grafů.

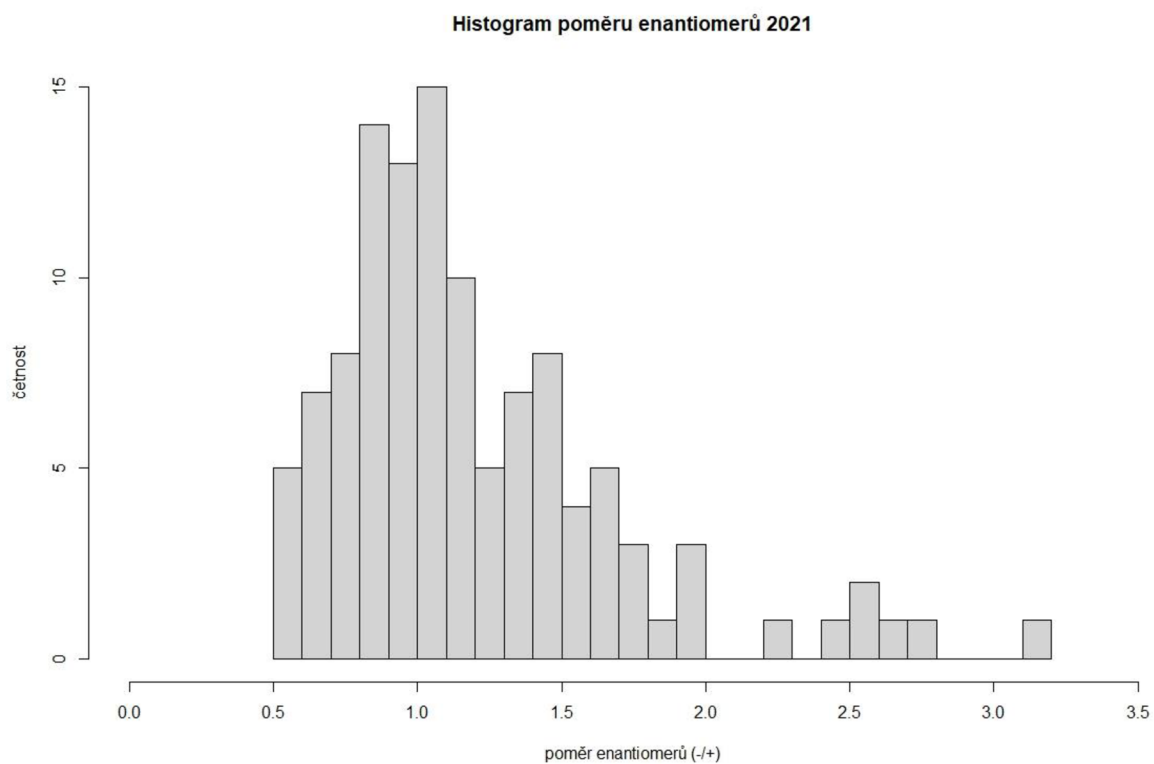
Za účelem volby nejvhodnějšího statistického testu byla posouzena normalita rozdělení a rovnost rozptylů na datových souborech z jednotlivých odběrových sezón. Na základě výsledků a struktury dat byl zvolen parametrický test, rozptylová analýza (ANOVA – analysis of variance) a následoval Tukey HSD test pro identifikaci rozdílných rozdělení v datovém souboru. Pro souhrnná data byl proveden párový korelační test a následně byl vytvořen smíšený lineární model pro posouzení vlivu opakovaného měření.

Ve výsledcích je použito krabicových grafů (boxplot). Tlustá černá čára vyjadřuje medián (druhý kvartil). Krabice vyjadřuje rozpětí od prvního do třetího kvartilu (čtvrtiny) rozpětí daného datového souboru (IQR – interquartil range; vnitrokvartilové rozpětí). Vousky (whiskers) reprezentují minimální a maximální hodnoty, které nepřesahují vzdálenost $1,5 \times \text{IQR}$ od mediánu. Pokud žádná hodnota nepřesahuje toto rozpětí, jsou vousky minimem a maximem datového souboru. Pokud některá hodnota přesahuje toto rozpětí, je vousk poslední hodnotou, která toto rozpětí nepřesahuje. Hodnota, přesahující vzdálenost $1,5 \times \text{IQR}$ od mediánu je v grafu zanesena jako samostatný bod, značený kolečkem.

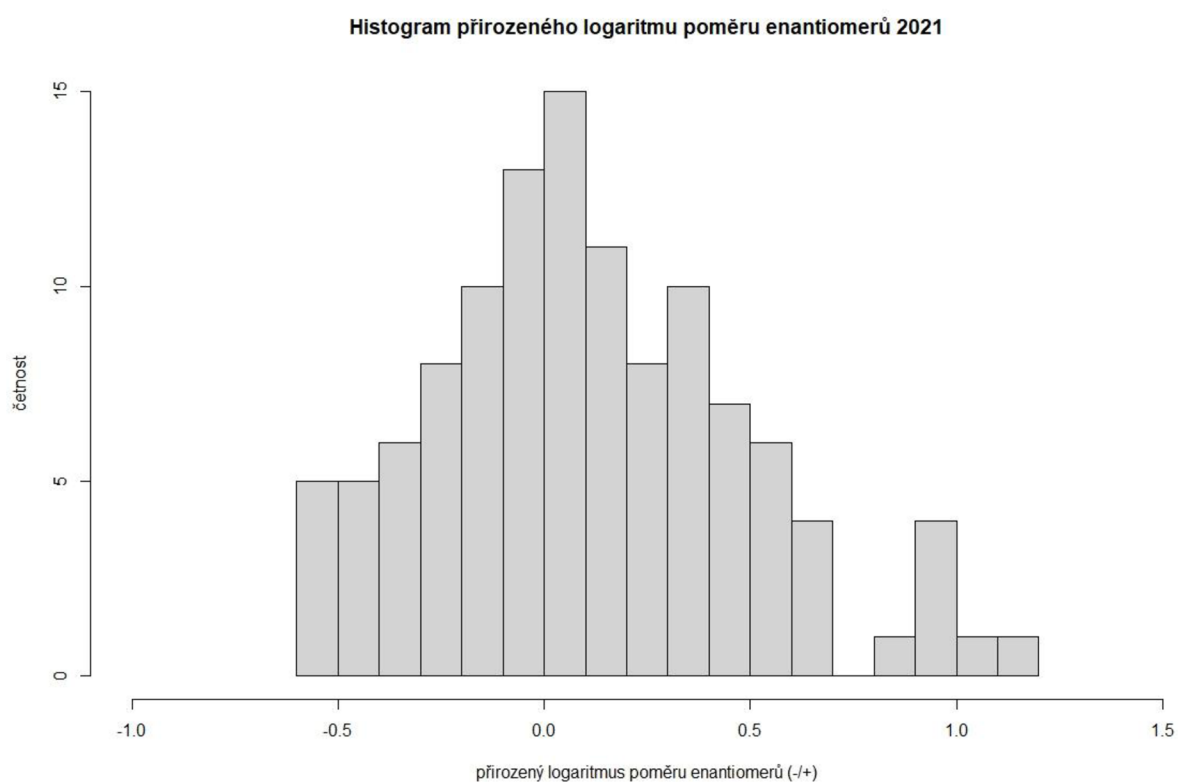
4.2 Výsledky

4.2.1 Normalita rozdělení

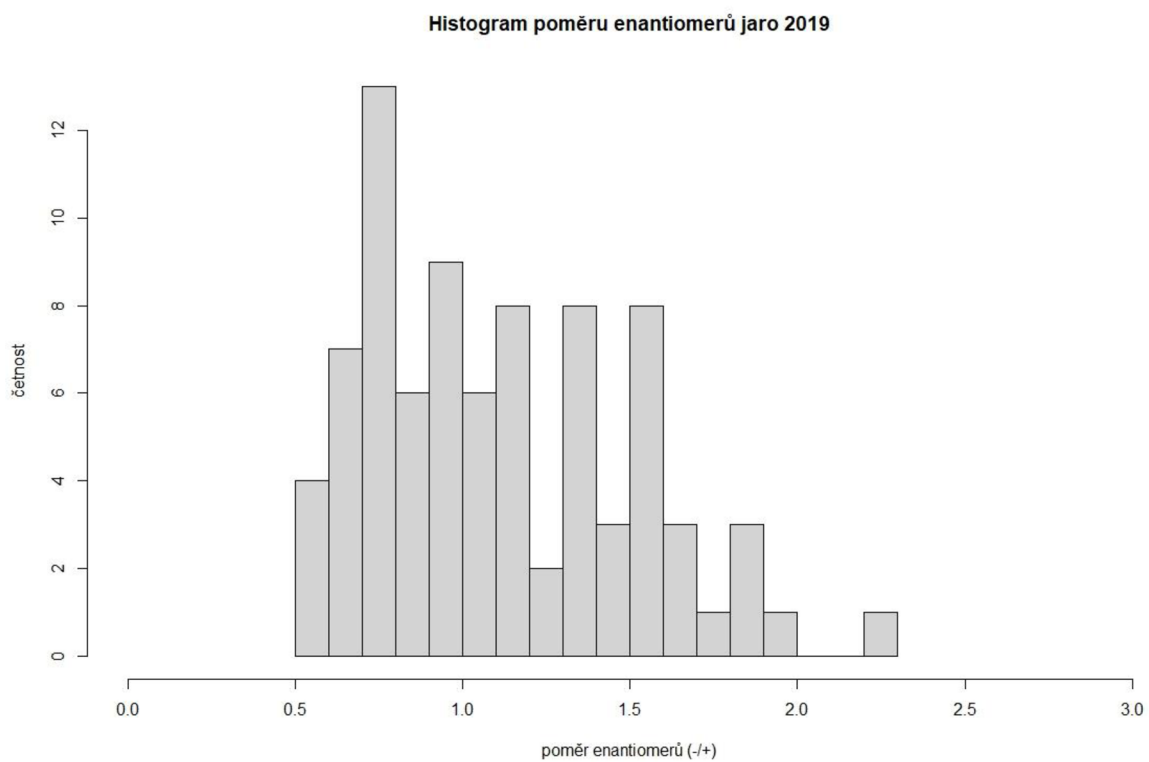
Poměr enantiomerů byl v rozhraní R vizualizován v podobě histogramů. Pro bližší podobnost normálnímu rozdělení byla provedena transformace poměru enantiomerů pomocí přirozeného logaritmu. Všechny následující testy byly provedeny na hodnotách po logaritmické transformaci.



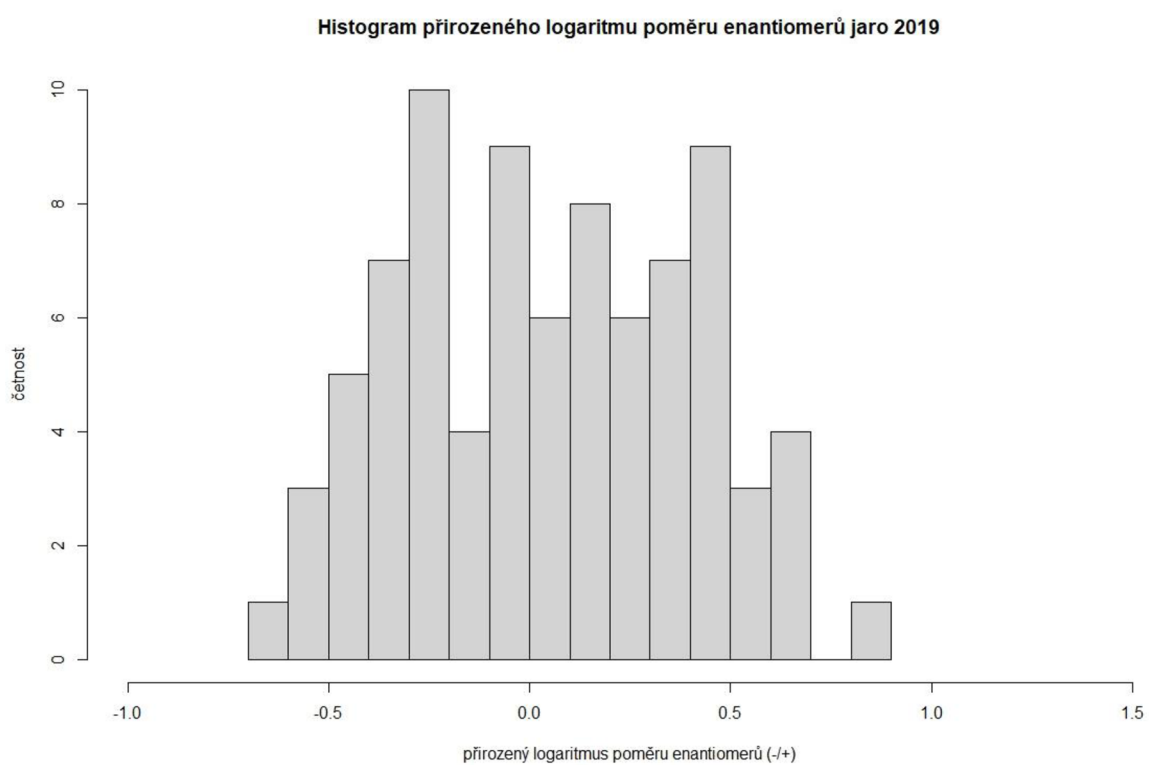
Obrázek 11 Histogram poměru enantiomerů α -pinenu rok 2021



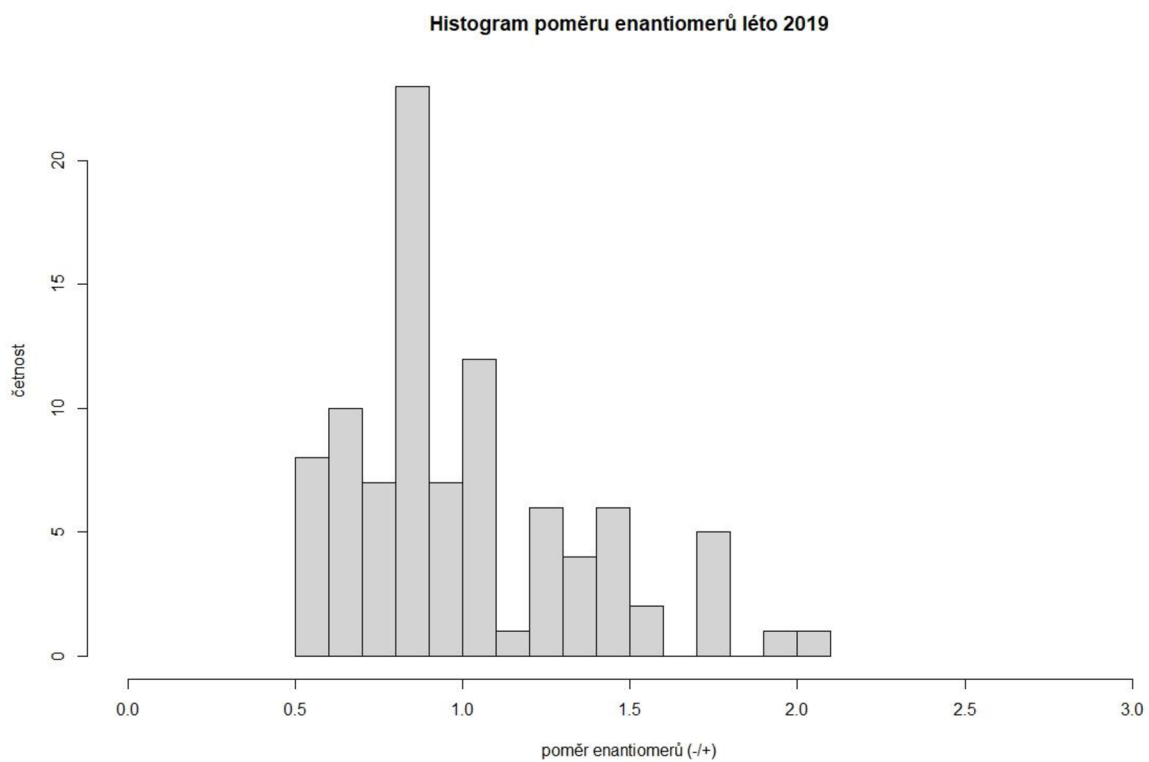
Obrázek 12 Histogram přirozeného logaritmu poměru enantiomerů α -pinenu rok 2021



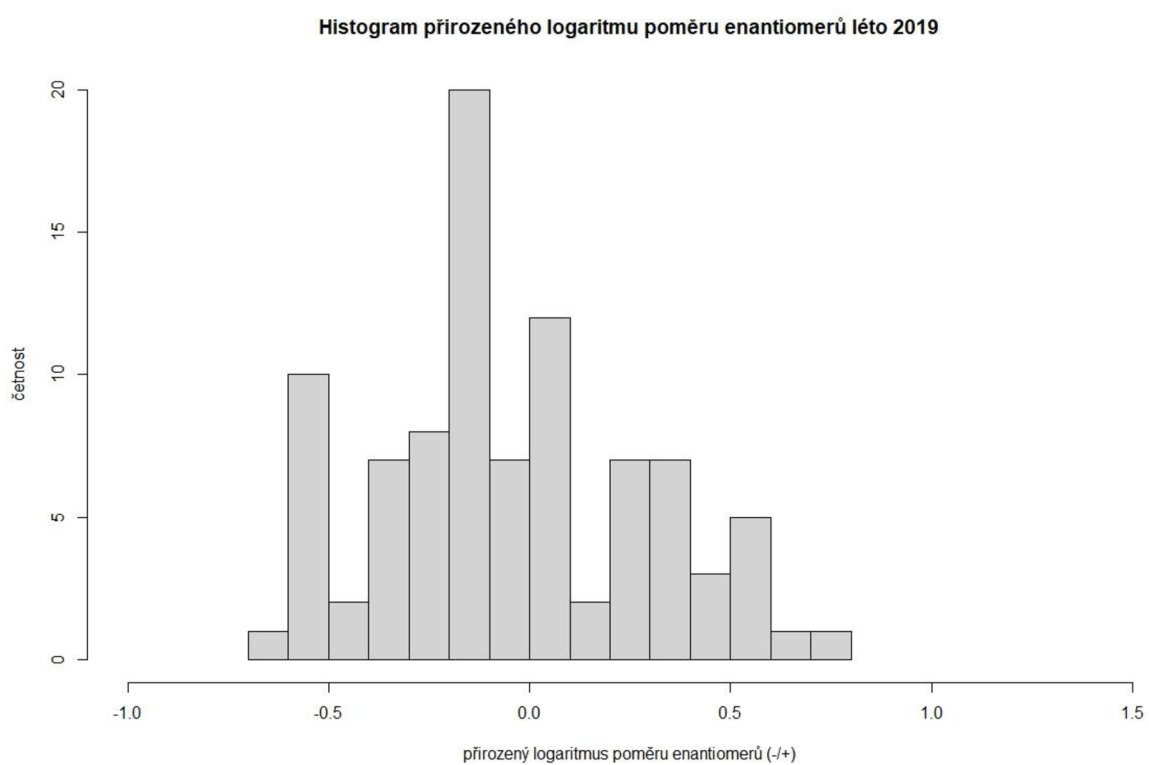
Obrázek 13 Histogram Poměru enantiomerů α -pinenu jaro 2019



Obrázek 14 Histogram přirozeného logaritmu poměru enantiomerů α -pinenu jaro 2019



Obrázek 15 Histogram poměru enantiomerů α -pinenu léto 2019



Obrázek 16 Histogram přirozeného logaritmu poměru enantiomerů α -pinenu léto 2019

Jak je z histogramů patrné (obr. 11-16), normálnímu rozdělení se po transformaci dat nejvíce přibližuje datový soubor z roku 2021. Přibližně normální rozdělení má i soubor z jara 2019. Soubor z léta 2019 se normálnímu rozdělení podobá nejméně.

Pro posouzení normality rozdělení byl proveden Shapiro-Wilkův test. Pro všechny datové soubory a příslušné ekotypy.

H_0 : „Poměr enantiomerů α -pinenu má normální rozdělení“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Rok 2021:

- H_0 se nezamítá pro datový soubor jako celek ($p = 0,074$)
- H_0 se nezamítá pro chlumní ekotyp (CH) ($p = 0,313$)
- H_0 se nezamítá pro horský ekotyp (H) ($p = 0,231$)
- H_0 se nezamítá pro vysokohorský ekotyp (VH) ($p = 0,424$)

Jaro 2019:

- H_0 se nezamítá pro datový soubor jako celek ($p = 0,169$)
- H_0 se zamítá pro chlumní ekotyp (CH) ($p = 0,029$)
- H_0 se nezamítá pro horský ekotyp (H) ($p = 0,723$)
- H_0 se nezamítá pro vysokohorský ekotyp (VH) ($p = 0,169$)

Léto 2019:

- H_0 se zamítá pro datový soubor jako celek ($p = 0,035$)
- H_0 se nezamítá pro chlumní ekotyp (CH) ($p = 0,267$)
- H_0 se nezamítá pro horský ekotyp (H) ($p = 0,268$)
- H_0 se nezamítá pro vysokohorský ekotyp (VH) ($p = 0,175$)

Na datových souborech byl následně proveden Bartlettův test pro identifikaci shodnosti rozptylů. Test porovnává rozptyl pro více než dvě skupiny. Test požaduje normalitu rozdělení.

H_0 : „Rozptyly poměru enantiomerů α -pinenu mezi ekotypy se rovnají“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Rok 2021:

- H_0 se nezamítá ($p = 0,504$)

Jaro 2019:

- H_0 se nezamítá ($p = 0,285$)

Léto 2019:

- H_0 se nezamítá ($p = 0,189$)

V závislosti na výsledcích předchozích testů byl pro zpracování dat vybrán test ANOVA. Jedná se o parametrický test. Požadující rovnost rozptylů, která byla Bartlettovým testem potvrzena.

Normalita byla Shapiro-Wilkovým testem zamítnuta pouze pro chlumní ekotyp pro jaro 2019 a pro léto 2019 jako celek. Požadavek normálního rozdělení dat lze zanedbat při vysokém počtu pozorování, které tyto datové soubory splňují. Podstatnější pro použití testu je shodnost rozptylů rozdělení (Janáček, 2022), kterou datové soubory splnily.

Analýza rozptylu byla použita na všechny tři datové soubory stejným způsobem, pro každý datový soubor bylo testu použito pro detekci rozdílu poměru enantiomerů mezi ekotypy i genotypy:

H_0 : „Střední hodnoty poměru enantiomerů α -pinenu se rovnají“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Na tento test navazuje Tukey HSD test. Jedná se o test schopný identifikovat, které skupiny dat jsou statisticky významně odlišné.

4.2.2 Rok 2021

4.2.2.1 Ekotypy

```
> fit_log1 <- aov(log_ratio ~ ekotyp, data = data)
> summary(fit_log1)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
ekotyp      2    0.81  0.4052   2.936 0.0572 .
Residuals 112  15.46  0.1380
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Obrázek 17 Předpis a výstup testu ANOVA pro ekotypy rok 2021

```

> posthoc <- HSD.test(fit_log1,"ekotyp", group = TRUE,console = TRUE)
Study: fit_log1 ~ "ekotyp"
HSD Test for log_ratio
Mean Square Error: 0.1380029
ekotyp, means
      log_ratio      std r      Min      Max
H   0.0857937 0.3830313 40 -0.5554699 1.1619885
CH  0.1585714 0.3759960 65 -0.5867010 1.0092395
VH -0.1419191 0.2762148 10 -0.4627839 0.4036903

Alpha: 0.05 ; DF Error: 112
Critical Value of Studentized Range: 3.359146

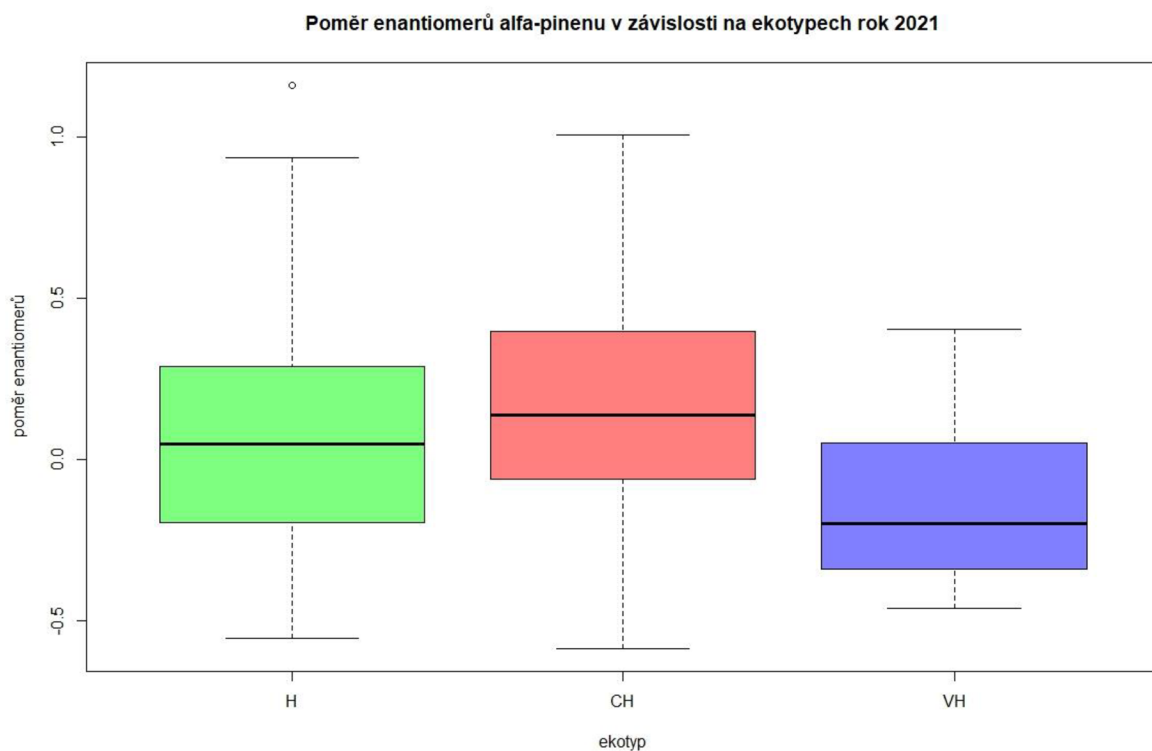
Groups according to probability of means differences and alpha level( 0.05 )
Treatments with the same letter are not significantly different.

      log_ratio groups
CH  0.1585714      a
H   0.0857937     ab
VH -0.1419191      b

```

Obrázek 18 Předpis a výstup Tukey HSD testu ekotypy rok 2021

Tukey HSD test pracuje odlišným způsobem než test ANOVA. V tomto případě vychází výsledek, že se signifikantně liší chlumní (CH) ekotyp od vysokohorského (VH) (obr. 18), ačkoliv H_0 nebyla pro tento případ analýzou rozptylu zamítnuta při nízké hodnotě p ($p = 0,0572$) (obr. 17). Důvodem této duality je nízká hodnota p testu ANOVA, který má pro závěr testu zásadní význam (obr. 19).



Obrázek 19 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypech rok 2021

4.2.2.2 Genotypy

```
> fit_log2 <- aov(log_ratio ~ genotyp, data = data)
> summary(fit_log2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotyp	28	6.557	0.2342	2.074	0.00551 **
Residuals	86	9.710	0.1129		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Obrázek 20 Předpis a výstup testu ANOVA pro genotypy rok 2021

Alpha: 0.05 ; DF Error: 86
Critical value of Studentized Range: 5.460259

Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

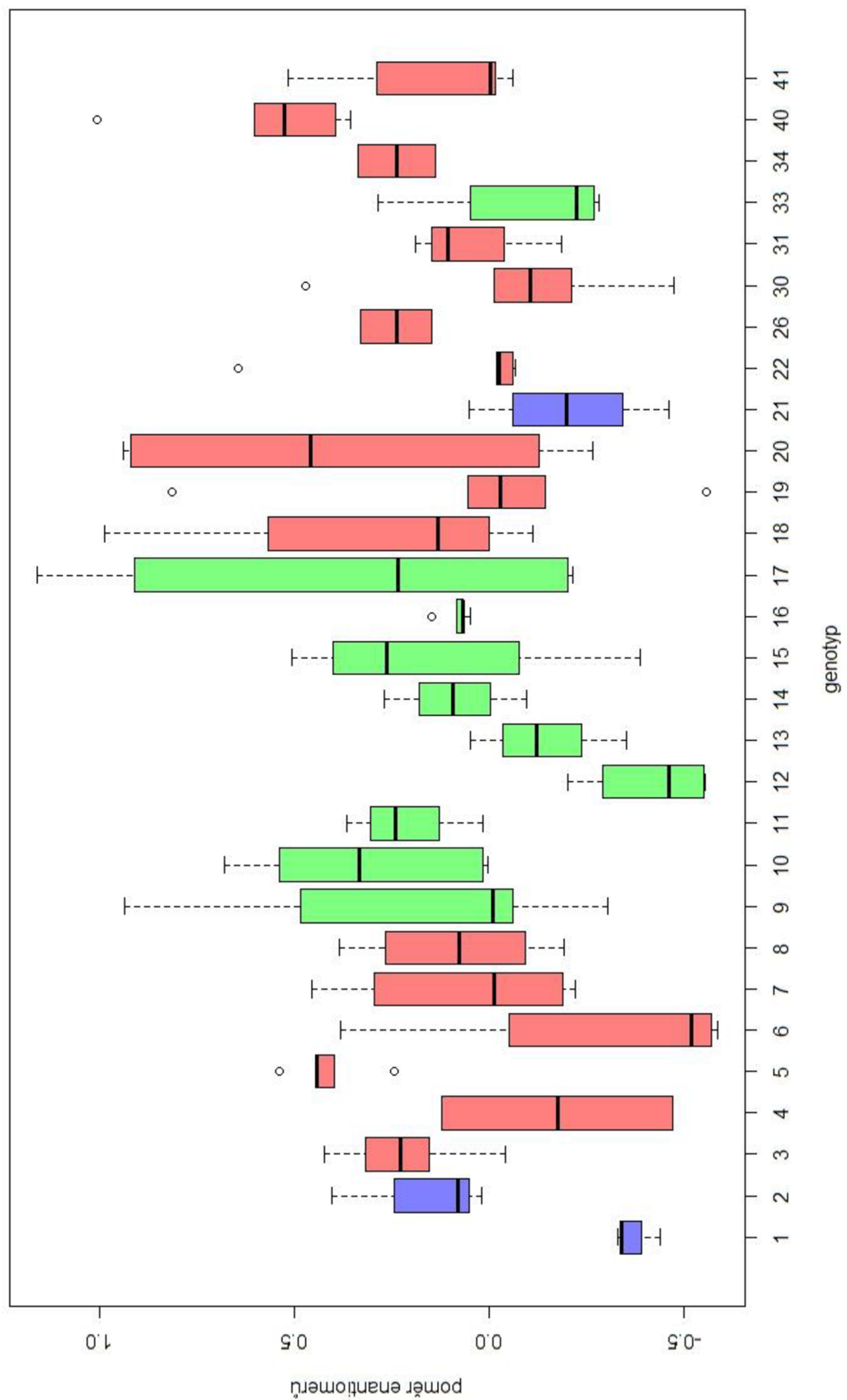
Treatments with the same letter are not significantly different.

	log_ratio	groups
40	0.56932588	a
5	0.41379146	ab
20	0.39673419	ab
17	0.35447640	ab
10	0.31500538	ab
18	0.28467610	ab
26	0.23820511	ab
34	0.23713303	ab
3	0.21617574	ab
9	0.20941369	ab
11	0.20787158	ab
2	0.16825542	ab
15	0.16150190	ab
41	0.14553835	ab
22	0.09430751	ab
14	0.08831718	ab
8	0.08588515	ab
16	0.08271112	ab
7	0.05204457	ab
31	0.03669867	ab
19	0.02704821	ab
30	-0.06688857	ab
33	-0.11108162	ab
13	-0.14228100	ab
4	-0.17545135	ab
21	-0.20296734	ab
6	-0.31147634	b
1	-0.37069600	b
12	-0.42130325	b

Obrázek 21 Výstup Tukey HSD testu pro genotypu rok 2021

Mezi genotypy byl testem ANOVA detekován statisticky významný rozdíl (obr. 20). Rozdíl byl identifikován Tukey HSD testem byl určeno, že genotyp 40 vykazuje ve sledovaném znaku významně vyšší hodnotu v porovnání s genotypy 6, 1 a 12 (obr. 21 a 22).

Poměr enantiomerů alfa-pinenu v závislosti na genotypech rok 2021



Obrázek 22 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na genotypech 2021 (přislušnost genotypů k ekotypům: červená- CH, zelená- H a modrá- VH)

4.2.3 Jaro 2019

4.2.3.1 Ekotypy

```
> fit_log1 <- aov(log_ratio ~ ekotyp, data = data)
> summary(fit_log1)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
ekotyp      2  0.664   0.3318   2.871 0.0623 .
Residuals  83  9.592   0.1156
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

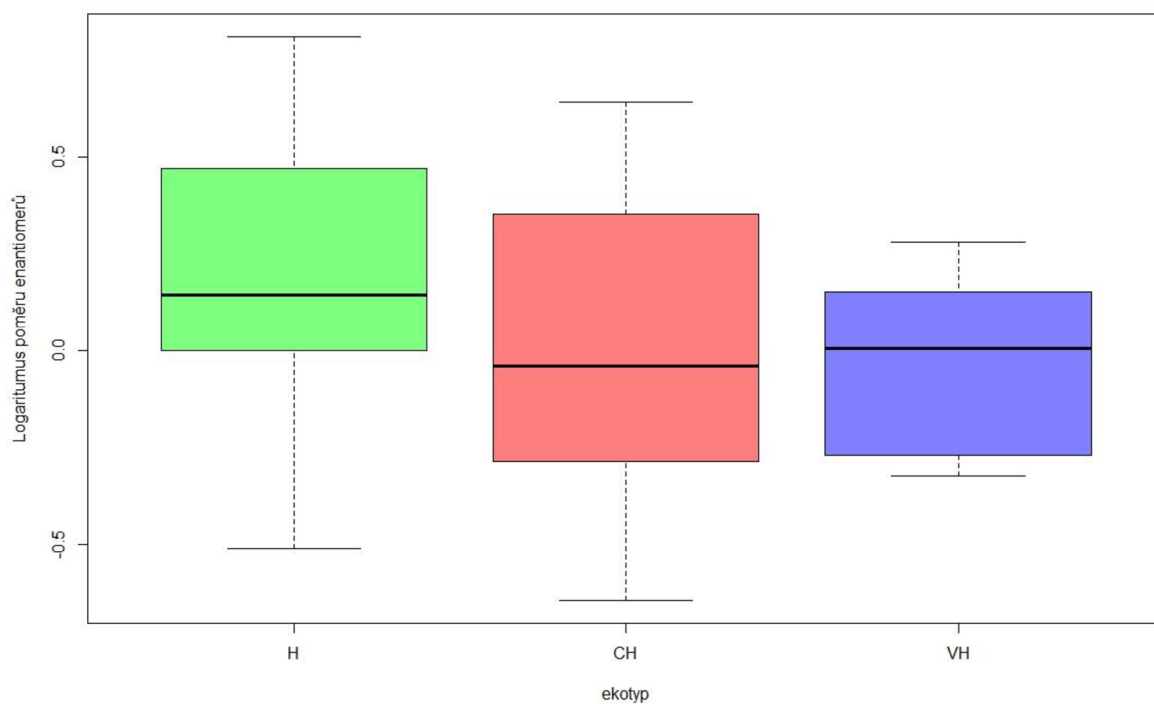
Obrázek 23 Předpis a výstup testu ANOVA pro ekotypy jaro 2019

```
> posthoc <- HSD.test(fit_log1,"ekotyp", group = TRUE,console = TRUE)
study: fit_log1 ~ "ekotyp"
HSD Test for log_ratio
Mean Square Error:  0.1155722
ekotyp, means
      log_ratio      std  r      Min      Max
H   0.174572309 0.3429660 29 -0.5121712 0.8100207
CH -0.002931431 0.3563769 47 -0.6440695 0.6403864
VH -0.040831143 0.2252822 10 -0.3224598 0.2817325
Alpha: 0.05 ; DF Error: 83
Critical Value of Studentized Range: 3.374985
Groups according to probability of means differences and alpha level( 0.05 )
Treatments with the same letter are not significantly different.
      log_ratio groups
H   0.174572309      a
CH -0.002931431      a
VH -0.040831143      a
```

Obrázek 24 Předpis a výstup Tukey HSD testu pro ekotypy jaro 2019

Vlastnosti datového souboru jaro 2019 jsou podobné, jako u dat z roku 2021. Mezi ekotypy nebyl odhalen statisticky významný rozdíl s nízkou hodnotou p ($p = 0,0623$) (obr. 23). Tukey HSD test se v tomto případě shoduje s analýzou rozptylu (obr. 24 a 25).

Poměr enantiomerů alfa-pinenu v závislosti na ekotypech jaro 2019



Obrázek 25 Boxplot poměr enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypech jaro 2019

4.2.3.2 Genotypy

```
> fit_log2 <- aov(log_ratio ~ genotyp, data = data)
> summary(fit_log2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotyp	25	6.386	0.2554	3.96	6.58e-06 ***
Residuals	60	3.870	0.0645		

signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Obrázek 26 Předpis a výstup testu ANOVA pro genotypy jaro 2019

Alpha: 0.05 ; DF Error: 60
Critical value of Studentized Range: 5.453197

Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

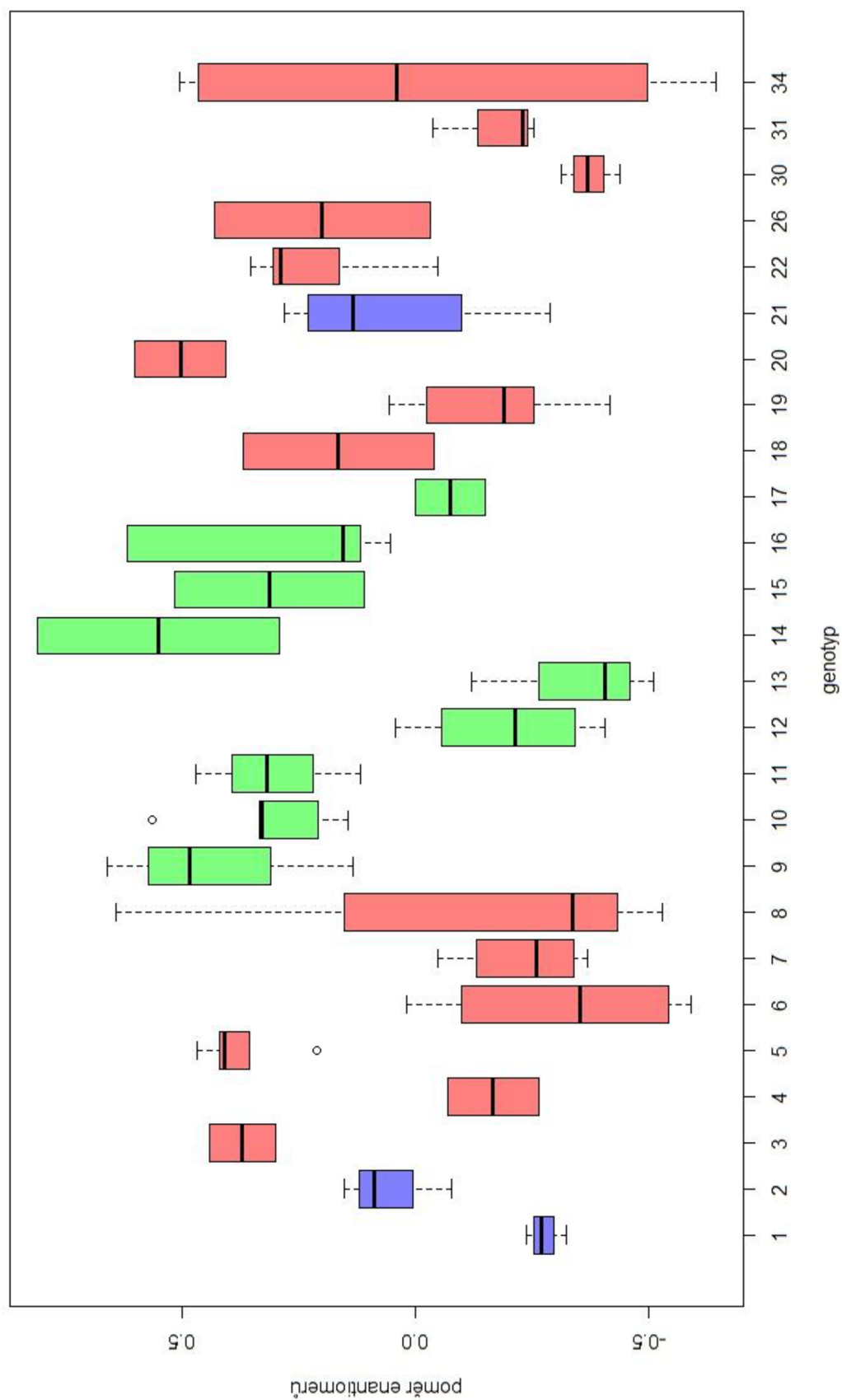
Treatments with the same letter are not significantly different.

	log_ratio	groups
14	0.55040300	a
20	0.50368236	ab
9	0.42618542	ab
5	0.37274658	ab
3	0.37019285	ab
10	0.31574571	ab
16	0.31245470	ab
15	0.31144215	ab
11	0.30192277	ab
22	0.21176805	ab
26	0.19929456	ab
18	0.16456278	ab
21	0.06445487	ab
2	0.05486460	ab
34	-0.01523099	ab
8	-0.07555346	ab
17	-0.07600352	ab
19	-0.16528403	ab
4	-0.16619425	ab
31	-0.18763830	ab
12	-0.19870691	ab
7	-0.23472202	ab
1	-0.27690823	ab
6	-0.32005934	b
13	-0.34652842	b
30	-0.37324796	b

Obrázek 27 Výstup Tukey HSD testu pro genotypu jaro 2019

V rovině genotypů byl zaznamenán statisticky významný rozdíl (obr. 26). Tukey HSD test identifikoval, že genotyp 14 ve sledovaném znaku vykazuje významně vyšší hodnotu než genotypy 6, 13 a 30 (obr. 27 a 28).

Poměr enantiomerů alfa-pinenu v závislosti na genotypech jaro 2019



Obrázek 28 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na genotypech jaro 2019 (přislušnost genotypů k ekotypům: červená- CH, zelená- H a modrá- VH)

4.2.4 Léto 2019

4.2.4.1 Ekotypy

```
> fit_log1 <- aov(log_ratio ~ ekotyp, data = data)
> summary(fit_log1)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
ekotyp     2  0.197  0.09831   0.923  0.401
Residuals 89  9.476  0.10647
```

Obrázek 29 Předpis a výstup testu ANOVA pro ekotypy léto 2019

```
> posthoc <- HSD.test(fit_log1,"ekotyp", group = TRUE,console = TRUE)

study: fit_log1 ~ "ekotyp"

HSD Test for log_ratio

Mean Square Error:  0.1064683

ekotyp, means

      log_ratio      std r      Min      Max
H  -0.02681164  0.3266881  30 -0.5435258  0.6714592
CH -0.02526032  0.3434950  52 -0.6601754  0.7005129
VH -0.17433548  0.2008913  10 -0.3964975  0.2282449

Alpha: 0.05 ; DF Error: 89
Critical value of studentized Range: 3.370849

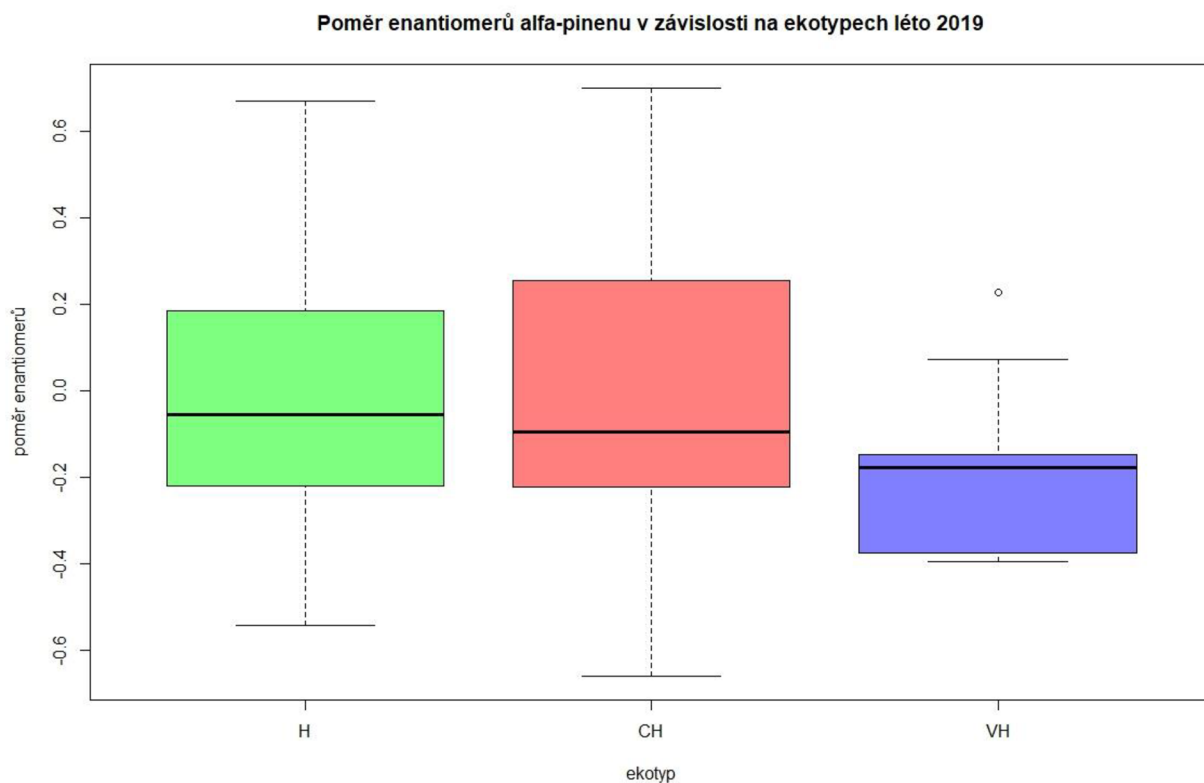
Groups according to probability of means differences and alpha level( 0.05 )

Treatments with the same letter are not significantly different.

      log_ratio groups
CH -0.02526032      a
H  -0.02681164      a
VH -0.17433548      a
- - - - -
```

Obrázek 30 Předpis a výstup Tukey HSD testu pro genotypy léto 2019

Obdobně, jako u předchozích datových souborů nebyl pro léto 2019 zjištěn statisticky významný rozdíl mezi ekotypy ($p = 0,401$) (obr. 29, 30 a 31).



Obrázek 31 Boxplot poměr enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypech jaro 2019

4.2.4.2 Genotypy

```
> fit_log2 <- aov(log_ratio ~ genotyp, data = data)
> summary(fit_log2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotyp	25	4.814	0.19255	2.616	0.000983 ***
Residuals	66	4.859	0.07361		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Obrázek 32 Předpis a výstup testu ANOVA pro genotypy léto 2019

Alpha: 0.05 ; DF Error: 66
Critical value of Studentized Range: 5.430145

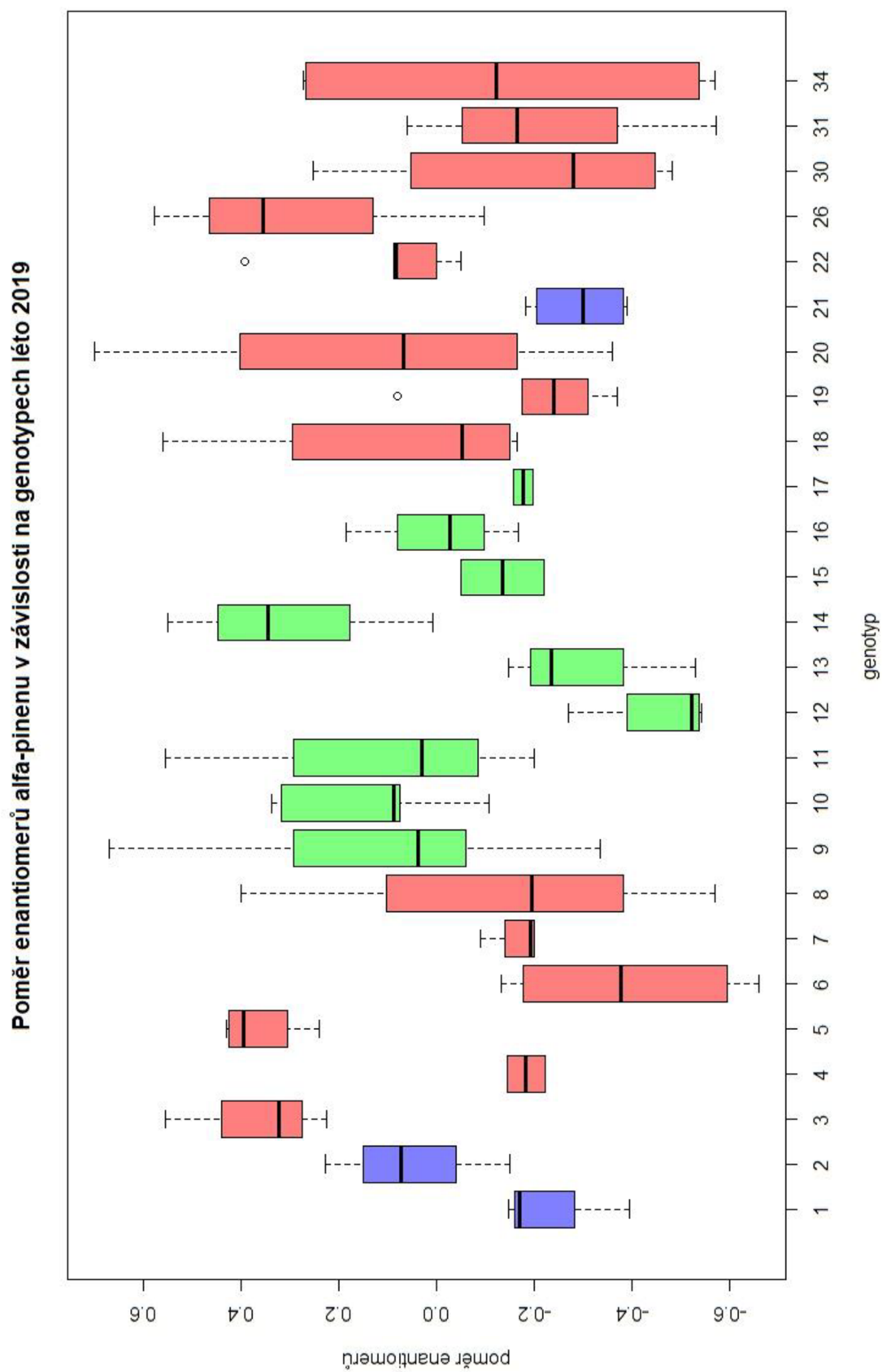
Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

Treatments with the same letter are not significantly different.

	log_ratio	groups
3	0.368053437	a
5	0.364587723	a
14	0.301266243	ab
26	0.278398792	ab
10	0.141734263	ab
11	0.128696419	ab
9	0.121172941	ab
20	0.118255088	ab
22	0.101742775	ab
18	0.072362119	ab
2	0.049774196	ab
16	-0.002965481	ab
8	-0.121650997	ab
15	-0.135110541	ab
34	-0.135581080	ab
7	-0.169676261	ab
17	-0.177513746	ab
4	-0.183470815	ab
30	-0.197438580	ab
19	-0.203153153	ab
31	-0.226191042	ab
1	-0.238652693	ab
21	-0.294179831	ab
13	-0.305145932	ab
6	-0.386352415	ab
12	-0.464797565	b

Obrázek 33 Výstup Tukey HSD testu pro genotypu léto 2019

Mezi genotypy byl pozorován statisticky signifikantní rozdíl (obr. 32). Tukey HSD test identifikoval, že genotypy 3 a 5 vykazují ve sledovaném znaku významně vyšší hodnoty v porovnání s genotypem 12 (obr. 33 a 34).



Obrázek 34 Boxplot poměr enantiomerů α -pinenu v závislosti na genotypech léto 2019 (příslušnost genotypů k ekotypům: červená- CH, zelená- H a modrá- VH)

4.2.5 Dílčí shrnutí výsledků

Ve sledovaném znaku se nelišily ekotypy ani pro jedno odběrové období.

V rovině genotypů byly sledovány statisticky významné rozdíly. Vždy se jednalo o menší skupinku genotypů (ne více než tři) na horní i spodní hranici spektra sledovaného znaku, které se lišily od sebe navzájem, ale nelišily se od centrální skupiny, která představuje většinu testovaných genotypů.

Hodnota uvedená v závorce reprezentuje střední hodnotu poměru enantiomerů α -pinenu po transformaci přirozeným logaritmem. Kladná hodnota představuje situaci, kdy (-) enantiomer α -pinenu ve vzorku převažuje nad (+) enantiomerem. Záporná hodnota představuje situaci opačnou.

Nejnižší poměr enantiomerů byl pro rok 2021 zaznamenán u genotypů 6 (-0,31); 1 (-0,37) a 12 (-0,42). Na jaře 2019 byl nejnižší poměr enantiomerů zaznamenán u genotypu 6 (-0,32); 15 (-0,35) a 30 (-0,37). Pro léto 2019 byl nejnižší poměr enantiomerů zjištěn u genotypu 12 (-0,46).

Pro rok 2021 se na horní straně spektra sledovaného znaku odlišuje genotyp 40 (0,57). V testování genotypů sezóny jaro 2019 vychází nejvyšší poměr enantiomerů u genotypu 14 (0,55). V létě 2019 vykazují nejvyšší poměr enantiomerů genotypy 3 (0,37) a 5 (0,36).

4.2.6 Souhrnná analýza

Další částí statistického testování bylo porovnání dat ze všech tří odběrových období, tedy jara roku 2019; léta roku 2019 a roku 2021. Jaro 2019 bylo označeno jako sezóna 1, léto 2019 jako sezóna 2 a rok 2021 jako sezóna 3.

Data z jednotlivých datových souborů byla sloučena do jedné tabulky. Vyloučeni byli jedinci, u kterých neproběhly odběry ve všech sezónách (tab. 6). Opět byla provedena transformace poměru enantiomerů α -pinenu přirozeným logaritmem.

Tabulka 6 Vlastnosti souhrnného datového souboru pro všechna odběrová období dohromady

Souhrnný datový soubor		
Ekotyp	Počet příslušných genotypů	Počet vzorkovaných jedinců
CH	14	44
H	9	28
VH	3	3
suma	82	26

Pro potřeby následného testu byla testována normalita rozdělení všech tří původních datových souborů Shapiro-Wilkovým testem.

H_0 : „Poměr enantiomerů α -pinenu má normální rozdělení.“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Jaro 2019:

- H_0 se nezamítá ($p=0,098$)

Léto 2019:

- H_0 se nezamítá ($p=0,056$)

Rok 2021:

- H_0 se nezamítá ($p=0,281$)

Hodnota p se liší vzhledem k testu normality samostatných testů, provedeného na datových souborech v první části testování, vlivem redukce vzorků.

4.2.6.1 Korelace mezi sezónami

Pro ilustraci podobnosti sledovaného znaku v oddělených odběrových sezónách proběhl mezi datovými soubory párový korelační test s Pearsonovým korelačním koeficientem.

H_0 : „poměr enantiomerů α -pinenu má mezi sezónami nulovou korelaci ($\rho=0$)“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Jaro a léto 2019:

```
> cor.test(data_long$ratio[data_long$season==1], data_long$ratio[data_long$season==2])

Pearson's product-moment correlation

data: data_long$ratio[data_long$season == 1] and data_long$ratio[data_long$season == 2]
t = 9.8883, df = 80, p-value = 1.596e-15
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.6252360 0.8257356
sample estimates:
      cor
0.7416197
```

Obrázek 35 Předpis a výstup korelačního testu s výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu porovnávající poměr enantiomerů α -pinenu mezi jarem a létem roku 2019

Jaro 2019 a rok 2021:

```
> cor.test(data_long$ratio[data_long$season==1], data_long$ratio[data_long$season==3])

Pearson's product-moment correlation

data: data_long$ratio[data_long$season == 1] and data_long$ratio[data_long$season == 3]
t = 7.8798, df = 80, p-value = 1.391e-11
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.5184021 0.7678954
sample estimates:
      cor
0.6610438
```

Obrázek 36 Předpis a výstup korelačního testu s výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu porovnávající poměr enantiomerů α -pinenu mezi jarem roku 2019 a rokem 2021

Léto 2019 a rok 2021:

```
> cor.test(data_long$ratio[data_long$season==2], data_long$ratio[data_long$season==3])

Pearson's product-moment correlation

data: data_long$ratio[data_long$season == 2] and data_long$ratio[data_long$season == 3]
t = 8.8543, df = 80, p-value = 1.699e-13
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.5741731 0.7986062
sample estimates:
      cor
0.7035217
```

Obrázek 37 Předpis a výstup korelačního testu s výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu porovnávající poměr enantiomerů α -pinenu mezi létem roku 2019 a rokem 2021

H_0 byla zamítnuta pro vztahy mezi všemi datovými soubory (obr. 35, 36 a 37). Vztahy všech tří datových souborů navzájem se dají charakterizovat, jako silná pozitivní korelace.

4.2.6.2 Lineární smíšené modely

4.2.6.2.1 ekotypy

Následně byla data modelována lineárním smíšeným modelem. Jako pevné efekty byly stanoveny vztahy ekotypu a odběrového období a faktory genotypu a odběrového období (jedná se o opakované měření téhož jedince) byly vloženy jako náhodné proměnné.

H_0 : „Střední hodnoty poměru enantiomerů α -pinenu se rovnají.“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

```
> fit_rm<- lmer(formula = ratio ~ 1 + ekotyp*season + (1|genotyp) + (1|season),
+ data = data_long)
> summary(fit_rm)
Linear mixed model fit by REML. t-tests use Satterthwaite's method ['lmerModLmerTest']
Formula: ratio ~ 1 + ekotyp * season + (1 | genotyp) + (1 | season)
Data: data_long

REML criterion at convergence: 77.1

Scaled residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.1504 -0.6105 -0.0949  0.5364  3.5694

Random effects:
 Groups   Name                Variance Std.Dev.
genotyp  (Intercept)             0.054728  0.23394
season   (Intercept)             0.003107  0.05574
Residual                    0.057823  0.24046
Number of obs: 246, groups: genotyp, 26; season, 3

Fixed effects:
              Estimate Std. Error      df t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.16541    0.10639  60.96379   1.555  0.1252
ekotypCH      -0.14864    0.11611  33.43597  -1.280  0.2093
ekotypVH      -0.23491    0.17963  32.39796  -1.308  0.2002
season2       -0.17334    0.10171  214.30789  -1.704  0.0898 .
season3       -0.07923    0.10171  214.30789  -0.779  0.4369
ekotypCH:season2  0.11036    0.08221  214.30789   1.342  0.1809
ekotypVH:season2  0.08010    0.12528  214.30789   0.639  0.5233
ekotypCH:season3  0.13944    0.08221  214.30789   1.696  0.0913 .
ekotypVH:season3  0.01060    0.12528  214.30789   0.085  0.9327
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:
              (Intr) ektyCH ektyVH seasn2 seasn3 ekCH:2 ekVH:2 ekCH:3
ekotypCH      -0.665
ekotypVH      -0.430  0.394
season2       -0.478  0.175  0.113
season3       -0.478  0.175  0.113  0.500
ektypCH:ss2   0.236 -0.354 -0.140 -0.494 -0.247
ektypVH:ss2   0.155 -0.142 -0.349 -0.324 -0.162  0.401
ektypCH:ss3   0.236 -0.354 -0.140 -0.247 -0.494  0.500  0.201
ektypVH:ss3   0.155 -0.142 -0.349 -0.162 -0.324  0.201  0.500  0.401
optimizer (nloptwrap) convergence code: 0 (OK)
Model is nearly unidentifiable: large eigenvalue ratio
- Rescale variables?
```

Obrázek 38 Předpis a výstup lineárního smíšeného modelu pro ekotypy na souhrnných datech

Následně byla data jednotlivých ekotypů v rámci jednotlivých období porovnána párovým testem, metodou nejmenších čtverců v závislosti na předchozím lineárním smíšeném modelu.

```
> emmeans(fit_rm, list(pairwise ~ ekotyp|season), adjust = "tukey")
$`emmeans of ekotyp | season`
season = 1:
  ekotyp    emmean      SE df lower.CL upper.CL
  H       0.16541  0.286  0   -Inf     Inf
  CH      0.01678  0.263  0   -Inf     Inf
  VH     -0.06949  0.300  0   -Inf     Inf

season = 2:
  ekotyp    emmean      SE df lower.CL upper.CL
  H      -0.00793  0.217  0   -Inf     Inf
  CH     -0.04620  0.226  0   -Inf     Inf
  VH     -0.16273  0.257  0   -Inf     Inf

season = 3:
  ekotyp    emmean      SE df lower.CL upper.CL
  H       0.08619  0.338  0   -Inf     Inf
  CH      0.07699  0.273  0   -Inf     Inf
  VH     -0.13812  0.298  0   -Inf     Inf

Degrees-of-freedom method: kenward-roger
Confidence level used: 0.95

$`pairwise differences of ekotyp | season`
season = 1:
  2      estimate      SE   df t.ratio p.value
  H - CH    0.1486  0.102  33.0   1.450  0.3275
  H - VH    0.2349  0.172  32.0   1.370  0.3684
  CH - VH    0.0863  0.174  31.9   0.496  0.8735

season = 2:
  2      estimate      SE   df t.ratio p.value
  H - CH    0.0383  0.102  33.0   0.375  0.9257
  H - VH    0.1548  0.172  32.0   0.902  0.6429
  CH - VH    0.1165  0.174  31.9   0.671  0.7816

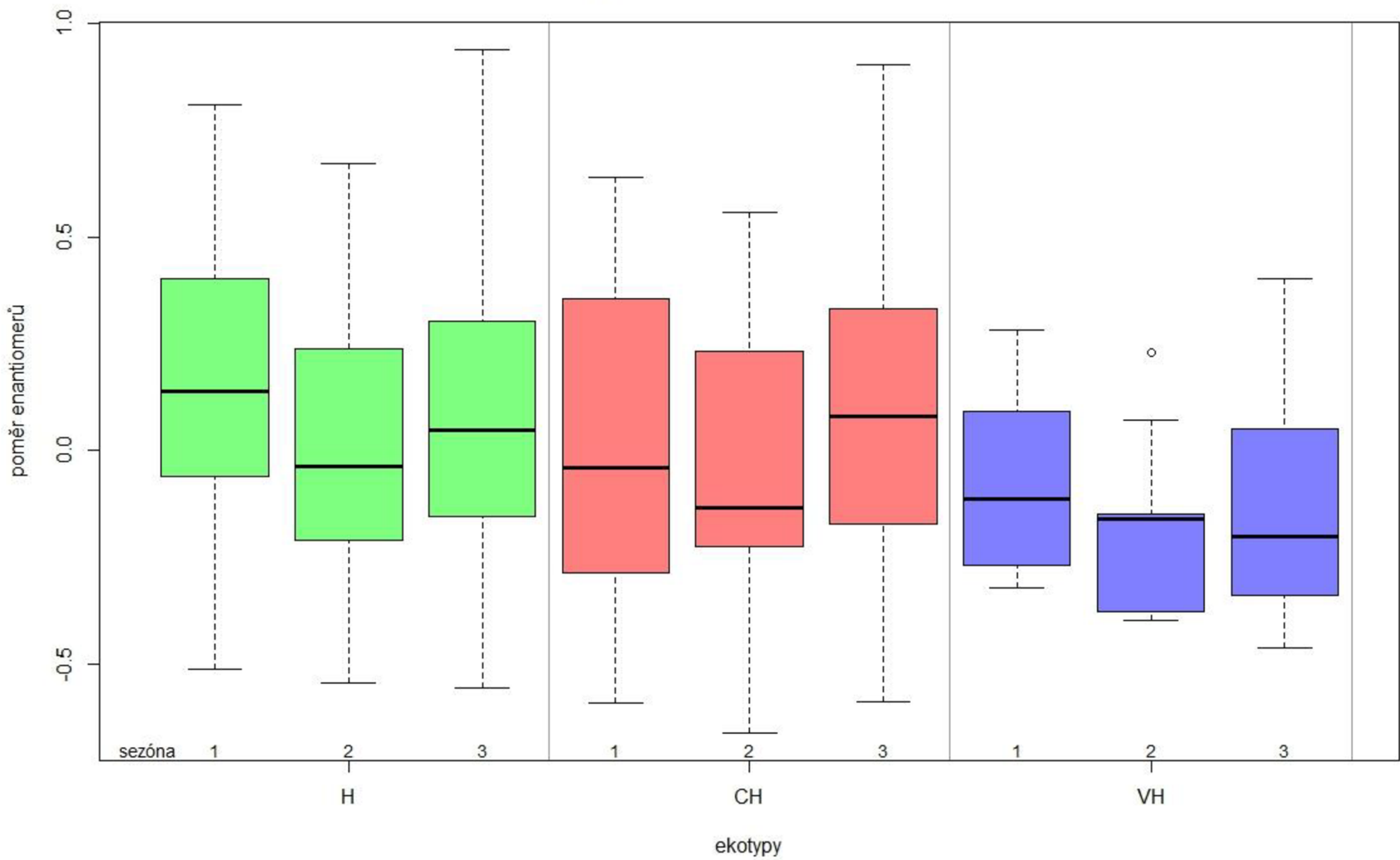
season = 3:
  2      estimate      SE   df t.ratio p.value
  H - CH    0.0092  0.112  33.0   0.082  0.9963
  H - VH    0.2243  0.173  32.0   1.297  0.4070
  CH - VH    0.2151  0.174  31.9   1.238  0.4401

Degrees-of-freedom method: kenward-roger
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
```

Obrázek 39 Předpis a výstup párového testu metodou nejmenších čtverců na souhrnných datech. V horní polovině testu je pro každý ekotyp v konkrétní sezóně uvedena střední hodnota. Ve spodní polovině jsou testovány rozdíly mezi ekotypy v příslušných sezónách

Výsledky z těchto dvou testů ilustrují, že mezi sledovanými ekotypy nebyl žádný statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a to ani za připojení náhodného faktoru genotypu a sezony odběru (obr. 38 a 39).

Porovnání poměru enantiomerů v čase ekotypy



Obrázek 40 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v čase podle ekotypů. Číslo v řádce „sezóna“ reprezentuje období (1- jaro 2019, 2- léto 2019, 3- rok 2021)

Graf typu boxplot znázorňuje poměr enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypu a období odběru (obr. 40). Zleva doprava reprezentují data pro jeden ekotyp odběry z jara 2019, léta 2019 a z roku 2021.

4.2.6.2.2 Genotypy

Závěrečnou částí statistické analýzy byl smíšený model dávající do souvislosti jako pevný faktor pouze genotyp a jako náhodný faktor sezonu.

H_0 : „Střední hodnoty poměru enantiomerů α -pinenu mezi genotypy se rovnají.“

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

```
> fit_rm2<- lmer(formula = ratio ~ 1 + genotyp + (1|season),
+               data = data_long)
> anova(fit_rm2)
Type III Analysis of Variance Table with Satterthwaite's method
      Sum Sq Mean Sq NumDF DenDF F value    Pr(>F)
genotyp 14.415  0.57662     25   218  9.9708 < 2.2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Obrázek 41 Předpis a výstup lineárního smíšeného modelu pro genotypy na souhrnných datech

H_0 byla zamítnuta (obr. 41). Byl proveden obdobný test jako v případě porovnání ekotypů. Byl proveden párový test, metodou nejmenších čtverců. Byly porovnány genotypy způsobem každý s každým. Jedná se o 26 genotypů, což představuje 325 dvojic (kombinační číslo $C(2,26)$). Výsledek testu je shrnut v tab. 7. a obr. 42.

```

> emmeans(fit_rm2, list(pairwise ~ genotyp), adjust = "tukey")
$`emmeans of genotyp`
  genotyp  emmean    SE    df lower.CL upper.CL
1         -0.29542 0.0858  62.6 -0.46694 -0.1239
2          0.09096 0.0858  62.6 -0.08056  0.2625
3          0.35921 0.0858  62.6  0.18769  0.5307
4        -0.17504 0.1029 102.1 -0.37904  0.0290
5          0.38122 0.0759  42.2  0.22809  0.5343
6        -0.33930 0.0759  42.2 -0.49243 -0.1862
7        -0.11745 0.0759  42.2 -0.27058  0.0357
8        -0.04405 0.0858  62.6 -0.21557  0.1275
9          0.40486 0.0858  62.6  0.23333  0.5764
10         0.25750 0.0692  30.6  0.11620  0.3988
11         0.21283 0.0858  62.6  0.04131  0.3844
12        -0.36160 0.0759  42.2 -0.51473 -0.2085
13        -0.26465 0.0858  62.6 -0.43617 -0.0931
14         0.36152 0.1029 102.1  0.15752  0.5655
15         0.18241 0.1029 102.1 -0.02159  0.3864
16         0.10093 0.0759  42.2 -0.05220  0.2541
17        -0.15168 0.1029 102.1 -0.35568  0.0523
18         0.00479 0.1029 102.1 -0.19921  0.2088
19        -0.11380 0.0692  30.6 -0.25509  0.0275
20         0.21833 0.1029 102.1  0.01433  0.4223
21        -0.16478 0.0759  42.2 -0.31791 -0.0116
22         0.13594 0.0692  30.6 -0.00536  0.2772
26         0.18885 0.1029 102.1 -0.01516  0.3928
30        -0.32820 0.0858  62.6 -0.49972 -0.1567
31        -0.12106 0.0858  62.6 -0.29258  0.0505
34         0.19379 0.1029 102.1 -0.01021  0.3978

```

Obrázek 42 Předpis a výstup párového testu metodou nejmenších čtverců pro genotypy na souhrnných datech. Střední hodnota pro genotyp je uvedena ve sloupci „emmean“

Tabulka 7 Přehled výsledků párových testů metodou nejmenších čtverců. Genotypy jsou seřazeny podle poměru enantiomerů α -pinenu vzestupně od nejnižšího po nejvyšší. Pro každý genotyp jsou uvedeny ty genotypy, od kterých se daný genotyp statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

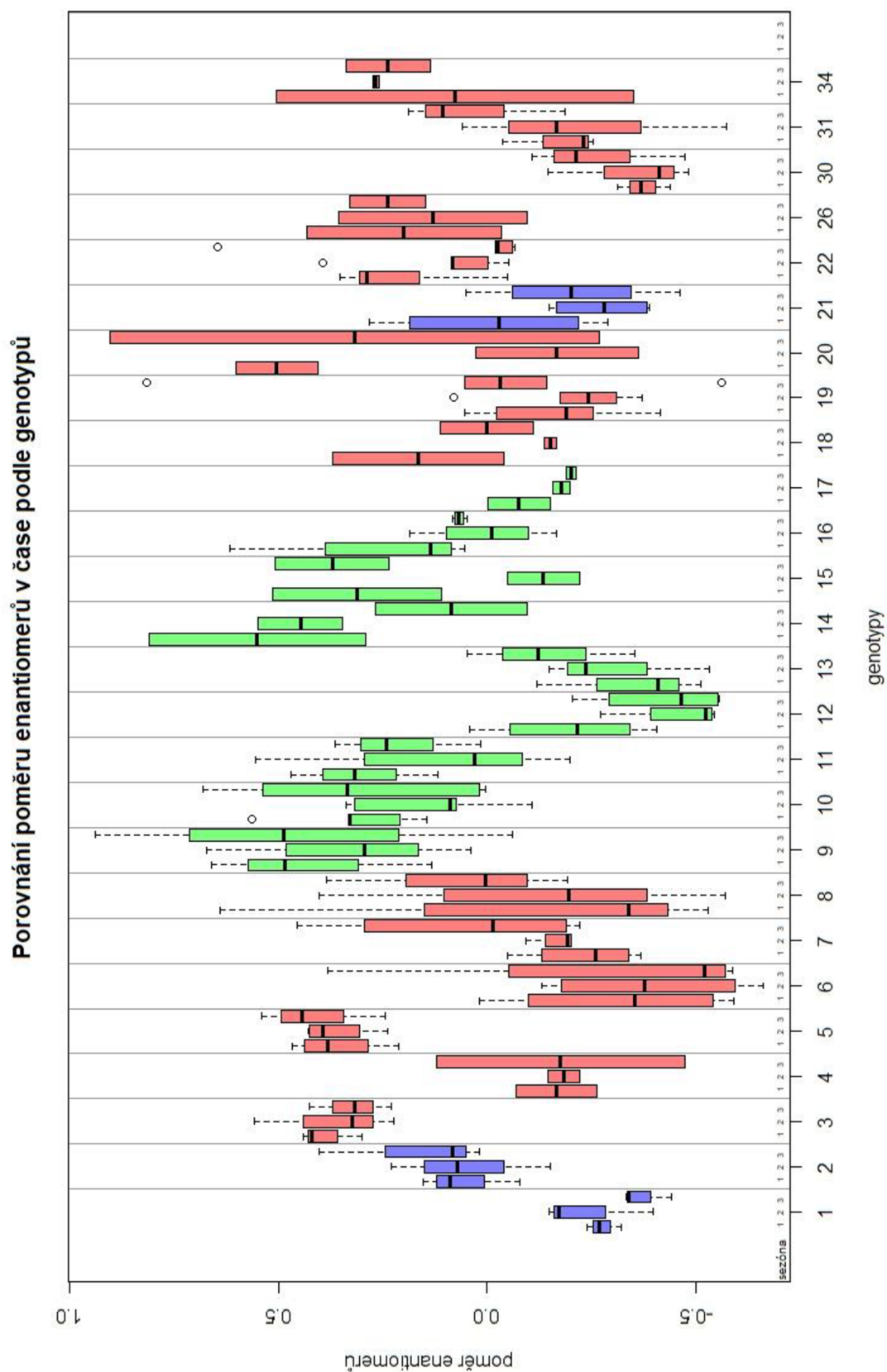
Výsledky párových testů				
Genotyp	Příslušný ekotyp	Ratio (-/+)	Přirozený logaritmus	Liší se od genotypů
12	H	0,697	-0,362	2, 3, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 26, 34
6	CH	0,712	-0,339	3, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 26, 34
30	CH	0,720	-0,328	3, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 26, 34
1	VH	0,744	-0,295	3, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 26, 34
13	H	0,767	-0,265	3, 5, 9, 10, 11, 14, 20, 22
4	CH	0,839	-0,175	3, 5, 9, 14
21	VH	0,848	-0,165	3, 5, 9, 10, 14
17	H	0,859	-0,152	3, 5, 9
31	CH	0,886	-0,121	3, 5, 9, 14
7	CH	0,889	-0,117	3, 5, 9, 10, 14
19	CH	0,892	-0,114	3, 5, 9, 10, 14
8	CH	0,957	-0,044	5, 6, 9
18	CH	1,005	0,005	6
2	VH	1,095	0,091	6, 12,
16	H	1,106	0,101	1, 6, 12, 30
22	CH	1,146	0,136	1, 6, 12, 13, 30
15	H	1,200	0,182	1, 6, 12, 30
26	CH	1,208	0,189	1, 6, 12, 30
34	CH	1,214	0,194	1, 6, 12, 30
11	H	1,237	0,213	1, 6, 12, 13, 30
20	CH	1,244	0,218	1, 6, 12, 13, 30
10	H	1,294	0,258	1, 6, 7, 12, 13, 19, 21, 30
3	CH	1,432	0,359	1, 4, 6, 7, 12, 13, 17, 19, 21, 30, 31
14	H	1,436	0,362	1, 4, 6, 7, 12, 13, 19, 21, 30, 31
5	CH	1,464	0,381	1, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 17, 19, 21, 30, 31
9	H	1,499	0,405	1, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 17, 19, 21, 30, 31

Mezi genotypy byla ve sledovaném znaku pozorována značná variabilita.

Nejnižší poměr enantiomerů α -pinenu měly genotypy 6 (-0,339); 12 (-0,361); 30 (-0,328) a 1 (-0,295). Genotypy 6 a 30 spadají pod ekotyp chlumní (CH). Genotyp 6 spadá pod ekotyp horský (H). Genotyp 1 spadá pod ekotyp vysokohorský (VH).

Zajímavostí je genotyp 18. Hodnota přirozeného logaritmu pro tento genotyp se nejvíce blíží nule (0,005). V původní podobě dat se hodnota poměru enantiomerů α -pinenu blíží jedné. Jedná se tak o genotyp, kde se α -pinen vyskytuje v téměř racemické podobě.

Nejvyšší poměr enantiomerů α -pinenu byl zaznamenán u genotypů: 9 (0,405); 5 (0,381); 14 (0,361) a 3 (0,359). Genotypy 9 a 14 náleží pod ekotyp horský (H). Genotypy 5 a 3 náleží pod ekotyp chlumní (CH).



Obrázek 43 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v čase podle genotypů. Barva boxplot grafu reprezentuje příslušnost k ekotypu (červená - CH, zelená - H, modrá - VH) číslo v řádce „sezóna“ reprezentuje odběrové období (1 - jaro 2019, 2 - léto 2019, 3 - rok 2021)

Rozdělení poměru enantiomerů α -pinenu v čase mezi genotypy lze vizualizovat způsobem analogickým k rozložení poměru enantiomerů α -pinenu v čase mezi ekotypy. Genotyp je reprezentován třemi boxy (obr. 43). Genotypy jsou navzájem odděleny svislými liniemi. Pro jednotlivé genotypy se jedná o odběry zleva doprava: 1 – jaro 2019; 2 – léto 2019; 3 – rok 2021. Genotypy jsou reprezentovány barvou, která odpovídá příslušnosti k ekotypu: červená – chlumní (CH); zelená – horský (H); modrá – vysokohorský (VH).

4.2.7 Dílčí shrnutí výsledků souhrnného testování

Ze souhrnných testů vyplývá, že poměr enantiomerů α -pinenu byl silně vázán na genotypy.

Mezi ekotypy statisticky signifikantní rozdíly pozorovány nebyly.

Téměř rovnoměrně po celém spektru hodnot sledovaného znaku se nachází genotypy, které spadají pod všechny tři ekotypy. Výjimkou je pouze vysokohorský ekotyp (VH), který se udržuje spíše na spodní hranici hodnot, statisticky významně se však od zbylých dvou ekotypů neliší.

Poměr enantiomerů α -pinenu je stálý v čase. Data z jednotlivých období jsou navzájem silně kladně korelována.

4.2.8 Shrnutí výsledků

Sledovaný znak poměr enantiomerů α -pinenu není vázán na ekotypy smrku. Výsledky žádného z testů porovnávající ekotypy v tomto znaku nezaznamenaly žádný statisticky významný rozdíl.

Sledovaný znak je vázán na genotypy. Statisticky významné rozdíly byly pozorovány u všech testů porovnávající genotypy

Poměr enantiomerů α -pinenu se nelišil napříč odběrovými obdobími.

Pro smrk je z hlediska obrany proti lýkožroutu nejvýhodnější co možná nejnižší hodnota poměru enantiomerů α -pinenu v podobě (-/+). Z tohoto pohledu mají největší výhodu genotypy 1, 6, 12, 13 a 30, jelikož jejich poměr enantiomerů α -pinenu byl významně nižší (v porovnání s jinými genotypy) v alespoň jednom z testů samostatných datových souborů z příslušných sezón i v souhrnné analýze.

5 Diskuze

Vzorky z roku 2019 byly rovněž analyzovány na induktabilitu těkavých volatilních látek po aplikaci methyl jasmonátu (MeJa), jako analogu rostlinného hormonu. Dle metodiky proběhl odběr kontrolního vzorku ve vzdálenosti 40 cm směrem nahoru po kmeni od místa aplikace MeJa 22 dní po inokulaci pro jarní odběr a 28 dní pro letní odběr. Zvolený postup neměl za cíl rozlišit chiralitu sloučenin a výsledky tedy ukazují pouze sumární kvantitu neseparovaných enantiomerů α -pinenu. Aplikace MeJa má, dle Zhao *et al.*, (2010) na terpenickou složku vliv kvantitativního charakteru, což bylo pozorováno v diplomové práci Římanová (2021). Vliv aplikace MeJa na relativní poměr složek je minimální (Zhao *et al.*, 2010). Vzhledem k minimálnímu vlivu MeJa na poměr enantiomerů α -pinenu je tento vliv zanedbatelný.

Poměr enantiomerů α -pinenu v různých pletivech jedinců smrku ztepilého stanovovali Borg-Karlson *et al.* (1993). Pro xylém kmene uvádějí relativní hodnoty poměru 42/59 a 43/57 (-/+). Po logaritmické transformaci to jsou hodnoty -0,323 a -0,282. Tyto hodnoty odpovídají výsledkům na nižší straně spektra pozorovaného v prezentované diplomové práci. Lze tvrdit, že hodnoty získané v jednom z prvních pokusů prováděných na danou problematiku se příliš neliší od hodnot získaných v této práci. Z článku Borg-Karlson *et al.* (1993) rovněž vyplývá, že enantiomerické složení α -pinenu se značně liší v závislosti na sledovaném pletivu. V jehlicích smrku ztepilého převažuje (-) enantiomer, proti kmenu a větvím, kde je poměr spíše vyrovnaný, což potvrzují Persson *et al.*, (1993; 1996).

Změnu složení monoterpenů smrku ztepilého v závislosti na období vegetační sezóny pozorovali Kamaitytė-Bukelskienė *et al.* (2021) na jehlicích smrku. Vyšší množství (-) enantiomeru α -pinenu nad (+) enantiomerem v jehlicích a také v emitované složce bylo pozorováno na začátku vegetačního období. Kamaityte-Bukelskiene *et al.* (2021) usuzují, že na dynamiku enantiomerického složení mají silnější vliv faktory genetické proti environmentálním. V zájmovém porostu této diplomové práce můžeme zanedbat mikrostanovištní vlivy v rámci genotypu (klonová řada), ale ne v případě ekotypu. Genotypy spadající pod jeden ekotyp se nacházely v různých částech porostu. V rámci porovnávání datových souborů nelze jednoznačně určit, jaký vliv měly podmínky vzhledem k rozdílné době odběru vzorků ve vegetační sezóně. Nicméně Kamaityte-Bukelskiene *et al.* (2021) pozorovali dynamiku na terpenickém složení na

jehlicích a na emitované složce, která je na počasí podstatně závislejší, než vlastnosti lýka (Wang *et al.*, 2017).

Vazba sledovaného znaku na genotyp (shodnost mezi klony) je potvrzena srovnatelnými články, které zkoumají složení terpenů jako celek: Silvestrini *et al.* (2004); Piva *et al.* (2019); Raber *et al.* (2021)

Silvestrini *et al.* (2004) prokázali, že na základě enantiomerického složení více monoterpenů lze spolehlivě identifikovat klony smrku ztepilého. Enantiomery α -pinenu byly zásadním znakem, v němž se klony odlišovaly.

Piva *et al.* (2019) uvádějí, že na základě normalizace relativního terpenického složení dřeviny lze vytvořit „otisk prstu“ (fingerprint). Tento „otisk prstu“ je unikátní pro danou dřevinu a stálý v čase a lze podle něj identifikovat druh dřeviny. Studie Piva *et al.* (2019) proběhla na zástupcích rodu *Protium* Brum. F., (čeleď březulovité (*Burseraceae*)). I v této čeledi je α -pinen hlavní terpen.

Raber *et al.* (2021) aplikovali podobnou teorii a postup jako Piva *et al.* (2019) na *Picea pungens* Englm., *Picea abies* (L.) Karst. a *Cedrus libani* A. Rich.. S tím rozdílem, že sledují také enantiomerické složení terpenů v „otisku prstu“. (+)- α -pinen byl více zastoupen ve smrku pichlavém, u smrku ztepilého a cedru libanonského byl více zastoupen (-)- α -pinen. Raber *et al.* (2021) prokázali, že skladba terpenů vykazuje silný vliv dědičných genetických vloh s nízkou variabilitou.

Genom Smrku ztepilého obsahuje vícečlennou skupinu genů syntáz, které regulují diverzitu a variabilitu monoterpenického profilu. Expres těchto genů není v každém jednotlivci totožná (Martin *et al.*, 2004). Výsledky prezentované diplomové práce vypovídají, že poměr enantiomerů byl napříč sezónami korelován, nicméně nebyl konstantní. V různých sezónách se statisticky významně lišily rozdílné genotypy. Tyto výkyvy je možné připsat jistému vlivu prostředí.

Chybějící vazbu sledovaného znaku na ekotyp můžeme spatřovat ve faktu, že ekotyp se vyznačuje zejména morfologickým uzpůsobením na konkrétní podmínky (Šnytr, 2009). Alternativně lze tvrdit, že ekotypy smrku v České republice reprezentují několik populací, které sdílejí určitý soubor adaptací na konkrétní podmínky (Čepl *et al.*, 2020). Geny zodpovědné za poměr enantiomerů α -pinenu byly patrně k morfologické adaptaci indiferentní, navíc hranice mezi ekotypy nejsou ostré a ekotypy se mohou

prolínat a mísit (Šnytr, 2009). V případě této práce se na tomto výsledku mohl podílet i fakt, že testované ekotypy nebyly zastoupeny rovnoměrně, obzvlášť nízkým počtem jedinců byl zastoupen vysokohorský ekotyp.

6 Závěr

Předmětem této práce bylo studium složení sekundárních metabolitů, se zaměřením na enantiomery α -pinenu a jejich vztah k odolnosti smrku ztepilého vůči lýkožroutu smrkovému. Výhodu v obraně proti lýkožroutu mají ti zástupci smrku, kteří mají větší poměr (+)- α -pinenu k (-)- α -pinenu. Ve střevě samce lýkožrouta probíhá detoxikace α -pinenu stereospecifickým způsobem. (-)- α -pinen je prekurzorem pro vznik *cis*-verbenolu, který je hlavní složkou agregačního feromonu. Při vstupu (+) enantiomeru do potravy lýkožrout produkuje *trans*-verbenol, který postrádá agregační funkci. Množství brouků útočících na strom je nižší a hostitel má více šancí na odvrácení kolonizace. V praktické části byl pomocí plynové chromatografie stanoven poměr těchto enantiomerů na klonových řadách reprezentujících tři ekotypy smrku a statisticky testována vazba znaku na genotypy a ekotypy, a stálost znaku pro jednotlivé stromy v čase.

V jehličnanech je α -pinen nejhojnější zástupce terpenů. Enantiomerický poměr α -pinenu se liší v různých skupinách jehličnanů. Společně s enantiomerickou strukturou ostatních terpenů utváří „otisk prstu“ unikátní pro úzkou skupinu dřevin. Poměr enantiomerů α -pinenu je dědičný znak vázaný na genetické vlastnosti a vliv prostředí je na jeho podobu minimální. Pro ekotypy smrku nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Mezi jednotlivými odběrovými sezónami byla pozorována silná pozitivní korelace. Sledovaný znak je stabilní v čase. Poměr enantiomerů α -pinenu vykazuje vazbu na genotypy. Na základě hodnoty znaku mohou být vylišeny určité genotypy, které by bylo vhodné zařadit do šlechtitelského programu za účelem dosažení vyšší odolnosti proti útoku lýkožrouta smrkového.

7 Seznam použitých zdrojů

Adams H. D., Germino M. J., Breshears D. D., Barron-Gafford G. A., Guardiola-Claramonte M., Zou C. B., Huxman T. E. (2013): Nonstructural leaf carbohydrate dynamics of *Pinus edulis* during drought-induced tree mortality reveal role for carbon metabolism in mortality mechanism, *New Phytologist*, 197(4):1142–1151s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/nph.12102.

Berini J. L., Brockman S. A., Hegeman A. D., Reich P. B., Muthukrishnan R., Montgomery R. A., Forester J. D. (2018) Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Frontiers in Plant Science*, 9:1257, [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.3389/fpls.2018.01257

Bínová Z., Korecký J., Dvořák J., Bílý J., Zádrapová D., Jansa V., Lstibůrek M. (2020): Genetic Structure of Norway Spruce Ecotypes Studied by SSR Markers, *Forests*, 11(1):110

Birgersson G., Schlyter F., Bergström G., Löfqvist J. (1988): Individual variation in aggregation pheromone content of the bark beetle, *Ips typographus*, *Journal of Chemical Ecology* 14: 1737-1761s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01014641>

Birgersson G., Schlyter F., Löfqvist J., Bergström G. (1984): Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases, *Journal of Chemical Ecology*, 10(7):1029-1055. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1007/BF00987511., [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.3390/f11010110>

Blanco S., López J., Maris A. (2020): Terpenoids: shape and non-covalent interactions. The rotational spectrums of *cis*-verbenol and its 1:1 water complex, *Royal society of chemistry, Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(10):5729-5734s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1039/D0CP00086H>

Bonello P., Gordon T. R., Herms D. A., Wood D. L., Erbilgin N. (2006): Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: A novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(4):95- 104s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/j.pmpp.2006.12.002

Borg-Karlson A-K., Lindström M., Norin T., Persson M., Valterová I. (1993): Enantiomeric Composition of Monoterpene Hydrocarbons in Different Tissues of Norway Spruce, *Picea abies* (L.) Karst. A Multi-dimensional Gas Chromatography Study, *Acta Chemica Scandinavica*, 47:138-144s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.3891/acta.chem.scand.47-0138

Byers J. A. (1996): An encounter rate model of bark beetle populations searching at random for susceptible host trees, *Ecological Modelling*, 91(1-3): 57–66s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(95\)00166-2](https://doi.org/10.1016/0304-3800(95)00166-2).

Byers J. A. (2000): Wind-aided dispersal of simulated bark beetles flying through forests. *Ecological Modelling* 125(2-3):231–243s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(99\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(99)00187-8)

Byers J. A., Zhang Q-H., Schlyter F., Birgersson G. (1998): Volatiles from Nonhost Birch Trees Inhibit Pheromone Response in Spruce Bark Beetles, *Naturwissenschaften*, 85(11):557-561s., [cit. 4. 4. 2023], DOI: 10.1007/s001140050551

Čepl J., Stejskal J., Korecký J., Hejtmánek J., Faltinová Z., Lstibůrek M., Gezan S. (2020): The dehydrins gene expression differs across ecotypes in Norway spruce and relates to weather fluctuations. *Scientific Reports*, 10(1):20789, 9s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76900-x>

ČGS (2022): Geovědní mapy 1 : 50 000, *Esri*, [cit. 9. 2. 2022], Dostupné z: <https://mapy.geology.cz/geocr50/>

Dickens J. C. (1981): Behavioural and electrophysiological responses of the bark beetle, *Ips typographus*, to potential pheromone components, *Physiological Entomology*, 6(3):251–261s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/j.1365-3032.1981.tb00269.x

Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. (2004): Biochemistry of plant volatiles, *Plant Physiology* 135(4):1893–1902s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1104/pp.104.049981

Dvořáková M., Valterová I., Vaněk T. (2011): Monoterpeny v rostlinách, *Chemické listy* 105: 839-845s., [cit. 3. 4. 2023], dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_839-845.pdf

Erbilgin N., Krokene P., Kvamme T., Christiansen E. (2007): A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) responses to its

agregation pheromone, *Agricultural and Forest Entomology* 9(2):135-140s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/j.1461-9563.2007.00329.x

Eyles A., Bonello P., Ganley R., Mohammed C. (2009): Induced resistance to pests and pathogens in trees, *New Phytologist*, 185(4): 893-908s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03127.x

Francesci V., Krokene P., Christiansen E., Krekling T. (2005): Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests, *New Phytologist*, 167(2):353-376s., [cit. 2. 3. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x>

Gaylord M. L., Kolb T. E., Pockman W. T., Plaut A. J., Yopez A. E., Macalady K. A., Pangle E. R., McSowell G. N. (2013): Drought predisposes pinon-juniper woodlands to insect attacks and mortality. *New Phytologist*, 198(2):567–578., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/nph.12174

Ghimire P. R., Kivimäenpää M., Blomquist M., Holopainen T., Lyytikäinen-Saarenmaa P., Holopainen K. J. (2016): Effect of bark beetle (*Ips typographus* L.) attack on bark VOC emissions of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) trees, *Athmospheric Environment*, 126:145-152s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.11.049>

Holopainen J. K., Virjamo V., Ghimire R. P., Blande J. D., Julkunen-Tiitto R., Kivimaenpaa M. (2018): Climate change effects on secondary compounds of forest trees in the Northern hemisphere. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1-10s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.3389/fpls.2018.01445

Horský J., Jindřich J. (2013): Cyklodextriny ve světě polymerů, *Chemické Listy* 107(10):769-776 s., [cit. 3. 4. 2023], dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_10_769-776.pdf

Huang J., Hammerbacher A., Weinhold A., Reichelt M., Gleixner G., Behrendt T., van Dam N., Sala A., Gershenson J., Trumbore S., Hartmann H. (2019): Eyes on the future - evidence for trade-offs between growth, storage and defense in Norway spruce, *New Phytologist* 222(1):144–158s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/nph.15522

Huang J., Kautz M., Trowbridge A., Hammerbacher A. (2020): Tree defence and bark beetles in a drying world: carbon partitioning, functioning and modelling, *New Phytologist*, 225(1):26–36s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1111/nph.16173

Janáček J. (2022): *Statistika jednoduše*, Praha: Grada publishing a. s., 120 s., ISBN: 9788027117383

Kacálek D., Mauer O., Podrázský V., Slodičák M. (2017): Meliorační a zpevňující funkce lesních dřevin: Soil improving and establishing functions of forest trees. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 300s., ISBN: 978-807458-102-1

Kamaitytė-Bukelskienė L., Ložienė L., Lobokas J. (2021): Dynamics of Isomeric and Enantiomeric Fractions of Pinene in Essential Oil of *Picea abies* Annual Needles during Growing season, *Molecules*, 26(8):2138, 16s., [cit. 4. 4. 2023], DOI: 10.3390/molecules26082138

Kännaste A., Zhao T., Lindström A., Stattin E., Långström B., Borg-Karlson A-K. (2012): Odors of Norway spruce (*Picea abies* L.) seedlings: differences due to age and chemotype, *Trees*, 27(1):149–159s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1007/s00468-012-0783-7

Klimetzek D., Francke W. (1980): Relationship between the enantiomeric composition of α -pinene in host trees and the production of verbenols in *Ips* species, *Experientia*, 30:1343-1345s. [cit. 4. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01960087>

Klouda P. (2013): *Základy biochemie*, Ostrava: tiskárna harok v Šenově, 3. vydání, ISBN: 978-80-86369-16-7

Koricheva J., Larsson S., Haukioja E., Keinänen M. (1998): Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis, *Oikos*, 83(2):212–226., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.2307/3546833

Kosíková L. (2012): *Chirální rozeznávání pomocí hmotnostní spektrometrie*, Praha, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Vedoucí práce: doc. Mgr. Jana Roithová, Ph.D.

Křístek J., Jančařík V., Mentberger J., Vicena I., Volný S. (2002): *Ochrana lesů a přírodního prostředí*, Písek: Matice lesnická spol. s r. o., 386 s., ISBN: 8086271080

Lewinsohn E., Gijzen M., Croteau R., (1991): Defense mechanisms of conifers: Differences in constitutive and wound-induced monoterpenes among species, *Plant physiologist* 96(1):44-49s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1104/pp.96.1.44.

Lindström M., Norin T., Birgersson G., Schlyter F. (1989): Variation of enantiomeric composition of α -pinene in norway spruce, *Picea abies*, and its influence on production of verbenol isomers by *Ips typographus* in the field. *Journal of chemical ecology*, 15(2): 541–548s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01014699>

Lindström M., Norin T., Roeraade J. (1990): Gas chromatographic separation of monoterpene hydrocarbon enantiomers on α -cyclodextrin, *Journal of Chromography*, 513:315-320s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89448-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89448-6)

Martin D., Faldt J., Bohlman J., (2004): Functional characterization of nine norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d Subfamily, *Plant physiology*, 135(4):1908-1927s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1104/pp.104.042028

Matoušek P. (2012): Populační dynamika lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) v různých gradačních fázích: plodnost na klasických lapácích, disertační práce, Praha, Česká zemědělská univerzita v Praze, Školitel: prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.,

Netherer S., Kandasamy D., Jirošová A., Kalinová B., Schebeck M., Schlyter F. (2021): Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. *Journal of Pest Science*, 94(3):591–614., [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01341-y>

Olenici N., Duduman M-L., Olenici V. (2007): Inhibitory effects of (-) alpha pinene high release rates on *Ips typographus* (L.) response to its aggregation pheromone, *Annals of Forest Research*, 50:203-212s. [cit. 3. 4. 2023], dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/234080698_Inhibitory_effect_of_-alpha-pinene_high_release_rates_on_Ips_typographus_L_response_to_its_aggregation_pheromone

Paine T. D., Raffa K. F., Harrington T. C. (1997): Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers, *Annual Review of Entomology* 42(1):179-206s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1146/annurev.ento.42.1.179

Persson M., Borg-Karlson A-K., Norin T. (1993): Enantiomeric composition of six chiral monoterpene hydrocarbons in different tissues of *Picea abies*, *Phytochemistry* 33(2):303-307s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/0031-9422(93)85508-O

Persson M., Sjödin K., Borg-Karlson A-K., Norin T., Ekberg I. (1996): Relative amounts and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*. *Phytochemistry*, 42(5):1289-1297s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/0031-9422(96)00119-7

Phillips A. M., Croteau B. R. (1999): Resin-based defenses in conifers, *Trends in plant science*, 4(5): 184-190s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/s1360-1385(99)01401-6

Piva L., Jardine K., Gimenez B., Perdiz R., Menezes V., Durgante F., Cobello L., Higuchi N., Chambers J. (2019): Volatile monoterpene „Fingerprints“ of resinous *Protium* tree species in the Amazon rainforest, *Phytochemistry* 160:61-70s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.01.014

Poleno Z., Vacek S., et al. (2009): Pěstování lesů III. - Praktické postupy pěstování lesů. 1 vyd. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce s.r.o., 951s. ISBN: 9788087154342.

Raber A., Peachey-Stoner R., Cessna S., Sidehurst M. (2021): Headspace GC-MS analysis of differences in intra- and interspecific Terpene profiles of *Picea pungens* Englem. And *P. abies* (L.) Karst, *Phytochemistry*, 181:13s., 112541, [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112541>

Raffa K. F. (2014): Terpenes tell different tales at different scales: Glimpses into the chemical ecology of conifer – bark beetle – microbial interactions, *Journal Chemical Ecology* 40(1): 1-20s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1007/s10886-013-0368-y

Ramakrishnan R., Hradecký J., Roy A., Kalinová B., Mendezes R. C., Synek J., Bláha J., Svatoš Aleš., Jirošová A. (2021): Metabolomics and transcriptomics of pheromone biosynthesis in an aggressive forest pest *Ips typographus*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 140:16s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103680>

Renwick J. A., Hughes P. R., Krull I. S. (1976): Selective production of *cis*- and *trans*-verbenol from (-)-and (+)- α -Pinene by a bark beetle, *Science*, 191(4223):199-201s., [cit. 3. 4. 2023], doi: 10.1126/science.1246609.

Rivas Da Silva A., Lopes P., Barros de Azevedo M., Costa D., Alviano C., Alviano D. (2012): Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers, *Molecules*, 17(6):6305-6316s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.3390/molecules17066305

Římanová K. (2021): Profilování těkavých látek u různých ekotypů smrku ztepilého (*Picea abies*, L.), Praha, Diplomová práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Excelentní tým pro mitigaci, Vedoucí práce: Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.

Salačová L., Faltusová Z., Ovesná J. (2015): Jaké mechanismy využívají rostliny pro obranu proti houbovým patogenům. *Chemické Listy*, 109(8):613–618s. [cit. 5. 3. 2023], dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/327>

Salehi B., Upadhyay S., Orhan I., Jurgan A., Jayaweera S., Dias D., Sharopov F., Taheri Y., Martins N., Baghalpour N., Cho W., Sharifi-Rad J. (2019): Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature, *Biomolecules*, 9(11):34s., 738, [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.3390/biom9110738

Seybold J. S., Huber W. P. D., Lee C. J., Graves D. A., Bohlmann J. (2006): Pine Monoterpenes and pine bark beetles: a marriage of convenience for defense and chemical communication, *Phytochemistry Reviews*, 5(1):143-178s., [cit. 3. 4. 2023], DOI:10.1007/s11101-006-9002-8

Schiebe CH. (2012): Attraction and Resistance in the *Picea abies* – *Ips typographus* system, Doctoral Thesis, Swedis University of Agricultural Sciences, Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, Department of Plant Protection Biology

Schlyter F., Birgersson G., Byers J. A., Löfquist J., Bergström G. (1987): Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates, *Journal of Chemical Ecology*, 13(4):701-716s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1007/BF01020153

Schlyter F., Birgersson G., Leufvén A. (1989): Inhibition of attraction to aggregation pheromone by verbenone and ipsenol Density regulation mechanisms in bark beetle *Ips typographus*, *Journal of Chemical Ecology* 15(8):2263-2277s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1007/BF01014114

Silvestrini E., Michelozzi M., Skroppa T., Brancaleoni E., Ciccioli P. (2004): Characterisation of different clones of *Picea abies* (L.) Karst using head-space sampling of cortical tissues combined with enantioselective capillary gas chromatography for the separation of chiral and non-chiral monoterpenes, *Journal of Chromatography A*, 1034(1-2):183-189s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/j.chroma.2004.02.001.

Skuhrový, V., (2002): *Lýkožrout smrkový a jeho kalamity (Ips typographus L.) (Der Buchdrucker und ihre seine Kalamitäten)*, Praha: Agrospoj, 196s., ISBN: 80-7084-238-5

Šnytr O. (2009): Vyhodnocení genových zdrojů lesních dřevin na území CHKO Jizerské hory. Loučná nad Nisou, Disertační práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, 115 s.

Taiz L., Zeiger E. (2002): *Plant physiology*, Sunderland: Sinauer Associates, 3. vydání, 690s. ISBN: 08-7893-823-0

Trumbore S, Brando P., Hartmann H. (2015): Forest health and globe change, *Science*, 349(6250):814-818s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1126/science.aac6759

Wang M., Schurgers G., Arneth A., Ekberg A., Holst T. (2017): Seasonal variation in biogenic volatile organic compound (BVOC) emissions from Norway spruce in a Swedish boreal forest, *Boreal environment research*, 22:353-367s., [cit. 3. 4. 2023], Dostupné z: <https://core.ac.uk/download/pdf/269302962.pdf>

Wang Y., Luo W., Rosenstiel T., Pankow F. J. (2022): Measurement of enantiomer percentages for five monoterpenes from six conifer species by cartridge-tube-based passive samplin adsorption-thermal desorption (ps-ATD), *Atmospheric Measurement Techniques* 15(15):4651-4661s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.5194/amt-15-4651-2022>

Wermelinger B. (2004): Ecology a management of the spruce bark beetle *Ips typographus* – a review of recent research, *Forest Ecology and Management*, 202(1-3): 67-82s., ISSN: 0378-1127, [cit. 3. 4. 2023], DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.07.018>.

Wood D. L. (1982): The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles, *Annual Review of Entomology* 27(1):411- 446s. [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1146/annurev.en.27.010182.002211

Zahradník P., Knížek M., (2010): Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.) lesní ochranná služba, Lesnická práce 12/2010 [cit. 3. 4. 2023] dostupné z: <https://docplayer.cz/15275897-Lykozrout-smrkovy-ips-typographus-l.html>

Zaman R. (2019): Toxicity of Norway spruce (*Picea abies*) defense compounds to the spruce bark beetle (*Ips typographus*), Master thesis, Frierich-Schiller-University Jena (Germany), Faculty of Biological Sciences, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Department ov Biochemistry

Zhao T. (2011) Conifer Chemical defence: Regulation of Bark Beetle Colonization and Pheromone Emission. Doctoral Thesis; KTH Chemical science and Engeneering, Stockholm ISBN 9789174158847, [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.13140/2.1.2254.1607

Zhao T., Krokene P., Bjorklund N., Langstrom B., Solheim H., Christiansen E., Borg-Karlson A-K. (2010): The influence of *Ceratocystis polonica* inoculation and methyl jasmonate application on terpene chemistry of Norway spruce, *Picea abies*, *Phytochemistry*, 71(11-12):1332-1341s., [cit. 3. 4. 2023], DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.05.017

Zumr V., (1995): Lýkožrout smrkový – biologie prevence a metody boje, Písek: Matice lesnická, 1. vydání, 131s., ISBN: 80-900043-2-6

8 Seznam obrázků

Obrázek 1 Základní složky sekundární pryskyřice (Phillips, Croteau, 1999). ...	18
Obrázek 2 Schématické znázornění vzniku sekundárních metabolitů v závislosti na primárním metabolismu (Taiz, Zeigler, 2002).....	19
Obrázek 3 Strukturní vzorec izoprenové jednotky (Taiz, Zeigler, 2002)	20
Obrázek 4 Syntéza terpenů. (Taiz, Zeigler, 2002)	22
Obrázek 5 Strukturní chemické vzorce obou enantiomerů α -pinenu a β -pinenu (Salehi et al., 2019).....	24
Obrázek 6 Transformace monoterpenů na feromony. (Phillips, Croteau, 1999).	26
Obrázek 7 Strategie vyhledávání stromu Lýkožrouta smrkového (Netherer et al., 2021).....	30
Obrázek 8 Strukturní chemické vzorce čtyř stereoisomerů verbenolu (Blanco et al., 2020)	31
Obrázek 9 Schematické znázornění syntézy cis-verbenolu (Ramakrishnan et al., 2021)	32
Obrázek 10 Schématické znázornění stereospecifické hydroxylace (-)/(+) enantiomerů α -pinenu (Renwick et al., 1976)	33
Obrázek 11 Histogram poměru enantiomerů α -pinenu rok 2021	44
Obrázek 12 Histogram přirozeného logaritmu poměru enantiomerů α -pinenu rok 2021	44
Obrázek 13 Histogram Poměru enantiomerů α -pinenu jaro 2019	45
Obrázek 14 Histogram přirozeného logratimu poměru enantiomerů α -pinenu jaro 2019	45
Obrázek 15 Histogram poměru enantiomerů α -pinenu léto 2019.....	46
Obrázek 16 Histogram přirozeného logaritmu poměru enantiomerů α -pinenu léto 2019	46
Obrázek 17 Předpis a výstup testu ANOVA pro ekotypy rok 2021	48
Obrázek 18 Předpis a výstup Tukey HSD testu ekotypy rok 2021.....	49
Obrázek 19 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypech rok 2021	50
Obrázek 20 Předpis a výstup testu ANOVA pro genotypy rok 2021	50
Obrázek 21 Výstup Tukey HSD testu pro genotypu rok 2021	51

Obrázek 22 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na genotypech 2021	52
Obrázek 23 Předpis a výstup testu ANOVA pro ekotypy jaro 2019	53
Obrázek 24 Předpis a výstup Tukey HSD testu pro ekotypy jaro 2019	53
Obrázek 25 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypech jaro 2019	54
Obrázek 26 Předpis a výstup testu ANOVA pro genotypy jaro 2019	54
Obrázek 27 Výstup Tukey HSD testu pro genotypu jaro 2019	55
Obrázek 28 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na genotypech jaro 2019	56
Obrázek 29 Předpis a výstup testu ANOVA pro ekotypy léto 2019	57
Obrázek 30 Předpis a výstup Tukey HSD testu pro genotypy léto 2019.....	57
Obrázek 31 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na ekotypech jaro 2019	58
Obrázek 32 Předpis a výstup testu ANOVA pro genotypy léto 2019	58
Obrázek 33 Výstup Tukey HSD testu pro genotypu léto 2019.....	59
Obrázek 34 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v závislosti na genotypech léto 2019	60
Obrázek 35 Předpis a výstup korelačního testu s výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu porovnávající poměr enantiomerů α -pinenu mezi jarem a létem roku 2019	63
Obrázek 36 Předpis a výstup korelačního testu s výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu porovnávající poměr enantiomerů α -pinenu mezi jarem roku 2019 a rokem 2021	63
Obrázek 37 Předpis a výstup korelačního testu s výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu porovnávající poměr enantiomerů α -pinenu mezi létem roku 2019 a rokem 2021	63
Obrázek 38 Předpis a výstup lineárního smíšeného modelu pro ekotypy na souhrnných datech	64
Obrázek 39 Předpis a výstup párového testu metodou nejmenších čtverců na souhrnných datech.	65
Obrázek 40 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v čase podle ekotypů.	66
Obrázek 41 Předpis a výstup lineárního smíšeného modelu pro genotypy na souhrnných datech	67

Obrázek 42 Předpis a výstup párového testu metodou nejmenších čtverců pro genotypy na souhrnných datech.....	68
Obrázek 43 Boxplot poměru enantiomerů α -pinenu v čase podle genotypů.	71

9 Seznam tabulek

Tabulka 1 Nastavení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem	41
Tabulka 2 Počet pozorování v souvislosti s příslušností ke genotypům a ekotypům 2021	42
Tabulka 3 Počet pozorování v souvislosti s příslušností ke genotypům a ekotypům jaro 2019	42
Tabulka 4 Počet pozorování v souvislosti s příslušností ke genotypům a ekotypům léto 2019	42
Tabulka 5 Příslušnost genotypů k ekotypům a vyznačení v grafech	42
Tabulka 6 Vlastnosti souhrnného datového souboru pro všechna odběrová období dohromady	61
Tabulka 7 Přehled výsledků párových testů metodou nejmenších čtverců.	69

10 Přílohy



Příloha 1 Snímek provenienční plochy "Cukrák" z dronu, orientace k severu (Excelentní tým pro mitigaci)

129/63	216 217	C1/65	221 222	R 38/65	226/65 227/65	S - Horský/65	231 (214)	219/65	112/218/65	220/65 221/65	I. 10/66	230/66	240/66
127/64	208 209 210 211 212	C8/65	204 205 206 207	C 5/65	199/65 200/65	S - Horský/65	205 (144) 206 207 (145) 208 (145)	232/65	R 7/65	190/65 191/65 192/65 193/65 194/65	I. 11/66	231/66	176/66 177/66 178/66 179/66 180/66
125/64 13	183 (171) 184 (172) 185 (173) 186 (174)	14/65 12	187 (82) 188 (83) 189 (84) 190 (85)	C 13/65	155/65 156/65 157/65 158/65	S - Horský/65	155 (120) 156 (121) 157 (122) 158 (123)	234/65	R 5/65	158/65 159/65 160/65 161/65	I. 12/66	232/66	172/66 173/66 174/66 175/66
126/64 13	190 (184) 191 (185) 192 (186) 193 (187)	18/65 12	191 (187) 192 (188) 193 (189) 194 (190)	C 19/65	192/65 193/65 194/65	S - Horský/65	192 (134) 193 (135) 194 (136) 195 (137)	235/65	R 7/65	117/65 118/65 119/65 120/65 121/65	I. 14/66	234/66 12 14	118 (124) 119 (125) 120 (126) 121 (127)
110/64 1130	71 (68) 72 (69)	C24/65 12	73 (67 - 70) 74 (67 - 81) 75 (68) 76 (69) 77 (70)	C 24/65	76/65 79/65 80/65 81/65 82/65	S - Horský/65	73 (131) 74 (132) 75 (133) 76 (134) 77 (135) 78 (136)	237/65	R 8/65	87/65 88/65 89/65 90/65 91/65 92/65	I. 15/66	3,56	400 (101) 401 (102) 402 (103) 403 (104) 404 (105) 405 (106)
230/64 1130	68 69 70	112/65 12	65 (2 - 24) 66 (25) 67 (26) 68 (27)	C 15/65	60/65 61/65 62/65 63/65 64/65	S - Horský/65	55 (104) 56 (105) 57 (106) 58 (107) 59 (108)	238/65	R 9/65	51/65 52/65 53/65 54/65	I. 17/66	238/66	35/66 36/66 37/66 38/66 39/66 40/66
1/64	1 2 3	113/65 12	41 (5) 42 (6) 43 (7 - 14)	C 23/65	37/65 38/65 39/65 40/65 41/65	S - Horský/65	32 (91) 33 (92) 34 (93) 35 (94) 36 (95)	239/65	R 10/65	17/65 18/65 19/65 20/65 21/65	I. 19/66	D6/19/65	31 (110) 32 (111) 33 (112) 34 (113)

Příloha 3 Spodní část schématického plánu provenienční plochy "Cukrák" žlutou barvou jsou vyznačeny stromy, u kterých proběhl odběr, barevné označení odpovídá ekotypům (červená - chlumní, zelená - horský, modrá - vysokohorský)