

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Změny v produkci vybraných metabolitů u zelí v závislosti na napadení motýly z čeledi běláskovitých

Diplomová práce

Autor: Bc. Barbora Konečná
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jiří Tůma, Ph.D.
Odborný konzultant: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.



Zadání diplomové práce

Autor: Bc. Barbora Konečná

Studium: S18BI008NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název diplomové práce: **Změny v produkci vybraných metabolitů u zelí v závislosti na napadení motýly z čeledi běláskovitých**

Název diplomové práce: Changes in the production of selected metabolites in cabbage depending on the attack of butterflies from the Pieris sp.

AJ:

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Běláskovití (*Pieris* sp.), především bělásek zelný, řepový aj. se vyskytují pravidelně každý rok a způsobují značné škody na bílém zelí a kvěťáku. Při napadení rostlin dochází ke změnám jak v primárním, tak sekundárním metabolismu rostlin ve prospěch syntézy obranných a ochranných látek. Význam řešení této problematiky je značný jednak v tom, že napomáhá vyvíjet nové insekticidy založené na přírodní bázi a na druhé straně se může podílet na omezování použití chemických přípravků v ochraně rostlin.

Cílem práce je zjistit jak se mění produkce vybraných metabolitů. Důležitých signálních látek (rostlinných hormonů, např. JA a SA, ACC) a látek souvisejících s oxidačním stresem (superoxid, peroxid vodíku), antioxidantů a dalších látek ochranného charakteru (fenolické látky), celkový obsah proteinů. Předmětem výzkumu bude studium reakce rostlin na naklazení vajíček, začátek líhnutí housenek a požer dospělých housenek běláška. Využity budou různé laboratorní metody (HPLC, fotometrické metody, ELISA, TLC, cytometrické) a další metody molekulární biologie. Výzkum bude probíhat ve spolupráci s vybranými pracovišti v ČR (Ústav experimentální botaniky AV ČR).

Anu, S. et al.: Health Benefits of Polyphenolic Compounds. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018, 5: 11563-11568. DOI: 10.5281/zenodo.1479242

Agerbirk, N. et al.: Complex metabolism of aromatic glucosinolates in *Pieris rapae* caterpillars involving nitrile formation, hydroxylation, demethylation, sulfation, and host plant dependent carboxylic acid formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2010, 40: 126-137. DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.01.003

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Bc. Barbora Konečná

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému vedoucímu práce Doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za ochotu, cenné rady a připomínky. Své odborné konzultantce RNDr. Zuzaně Kovalíkové Ph.D. za odbornou pomoc při praktickém zpracování práce. Poděkování patří také RNDr. Radomíře Vankové, CSc. a Ing. Petre I. Dobrevovi, CSc. z Ústavu experimentální botaniky AV ČR za stanovení rostlinných hormonů. Dále RNDr. Pavlu Pechovi, Ph.D. za pomoc při odchytu škůdců. Děkuji také svým spolužákům Janu Lněničkovi a Janu Chlupáčovi za pomoc v laboratoři. Poděkování patří také mé rodině za její podporu.

Anotace

KONEČNÁ, B. 2020: *Změny v produkci vybraných metabolitů u zelí v závislosti na napadení motýly z čeledi běláskovitých*. Hradec Králové. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Tůma Jiří, doc. Ing. CSc. 65 s.

Diplomová práce se zabývá tématem změn v produkci vybraných ochranných, obranných a signálních látek u zelí v závislosti na napadení motýly z čeledi běláskovitých. Sledované změny v produkci metabolitů se týkají změn na úrovni jak primárního, tak sekundárního metabolismu. V teoretické části jsou uvedeny základní charakteristiky zkoumané rostlinné čeledi a škůdců z čeledi běláskovitých (*Pieris sp.*). Jsou zde popsány stresové reakce rostlin, obranné a ochranné mechanismy a základní metabolické procesy. Stanovení obsahu vybraných metabolitů bylo provedeno pomocí metod, jako je spektrofotometrie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V rámci experimentální části bylo zjištěno, že produkce ROS byla signifikantně vyšší u rostlin napadených přímým okusem housenek bělásků než u rostlin s nakladenými hmyzími vajíčky. Dále také, že rostliny napadené motýly z čeledi běláskovitých vyprodukovaly oproti rostlinám, které nebyly vystaveny biotickému stresu, signifikantně vyšší obsah celkových rozpustných proteinů. Obsah kyseliny jasmonové, salicylové a abscisové se signifikantně zvýšil vždy při poškození pletiv housenkami, ať už dospělými či čerstvě vylíhnutými.

Klíčová slova

Brassicaceae, *Pieris sp.*, fenolické látky, primární metabolity, fytohormony, herbivorie

Annotation

KONEČNÁ, B. 2020: *Changes in the production of selected metabolites in cabbage depending on the attack of butterflies from the Pieris sp.* Hradec Králové. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Diploma Thesis supervisor Tůma Jiří, Assoc. Prof. Ing. Ph.D. 65 pp.

The diploma thesis deals with the topic of changes in the production of selected protective, defensive and signaling substances in cabbage, depending on the infestation by butterflies from the family *Pieridae*. Plant stress reactions, defense and protective mechanisms and basic metabolic processes are described here. The content of selected metabolites was determined by using methods such as spectrophotometry or high performance liquid chromatography. The experimental part deals with changes in the production of primary and secondary metabolites in cabbage plants after the infestation by *Pieris* sp. It was found that ROS production was significantly higher in plants infested with direct damage by caterpillars than in plants with laid insect eggs. Furthermore, plants infested with butterflies from the *Pieridae* family produced significantly higher levels of total soluble proteins than plants that were not exposed to biotic stress. The content of jasmonic, salicylic and abscisic acids increased significantly when the plant tissues were damaged by caterpillars, whether adults or freshly hatched.

Keywords

Brassicaceae, *Pieris* sp., phenolic compounds, primary metabolites, phytohormones, herbivory,

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární řešerše	11
2.1	Rostliny z čeledi <i>Brassicaceae</i>	11
2.2	Hlavní hmyzí škůdci brukvovitých rostlin.....	11
2.2.1	Běláskovití (<i>Pieridae</i>).....	13
2.3	Fytofágní hmyz.....	16
2.4	Obranné mechanismy rostlin.....	16
2.4.1	Konstitutivní obrana	18
2.4.2	Indukovaná obrana	18
2.5	Rostlinný stres.....	19
2.5.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS- Reactive Oxygen Species).....	20
2.5.2	Reakce rostliny při napadení hmyzím herbivorem.....	21
2.5.3	Reakce rostliny na naklazení hmyzích vajíček.....	22
2.5.4	Varovná signalizace pomocí VOCs.....	23
2.1	Primární metabolismus	24
2.1.1	Obranné proteiny rostlin	24
2.2	Sekundární metabolismus.....	25
2.3	Rostlinné hormony.....	25
2.4	Glukosinoláty	26
2.5	Polyfenoly	28
2.5.1	Flavonoidy.....	28
2.5.2	Fenolové kyseliny	29
3	Metodika.....	30
3.1	Rostliny použité pro experiment.....	30
3.2	Odchyt bělásků na lokalitě.....	30
3.3	Analýza vzorků.....	34
3.3.1	Příprava vzorků pro analýzu.....	34
3.4	Statistické zpracování	36
3.4.1	Jednorozměrná analýza rozptylu (Anova) a Tukeyho test.....	36
4	Výsledky.....	37
4.1	Obsah peroxidu vodíku	37
4.2	Obsah superoxidového radikálu.....	38
4.3	Obsah celkových rozpustných fenolů.....	39

4.4	Obsah celkových flavonoidů	40
4.5	Obsah fenolových kyselin.....	41
4.6	Obsah kvercetinu a kemferolu.....	42
4.7	Obsah kvercetinu a kemferolu po kyselé hydrolýze	43
4.8	Obsah celkových rozpustných proteinů.....	44
4.9	Obsah kyseliny abscisové (ABA), (DPA, ABA-GE)	45
4.10	Obsah kyseliny salicylové (SA) a kyseliny benzoové (BzA)	46
4.11	Obsah jasmonátů (JA a JA-ileu)	47
5	Diskuze	48
5.1	Změny v hodnotách ROS.....	48
5.2	Změny v hodnotách fenolických látek a flavonoidů	49
5.3	Změny v hodnotách celkových rozpustných proteinů	49
5.4	Změny v hodnotách fytohormonů	50
6	Závěr	52
	Seznam obrázků.....	53
	Seznam použité literatury.....	54
	Přílohy.....	62

1 Úvod

Tato práce se zabývá problematikou nekonečného evolučního souboje mezi rostlinami a fytofágním hmyzem tzv. Efekt červené královny. Tento ozbrojený závod o přežití dobře ilustruje věta z knihy, *Jak se dělá evoluce. Na počátku byla jemná křehká bylinka, kterou občas někdo sežral; na konci je trnitá a jedovatá obluda, kterou také občas někdo sežere* (Zrzavý et al., 2004). Touto tematikou jsem se zabývala již ve své bakalářské práci a zaujala mne natolik, že jsem se rozhodla jí prostudovat hlouběji i ve své diplomové práci.

Rostliny jsou napříč evolucí nuceny odolávat různým nepříznivým vlivům, aby přežily. Jejich omezení z hlediska pohybu a tedy možnosti úniku musejí kompenzovat širokou škálou nejrůznějších obranných a ochranných mechanismů. Tyto nepříznivé vlivy neboli stresory mohou být buď abiotického či biotického charakteru. Fürstenberg-Hägg et al. (2013) dokládá, že je rostlina schopna rozeznat, zda je původcem stresu herbivor nebo je poškozována mechanickým způsobem např. kroupy, vítr. Rostliny dokonce dokáží detekovat nakladená vajíčka na svém povrchu. Díky této schopnosti předcházejí plýtvání energeticky nákladnými zdroji na obranu. Působení biotického stresu se u rostlin projevuje změnami na úrovni jak primárního, tak sekundárního metabolismu. Rostliny se mohou bránit působení škůdců různými morfologickými, biochemickými či molekulárními mechanismy. Škála biochemických mechanismů obrany je široká a různorodá a je zprostředkována formou přímé i nepřímé obrany. Některé obranné látky jsou v rostlinách konstitutivně přítomny, jiné jsou indukovány poškozením rostlinných pletiv. Nejčastěji se jedná o sekundární metabolity a proteiny, které mohou mít repelentní či toxické účinky na hmyz nebo mají charakter signálních látek (War et al., 2012).

Zelí se řadí do čeledi brukvovitých rostlin. Jde o ekonomicky a nutričně významnou košťálovou zeleninu pěstovanou ve více než 90 zemích a konzumovanou po celém světě. Produkci této klíčové zemědělské plodiny snižuje řada biotických a abiotických faktorů. Hlubší porozumění mezidruhovým vztahům mezi rostlinou a fytofágním hmyzem přináší možnost předcházet významným ekonomickým ztrátám v produkci polních plodin. S cílem využít vědeckého poznání k vývoji ekologických či přírodě blízkých způsobů ochrany plodin. Omezování chemických přípravků a insekticidů je stěžejní v zájmu zachování lidského zdraví a ochrany přírody.

Cílem této diplomové práce bylo prostudovat dostupnou soudobou literaturu týkající se změn v produkci látek na úrovni primárního a sekundárního metabolismu rostlin jako odpověď na napadení herbivory, především motýly z čeledi běláskovitých (*Pieris sp.*). Předmětem výzkumu bylo zjišťování změn v produkci signálních látek (rostlinných hormonů, např. JA a SA, ABA) a látek souvisejících s oxidačním stresem (superoxid, peroxid vodíku), antioxidantů a dalších látek ochranného charakteru (fenolické látky), celkový obsah proteinů. Metabolické změny byly zkoumány na rostlinách po nakladení vajíček, na začátku líhnutí

housenek a při požeru dospělých housenek běláška. Pokusnou rostlinou bylo v našem případě zelí bílé hlávkové (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) f. *alba*). Výsledky byly analyzovány různými laboratorními metodami jako je HPLC, fotometrické metody, ELISA, TLC.

Výzkum proběhl ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR a katedrou chemie Přf UHK.

2 Literární rešerše

2.1 Rostliny z čeledi *Brassicaceae*

Čeď brukvovitých rostlin nebo také alternativně rostlin křížatých je složena z 380 rodů a přibližně 3 200 druhů. V České republice roste přes 50 rodů brukvovitých rostlin s více jak 150 druhy. Tato čeď zahrnuje jednoleté až vytrvalé byliny. Jsou to rostliny s oboupohlavnými, pravidelnými květy se 4 kališními a 4 korunními lístky, nejčastěji bývají bílé, žluté či růžové až fialové barvy. Součástí květu jsou 2 tyčinky s kratšími nitkami ve vnějším kruhu a 4 tyčinkami s delšími nitkami ve vnitřním kruhu (tzv. čtyřmocné tyčinky) a jeden dvoupodolistový pestík s nepravou placentární přehrádkou. Květy bývají uspořádány do květenství, nejčastěji to je hrozen případně chocholík nebo lata. Plody jsou zpravidla suché a pukavé (šešule, šešulka), výjimečně je plodem nažka, dvounažka či struk. Tato čeď zahrnuje množství rostlin značného ekonomického významu díky jejich nutričním a bioindustriálním vlastnostem (Rosypal et al. 2003; Petruzzello et al., 2016; Kocián, 2018).

Brukev zelná (*Brassica oleracea*) je dvouletá bylina, původem ze Středozeří, která se pěstuje v několika varietách, mezi které řadíme např. zelí (var. *capitata*), květák (var. *botrytis*), růžičkovou kapustu (var. *gemmifera*), kedluben (var. *gongylodes*) (Rosypal et al. 2003). Brukvovité rostliny mají široké zastoupení v lidské stravě, pěstují se také pro svá olejnatá semena např. brukev řepka olejka. Využívají se také jako krmivo pro hospodářská zvířata, jako plodiny pro účely biokontroly a uplatňují se v rotačním systému zemědělství. Rovněž se jedná o důležité medonosné rostliny (Ahuja, 2010; Kocián, 2018). Řada druhů má také okrasný význam např. *Aubrietia deltoidea*, *Iberis sempervirens*, *Hesperis matronalis* a *Lunaria annua*. Brukvovité rostliny zaujímají rozmanitá stanoviště. Nachází se v lesních, lučních, vodních, mokřadních, horských, stepních i pouštních biotopech. Mezi brukvovité se řadí i mnoho plevelných a ruderalních druhů např. *Thlaspi arvense*, *Sisymbrium officinale*, *Capsella bursa-pastoris*. První rostlinou s kompletně nasekvenovaným genomem se stala rostlina právě z této čeledi – *Arabidopsis thaliana* (Grulich, 2012).

Z obsahových látek jsou pro brukvovité rostliny typické glukosinoláty. Konkrétně molekula glukorafaninu je pomocí enzymu myrozinázy štěpena na sulforafan, což je sloučenina s antikarcinogenními vlastnostmi. Dále je charakteristická přítomnost kyseliny askorbové (vitamin C), fenolických látek a karotenoidů. Pravidelná konzumace některých plodin z této čeledi významně prospívá lidskému zdraví. Vysoký obsah antioxidantů v těchto rostlinách napomáhá snižování rizika chronických onemocnění, zejména kardiovaskulárních onemocnění a několika typů rakoviny (Raiola, 2017).

2.2 Hlavní hmyzí škůdci brukvovitých rostlin

Hmyzí škůdci představují obrovskou výzvu v celosvětové produkci brukvovitých rostlin. Jsou napadány širokou škálou hmyzích druhů, někteří z nich jsou specialisté

a preferují brukvovité jako své hostitelské rostliny (Ahuja, 2010). Hmyz je nejpočetnější a nejzávažnější skupinou živočišných škůdců rostlin. Tělo hmyzu se skládá z hlavy, hrudi s třemi páry nohou, popřípadě s křídly, a zadečku. Ústní ústrojí může být bodavé, kousavé, savé, bodavě savé a lízavě savé. Hmyz s proměnou dokonalou klade vajíčka, ze kterých se líhnou larvy, které mají několik růstových fází (instarů) a nepodobají se dospělcům. Následně se larvy kuklí a z kukly se líhne dospělec (imago). U hmyzu s proměnou nedokonalou mají larvy také několik instarů. Imagům se nepodobají a chybí u nich stádium kukly (Rod, 2017).

Hemiptera (polokřídli)

Mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*) je vektorem 17 druhů rostlinných virů. Výskyt byl prokázán u řady rostlinných druhů, z brukvovitých je to např. kapusta, zelí, květák, řepka aj. Největší škody způsobují mšice sáním na květenstvích a šešulích. Což vede k tržnímu znehodnocení rostlin a nižším výnosům ze semen (Fryč, 2019). Mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) je nejspíše největším přenašečem rostlinných virů. Přenáší jich přes 180 druhů. Při extrémním napadení podobně jako ostatní mšice sáním na různých rostlinných tkáních, způsobuje zesvětlování, svinování a další deformace listů a zpomaluje růst rostlin (Ahuja et al., 2010; Fryč, 2019)

Hymenoptera (blanokřídli)

Pilatka řepková (*Athalia rosae* L.) je blanokřídly škůdce brukvovitých rostlin. Housenice tohoto druhu poškozují žírem listy a lodyhy rostlin. Při přemnožení dochází až k holožírům. Podobným způsobem jako housenice pilatek poškozují listy brukvovitých také první instary housenek osenic a plži. První generace housenic škodí zejména na brukvovité zelenině, jarní řepce a hořčici a 3. generace škodí při zakládání porostů ozimé řepky. Poškození listů se projevuje okénkováním či bočním žírem. Dospělci rostlinu nijak nepoškozují (Kazda et al., 2008; Kocourek et al., 2017).

Diptera (dvoukřídli)

Bejломorka kapustová (*Dasineura brassicae*) je dvoukřídly hmyz z čeledi bejломorkovitých. Škůdcem jsou larvy, které poškozují stěny šešulí řepky. Enzymaticky je rozpouštějí a následně vysávají jejich obsah. Šešule se deformuje a rozpadá a semena vypadávají. Tím každoročně snižují výnosy až o 30% (Kocourek et al., 2018). Květilka zelná (*Delia floralis*) je škůdcem brukvovitých rostlin rodu Brassica, jako je brokolice, růžičková kapusta, zelí aj. Larvy tohoto hmyzu poškozují kořeny rostlin, což vede ke snížení meziročních výnosů, produkce květů i semen a také listové biomasy (Ahuja et al., 2010)

Coleoptera (brouci)

Dřepčící rodu (*Phyllotreta*) patří mezi mandelinkovité brouky. Hlavními škůdci na polích jsou zejména dřepčík černonohý, dřepčík černý, dřepčík zelný a dřepčík polní. Škodí na polích s brukvovitou zeleninou, na řepce a hořčici. Vyskytují se hojně a každoročně způsobují značné ekonomické ztráty. Škody způsobují především dospělci, kteří vyžírají drobné otvory v listech. Ohroženy jsou především mladé

rostliny, které mohou dřepčící zcela zahubit. Kromě poškození listů mohou dřepčící přenášet i některé choroby brukvovitých (Kovaříková et al., 2017). Blýskáček řepkový (*Meligethes aeneus*) je v současnosti hlavním škůdcem ozimé řepky. Brouci pravidelně škodí na různých brukvovitých rostlinách. Mladí jedinci povrchově ožírají listy a poupata ještě před vykvetením. Se stoupající teplotou se množství brouků a škody na plodinách zvyšují. Malá poupata většinou zcela zničí a do větších vykusují díry a živí se vnitřkem. Poškozená poupata žloutnou, usychají a nakonec opadávají. Důsledkem je nepravidelné nasazení květů i šešulí. Škodlivost blýskáčků řepkových je omezena rozvinutím květů. Dále se brouci živí pouze nektarem a pylem (Kazda, 2012). Krytonosec řepkový (*Ceutorhynchus napi*) a krytonosec čtyřzubý (*Ceutorhynchus quadridens*) jsou významnými škůdci řepky v Evropě. Označují se termínem „stonkoví krytonosci“, protože jejich larvy poškozují vnitřek stonků řepky. Rostliny jsou tak celkově oslabovány a je narušen přívod živin do šešulí (Kocourek et al., 2018).

Lepidoptera (motýli)

Zápředníček polní (*Plutella xylostella* L.) je drobný motýl s kosmopolitním rozšířením. První vývojový stupeň housenek minuje v listech, další instar z min vylézá a živí se především na spodní straně listů, ve kterých vytváří svým žírem tzv. okénka. Vrchní strana listů zůstává neporušena. Housenky vyšších vývojových stupňů se živí celými listy. Mohou způsobovat holožíry, kdy z listu zbydou pouze silnější žebra (skeletování). Největší škody způsobují housenky 2. a 3. generace, protože jsou nejpočetnější (Kocourek et al., 2017, Kovaříková et al., 2017). Můra zelná (*Mamestra brassicae* L.) je významný škůdce brukvovitých rostlin. Housenky zejména 2. generace vyžírají v listech nepravidelné otvory. Listy skeletují, až z nich zůstanou pouze silnější žebra. Likvidují i vnitřky hlávek či růžic rostlin a znečišťují je trusem. Přes den se ukrývají v půdě a pod zbytky rostlin. Aktivní jsou především v noci, kdy dochází k žíru (Pokluda, 2007). Kovolessklec cizokrajný (*Trichoplusia ni*) je závažným škůdcem celé řady brukvovitých rostlin, zejména zelí. Mladé housenky se živí na spodní straně listů. Jejich žír zanechává v listech otvory a starší housenky vyžírají do listů otvory ještě větší. Pokud je poškozen vzrostný vrchol, rostlina odumírá nebo se poškození projeví větvením stonku. Dále bývají poškozeny hlávky a středové růžice, které jsou ještě znečištěny trusem. Pokud nejsou plodiny kontrolovány, zůstávají housenky při sklizni uvnitř hlávek (Gerson et Applebaum, 2020).

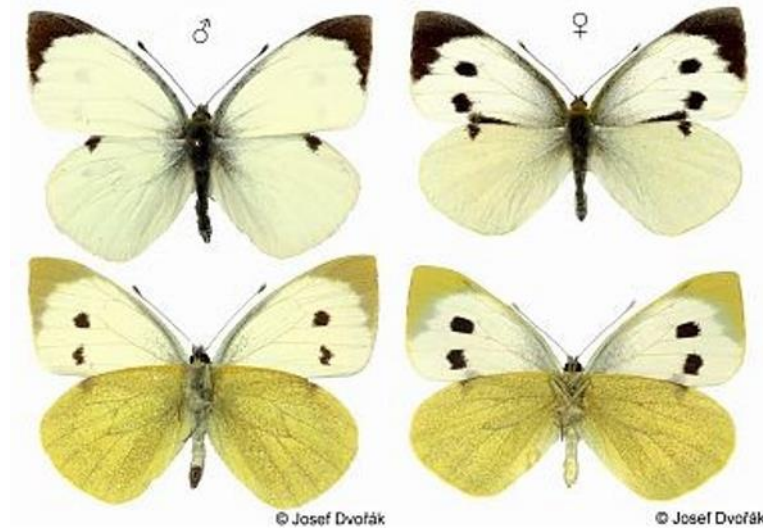
2.2.1 Běláskovití (*Pieridae*)

Motýli z čeledi běláskovitých jsou specializováni na brukvovité rostliny, které produkují glukosinoláty, což jsou chemické obranné látky proti herbivorům. Naproti tomu, housenky běláskovitých mají ve střevech proteiny (NSPs), které přeměňují toxické isothiokyanáty na netoxické nitrily (Okamura et al., 2019).

Bělásek zelný (*Pieris brassicae*)

Areál rozšíření Běláska zelného (Obrázek č. 1) je západopalearktický. Vyskytuje se v celé Evropě včetně Skandinávie až po Himaláje. Byl zavlečen do Chile. V České

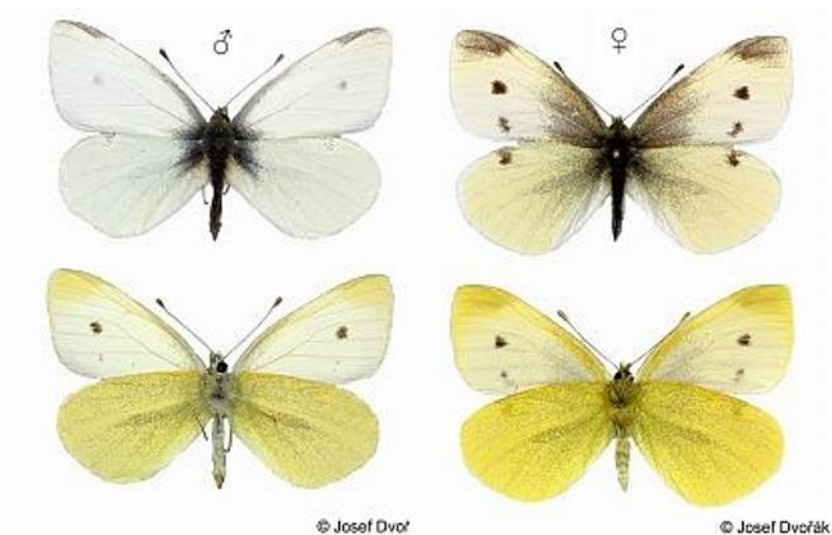
republice je hojně rozšířen. Jde o významného škůdce brukvovitých rostlin na polích i zahradách. Přizpůsobil se intenzivně obhospodařované krajině a životu v agrocenózách. Živnou rostlinou housenek jsou různé druhy brukvovitých rostlin, ať už pěstované, nebo volně rostoucí zvláště brukev zelná (*Brassica oleracea*), ale také lichořeřišnice (*Tropaeolum majus*). Vývoj těchto motýlů je dvougenerační (duben – červen, červen – listopad). Vajíčka jsou kladena ve shlucích a jejich kukly přezimují (Beneš et al., 2002).



Obrázek č. 1: Bělásek zelný - samec a samice (Dvořák, 2020).

Bělásek řepový (*Pieris rapae*)

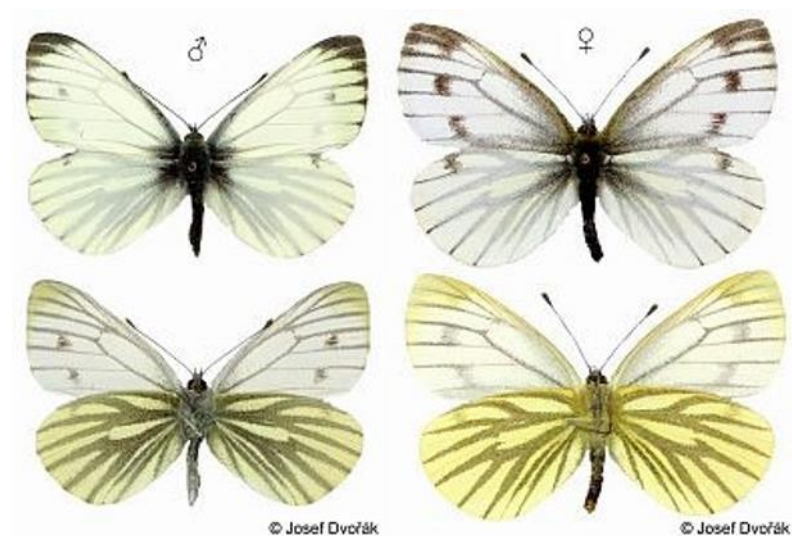
Bělásek řepový (Obrázek č. 2) je kosmopolitní, byl zavlečen do Severní Ameriky, Austrálie a na Nový Zéland a stal se významným škůdcem. Vyskytuje se na celém území České republiky. Je přizpůsobený intenzivně obdělávané krajině. Nejčastěji se vyskytuje v agrocenózách, plevelových společenstvech opuštěných polích, zahradách a v ruderalních biotopech. Živnou rostlinou housenek jsou rostliny z čeledi brukvovitých, ať už zemědělsky pěstovaných, nebo volně rostoucích druhů např. brukev zelná (*Brassica oleracea*), hořčice rolní (*Sinapis arvensis*), česnáček lékařský (*Alliaria petiolata*) aj. Tento druh motýla má vícegenerační vývoj, většinou jde o tři generace (konec března – červen, červenec – srpen, září – začátek listopadu). Vajíčka kladou jednotlivě na spodní stranu listů živných rostlin. Larvální vývoj trvá přibližně 20 dní a kukla přezimuje (Beneš et al., 2002).



Obrázek č. 2: Bělásek řepkový - samec a samice (Dvořák, 2020).

Bělásek řepkový (*Pieris napi*)

Areál rozšíření tohoto druhu je palearktický, vyskytuje se v celé Evropě až po Japonsko. Je hojně rozšířen po celé území České republiky. Rychle osídluje přechodné lokality včetně ruderálních biotopů a městské zástavby. Živnými rostlinami housenek jsou rostliny z čeledi brukvovitých především řeřišnice luční (*Cardamine pratensis*), česnáček lékařský (*Alliaria petiolata*), hořčice rolní (*Sinapis arvensis*), řeřišnice hořká (*Cardamine amara*) aj. Osidlování živných rostlin je omezeno pouze na divoce rostoucí druhy. Bělásek řepkový (Obrázek č. 3) tedy není ani potenciálním škůdcem plodin. Vývoj tohoto druhu je dvou až více generační (březen – květen, červenec – srpen). Samice kladou vajíčka na listy jednotlivě. Larvální vývoj trvá do 20 dní a kukly přezimují (Beneš et al., 2002).



Obrázek č. 3: Bělásek řepkový - samec a samice (Dvořák, 2020).

2.3 Fytofágní hmyz

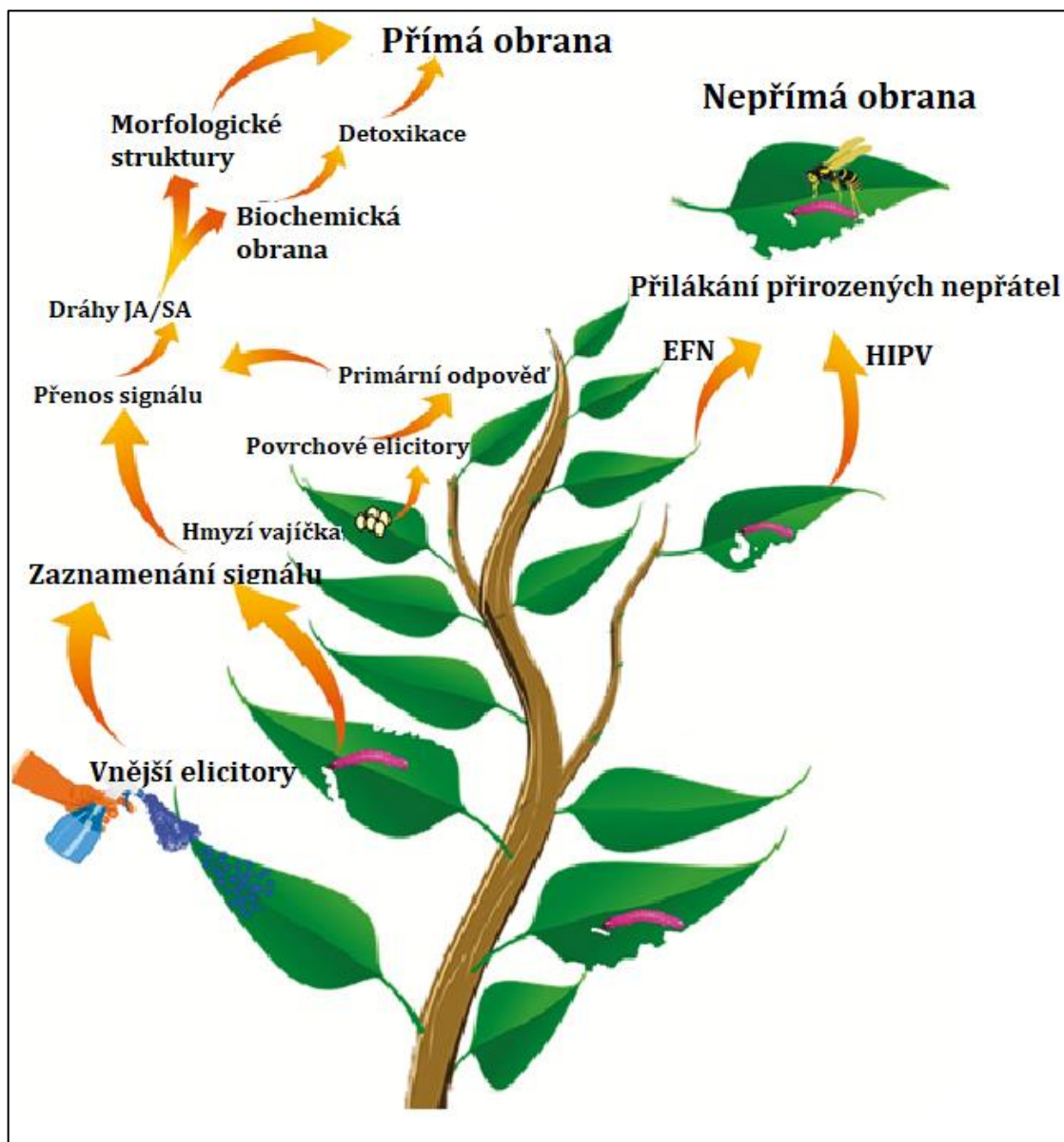
Fytofágní hmyz lze rozdělit do dvou skupin, na generalisty a specialisty. Generalisté tzv. polyfágové se živí na hostitelských rostlinách z různých čeledí, kdežto specialisté tzv. oligofágové či monofágové, si vybírají jeden nebo pouze několik druhů rostlin ze stejné čeledi. Generalisté jsou schopni tolerovat širokou škálu rostlinných obranných mechanismů, ale nemohou se živit rostlinami, které vyvinuly příliš specializované obranné systémy. Příkladem potravního generalisty je mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), která se živí na hostitelských rostlinách z více než padesáti čeledí. Specialisté naproti tomu zvolili odlišnou potravní strategii. Využívají pouze omezený počet hostitelských rostlin, jejichž obranné látky využívají, jako potravní stimulanty či atraktanty ke kladení vajíček. Mezi monofágní hmyz řadíme zástupce z řádů Hemiptera, Coleoptera, a dále některé larvy z řádu Lepidoptera. Příkladem oligofágního hmyzu jsou larvy běláskovitých (*Pieris* sp.) nebo mandelinka (*Leptinotarsa decemlineata*), která se specializuje na rostliny z čeledi Solanaceae (Feeny, 1976, Schoonhoven et al., 2005, Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Pro rostliny je stěžejní, aby co nejrychleji rozpoznaly původce poškození. Díky tomu, že dokáží rozeznat, zda je jejich poškození způsobeno mechanicky či útokem herbivora předcházejí energetickým ztrátám při produkci obranných látek. Rostliny též dokáží zaznamenat naklazení hmyzích vajíček na svém povrchu (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Rostlinami produkované bioaktivní obranné látky mohou působit na hmyzí generalisty repelentně zato na hmyzí specialisty mohou působit jako atraktanty. Podobně také toxické sloučeniny produkované rostlinami intoxikují především generalisty, specializovaný hmyz vyvinul detoxikační mechanismy, díky kterým se pouze zpomalí jejich růst a vývoj, ale následky pro ně nejsou smrtelné (Kessler et Baldwin, 2002).

2.4 Obranné mechanismy rostlin

Vzájemný dynamický koevoluční vývoj rostlin a hmyzu spočívá ve zdokonalování systému obrany rostlin a zároveň adaptačních strategií hmyzu. V důsledku tohoto evolučního tlaku se u rostlin vyvinula komplexní síť molekulárních, metabolických i biochemických mechanismů obrany (viz Obrázek č. 4). Rostliny mají schopnost minimalizovat poškození svých pletiv herbivory pomocí rezistence či tolerance. Tyto dva mechanismy obrany jsou vzájemně komplementární (Santamaria et al., 2013). Pomocí mechanismu rezistence se rostlina snaží předejít stresovým událostem. Tento způsob obrany je pasivní a zahrnuje mechanické bariéry jako je silná kutikula, impregnace buněčných stěn, vosky na povrchu listů, trny, trichomy atd. Mechanismus tolerance tvoří tzv. aktivní obrana rostlin, která minimalizuje negativní dopad stresorů po jejich proniknutí k plazmatické membráně. Dochází ke spouštění řetězce událostí v rostlině nazývaných stresová reakce. Intenzita a délka působení stresu, ale také kondice, genotyp, stádium vývoje a adaptační schopnosti ovlivňují průběh a výsledek stresové reakce (Piterková et al., 2005).

Rostliny se brání proti napadení herbivorů nejrůznějšími mechanismy jak přímé, tak nepřímé obrany. Jsou schopny ovlivnit jejich preferenci hostitelské rostliny, přežití i reprodukční úspěch (přímá obrana). Rostliny mohou produkovat

specifickou směs těkavých látek, která přiláká přirozené nepřátele hmyzu. Obrana je tak zprostředkována za pomoci třetí trofické úrovně (nepřímá obrana). Přímá i nepřímá obrana mohou být konstitutivně přítomny nebo mohou být indukovány při poškození pletiv herbivorem (Aimura et al., 2009; War et al., 2012). Účinky kombinované přímé a nepřímé obrany poskytují relativně trvalou odolnost vůči širokému spektru herbivorních členovců v přírodních ekosystémech (Howe et Jander, 2008).



Obrázek č. 4: Rostlinné obranné mechanismy proti hmyzím škůdcům. Upraveno dle War et al. (2018).

2.4.1 Konstitutivní obrana

Přímá konstitutivní obrana

Přímá konstitutivní obrana zahrnuje všechny rostlinné znaky, které mají samy o sobě vliv na útočící herbivorní členovce a také zvyšují fitness rostlin vůči herbivorům (Kessler et Baldwin, 2002). Přímá obrana může být mechanické či chemické povahy. Mechanické obranné struktury, které rostliny vytváří, jsou první linií obrany proti škůdcům. Jedná se o morfologické útvary od makroskopických trnů, ostnů, trichomů či štětín, ztlustlých a sklerifikovaných listů, epikutikulárních vosků, latexu a pryskyřic po mikroskopické změny v tloušťce buněčné stěny v důsledku lignifikace a suberinizace (Hanley et al., 2007). Chemická obrana je zajištěna přítomností toxických látek tzv. sekundárních metabolitů. V případě, že jsou konstitutivně přítomny jako neaktivní formy v rostlinných orgánech, jde o tzv. fytoanticipiny (Morant et al., 2008). V rostlinách jsou konstitutivně přítomny i další specializované bioaktivní látky, které jsou určeny přímo k obraně před herbivory. Zasahují zejména nervový, trávicí a endokrinní systém. Tyto specializované sloučeniny se významně podílejí i na konkrétní barvě, vůni a chuti rostliny (Taiz et Zeiger, 2010).

Nepřímá konstitutivní obrana

Extraflorální nektária jsou útvary, které se vyskytují na listech či stoncích některých rostlin. Extraflorální nektar se vyskytuje u více než 70 druhů rostlin a je pravděpodobně evolučně starší než květový nektar. Na rozdíl od květového nektaru extraflorální nektar slouží k přilákání predátorů a parazitoidů hmyzu (Heil, 2007). Dalším způsobem nepřímé konstitutivní obrany jsou hnízda či úkryty pro celou řadu predátorů, jako jsou mravenci, roztoči a další drobní členovci. Rostliny vytvářejí drobné komůrky, které těmto symbiontům slouží jako úkryty či hnízdiště a poskytují jim i zdroj potravy. Na oplátku brání rostlinu před herbivorním hmyzem a patogeny (Fischer et al., 2002).

2.4.2 Indukovaná obrana

Přímá indukovaná obrana

Indukovaná obrana spočívá v syntéze toxických chemických látek nazývaných sekundární metabolity. Jde o alkaloidy, terpenoidy a fenolické látky, které mají přímé toxické, odpuzující a repelentní účinky a omezují stravitelnost a příjem živin. Většinou jsou uloženy v neaktivních formách. Především z důvodu chemické stability a lepší rozpustnosti, což umožňuje jejich skladování ve vakuolách a zároveň se tak rostlina chrání před toxickými účinky vlastního obranného systému (Jones a Vogt, 2001; Morant et al., 2008). Pokud dojde k narušení buněk, např. okusem hmyzu, jsou sloučeniny aktivovány hydrolýzou glukosidických vazeb katalyzovaných β -glukosydázami (Morant et al., 2008). Sekundární metabolity indukované v reakci na napadení hmyzem se nazývají fytoalexiny (VanEtten et al., 1994). Další formou indukované obrany jsou obranné proteiny např. inhibitory proteáz, které jsou indukovatelné poškozením rostlinných pletiv a způsobují

inhibici trávicích enzymů hmyzu (Koiwa et al., 1997). Dále obranné enzymy např. polyfenol oxidázy, které snižují nutriční hodnotu poškozované rostliny (Kessler et Baldwin, 2002). Indukovaná obrana zahrnuje také reaktivní formy kyslíku (Kawano, 2003).

Nepřímá indukovaná obrana

Rostliny se brání hmyzím škůdcům nepřímo tím, že vypouštějí směsi těkavých i netěkavých látek. Těkavé látky indukované herbivorem (HIPV) slouží k přilákání přirozených nepřátel hmyzu, dokáží také odradit hmyz od okusu i od nakladení vajíček (Aimura et al., 2009).

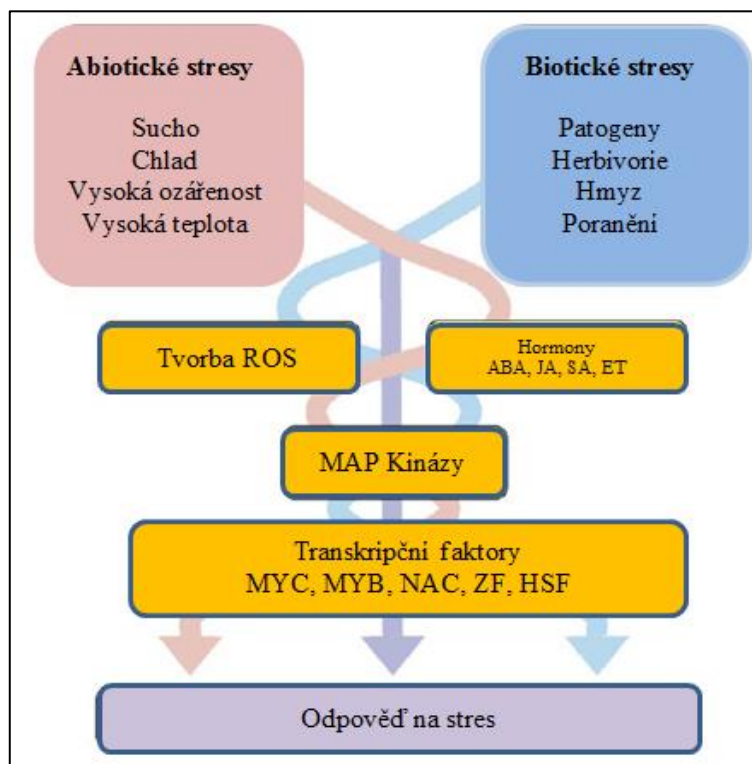
2.5 Rostlinný stres

Rostliny, stejně jako ostatní živé bytosti, žijí v neustále se měnícím prostředí. Často bývá nepříznivé či stresující pro jejich růst a vývoj. V průběhu evoluce rostliny vyvinuly specifické mechanismy, které jim umožňují přizpůsobit se a přežít stresující okolnosti. Pokud jsou rostliny vystaveny biotickému nebo abiotickému stresu dojde k narušení metabolického procesu, což má za následek fyziologické a energetické výdaje, což v konečném důsledku vede ke snížení kondice a produktivity (Rejeb et al., 2014).

Nepříznivé environmentální podmínky zahrnují abiotický stres. Příčinou může být nadměrné sucho, teplo, chlad, UV záření, nedostatek/nadbytek vody, nedostatek živin, zasolení či toxické kovy v půdě např. hliník, olovo, arsen, kadmium. Rostlinný stres vyvolaný nadměrným suchem, zasolením a teplotou, je hlavním environmentálním faktorem, který ovlivňuje geografické rozmístění rostlin v přírodě (Mittler, 2006; Zhu, 2016).

Rostliny na všech přírodních stanovištích vzájemně interagují s ostatními živými organizmy. Interakce může být pro rostlinu výhodná např. mykorhyza či symbióza nebo nepříznivá. Negativní působení organismů na rostlinu vyvolává stres, který označujeme jako biotický. Mohou jej vyvolat konkurenční rostliny (alelopátie, parazitismus), patogeny nebo býložraví živočichové (Berger et al., 2007). Patogeny jsou buněčné i nebuněčné organizmy, které jsou schopny svému hostiteli způsobit chorobu. Mezi patogenní mikroorganismy řadíme viry a fytoplasmata, bakterie a houby. Vývoj choroby u rostliny však není pravidlem. Reakce rostliny také závisí na specifické odrůdě rostliny a typu patogena (Landa et al., 2002; Věchet, 2012). Přítomnost abiotického stresu může mít za následek zvýšení nebo snížení náchylnosti k vlivu patogenů, což platí i naopak. Tato interakce mezi biotickým a abiotickým stresem je řízena signalizačními drahami hormonů, zejména skrz dráhu kyseliny abscisové. Hormonální signalizační dráhy se mohou být synergické nebo antagonistické (Fujita et al., 2006; Atkinson et Urwin, 2012). Obrázek č. 5 znázorňuje jak vnímání biotického a abiotického stresu indukuje kaskády, které aktivují iontové kanály, kinázu, kyselinu salicylovou, ethylen, kyselinu jasmonovou a kyselinu abscisovou. Tyto signály nakonec indukují expresi specifických podskupin obranných genů, které vedou k celkové obranné reakci (Shanker et Venkateswarlu, 2011). V rámci studia propojení signalizačních drah bylo zjištěno, že abiotický stres

má negativní dopad na odolnost vůči biotickému stresu a může vést ke zvýšené citlivosti rostlin k biotickému stresu (Nejat et Mantri, 2017). Při působení abiotického stresu v podobě sucha se zvýšila náchylnost huseníčku rolního k infekci hlísticemi (Atkinson, 2020). V další studii bylo prokázáno, že působením stresu vyvolaného suchem a teplem se zvýšila náchylnost huseníčku rolního k infekci virem mozaiky vodnice (Turnip mosaic virus, TuMV), kdy došlo k potlačení obranných reakcí na biotický stres (Prasch et Sonnewald, 2013). Dále vlivem stresu ze zasolení se významně zvýšila náchylnost rajčete k padlí *Oidium lycopersicum* (Kissoudis et al. 2015)



Obrázek č. 5: Propojení signálních drah při působení abiotických a biotických stresů. Legenda: ABA-kyselina abscisová; SA - kyselina salicylová; JA - kyselina jasmonová; ET - ethylen; MAP Kinázy -mitogenyaktivované proteinkinasy. Upraveno dle Fujita et al. (2006).

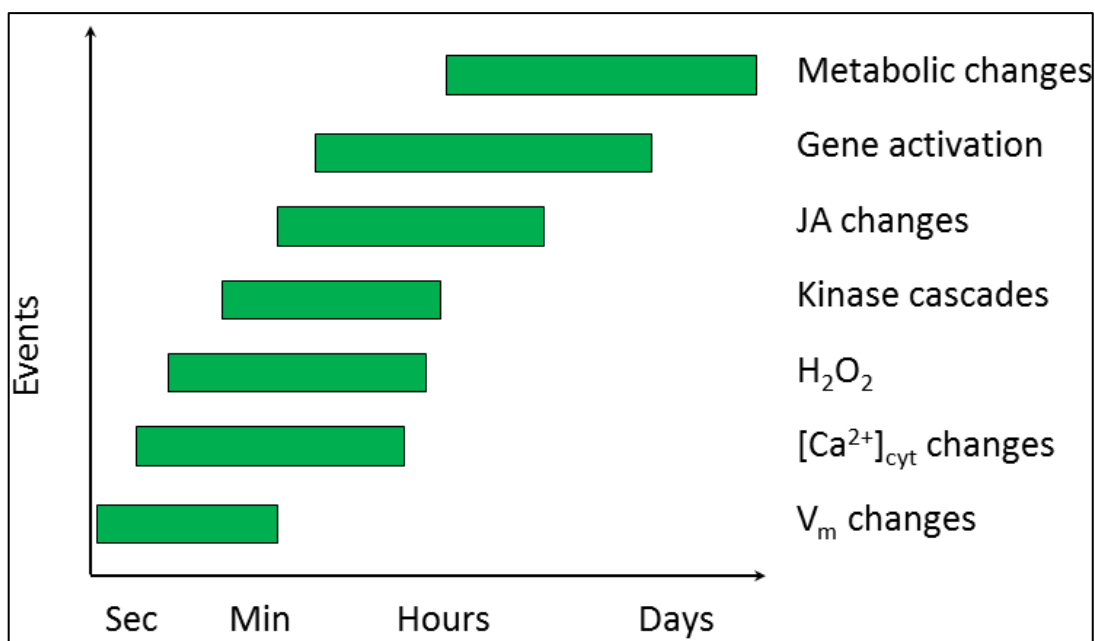
2.5.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS- Reactive Oxygen Species)

Oxidativní stres může být v rostlinách vyvolán působením různých stresových faktorů. V podstatě jde o narušení metabolismu kyslíku. Projevuje se prudkou přechodnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS). Vzniká nerovnováha mezi tvorbou a odbouráváním ROS. Proces vzniku reaktivních forem kyslíku probíhá mechanismem řetězové reakce volných radikálů. Zdrojem ROS je řada redoxních reakcí např. redukce kyslíku v elektronovém transportu v mitochondriích nebo fotolýza vody chloroplastovým elektronovým transportním řetězcem. Při těchto procesech vzniká singletový kyslík, jehož produkce stimuluje vznik dalších reaktivních forem kyslíku. Jde o peroxid vodíku, superoxidový radikál a hydroxylový radikál. ROS tedy primárně vznikají v chloroplastech a mitochondriích, dále mohou vznikat také v plazmalemě, tonoplastu, endoplazmatickém retikulu, peroxizomech a glykoxyzomech či v buněčné stěně a v mezibuněčných prostorech. Tyto toxické

vedlejší produkty metabolismu působí destruktivně na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Reaktivní formy kyslíku hrají také klíčovou roli v obranném mechanismu rostlin. Fungují jako signální molekuly kontrolující obranné procesy, mají dokonce přímý toxický efekt na patogeny a hrají významnou roli v procesu apoptózy (Semenza, 1999; Piterková et al. 2005; Řepková, 2013). Rostliny se brání oxidačnímu poškození antioxidantními mechanismy, které zahrnují jak enzymatické tak neenzymatické systémy. Neenzymatické antioxidanty jsou např. kyselin askorbová, glutathion, alfa-tokoferol, karotenoidy, flavonoidy, polyamidy a některé cukry. Katalyzátorem detoxikačních reakcí jsou enzymy jako superoxiddismutáza, askorbátperoxidáza a glutathionperoxidáza, monoaskorbátreduktáza, dehydroaskorbátreduktáza, glutathionreduktáza a kataláza (Řepková, 2013). Značný počet těchto molekul patří do kategorie sloučenin nazývaných sekundární metabolity. Sekundární metabolity plní v rostlině specializované funkce v závislosti na daných podmínkách. Absence sekundárních metabolitů dlouhodobě zhoršuje životaschopnost rostlin. Obecně se jedná především o pigmenty, fenolické sloučeniny atd. Při působení různých biotických a abiotických stresů dochází k akumulaci rostlinných fenolických látek, jako jsou flavonoidy a prekurzory ligninu. Tyto látky jsou považovány za klíčové obranné sloučeniny, které dokáží zneškodnit či zpomalit tvorbu nežádoucích reaktivních forem kyslíku (Bartwal et al., 2013). Dalšími zásadními rostlinnými metabolity jsou brassinosteroidy, které se řadí do skupiny fytohormonů. Podílí se na regulaci ROS a stimulují růst a dělení buněk (Li et al., 2013).

2.5.2 Reakce rostliny při napadení hmyzím herbivorem

Reakce na biotický stres vyvolaný hmyzími herbivory zahrnuje několik různých obranných mechanismů. Plazmatická membrána rostliny je v přímém kontaktu s vnějším prostředím, proto je schopna zaznamenávat změny a popřípadě iniciovat sérii kaskádovitých procesů vedoucích k možné reakci. Biotický i abiotický stres vede k okamžité změně potenciálu buněčné membrány nebo modulaci toku iontů na úrovni plasmatické membrány. Změny potenciálu buněčné membrány vyvolané vlivem hmyzích herbivorů jsou následovány rychlým elektrickým signálem (akčním potenciálem). Ten prochází celým rostlinným organizmem počínaje místem, kde byl vyvolán (Ebel et Mithöfer, 1998). Vápníkové ionty fungují jako druhý posel v několika signalizačních drahách rostlin. Signál o útoku herbivora se může projevit už několik sekund po napadení (Sathyanarayanan et Poovaiah, 2004). Signalizace pomocí Ca^{2+} iontů a tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) jsou úzce spojeny se změnami potenciálu buněčné membrány (Zebelo et Maffei, 2015). Rodriguez et al. (2010) uvádí jako další signální dráhu, ústřední kaskádu proteinové rodiny serin/treoninových kináz tzv. mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK nebo MAP kinázy). Tyto kaskády vedou ke zvýšení produkce fytohormonů kyseliny jasmonové (JA) a kyseliny salicylové (SA) a etylenu a následně k expresi genů, které zodpovídají za rychlou reakci na různé druhy rostlinných stresů (Appel et Cocroft, 2014). Sled událostí probíhajících v rostlině po napadení hmyzím herbivorem je znázorněn na Obrázek č. 6.

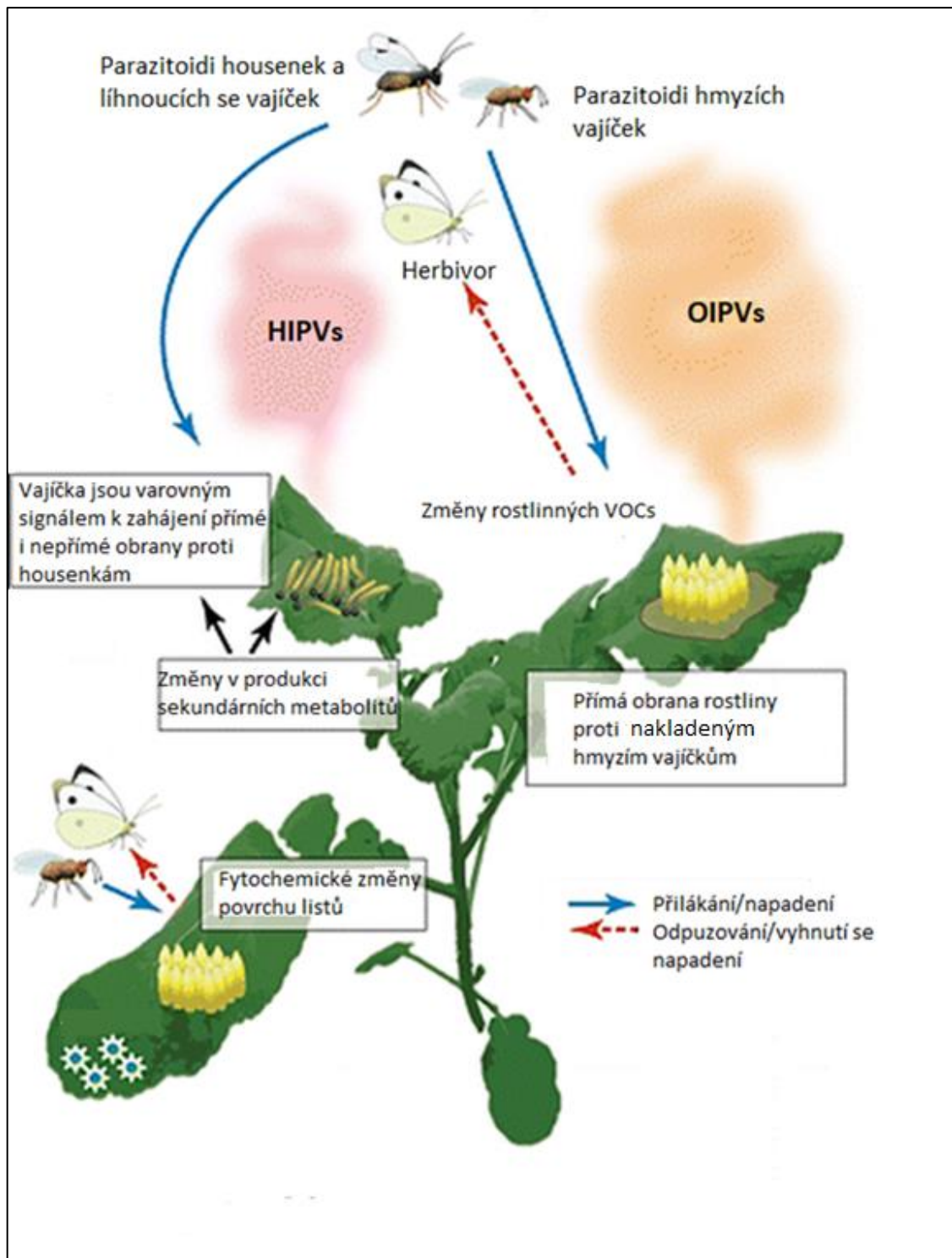


Obrázek č. 6: Události probíhající v rostlině při útoku hmyzích herbivorů. Změny v transmembránovém potenciálu (V_m) nastanou již v okamžiku, kdy herbivor poškozuje rostlinu a jsou těsně následovány změnami v koncentraci intracelulárních iontů Ca^{2+} a produkci H_2O_2 . Kinázy a fytohormon kyselina jasmonová (JA) jsou zaznamenatelné v řádu minut. Po necelé hodině jsou aktivovány geny a následují metabolické změny. Převzalo z Fürstenberg-Hägg et al. (2013).

Informace o poškození pletiv je přenášena především fytohormony: kyselinou jasmonovou, kyselinou salicylovou a etylénem, přičemž dráha kyseliny jasmonové je indukována jako odezva na poranění hmyzem či napadení patogeny (Arimura et al., 2012). Kyselina salicylová je aktivována především působením biotrofních patogenů a mšic a roztočů. Působí jako negativní modulátor skrz potlačení kyseliny jasmonové (Arimura et al., 2009). Etylén se uvolňuje při různých typech napadení hmyzem a působí synergicky s kyselinou jasmonovou. Etylén snižuje produkci konstitutivních obranných sloučenin, avšak produkci kyseliny jasmonové a těkavých látek zvyšuje (Von Dahl et Baldwin, 2007).

2.5.3 Reakce rostliny na naklazení hmyzích vajíček

Naklazení hmyzích vajíček v rostlině vyvolává indukci jak přímé, tak nepřímé obrany. Tyto obranné strategie rostlin se zaměřují spíše na vajíčka než na samice hmyzu, které je kladou. Přímá obrana spočívá v přímém negativním působení rostlinného organismu na naklazená hmyzí vajíčka. Zahrnují vysoušení, odpadnutí, rozdrcení či usmrcení vajíček. Nepřímá obrana rostlin spočívá v uvolňování směsi těkavých látek, která přiláká parazitoidy hmyzích vajíček. Indukci těchto látek nepřímé obrany vyvolává poškození rostlinných pletiv herbivory (HIPV), ale také naklazení vajíček na povrch rostliny (OIPV). Depozice hmyzích vajíček je pro rostlinu také varovným signálem před budoucím poškozením housenkami. Díky tomuto včasnému zaznamenání hrozby jsou schopny předem aktivovat obranné mechanismy nebo urychlit svůj růst, kvetení a rozmnožování (Little et al. 2007; Hilker et Fatouros, 2015). Tyto procesy ilustruje **Obrázek č. 7**.



Obrázek č. 7: Přehled reakcí rostliny na naklazení hmyzích vajíček a jejich vliv na interakce mezi rostlinami, herbivory a parazitoidy. Legenda: HIPVs – volatilní látky vyvolané herbivorem, OIPVs – volatilní látky vyvolané naklazením vajíček hmyzu, VOCs – volatilní organické sloučeniny. Upraveno dle Hilker et Fatouros, (2015).

2.5.4 Varovná signalizace pomocí VOCs

Těkavé organické sloučeniny tzv. VOCs (volatile organic compounds) jsou směsí chemických látek, které rostliny uvolňují do ovzduší. Rostliny emitují VOCs v případě, že jsou vystaveny stresovým faktorům, jako jsou infekce způsobené

patogeny, poranění herbivory, extrémní teploty atd. Tyto specifické látky jsou uvolňovány také k přilákání opylovačů a zajištění reprodukce. VOCs fungují jako vzdušné signály, které jsou rozptýleny rostlinou do okolí a přináší nepoškozeným rostlinám varovný signál o možné hrozbě a dávají jim šanci posílit svůj vlastní obranný systém. Příjemcem těchto signálů mohou být i nepříbuzné druhy. Informaci o útoku herbivorů, kterou rostlina vysílá, mohou zachytit také jejich přirození nepřátelé (Ueda et al., 2012). Obranná reakce rostliny, však může být narušena, pokud je rostlina současně napadena dalšími druhy hmyzu s odlišnou potravní strategií. Stout et al. (1998) například zjistili, že mšice sající floém způsobují, že se rostliny rajčete stávají náchylnější k napadení housenkami. Poruchy obranných reakcí při napadení více než jedním druhem herbivora, mohou ovlivnit interakce na třetí trofické úrovni, tzn. interakce mezi rostlinami a přirozenými nepřáteli herbivorů. Bylo zjištěno, že rostliny poškozené dvěma druhy z čeledi Lepidoptera emitují jinou směs těkavých látek ve srovnání s těmi, které byly napadeny jen jedním druhem (Shiojiri et al., 2001).

2.1 Primární metabolismus

Primární metabolismus je soubor metabolických přeměn probíhajících v rostlinách, při kterých vznikají základní látky, jako jsou sacharidy, z nichž se syntetizují mastné kyseliny a tuky, karboxylové kyseliny, 20 základních aminokyselin, které jsou základem pro biosyntézu proteinů a další deriváty zmíněných látek (Neuhaus, 2007). Rostliny jsou trvale vystaveny ohrožení v podobě biotického i abiotického stresu v důsledku čehož vyvinuly složité mechanismy pro rozpoznání a obranu proti potenciální hrozbě. Jednou z možností obrany je snížení fotosyntézy a dalších procesů spojených s primárním metabolismem, které jsou nezbytné pro růst rostlin. Energie uspořádaná utlumením primárního metabolismu je přesměrována a použita pro obranné reakce. Několik studií však prokázalo, že během interakcí mezi rostlinami a patogeny dochází ke zvýšené funkci primárního metabolismu. Rostliny vystavené útoku patogenů či vlivu škůdců indukují několik genů spojených s primárními metabolickými cestami, jako jsou například ty, které se podílejí na syntéze nebo degradaci sacharidů, aminokyselin a lipidů (Rojas et al., 2014).

2.1.1 Obranné proteiny rostlin

Vzájemná ekologická interakce mezi hmyzem a rostlinami je podmínkou přežití obou zúčastněných stran. Hmyz vždy vyhledává zdravou a životaschopnou hostitelskou rostlinu, která mu poskytne potravu, vhodné podmínky pro spáření, naklazení vajíček a také potravu pro potomstvo. Hmyz má podobné nutriční požadavky jako jiní živočichové a jakákoliv nerovnováha v trávení či využití rostlinných proteinů může mít velmi negativní účinky na jeho fyziologii. Biotický stres, který se u rostlin projevuje při napadení hmyzími herbivory, vede ke změnám genové exprese a potažmo ke změnám v syntéze proteinů. Tyto proteiny pak mohou hrát roli v přenosu signálu či v obranných reakcích rostlin. Rostlinné proteiny přijímané hmyzem projdou většinou bez problémů, ve stabilní formě trávicím traktem a pronikají stěnou střeva do hemolymfy. Změna obsahu či struktury aminokyselin však ovlivňuje funkci proteinů. Insekticidní aktivita toxických látek

citlivých na proteolýzu může být podpořena účastí enzymů inhibitorů proteáz (PI), které zabraňují odbourávání toxických proteinů a umožňují tak vykonávat jejich obrannou funkci. (Gulsen et al., 2010; War et al., 2012).

2.2 Sekundární metabolismus

Chemické látky produkované rostlinným organizmem se rozdělují na primární a sekundární metabolity. Sekundární metabolity hrají klíčovou roli v obraně rostlin. Jejich produkce je úzce spjata s primárním metabolismem. Oproti primárním metabolitům tyto látky nemají přímý vliv na růst a vývoj rostliny. Sekundární metabolity jsou strukturně a chemicky mnohem rozmanitější než primární metabolity, mají nezastupitelnou úlohu v obraně proti býložravcům, mikrobům, virům nebo konkurenčním rostlinám, uplatňují se také jako signální sloučeniny (přitahují opylovače a živočichy, zajišťující jejich rozšiřování) a chrání rostliny před ultrafialovým zářením a oxidativním stresem (Anu et al., 2018). Sekundární metabolity lze na základě působení na fytofágní hmyz rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Látky kvalitativní, které se v rostlinách vyskytují v nízkých koncentracích, ale působí na herbivory silně toxicky, jsou např. o alkaloidy, glykosidy a glukosinoláty. Kvantitativní látky nebývají příliš toxické, ale mají repelentní účinky, jsou špatně stravitelné, nechutné až toxické. Do této skupiny se řadí např. fenolické látky, ligniny a taniny (Procházka et al., 1998; Taiz et Zeiger, 2010).

2.3 Rostlinné hormony

Růst, vývoj a reakce na měnící se podmínky prostředí jsou částečně regulovány fytohormony. Regulátory růstu rostlin jsou auxiny, cytokininy, gibereliny a brassinosteroidy. Jejich hlavními úkoly jsou podpora buněčného dělení a růstu, ovlivňují také vitalitu a stimulují vývoj rostliny. Rostlinné hormony, které se účastní stresových reakcí rostlin, jsou kyselina abscisová, ethylen, kyselina jasmonová a kyselina salicylová. Regulují ochranné reakce rostlin proti biotickým i abiotickým stresům prostřednictvím synergických a antagonistických reakcí. (Fujita et al., 2006; Vanková, 2011). Jejich působením dochází k inhibici buněčného dělení, které souvisí s potlačením růstu, ke kterému často dochází ve stresových podmínkách, což umožňuje přerozdělení omezených zdrojů na energetické nákladné obranné reakce (Lopez et al., 2008). Dlouhodobé působení stresu stimuluje změnu toků uhlíku z primárních na sekundární metabolické dráhy, což indukuje posun dostupných zdrojů ve prospěch syntézy sekundárních metabolitů (Iriti and Faoro, 2009).

Kyselina jasmonová (JA)

Kyselina jasmonová je fytohormon, který má nezastupitelnou roli v obraně rostlin proti herbivorům, protože dokáže aktivovat mechanismy jak přímé, tak i nepřímé obrany (War et al., 2011). Syntézu JA stimuluje systemin - peptid bohatý na prolin, obsahující 18 aminokyselinových zbytků. Systemin se uvolňuje po poranění z prosysteminu (200 aminokyselinových zbytků) v cévních svazcích. Současně JA podporuje tvorbu systeminu. Tato pozitivní zpětnovazebná reakce umožňuje

zesílení signálu při poranění nebo infekci (Hause et al., 2003). Kyselina jasmonová zajišťuje odolnost vůči patogenům a poraněním způsobených škůdci. JA je zapojena do lokální programované buněčné smrti, kterou rostlina omezuje invazi patogenů podobně jako je tomu u hypersenzitivní reakce. JA hraje důležitou roli v obraně před abiotickým stresem ve formě ozonu a zasolení. JA, stejně jako ABA, zpomaluje dělení buněk a inhibuje postup buněčného cyklu (Vanková, 2011).

Kyselina salicylová (SA)

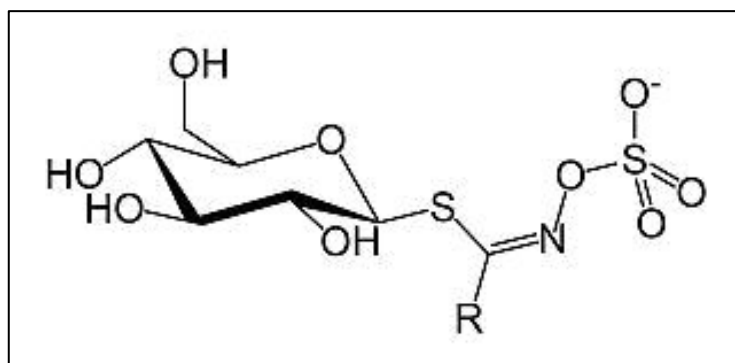
Kyselina salicylová je derivátem kyseliny benzoové, jedná se o důležitý fytohormon zapojený do regulace ochrany rostlin (War et al., 2011). Hraje důležitou roli v signalizaci jak lokálních, tak systémových obranných reakcí (Slaymaker et al., 2002). Kyselina salicylová tlumí signalizaci auxinů a ABA, což vede ke snížení dostupnosti živin pro patogeny a přemístění rostlinných zdrojů směrem k aktivaci obranných sloučenin (Lopez et al., 2008). Napomáhá ke zvýšení tolerance k abiotickým stresům stimulací antioxidační kapacity (Horvath et al., 2007). Dokáže také aktivovat geny kódující detoxikační nebo antioxidační enzymy (Slaymaker et al., 2002).

Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová je klíčovým hormonem v reakci na abiotické stresy spojené s dehydratací, zprostředkovává jak rychlé reakce (uzavření průduchů), tak dlouhodobé změny v expresi genů spojených se stresem. Průduchy jsou místem, kde dochází k největším ztrátám vody, dokonalá regulace mechanismu otvírání a zavírání má velký význam při nedostatku vody (Vanková, 2011, Dalal et Chinnusamy, 2015). Role ABA v reakci na biotický stres není přímá. Uzavření průduchů indukované ABA může omezit vstup patogenu do buněk. V pozdějších stádiích infekce mají vysoké hladiny ABA spíše negativní účinek (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Glukosylester kyseliny abscisové (ABA-GE) je hydrolyzovatelný konjugát ABA, který se hromadí především ve vakuolách. Dekonjugace ABA-GE umožňuje rychlou tvorbu volné ABA jako reakci na abiotický stres, jako je dehydratace a solný stres (Burla et al., 2013).

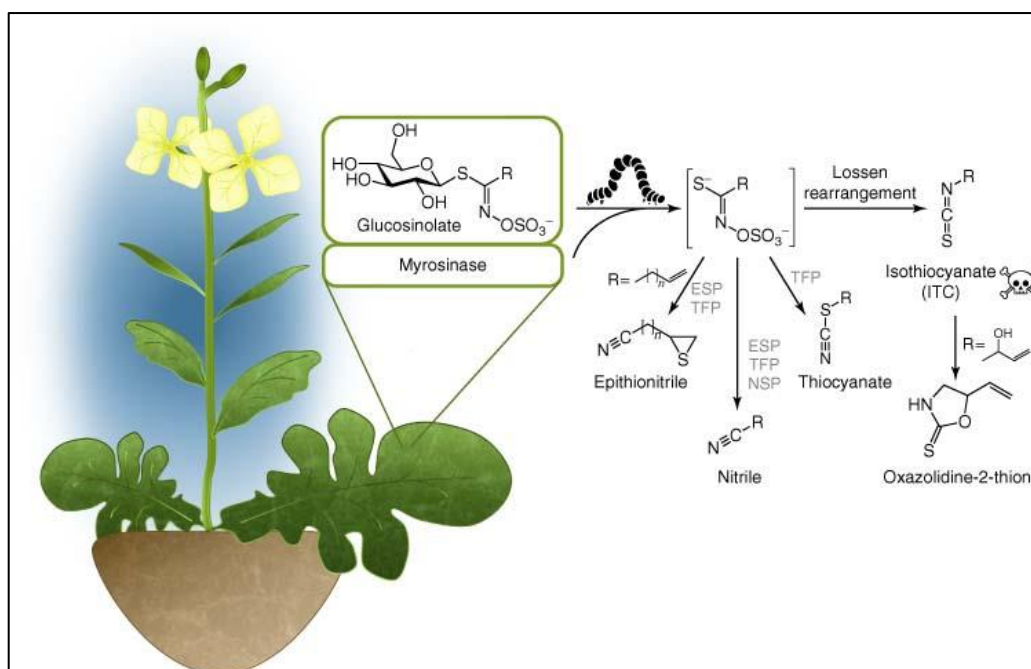
2.4 Glukosinoláty

Glukosinoláty neboli hořčičné glykosidy (glykosidy hořčičných olejů) jsou sirné glukosidy (dříve thioglukosidy). Jsou to biologicky aktivní látky tvořené C=N skupinou substituovanou sulfátem na dusíku, na kterém je navázán S-glykosidickou vazbu β -D-glukopyranosa další řetězec, charakteristický pro daný glukosinolát (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8 Chemická struktura glukosinolátu

Jedná se o významné sekundární metabolity rostlin, které působí jako obrana proti škůdcům (Schulzová, 2020). Vyskytují se v mnoha druzích rostlin z čeledi brukvovitých, nacházejí se také v rostlinách z čeledi kaparovité (Hopkins et al., 2009). V základních pletivech mají brukvovité rostliny idioblasty, obsahující enzym myrosinasu, která štěpí glukosinoláty na příslušné isothiokyanáty, hydrogensíran a glukózu. Přestože jsou glukosinoláty poměrně nestálé, tak se v rostlině neštěpí, ale k jejich rozkladu dochází až při poranění pletiva. Při štěpení vzniká látka isothiokyanát, který způsobuje typický zápachu brukvovitých rostlin, tento mechanismus ilustruje Obrázek č. 9 (Schulzová, 2020). Hmyzí herbivoři se snaží snížit toxicitu glukosinolátů a jejich produktů mechanismy exkrece, detoxikace či je využít ve svůj prospěch (Hopkins et al., 2009). Wittstock et al. (2004) a Agerbirk et al. (2010) uvádějí, že housenky běláskovitých disponují metabolickou adaptací na toxický efekt glukosinolátů. Housenky mají ve svém trávicím ústrojí NSP protein (nitrile-specifier protein), který slouží k odvrácení drastických účinků hydrolýzy glukosinolátů. V konečném důsledku se tedy glukosinoláty rozloží na nitrily místo toxických isothiokyanátů.



Obrázek č. 9: Štěpení glukosinolátů v procesu obrany proti hmyzím herbivorům. Převzato z Jeschke et Burow (2018).

2.5 Polyfenoly

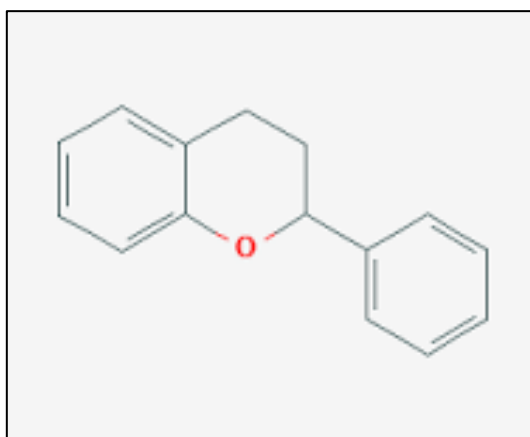
Fenolické látky neboli polyfenoly jsou nejrozšířenější skupinou sekundárních metabolitů v celé rostlinné říši. Jde o chemické sloučeniny odvozené od dráhy kyseliny šikimové nebo malonové. Do této rozsáhlé a různorodé skupiny chemických sloučenin se řadí deriváty benzenu, kyseliny benzoové a kyseliny skořicové. Dalšími významnými zástupci této skupiny jsou flavonoidy, antokyany a kumariny, ze složitějších látek jsou to třísloviny či lignin (Engelberth, 2006, Anu et al., 2018). Fenoly hrají klíčovou roli v obraně rostlin před různorodými druhy environmetálního stresu. Tyto sloučeniny mají antibiotické, antinutriční nebo nepoživatelné vlastnosti, inhibují hmyzí enzymy, brání rostlinu před infekcemi a patogeny. Pomocí fenolů rostliny dokáží přilákat opylovače. Fenoly také absorbují škodlivé ultrafialové záření či omezují růst okolních konkurenčních rostlin (Cheeke, 1989, Wink, 1997). Hromadění fenolických látek v rostlinných pletivech je považováno za běžnou adaptivní reakci rostlin na nepříznivé podmínky prostředí (Anu et al., 2018). Dalším obranným mechanismem rostlin proti hmyzím herbivorům je oxidace fenolů katalyzovaná polyfenol oxidázou (PPO) a peroxidázou (POD). Produktem oxidace fenolů jsou chinony, které se kovalentně vážou na proteiny v listech a způsobují u hmyzu inhibici trávení či vykazují přímé toxické účinky (Bhonwong et al., 2009).

2.5.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou chemické sloučeniny, které se řadí do skupiny rostlinných fenolů. Základem struktury je flavan (Obrázek č. 10 **Obrázek č. 10**), který je tvořený dvěma benzenovými jádry spojenými 2-fenylbenzopyranem (Pietta, 2000; Saxena et al., 2012). Flavonoidy jsou známé pro své antioxidační účinky a jsou široce zastoupeny v rostlinné říši. Mají antimikrobiální a repelentní účinky, fungují jako fotoreceptory a vizuální atraktanty (Pietta, 2000). Klasifikace flavonoidů není jednotná. Dle Winkel-Shirley (2001) jsou klasifikovány do šesti hlavních skupin:

- chalkony
- flavony
- flavonoly
- flavanony
- antokyany
- kondenzované taniny

Tyto sloučeniny se běžně vyskytují u většiny vyšších rostlin. Dále se rozlišují dvě podskupiny, které jsou u rostlin méně zastoupeny: aurony a isoflavonoidy. Blízce příbuznou sloučeninou flavonoidům jsou stilbeny (Winkel-Shirley, 2001).

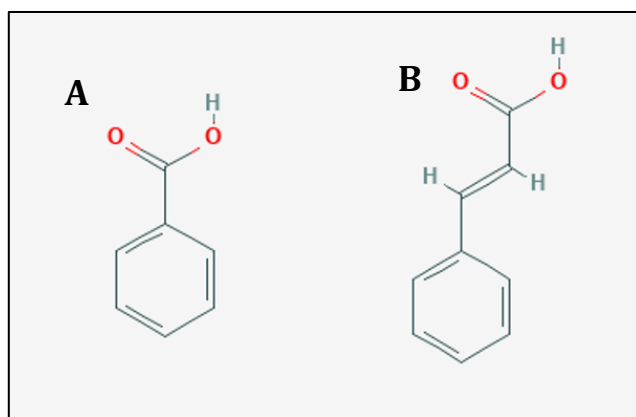


Obrázek č. 10: Vzorec flavanu

Některé flavonoidy chrání rostliny proti působení reaktivních forem kyslíku (ROS) tím, že zachycují volné radikály. Funkce flavonoidů pravděpodobně souvisí také s řízením polárního transportu auxinů. Tento hormon řídí během stresové reakce otevírání průduchů a alokaci zdrojů při špatných růstových podmínkách. Flavonoidy, jako je kvercetin, kemferol, apigenin a další aglykonové molekuly syntetizované v prvních krocích biosyntézy flavonoidů, inhibují polární transport auxinu a zvyšují následnou lokalizovanou akumulaci auxinu v rostlině (Peer et Murphy, 2007; Kuhn et al., 2011; Lewis et al., 2011).

2.5.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou hydroxylované deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové, jejichž chemické struktury jsou vyobrazeny na Obrázek č. 11. Kyseliny p-kumarová, kávová, vanilinová, ferulová a protokatechová se běžně vyskytují téměř ve všech rostlinách. Vůbec nejrozšířenější fenolovou kyselinou je kyselina kávová, jejíž ester kyselina chlorogenová, se vyskytuje v nepražených kávových zrnech, zelí, bramborách a v mnoha dalších druzích ovoce i zeleniny. Fenolové kyseliny se nacházejí ve všech částech rostliny, ale většinou jsou vázány ve formě esteru, éteru a dalších sloučenin. Kyselina kávová, ferulová a galová se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, přičemž se váží na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů (Clifford, 2000; Robbins, 2003).



Obrázek č. 11: Chemická struktura: kyseliny benzoové (A) a kyseliny skořicové (B).

3 Metodika

3.1 Rostliny použité pro experiment

Výzkumnou rostlinou vybranou pro tento experiment bylo zelí hlávkové bílé (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) f. *alba*) z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), viz Obrázek č. 12. Rostliny byly zasety 25. 5. 2019 a předpěstovány v sadbovačích za optimálních podmínek v pěstební komoře Fytotron. Použitým půdním substrátem byl zakoupený zahradnický substrát. Kultivace rostlin probíhala při 15hodinové fotoperiodě, kdy denní teplota byla 22 °C a noční 17 °C a vlhkost zde byla 60 % ve dne a 70 % v noci. Po čtrnácti dnech byly rostliny přesazeny do větších sadbovačů o rozměrech 5 x 5 x 5. Rostliny byly pravidelně zalévány roztokem kohoutkové a destilované vody v poměru 1:1.



Obrázek č. 12: Napěstované sazenice zelí připravené k experimentu (foto Konečná, 2019).

3.2 Odchyt bělásků na lokalitě

Pro tento výzkum byli vybráni motýli z čeledi běláskovitých (*Pieris* sp.). Jedná se o jednoho z nejběžnějších škůdců brukvovitých rostlin a každoročně má na svědomí značné ztráty z výnosu plodin. Odchyt škůdců byl proveden na poli družstva Agrospol v obci Bolehošť dne 8. 7. 2019 na GPS souřadnicích N50.2131900, E16.0778428. Pro účely tohoto výzkumu byly odebrány housenky i imaga dané čeledi. Odběr škůdců zachycuje Obrázek č. 13 a Obrázek č. 14. K odchytu motýlů byla využita entomologická síťka a jedinci byli umístěni do pěstebních boxů s předpěstovanými sazenicemi zelí. Housenky byly odebrány do epruвет. Veškerý pokusný materiál byl přepraven do laboratoře a experiment dále probíhal v pěstební komoře Fytotron za stávajících podmínek: teplota ve dne 22 °C / v noci 17 °C, vlhkost ve dne 60 % / v noci 70 %.



Obrázek č. 13: Odchyt motýlů z čeledi běláskovitých na lokalitě (foto Tůma, 2019).



Obrázek č. 14: Sběr housenek motýlů z čeledi běláskovitých do epruvet (foto Konečná, 2019).

Pro výzkum změn v produkci vybraných metabolitů u zelí byly použity předpěstované rostliny zelí bílého (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) f. *alba*), škůdci z čeledi běláskovitých (*Pieris* sp.), a to jak housenky, tak dospělci. Odchycení škůdci byli umístěni do připravených pěstebních boxů o objemu 29 litrů. Tyto průhledné plastové boxy byly vybaveny sítkou pro cirkulaci vzduchu a gumovou hadičkou určenou k zálivce pěstovaných rostlin, jak dokumentuje Obrázek č. 15. Na dno boxu byla nasypána vrstva agropערלית, jejíž funkcí byla ochrana před uhynutím odchycených škůdců. Celkově bylo k experimentu použito 12 takto koncipovaných

pěstebních boxů s 8 předpěstovanými rostlinami zelí v sadbovači, přičemž 3 takto připravené boxy byly použity pro kontrolní měření a rostliny v těchto boxech nebyly nijak ovlivněny působením herbivorů. Do dalších 3 boxů byly umístěny housenky běláška vždy po 15 jedincích. Do zbývajících 6 boxů byly umístěny dospělé samičky běláška vždy po 8 jedincích (viz Obrázek č. 16). Z čehož 3 boxy s motýly byly určeny pouze pro výzkum změn v produkci vybraných metabolitů u zelí při nakladení vajíček herbivorem. Poslední série boxů byla určena k výzkumu vlivu čerstvě vylíhnutých housenek běláška na metabolismus brukvovitých rostlin.



Obrázek č. 15: Pěstební boxy s rostlinami zelí bílého (foto Konečná, 2019).



Obrázek č. 16: Pěstební box s rostlinami zelí bílého a odchycenými motýly (foto Konečná, 2019).

Po 3 dnech od začátku experimentu, tedy 11. 7. 2019 byla provedena analýza kontrolních rostlin a rostlin s nakladenými hmyzími vajíčky (Obrázek č. 18). A po dalších 4 dnech, tedy 15. 7. 2019 proběhly zbylé analýzy - rostliny poškozené žírem housenek a rostliny s čerstvě vylíhnutými housenkami (Obrázek č. 17).



Obrázek č. 17: Vylíhnuté housenky běláška na rostlině zelí, znečištěném jejich trusem a poškozeném okusem (foto Konečná, 2019).



Obrázek č. 18: Nakladená vajíčka běláška na spodní straně listu zelí bílého (foto Konečná, 2019).

3.3 Analýza vzorků

Rostlinný materiál, který byl použit pro následující analýzy, byl odebírán ze všech dvanácti boxů (kontrola, housenky, vajíčka, líhnoucí se vajíčka). V každé analýze byla pro všechny vzorky provedena tři opakování. Celkem bylo zhotoveno 36 vzorků, které byly následně analyzovány. Pro všechna měření absorbance byl použit spektrofotometr Cintra (Cintra 101, Dandenong, Australia). Stanovení rostlinných hormonů proběhlo ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR. Stanovení fenolových kyselin proběhlo ve spolupráci s katedrou chemie Příf UHK.

3.3.1 Příprava vzorků pro analýzu

*FW – hmotnost čerstvého rostlinného materiálu

Příprava supernatantů pro superoxidový radikál a peroxid vodíku (O_2^- , H_2O_2)

Na analytických vahách bylo odváženo 0,1 g rostlinného materiálu. Následně bylo toto množství rozetřeno ve vychlazené třecí misce s trochou mořského písku a s 2 ml fosfátového pufru vzniklého smícháním hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) v poměru 1 : 1. Hotový supernatant byl v mikrozkušnicích (Eppendorf) centrifugován 15 minut při 4 °C a 15 000 g_n (Kovalíková et al., 2019).

Analýza peroxidu

Pro analýzu obsahu peroxidu vodíku bylo smícháno 500 μ l supernatantu a 250 μ l 0,5% roztoku $TiCl_4$ v 20% H_2SO_4 . Tato směs látek byla po promíchání opět centrifugována při 15 000 g_n a 4 °C po dobu 15 minut a poté byla změřena její absorbance při vlnové délce 410 nm ve skleněných kyvetách pomocí spektrofotometru. Výsledky byly přepočítány na jednotku čerstvé hmotnosti a vyjádřeny jako množství peroxidu vodíku v μ mol g^{-1} FW (Kovalíková et al., 2019).

Analýza superoxidu

Pro analýzu obsahu superoxidového radikálu bylo k reakční směsi obsahující 300 μ l supernatantu, 270 μ l 50 mM fosfátového tlumivého roztoku (pH = 7,0) a 30 μ l 10 mM hydroxylaminu postupně v 15minutových intervalech inkubace při laboratorní teplotě přidáno 300 μ l 17 mM sulfanilamidu, 300 μ l 7 mM α -naftylaminu a 300 μ l dietyléteru. Nakonec byla měřena absorbance ve skleněných kyvetách při vlnové délce 530 nm pomocí spektrofotometru. Výsledky byly přepočítány na jednotku čerstvé hmotnosti a vyjádřeny jako množství superoxidového radikálu v μ g g^{-1} FW (Kovalíková et al., 2019).

Příprava supernatantů pro fenoly a flavonoidy

Ve třecí misce bylo rozetřeno 0,2 g rostlinného materiálu s trochou mořského písku ve 2 ml 80% metanolu. Vzniklý supernatant byl centrifugován v mikrozkušnicích (Eppendorf) po dobu 15 minut při 10 °C a 14 000 g_n (Dučaiová et al., 2016).

Analýza fenolů

Pro analýzu fenolických látek bylo nejdříve smícháno 470 μl destilované vody a 30 μl supernatantu. Poté bylo přidáno 975 μl 2% uhličitanu sodného (Na_2CO_3) a 25 μl Folin-Ciocalteu činidla. Vše bylo po dobu 60 minut zahříváno na 45 °C ve vodní lázni. Nakonec byla měřena absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 750 nm ve skleněných kyvetách. Standardní látkou pro sestavení kalibrační křivky byla použita kyselina gallová (Sigma-Aldrich). Výsledky byly vyjádřeny v mg g^{-1} FW (Dučaiová et al., 2016).

Analýza flavonoidů

Obsah flavonoidů byl stanoven klasickou reakcí s ionty hliníku, které specificky reagují s keto- nebo hydroxy- skupinou. Pro analýzu flavonoidů bylo nejdříve smícháno 500 μl supernatantu a 500 μl 2% roztoku hliníku (AlCl_3 v 100% metanolu). Vzniklá směs látek byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Nakonec byla měřena absorbance při vlnové délce 420 nm v semi-mikro plastových kyvetách. Jako standardní látka pro stanovení kalibrační křivky byl použit kvercetin (Sigma-Aldrich). Výsledky byly vyjádřeny jako mg g^{-1} FW (Dučaiová et al., 2016).

Fenolové kyseliny

Obsah fenolových kyselin a vybraných flavonoidů v metanolových extraktech a po kyselé hydrolýze (2M HCl po dobu 60 minut při 100 °C) byl stanoven pomocí UHPLC na 2,1 x 50 mm, 1,8 μm koloně Zorbax RRHD Eclipse plus C18 (Agilent) s hmotnostním spektrometrem Triple Quadrupole 6470 (Agilent), elektrosprejová ionizace - negativní iontový režim jako detektor. Eluenty: (A) 0,05% kyselina mravenčí ve vodě a (B) 0,05% kyselina mravenčí v acetonitrilu (Kovalíková et al., 2019).

Příprava supernatantů pro rozpustné proteiny

Pro analýzu rozpustných proteinů byl nejprve připraven supernatant. Jeho příprava probíhala tak, že ve třecí misce bylo rozetřeno 0,1 g rostlinného materiálu, ke kterému bylo přidáno pár zrněk písku, ve 2 ml fosfátového pufru (PB), který byl připraven smícháním hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a dihydrogenfosforečnanu draseleného (KH_2PO_4) v poměru 1 : 1. Poté byl vzniklý supernatant převeden do mikrokumavek (Eppendorf). Následně byla provedena centrifugace po dobu 15 minut při 4 °C a o zrychlení 15 000 g_n (Dučaiová et al., 2016).

Rozpustné proteiny

Obsah celkových rozpustných proteinů v homogenátech byl stanoven standardní metodikou dle Bradford (1976). Pro analýzu rozpustných proteinů bylo smícháno 970 μl Bradfordova činidla s 30 μl námi připraveného supernatantu. Po promíchání a 10minutové inkubaci byla ve spektrofotometru měřena absorbance při vlnové

délce 595 nm v plastových kyvetách semi-mikro. Jako standardní látka pro sestavení kalibrační křivky byl použit komerčně dostupný hovězí sérový albumin - BIO-RAD.

Rostlinné hormony

100 mg FW v 2 ml zkumavkách Eppendorf byl okamžitě zmražen v tekutém dusíku. Vzorky byly skladovány při -80°C . Analýza hormonů byla provedena dle metodiky Dobrev a Kamínek (2002), Dobrev a Vankova (2012) v Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Fytohormony byly rozděleny pomocí SPE – reverzní fáze chromatografie (kolona Oasis-MCX, Waters) na kyselou frakci elucí metanolem (auxiny, ABA, SA, JA) a na bazickou frakci elucí 0,35 M NH_4OH v 60% metanolu (CKs). Frakce byly analyzovány pomocí HPLC (Ultimate 3000, Dionex) spojenou s hybridem 3200 Q TRAP hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem / lineárním iontovým lapačem. Kvantifikace hormonů byla prováděna metodou ředění izotopů s víceúrovňovými kalibračními křivkami.

3.4 Statistické zpracování

Hodnoty absorbance naměřené při analýzách vzorků byly následně zaneseny do tabulek a byly vypočítány průměry a standardní chyby průměru. Výsledky byly pro lepší přehlednost zpracovány formou sloupcových grafů pomocí MS Excel, průměr a směrodatná odchylka.

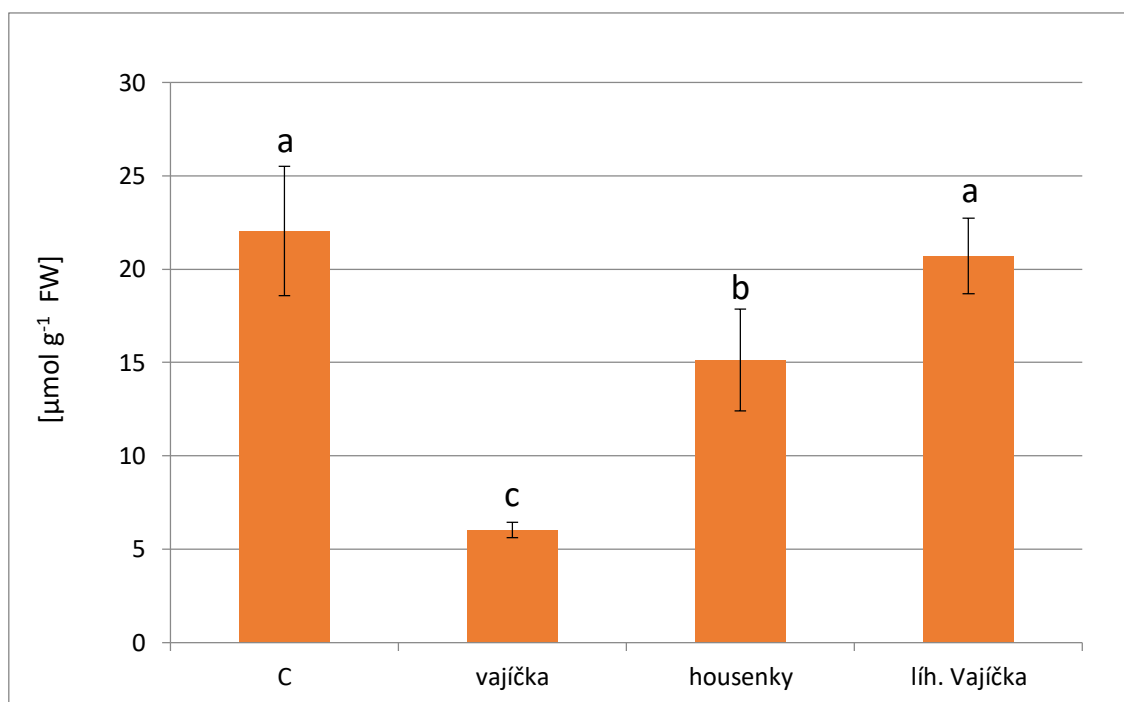
3.4.1 Jednorozměrná analýza rozptylu (Anova) a Tukeyho test

Všechny naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí jednorozměrné analýzy rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 %. Což znamená, že pokud je hodnota $P < 0,05$, pak to znamená, že mezi naměřenými hodnotami jsou signifikantní rozdíly a je to také nejmenší hladina, na které zamítáme. Pro porovnání rozdílů můžeme použít tzv. Tukeyho test, který patří mezi tzv. Post-hoc testy. Tento test nám zjistí, zda jsou rozdíly pouze uvnitř konkrétní skupiny nebo mezi skupinami navzájem. Tukeyho test se využívá, pokud porovnáváme stejně početné výběry.

4 Výsledky

V této kapitole jsou shrnuty výstupy z praktické části diplomové práce. Pomocí grafů jsou zde znázorněny reakce rostliny na napadení fytofágním hmyzem. Byl zkoumán vliv nakladení vajíček, žíru housenek a líhnoucích se vajíček motýlů z čeledi běláskovitých. Od každé varianty byly zhotoveny tři verze a z každé provedeny 3 opakování. Pro jednotlivé analýzy bylo tedy k dispozici 36 vzorků. Výsledky experimentu zaznamenávají změny v koncentracích u jednotlivých primárních a sekundárních metabolitů v závislosti na způsobu napadení rostliny. Grafy znázorňují průměrné hodnoty z každé varianty a jsou doplněny chybovými úsečkami. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Písmena nad jednotlivými sloupci značí, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší ($P < 0,05$). Statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách jsou označeny a, b, c, d. Tabulky se zpracovanými daty z měření jsou uvedeny v příloze diplomové práce.

4.1 Obsah peroxidu vodíku

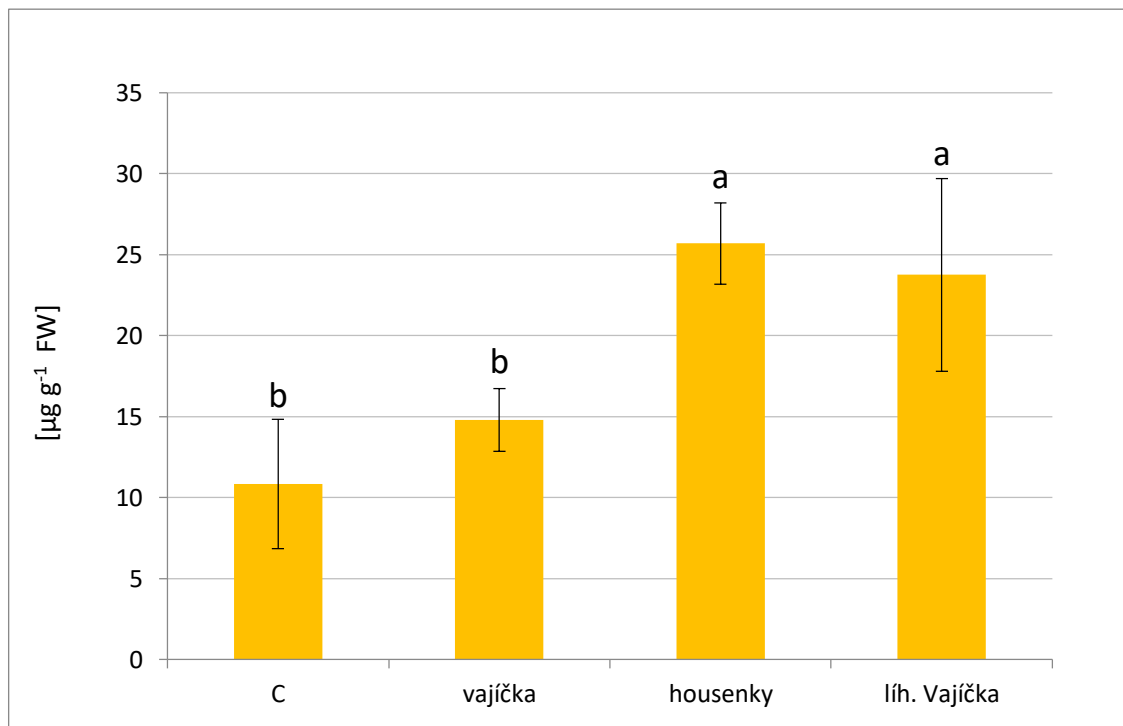


Graf č. 1: Obsah peroxidu vodíku v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - $P < 0,05$).

Graf č. 1 zaznamenává změny obsahu peroxidu vodíku u jednotlivých zkoumaných variant. Výsledky Tukeyho testu znázorněné odlišnými písmeny nad jednotlivými sloupci znamenají, že mezi nimi byly zjištěny statisticky významné rozdíly. Největší snížení obsahu peroxidu vodíku bylo zaznamenáno mezi variantami kontrola a vajíčka, kde došlo k poklesu o 266 %. Největší nárůst byl naopak zaznamenán mezi variantami vajíčka a líhnoucí se vajíčka kde došlo ke zvýšení obsahu o 244 %. Varianta

s housenkami se oproti variantě s vajíčky zvýšila o 37 %. Oproti variantě kontrola se snížil obsah peroxidu vodíku u varianty s vajíčky a s housenkami. Mezi kontrolou a variantou s líhnoúícími se vajíčky nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

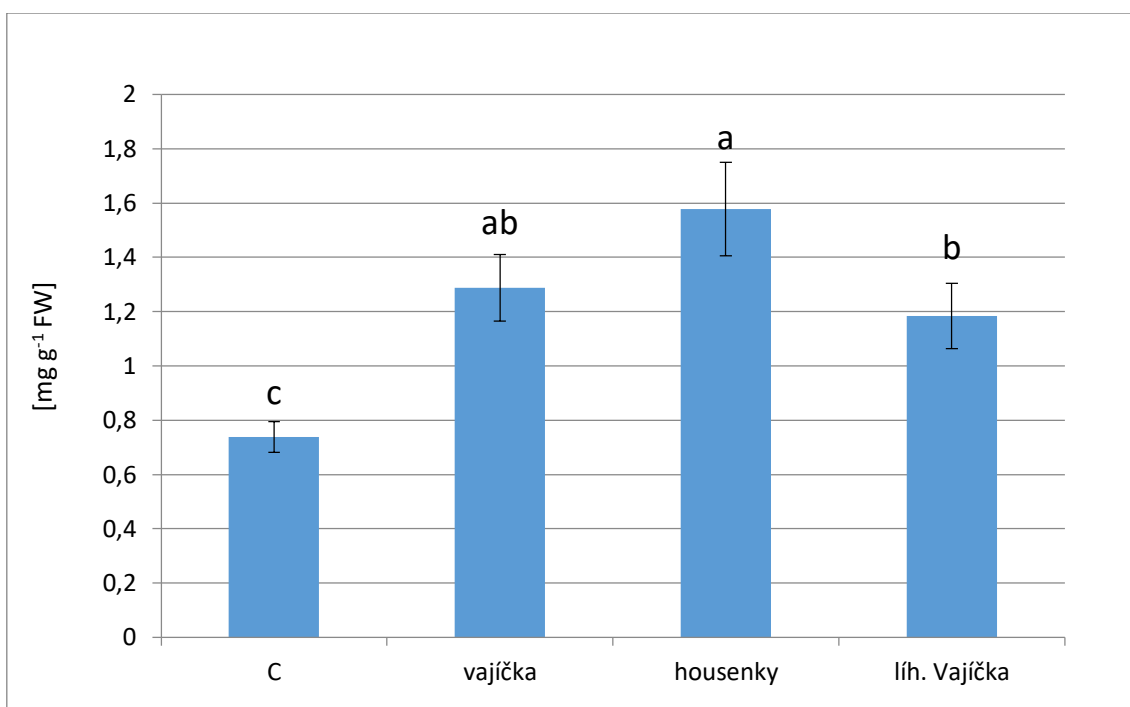
4.2 Obsah superoxidového radikálu



Graf č. 2: Obsah superoxidu v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b - $P < 0,05$).

Z grafu č. 2, který zaznamenává změnu obsahu superoxidu, je patrné že u všech variant došlo k nárůstu oproti kontrole. V případě varianty vajíčka však nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl, průměrné hodnoty obsahu přesto zaznamenávají mírný nárůst ve prospěch varianty vajíčka. Kdežto u variant housenky a líhnoúící se vajíčka došlo v obou případech k významnému nárůstu obsahu superoxidu. Konkrétně u varianty housenky došlo oproti kontrole k nárůstu o 137 % a u varianty líhnoúící se vajíčka došlo ke zvýšení o 118 %. Nárůst obsahu superoxidu u varianty housenky oproti variantě vajíčka byl o 74 %.

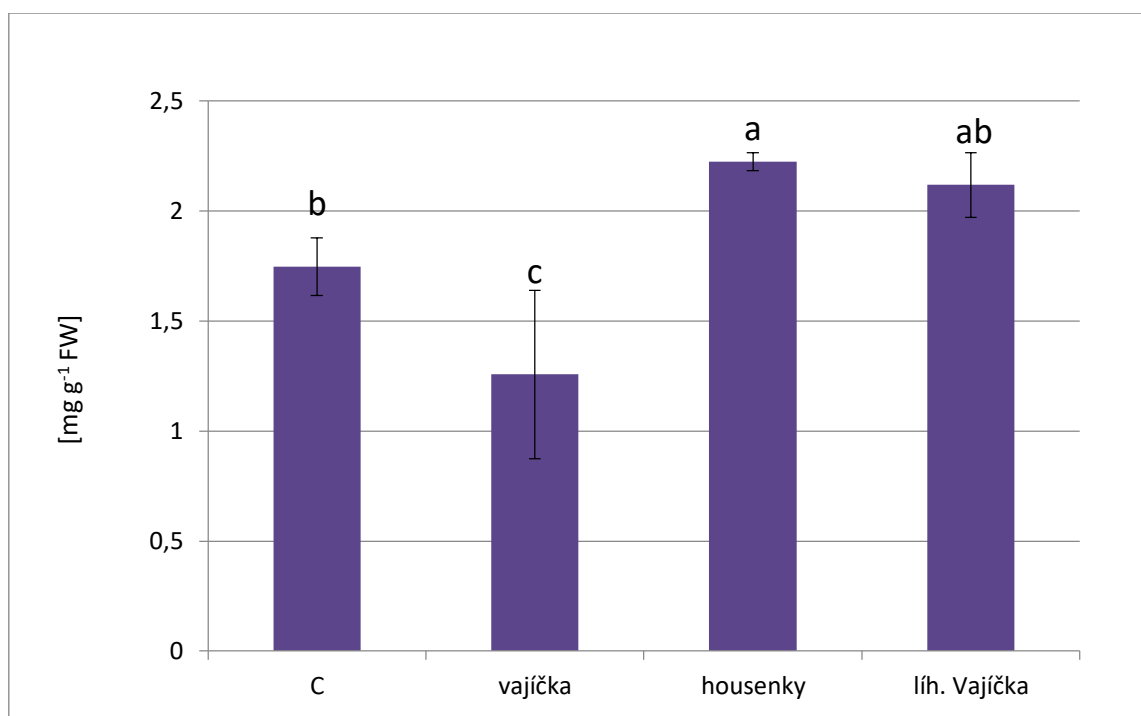
4.3 Obsah celkových rozpustných fenolů



Graf č. 3: Obsah celkových rozpustných fenolů v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - $P < 0,05$).

Graf č. 3 zaznamenává výrazné změny v obsahu celkových rozpustných fenolů u všech sledovaných variant oproti kontrole. U variant vajíčka a housenky došlo k statisticky významnému nárůstu ve vztahu ke kontrole. Konkrétně v případě varianty vajíčka byl nárůst 74% a u varianty housenky 114%. U varianty líhnoucí se vajíčka bylo zaznamenáno také signifikantní zvýšení obsahu fenolů oproti kontrole. Ale tento nárůst byl nižší než u výše zmíněných variant, a to 60%.

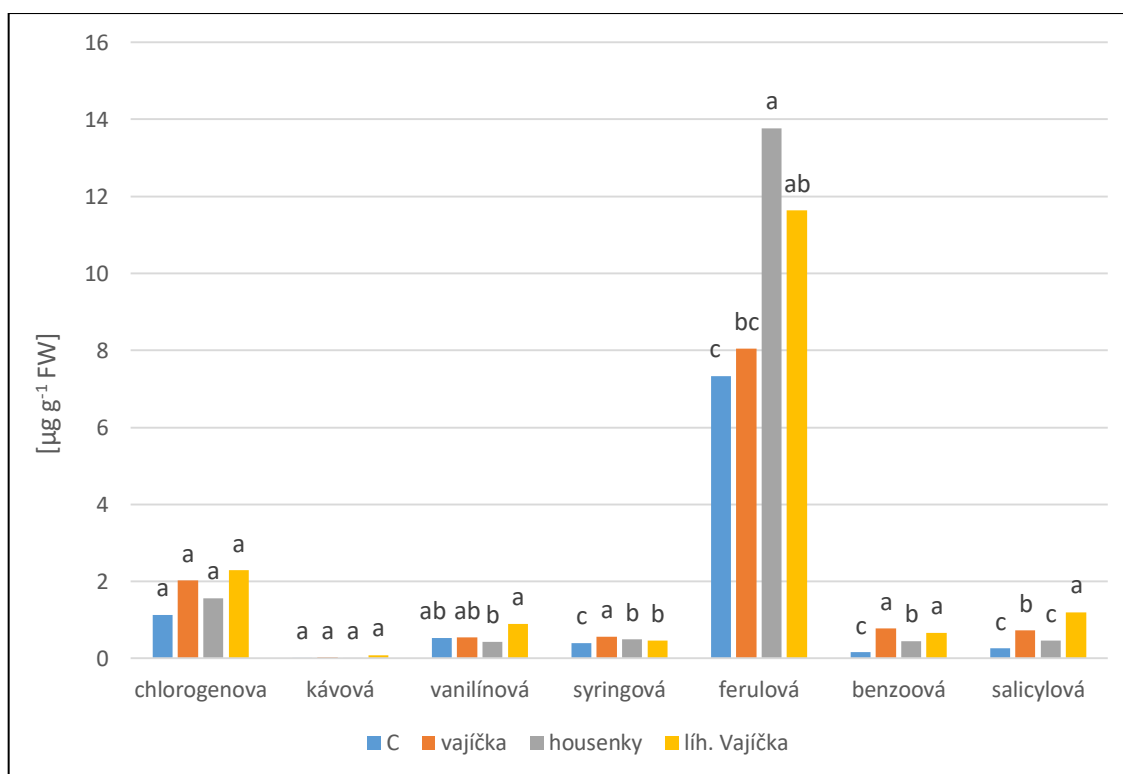
4.4 Obsah celkových flavonoidů



Graf č. 4: Obsah celkových flavonoidů v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - P < 0,05).

Z grafu č. 4 je patrné zvýšení obsahu flavonoidů ve vztahu ke kontrole u variant housenky a líhnoucí se vajíčka. Statisticky významný nárůst byl však zaznamenán pouze u varianty housenky. Konkrétně jde o 27% zvýšení obsahu sledované látky. U varianty vajíčka lze pozorovat naopak pokles oproti kontrolní variantě. Obsah flavonoidů u vajíček se tedy snížil o 39 %. Největší rozdíl průměrných hodnot byl zaznamenán mezi variantou vajíčka a housenky a stejně tak podle Tukeyho testu jsou hodnoty sloupců nejvíce signifikantně odlišné.

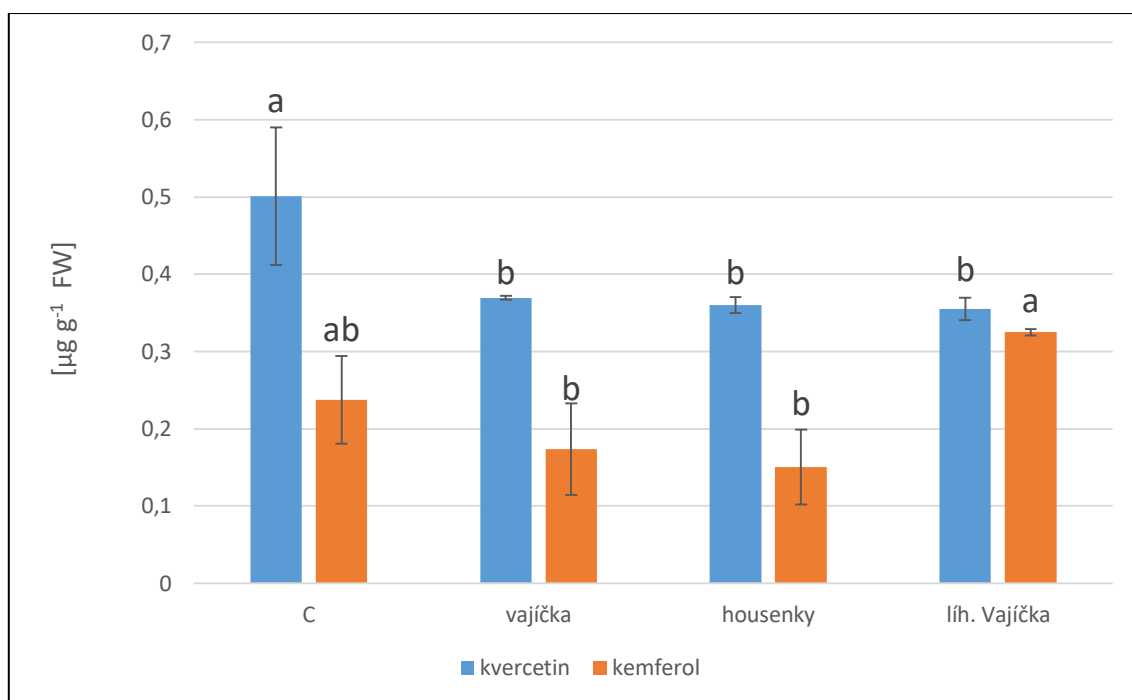
4.5 Obsah fenolových kyselin



Graf č. 5: Obsah fenolových kyselin v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - $P < 0,05$).

Z grafu č. 5 je patrné, že nejzásadnější změny v obsahu fenolových kyselin se udály v případě kyseliny ferulové, syringové, benzoové, salicylové a vanilínové. U ostatních analyzovaných fenolových kyselin nebyly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami. V případě kyseliny kávové došlo k největšímu nárůstu oproti kontrole u varianty líhnoucí se vajíčka. Obsah kyseliny chlorogenové se ve vztahu ke kontrole zvýšil u všech variant, nejvíce však u varianty líhnoucí se vajíčka. Obsah kyseliny vanilínové se významně zvýšil u varianty líhnoucí se vajíčka oproti variantě housenky, kdy se jednalo o 104% nárůst. Mezi kontrolou a ostatními variantami nebyl rozdíl statisticky průkazný. U kyseliny syringové došlo u všech variant k statisticky významnému nárůstu oproti kontrole, u vajíček o 41 %, u housenek 23 % a u líhnoucích se vajíček o 17 %. Z analýzy kyseliny ferulové vyplývá, že došlo k nárůstu u všech variant ve vztahu ke kontrolnímu vzorku. Statisticky průkazný je však pouze nárůst u varianty housenky a líhnoucí se vajíčka. Nejdynamičtější nárůst se prokázal u varianty s housenkami, a to o 88 %, k vysokému nárůstu došlo i u varianty líhnoucí se vajíčka, zde byl 59%. Statisticky průkazný nárůst obsahu kyseliny benzoové oproti kontrole byl zaznamenán u všech ostatních variant. Největší nárůst o 380 % byl u varianty s vajíčky. Dále u varianty housenky došlo ke zvýšení o 181 % a u líhnoucích se vajíček o 317 %. Obsah kyseliny salicylové se oproti kontrole významně zvýšil pouze u varianty s vajíčky – o 183 % a s líhnoucími se vajíčky – o 368 %. U varianty s housenkami se statistický rozdíl nepotvrdil.

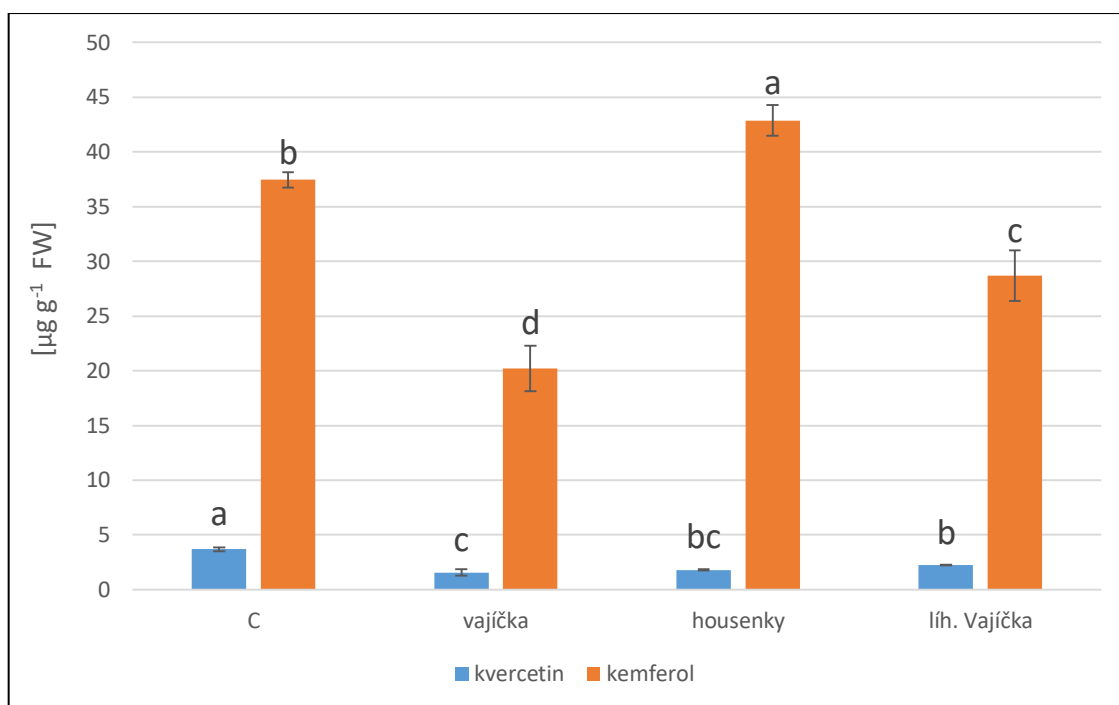
4.6 Obsah kvercetinu a kemferolu



Graf č. 6: Obsah kvercetinu a kemferolu v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b - $P < 0,05$).

Z grafu č. 6 můžeme vyčíst, že obsah kvercetinu se oproti kontrole statisticky průkazně snížil u všech variant. K největšímu poklesu došlo u varianty líhnoucí se vajíčka, a to o 41 %. Výsledek analýzy kemferolu neprokázal statisticky významné rozdíly u žádné varianty ve vztahu ke kontrole. K největšímu rozdílu v obsahu došlo mezi housenkami a líhnoucími se vajíčky (o 117 %).

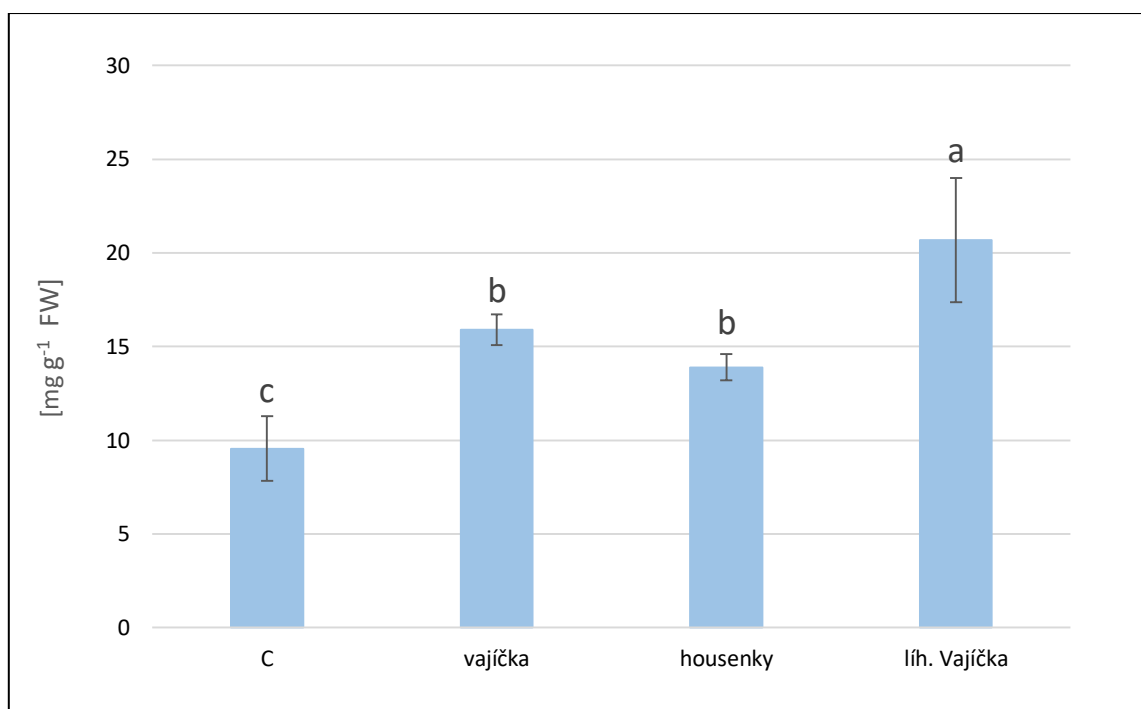
4.7 Obsah kvercetinu a kemferolu po kyselé hydrolýze



Graf č. 7: Obsah kvercetinu a kemferolu po kyselé hydrolýze v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c, d - $P < 0,05$).

Obsah kvercetinu po kyselé hydrolýze u jednotlivých variant zaznamenává graf č. 7. Nejvyšší obsah byl zjištěn u varianty kontrola a u ostatních variant se statisticky průkazně snížil. K největšímu úbytku došlo u varianty vajíčka – o 138 %. Analýza kemferolu prokázala signifikantní nárůst jeho obsahu oproti kontrole u varianty housenky, zde došlo k 15% zvýšení. Statisticky průkazné snížení ve vztahu ke kontrole bylo zjištěno u varianty vajíčka (o 85 %) a líhnoucí se vajíčka (o 30 %). Největší rozmezí hodnot obsahu bylo naměřeno mezi variantou vajíčka a housenky, jejich rozdíl je více než dvojnásobný.

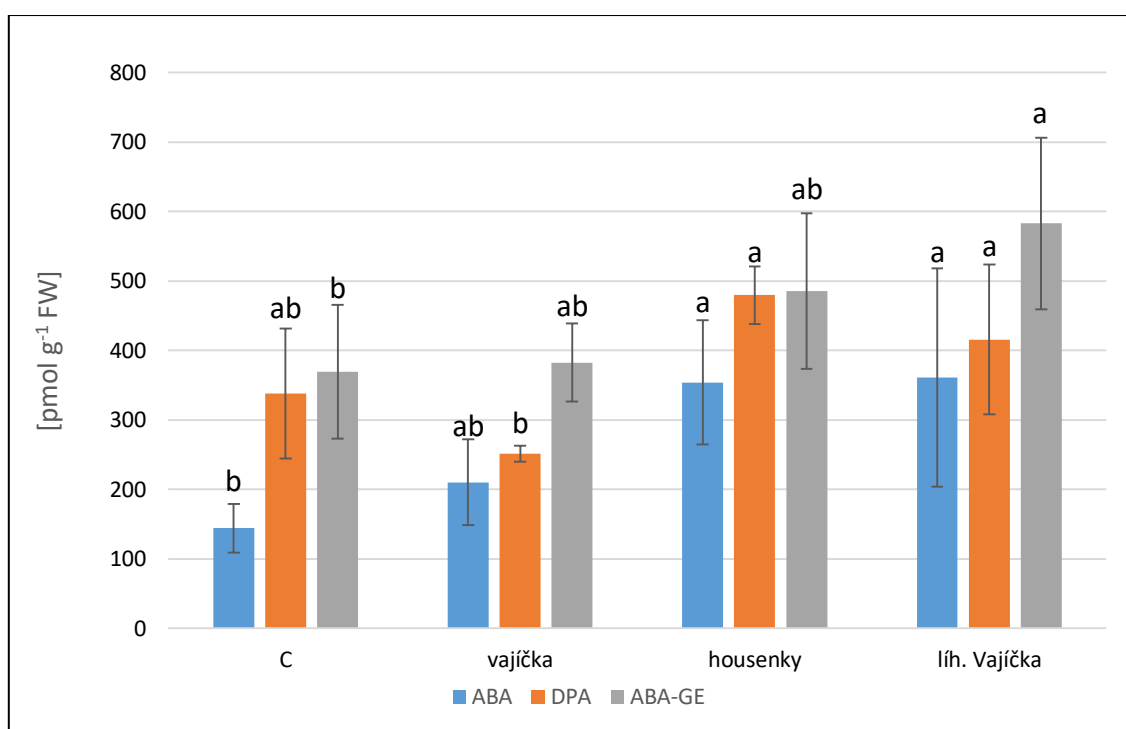
4.8 Obsah celkových rozpustných proteinů



Graf č. 8: Obsah celkových rozpustných proteinů v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - $P < 0,05$).

Graf č. 8 zaznamenává rozdíly v obsahu celkových rozpustných proteinů u jednotlivých sledovaných variant. K signifikantnímu nárůstu obsahu oproti kontrole došlo u všech variant a tím, že nejvyšší nárůst byl zaznamenán u varianty s líhnoucími se vajíčky - o 116 % a nejnižší u varianty housenky - o 45 %. Statisticky významný nárůst je také mezi variantou vajíčka a líhnoucí se vajíčka (30%) a housenky a líhnoucí se vajíčka (49%). Mezi variantami vajíčka a housenky nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, dle průměrných naměřených hodnot je varianta s housenkami o 2 [mg/g FW] nižší než variant s vajíčky.

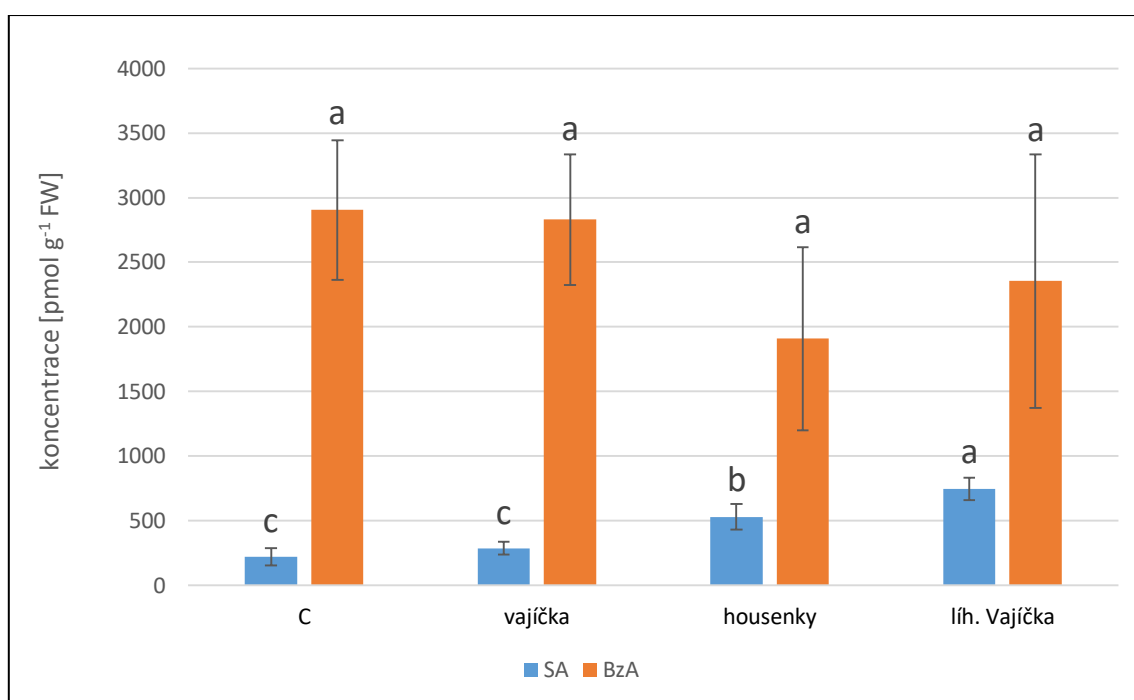
4.9 Obsah kyseliny abscisové (ABA), (DPA, ABA-GE)



Graf č. 9: Obsah kyseliny abscisové (ABA) a jejích metabolických forem (DPA, ABA-GE) v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b - $P < 0,05$).

Graf č. 9 zaznamenává výsledky analýzy kyseliny abscisové, kyseliny dihydrofazeové - DPA (deaktivační produkt) a glukosylesteru kyseliny abscisové - ABA-GE (zásobní forma). V případě ABA byl zjištěn signifikantní nárůst oproti kontrole u varianty housenky a líhnoucí se vajíčka. Mezi kontrolou a rostlinami s nakladenými vajíčky se statisticky průkazný rozdíl nepotvrdil, přesto ale došlo k mírnému nárůstu ABA u varianty vajíčka. Analýza DPA potvrdila mírný nárůst variant housenky a líhnoucí se vajíčka ve vztahu ke kontrolnímu vzorku, ale signifikantní rozdíl zde prokázán nebyl. Statisticky významný byl nárůst u varianty housenky (o 91 %) a líhnoucí se vajíčka (o 65 %) oproti variantě s vajíčky. Postupný nárůst mezi jednotlivými variantami oproti kontrole byl zaznamenán u výsledků ABA-GE. Statisticky průkazný je však pouze nárůst v případě líhnoucích se vajíček ve vztahu ke kontrolnímu vzorku, a to o 57 %.

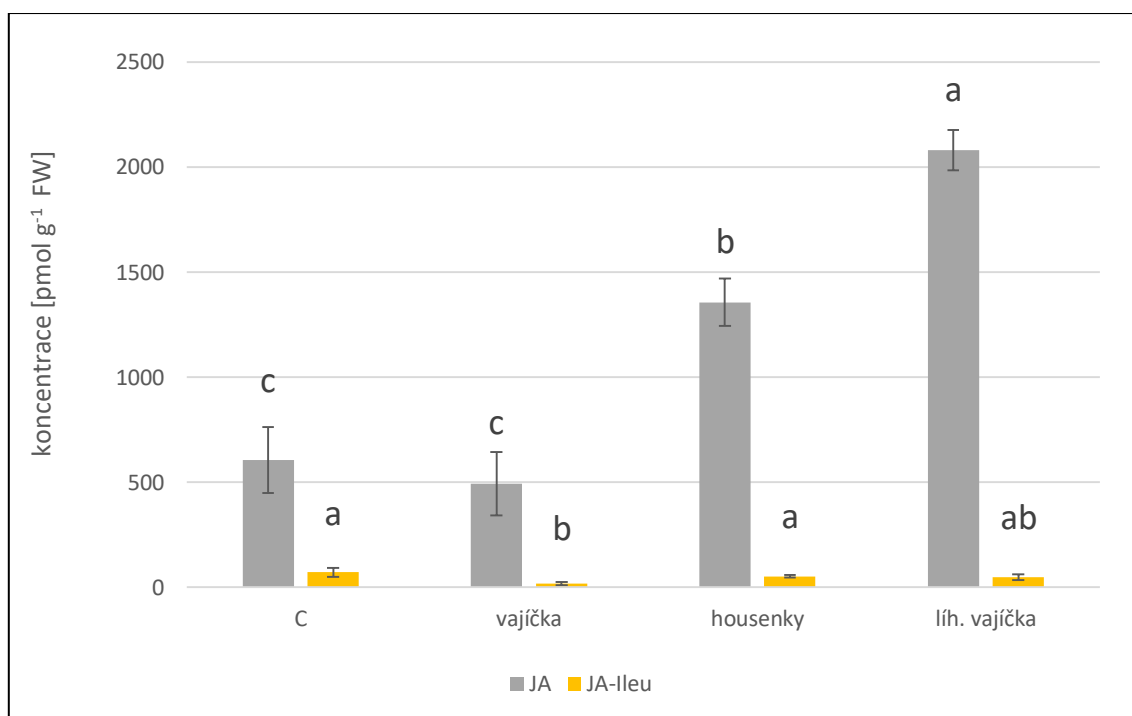
4.10 Obsah kyseliny salicylové (SA) a kyseliny benzoové (BzA)



Graf č. 10: Obsah kyseliny salicylové (SA) a kyseliny benzoové (BzA) v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - $P < 0,05$).

V případě analýzy kyseliny salicylové se její obsah oproti kontrole signifikantně zvýšil u varianty housenky a líhnoucí se vajíčka, jak je vidět v grafu č. 10. Zvýšení obsahu SA u varianty housenky bylo 140% a u varianty líhnoucí se vajíčka 239%. Statisticky průkazný byl i nárůst obsahu SA v případě líhnoucích se vajíček ve vztahu k variantě housenky, konkrétně o 41 %. V případě sledované látky BzA nedošlo k statisticky významnému nárůstu obsahu v rámci jednotlivých variant. Přesto lze z průměrných hodnot měření zaznamenat výraznější pokles obsahu BzA u varianty s housenkami a s líhnoucími se vajíčky oproti druhým dvěma variantám.

4.11 Obsah jasmonátů (JA a JA-ileu)



Graf č. 11: Obsah kyseliny jasmonové (JA) a jasmonát-izoleucinu (JA-ileu) v listech brukve zelné u jednotlivých variant. Tukey test (a, b, c - $P < 0,05$).

Jak lze vyčíst z grafu č. 11, nejvyšší obsah kyseliny jasmonové (JA) byl naměřen u rostlin slíhnocími se vajíčky bělásků. Oproti kontrole došlo k statisticky průkaznému nárůstu o 243 %. Signifikantní nárůst oproti kontrolnímu vzorku byl zaznamenán také u rostlin vystavených okusu housenek, zde šlo o 124% zvýšení obsahu sledované látky. Mezi kontrolou a variantou s vajíčky došlo k statisticky neprůkaznému snížení obsahu o 23 %. Největší a statisticky významný rozdíl mezi naměřenými hodnotami byl v mezi variantami vajíčka a líh. vajíčka, jde o 321% nárůst. V případě jasmonát-izoleucinu (JA-ileu) došlo u rostlin s nakladenými vajíčky k signifikantnímu poklesu obsahu oproti kontrole. Mezi ostatními variantami nedošlo ve vztahu ke kontrole k žádné statisticky významné změně v obsahu sledované látky.

5 Diskuze

Tato experimentální diplomová práce byla zaměřena na sledování změn v produkci vybraných metabolitů u zelí v závislosti na způsobu napadení motýly z čeledi běláskovitých. Zelí napěstované v optimálních laboratorních podmínkách v pěstební komoře Fytotron bylo podrobena různým formám biotického stresu. Byl zkoumán vliv: napadení housenkami, naklazení vajíček a líhnoucích se vajíček. Následně byly provedeny analýzy vybraných metabolitů, u kterých se předpokládala změna jejich obsahu při působení biotického stresu. Testovanými obsahovými látkami byly reaktivní formy kyslíku – peroxid vodíku a superoxidový radikál, fenolické látky – celkové rozpustné fenoly, celkové flavonoidy a jednotlivé fenolické kyseliny (chlorogenová, kávová, vanilínová, syringová, ferulová, benzoová a salicylová), dále byly testovány celkové rozpustné proteiny a fytohormony, konkrétně kyselina abscisová (ABA) a její metabolické formy (DPA a ABA-GE), kyselina salicylová (SA), kyselina benzoová (BzA), kyselina jasmonová (JA) a jasmonát-izoleucin (JA-ileu).

5.1 Změny v hodnotách ROS

Testované rostliny produkovaly po celou dobu experimentu komplex obranných mechanismů v závislosti na míře a typu působícího biotického stresu. Reaktivní formy kyslíku inaktivují enzymy a mohou poškodit důležité buněčné komponenty, zvýšená produkce toxických derivátů kyslíku je považována za univerzální nebo společný znak stresových podmínek (Arora et al., 2002). Dle Fürstenberg-Hägg et al. (2013) dochází při mechanickém narušení pletiv či při infekcích způsobených patogeny ke zvýšené produkci peroxidu vodíku (H_2O_2), což vede k lokální i systémové reakci. Peroxid vodíku je molekula zapojená do signalizační dráhy vedoucí k expresi obranných genů. Očekávaným výstupem z analýzy peroxidu vodíku byl nárůst u všech variant oproti kontrole. Výsledky však ukázaly nejvyšší obsah peroxidu vodíku právě u kontroly. Byl zaznamenán signifikantní nárůst mezi variantou s housenkami a s líhnoucími se vajíčky oproti variantě s vajíčky. Lze tedy usuzovat, že vyšší obsah peroxidu vodíku produkují rostliny napadené přímým okusem rostlinných pletiv oproti rostlinám, na které byla nakladena vajíčka. Tento nárůst však není relevantní z hlediska celkového pohledu na výsledek analýzy. Oproti kontrole došlo k signifikantnímu poklesu obsahu peroxidu vodíku u varianty vajíčka a housenky a u varianty líhnoucí se vajíčka ve vztahu ke kontrole nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Výsledek této analýzy naznačuje, že rostliny vyvinuly dostatečně účinné obranné mechanismy, které chrání buňky před oxidativním poškozením. Nízké hladiny ROS jsou udržovány antioxidační aktivitou sekundárních metabolitů a obranných enzymů (Maffei et al., 2007; Hernández et al., 2009) Z výsledků analýzy superoxidového radikálu je patrné, že jeho produkce byla vyšší u rostlin napadených přímým okusem housenek bělásků než u rostlin s nakladenými hmyzími vajíčky, podobně jako u peroxidu vodíku. V případě superoxidu však došlo u všech variant k nárůstu jeho obsahu oproti kontrole. Také v případě studie Kovalíková et al. (2019) se koncentrace superoxidového radikálu zvýšila téměř u všech rostlin vystavených napadení hmyzích škůdců.

5.2 Změny v hodnotách fenolických látek a flavonoidů

Tento experiment se zaměřil také na výzkum změn v produkci sekundárních metabolitů. V tomto případě byl analyzován obsah celkových rozpustných fenolů, celkových flavonoidů a fenolových kyselin. Fenolické látky hrají hlavní roli v obraně proti herbivorům včetně hmyzu, na který působí repelentně až toxicky a způsobují inhibici enzymů (Furstenberg-Hagg et al., 2013). Hmyzí herbivoři vyvolávají v rostlinách reakci v podobě kvalitativní a kvantitativní změny v obsahu fenolických látek, čímž se zvyšuje jejich antioxidační aktivita (War et al., 2012). Předpokladem pro jednotlivé analýzy fenolických látek bylo zvýšení jejich obsahu při napadení škůdci z čeledi běláskovitých ve vztahu ke kontrole. Analýza celkových rozpustných fenolů tuto hypotézu potvrdila. U všech testovaných rostlin, které byly napadeny běláskem, se statisticky průkazně zvýšil obsah fenolů oproti kontrole (viz graf č. 3). Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u varianty s housenkami, kde byl nárůst dvojnásobný oproti kontrole. Tento experiment tedy potvrzuje, že působení bělásků na rostliny zelí se projevuje zvýšenou produkcí fenolických látek. Produkce fenolů je indukována ve větší míře u rostlin napadených housenkami, tedy přímým mechanickým poraněním pletiv. Analýza flavonoidů taktéž prokázala nejvyšší signifikantní nárůst jejich obsahu oproti kontrole u varianty housenky. Statisticky významný pokles obsahu byl naměřen u varianty svajíčky. Můžeme tedy konstatovat, že na biotický stres způsobený bělásky reagovaly rostliny zelí zvýšenou produkcí flavonoidů, ale naklazením motýlích vajíček se celkový obsah fenolů v rostlinách nezvýšil. Analýza na flavonoidy kvercetin a kemferol nevyšla v případě analýzy extraktu nijak průkazně. Došlo k signifikantnímu snížení obsahu kvercetinu u všech variant oproti kontrole. A u kemferolu se neprokázal žádný signifikantní rozdíl hodnot. Kyselá hydrolýza těchto látek prokázala v případě kvercetinu signifikantní pokles jeho obsahu u všech variant ve vztahu ke kontrole. Obsah kemferolu se signifikantně zvýšil oproti kontrole pouze u varianty s housenkami, v ostatních variantách došlo k jeho statisticky průkaznému poklesu. Důvodem poměrně nízkého obsahu flavonoidů by mohlo být přesměrování obrany na jiné obranné mechanismy, například ve formě obranných proteinů či jiných fenolických látek. Analýza fenolových kyselin a jejich relativní zastoupení zobrazuje graf č. 5. Statisticky průkazné zvýšení obsahu u všech variant oproti kontrole se prokázalo u kyseliny ferulové, syringové a benzoové. Z výsledků této analýzy lze usoudit, že jmenované fenolové kyseliny mají největší podíl v obraně proti běláskovitým motýlům.

5.3 Změny v hodnotách celkových rozpustných proteinů

Fytohormony, které hrají ústřední roli v obranných reakcích rostlin, aktivují geny, které kódují detoxikační a antioxidační enzymy a obranné proteiny (Slaymaker et al., 2002). Předpokládaným výsledkem analýzy celkových rozpustných proteinů byl nárůst jejich obsahu u jednotlivých variant ve vztahu ke kontrolnímu vzorku s rostlinami, které nebyly ovlivněny biotickým stresem. Výsledky analýzy potvrdily tuto hypotézu, jak je znázorněno v grafu č. 8. K signifikantnímu nárůstu došlo u všech testovaných variant oproti kontrole. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u

varianty líhnoucí se vajíčka, došlo zde k dvojnásobnému nárůstu obsahu sledované látky. K signifikantnímu nárůstu oproti kontrole došlo i u varianty vajíčka, kdy byl naměřený obsah proteinů dokonce vyšší než u varianty housenky. Nebyl však prokázán statisticky významný rozdíl mezi variantou vajíčka a housenky. Rostliny napadené motýly z čeledi běláskovitých vyprodukovaly oproti rostlinám, které nebyly vystaveny biotickému stresu, signifikantně vyšší obsah proteinů. Prokazatelné zvýšení bylo zaznamenáno u varianty vajíčka, housenky i líhnoucí se vajíčka. Studie Ibrahim et al. (2018), která zkoumala obranné mechanismy rostlin na kapustě při napadení běláskem *Pieris brassicae*, došla k podobným výsledkům. Z této studie vyplývá, že se obsah celkových rozpustných proteinů signifikantně zvýšil při napadení hmyzími škůdci oproti nenapadeným rostlinám. Také Chen et al. (2009), který zkoumal změny v produkci metabolitů u kukuřice napadené blýskavkou kukuřičnou (*Spodoptera frugiper*), zaznamenal prokazatelné zvýšení proteinů u napadených rostlin. Zvýšený obsah proteinů v rostlinách napadených hmyzími herbivory je přičítán indukci rostlinných obranných enzymů a dalších enzymatických obranných proteinů zapojených do ochrany rostlin proti hmyzím škůdcům (War et al., 2011)

5.4 Změny v hodnotách fytohormonů

Kyselina jasmonová a salicylová i abscisová jsou zapojeny do procesu regulace obranných reakcí rostlin proti různým abiotickým stresům, patogenům a škůdcům (Glazebrook 2005; Lorenzo a Solano 2005). Křížení signálních drah kyseliny salicylové a kyseliny jasmonové může vést k inhibici obranných reakcí zprostředkovaných kyselinou jasmonovou (van Wees et al., 2000). Kyselina jasmonová také interaguje s ethylenem, H_2O_2 , ABA a SA a snižuje expresi cílových genů v procesu obrany proti biotickému stresu (Furstenberg-Hagg et al., 2013). Předpokládaným výstupem z analýzy fytohormonů bylo zvýšení obsahu konkrétního fytohormonu v porovnání s kontrolou. V případě kyseliny abscisové (ABA) došlo k předpokládanému zvýšení jejího obsahu u všech variant oproti kontrole. Signifikantní byl však nárůst pouze u varianty housenky a líhnoucí se vajíčka. Tento výsledek naznačuje, že naklazením vajíček se indukuje nižší obsah ABA než v případě přímého mechanického poškození pletiv způsobeného housenkami běláskovitých. Analýza DPA neprokázala signifikantní změny v jejím obsahu u žádné z variant oproti kontrole. V případě analýza ABA-GE se statisticky průkazně zvýšil obsah tohoto metabolitu oproti kontrole u varianty líhnoucí se vajíčka. Analýza kyseliny salicylové (SA) dokládá signifikantní nárůst jejího obsahu ve vztahu ke kontrolnímu vzorku u varianty housenky a líhnoucí se vajíčka. Mezi kontrolou a variantou vajíčka nedošlo k statisticky průkazné změně v obsahu SA. Obsah kyseliny benzoové (BzA) se signifikantně nezměnil u žádné z variant. Hodnoty jsou graficky zpracovány v grafu č. 10. Obsah kyseliny jasmonové (JA) se dle provedené analýzy statisticky významně zvýšil oproti kontrole v případě varianty housenky a líhnoucí se vajíčka. K nejvýraznějšímu nárůstu došlo u varianty líhnoucí se vajíčka, kdy se obsah JA zvýšil téměř 3,5krát. U varianty s vajíčky nedošlo k signifikantnímu rozdílu v obsahu JA. Změna obsah JA-ileu se statisticky významně neprojevila u žádné z variant, pouze u varianty s vajíčky došlo k signifikantnímu

poklesu. Můžeme tedy konstatovat, že předpokládaná hypotéza se potvrdila u fytohormonů JA, SA i ABA, u kterých došlo k signifikantnímu nárůstu ve vztahu ke kontrole u variant housenky a líhnoucí se vajíčka. Výsledky ukazují, že fytohormony SA, JA i ABA působí synergicky v rámci obrany proti útoku hmyzích herbivorů. Obsah zmíněných fytohormonů se signifikantně zvýšil vždy při poškození pletiv housenkami, ať už dospělými či čerstvě vylíhnutými. Z výsledků stanovení fytohormonů můžeme vyvodit, že rostliny reagují na poranění pletiv, způsobené housenkami běláskovitých, zvýšenou produkcí fytohormonů a to zejména kyseliny jasmonové. Obsah JA u varianty líhnoucí se vajíčka se oproti SA zvýšil 2,8krát a u ABA 5,8krát. Výzkum Ibrahim et al. (2018) provedený na kapustě při napadení běláskem *Pieris brassicae* prokázal, že u rostlin ošetřených kyselinou jasmonovou a následně napadených hmyzem, se signifikantně zvýšily hladiny fenolů. Což je pravděpodobně způsobeno silnou indukcí signálních drah rostlin JA a SA, při napadení hmyzem. S podobnými výsledky přichází i výzkum War et al. (2015), Výsledky dokazují, že JA a SA byly zapojeny do indukce aktivity antioxidantních enzymů v rostlinách podzemnice olejné proti *Helicoverpa armigera* a snížily její růst a vývoj. Indukovaná odpověď na aplikaci JA byla však větší než na SA. Vysoký obsah kyseliny jasmonové, který byl prokázán při napadení rostlin zelí housenkami bělásků, pravděpodobně vypovídá o indukci signálních drah v reakci na přímé poškození pletiv. Podobně jako je prezentováno ve zmíněných výzkumných pracích.

6 Závěr

Tato diplomová práce, se zabývala výzkumem změn v obsahu vybraných metabolitů v rostlinách zelí v důsledku napadení motýly z čeledi běláskovitých. Z provedeného výzkumu lze vyvodit následující závěry.

- U rostlin napadených motýly z čeledi běláskovitých se projevíly změny metabolismu stresových sloučenin. A to jak na úrovni primárního, tak sekundárního metabolismu.
- Produkce ROS byla signifikantně vyšší u rostlin napadených přímým okusem housenek bělásků než u rostlin s nakladenými hmyzími vajíčky.
- Působení bělásků na rostliny zelí se projevilo signifikantně zvýšenou produkcí fenolických látek u všech sledovaných variant.
- Na biotický stres způsobený bělásky reagovaly rostliny zelí zvýšenou produkcí flavonoidů, ale nakladením motýlích vajíček se celkový obsah fenolů v rostlinách nezvýšil.
- Fenolové kyseliny mají, dle provedených analýz, signifikantní podíl v obraně proti běláskovitým motýlům, zejména kyseliny - ferulová, syringová a benzoová.
- Rostliny napadené motýly z čeledi běláskovitých, ve všech sledovaných variantách vyprodukovaly oproti rostlinám, které nebyly vystaveny biotickému stresu, signifikantně vyšší obsah celkových rozpustných proteinů.
- Obsah fytohormonů JA, SA a ABA se signifikantně zvýšil vždy při poškození pletiv housenkami, ať už dospělými či čerstvě vylíhnutými.
- Rostliny reagovaly na poranění pletiv, způsobeného housenkami běláskovitých, signifikantně zvýšenou produkcí fytohormonů a to zejména kyseliny jasmonové.

Výzkum mechanismů obrany rostlin proti napadení hmyzími herbivory již přinesl určitá konkrétní data, která objasňují některé principy, funkce a pochody odehrávající se v rostlinách při působení biotického stresu. Jde však o velmi sofistikovaný a komplexní systém, jehož rozsah byl naznačen i v této práci. Bylo by za potřebí dalších navazujících experimentů a výzkumných prací, které by přinesly další poznatky v této oblasti. Každoroční boj s hmyzími škůdci spolu s aktuálním vlivem extrémního sucha způsobují nemalé ztráty na zemědělských výnosech. Poznání v této oblasti by mohlo přinést nové pohledy na ochranu polních plodin. V ideálním případě by důkladná znalost obranných mechanismů mohla přinést klíč k vyvinutí insekticidů založených na přírodní bázi.

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Bělásek zelný - samec a samice (Dvořák, 2020).....	14
Obrázek č. 2: Bělásek řepový - samec a samice (Dvořák, 2020).....	15
Obrázek č. 3: Bělásek řepkový - samec a samice (Dvořák, 2020).....	15
Obrázek č. 4: Rostlinné obranné mechanismy proti hmyzím škůdcům. Upraveno dle War et al. (2018).....	17
Obrázek č. 5: Propojení signálních drah při působení abiotických a biotických stresů. Legenda: ABA-kyselina abscisová; SA - kyselina salicylová; JA - kyselina jasmonová; ET - ethylen; MAP Kinázy -mitogenyaktivované proteinkinasy. Upraveno dle Fujita et al. (2006).....	20
Obrázek č. 6: Události probíhající v rostlině při útoku hmyzích herbivorů. Změny v transmembránovém potenciálu (Vm) nastanou již v okamžiku, kdy herbivor poškozují rostlinu a jsou těsně následovány změnami v koncentraci intracelulárních iontů Ca ²⁺ a produkci H ₂ O ₂ . Kinázy a fytohormon kyselina jasmonová (JA) jsou zaznamenatelné v řádu minut. Po necelé hodině jsou aktivovány geny a následují metabolické změny. Převzato z Fürstenberg-Hägg et al. (2013).....	22
Obrázek č. 7: Přehled reakcí rostliny na naklazení hmyzích vajíček a jejich vliv na interakce mezi rostlinami, herbivory a parazitoidy. Legenda: HIPVs – volatilní látky vyvolané herbivorem, OIPVs – volatilní látky vyvolané naklazením vajíček hmyzu, VOCs – volatilní organické sloučeniny. Upraveno dle Hilker et Fatouros, (2015).....	23
Obrázek č. 8 Chemická struktura glukosinolátu	27
Obrázek č. 9: Štěpení glukosinolátů v procesu obrany proti hmyzím herbivorům. Převzato z Jeschke et Burow (2018).....	27
Obrázek č. 10: Vzorec flavanu	29
Obrázek č. 11: Chemická struktura: kyseliny benzoové (A) a kyseliny skořicové (B).	29
Obrázek č. 12: Napěstované sazenice zelí připravené k experimentu (foto Konečná, 2019).....	30
Obrázek č. 13: Odchyt motýlů z čeledi běláskovitých na lokalitě (foto Tůma, 2019).....	31
Obrázek č. 14: Sběr housenek motýlů z čeledi běláskovitých do epruvet (foto Konečná, 2019).....	31
Obrázek č. 15: Pěstební boxy s rostlinami zelí bílého (foto Konečná, 2019).....	32
Obrázek č. 16: Pěstební box s rostlinami zelí bílého a odchycenými motýly (foto Konečná, 2019).....	32
Obrázek č. 17: Vylíhnuté housenky běláška na rostlině zelí, znečištěném jejich trusem a poškozeném okusem (foto Konečná, 2019).....	33
Obrázek č. 18: Nakladená vajíčka běláška na spodní straně listu zelí bílého (foto Konečná, 2019).....	33

Seznam použité literatury

Agerbirk, N. et al., 2010: *Complex metabolism of aromatic glucosinolates in Pieris rapae caterpillars involving nitrile formation, hydroxylation, demethylation, sulfation, and host plant dependent carboxylic acid formation*. Insect Biochem Mol Biol., 40(2): 126-137 pp.

Ahuja, I. et al., 2010: *Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management*. A review, Agron. Sustain. Dev. 30: 311–348 pp.

Aimura, G. Et al., 2009: *Chemical and Molecular Ecology of Herbivore-Induced Plant Volatiles: Proximate Factors and Their Ultimate Functions*. Plant Cell Physiol. 50(5): 911–923 pp.

Arimura, G. I. et al., 2012: *Recent advances in plant early signaling in response to herbivory*. Int. J. Mol. Sci. 12: 3723–3739 pp.

Anu, S. et al., 2018: *Health Benefits of Polyphenolic Compounds*. Indo Am. J. Pharm. Sci., 5: 11563-11568 pp.

Appel, H. et Cocroft, R., 2014: *Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing*. Oecologia 175: 1257–1266 pp.

Arora, A. et al., 2002: *Oxidative stress and antioxidative system in plants*. Curr. Sci. 82: 1227-1238 pp.

Bartwal, A. et al., 2013: *Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses*. J. Plant Growth Regul., 32(1): 216-232 pp.

Beneš, J. et al., 2002: *Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana I / II*. SOM, Praha, 857s.

Berger, S. et al., 2007: *Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions*. J. Exp. Botany 58: 4019-402 pp.

Bhonwong, A. et al., 2009: *Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (Helicoverpa armigera) and beet armyworm (Spodoptera exigua)*. J Chem. Ecol. 35: 28-38 pp.

Bradford, M. M., 1976: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem, 72, 248–254 pp.

Burla, B. et al., 2013: *Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in Arabidopsis*. Plant Physiol., 163(3): 1446-1458 pp.

Cheeke, P. R., 1989: *Toxicants of Plant Origin, Volume IV, Phenolics*; Boca Raton CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Chen, Y. et al., 2009: *Physiological, Nutritional, and Biochemical Bases of Corn Resistance to Foliage-Feeding Fall Armyworm*. J. Chem. Ecol., 35: 297–306.

- Dalal, M. et Chinnusamy, V., 2015: *ABA Receptors: Prospects for Enhancing Biotic and Abiotic Stress Tolerance of Crops*. In: Pandey G. (eds) *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. Springer, New York, NY.
- Dobrev, P. et Kamínek, M., 2002: *Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction*. *J Chromatogr A* 950: 21–29 pp.
- Dobrev, P. et Vankova R., 2012: *Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues*. *Methods Mol. Biol.* 251–261 pp.
- Dučaiová, Z. et al., 2016: *Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation*. *Plant Growth Regul.*, 79: 81–94 pp.
- Ebel, J. et Mithöfer, A., 1998: *Early events in the elicitation of plant defence*. *Planta*, 206, 335–348 pp.
- Engelberth, J., 2006: *Secondary Metabolites and Plant Defense*. In *Plant Physiology*; Taiz, L., Zeiger, E., Eds.; Sinauer Associates: Sunderland, UK, 4: 315–344. 120 pp. Blee, E. *Impact of phyto-oxylipins in plant defense*. *Trends Plant Sci.*, 315–321 pp.
- Feeny P., 1976: *Plantapparency and Chemical Defense*. In: Wallace J. W., Mansell R. L. (eds) *Biochemical Interaction Between Plants and Insects*. Recent Advances in Phytochemistry, 10. Springer, Boston, MA.
- Fischer, R. C. et al., 2002: *Plants feed ants: Food bodies of myrmecophytic piper and their significance for the interaction with *Pheidole bicornis* ants*. *Oecologia*, 133: 186–192 pp.
- Fujita, M. et al., 2006: *Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks*. *Curr. Opin. Plant Bio.*, 9: 436–442 pp.
- Furstenberg-Hagg, J. et al., 2013: *Plant defense against insect herbivores*. *Int J. Mol. Sci.* 14(5): 10242-10297 pp.
- Glazebrook, J., 2005: *Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens*. *Annu Rev. Phytopathol.*, 43: 205–227 pp.
- Gulsen, O. et al., 2010: *Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warmseason turfgrasses challenged by *Blissus occiduus**. *Arthropod-Plant Interact.*, 4: 45-55 pp.
- Hanley, M. E. et al., 2007: *Plant structural traits and their role in antiherbivore defense*. *Perspec. Plant Ecol. Evol. Syst.*, 8: 157 – 178 pp.
- Hause, B. et al., 2003: *Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements*. *Plant Cell Physiol.*, 44: 643–648 pp.
- Heil, M., 2007: *Indirect defence—Recent development and open questions*. *Progress Botany*, 69: 360–395 pp.

- Hernández, I. et al., 2009: *How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?* Trends Plant Sci., 14(3): 125-132 pp.
- Hilker M., Fatouros N., 2015: *Plant Responses to Insect Egg Deposition*. Annu. Rev. Entomol., 60: 493-515 pp.
- Horvath, E. et al., 2007: *Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling*. J. Plant Growth Regul., 26(3): 290–300 pp.
- Ibrahim, S. et al., 2018: *Herbivore and phytohormone induced defensive response in kale against cabbage butterfly, Pieris brassicae Linn*. J. Asia-Pac. Entomol., 21, 367–373 pp.
- Iriti, M. and F. Faoro., 2009: *Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution*. International J. Mol. Sci., 10(8): 3371–3399 pp.
- Jones, P. et Vogt, T., 2001: *Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers*. Planta., 213(2): 164-174 pp.
- Kazda, J. et al., 2008: *Metodika integrované ochrany řepky*, ISBN 978-80-87065-08-2.
- Kawano, T., 2003: *Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction*. Plant Cell Rep., 21: 829–837 pp.
- Kissoudis, C. et al., 2015: *Combined biotic and abiotic stress resistance in tomato*. Euphytica 202: 317–332 pp.
- Kocourek et al., 2017: *Ochrana řepky proti živočišným škůdcům na podzim bez mořidel na bázi neonikotinoidů*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017. ISBN 978-80-7427-251-6.
- Kocourek et al., 2018: *Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům vyjma podzimních škůdců*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 2018. ISBN 978-80-7427-300-1.
- Koiwa, H. et al., 1997: *Regulation of protease inhibitors and plant defense*. Trends Plant. Sci. 2: 379–84 pp.
- Kovalikova, Z. et al., 2019: *Changes in Content of Polyphenols and Ascorbic Acid in Leaves of White Cabbage after Pest Infestation*. Molecules, 24: 2622 p.
- Kuhn, B. M. et al., 2011: *Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in Arabidopsis*. Plant Physiol. 156, 585–595 pp.
- Landa, B. B. et al, 2002: *Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and Fusarium oxysporum*, Can. J. Microbiol., 48(11): 971-985 pp.
- Lewis, D. R. et al., 2011: *Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks*. Plant Physiol. 156: 144–164 pp.
- Li, P. et al., 2013: *Brassinosteroids-induced systemic stress tolerance was associated with increased transcripts of several defence-related genes in the phloem in Cucumis sativus*. PLoS One, 8(6), e66582.

- Little, D. et al., 2007: *Oviposition by Pierid Butterflies Triggers Defense Responses in Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 143: 784–800 pp.
- Lopez, M. A. et al., 2008: *Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 420–427 pp.
- Lorenzo, O. et Solano, R., 2005: *Molecular players regulating the jasmonate signaling network*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 532–540 pp.
- Maffei, M. E. et al., 2007: *Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release*. *Phytochemistry*, 68(22-24): 2946-59 pp.
- Mittler, R., 2006: *Abiotic stress, the field environment and stress combination*. *Trends Plant Sci.*, 11: 15-19 pp.
- Morant, A. V. et al., 2008: *beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense*. *Phytochemistry*, 69:1795 – 1813pp.
- Nejat, N. et Mantri, N. 2017: *Plant Immune System: Crosstalk Between Responses to Biotic and Abiotic Stresses the Missing Link in Understanding Plant Defence*. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 23: 1-16 pp.
- Neuhaus H. E., 2007: *Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane*. *FEBS letters*. 581: 2223-2226 pp.
- Okamura, Y. et al., 2019: *Interspecific Differences in the Larval Performance of Pieris Butterflies (Lepidoptera: Pieridae) Are Associated with Differences in the Glucosinolate Profiles of Host Plants*. *J. Insect Sci.*, 19(3).
- Peer, W. A., et Murphy, A. S. 2007: *Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?* *Trends. Plant. Sci.*, 12: 556–563 pp.
- Pietta, P. G., 2000: *Flavonoids as Antioxidants*. *J. Nat. Prod.*, 63(7): 1035–1042 pp.
- Piterková, J. et al., 2005: *Oxidativní stres: Lokalizace aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu.*, *Chem. listy*, 99: 455-466 s.
- Pokluda, R., 2007: *Atlas chorob a škůdců zahradnických kultur*. MZLU, Brno, 75 s.
- Procházka, S. et al., 1998: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2.
- Raiola, A. et al., 2017: *Bioactive Compounds in Brassicaceae Vegetables with a Role in the Prevention of Chronic Diseases*. *Molecules*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(1): 15p.
- Robbins, R. J., 2003: *Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology*. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2866-2887 pp.
- Robert-Seilaniantz, A. et al., 2007: *Pathological hormone imbalances*. *Curr. Opin. Plant Bio*, 10(4): 372–379 pp.
- Rodriguez M. C. et al., 2010: *Mitogen-activated protein kinase signaling in plants*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 621-649 pp.

- Rojas, C. M. et al., 2014: *Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense*. Front. Plant. Sci. 5: 17 p.
- Rosypal, S. et al., 2003: *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia. ISBN 978-80-86960-23-4.
- Řepková, J., 2013: *Genetika rostlin*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-6408-9.
- Santamaria, M. E. et al., 2013: *Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests*. Transgenic Research. 22: 697–708 pp.
- Sathyanarayanan, P. V. et Poovaiah, B. W., 2004: *Decoding Ca²⁺ signals in plant*. Crit. Rev. Plant Sci., 23: 1–11 pp.
- Saxena, M. et al., 2012. *Flavonoids and Phenolic Acids as Antioxidants in Plants and Human Health*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research., 16(2): 130 – 134 pp.
- Schoonhoven L. M. et al., 2005: *Insect-plant biology*. Oxford University Press, ISBN-10: 019852594X.
- Semenza, GL., 1999: *Perspectives on Oxygen Sensing*. Cell, 98: 281p.
- Shanker, AK. et Venkateswarlu, B., 2011: *Abiotic Stress Response in Plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. ISBN 979-953-307-195-3.
- Shiojiri, K. et al., 2001: *Infochemically mediated tritrophic interaction webs on cabbage plants*. Popul. Ecol., 43: 23–29 pp.
- Slaymaker, D. H. et al., 2002: *The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response*. PNAS, 99(18): 11640–11645 pp.
- Stout, M. J. et al., 1998: *Specificity of induced resistance in the tomato, Lycopersicon esculentum*. Oecologia 113: 74–81 pp.
- Taiz L., Zeiger E., 2010: *Secondary Metabolites and Plant Defense*. Plant physiol., 5: 301-302 pp.
- Ueda, H. et al., 2012: *Plant communication*, Plant Signal. Behav., 7(2): 222-226 pp.
- VanEtten, H. D. et al., 1994: *Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins"*. Plant Cell., 6(9): 1191-1192 pp.
- Vanková, R., 2011: *Plant Hormone Functions in Abiotic and Biotic Stress Responses*. Handbook of Plant and Crop Stress, Third Edition, chapter 8: 22 pp.
- Van Wees, S. C. et al., 2000: *Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in Arabidopsis thaliana*. PNAS, 97(15): 8711–8716 pp.

Věchet, L., 2012: *Mechanizmy interakcí hostitel – patogen a základy šlechtění na odolnost*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., ISBN: 978-80-7427-072-7.

Von Dahl, C. et Baldwin, I. T., 2007: *Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions*. J. Plant Growth Regul., 26: 201–209 pp.

War, A. R. et al., 2011: *Jasmonic acid- mediated induced resistance in groundnut (Arachis hypogaea L.) against Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)*. J Plant Growth Regul.; 30: 512-23 pp.

War, A. R. et al., 2012: *Mechanism od plant defense against insect herbivores*. Plant Signal. Behav., 7(10): 1306-1320 pp.

War, A. R. et al., 2015: *Induced resistance to Helicoverpa armigera through exogenous application of jasmonic acid and salicylic acid in groundnut, Arachis hypogaea*. Pest Manag. Sci., 71 (1): 72-82 pp.

War, A. R. et al., 2018: *Plant defence against herbivory and insect adaptations*. AoB PLANTS. 10(4), ply037.

Wink, M., 1997: *Compartmentation of Secondary Metabolites and Xenobiotics in Plant Vacuoles*, Adv. Bot. Res., 25: 141 pp.

Winkel-Shirley, B., 2001: *Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. Plant Physiol., 126: 485–493 pp.

Wittstock, U. et al., 2004: *Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense*. PNAS., 101: 4859-4864 pp.

Zebelo, S. A. et Maffei, M. E., 2015: *Role of early signalling events in plant–insect interactions*. J. Exp. Bot., 66(2): 435–448 pp.

Zhu J. K., 2016: *Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants*. Cell, 167(2): 313–324 pp.

ZRZAVÝ, J. et al., 2004: *Jak se dělá evoluce: od sobeckého genu k rozmanitosti života*. V Praze; Litomyšli: Paseka, 2004. ISBN 80-7185-578-2.

Internetové zdroje:

Atkinson, N. J. 2020. *Plant molecular response to combined drought and nematode stress* [online]. [cit. 2020 – 04 – 29]. Dostupné z WWW: <[http://etheses.whiterose.ac.uk/2131/1/Atkinson N J Faculty of Biological Sciences PhD 2011.pdf](http://etheses.whiterose.ac.uk/2131/1/Atkinson_N_J_Faculty_of_Biological_Sciences_PhD_2011.pdf)>

Dvořák, J. 2020: *Bělásek řepový (Pieris rapae)*. [online]. [cit. 2020 – 07 – 10]. Dostupné z WWW: <<http://www.lepidoptera.cz/motyli/belasek-repovy--pieris-rapae-linnaeus-1758>>

Dvořák, J. 2020: *Bělásek zelný (Pieris brassicae)*. [online]. [cit. 2020 – 07 – 10]. Dostupné z WWW: <<http://www.lepidoptera.cz/motyli/belasek-zelny--pieris-brassicae-linnaeus-1758>>

- Dvořák, J. 2020: Bělásek řepkový (*Pieris napi*). [online]. [cit. 2020 – 07 – 10]. Dostupné z WWW: <<http://www.lepidoptera.cz/motyli/belasek-repkovy--pieris-napi-linnaeus-1758>>
- Fryč, D. et al. 2020: *Nálety mšic do sacích pastí Johnson-Taylor v roce 2018* [online]. [cit. 2020 – 04 – 10]. Dostupné z WWW: <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/nalety-msic-do-sacich-pasti-johnson-taylor-v-roce-2018>>
- Grulich, V. 2020: *BRASSICACEAE Burnett – brukvovité / kapustovité* [online]. [cit. 2020 – 04 – 06]. Dostupné z WWW: <<https://botany.cz/cs/brassicaceae/>>
- Gerson, U., Applebaum, S., 2020: *Plant Pests of the Middle East*. [online]. [cit. 2020 – 06 – 11]. Dostupné z WWW: <<http://www.agri.huji.ac.il/mepests/>>
- Jeschke, V. and Burow, M. 2020: *Glucosinolates*. In eLS , John Wiley & Sons, Ltd (Ed.) [online]. [cit. 2020 – 07 – 13]. Dostupné z WWW: <<https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2F9780470015902.a0027968>>
- Kazda, J. 2020: *Blýskáček řepkový a jeho škodlivost* [online]. [cit. 2020 – 04 – 13]. Dostupné z WWW:<<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/blyskacek-repkovy-a-jeho-skodlivost>>
- Kocián, P. 2020: *Brassicaceae-brukvovité* [online]. [cit. 2020 – 04 – 06]. Dostupné z WWW: <<http://www.kvetenacr.cz/celed.asp?IDceled=3>>
- Kovaříková, K. et al., 2020: *Zápředníček polní - významný škůdce brukvovité zeleniny a řepky* [online]. [cit. 2020 – 04 – 10]. Dostupné z WWW: <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/zaprednicek-polni-vyznamny-skudce-brukvovite-zeleniny-a-repky>>.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benzoic acid [online]. [cit. 2020 – 07 – 10]. Dostupné z WWW: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/243>>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cinnamic acid [online]. [cit. 2020 – 07 – 10]. Dostupné z WWW: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444539>>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Flavan [online]. [cit. 2020 – 07 – 10]. Dostupné z WWW: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flavan>>.
- Patočka, J. et Jakl, J. 2020: *Glukosinoláty řeřišnice hořké* [online]. [cit. 2020 – 07 – 13]. Dostupné z WWW: <<http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=367>>
- Petruzzello, M. et al. 2020: *Brassicaceae*. Encyclopaedia Britannica, inc. [online]. [cit. 2020 – 04 – 06]. Dostupné z WWW: <https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae>

Schulzová, V. 2020: *Glukosinoláty a produkty jejich rozkladu* [online]. [cit. 2020 – 07 – 11]. Dostupné z WWW: <<https://web.vscht.cz/~schulzov/Nutraceutika%20a%20FP/Glukosinolaty%202018.pdf>>

Přílohy

*FW – hmotnost čerstvého rostlinného materiálu

Tabulka 1. Obsah **peroxidu vodíku** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
22,034 ± 3,469 ^a	6,027 ± 0,419 ^c	15,127 ± 2,735 ^b	20,712 ± 2,030 ^a

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 2. Obsah **superoxidu** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
10,852 ± 3,991 ^b	14,791 ± 1,937 ^b	25,684 ± 2,493 ^a	23,755 ± 5,937 ^a

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 3. Obsah **celkových rozpustných fenolů** ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
0,739 ± 0,057 ^a	1,288 ± 0,122 ^{ab}	1,578 ± 0,173 ^{ab}	1,184 ± 0,120 ^b

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 4. Obsah **celkových flavonoidů** ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
1,747 ± 0,130 ^b	1,257 ± 0,383 ^c	2,225 ± 0,041 ^a	2,119 ± 0,148 ^{ab}

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 5. Obsah **fenolových kyselin** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

fenolové kyseliny	kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
chlorgenová	1,134 ± 0,273 ^a	2,024 ± 0,863 ^a	1,566 ± 0,429 ^a	2,291 ± 1,013 ^a
kávová	0,013 ± 0,002 ^a	0,026 ± 0,003 ^a	0,019 ± 0,009 ^a	0,090 ± 0,069 ^a
vanilínová	0,535 ± 0,239 ^{ab}	0,552 ± 0,099 ^{ab}	0,437 ± 0,079 ^b	0,891 ± 0,103 ^a
syringová	0,399 ± 0,027 ^c	0,564 ± 0,020 ^a	0,492 ± 0,012 ^b	0,469 ± 0,014 ^b
ferulová	7,335 ± 0,953 ^c	8,040 ± 0,777 ^{bc}	13,773 ± 2,764 ^a	11,632 ± 1,191 ^{ab}
benzoová	0,161 ± 0,068 ^c	0,772 ± 0,112 ^a	0,452 ± 0,034 ^b	0,672 ± 0,036 ^a
salicylová	0,258 ± 0,031 ^c	0,730 ± 0,085 ^b	0,468 ± 0,125 ^c	1,202 ± 0,106 ^a

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 6. Obsah **kvercetinu a kemferolu** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

flavonoidy	kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
kvercetin	0,501 ± 0,089 ^a	0,369 ± 0,002 ^b	0,360 ± 0,010 ^b	0,355 ± 0,015 ^b
kemferol	0,237 ± 0,057 ^{ab}	0,174 ± 0,059 ^b	0,150 ± 0,048 ^b	0,325 ± 0,004 ^a

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 7. Obsah **kvercetinu a kemferolu po kyselé hydrolyze** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

flavonoidy	kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
kvercetin	3,705 ± 0,178 ^a	1,556 ± 0,283 ^c	1,798 ± 0,069 ^{bc}	2,236 ± 0,031 ^b
kemferol	37,435 ± 0,726 ^b	20,201 ± 2,058 ^d	42,867 ± 1,402 ^a	28,687 ± 2,301 ^c

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 8. Obsah **celkových rozpustných proteinů** ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
$9,561 \pm 1,731^c$	$15,912 \pm 0,827^b$	$13,903 \pm 0,709^b$	$20,672 \pm 3,313^a$

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 9. Obsah **kyseliny abscisové** ($\text{pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

hormony	kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
ABA	$143,957 \pm 34,888^b$	$209,912 \pm 61,751^{ab}$	$353,958 \pm 89,2248^a$	$360,916 \pm 156,952^a$
DPA	$338,087 \pm 93,507^{ab}$	$251,525 \pm 11,579^b$	$479,576 \pm 41,199^a$	$415,740 \pm 107,980^a$
ABA-GE	$369,342 \pm 96,364^b$	$382,648 \pm 56,421^{ab}$	$485,601 \pm 111,960^{ab}$	$582,782 \pm 123,899^a$

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 10. Obsah **kyseliny salicylové a salicylátů** ($\text{pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

hormony	kontrola	vajíčka	housenky	líhnoucí se vajíčka
SA	$220,281 \pm 68,284^c$	$286,602 \pm 49,467^c$	$529,463 \pm 99,610^b$	$746,500 \pm 86,292^a$
BzA	$2904,278 \pm 540,565^a$	$2829,632 \pm 505,073^a$	$1909,183 \pm 708,420^a$	$2354,808 \pm 980,884^a$

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.

Tabulka 11. Obsah kyseliny **jasmonové a jasmonát-izoleucinu** (pmol·g⁻¹ FW) v extraktech ze zelí bílého napadeného motýly z čeledi běláskovitých

hormony	kontrola	vajíčka	housenky	línoucí se vajíčka
JA	606,357 ± 156,318 ^c	493,603 ± 151,714 ^c	1356,922 ± 112,916 ^b	2082,504 ± 95,868 ^a
JA-ileu	71,604 ± 21,431 ^a	18,063 ± 8,660 ^b	52,543 ± 6,863 ^a	47,083 ± 13,516 ^{ab}

V tabulce jsou zaznamenány průměry naměřené pro jednotlivé varianty ± směrodatná odchylka. Písmena udávají, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Odlišná písmena mezi hodnotami každého vzorku podle Tukeyho testu ukazují významný rozdíl při $p < 0,05$.