

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA GENETIKY A FYZIOLOGIE LESNÍCH DŘEVIN

APLIKACE BRASSINOSTEROIDŮ NA BUKOVÉ
SAZENICE OVLIVNĚNÉ ŽÍREM BEKYNĚ
VELKOHlavÉ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

Diplomant: Bc. Žaneta Valdecká

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Žaneta Valdecká

Inženýrská ekologie
Ochrana přírody

Název práce

Aplikace brassinosteroidů na bukové sazenice ovlivněné žírem bekyně velkohlavé

Název anglicky

Brassinosteroids application on beech seedlings under gypsy moth attack

Cíle práce

Cílem práce je zhodnocení vlivu významného fytohormonu na fyziologický stav dřeviny, která je defoliována lesnicky významným škůdcem – bekyní velkohlavou.

Metodika

Brassinosteroidy jsou fytohormony, které významně ovlivňují odrůstání rostlin pod vlivem řady nepříznivých faktorů. V předložené práci se zaměříme na hlavní markery zdravotního stavu bukových sazenic, jako jsou rychlá fáze fluorescenční indukce, transpirace a asimilace na úrovni listu. K měření bude využitý Fluorpen (PSI, CR) a gazometrický systém LI-COR 6400XT (LICOR, NE, USA) v několika kampaních v průběhu vegetační sezóny. Bukové sazenice budou pěstovány v obalech v růstových komorách Step-In (PSI, CR), které umožní přesnou regulaci vnějších podmínek (světlo, vlhkost vzduchu) a zajistí zdárný vývoj housenek. Sazenice budou obalené textilií propouštějící světlo, která zabráni pohybu housenek mimo zájmové bukové listy. Experiment se zaměří na hodnoty asimilace a fluorescence nejen v období žíru, ale i na tzv. recovery fázi u sazenic s aplikovanými brassinosteroidy a kontrolní variantu.

Doporučený rozsah práce

40-50

Klíčová slova

fytohormon, bekyně velkohlavá, buk, fytokomora

Doporučené zdroje informací

- Divi UK, Krishna P (2009) Brassinosteroids confer stress tolerance. *Plant Stress Biol from genomics to Syst Biol*: 119–135
- Fraire-Velázquez S, Rodríguez-Guerra R, Sánchez-Calderón L (2011) Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. In: *Abiotic Stress Response in Plants-Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech
- Furio RN, Albornoz PL, Coll Y, et al (2019) Effect of natural and synthetic Brassinosteroids on strawberry immune response against *Colletotrichum acutatum*. *Eur J Plant Pathol* 153:227–241
- Peres ALGL, Soares JS, Tavares RG, et al (2019) Brassinosteroids, the Sixth Class of Phytohormones: A Molecular View from the Discovery to Hormonal Interactions in Plant Development and Stress Adaptation. *Int J Mol Sci* 20:331
- Vardhini BV, Anuradha S, Sujatha E, Rao SSR (2010) Role of brassinosteroids in alleviating various abiotic and biotic stresses-a review. *Plant Nutr Abiotic Stress Toler I Plant Stress* 4:56–61
-

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FŽP

Vedoucí práce

doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 30. 1. 2020

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 11. 2. 2020

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 27. 03. 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Ivany Tomáškové, Ph.D.. Další informace mi poskytly RNDr. Alina Diuzheva a Ing. Anna Krejzková a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze 24. 06. 2020

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Ivaně Tomáškové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za vedení, zájem, připomínky a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Alině Diuzhevě a Ing. Anně Krejzkové, za jejich čas, odbornou pomoc a rady. Mé poděkování patří též mé rodině, přátelům a kolegům. Zvláště za jejich trpělivost a nikdy nekončící podporu.

V Praze 24. 06. 2020

.....

Abstrakt

Jako potenciální léky či látky nahrazující pesticidy se brassinosteroidy dostávají do popředí zájmu. Tato diplomová práce se zabývá jejich zapojení do obrany rostliny buku lesního (*Fagus sylvatica*) před škodlivými fytopatogeny, v podobě bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*). První část práce se zabývá jednotlivými fytohormony a jejich zapojením do obrany rostliny. Druhá část je pak věnována samotnému výzkumu. Měřením stresového faktoru, aminokyseliny (AMK) prolinu, se vliv brassinosteroidů povedlo prokázat za pomoci ultrafialovo-viditelné (UV-VIS) spektrometrie. Statistické výpočty však tento závěr popírají a zcela vyvracejí jakékoli zapojení exogenně dodávaného 24-epibrassinolidu (EpiBr) do obranné kaskády rostliny. Protikladné výsledky poukázaly na nutnost dalšího výzkumu vlivu exogenně dodávaných fytohormonů na rostlinu.

Klíčová slova:

Brassinosteroidy, bekyně velkohlavá, prolin, bukové sazenice, obrana rostliny

Abstract

As potential drugs or pesticide replacers, brassinosteroids are in the forefront. This dissertation thesis deals with their involvement in the defense of the beech (*Fagus sylvatica*) plant against phytopathogens, in the form of *Lymantria dispar*. The first part of the dissertation thesis is devoted to individual phytohormones, their properties and their involvement in plant defense. The second part is devoted to the research. By measuring the stress factor, amino acid (AMK) of proline, the effect of brassinosteroids was proved by ultraviolet-visible (UV-VIS) spectrometry. However, statistical calculations deny this conclusion and completely refuse any involvement of exogenously supplied 24-epibrassinolide (EpiBr) in the plant defense cascade. Contradictory results indicated the need for further research into the effect of exogenously supplied phytohormones on the plant.

Keywords:

Brassinosteroids, gypsy moth, proline, beech seedlings, defense in plant

Seznam použitých zkratek

1Q	1. kvantil
3Q	3. kvantil
A	Absorbance
AMK	Aminokyseliny
BVOC	Volatilní organické látky
BZir	Vzorky nebyly vystaveny vlivu žíru bekyně velkohlavé
c	Koncentrace
CE	Kapilární elektroforéza
Ci	Intracelulární koncentrace CO ₂
Cond	Stomatální vodivost
EpiBr	24-epibrassinolid
Fi	Fluorescence chlorofylu ve 2ms od startu aktinického světla
Fj	Fluorescence chlorofylu ve 30ms od startu aktinického světla
Fo	Minimální fluorescence chlorofylu
Fm	Maximální fluorescence chlorofylu
Fv	Maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu
FW	Čerstvé hmotnosti
GC	Plynová chromatografie
GMO	Geneticky modifikované organismy
IAA	Idolyl-3-octová kyselina
Isat(95)	Saturační bod světelné ozáření
LC	Kapalinová chromatografie
LdMNPV	Lymantria dispar multicapsid nuclear polyhedrosis virus
LOS	Lesní ochranná služba
Max	Maximální hodnota
MS	Hmotnostní spektrometrie
Med	Medián
Min	Minimální hodnota
Pgmax	Maximální rychlost hrubé fotosyntézy
Phi_Po	Maximální kvantový výtěžek
Pi_Abs	„Performace index“
PN(I _{max})	Rychlost čisté fotosyntézy
Pr	Průměrná hodnota
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SAR	Systémově získaná obrana
SD	Směrodatná odchylka
Trmmol	Transpirace

ULV	Ultra nízký objem (Ultra Low Volume)
UHPLC	Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie
Vi,	Relativní fluorescence chlorofylu ve 2ms od startu aktinického světla
Vj	Relativní fluorescence chlorofylu ve 30ms od startu aktinického světla
vz	Vzorek
Zir	Vzorky byly vystaveny žíru bekyně velkohlavé

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	1
3. Fytohormony.....	2
3.1 Historie	2
3.2 Základní pojmy.....	2
3.3 Brassinosteroidy	3
3.3.1 Syntéza a analýza	4
3.3.2 Signální dráhy brassinosteroidů	5
3.3.3 Vlastnosti brassinosteroidů	5
3.4 Cytokininy	7
3.4.1 Druhy.....	7
3.4.2 Význam	8
3.5 Auxiny	8
3.5.1 Druhy.....	9
3.5.2 Význam	10
3.6 Gibereliny	10
3.6.1 Význam	11
3.7 Ostatní fytohormony s regulační funkcí	11
3.7.1 Ethylen	11
3.7.2 Kyselina jasmonová	12
3.7.3 Kyselina salicylová	13
3.7.4 Kyselina abscisová	14
4. Volatilní organické látky.....	14
5. Obrana rostliny.....	15
6. Bekyně velkohlavá.....	17
6.1 Popis a životní cyklus bekyně velkohlavé	17
6.2 Monitoring	20
6.3 Opatření před bekyní velkohlavou	21
7. Metody použité při měření.....	21
7.1 Spektrometrie.....	21
7.2 Gazometrie.....	22
8. Měření	23

9. Výsledky	24
9.1 Fotosyntéza rostliny.....	24
9.2 Stanovení prolinu.....	26
9.2.1 Vliv bekyně velkohlavé za přítomnosti brassinosteroidů (B_okus) a bez chemického ošetření (Okus)	28
9.2.2 Bez vlivu bekyně velkohlavé	29
10. Výsledné zhodnocení	30
11. Diskuze	30
12. Závěr	42
13. Přínos práce.....	42
Použitá literatura	43
Seznam obrázků	46
Seznam grafů.....	46
Seznam tabulek	46
Příloha č. 1.....	47
Vliv bekyně velkohlavé na fotosyntézu sazenic buku.....	47
Příloha č. 2.....	52
Vliv dodávaného brassinosteroidu na koncentraci prolinu.....	52
Příloha č. 3.....	53
Rychlá fáze fluorescenční indukce	53

1. Úvod

Fytohormony, jsou pro rostlinu nejdůležitějšími chemickými sloučeninami, odpovídajícími za růst rostliny, přizpůsobivost změnám podmínek, výživu a další funkce nezbytné pro existenci rostliny. Mezi tyto chemické sloučeniny mimo jiné patří brassinosteroidy. V minulosti byl prokázán vliv brassinosteroidů na přizpůsobivost rostliny. Nedávno se ovšem také začal zkoumat vliv brassinosteroidů na obranu rostliny před různými druhy fytopatogenů, jakou je kupříkladu bekyně velkohlavá (*Lymantria dispar*). Gradaci bekyně stimuluje převážně teplé, suché a slunné počasí. Takovéto klima má příznivý dopad na rozmnožování a následný vývoj bekyně (Křístek et Urban, 2013). Vlivem klimatických změn by takovýto období mělo přibývat. Příkladem je rok 2018, kdy byly žíry a holožíry bekyně velkohlavé zaznamenány v rozsahu několika tisíc hektarů. Postiženými oblastmi byli jižní Morava a střední Čechy. Poprvé dokonce byla, v našich klimatických podmínkách, zaznamenána vícečetná napadení na jehličnanech. Nebyla to však jen bekyně, která byla v roce 2018 klimatickými podmínkami stimulována. Po téměř 80 letech se také přemnožil sosnokaz borový (*Panolis flammea*) na rozloze kolem 1 tisíce hektaru. Tento narůstající trend byl zaznamenán i u zbylých listožravých škůdců (Lesní ochranná služba: LOS, 2019). Je tedy zřejmé, že počet teplých a suchých roků má pozitivní vliv na fytopatogeny. Znalostí fytohormonů můžeme v budoucnu přispět k ochraně před těmito druhy a zamezit tak velkým škodám na rostlinách, případně dopomoci rostlinám se klimatickým změnám přizpůsobit a zamezit tak vyhynutí ohroženým druhům rostlin.

2. Cíle práce

Diplomová práce zkoumá vliv brassinosteroidů na obranu sazenic buku před fytopatogenem – bekyní velkohlavou (*Lymantria dispar*). Cílem tedy je:

- Ovlivňuje žír bekyně velkohlavé parametry světelné křivky fotosyntézy?
- Navyšuje exogenně dodávaný 24-epibrassinolid (EpiBr) obranu rostliny?
- Je rostlina schopna přijmou a využít dodávaný brassinosteroid?
- Mohou v budoucnu brassinosteroidy nahradit pesticidy?
- Je možné využít brassinosteroidy ke zvýšení přizpůsobivosti rostliny na změny podmínek?

3. Fytohormony

3.1 Historie

Fytohormony jsou velmi staré látky. Zřejmě se vyvinuly již v dávné minulosti u nižších forem života. Tyto organismy však fytohormony neuměly využívat, a tak končila tato skupina chemických látek v okolí organismů jako odpad. Vývojem vyspělejších rostlin ovšem dostaly fytohormony zásadní funkci. Dříve odpadní látky tak byly využity ke komunikaci mezi jednotlivými buňkami složitých organismů i mezi jejich orgány. Vyvinuly se složitější formy komunikačních cest a fytohormony dostaly svou roli i v obranných systémech rostlin. Dnes jsou fytohormony nedílnou součástí rostliny, zasahující téměř do všech fyziologických procesů rostliny, včetně obrany před fytopatogeny (Psota et Šebánek, 1999). I když jsou fytohormony velmi staré, jejich objevení snadné nebylo. Zpočátku se věřilo, že vliv na vývoj a růst rostliny má pouze výživa. Toto přesvědčení jako první zpochybnil až J.von Sachs (1832-1897). Tento vědec se zasadil o myšlenku, že u rostlin hrají klíčovou roli chemické signály a že tyto chemické sloučeniny jsou nezbytné pro komunikaci mezi orgány rostliny. J. von Sachs však svou teorii nepodložil žádným výzkumem. Teorii o chemických signálech se povedlo prokázat o několik let později profesoru R. Dostálovi (1885-1973), který tak učinil za pomoci řady morfologických pokusů (Procházka et al. 1998). Nejen, že se mu povedlo prokázat teorii J. von Sachse, ale také svým výzkumem přinesl mnoho nových informací o fyziologii rostlin. Látky, které profesor R. Dostál objevil, získaly název růstové regulátory, mezi které spadá i celá řada fytohormonů. Na tento výzkum začaly postupně navazovat další vědci svými pokusy a rozšířili tak poznatky o fytohormonech (Psota et Šebánek, 1999).

3.2 Základní pojmy

Fytohormony jsou nízkomolekulární chemické látky, sloužící ke komunikaci mezi jednotlivými orgány rostliny. V rostlinách se nacházejí ve velmi nízkých koncentracích, a to v řádech mikromolů až femtomolů na gram rostlinného materiálu (Podlešáková et al., 2012). Jeden druh fytohormonu může být syntetizován na několika místech rostliny a může zastávat daleko více funkcí (Psota et Šebánek, 1999). Tím si rostliny vytvořily systém, kdy jeden proces ovlivňuje vícero chemických látek. Snížilo se tak riziko přerušení procesu z důvodu nedostatku fytohormonu. Tím ovšem dochází ke střetu dvou a více látek. O výsledném procesu nerozhoduje funkce těchto látek, ale celková koncentrace v daném místě oproti koncentraci jiného

fytohormonu (Podlešáková et al., 2012). Příkladem tohoto jevu je poměr mezi gibereliny, skupinou fytohormonů, a kyselinou abscisovou, která se mezi fytohormony také řadí. Jejich poměr určuje, zda dojde k dormanci semen. Rozmanitost funkcí, jejich zcela odlišné reakce v různých orgánech rostliny a jejich možné ovlivnění jsou důvodem, proč jsou rostliny velmi zranitelné při vlivu několika biotických a abiotických stresových faktorů. Nejnebezpečnějším stresovým faktorem současnosti je globální oteplování. Od roku 1880 byl rok 2019 druhým nejteplejším rokem v historickém záznamu. Množství tepelné energie uložené v horních 2000 m v oceánu pak bylo od roku 1880 nejvyšší. I když od roku 1880 dochází k postupnému oteplování, do roku 1981 docházelo k nárůstu teploty o 0,07 °C za rok, v posledních letech se nárůst výrazně zvýšil a to na 0,18 °C za rok. Průměrná teplota v roce 2019 byla ve srovnání s průměrnou teplotou let 1981-2010 vyšší o 0,95 °C, ale při srovnání s průměrem let 1880-1900 byl nárůst o 1,15 °C (Lindseyová, 2020). Leden 2020 se pak stal nejteplejším lednem od roku 1880. Předpokládá se, že pokud nárůst teploty překročí hodnoty 1,5 °C, dojde ke globálním rozdílům v teplotních extrémech. Očekává se, že v letním období dojde k nejsilnějšímu oteplování ve středních zeměpisných šířkách. Nárůst by mohl být až o 3 °C oproti průměrné teplotě. Nejvíce mimořádně horkých dní by však podle předpovědi mělo být v tropické oblasti. Tento trend má vysoký vliv na počasí. Silné bouřky a extrémní počasí v podobě vichřic, střídají extrémní sucha (Hoegh-Guldberg et al, 2018). Rostliny se brání těmto změnám i mimo jiné za pomoci fytohormonů. Tyto druhy látek reagující na abiotické podmínky mohou působit proti fytohormonům reagujících na fytopatogeny. Je tedy nezbytné pochopit nejen vlastnosti hormonů podporujících obranu rostliny před parazity, jako je například kyselina salicylová, ale také pochopit interakce mezi jednotlivými fytohormony.

3.3 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy se sice řadí mezi fytohormony, jsou však blízkými příbuznými zvířecích steroidních hormonů. Tyto chemické látky, spadající do skupiny polyhydroxysteroidů, se v rostlinách vyskytují, stejně jako ostatní fytohormony, ve velmi nízkých koncentracích. Nejvyšší koncentrace dosahují v poupatech, semenech a čerstvě vyrašených částech rostlin. Příkladem vyšší koncentrace brassinosteroidů jsou nezralá semena rostlin, které obsahují 1-100 µg/kg brassinosteroidů na 1 g rostlinného materiálu, zatímco výhonky a listy mají obvyklé 0,01-01 µg/kg brassinosteroidů na 1 g materiálu (Nováková et al., 2014). Prvním objeveným brassinosteroidem se stal brassinolid, který byl syntetizován z rostlin roku 1979

z řepky (*Brassica napur*). Právě od rostliny, ze které byl tento fytohormon izolován, pochází i jeho název. Dalšími objevenými brassinosteroidy byly například kastasteron a typhasterol. Tyto látky se nejvíce vyskytují v pylu, semenech a mladých vegetativních orgánech (Clouse et Sasse, 1998). Následné výzkumy, dopomohly k objevení více než 60 brassinosteroidů, které byly izolovány z více než sto druhů rostlin, a to ve škále od řas po krytosemenné rostliny (Peres et al., 2019).

3.3.1 Syntéza a analýza

Základní chemickou sloučeninou brassinosteroidů je chlosteracetát. Následné brassinostroidy se od sebe odlišují rozdílnou orientací hydroxilové skupiny. Řada brassinosteroidů je syntetizována z kampesterolu, sitosterolu a cholesterolu. Všechny tři zmíněné steroly, dokáží rostliny ve svých buňkách přeměnit na velké množství metabolitů, ale jen málo z těchto metabolitů má biologickou aktivitu. Tři hlavní cesty biosyntézy brassinosteroidů, mající prekurzor kampesterol, jsou dobře známy. Byly také identifikovány proteiny, zapojené do signálních transdukčních drah brassinosteroidů. První syntéza v laboratorních podmínkách se povedla krátce poté, co se zdařila první izolace této skupiny fytohormonů. Tato syntéza vychází z komerčně dostupného ergosterolu. K úspěšné syntéze je tak zapotřebí devět až dvanáct kroků. Nejdůležitější reakce v tomto schématu je izomerizace a tvorba i-ergosterolu. Následná oxidace na i-steron a redukce dvojné vazby na C7. Rychlejší a méně náročná syntéza těchto fytohormonů vycházející z brassikasterolu, kdy výchozím materiálem je EpiBr. Tímto způsobem jde daný fytohormon syntetizovat v pouhých pěti krocích. Velkou nevýhodou je ovšem nízká dostupnost a vysoká cena brassikasterolu a tím i vysoká cena samotné syntézy (Oklestková et al., 2015). Tato syntéza ovšem představuje nepatrnou překážku oproti samotné analýze. Analýza jakéhokoli fytohormonu je pro analytickou chemii i v současnosti velice náročná i nákladná. Fytohormony se obecně v rostlinách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, a to až ve femtomolech na gram rostlinné hmoty. Další překážku představují chemické sloučeniny mající obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti, které ovšem mezi fytohormony nepatří, mnohdy je však problém tyto látky účinně oddělit. Jde zejména o konjugáty se sacharidy či AMK, často o isomery s výrazně odlišnou biologickou aktivitou. Aby tedy byla analýza možná, využívají se zde spojené techniky chemické analýzy. Jde hlavně o přístroje využívající separační účinnost chromatografických či elektromigračních metod a současně vynikají selektivitou a citlivostí hmotnostně spektrometrické detekce. Dříve se

využívala metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), ta však byla postupně nahrazena vhodnější kapalinovou chromatografií doplněnou také o hmotnostní detekci (LC-MS). Ta je dnes využívána v podobě ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS). Další možnou metodou je uplatnění kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS). Ani izolace brassinosteroidů není nikterak jednoduchá. Brassinosteroidy jsou vysoce hydrofobní chemické sloučeniny. K izolaci se tak využívají citlivé biotesty (Podlešáková et al., 2012).

3.3.2 Signální dráhy brassinosteroidů

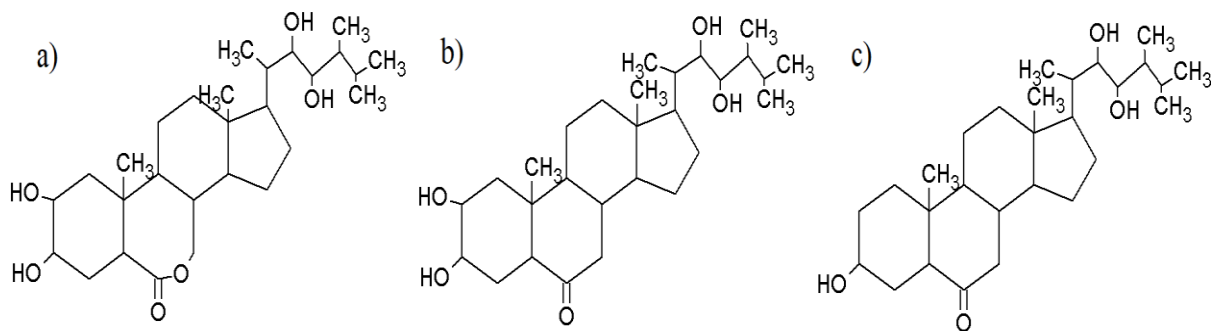
V posledním desetiletí byl k výzkumu využívána převážně huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), díky němuž byly zjištěny nejen vlastnosti mnohých fytohormonů, ale také jejich signální dráhy, geny zapojené do biosyntézy či jejich regulace. Nedávné studie také poskytly informace o aspektech signálních drah brassinosteroidů, které se tak staly nejlépe pochopenými signálními transdukčními dráhami v rostlinách. Podle těchto výzkumů se nejaktivnější brassinosteroidy, jako je brassinolid a kastasteron, váží přímo na extracelulární kinázu BRI1. Vliv této vazby způsobí, že negativní regulátor označovaný BRI1 vyvolá disociaci zmíněné kinázy, čímž dojde k naprosté heterodimerizaci BRI1 a k aktivaci koreceptoru. Následná interakce mezi BRI1 s kinázou signalizující fosforylaci způsobí, že se aktivuje proteinová fosfatáza označující se jako BSU1. Aby se signál aktivoval, musí dojít k inhibici kinázy nesoucí označení BIN2. Snížení aktivity kinázy vyvolá aktivaci homologního transkripčního faktor BZR1/BZR2, který v následném kroku aktivuje kinázu BRZ1. Právě kináza BRZ1 migruje do jádra a navazuje se na BR-promotor. Právě tato vazba vyvolává konečnou signalizaci (Bruyne et al., 2014).

3.3.3 Vlastnosti brassinosteroidů

Za jednu z největších příčin ekonomických ztrát v zemědělství dnešní doby, byly mimo jiné označeni také škůdci. Vliv fytopatogenů každoročně přináší vysoké ztráty v podobě úbytku plodin. Aby zemědělci tyto ztráty snížily, ošetřují plodiny nejrůznějšími druhy pesticidů. Nevýhoda těchto látek spočívá ve zvyšování toxicity plodin, ve kterých zůstávají ve formě reziduí. Nedávné výzkumy poukazují na to, že by brassinosteroidy mohly nejen navyšovat obranu rostliny před fytopatogeny, ale také chránit rostlinu před abiotickým stresem v podobě

těžkých kovů, sucha, teploty a dalších. Brassinosteroidy, mají také vlastnost, snižovat toxicitu pesticidů v neporušených rostlinách, kdy aktivují antioxidační obranný systém. Také se tyto fytohormony podílejí na zvýšené degradaci pesticidů, což vede ke snížení toxických reziduí v rostlinných částech. Rostliny detoxikují pesticidy enzymem zprostředkovaný třífázovým detoxikačním systémem, kdy jsou nakonec méně toxické metabolity pesticidů uloženy ve vakuolách a apoplastech. Není to však jediná vlastnost brassinosteroidů. Mezi hlavní témata dnešní doby v oblasti ochrany přírody je nárůst koncentrace CO₂ v životním prostředí. Brassinosteroidy, jak se předpokládá, jsou schopny s tímto plynem interagovat. Tato interakce u rostlin zvyšuje jejich růst, navyšuje obsah cukru a škrobu a reguluje různé aktivity enzymů, zapojených do různých fyziologických cyklů rostliny. Brassinosteroidy také navyšují ochranu rostliny před toxickými těžkými kovy. Tento jev byl prokázán v rostlinách hořčice (*Sinapis spp.*), kdy brassinosteroidy navýšily ochranu rostliny před působením niklu a arsenu (Sharma et al., 2018). Z toho vyplývá, že brassinosteroidy mají vícero funkcí a jsou taktéž ovlivněny dalšími druhy fytohormonů a jejich koncentrací. Příkladem propojení s ostatními fytohormony je například zapojení brassinosteroidů do růstu rostlin. Růst rostlin je současně ovlivňován také auxiny a gibereliny. Vliv brassinosteroidů je ovšem v růstu rostliny nezanedbatelný. Jsou-li brassinosteroidy vlivem genetické poruchy blokovány, rostlina do požadované výšky nedoroste (Bruyne et al., 2014). Brassinosteroidy podporují stárnutí listů, působí tak antagonicky nejen k cytokininům, ale také k auxinům. Oproti tomu podporují buněčné dělení, čímž působí k cytokininům a auxinům synergicky (Hayat et al., 2016).

Brassinosteroidy se řadí mezi stresové hormony. Pomáhají tak rostlině přečkat stresové období, které způsobují jak abiotické faktory, tak i biotické. Tyto fytohormony rovněž umí vyvolat syntézu ethylenu, který je rovněž stresovým hormonem. Brassinosteroidy tak činí za podpory kyseliny abscisové, která také vyvolává syntézu plynného hormonu. Další nezbytnou vlastností brassinosteroidů, je zapojení do syntézy superoxiddismutázy, která se podílí na regulaci nebezpečných, přesto nezbytných kyslíkových radikálů (ROS) (Lv et al., 2018), které hrají klíčovou roli nejen při obraně rostliny, ale zřejmě také při jejím vývoji. Další zajímavou vlastností pro oblast zemědělství, je schopnost aktivovat fotosyntézu (Sharma et al., 2018). Dále se brassinosteroidy podílejí na buněčném dělení a regulují řadu genů, zapojených do různých fyziologických procesů, mezi které patří například metabolismus proteinů plus enviromentální a hormonální reakce (Peres et al., 2019)



Obrázek 1 – Brassinosteroidy (ChemSketch, 2019): a) brassinolid; b) kastasteron; c) typhasterol

Protože jsou fytohormony úzce provázané, je nutné porozumět nejen vlastnostem brassinosteroidům, ale také všech ostatních fytohormonů.

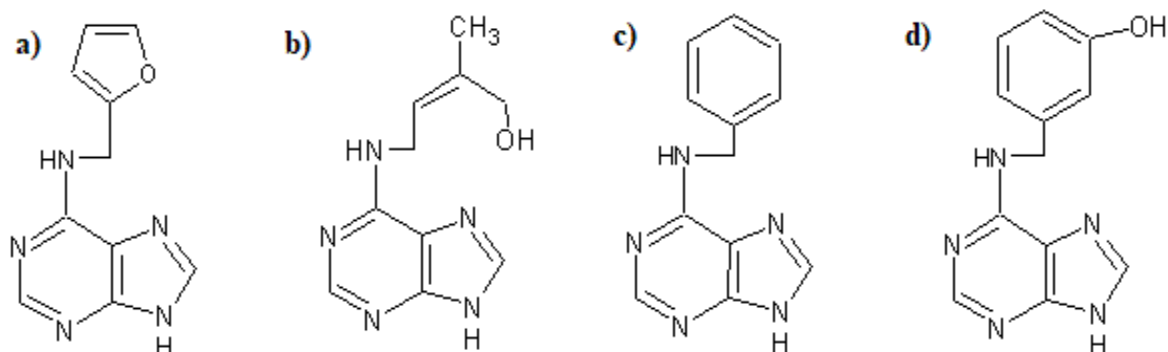
3.4 Cytokininy

Cytokininy jsou druhem fytohormonů nacházejících se nejen v rostlinách, ale také v bakteriích, řasách, rozsivkách, ve většině druhů mechů a hub; a některých druhů hmyzu. Cytokininy mají řadu vlastností, které jsou pro rostlinu nezbytné. Některé druhy hmyzu a hub si ovšem za pomoci tohoto druhu fytohormonů vytvořily strategie, kterými snadněji napadají své hostitele. Nejen, že mohou snížit obranu rostliny, ale také mohou rostlinu přinutit k dodávání živin na jimi napadené místo (Giron et Glevarec, 2014).

3.4.1 Druhy

Cytokininy jsou odvozeny od chemické sloučeniny puriny. Přesto se mezi cytokininy řadí i sloučeniny, které žádný purinový základ nemají, vlastnostmi jsou však cytokininům blízké (Psota et Šebánek, 1999). Endogenní cytokininy vychází strukturně z adeninu, který rostlina substituuje na AMK v poloze 6. Tento chemický proces je podmínkou buněčné aktivity (Procházka et al. 1998). Cytokininy, N⁶ substituované deriváty adeninu, dělíme dle R² substituentu na izoprenoidní cytokininy a aromatické cytokininy (Podlešáková et al., 2012). K izoprenoidním cytokininům náleží: N⁶-(Δ^2 -izopentyl)adenin, dihydrozeatin a zeatin (Podlešáková et al., 2012), k aromatickým pak: 6-benzyladenin, 6-benzylaminopurin, *orto*-topolin, *meta*-topolin a *para*-topolin (Doležal et Strnad, 2017). Dále do této skupiny patří

ribozity, chemické látky mající ribózu v poloze N-9, a ribotidy, chemické látky s kyselinou fosforečnou, navázanou v poloze 5 na ribóze (Procházka et al. 1998).



Obrázek 2: Cytokininy (ChemSketch, 2019): a) kinetin; b) zeatin; c) 6-benzyladenin, d) *m*-topolin.

3.4.2 Význam

Cytokininy mají v rostlině mnoho fyziologických funkcí. Podílejí se na zpoždění stárnutí listů, senescenci a přenosu živin (Doležal et Strnad, 2017). Právě těchto vlastností se naučily využívat mnohé druhy hmyzích fytopatogenů. Příkladem takového hmyzího škůdce je klíněnka jabloňová (*Phyllonorycter blancardella*), parazitující na jabloni domácí (*Malus domestica*). Ve slinách této housenky, byly objeveny cytokininy o vysokých koncentracích, mezi které například také patřil zeatin (Giron et Glevarec, 2014). Brassinosteroidy podporují stárnutí listů, působí tak antagonicky k cytokininům (Hayat et al, 2010). Cytokininy, společně s auxiny, se také podílejí na iniciaci a kontrole buněčného dělení. Při vhodném poměru s auxiny podporují cytokininy rovněž tvorbu pupenů, nebo kořenů (Taiz et Zinger, 2002).

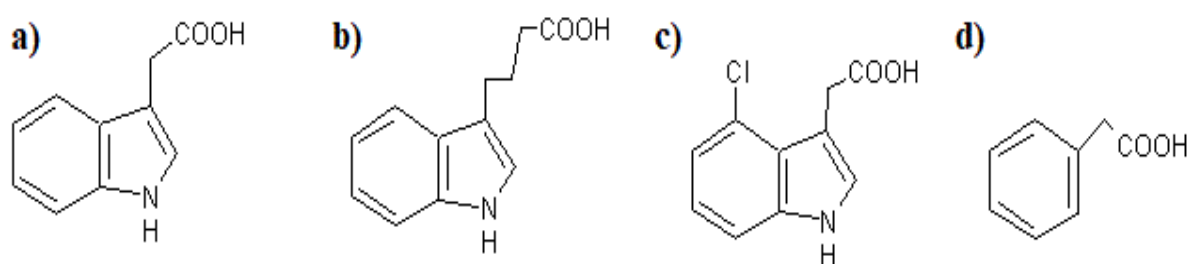
3.5 Auxiny

Ch. Darwin a jeho syn, během druhé poloviny 19. století studovali růst rostlin. Jedním z jejich zájmů, byla také schopnost rostlin ohýbat se za světlem – fototropismus. Darwinové zjistili, že pokud se fólií přikryje špička koleoptile, rostlina se za světlem neohne, přestože růstová oblast se nachází několik milimetrů pod špičkou. Vědci došli k závěru, že se na špičce coleoptile vytváří jakýsi druh signálu, který putuje do růstové zóny. Tento jev pak popsali ve své knize *Síla pohybu*, kterou publikovali v roce 1881. Na tento výzkum navázalo mnoho dalších vědců,

ve snaze jev vysvětlit. Mnozí následovníci se pokusily chemickou látku způsobující přenos signálu izolovat, ale v okamžiku pomletí rostlinné tkáně se uvolnily inhibující látky zachycené v buňkách, které zamezily izolaci neznámé chemikálie. 1926 F. Went se rozhodl místo pomletí, coleoptilu rozřezat na proužky. Tímto krokem se mu povedlo neznámé látky izolovat a prokázat jejich existenci. Nově objevené látky díky těmto pokusům získali název auxin z Řeckého auxein, což znamená ‚růst‘ nebo ‚zvětšovat‘. Auxiny se tak staly prvními objevenými fytohormony v historii (Taiz et Zinger, 2002).

3.5.1 Druhy

Auxiny se nepovedlo syntetizovat jen v rostlinách, ale také v bakteriích a řasách (Procházka et al. 1998). Postupem času bylo objeveno nepřeborné množství těchto látek, které měli nejrůznější původ. Proto byly auxiny rozděleny na syntetické a přirozené. Mezi přírodní auxiny se například řadí kyselina indolyl-3-octová (IAA) nebo kyselina fenylactová (Erb et al., 2012). Postupný výzkum prokázal, že se kyselina fenylactová nachází v rostlinných v daleko vyšších koncentracích než IAA, má však daleko menší účinky. Do skupiny syntetických auxinů se však zařadilo daleko více chemických látek. Pro přehlednost tak byly tyto auxiny rozděleny do dalších skupin, mezi které patří naftalenové kyseliny, chlorfenolové kyseliny, benzoové kyseliny a deriváty kyseliny pikolové. I tyto druhy auxinu se v rostlinách nachází a podílejí se na nezbytných fyziologických procesech. Mezi syntetické auxiny se řadí například indol-3-másečná kyselina nebo kyselina 4-chlor-IAA (Procházka et al. 1998).



Obrázek 3: Auxiny (ChemSketch, 2019): a) IAA; b) indol-3-másečná kyselina; c) 4-chlor-IAA; d) kyselina fenylactová

3.5.2 Význam

Z pokusů Ch. Darwina vyplývá, že se auxiny podílejí na stimulaci prodlužovacího růstu a podílejí se na fototropismu (Taiz et Zinger, 2002). Mezi další vlastnosti auxinů patří podíl na buněčném dělení nebo apikálním dormanci (Erb et al., 2012). Mají také svou roli v obraně před herbivory a také se podílejí na rozpoznávání fytopatogenů. Další funkce, do které jsou auxiny společně s cytokininy zapojeny, patří i regenerace rostlinných pletiv po jakémkoli zranění. Zdá se také, že jsou auxiny, stejně jako cytokininy, základní fytohormony. Žádná mutací ovlivněná rostlina, se bez těchto druhů fytohormonů neobešla. Je tedy zřejmé, že auxiny a cytokininy jsou pro život rostlinu nezbytné (Taiz et Zinger, 2002).

3.6 Gibereliny

Skupina giberelinů byla objevena v 50. letech minulého století. Do současnosti bylo objeveno více než 125 giberelinů a je známa spíše jejich biologická aktivita než jejich chemická struktura. Mnohem dříve však byly gibereliny objeveny japonskými vědci. Asijští pěstitelé rýže znali nemoc, která způsobovala, že byla rýže vysoká a vylučovala produkci semen. Vědci, kteří pátrali po původu této nemoci zjistili, že původcem je houba uvolňující chemickou látku, která poškozuje rostliny. Izolovaná látka dostala název giberelin po houbě *Gibberella fujikuroi*. Japonští vědci následně dokázali izolovat aktivní sloučeniny, které dostaly název giberelin A a B. Vlivem 2. světové války se však tento objev nedostal k západním vědcům. Vědci z USA a výzkumná stanice Welyn v Británii, tak gibereliny objevily až v 50. letech. Tato látka dostala název kyselina giberelová. V téže době se povedlo japonským vědcům izolovat další tři chemické sloučeniny náležící ke giberelinům. Giberelin A1, giberelin A2 a giberelin A3, přičemž giberelin A3 se shodoval s kyselinou giberelovou. Následný výzkum prokázal, že gibereliny jsou obsaženy ve všech houbách, kde kyselina giberelová je hlavní komponentou. Mezi gibereliny tak patří všechny chemické látky, které jsou odvozeny od prstencové struktury entkaurenu (Taiz et Zinger, 2002). Rostlina tyto látky syntetizuje nejvíce v mladých tkáních rostliny, případně ve zrajících semenech. Syntéza giberelin začíná v chloroplastech a následně zahrnuje membránu a cytoplazmu (Davies, 2010).

3.6.1 Význam

Gibereliny ovlivňují mnoho vývojových procesů rostlin. Za pomoci těchto fytohormonů může rostlina ovládat různé aspekty při klíčení semen, mezi které patří například ukončení dormance, nebo mobilizace endospermové odezvy. Nejvýznamnější rys giberelinů je ovšem schopnost prodlužovat stonky rostlin. Tuto vlastnost lze nejlépe pozorovat u trpasličích druhů rostlin. Exogenně podávaný giberelin A3 totiž může způsobit u trpasličích druhů takový růst, že se velikostí vyrovnají nejvyšším odrudám stejného druhu. Tento růst je ovšem doprovázen ztenčením stonku a zmenšením velikosti listů, které získají světlejší zelenou barvu. Gibereliny, společně s brassinosteroidy, ovlivňují růst rostlin, větvení a vývoj pohlavních orgánů. Tato společná kombinace byla prokázána v rostlinách huseníčku a kukuřici seté (*Zea mays*) (Best et al., 2016). Gibereliny mají také vliv na prodloužení kořenů rostliny. Gibereliny se také podílejí na obraně rostliny (Taiz et Zinger, 2002) a podporují tvorbu enzymů, i zrání ovoce (Davies, 2010).

3.7 Ostatní fytohormony s regulační funkcí

K fytohormonům se řadí daleko více chemických látek, které se podílejí na fyziologických procesech rostliny. Mezi chemické látky, které se podílejí na obraně rostliny před fytopatogeny, patří kyselina jasmonová (Creelman et Muller, 1997) a kyselina salicylová (An et Mou, 2011). Mezi stresové fytohormony se pak zařadily: kyselina abscisová (Danquah et al., 2013) a ethylen. Nedávné výzkumy však prokázaly, že i tyto stresové hormony se, stejně jako brassinosteroidy, zapojují do obranného mechanismu rostliny (Taiz et Zinger, 2002).

3.7.1 Ethylen

Ethylen je poměrně dlouho známý plyn, který je mimo jiné obsažen také v zemním či koksárenském plynu. Právě tyto plyny, se v 90. letech 19. století začaly hojně využívat k osvětlení ulic. Jejich přítomnost však způsobovala defoliaci blízkých stromů. Tento efekt nezůstal bez povšimnutí a mnoho vědců začalo zkoumat, co tuto defoliaci způsobuje. 1934 tak R. Gane poprvé definoval ethylen jako přírodní produkt, který díky svým vlastnostem na rostliny, byl zařazen mezi fytohormony. Jedná se tak o jediný plynný fytohormon v rostlinách (Taiz et Zinger, 2002). V rostlině je ethylen ukotven pomocí prekurzoru, 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny. Plyn se na tento prekurzor může snadno navázat a snadno se z něj také

uvolnit, dle potřeb rostliny. Aktivita plynu je tak ovlivněna prekurzorem. Bez prekurzoru ethylen uniká do mezibuněčných prostor a odtud průduchy vychází z rostliny do okolí (Van de Poel et Van der Straeten, 2014). Ethylen je pro rostlinu nesmírně důležitý při zrání plodu, při degradaci škrobu, celulózy i pektinu. Také se podílí na senescenci rostliny a gravitropismu. Při gravitropismu, dochází k interakci mezi ethylenem a brassinosteroidy, ač nepřímo přes auxiny. Brassinosteroidy ovšem působí antagonicky k ethylenu (Saini et Sharma et Pati, 2015). Ovšem stejně jako brassinosteroidy, je také ethylen označován za stresový hormon rostliny. Čím vyšší má rostlina stres, tím vyšší je jeho koncentrace. Syntézu ethylenu spouští různé stresové faktory, mezi které patří nedostatek vody, teplotní výkyvy, mechanické poranění a další. Tento stresový hormon se pak zapojuje do obrany rostliny v podobě zvýšení odolnosti proti chorobám, ale také v podobě iniciace hojení ran (Taiz et Zinger, 2002).

3.7.2 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová byla poprvé objevena v rostlině jasmínu, po které tento fytohormon dostal svůj název. Tento fytohormon se v rostlinách podílí na dozrávání životaschopného pylu, růstu kořenů a na uchycení úponků rostliny, nebo na senescenci (Vylíčilová et al., 2015). Nejvíce však byla kyselina jasmonová spojována s obranou rostliny proti různým druhům škůdcům, ochranou rostliny proti chorobám, které tyto škůdci mohou způsobovat (Chanclud et al., 2016). Deriváty kyseliny jasmonové se kupříkladu podílejí na obraně za pomoci aktivací genů, zachovávajících proteiny v rostlině. Tyto deriváty však mají také negativní vliv, kdy potlačují tvorbu proteinů podílejících se na procesu fotosyntézy (Creelman et Muller, 1997). Methyljasmonát se například podílí na systémově získané obraně rostliny (SAR) (Profotová, 2006). I přes to, že se kyselina jasmonová a její deriváty podílejí na obraně rostliny ve všech částech, nejvyšší koncentrace se nacházejí v kořenech, starších listech, či zralejších oblastech stonku. Vysoké koncentrace jsou také v reprodukčních orgánech nebo květech (Creelman et Muller, 1997). Kyselina jasmonová však nemá význam jenom pro rostliny, ale také pro hmyzí zástupce. Tento fytohormon byl objeven ve vajíčkách a housenkách několika druhů motýlů (*lepidoptera*) a to v daleko vyšších koncentracích, než je koncentrace kyseliny jasmonové u rostlin. Výrazné rozdíly koncentrací byly také mezi jednotlivými druhy; a také mezi vajíčky a larvami stejného druhu. V některých případech byla naměřena vyšší koncentrace ve vajíčkách než u larev. U bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*) byla ovšem koncentrace kyseliny jasmonové vyšší u larev než ve vajíčkách, a to i přesto, že čerstvě vylíhnutým jedincům chyběla

potrava. Zřejmě se tak jedná o biokumulaci kyseliny jasmonové předávanou z matky na potomstvo (Tooker et De Moraes, 2005).

V roce 1991 byl objeven peptidový hormon systemin. Poprvé byl izolován z rajčatových (*Solanum spp.*) listů skupinou vedenou C. A. Ryanem. Rostlina tento peptid produkuje v okamžiku napadení fytopatogenem. Syntéza peptidu probíhá na cytoplazmatických a buněčných stěnách rostlinných buněk. Zpočátku se věřilo, že prekurzor pro systemin je stejný, jako prekurzor pro brassinosteroidy, ale tato teorie se neprokázala. Nyní se předpokládá, že systemin navyšuje produkci kyseliny jasmonové a má tak zásadní význam při obraně rostliny. Nové výzkumy dopomohly k objevům dalších peptidových hormonů spojených s fytohormony, a tedy i kyselinou jasmonovou. Tyto peptidy byly objeveny například také v tabáku (*Nicotiana spp.*) (Pearce, 2011).

3.7.3 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová má velký význam na obranu rostliny, stejně jako kyselina jasmonová. I když má významnou roli, je kyselina salicylová sekundárním metabolitem, který produkují nejen eukaryotické buňky, ale také prokaryotické organismy. Tento druh kyseliny se řadí mezi fenolické látky s aromatickým jádrem, na které je navázána hydroxylová skupina nebo její funkční derivát. I když jde o poměrně složitou chemickou látku, je kyselina salicylová jednou z nejstarších látek využívanou ve farmacii jako lék. Její léčivé schopnosti jsou známy již od 5. století n.l. Hippokrates, řecký lékař považovaný za otce medicíny, tuto látku předepisoval jako lék proti bolesti. Kyselinu salicylovou se však podařilo izolovat až v roce 1885, německým vědcem J. A. Bushnerem. Uměle vytvořenou kyselinu salicylovou vytvořil později R. Piriem. Díky tomuto objevu, můžeme tento fytohormon využívat ve farmacii dodnes. I když je kyselina salicylová známá spíše léčivými účinky, případně obrannými schopnostmi, má v rostlině více vlastností. Mezi její další vlastnosti, patří například zapojení do buněčného dělení, termoregulace či klíčení semen. Kyselina salicylová se, stejně jako kyselina jasmonová, podílí na SAR. Vědci tuto vlastnost objevili v rostlině tabáku, kdy je tento fytohormon důležitý při obraně rostliny proti tabákové mozaice (Schreiber, 1994). Ovšem rostlina může kyselinu salicylovou využívat ještě v daleko větší míře. Tato látka je výrazně propojena se signálními drahami ostatních fytohormonů. Vědci prokázali, že při infekci rostlina navýší tuto látku, a to i mimo napadenou oblast. Jakými způsoby je rostlina schopna kyselinu salicylovou syntetizovat, nebylo zatím zjištěno (An et Mou, 2011).

3.7.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová byla dlouho mylně považována za původce abscise odtud její název. Postupným výzkumem se však zjistilo, že za tento jev je odpovědný ethylen a kyselina abscisová se na jevu podílí spíše nepřímo. Je totiž odpovědná za stimulaci ethylenu. Mezi její prokázané vlastnosti patří zrání a dormance semen. A stejně jako brassinosteroidy a ethylen, je kyselina abscisová zařazena mezi stresové hormony (Taiz et Zinger, 2002). Kyselina abscisová, společně s brassinosteroidy, přispívá ke schopnosti rostliny zvládnout stres způsobený jak abiotickými, tak biotickými činiteli. Rovněž dopomáhá rostlině adaptovat se na změny okolí (Morrison et al., 2015). Protože se kyselina abscisová řadí mezi izoprenoidy, podílí se společně s cytokininy a auxiny na vývoji a růstu rostliny. Tento druh kyseliny hraje také důležitou roli při inhibici klíčení, uzavírání průduchů a dalších nezbytných fyziologických procesech (Danquah et al., 2013). Jelikož brassinosteroidy podporují klíčení semen, mají v tomto procesu antagonistický vliv na kyselinu abscisovou (Saini et Sharma et Pati, 2015). A přestože v rostlinách je kyselina abscisová syntetizována v plastidech buněk, byl tento druh chemické sloučeniny objeven ve všech organismech, kromě třídy *Archea* (Danquah et al., 2013).

4. Volatilní organické látky

Volatilní organické látky (BVOC) jsou sekundární metabolity, které nespádají do skupiny fytohormonů. Přesto je jejich produkce ovlivněna fyziologickým stavem rostliny, dostupností světla a jinými metabolickými látkami. BVOC jsou látky, které můžeme velmi dobře vnímat. Zřejmě se jedná o signální chemikálie, sloužící k přenosu informací mezi dvěma rostlinami. Příkladem takové vůně způsobené BVOC, je kupříkladu vůně borovice, způsobená látkami *a-pinén* a *b-pinén*. Dalším příkladem, je vůně citronu způsobená limonenem, vůně černého pepře *sabinenem* nebo vůně eukalyptu za kterou je odpovědná látka *cinéola*. Většina těchto těkavých látek spadá do skupin benzenoidů, isoprenů, mono- a seskviterpenoidů. Rozdělení na základě biosyntézy se ovšem BVOC rozdělují na terpenoidy, deriváty mastných kyselin, fenylopropanoidy, benzenoidy a další amino deriváty kyselin. Největší skupinou tohoto rozdělení jsou terpenoidy. Příkladem látek spadajících do skupiny terpenoidů, jsou fytooxylipiny známé také jako těkavé látky zelených listů. Fytooxylipiny zahrnují C6 aldehydy, alkoholy a jejich estery. Rostliny je syntetizují, když jsou listy poškozeny biotickým a abiotickým stresem. Fytooxylipiny tak mohou zprostředkovávat komunikaci nejen mezi

jednotlivými rostlinami v okolí, ale také mezi jednotlivými orgány. Huseníček z porušených pletiv uvolňoval cis-3-hexenal, zatímco z okolní neporušené tkáně se uvolňovali látky hexenol a cis-3-hexenylacetát. Tím byla u BVOC prokázána souvislost s obranou rostliny. Rovněž bylo prokázáno, že v případě napadení mohou BVOC přivolat predátory či parazity fytopatogenů. BVOC byly objeveny nejen v rostlinách, ale také v houbách a bakteriích (Šimpagra et Takabayashi et Holopainen, 2016).

5. Obrana rostliny

Všechny části rostliny, ať už se jedná o nadzemní části či podzemní, jsou nepřetržitě vystavovány nejrůznějším fyziologickým interakcím. Mezi tyto druhy interakcí patří nejen běžné životní podmínky, ale také biotické či abiotické stresové faktory. Na všechny druhy interakcí si rostliny vyvinuly různé obranné mechanismy, na kterých se podílejí i fytohormony. Mezi nejčastějším biotickým stresovým faktorem, jsou organismy třídy hmyzu. Hmyz se řadí mezi nejpočetnější skupinu a do této třídy se řadí až 80 % všech druhů světa, přičemž většina těchto hmyzích druhů jsou býložravci a jsou tak rostlinnými fytopatogeny. Tyto druhy pak každoročně způsobují rozsáhlé škody na zemědělských plodinách. Aby se rostlina byla schopna aktivně, a hlavně účinně bránit, musí být nejprve schopna vnímat útok a adekvátně reagovat aktivací nejvhodnějšího obranného systému. Vybrat nejvhodnější obrannou strategii je klíčové. Rozmanitost hmyzu dopomohla k vytvoření mnoha způsobu napadení, na které rostliny v rámci evoluce odpověděly vytvořením různých strategií obrany. Rostliny vnímají útoky fytopatogenů za pomoci elicitorů (chemické sloučeniny schopné stimulovat tvorbu jiné chemické sloučeniny) odvozených od škůdců, nebo pak nepřímo, prostřednictvím rozpoznání hmyzích proteinů. Jedním z takových proteinů, je inceptin. Inceptin je obsažen ve slinách housenek, které se živí částmi rostlin. Tato chemická sloučenina aktivuje regulační oblasti indukci těkavých fenylypropanoidních a proteázových inhibitorů. Mezi přímé biotické elicitory produkované patogeny, patří například volicitin (Elena, 2012). U bakterií pak je schopna rostlina rozpoznat látku flagelin, u hub chitin (Chanclud et al., 2016). Jakmile jsou tyto látky rostlinou identifikované, dojde k okamžité aktivaci obranné reakce rostliny.

Výzkum obrany rostlin se historicky zaměřil na výzkum tří fytohormonů. Kyselina salicylová, kyselina jasmonová a ethylen, byli dlouho považovány za hlavní obranné fytohormony. V huseníčku rolním bylo zjištěno, že rostlina proti biotrofním fytopatogenům využívá převážně kyselinu salicylovou, zatímco proti nekrotrofním fytopatogenům používá směs kyseliny

jasmonové a ethylenu. Také bylo zjištěno, že tyto dvě cesty obrany jsou zpravidla antagonistické. V nedávné době se však tento jednoduchý model začal zpochybňovat s tím, že obrana rostlin je složitější a vysoce komplexní signalizační síť, do které je zapojeno více fytohormonů, včetně brassinosteroidů. Do této signalizační sítě jsou zapojeny také auxiny, které mají mnoho podobných vlastností jako kyselina jasmonová, zatímco proti kyselině salicylové působí spíše antagonisticky. Další možností obrany je akumulace ROS (Chanclud et al., 2016). K ROS se řadí nejen všechny radikální formy kyslíku, ale také chemické sloučeniny v podobě peroxidu vodíku či singletový kyslík, který je považován za jeden z faktorů stárnutí. ROS jsou vysoce toxické chemické látky, které způsobují rozpad buněk. Tato vlastnost je pro obranu rostliny klíčová, přesto pro samotnou rostlinu nebezpečná. ROS totiž mohou urychlit nástup senescence (Vyličilová et al., 2015). Aby rostlina zabránila nežádoucím účinkům, využívá k regulaci ROS brassinosteroidy (Lv, B. et al., 2018). Rostlina je při ohrožení také schopna posílit buněčnou stěnu v místě ohrožení. Touto strategií rostlina zabrání přístupu fytopatogenu k samotným buňkám. Do obrany se také mohou zapojit metabolity a enzymy s antimikrobiálními schopnostmi, které rostliny také syntetizují (Chanclud et al., 2016). Další možnou obranou je schopnost rostliny přivábit predátora nebo parazita rostlinného škůdce. Nejčastěji tuto vlastnost rostlina využívá proti larvám fytopatogenu. Tuto strategii lze pozorovat například u kukuřice (*Zea spp.*), která po rozpoznání škůdce zvýší syntézu kyseliny jasmonové v listech, čímž se zahájí syntéza BVOC. Tím rostlina přivábí vosu z rodu lumčíkovitých (*Cotesia*), které do housenek nakladou vajíčka, čímž je nakonec zahubí (Van Poecke et al., 2001). Tyto užitečné druhy predátorů jsou ovšem dnes ohroženy pesticidy a dalšími chemickými látkami, které zlepšují výnosnost plodin nebo hubí fytopatogeny. Možným řešením by mohl být přechod na ekologické zemědělství, což by mohlo zlepšit životní podmínky pro druhy hmyzu podílejících se na obraně rostlin před škůdci (Elena, 2012).

Ve všech zmíněných obranných mechanismech se rostliny opírají o fytohormony. Jejich podíl na obraně však není za všech okolností stejný. Účinky brassinosteroidů při obraně rostliny se zdají být ovlivněny nejen životním stylem fytopatogenu, ale také jsou zřejmě ovlivněny strategií infekce. Je také zřejmě odlišné, jakým způsobem jsou brassinosteroidy rostlině podávány. Tedy zda jsou tyto fytohormony podávány uměle, nebo jsou rostlinnou syntetizovány (Mei-Hui et al., 2018). Strategie fytopatogenu je ovšem také zásadní. Můžeme rozlišit několik strategií. Jednou z nich jsou biotrofní patogeny, které zdánlivě žijí v souladu s hostitelem. Poškození takovýmto typem patogenu je mírné a nedestruktivní. Brassinosteroidy v takovémto případě zřejmě dopomáhají rostlině ke zvýšení odolnosti a chrání tak rostliny před

těmito druhy škůdců. Například exogenně podávané brassinosteroidy dopomohly snížit u brambor poškození, způsobené eukaryotními organismy z rodu *Phytophthora*. Brassinosteroidy byly však také zkoumány u hemibiotrofních a nekrotrofních fytopatogenů. Zde je účinek brassinosteroidů značně široký. Tyto druhy fytohormonů mohou v rámci obrany proti těmto typům fytopatogenů, navýšit rezistenci rostliny, navýšit citlivost, nebo nemusejí mít žádný účinek. Jak budou brassinosteroidy účinné, závisí na druhu fytopatogenu (Mei-Hui et Zhe-Ze et Jun-Xian, 2018). Brassinosteroidy se například podílejí na obraně ječmene před *Fusarium oxysporum* což je houbová choroba nejčastěji způsobená srpovičkou špičatovýtrusnou (*Fusarium oxysporum*). Ne vždy ovšem působí brassinosteroidy na obranu rostliny pozitivně. Exogenní brassinolid znemožňuje vytvořit rezistenci huseníčku na bakterii *Pseudomonas syringae* a houbu čerň kapustovou (*Alternaria rassicicola*). Další studie odhalily, že ošetření za pomoci brassinolidu způsobilo u rýže seté (*Oryza sativa*) přecitlivělost na kořenové fytopatogeny *Pythium graminicola* a *Meloidogyne graminicola*. Toto zjištění poukázalo, že brassinosteroidy mohou obranu rostliny nejen podporovat, ale také snižovat až natolik, že zřejmě *Pythium graminicola* využívá brassinosteroidy jako faktor virulence. Využití brassinosteroidů není nikterak ojedinělé. Dalším fytopatogenem využívaným fytohormonem je například auxin, který škůdci produkují za účelem manipulovat s obranou a vývojem rostliny (Bruyne et al., 2014).

6. Bekyně velkohlavá

6.1 Popis a životní cyklus bekyně velkohlavé

Bekyně velkohlavá (*Lymantria dispar*) se řadí do nově ustanovené čeledi *Erebidae*, která v současnosti nemá český ekvivalent (Zahradník, 2014). Bekyně velkohlavá má, stejně jako ostatní druhy čeledi *Erebidae*, pohlavní dimorfismus. Rozpětí křídel samečků je 35 až 45 mm. První pár křídel se vyznačuje hnědou barvou s tmavým příčným vlnkováním, zatímco druhý pár křídel má hnědou barvu (Křístek et Urban, 2013). Samečci mají na hlavě pár mohutných, oboustranně peřenitých tykadel, samičky se pak vyznačují párem nitkovitých tykadel (Zahradník, 2014). Samičky se dále odlišují svou mohutností. Mají také větší rozpětí křídel, v rozmezí 50 až 75 mm. Neodlišují se však jen mohutností a větším rozpětím křídel, ale také svou barvou. Samičky, na rozdíl od samečků, mají oba páry křídel špinavě bílé, přičemž, stejně jako u samečků, má první pár křídel tmavé, příčné vlnkování. Vajíčka bekyně mají kulovitý

tvář, charakteristickou žlutohnědou barvu a na dotek jsou lepkavá. Samička klade vajíčka v oválných hromádkách na kůry stromů, kdy tyto snůšky bekyně pokrývá žlutohnědými chloupky ze svého zadečku. Výsledný tvar této snůšky (tzv. hubky) se podobají plstěným nebo houbovým bochánkům. Následné housenky pak mohou dorůstat až do velikosti 70 mm. Housenky lze rozpoznat díky žlutavé a tmavě mramorované hlavě, válcovitému šedožlutému tělu s červenou kresbou a třemi hřbetními pruhy táhnoucími se podél celého těla. Nápadné jsou také modré bradavky na prvních člancích trupu. Na zbývajících člancích pak mají housenky bradavky černější barvy. Po dvou měsících aktivního žíru se housenky zakuklí. Kukly jsou dlouhé v rozmezí 20 až 30 mm. Mají matnou, červenohnědou barvu s řídkými, zato poměrně dlouhými červenožlutými štětečky chlupů (Křístek et Urban, 2013). Fyziologie bekyně je silně závislá na chemickém složení hostitelské rostliny. Od vlastností rostliny se odvíjí nejen vývoj tohoto fytopatogenu, ale také nezbytná reprodukce, i samotné fyziologické schopnosti škůdce. Rostliny, které produkují alelochemikálie, nebo jsou pro bekyni nutričně nedostatečné, způsobují metabolickou zátěž tohoto hmyzu. Stres se projevuje na vývoji larev a značně snižuje jejich růst. Bekyně se takovému stresu brání za pomoci fenotypové plasticity, kdy se na zhoršené až nepříznivé podmínky adaptuje. Například může u bekyně dojít ke snížení využitelnosti potravy, což tento hmyzí parazit kompenzuje zvýšeným příjmem potravy. Dalším příkladem adaptace na nutriční stres, jsou změny na úrovni zažívacího traktu bekyně. Alelochemikálie zase mohou způsobit změny u detoxikačních enzymů bekyně (Lazarevis et al., 2002).

V České republice se bekyně nejčastěji přemnožuje na dubových nebo dubohabrových porostech. Nejčastěji se tak děje na jižní Moravě. V Evropě se s bekyní potýkají hlavně na jihu a jihovýchodě Evropy, kde bekyně napadá převážně dubové porosty (Křístek et Urban, 2013). I když bekyně nejvíce napadá dubové porosty, nejsou jejím jediným zdrojem potravy. Bekyně velkohlavá je polyfágní druh hmyzu, kdy je schopna parazitovat až na 500 druzích rostlin ze 73 čeledí (Lazarevis et al., 2002). Bekyně ovšem dává přednost hlavně dubům (*Quercus spp.*), habrům (*Carpinus spp.*), bukům (*Fagus spp.*), kaštanovníkům (*Castanea spp.*), jabloním (*Malus spp.*) a hrušním (*Pyrus spp.*). V menší míře ji lze nalézt na břízách (*Betula spp.*), lípách (*Tilia spp.*), vrbách (*Salix spp.*), topolech (*Populus spp.*), javorech (*Acer spp.*), olších (*Alnus spp.*), modřínkách (*Larix spp.*) a dalších druzích včetně keřů (Zahradník, 2014). Teplé a suché klima podporuje rozmnožování a vývoj bekyně velkohlavé. Gradace, způsobené teplým podnebím, pak obvykle trvají 3 až 5 let a dochází k periodickému opakování (Křístek et Urban, 2013). Bekyně, při těchto gradacích, způsobuje rozsáhlé holožíry, v jejichž důsledku dochází

k odumírání nejen stromů, ale také celých porostů (Bartošová et al., 2019). Konec těchto gradací zpravidla způsobuje nedostatek kvalitní potravy, kdy bekyně přejde na méně vhodnou dřevinu. Dalším faktorem ukončení gradace bekyně jsou predátoři, případně choroby. Mezi predátory bekyně patří ptáci, například kukačka obecná (*Cuculiformes canorus*) nebo žluva hajní (*Oriolus oriolus*). Také jsou potravou krajníků (*Calosoma*), dravých ploštic (*Heteroptera*) a dalších hmyzích predátorů. Vajíčka jsou pak ohrožena různými druhy cizopasníků. Většina gradací je však ukončena jádrovou polyedrií. Jedná se o virové onemocnění housenek, kdy se vlivem onemocnění objeví v buněčném jádře polyedry, neboli bílkovinná tělíška. Některé housenky této nemoci podlehnou, ale mnohé jsou i přesto schopny žrát až do posledního instaru a následně se zakuklit. Vylíhnutí se motýli jsou ovšem degenerovaní, čímž dojde ke snížení populace v dané oblasti a ukončení gradace (Křístek et Urban, 2013). V našich zeměpisných šířkách dochází k rozmnožování bekyně v srpnu a září. Samečci se ovšem se samičkami páří obvykle již 1. den po vylíhnutí, kdy samičky po několika málo hodinách již kladou vajíčka na kůru stromů. Kladení probíhá průměrně v 5 dnech, kdy samička naklade 400 až 800 kusů vajíček. Nejvíce samička naklade již 1. den, obvykle 70 % z celkového počtu. Nejčastěji si samičky vybírají jižní stranu kmenů stromů, rostoucích na okraji porostů a jiných osluněných místech. Jsou-li bekyně přemnožené, kladou samičky vajíčka i třeba na pařezy, ploty a jiná neobvyklá místa.

Vajíčka ukončují genetický vývoj po 3 až 4 týdnech, k vylíhnutí housenek však nedochází. Housenky bekyně prodělávají geneticky podmíněnou zimní diapauzu, což způsobí, že housenky opouští vaječné obaly v dubnu nebo začátkem května následujícího roku. Tím se housenky vyhnou zimnímu období a vylíhnou se v době, kdy dochází k rašení hostitelských rostlin. Čerstvě vylíhnuté housenky se nikam nepřesouvají. Zůstávají v okolí opuštěných snůšek a shlukují se do skupin zvaných zrcátka. V těchto zrcátkách zůstávají housenky několik dní, teprve poté se vydávají do korun stromů, kdy si začnou shánět potravu. V době 1. instaru zůstávají housenky pospolu, kdy se živí mladými a čerstvě vyrašenými lístky (zanechávají na nich drobné otvory) a pupeny stromů. K rozptylu housenek dochází od 2. instaru. Tehdy housenky začínají ožírat listy ze všech stran, včetně žilnatiny. Zbytky těchto listů jsou pak roztroušeny na zemi po okolí. V okamžiku, kdy housenky spotřebují veškerou potravu, dochází k nekoordinovanému rozmístění, za účelem nalézt nové potravní zdroje. Jsou-li dostupné zdroje potravy kvalitní a klima okolí je pro bekyni optimální, vyvíjejí se housenky přibližně 8 až 12 týdnů, zpravidla se tak zakuklí v červnu. Pokud jsou ovšem podmínky nepříznivé, se bekyně nachází ve vyšších nadmořských výškách, mohou se housenky kuklit až koncem června

či později. K zakuklení zpravidla dochází ve štěrbinách kůry, řidčeji lze nalézt kukly bekyně například na plotu, stavení a jiných méně vhodných místech. Při gradacích se housenky mohou kuklit i ve skupině, a to i po více než 100 jedincích. Motýli se pak líhnou po 2 až 3 týdnech vývoje. Žír bekyně velkohlavé tak vrcholí od konce dubna do poloviny června. Bekyně tak činí největší škody v době, kdy listy postižených rostlin ještě nesplnily svou asimilační funkci. Po ukončení žíru by se pak rostliny měly během léta opět zazelenat a k žádnému vážnému úbytku by dojít nemělo. Odlistění může zničit úrodu žaludů, prosychání koruny a odumírání dřevin, třeba vlivem padlého starého stromu, který způsobí zničení nově vyrašených lístků i semenáčků. Z toho vyplývá, že bekyně velkohlavá nezpůsobuje primárně odumírání dřevin ve větším množství, její vliv ovšem způsobuje, že se stromy nejsou schopny vyrovnat s dalšími nepříznivými biotickými či abiotickými vlivy, mezi které patří například nedostatek vody nebo dlouho trvajícím suchu (Křístek et Urban, 2013).

6.2 Monitoring

Monitoring bekyně probíhá za pomoci feromonových lapačů, využívajících sexuální feromon. Zpravidla se monitoring provádí třetí rok po ukončení gradací. Lapače se rozestaví ve schématu 4x4 tak, aby jednotlivé lapače měly od sebe rozestup 50 m. Při překročení hranice 100 samců na jeden lapač se přechází na Turčekovu metodu, která spočívá v počítání snůšek na náhodně vybraných stromech. Tato metoda se dá použít pouze od září do února následujícího roku. Pokud následný výsledek je vyšší než dvě snůšky na jeden strom, jedná se o kalamitní stav. I v případě kalamitního stavu nemusí dojít k obranným opatřením. Ty se provádějí v případě, že jsou ohrožení jedinci ve špatném zdravotním stavu, kupříkladu vlivem sucha, nebo se jedná o víceletou defoliaci, či se jedná o kombinaci více faktorů. Zásah se také může provádět ze zdravotně-hygienických důvodů. Je-li bekyně pro napadený strom ohrožující a je tak třeba učinit obranná opatření, dochází k nim zpravidla v květnu. Kontrola obranného zásahu se následně provádí za pomoci trusníkové metody, kdy se využívají trusníky o rozměrech 1x1 m. Mortalita bekyně se vypočítá z rozdílu trusinek před a po obranném zásahu. Gradace bekyně nelze předvídat. Pravděpodobný výskyt se tak stanovuje podle výskytu v roce předešlém (LOS, 2019).

6.3 Opatření před bekyní velkohlavou

Ideální způsob obrany jsou preventivní opatření, která snižují počet bekyní. Zejména se jedná o vhodnou prostorovou a porostní skladbu, která umožní existenci vícero druhů přirozených nepřátel bekyně velkohlavé. Vhodné je také podporovat výskyt predátorů a parazitoidů. Důležitým faktorem je také respektování ekologických nároků rostlin. Odstraňovat stromy s velkým množstvím mrtvého dřeva a s hrubou borkou, které představují vhodné hostitele bekyně velkohlavé. V menší míře lze mechanicky odstraňovat hubky či housenky. Jako poslední možné opatření se využívá chemický postřik pomocí letecké ULV (ultra nízký objem) aplikace. V mladých porostech je možné využít zádoových postřikovačů. K takovému opatření dochází zcela výjimečně. Vhodnější je využít biologické přípravky obsahující bakterie *Bacillus thuringiensis kurstaki*, které napadají housenky bekyně. I přes dodržování těchto preventivních opatření a využití postřiků, může bekyně napáchat rozsáhlé škody. Nejúčinnější, téměř 100 %, je aplikace polyedrického viru nesoucí označení LdMNPV (Lymantria dispar multicapsid nuclear polyhedrosis virus), dříve *Borralinivirus reprimens*, který je v současné době zakázaný (LOS, 2019). Veškeré chemické přípravky mají ovšem mnoho nepříznivých dopadů na okolí. Mnohé druhy si navíc vlivem evoluce vytváří rezistenci vůči těmto pesticidům, a tak se začaly zvažovat nové způsoby obrany rostlin před hmyzími patogeny. Jedním možným řešením se jeví sterilita samců hmyzu, která je způsobená úmyslným zásahem do genetické výbavy zvoleného škůdce. Tato technika může být úspěšná jen tehdy, když uvolněný sterilní hmyz účinně soutěží se svými divokými protějšky o přízeň samic. Toho se dá dosáhnout i za pomoci pesticidů, které přirozenou populaci hmyzu značně oslabí. Možnou budoucí obranou jsou také nanočástice obsahující látky, kupříkladu pesticidy, které by úspěšně hubily škůdce, a přitom příliš nenarušovaly okolní krajinu. Navíc by tyto nanočástice mohly snadněji pronikat přes kutikulu a tkáň hmyzu (Seth et al., 2018).

7. Metody použité při měření

7.1 Spektrometrie

Spektrometrie je metoda založená na interakci mezi elektromagnetickým zářením a analyzovaným vzorkem. Záření je pak částečně vzorkem absorbováno. Absorpcí dojde ke změně energie molekuly, čímž vzniká excitovaný atom, který projde zkoumaným roztokem a je následně detekován přístrojem. Množství světla, které je propuštěno, odraženo nebo

pohlčeno je závislé na vlnové délce záření a na koncentraci zkoumané látky. Množství záření, které projde, je popisováno pomocí transmitance. Transmitance může nabývat hodnot od 0, (vzorek záření zcela absorboval) až 1 (k absorpci záření vzorkem nedošlo). Absorbance je pak záporným dekadickým logaritmem transmitance. Vyjadřuje tak schopnost molekul látky pohlčovat záření určité vlnové délky. Každé barevné světlo má svou specifickou vlnovou délku. Kupříkladu červené světlo má vlnovou délku 660 nm, zelené světlo pak 520 nm. Vlnová délka, která je objektem vyzářena, určuje výslednou pozorovanou barvu. K samotnému stanovení koncentrace zkoumané látky slouží Lambert-Beerův zákon. Ten určuje vztah mezi koncentrací a absorbancí. Samotný zákon ovšem k přesnému stanovení nestačí. Využívá se také metoda kalibrační křivky. Kdy se naměří absorbance několika kalibračních roztoků o různých koncentracích. Je nezbytné toto měření provést na jednom stroji, v jedné kyvetě a o stejné vlnové délce, aby nedošlo ke změně konstanty, která je závislá na tloušťce kyvety. Výsledná závislost je v ideálním případě lineární a prochází počátkem. Kalibrační křivku však lze použít pouze pro jednoduché vzorky, neobsahující mnoho chemických látek. V případě složitějších vzorků se využívá metoda standardního přídatku. Spektrometr se skládá ze zdroje světla, optické mřížky nebo monochromátoru, štěrbin, která se posouvá na základě požadované vlnové délky, kyvety a detektoru. Spektrometrie lze stanovit organické molekuly, anorganické ionty nebo komplexy v roztocích. Touto metodou je také možné analyzovat pevné materiály, jako jsou například filmy nebo sklo (De Caro, 2015).

7.2 Gazometrie

Gazometrie je metoda zkoumající výměnu dvou plynů mezi listem a jeho okolím. Tato výměna se projeví změnou koncentrace plynu v okolí zkoumaného vzorku. Stejně, jako ve spektrometrii, je gazometrie založena na absorpci záření. Heteroatomické molekuly (mezi které patří například námi zkoumané CO_2) absorbují záření při specifických vlnových délkách v oblasti infračerveného záření. Monoatomické molekuly (např.: O_2 , N_2) mají nulový dipólový moment, proto infračervené záření neabsorbují. Z toho důvodu lze změřit koncentrace CO_2 v okolí listu, aniž by došlo k ovlivnění výsledků. Jediný plyn ovlivňující měření CO_2 je vodní pára, která absorbuje záření v podobné oblasti. Gazometr se skládá z několika částí: širokospektrální zdroj infračerveného záření, asimilační komory, optického filtru a detektoru. Elektronicky zpracovaná signál z detektoru je pak převeden na koncentraci zkoumaného plynu. Na základě výpočtu mezi koncentrací CO_2 před a po absorpci listu, lze vypočítat rychlost

fotosyntézy. Vliv na absorpci CO₂ má navíc několik faktorů. Odpor pokožky listu, difuzní odpor průduchů listu a také difuzní odpor mezofylu. Na základě získaných údajů lze také vypočítat vnitřní koncentraci CO₂ (Anonym, 2018).

8. Měření

V této práci bylo použito 16 sazenic buku lesního (*Fagus sylvatica*). 8 sazenic z 16 bylo ošetřeno syntetickým brassinosteroidem 24-epibrassinolidem (EpiBr), chemický vzorec EpiBr je 2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstan-6-one, o koncentraci 0,4 mg/l. Protože byl roztok EpiBr pro aplikaci příliš koncentrovaný, byl EpiBr zředěn v poměru 1:10. Z těchto 8 sazeniček buku pak byly 4 sazeničky vystaveny vlivu bekyně velkohlavé. Zbýlých 8 sazeniček bylo také rozděleno do dvou skupiny po 4 vzorcích, kdy jedna skupina byla vystavena vlivu bekyně velkohlavé, zatímco druhá skupina byla ponechána jako kontrolní skupina. Těchto 8 sazeniček již EpiBr nebylo ošetřeno. Sazenice byly umístěny do fytokomor (model FS-SI 3400), kde byly po dobu 3 měsíců vystaveny stabilním podmínkám. Podmínky byly stanoveny s ohledem na letní dny. Vlhkost vzduchu byla 70 %, teplota se pak pohybovala 15-25 °C, kdy se teploty měnily v rámci noci a dne. Dále bylo nastaveno 405 ppm CO₂ a fotoperioda odpovídala letnímu dni, tedy byla nastavena na 8 a 16 hodin. Po uplynutí potřebné doby byly vzorky změřeny gazometricky za pomoci gazometrického přístroje LI-6400XT (LI-COR), NE, USA, kdy byly zjištěny parametry fotosyntézy. Vzorkům byla rovněž změřena fluorescenční indukce fluorimetrem FluorPen (PSI, Drásov, ČR).

Jelikož měření brassinosteroidů je náročné a vyžaduje velice přesné analytické přístroje, jako je kupříkladu UHPLC-MS, který nebyl k dispozici, bylo třeba využít jiný způsob měření. K získání potřebných dat se proto měřila koncentrace AMK prolinu, který je rovněž ukazatelem stresu rostliny, jako je tomu u brassinosteroidů. Měření probíhalo za pomoci spektrofotometrického přístroje UV-VIS spektrometr DR6000 (HACH, CO, USA). Předpokladem bylo, že brassinosteroidy by měly ovlivnit koncentraci prolinu. Nejprve bylo nutné prolin extrahovat. Extrakce byla provedena za pomoci kyseliny sulfosalicylové a roztoku ninhydrinu, který je zapotřebí míchat vždy čerstvý. Protože není nutné mít čerstvý roztok kyseliny sulfosalicylové, byl vytvořen jeden zásobní roztok. Na 1 l roztoku, bylo zapotřebí 30 g krystalické látky této kyseliny. Na požadovaný roztok ninhydrinu, bylo zapotřebí 0,25 g ninhydrinu, rozpuštěného v 6 ml ledové kyseliny octové a 4 ml kyseliny fosforečné. Pro

podporu rozpouštění bylo zapotřebí vzniklý roztok zahřát na vodní lázni. Následně byl roztok promíchán za pomoci vortexu. Takto připravený ninhydrin, měl expirační dobu 24 h od okamžiku namísení. Aby bylo možné zjistit koncentraci prolinu za pomoci spektrofotometrie, bylo zapotřebí 150 mg listů buku lesního. Toto množství vzorků se vložilo do třecí misky s tloučkem, k nimž se za pomoci pipety přidalo 1,5 ml vytvořeného roztoku kyseliny sulfosalicylové. Vzorky byly důkladně rozetřeny na kaši. Tato hmota se následně za pomoci kopisty převedla do 2 ml mikrozkušavek, které byly vloženy do centrifugy. Centrifuga byla nastavena na 5 min na maximální otáčky. Za pomoci pipety bylo 400 μ l supernatantu (tekutina nad sedimentem) převedeno do 2 ml mikrozkušavek. K tomuto supernatantu bylo převedeno za pomoci pipety 400 μ l ledové kyseliny octové a 400 μ l čerstvého roztoku ninhydrinu. Vzorek byl promísen za pomoci vortexu a vložen do nahřátého zahřívacího bloku HeatBlocku, který byl nastaven na 95 °C. Vzorky byly v termobloku temperovány po dobu 1 h. Vzorky byly po uplynutí požadované doby vyjmuty a ochlazeny. Po ochlazení bylo k vzorkům převedeno 800 μ l toluenu. Vzorky byly po dobu 20-30 s smíseny na vortexu. Horní část vzorku se následně pipetou převedla do připravené kyvety a změřena na spektrofotometru DR6000 při vlnové délce 520 nm. Při stejné vlnové délce byla měřena i kalibrační křivka. Pro kalibrační křivku bylo vytvořeno 5 roztoků o známé koncentraci prolinu, šestý vzorek prolin neobsahoval. Kalibrační křivka pak posloužila k získání koncentrace prolinu ve vzorcích.

9. Výsledky

9.1 Fotosyntéza rostliny

Za pomoci gazometrického stanovení fotosyntetických parametrů, bylo možné prověřit hypotézu, zda má bekyně velkohlavá skutečný vliv na fotosyntézu rostliny. Ze získaných výsledků byly vybrány některé parametry, dle kterých bylo možné hypotézu posoudit. Maximální rychlost hrubé fotosyntézy (P_{gmax}), saturační bod světelné ozáření ($I_{sat(95)}$), rychlost čisté fotosyntézy ($P_N(I_{max})$), stomatální vodivost ($Cond$), intracelulární koncentrace CO_2 (C_i) a transpirace (T_{rmmol}).

Tabulka 1 - vliv bekyně velkohlavé na fotosyntézu rostliny: vz – vzorek (listy buku lesního), P_{gmax} – Maximální rychlost hrubé fotosyntézy, I_{sat(95)} – saturační bod světelné ozáření, PN(I_{max}) – rychlost čisté fotosyntézy, Cond – stomatální vodivost, C_i – intracelulární koncentrace CO₂, Trmmol – transpirace vzorku.

Žír bekyně						
vz	P_{gmax}	I_{sat(95)}	PN (I_{max})	Cond	C_i	Trmmol
1	8,00	526,20	7,70	0,13	277,40	3,35
2	6,00	439,10	5,70	0,12	298,20	3,27
3	8,60	451,20	8,30	0,19	303,00	4,10
4	6,70	524,50	6,50	0,11	282,10	3,24
Bez žíru bekyně						
vz	P_{gmax}	I_{sat(95)}	PN (I_{max})	Cond	C_i	Trmmol
1	8,50	551,60	8,30	0,18	298,50	4,93
2	6,50	434,80	6,30	0,13	296,20	3,67
3	5,90	507,40	5,60	0,12	297,80	3,64
4	7,30	498,20	7,10	0,14	289,50	3,89

Vložením výsledných dat do statistického programu R přineslo kýžený výsledek. Do statistického výpočtu byly zaneseny hodnoty P_{gmax}, s vlivem bekyně velkohlavé (B_p_{gmax}) a výsledky z rostlin, které bekyní napadané nebyly (NB_p_{gmax}). Hypotézy byly zvoleny následovně:

H₀ = Bekyně velkohlavá nemá žádný vliv na fotosyntézu rostliny.

H₁ = Bekyně velkohlavá má vliv na fotosyntézu napadené rostliny.

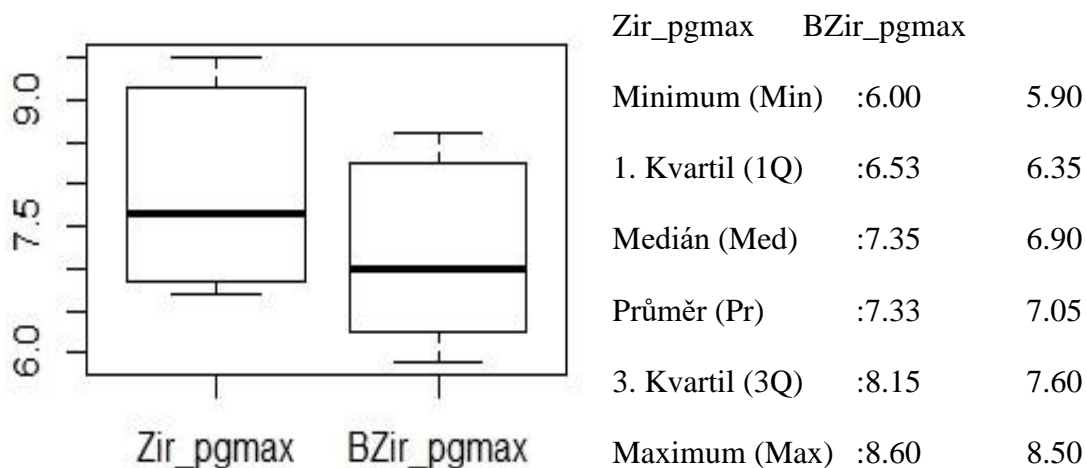
Zadané příkazy v programu R:

Zir_p_{gmax}=c(8.0,6.0,8.6,6.7); (Zir – vliv bekyně velkohlavé na vzorek)

BZir_p_{gmax}=c(8.5,6.5,5.9,7.3) (BZir – vzorek bez vlivu bekyně velkohlavé)

P_{gmax}=data.frame(Zir_p_{gmax}, BZir_p_{gmax})

summary(P_{gmax}); boxplot(P_{gmax}) – Vliv bekyně velkohlavé na P_{gmax} rostliny



Graf 1 - Vliv bekyně velkohlavé na P_{gmax} rostliny: P_{gmax} – Maximální rychlost hrubé fotosyntézy, Zir_pgmax – vliv bekyně velkohlavé na data P_{gmax}; BZir_pgmax – hodnoty P_{gmax} bez vlivu bekyně velkohlavé (R); střední hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

var.test(P_{gmax}\$Zir_pgmax, P_{gmax}\$BZir_pgmax):

F = 1.1154, num df = 3, denom df = 3, p-value = 0.9306

Protože je p-value rovno 0,9306 a je tedy větší než hodnota hladiny významnosti 0,05; H₀ se nezamítá. Bekyně tak nemá vliv na hodnotu P_{gmax}. Dalšími výpočty bylo dosaženo stejných výsledků (viz příloha č. 1). Žír bekyně velkohlavé tedy nemá žádný vliv na parametry fotosyntézy rostliny.

9.2 Stanovení prolinu

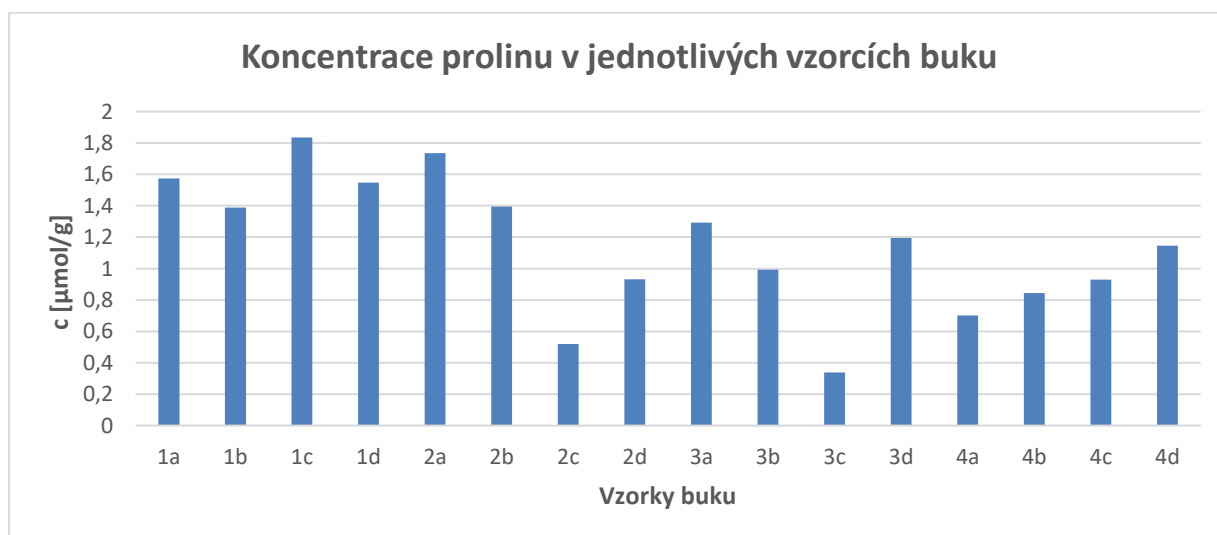
Aby bylo možné vypočítat koncentraci prolinu, bylo zapotřebí nejprve vytvořit kalibrační křivku. Té lze dosáhnout za pomoci spektrofotometrického měření několika známých koncentrací prolinu. Výsledná data se vloží do grafu a proloží se křivkou. Z rovnice křivky pak lze vypočítat koncentraci prolinu v jednotlivých vzorcích buku a vztáhnout na hmotnost vzorku.

Naměřená data jednotlivých koncentrací určených pro kalibrační křivku (viz *Graf 10*), by měla být co nejpřímější. Nicméně přístroj pracuje s určitou chybou a samotné vytvoření jednotlivých vzorků pro kalibrační křivku také není přesné. Čím jsou však body na křivce přímější, tím je přesnější i kalibrační křivka.

Tabulka 2 - Koncentrace prolinu ve vzorcích listů buku: vz – vzorek (listy buku lesního), A – absorbance, c – koncentrace AMK prolinu v čerstvém vzorku.

Ošetření brassinosteroidy					
Vliv bekyně			Bez vlivu bekyně		
vz	A	c[$\mu\text{mol/g FW}$]	vz	A	c[$\mu\text{mol/g FW}$]
1a	0,738	0,272	3a	0,606	0,224
1b	0,651	0,240	3b	0,465	0,172
1c	0,860	0,317	3c	0,159	0,059
1d	0,725	0,267	3d	0,560	0,207
Bez ošetření brassinosteroidy					
Vliv bekyně			Bez vlivu bekyně		
vz	A	c[$\mu\text{mol/g FW}$]	vz	A	c[$\mu\text{mol/g FW}$]
2a	0,813	0,300	4a	0,329	0,121
2b	0,654	0,241	4b	0,396	0,146
2c	0,244	0,090	4c	0,436	0,161
2d	0,437	0,161	4d	0,537	0,192

K zobrazení výsledných koncentrací prolinu byl zvolen sloupcový graf coby nejpřehlednější ze skupiny grafů. Na první pohled není zcela zřejmé, zda mají brassinosteroidy nějaký vliv na rostliny. Nicméně rozpětí koncentrace prolinu při ošetření brassinosteroidy je odlišný od rozpětí koncentrace prolinu v rostlinách, které ošetřeny nebyly.



Graf 2 - Koncentrace prolinu ve vzorcích listů buku: c – koncentrace prolinu ve vzorku [$\mu\text{mol/g FW}$ (čerstvé hmotnosti)], 1a-1d – vystavení žíru bekyně velkohlavé po ošetření brassinosteroidy; 2a-2d – vystavení žíru bekyně velkohlavé bez ošetření brassinosteroidy; 3a-3d – bez vlivu bekyně velkohlavé po ošetření brassinosteroidy; 4a-4d sazenice nebyly ošetřeny brassinosteroidy ani nebyly vystaveny žíru bekyně velkohlavé.

Výsledky byly i v tomto případě zaneseny do programu R. V tomto případě bylo zhodnoceno, zda mají brassinosteroidy vliv na rostlinu, a to jak bez vlivu bekyně velkohlavé, tak i při jejím napadení:

9.2.1 Vliv bekyně velkohlavé za přítomnosti brassinosteroidů (B_okus) a bez chemického ošetření (Okus)

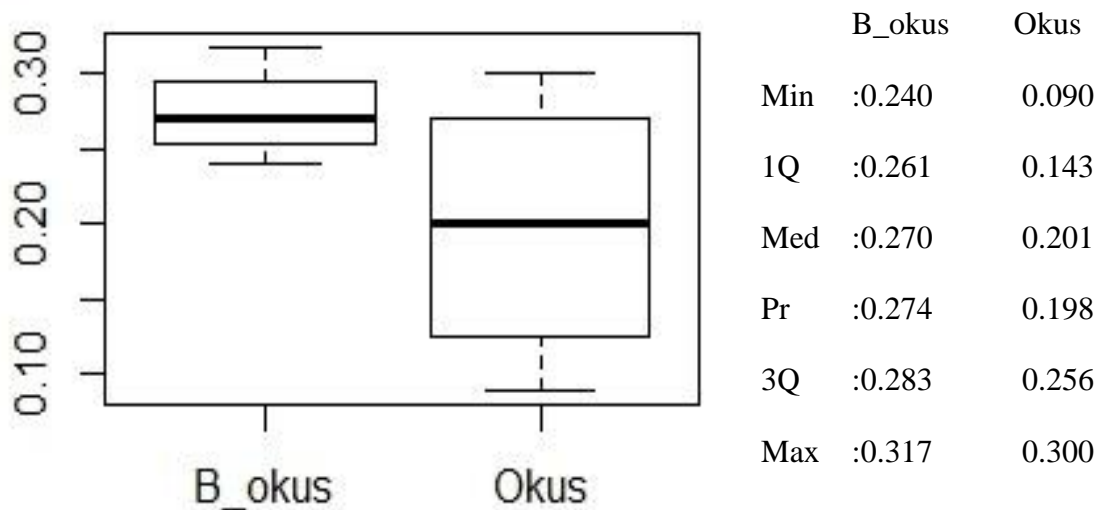
H0 = Brasinosteroidy nemají vliv na stres rostliny.

H1 = Brasinosteroidy mají vliv na stres rostliny.

B_okus=c(0.2722,0.2401,0.3172,0.2674); Okus=c(0.2999,0.2412,0.0900,0.1612)

Zir=data.frame(B_okus, Okus)

summary(Zir); boxplot(Zir): Vliv brassinosteroidů na koncentraci AMK prolinu za přítomnosti žíru bekyně velkohlavé.



Graf 3 - Vliv brassinosteroidů za přítomnosti žíru bekyně velkohlavé na koncentraci prolinu na sazenice buku: prostřední hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

Vliv brassinosteroidů na rozpětí koncentraci prolinu je z *Graf 3* ještě patrnější, než tomu bylo u *Graf 2*. Z grafů tedy lze předpokládat, že brassinosteroidy mají jakýsi vliv na rostliny, případně mají vliv na koncentraci prolinu.

```
var.test(Zir$B_okus, Zir$Okus)
```

F = 0.12118, num df = 3, denom df = 3, p-value = 0.1167

Protože je p-value větší než 0,05, hypotéza H₀ se nezamítá. Brassinosteroidy nemají vliv na stres rostliny za přítomnosti bekyně velkohlavé. Třebaže *Graf 3* poukazuje na jiný výsledek.

9.2.2 Bez vlivu bekyně velkohlavé

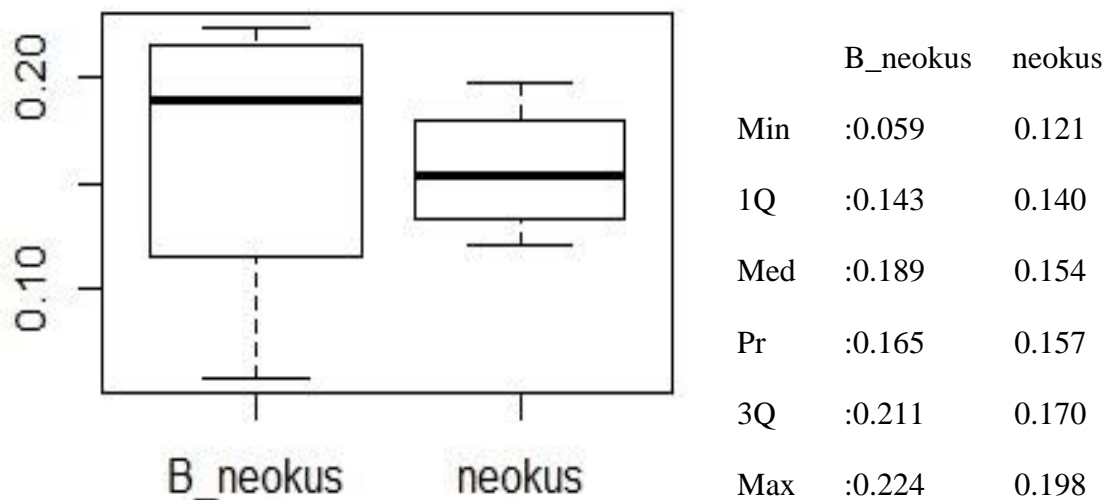
H₀ = Brassinosteroidy nemají žádný vliv na stres rostliny.

H₁ = Dodávané brassinosteroidy mají vliv na stres rostliny.

```
B_neokus=c(0.2235,0.1715,0.0586,0.2065); neokus=c(0.1213,0.1461,0.1608,0.1981)
```

```
BezZiru=data.frame(B_neokus, neokus)
```

summary(BezZiru); boxplot(BezZiru): Vliv brassinosteroidů na koncentraci AMK prolinu, bez žíru bekyně velkohlavé.



Graf 4 - Vliv brassinosteroidů na koncentraci AMK prolinu bez žíru bekyně velkohlavé na sazenice buku: prostřední hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

I v tomto případě *Graf 4* prokázal vliv brassinosteroidů na koncentraci prolinu.

var.test(BezZiru\$B_neokus, BezZiru\$neokus):

F = 5.3316, num df = 3, denom df = 3, p-value = 0.2027

Jelikož je i v tomto případě p-value větší než 0,05, hypotéza H₀ se nezamítá. Uměle dodávané brassinosteroidy nemají vliv na stres rostliny.

10. Výsledné zhodnocení

Na základě statistických výsledků bylo zjištěno, že exogenně aplikované brassinosteroidy na listy sazenic buku lesního, nemají žádný vliv na stres rostliny a případné využití místo pesticidů by tak nemělo žádný vliv na gradace bekyně velkohlavé. Rovněž jejich případné využití k přizpůsobení rostliny není možné. Z výsledků také vyplývá, že bekyně velkohlavá nemá žádný vliv na fotosyntézu sazenic. Ve všech těchto případech však nelze výsledky považovat za konečné. Aby tento pokus byl prokazatelný, bylo by zapotřebí více reprezentativních vzorků sazenic buku, než 16 sazenic rozdělených ve 4 skupinách po 4 vzorcích. Důkazem je prokázaný vliv brassinosteroidů na stres rostliny ve výsledných grafech. Výsledkem tedy je, že brassinosteroidy nemají žádný vliv na obranu rostlin, nelze jimi nahradit pesticidy a není možné je využít k přizpůsobení rostlin; ale vzhledem k počtu vzorků je tento výsledek neprůkazný. Zda rostlina efektivně využívá exogenní brassinosteroidy a je schopna je skrze listy přijmout, nelze za daných podmínek prokázat.

11. Diskuze

Výzkum fytohormonů je sám o sobě značně náročnou vědní disciplínou. V rostlinách se tyto chemické látky nachází v nízkých koncentracích, a to až takových, že se pohybují na hranici měřitelnosti i těch nejcitlivějších přístrojů. Aby bylo možné při tomto pokusu změřit koncentraci brassinosteroidů, bylo by za potřebí UHPLC, doplněného o MS jak zmiňuje Podlešáková (2012). Jelikož využití UHPLC nebylo možné, dalším způsobem, jak získat potřebné výsledky, bylo změřit koncentraci AMK prolinu, který je, stejně jako brassinosteroidy, považován za ukazatel stresu rostliny. Předpoklad byl takový, že brassinosteroidy by snížily

koncentraci prolinu v rostlině. Tento pokus však zmíněný předpoklad vyvrátil. Prolin byl jak v případě ošetření brassinosteroidy tak i bez ošetření, statisticky stejný. Nicméně *Graf 3* (vliv brassinosteroidů za přítomnosti žíru bekyně velkohlavé na koncentraci prolinu na sazenice buku) tomuto statickému závěru zcela neodpovídá. Vzorky 1a-1d měly užší rozptyl koncentrace prolinu, než tomu bylo u vzorků 2a-2d. Jedinou změnou je zde ošetření brassinosteroidy. Je možné, že je tento jev způsoben vlastnostmi rostliny. Možná byly sazenice označené jako 1a-1d méně odolné a tedy více podléhaly stresu, než tomu bylo u vzorků sazenic 2a-2d. Ovšem další možností je vliv aplikovaných brassinosteroidů. Bez většího množství vzorků však nelze tyto závěry a dohady potvrdit či vyvrátit. I *Graf 4* (vliv brassinosteroidů na koncentraci AMK prolinu bez žíru bekyně velkohlavé na sazenice buku) by mohl poukazovat na vliv brassinosteroidů. Tentokrát je však jeho případný vliv opačný. Rozptyl mezi maximální a minimální koncentrací prolinu je v případě ošetřených vzorků větší než u neošetřených. Vzorky 3a-3d, které byly ošetřeny brassinosteroidy, měly větší hodnoty koncentrace prolinu, než tomu bylo u vzorků 4a-4d, které byly mnohem konstantnější. Statisticky byl vliv brassinosteroidů vyvrácen, ovšem při větším množství vzorků, by se mohl vliv brassinosteroidů prokázat. Nejlépe je pak vidět případný vliv brassinosteroidů na *Grafu 2* (koncentrace prolinu ve vzorcích listů buku), kde lze porovnat všech 16 vzorků sazenic.

Samotné měření však nepředstavovalo takovou překážku, jakou představovala kalibrační křivka. Protože se zde měřily velmi nízké koncentrace, bylo zapotřebí vytvořit roztoky tomu odpovídající. Nebylo ovšem možné navázat potřebné množství krystalické látky, jednalo se o příliš nízké hmotnosti, muselo se tedy využít metody zvané mnohonásobné zředění. Tento proces sice vedl k získání k roztoků s požadovanou koncentrací, ale byly také závislé na schopnostech laboratorního pracovníka a použitých laboratorních pomůcek. Jelikož každá manipulace vedla k nasčítání chyb, kterým se nebylo možné vyvarovat, ani jim nešlo předcházet; výsledné koncentrace mohou být velmi odlišné od původního záměru. Ve vysokých koncentracích nejsou tyto chyby zásadní, ale v nízkých koncentracích mohou mít velkou váhu. Protože se těmto chybám nelze vyvarovat, je nutné předpokládat, že se chyba může projevit v konečných výsledcích. Bylo by možné těmto chybám předcházet vytvořením vícero kalibračních křivek? Chybám se vyvarovat nelze, ale šlo by touto metodou, míru chyby snížit. Nicméně tento postup by byl časově náročný a u některých druhů chemikálií i finančně značně nákladný. Z toho důvodu se většinou používá pouze jedna kalibrační řada.

Při aplikaci EpiBr vzniklo několik otázek. Nebylo zcela jasné, jak se rostlina k aplikovaným brassinosteroidům chová. Vstoupí-li EpiBr do rostliny, mělo by dojít k navýšení koncentrace

brassinosteroidu a tím by se měla spustit odpovídající reakce napříč celou kaskádou fytohormonů. Není však jasné, jak funguje ‚metabolismus‘ rostliny. Můžeme předpokládat, že brassinosteroidy zůstaly v rostlině nepřetržitě a ovlivňovaly celkový chemismus rostliny? Rostlina by se, dříve či později, měla snažit koncentraci brassinosteroidů snížit tak, aby odpovídala dané situaci nebo brassinosteroidy rozložit a uchovat. A zde vyvstává otázka. Za jak dlouho rostlina začne EpiBr odbourávat? Na tuto otázku prozatím neznáme odpověď. Není ani zcela jasné, zda je rostlina schopna dodávaný brassinosteroid uchovávat. Další nejasnost představuje samotné propojení s ostatními fytohormony. Pokud by navýšení EpiBr bylo k neprospěchu rostliny, je zřejmé, že by se rostlina snažila brassinosteroidy odbourat dříve, než by jejich koncentrace narušila celkový metabolismus rostliny. To by však mělo za následek, že by brassinosteroidy rostlinu na krátkou dobu ovlivnily, dlouhodobě by ovšem neměly žádný efekt. V současné době však neexistují způsoby, jak zjistit, zda fytohormony mohou krátkodobě ovlivnit vnitřní složení rostlin. Také není zcela jasné, jak by se fytohormony chovaly, pokud by byly brassinosteroidy neustále dodávány. Došlo by nějak k narušení celkové obrany? Nebyl by v takovém případě ovlivněn růst rostliny? Nemohla by rostlina být dokonce intoxikována? A jak konkrétně se fytohormony ovlivňují? Došlo by u rostlin k adaptaci na vysoké koncentrace brassinosteroidů? V případě ukončení těchto dávek, došlo by k selhání fyziologických procesů rostliny? Na žádnou z těchto otázek nemáme v současné době jednoznačnou odpověď. Důvodem jsou nedostatečné analytické metody. V současnosti se nejčastěji využívá metoda UHPLC doplněná o MS. Tato metoda je poměrně přesná, nicméně, stejně jako většina analytických metod, je zapotřebí vytvořit nejprve jakýsi porovnávací graf. Při této práci byla použita kalibrační křivka, u UHPLC-MS je rovněž zapotřebí znát nejprve polohu píku daného fytohormonu, než dojde k měření. Potíž je však v tom, že všechny fytohormony se nacházejí ve velmi nízké koncentraci, jsou ovlivněny dalšími fytohormony; a hlavně pak svými deriváty, které se jen velmi obtížně oddělují. V některých případech je oddělit nelze. Abychom pochopili tuto ‚fytohormonovou kaskádu‘ musel by se zkoumat každý jednotlivý fytohormon zvlášť. Jelikož v současnosti nejsou metody pro efektivní oddělení jednotlivých fytohormonů, je takovýto výzkum nemožný a stroje při tomto procesu, pomoci také prozatím nedokáží. Z toho vyplývá, že výzkum provázanosti jednotlivých fytohormonů je možné provést až v době, kdy budeme mít citlivější a přesnější stroje a dokonalejší způsoby izolace jednotlivých chemických sloučenin.

Před zahájení práce bylo nutné nejprve promyslet, zda by bylo lepší aplikovat EpiBr na listy sazenic nebo aplikovat EpiBr do půdy, odtud by jej sazenice přijaly. Z fyziologie rostliny by se

EpiBr vložený do půdy zdál sice výhodnější, ale také by byl případný výsledek nejistý. Je zde otázka, zda rostlina přijme ze svého okolí všechno, či zda si živiny a potřebné látky pečlivě vybírá. Není tak jasné, zda by rostlina bez zjevného důvodu byla ochotna přijmout brassinosteroidy jako preventivní opatření. Protože nebyla možnost, jak ověřit, že skutečně rostlina přišla do kontaktu s EpiBr, byla aplikace provedena na povrch listů. Půda navíc představovala další riziko. Není nijak známo, jak by se mikroorganismy nacházející se v půdě, k EpiBr chovali. Mohlo dojít k degradaci, nebo naopak mohly mikroorganismy brassinosteroidy využít k syntéze jiné chemické látky, i třeba toxické. Rovněž nebyla známa stabilita EpiBr. EpiBr by mohlo ovlivnit chemické složení půdy, čímž by byl závěr nejednoznačný či dokonce chybný. Průzkum článků obdobných výzkumů, odpovědi na tyto otázky nepřinesly, protože se články se těmito pochybnostmi nezabývaly. Pokud byl někdy výzkum na tyto nejasnosti proveden, nebyl nalezen. Nicméně ani aplikace přes listy nebyla nejvhodnější metodou. EpiBr měl poměrně složitou chemickou strukturu a nebylo tak zcela jasné, zda takto složitá chemická sloučenina byla schopna projít přes pokožku listu do systému rostliny. Nabízela se tedy otázka, zda byla rostlina schopna EpiBr absorbovat a účinně využít. Byla rostlina takovouto složitou látku schopna přes pokožku absorbovat? Nenašly by se způsoby, jak této absorpci dopomoci, třeba skrze narušení pokožky listu? A jak moc by byla rostlina schopna takovýto fytohormon využít? Nevyužila by jej jen částečně? Případně nebylo by účinnější aplikovat na rostlinu látku, ze které by rostlina daný fytohormon mohla syntetizovat? A v jaké koncentraci by mohla rostlina daný fytohormon přijmout? Jakou rychlostí by rostlina látku absorbovala? Mnohé tyto otázky nebyly doposud zodpovězeny, nicméně některé lze za pomoci zobrazovacích metod objasnit. Mezi tyto metody se řadí i radioaktivní označení aplikovaných brassinosteroidů. Za pomoci této metody sice nelze zjistit koncentraci studované látky, ale lze jejím použitím zjistit, zda látka pronikla do rostliny či nikoli. Tato metoda má sice nespornou výhodu, ale je doprovázena několika vedlejšími efekty, které mohou narušit celkový výsledek. První takovou nevýhodou měření je zamoření radioaktivními prvky. Jakmile se jednou použije radioaktivní označení, ovlivní se tímto pokusem celá laboratoř, což může ovlivnit následné pokusy. Doba rozpadu těchto látek je dlouhá a vyčištění laboratoře je nákladné a časově náročné, ne-li nemožné. Takovýto výzkum vyžaduje zdlouhavou a finančně náročnou přípravu v podobě přestavby laboratoře. Je také nutné zajistit kvalitní pomůcky a náležitě proškolit personál. Jakákoli chyba či nedodržení přísných opatření může mít za následek zamoření dalších míst a tím ovlivnit i další výzkumy. Nekvalitní pomůcky pak mohou způsobit nepřesnosti. Zamoření radioaktivních prvků v okolí

může zásadně ovlivnit výsledky měření, pokud by přístroje netěsnily. I přes tyto nesnáze, lze značení radioaktivními prvky úspěšně využít ke studii fytohormonů, jak již prokázal Symons (2007). Z práce týmu vyplynulo, že se exogenně aplikovaný brassinosteroid v rostlině nemůže daleko, ani nijak rychle pohybovat. Je zřejmé, že radioaktivní značení bylo objeveno v místě vstupu, dále v rostlině se však již neobjevilo. Není však prokazatelné, zda toto měření bylo přesné. Kvůli možné kontaminaci nelze s jistotou říci, zda brassinosteroidy vůbec do rostliny pronikly. Protože pokud by povrch listů nebyl dostatečně ošetřen, výsledky by byly stejné, jako kdyby se brassinosteroidy přes rostlinu pohybovaly pomaleji či vůbec. Změřen by byl totiž povrch listu, nikoli samotný vnitřek. Dále není jasné, zda aplikovaný brassinosteroid nebyl pro rostlinu příliš veliký a složitý, aby jej rostlina mohla přes pokožku absorbovat. I Symons a jeho kolegové nebyli zcela přesvědčeni svým pozorováním. Přesto přiznávají, že ať brassinosteroidy cestují krátkou vzdálenost, či vůbec do rostliny nepronikají, mají určitý vliv na fytohormony. V článku byl zmíněn pouze auxin, ale novodobější pozorování fytohormonů prokázalo, že jsou dráhy těchto chemických látek silně propojené. Je tak otázkou, zda exogenně podávané brassinosteroidy neovlivnily i další fytohormony. Dále se nabízí otázka, jakým způsobem, jak moc a s jakým výsledkem toto ovlivnění proběhlo. Většina předpokladů se opírala o vlastnosti brassinosteroidů. Zvláště pak o jejich pozitivní vliv na rostlinu. Pokud však brassinosteroidy fungovaly jako antagonisté pro ROS, mohly by z dlouhodobého hlediska negativně ovlivnit obranu rostliny. I z výsledků v této práci je možné pochybovat o vlastnostech brassinosteroidů. Ač statistika vliv brassinosteroidů zamítla, grafy už tak jednoznačné nebyly. EpiBr v případě napadení bekyně navýšil koncentraci prolinu a snížil rozpětí koncentrace. Bez vlivu bekyně bylo rozpětí koncentrace prolinu větší. Lze tedy předpokládat, že brassinosteroid navýšil stres rostliny? Pokud by tomu tak bylo, byl to pro rostlinu pozitivní či negativní vliv?

Protože v prováděném pokusu byla měřena koncentrace AMK prolinu, byla tak, dle předpokladu, měřena úroveň stresu rostliny. Měření hladiny stresu bylo však u rostlin značně ošemetné. Pokud by rostlina cítila jakoukoli nepohodu, okamžitě by došlo ke zvýšení koncentrace prolinu, tedy k navýšení stresu. Jakmile by si rostlina na nové podmínky přivykla, došlo by automaticky ke snížení koncentrace prolinu. Nedostatek vláhy nebo její nadbytek, méně slunce, než kolik by rostlina vyžadovala, to vše v rostlině vyvolává odezvu v podobě navýšení stresových fytohormonů. Ve fytokomoře byly konstantní podmínky pro všechny rostliny. Než došlo u rostlin k adaptaci na nové prostředí, musela být koncentrace stresových fytohormonů vyšší, než je tomu obvyklé. Otázkou bylo, zda tento počáteční stres neměl nějaký vliv na měření. Také nemůžeme jednoznačně říci, jak se rostliny chovaly. Byly jako skupina

heterogenní, či byly jako jedinci výjimeční? Každá rostlina by měla na dané podmínky reagovat odlišně. Nejsme však schopni konstatovat, zda dané podmínky přesně vyhovovaly všem rostlinám obdobně, či u některé ze sazenic nevyvolávaly větší hladinu stres. Právě tato nejednoznačnost vyžaduje více vzorků, než 4, aby pokus mohl být statisticky věrohodný. Další statistickou chybou, může být předpoklad, že jsou dané rostlinné orgány homogenní. Můžeme tvrdit, že list nacházející se na první větvi s orientací na jih, má stejnou koncentraci měřené chemické látky jako list nacházející se o patro výše? Nebo jako list, který je orientován na sever? A list, který je částečně zastíněn? Byly listy na samém vrcholu stejné, jako listy na nejspodnější větvi? Jisté odlišnosti mezi listy byly, není však zřejmé, jak statisticky významné tyto rozdíly byly. Všechny tyto dotazy by bylo vhodné umět zodpovědět před samotným měřením, protože pokud je rozdíl statisticky významný, mohla by být konečná hypotéza chybná. Pro další měření by bylo vhodné pozměnit postupy extrakce fytohormonů tak, aby bylo možné separovat pouze jeden daný fytohormon z jedné konkrétní části a analyzovat jej v dokonalejším a přesnějším analytickém stroji.

Právě unikátnost jednotlivců, se jevila jako jedna z překážek při studii stresových fytohormonů. Nebylo zřejmé, jak se rostliny při konstantních podmínkách budou chovat a zda by nebylo vhodnějších provádět výzkum fytohormonů mimo laboratorní podmínky. I když ve fytokomorách lze navodit přesně dané podmínky, unikátnost jedinců by mohla pokus narušit. Zadané podmínky mohly vyhovovat určitým jedincům, dalším by vyhovovaly podmínky jiné. Je možné takové chybě zabránit použitím sourozeneckých jedinců? Mají ‚sourozenci‘ stejné vlastnosti nebo je jejich unikátnost něčím ovlivněná, jako je u lidí výchova? Jelikož rostliny nemohou aktivně měnit prostředí, mělo by právě jejich okolí mít vliv na jejich fyziologii. Přestože rostliny pobývaly ve stejných podmínkách, je možné, že se od sebe odlišovaly. V takovém případě je otázkou, jak velké tyto odlišnosti byly, a jak se stresovanější jedinci chovaly při napadení bekyní velkohlavou. Mohly se, v takovémto případě, rostliny ještě více vystresovat nebo byla hladina stresových fytohormonů za těchto podmínek stejná? Byl tento stres stejný ve všech listech rostliny nebo byl na některých místech výrazně vyšší? Tím se naskytá další otázka; byly rostliny schopny komunikovat a způsobily tak ve svém okolí paniku? Mohla mít případná komunikace vliv na fyziologii rostlin při růstu? Je například prokázáno, že vůně čerstvě posekané trávy je jakýsi výkřik či poplach rostlin. Touto vlastností se zabývali Kost a Heil (2006), kdy zkoumali vliv napadené rostliny na své okolí, konkrétně se jednalo o fazol měsíční (*Phaseolus lunatus*). Co kdyby však komunikace rostlin byla hlubší a navzájem se ovlivňovaly? Jak moc by se v takovém případě lišila koncentrace nenapadených rostlin

nacházejících se v bezprostřední blízkosti rostlin napadených? A pokud by se škůdci nacházeli po pravé straně, mohla by rostlina navýšit obranné fytohormony jen na pravé straně a levou stranu ponechat ještě více oslabenou? Mohly by si rostliny na základě těchto komunikačních způsobů předávat informace? Mohlo by docházet také k přenosu fytohormonů? A co kdyby si rostliny dokonce dokázaly předávat „zkušenosti“ s bojem proti škůdcům? Pokud by některá z těchto otázek byla prokázána jako pravdivá, pak by pařezinový způsob pěstování rostlin případně víceletý porost byl daleko větším přínosem než vysazování malých semenáčků na odlesněné půdě. Nedávné průzkumy poukázaly na schopnost rostlin, vylučovat do okolní těkavé látky – BVOC. Jak zmiňuje Šimpagraová (2016), rostlina by skrze tyto látky mohla komunikovat nejenom se svým okolím, ale také by mohla předávat informace mezi svými jednotlivými orgány. Tyto předpoklady doposud nebyly řádně prozkoumány. Kdyby byly předpoklady pravdivé, pak by výzkum vlivu brassinosteroidů musel počítat se značnou chybou. 16 vzorků bylo při tomto experimentu zvoleno z důvodu jediné dostupné fytokomory. Vzorky tak byly uzavřeny pospolu při stejných podmínkách, jen každý ovlivněn dle svého zařazení do skupiny. Nicméně skrze BVOC by si sazenice mohly předávat stres. Nevíme však, na jakou vzdálenost se mohou rostliny ovlivňovat. Jaká by musela být koncentrace BVOC ve vzduchu, aby reagovaly okolní rostliny? S jakou rychlostí by byla tato odezva provedena? A v jaké míře by probíhala? Na žádnou z těchto otázek ovšem v současnosti přesné odpovědi nemáme, i když se již některé pokusy provádí. Kost a Heil (2006) provedli pokus, při kterém otestovali tento jev v přírodních podmínkách a vliv napadených rostlin na své okolí prokázali. Detailnější popis týkající se koncentrace fytohormonů však stále neznáme. Jelikož se mnozí vědci domnívají, že jsou škůdci schopni ovlivňovat rostliny fytohormony, předpokládají, že se koncentrace fytohormonů bude na různých místech výrazně lišit. Pokud by byla koncentrace v každém jednotlivém listě odlišná, nemohla by mít hladina fytohormonů vliv na samotného škůdce? Nemohli by si škůdci vybírat listy na základě koncentrace fytohormonů? Nebo nemohla by rostlina za pomoci fytohormonů navést škůdce na místa, která by byla pro rostlinu výhodnější a méně likvidační? A jak dlouho by rostlina mohla škůdce ovlivňovat, než by jeho tlaku podlehla? Dokud nebude věda natolik pokročilá, aby šlo měřit koncentrace jednotlivých fytohormonů v jednom listu bez toho, aby byl list zcela znehodnocen, nebudou moci být nalezeny odpovědi na tyto otázky.

Brassinosteroidy by mohly být výraznou pomocí při adaptaci ohrožených druhů rostlin na měnící se podmínky v okolní krajině. Tyto změny mohou být podmíněny lidskou činností, ale také globálním oteplováním. Také by bylo možné za pomoci brassinosteroidů snadněji rostliny

přesazovat z nevhodných oblastí nebo z oblastí komerčně zajímavých (třeba oblastí určených ke stavbě silnic). Doposud nejsou žádné postupy pro ochranu rostlin, co se týče změn okolí. Lze podpořit jeden druh na úkor druhého, například sečí či pastvou. Ale donutit jeden druh rozšířit svou ekologickou valenci je v současnosti nemožné. Brassinosteroidy by se však mohly stát řešením. Ani přesazování není v současné době zcela vhodné. Mnohé rostliny takovýto přesun nepřežijí, nejen z důvodu poničení kořenového systému, ale také z důvodu stresu. Protože jsou rostliny unikátní organismy, nemusí změna prostředí všem jedincům vyhovovat. U rozšířených druhů, úmrtí několika jedinců, pro populaci nepředstavuje ohrožení. U kriticky ohrožených rostlin je však úhyn, byť jediné rostliny, zásadní a nebezpečný pro existenci druhu. Pokud by bylo možné brassinosteroidy využít tímto způsobem, případné přesazování daných druhů by nemuselo mít za následek snížení počtu jedinců dané populace. Případné porozumění celkové fytohormonové kaskády, by navíc mohlo dopomoci k vyšlechtění jedinců daleko odolnějších a přizpůsobivějších. Bylo by tak možné zachránit druhy, které v současné době směřují do černé knihy.

Saini (2015) vydal článek shrnující poznatky o této fytohormonové kaskádě, zkoumané na rostlinách huseníčku. Byla zde snaha o sepsání synergických a antagonistických vlivů, mezi brassinosteroidy a jinými fytohormony. Shrnutí poznatků poukázalo na složitost těchto procesů. Nejen, že jednotlivé signální dráhy jsou úzce a poměrně složitě propojeny, ale navíc nelze jednoznačně určit vztah jednotlivých druhů fytohormonů. Brassinosteroidy, jak bylo prokázáno, mají vazby na všechny fytohormony. Ale ve všech případech byly nalezeny jak synergické vztahy, tak antagonistické. Příkladem může být senescence, kdy brassinosteroidy podporují tuto fyziologickou vlastnost rostliny. Cytokininy však senescenci zpomalují. Také je zde popsán vliv brassinosteroidů na ethylen při gravitropismu rostliny. Opět se zde jedná o antagonistický vztah, ač při stresu se spíše tyto fytohormony doplňují. V práci však nebyly popsány všechny procesy. Navíc procesy, které článek shrnoval, lze také zpochybnit. Problém představuje složitost vlivů. Sami autoři poukázali na interakci mezi auxiny a brassinosteroidy ve spojitosti se stresem, který nebyl zcela pochopen. Samotné zapojení brassinosteroidů do obrany je nedávný objev a rovněž nebyl zcela popsán. Jednotlivé interakce tak mohou být daleko složitější a mohou do nich zasahovat i další fytohormony. Přitom pochopení všech těchto procesů je zásadní pro vytvoření postupů, jak za pomoci fytohormonů vyšlechtit odolnější jedince.

S tím však přichází etické dilema. Pokud by došlo k vyšlechtění druhu, který by byl odolnější a přizpůsobivější, tento druh by se nesporně stal invazním druhem tak silným, že by vytlačil

veškerou konkurenci. Bylo by nezbytné přešlechtit všechny druhy rostlin, aby nedošlo k žádnému znevýhodnění. Takový krok by však zřejmě ohroženým druhům příliš nepomohl. Většina těchto druhů jsou pionýrské druhy a jsou tak snadno porazitelní v konkurenčním boji. Nicméně by tak alespoň jednotlivé druhy překonaly vliv globálního oteplování. Ohrožení lidskou činností a konkurencí silnějších druhů by ovšem přetrvalo. Je však nezbytné si uvědomit, že jakýkoli zásah do přírody může mít i silně negativní vliv. Rostlina ovlivněna jakoukoli chemickou látkou může způsobit vymření nějakého druhu fytopatogenu, čímž by mohl vymřít jiný druh, závislý na tomto škůdci. I jedno vymření jediného druhu může mít za následek úpadek celého ekosystému. Rovněž se tímto způsobem může mezi rostlinami objevit nový druh nemoci; nebo posílit nemoci, kterými rostliny již trpí. Právě zásah do rostlin coby organismů by mohl způsobit nové formy rakovinné mutace a mít tak za následek vymření celého druhu. Další faktor, který je nutno zvážit, je možný negativní vliv takovéto rostliny na své okolí. Ví se, že rostliny své okolí mění skrze přijímání a vylučování látek. Jak by se chovala rostlina chemicky upravená? Nemohla by způsobit změny v půdě, které by vedly k záhubě nějakého druhu? Všechny tyto otázky by před takovýmto zásahem měly být zodpovězeny. Příkladem takového nevydařeného zásahu za účelem posílení druhu jsou afrikanizované včely vyskytující se v Americe. Tento výzkum poukázal na nutnost opatrnosti při zásazích do ekologie přírody.

Přesto se manipulace s rostlinami dějí již nyní. Příkladem jsou geneticky modifikované organismy (GMO). GMO jsou momentálně nejdiskutovanější organismy. Mnozí se domnívají, že jejich úprava je nebezpečná nejen pro přírodu jako takovou, ale i pro samotný lidský organismus, kdy by konzumace GMO mohla způsobovat nejrůznější onemocnění, kupříkladu rakovinu. GMO však mají pouze navýšit zemědělskou produkci a nejsou prozatím nijak zamýšleny ke zlepšení stavu životního prostředí. Riziko spojené s těmito genetickými úpravami však vede k domněnce, zda by manipulace skrze fytohormony nebyla přínosnější. Zatímco GMO jsou uměle a násilně upravené rostliny, úprava fytohormony by byla přírodní a mohla by podpořit přirozenou evoluci rostlin. Nevýhodou fytohormonů je ovšem naše neznalost a značná propojenost signálních drah. Je nutné přesně vědět, co jaký fytohormon, v jaké míře a na jakém místě způsobí. Dodávání určitého fytohormonu by sice mohlo způsobit po nějakou dobu příznivý efekt, ale po delší době by naopak mohlo dojít k intoxikaci rostliny. Případné zastavení nějakého fyziologického procesu by mohlo způsobit úbytek plodin případně úhyn celých rostlin. K pochopení je tak zapotřebí větších znalostí a častější manipulace s rostlinami, než je tomu u GMO. Manipulace s nimi je méně časově náročná, trvalejší; a protože znalosti genetiky

jsou obsáhlejší, i lépe kontrolovaná. Z toho důvodu jsou fytohormony ovlivněné rostliny, coby nástupci GMO, prozatím jen pouhou myšlenkou. Realizace by však byla možná jen za předpokladu, že by GMO měly skutečně velmi vážné důsledky na lidský organismus.

Boj za pomoci fytohormonů není příliš účinný. Tato metoda je založena spíše na posílení obrany rostliny proti škůdcům. Taková metoda není přespříliš populární ve srovnání s genetickou modifikací. Genetická modifikace však je zvažována jen v podobě hmyzích fytopatogenů. Proti různým onemocněním či houbám nelze genetickou modifikaci v současné době využít. Pesticidy jsou tak prozatím jediným komplexním řešením, co se týče rychlosti nebo ekonomických nákladů. Pesticidy jsou ovšem silně toxické látky, které neovlivňují jen fytopatogeny, mají také prokázáný vliv na lidský organismus a jejich nahrazení je tak nesmírně žádoucí. Fytohormony jsou sice jednou z možností, ale je nesporné, že jejich použití je komplikované. Jedna kombinace fytohormonů je vhodná proti jednomu škůdci, další škůdce však této kombinace může využít ve svůj prospěch. Výzkum může tyto procesy odhalit a v budoucnu dopomoci k efektivnějšímu využívání fytohormonů. V současnosti je však jejich využití značně omezené. Jistým kompromisem by se tak mohly stát brassinosteroidy, které, jak bylo zmíněno, by mohly dopomoci zlepšit obranu rostliny. Mají také vlastnost degradovat pesticidy a snižovat jejich toxicitu. Tato vlastnost není prozatím příliš prozkoumána, ale jak se zmiňuje Sharma (2018), byl tento vliv již prokázán. Do jaké míry a zda by brassinosteroidy měly vliv na všechny pesticidy, není zcela jasné. Rovněž Sharma (2018) v publikaci zmiňuje i několik dalších vlastností, které by byly nesmírně ceněny. První vlastností je navýšená obrana rostliny před těžkými kovy. Těžké kovy jsou momentálně největším problémem světa. Již mnoho katastrof prokázalo vliv těžkých kovů na zdraví populace. Případná ochrana rostliny před těmito látkami by výrazně přispěla ke zlepšení zdraví populace. Druhá vlastnost je interakce s CO₂. V současné době vlivem průmyslu dochází ke zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře. Využití tohoto jevu ve prospěch zemědělství by tak bylo žádané. Pokud by navíc tato manipulace dokázala snížit obsah CO₂, mohlo by dojít k celkovému zlepšení stavu ekosystému.

Pro oblast medicíny jsou ovšem brassinosteroidy také lukrativní, a to hned z několika důvodů. Nejozřejavějším tématem a rovněž i nejvíce kontroverzním je nesmrtelnost, či výrazné zpomalení stáří, a tedy oddálení smrti. Vědci se zatím neshodli, co je příčinou stárnutí, přesto je zde hned několik teorií. Za podezřelé se také řadí i ROS, které brassinosteroidy ovlivňují. Pokud by byla tato vlastnost pochopena a plně využita, mohly by brassinosteroidy prodloužit život a rovněž oddálit stáří člověka. Další vlastností, která by byla v medicíně lukrativní, jsou

vlastnosti antivirové a antibakteriální, o kterých se zmiňuje Oklestková (2015). Jejich vliv byl prokázán i v živočišných buňkách. Je tedy otázkou, zda fytopatogeny, u kterých bylo využití brassinosteroidů prokázáno, tak využívají tyto látky ke své vlastní ochraně nebo ke snadnějšímu napadení rostliny. Pokud by fytohormony sloužily ke zvýšení imunity těchto škůdců, nebylo by možné využít brassinosteroidy jako účinný lék proti některým druhům virů a zamezit tak pandemii podobné té, kterou způsobil koronavirus COVID-19? Dal by se případně také použít k léčbě AIDS či obdobných doposud neléčitelných onemocnění? Či snad proti bakteriální borelióze, která je v ČR rozšířená, přesto velice obtížně léčitelná? K čemu všemu by se brassinosteroidy daly využít je prozatím nejasné. Přesto se Oklestková (2018) domnívá, že by se brassinosteroidy daly využít k léčbě rakoviny. Brassinosteroidy by tak nebyly prvními fytohormony, které by tuto vlastnost měly. Strad a Doležal se (2017) zabývali možností využít k léčbě rakoviny cytokininy. Jsou tedy fytohormony budoucností medicíny? Neměl by tedy jejich výzkum být rozšířenější? Ne nezbytně. Dalším možným lékem proti rakovině jsou také ROS, které jsou sice toxické, nicméně rychlé a efektivní. Traduje se, že léčba ROS byla na území ČR na jedné osobě úspěšně aplikována, než byl výzkum ukončen. Pokud by byly vytvořeny postupy, jak ROS ovládat a bylo by možné je zacílit na konkrétní místo, mohly by ROS léčit i pokročilá stádia či doposud neléčitelné formy rakoviny. Mohly by tímto regulátorem být brassinosteroidy? Nebo třeba cytokininy, které umí chránit DNA před ROS? Cytokininy se zatím jeví jako možnější, protože jsou v současnosti již komerčně využívány. V současné době jsou velkým lákadlem v kosmetice, kdy se využívá 6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2yl)-purin (pyratin). Tento průmyslově vyráběný cytokinin se využívá k vyhlazování vrásek a ke snížení hrubosti pokožky. Měl by zabraňovat vysychání, ale působí také proti akné, a dokonce i růži. Z toho vyplývá, že skutečně lze fytohormony účinně využívat, a to nejen v kosmetice.

Nedávné vědecké studie poukázaly, že housenky bekyně velkohlavé, mají ve slinách vysoké koncentrace kyseliny jasmonové. Není zatím jasné, jak bekyně získává tento fytohormon. Zřejmě se tak děje kumulací při žíru a následným předáváním z matky na potomky, ale je také možné, že bekyně je schopna kyselinu jasmonovu syntetizovat. K čemu však bekyně tuto kyselinu využívá, není zcela jasné. Aby však měla housenka ve slinách fytohormon bez možného využití, je značně nepravděpodobné, zvláště když se jedná o tak vysoké koncentrace. Mohla by housenka využívat kyselinu jasmonovou ke své ochraně? Ač není kyselina jasmonová spojována s antivirovými či antibakteriálními vlastnostmi, může tyto vlastnosti mít. Mnohé druhy fytohormonů jsou v současnosti označeny za budoucí léčebné přípravky.

Kupříkladu cytokininy i brassinosteroidy jsou studovány coby léky proti rakovině. Výzkum brassinosteroidů potvrdil regulaci nebezpečných ROS, které ovlivňují i lidský organismus. Kyselina salicylová je coby léčebný přípravek známa několik staletí. Výzkum kyseliny jasmonové ve slinách bekyně, by tak mohl odhalit nějaké, pro lidstvo nezbytné vlastnosti spojené s léčbou. Pokud by housenka za pomoci kyseliny jasmonové pouze snižovala obranu rostliny, nešlo by o nic mimořádného a převratného, protože doposud nebyla kyselina jasmonová spojována s žádným škůdcem. Fytopatogeny k narušení obrany využívají fytohormony často. Prokázané využití fytohormonů bylo u klíněnky jabloňové (*Phyllonorycter blancardella*), která má ve svých slinách vysoké koncentrace směsi cytokininů. Klíněnka za pomoci cytokininů nenarušuje jen obranu rostliny, ale také nutí jablň domácí (*Malus domestica*), na které tento škůdce parazituje, aby klíněnku vyživovala. Tím dochází k oslabení stromu, který při senescenci je nucen posílat výživu do listu, který by za jiných okolností byl dávno odstraněn. Protože je klíněnka minujícím druhem, bude strategie bekyně odlišná. Nicméně je klíněnka nesporným důkazem, že škůdci mohou využívat fytohormony ke svému užítku, a to nejen k ovlivnění fytohormonu, který sami využívají. Škůdci dokáží za pomoci jediné skupiny fytohormonů ovlivnit celou fyziologii rostliny. Už z tohoto důvodu je nutné porozumět fytohormonům, protože jedině s pochopením všech vlastností fytohormonů se zlepši boj proti fytopatogenům.

Jak moc brassinosteroidy ovlivňovaly ostatní fytohormony? A za jak dlouho se tento vliv v rostlině projevil? Byla rostlina schopna brassinosteroidy na povrchu listu degradovat? Měly brassinosteroidy vždy pozitivní efekt nebo jejich dlouhodobý vliv způsobil rostlině trvalé poškození? I když v současnosti odpovědi na tyto otázky nemáme, jsou pro výzkum brassinosteroidů zásadní. Ač jsou brassinosteroidy známé delší dobu, zájem o ně však tak starý není. Zpočátku byl velký důraz kladen na cytokininy či auxiny, coby na fytohormony schopné ovlivnit růst a vývoj rostliny. Následně byl výzkum zaměřen na kyselinu abscisovou, kyselinu jasmonovou a ethylen, coby obranné fytohormony. Brassinosteroidy tak byly značně upozaděny a zájem o ně se objevil až v posledních letech. Zájem o výzkum těchto látek navíc stoupá s klimatickými změnami a hrozbou nebezpečných pandemií. Bekyně nebo škůdci obecně, nemají příliš velký zájem o usmrcení hostitele. Při úhynu rostliny přicházejí tito škůdci o cenný zdroj potravy, který by je mohl živit několik generací. Ač škůdci způsobují značné ztráty, v některých případech se jedná o ztráty až 90 % na zemědělských plodinách; jsou to ztráty čistě komerční, nikoli však ekologické. Rostliny většinu těchto napadení přežijí. Riziko tak představují změny v okolní krajině. Jedním z důvodů snížení odolnosti hospodářských

plodin je lidská činnost, při které dochází ke znečištění půdy či ke snížení areálu, ale také jsou důvodem oslabení rostlin nevhodné hospodářské postupy v podobě stejnověkových a výrazně chudých společenstev. Tím vším jsou podmínky výrazně posunuty ve prospěch škůdců, kteří oslabení rostlin efektivně využívají. Největší hrozbou jsou ovšem globální změny, kterým se nejen rostliny těžce přizpůsobují. Rostliny jsou tak vystaveny většímu stresu po většinu roku, čímž se narušuje jejich schopnost se aktivněji bránit. Brassinosteroidy by se tak mohly stát řešením, které by mohlo těmto ztrátám zabránit, což vyvolalo nutnost tyto látky prozkoumat. Výzkum je ovšem pomalý a články na téma brassinosteroidů se shánějí obtížně.

12. Závěr

Výzkumem bylo prokázáno, že bekyně velkohlavá nemá žádný vliv na rychlost fotosyntézy. I vliv brassinosteroidů na ochraně rostlin nebyl statisticky prokázán, grafy ovšem vliv na koncentraci AMK prolinu prokázaly. Tento rozpor vyžaduje další přezkoumání v podobě většího počtu vzorků a využití přesnějších analytických metod. Diskuzí pak byla prokázána neznalost vlivů, které tento výzkum mohly ovlivnit. Nedostatek informací a vědeckých článků zabývajících se brassinosteroidy ve spojení s obranou rostlin poukazuje na nutnost dalších výzkumů a rozšíření povědomí o těchto fytohormonech.

13. Přínos práce

Diskuze poukázala na to, jak málo toho o brassinosteroidech, a fytohormonech obecně víme. I nepatrný zlomek informací tak může být zásadním krokem při zkoumání těchto chemických látek. Tento výzkum poukázal na jistý vliv, který byl prokázán pouze v grafech dodávaných brassinosteroidů na rostliny buku. Tím se otevírá možnost případného využití při ochraně rostlin nebo v zemědělství. V současnosti sice nemáme pro fytohormony zásadní využití, ale jejich důležitost se může projevit nejen ve zmíněných odvětvích. Mohou být také zásadní v medicíně. Ať už bude jejich využití v budoucnosti jakékoli, budou hrát fytohormony zásadní roli. To se však stane, nebudeme-li ve výzkumu polevovat i napříč tomu, že nemáme pro tento výzkum přesné analytické přístroje, správné chemické postupy, a zvláště pak konkrétní znalosti okolí i rostlin samotných.

Použitá literatura

- An, C. et Mou, Z., 2011, Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of integrative plant biology*, 412-428.
- Anonym, 2018, LI-6400; Gazometrická stanovení fotosyntetických parametrů. 1-6.
- Barták, M., Indikace dopadů stresu na vitalitu in-vitro kultivovaných rostlin pomocí pokročilých metod fluorescence chlorofylu, 1-12.
- Bartošáková, E. et Bohuš, M. et al. 2019, *Velká kniha živočichů: od jednobuněčných po savce*. Bratislava: IKAR, a.s.
- Best, N. B. et Hartwig, T. et Budka, J. et Fujioka, S. et Gurmukh, J. et Burkhard, S. et Brian, P. D., 2016, Encodes a maize ortholog of the arabidopsis brassinosteroid biosynthesis gene DWARF1, identifyinf developmental interactions between brassinosteroids and gibberellins. *Plant physiology*, 2633-2647.
- Bremen, R. J., rok neveden, Stability in a periodic model for genetically altered mosquitos. 1-18.
- Caro, C. A., 2015, UV/VIS Spectrophotometry - fundamentals and Applications. Mettler Toledo.
- Clouse, S. D. et Sasse J. M., 1998, Brassinosteroids: Essential regulators od plant growth and development. *Plant physiologi*. 427-451.
- Creelman, R. A. et Mullet J. E., 1997, Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant physiologi*. 355-381.
- Danquah, A. et de Zelicourt, A. et Colcombet, J. et Hirt, H.,(2013). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Elsevier*. 40-52
- Davies, P. J., 2010, The plat hormones: their nature, occurrence and functions. V *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action*, 1-15.
- De Bruyne, L. et Höffe, M. et De Vleeschauwer, D., June 2014, Connecting growth and defense: the emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Molecular plant* 7, stránky 943-959 .
- Doležal, K. et Strnad, M., 2017, Cytokininy - regulátory růstu rostlin, které dokážou mnohem více než jen regulovat dělení buněk. *Živa*, 149-152.
- Dou, D. et Zhou, J. M., 2012, Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground . *Cell host & microbe*, 12. 484-495
- Dvořáková, M. et Vaněk, T., 2015, Strigolaktony - struktura a funkce v rostlinách. *Chemické listy* , 762-769.
- Elena, D., 2012, Brief approach of plant-insect herbivores physiological interactions. *JOURNAL of horticulture, forestry and biotechnology*, 16(2), 17-31.
- Erb, M. et Meldau, S. et Howe, G. A., 2012, Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci*. 17(5), 250-259.
- Ghanbari, S. et Ali Fakheri, B. et Mahdinezhad, N. et Khedri, R., 2015, Systemic Acquired Resistance. *Journal on New Biological Reports*, 56-69.

- Giron D. et Glevares, G., 2014, Cytokinin-induced phenotypes in plant-insect interactions: learning from the bacterial world. *Chem Ecol*, 826-835.
- Hoegh-Guldeerg, O. et Jacob, D. et Taylor, M. et Bindi, M. et Brown, S. et Camilloni, I. et Diedhiou, A. et Djalante, R. et Zhou, G., říjen 2018, *Impacts of 1,5 °C Global warming on natural and human systems* (online) [cit. 10. 02. 2020] dostupné z: <https://www.ipcc.ch/sr15/chapter/chapter-3/>
- Chanclud, E. et Kisiala, A. et Neil, R. et Emery, J. et Chalvon, V. et Ducasse, A. et Romiti-Michel, C. et Gravot, A. et Kroj, T. et Morel, J.-B., 2016, Cytokinin Production by the Rice Blast Fungus. *PLOS pathogens*.
- Katedra experimentální biologie rostlin Univerzity Karlovy, Teoretický úvod: Fluorescence, rychlá kinetika fluorescenční indukce. *Univerzita Karlova* (online) [cit. 18. 05. 2020] dostupné z: http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c14/navody/3_fluorescence.pdf, 1-14
- Kost, C. et Heil, M., 2006, Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defense in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94, 619-628
- Křístek, J. et Urban, J., 2013, Lesnická entomologie. ACADEMIA.
- Lobo, F. de A. et de Barros, M. P. et Dalmagro, H. J. et Dalmolin, A. C. et Pereira, W. E. et de Souza, E. C. et Vourlitis, G.L. et Rodríguez Ortíz, C. E., 2013, Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica* 51 (3), 445-456.
- LOS (Lesní ochranná služba), 2019 (Svazek) , Škodlivý činitelé v lesích Česka. *Zpravodaj ochrany lesa*, str. 17.
- Li, N. et Han, X. et Feng, D. et Yuan, D. et Huang, L. J., 2019, Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate i plant defense: Do we understand what they are whispering? *Molecular Sciences*, 20, 1-15.
- Lazarevic, J. et Mataruga, V. P. et Stojković, B. et Tucić, N., 2002, Adaptation of the gypsy moth to an unsuitable host plant. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102, 75-86.
- Lindseyová, R., 2020, *Climate* (oline) [cit. 10. 02. 2020], dostupné z: <https://www.climate.gov/news-features/featured-images/2019-was-second-warmest-year-record>
- Lv, B. et Tian, H. et Zhang, F. et Liu, J. et Lu, S. et Bai, M. et Li, Ch. et Ding, Z., 2018, Brassinosteroids regulate root growth by controlling reactive oxygen species homeostasis ad dual effect on ethylene synthesis in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics*, 1-26.
- Mei-Hui, Y. et Zhe-Ze, Z. et Jun-Xian, H., 2018, Brassinosteroid signaling in plant-microbe insteractions. *Molecular sciences*, 19.
- Morrison, E. N. et Emery, R. J. et Saville, B. J., 2015, Phytohormone Involvement in the Ustilago maydis– Zea mays Pathosystem: Relationships between Abscisic Acid and Cytokinin Levels and Strain Virulence in Infected Cob Tissue. *PLOS ONE*.
- Nováková, O. et Kunes, I. et Gallo, J. et Baláš, M., 2014, Effects of brassinosteroids on prosperity of Scots pine seedlings. *Journal of forest science* 60, 388-393.

- Oklestková J. et Rárová, L. et Kvasnica, M. et Strnad, M., 2015, Brassinosteroids: synthesis and biological activities. *Phytochem Rev* 14, 1053-1072.
- Pearce, G., 2011, Systemin, hydroxyproline-Rich systemin and the induction of proteasae inhibitors. *Curret protein & peptide science*, 399-408.
- Peres, A. L. G. L. et Soares, J. S. et Tavares, R. G. et Righetto, G. et Zullo, M. A. T. et Mandava, N. B. et Menossi, M., 2019, Brassinosteroids, the Sixth class of phytohormones : a molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation. *Molecular Sciences*, 1-33.
- Podlešáková, K. et Tarkowská, D. et Pěňčík, A. et Okleštková, J. et Turečková, V. et Floková, K. et Tarkowski, P., 2012, Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem.Listy*, 373-379.
- Poór, P. et Czékus, Z. et Tari, I. et Ördög, A., 2019, The multifaceted roles of plant hormone salicylic acid i endoplasmic reticulum stress and unfolded protein responce. *Molecular sciences* 20, 1-13.
- Procházka, S. et Macháčková, J. et Krekule, J. et Šebánek, J. et kolektiv, 1998, *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia.
- Psota, V. et Šebánek, J., 1999. *Za tajemstvím růstu rostlin*. Praha: Scientia
- Seth, R. K. et Vimal, N. et Sengupta, M. et Angmo, N. et Dhal, M. K. et Seth, R., 17. September 2018, Coupling biorational tactics with radio-genetic F1 sterility technique for an effective integrated pest management against lepidopteran insects. *International journal of zoology and animal biology*, stránky 1-13.
- Sharma, A. et Kumar, V. et Kumar, R. et Shazhad, B. et Thukral, A. K. et Bhardwaj, R., 2018, Brassinosteroid-mediated pesticide detoxification in plants: A mini-review. *Cogent Food & Agriculture* , 4.
- Šimpraga, M. et Takbayashi, J. et Holopaien, J. K., 2016, Language of plants: Where is the word? *Jornal of integrative plant iology*, 343-349.
- Taiz, L. et Zeiger, E., 2002, *Plant physiology; 3 edition*. Sinauer Associates.
- Tooker, J. F. et De Moraes, C. M., 2015, Jasmonate in lepidopteran eggs and neonates. *Journal of Chemical Ecology*, stránky 2753-2759.
- Torres-Ruiz, J. M. et Cochard, H. et Choat, B. et Jansen, S. et al. 2017, Xylem resistance to embolism: presenting a simpe diagnostic test for the open vessel artefact. *New phytologist*, 489-499.
- Trabelsi, R. et Sellami, H. et Gharbi, Y. et Cheffi, M. et Chaari, A. et Baucher, M. et El Jaziri, M. et Ali Triki, M. et Gdoura, R., 2017, Response of olive tree (*Olea europeae* L. cv. chemlali) to infection with soilborne fungi. *J plant dis prot* 124, 153-162.
- Van de Poel, B. et Van der Straeten, D., 2014, 1-aminocyclopropane-1-caroxylic acid (ACC) in plants: more than jist the precursor of ethylen! *Front. Plant Sci.* 5, 640-651.
- Zahradník, P., 2014, *Metodická příručka integrované ochrany rotlin pro lesní porosty*. Lesnická práce, s.r.o.

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Brassinosteroidy (ChemSketch, 2019)	7
Obrázek 2 - Cytokininy (ChemSketch, 2019)	8
Obrázek 3 - Auxiny (ChemSketch, 2019)	9

Seznam grafů

Graf 1 - Vliv bekyně velkohlavé na P _{gmax} rostliny	26
Graf 2 - Koncentrace prolinu ve vzorcích listů buku	27
Graf 3 - Vliv brassinosteroidů za přítomnosti žíru bekyně velkohlavé na koncentraci prolinu na sazenice buku	28
Graf 4 - Vliv brassinosteroidů na koncentraci AMK prolinu bez žíru bekyně velkohlavé na sazenice buku	29
Graf 5 - Vliv bekyně velkohlavé na Isat (95) rostliny	47
Graf 6 - Vliv bekyně velkohlavé na PN(Imax) rostliny	48
Graf 7 - Vliv bekyně velkohlavé na Cond rostliny	49
Graf 8 - Vliv bekyně velkohlavé na Ci rostliny	50
Graf 9 - Vliv bekyně velkohlavé na Trmmol rostliny	51
Graf 10 - Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace prolinu	52
Graf 11 – Vliv bekyně velkohlavé na fluorescenci vzorku listů buku	53

Seznam tabulek

Tabulka 1 - vliv bekyně velkohlavé na fotosyntézu rostliny	25
Tabulka 2 - Koncentrace prolinu ve vzorcích listů buku	27
Tabulka 3 – Naměřená data pro kalibrační křivku	52
Tabulka 4 – Fluorescenční parametry	54

Příloha č. 1

Vliv bekyně velkohlavé na fotosyntézu sazenic buku

- Vliv bekyně velkohlavé na Isat (95)

H0 – Bekyně velkohlavá nemá vliv na Isat(95)

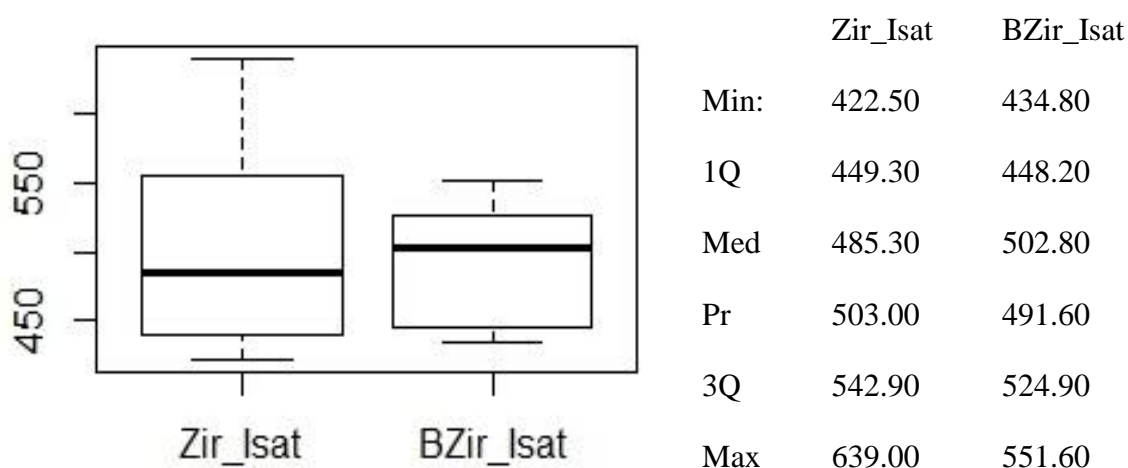
H1 – Bekyně velkohlavá má vliv na Isat(95)

```
Zir_Isat=c(422.5,422.5,530.1,581.2,639.0,467.5,503.1,458.2)
```

```
BZir_Isat=c(526.2,439.1,451.2,524.5,551.6,434.8,507.4,498.2)
```

```
Isat=data.frame(Zir_Isat, BZir_Isat)
```

```
summary(Isat); boxplot(Isat) - vliv bekyně velkohlavé na Isat(95) sazenic buku lesního.
```



Graf 5 - Vliv bekyně velkohlavé na Isat (95) rostliny: Isat(95) – Saturační bod světelné ozáření, Zir_Isat – vliv bekyně velkohlavé na data Isat; NZir_Isat – hodnoty Isat bez vlivu bekyně velkohlavé (R); průměrná hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

```
var.test(Isat$Zir_Isat, Isat$BZir_Isat):
```

F = 3.0153, num df = 7, denom df = 7, p-value = 0.1686

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval:0.6036784; 15.0612426

H0 nelze zamítnout. Bekyně velkohlavá nemá vliv na Isat (95).

- Vliv bekyně velkohlavé na PN (Imax)

H0 – Bekyně velkohlavá nemá vliv na PN (Imax)

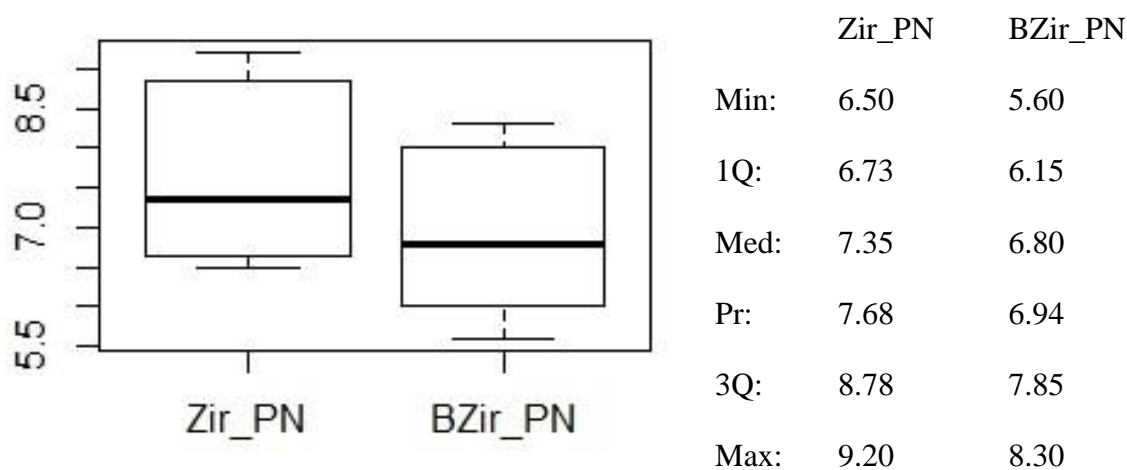
H1 – Bekyně velkohlavá má vliv na PN (Imax)

Zir_PN=c(6.5,6.5,9.2,8.7,9.0,6.8,7.2,7.5)

BZir_PN=c(7.7,5.7,8.3,6.5,8.3,6.3,5.6,7.1)

PN=data.frame(Zir_PN, BZir_PN)

summary(PN); boxplot(PN) - vliv bekyně velkohlavé na PN sazenic buku lesního.



Graf 6 - Vliv bekyně velkohlavé na PN(Imax) rostliny: PN(Imax) – rychlost čisté fotosyntézy, Zir_PN – vliv bekyně velkohlavé na data PN; BZir_PN – hodnoty PN bez vlivu bekyně velkohlavé (R); střední hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

var.test(PN\$Zir_PN, PN\$BZir_PN):

F = 1.0821, num df = 7, denom df = 7, p-value = 0.9198

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval: 0.2166369; 5.4048995

H0 nelze zamítnout. Bekyně velkohlavá nemá vliv na PN (Imax)

- Vliv bekyně velkohlavé na Cond

H0 – Bekyně velkohlavá nemá vliv na Cond

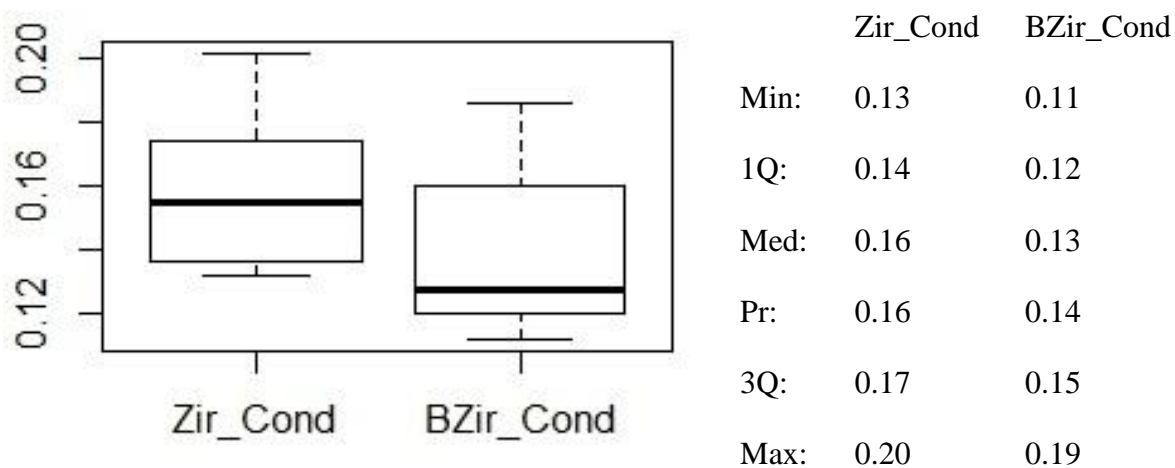
H1 – Bekyně velkohlavá má vliv na Cond

```
Zir_Cond=c(0.1322,0.1322,0.1641,0.2018,0.1776,0.1456,0.1413,0.1711)
```

```
BZir_Cond=c(0.1285,0.1173,0.1859,0.1122,0.1840,0.1262,0.1231,0.1364)
```

```
Cond=data.frame(Zir_Cond, BZir_Cond)
```

summary(Cond);boxplot(Cond) - vliv bekyně velkohlavé na Cond sazenic buku lesního.



Graf 7 -Vliv bekyně velkohlavé na Cond rostliny: Cond – Stomatální vodivost, Zir_Cond – vliv bekyně velkohlavé na data Cond; BZir_Cond – hodnoty Cond bez vlivu bekyně velkohlavé (R); prostřední hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

```
var.test(Cond$Zir_Cond, Cond$BZir_Cond):
```

F = 0.71882, num df = 7, denom df = 7, p-value = 0.6741

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval:0.1439112; 3.5904564

H0 nelze zamítnout. Bekyně velkohlavá nemá vliv na Cond

- Vliv bekyně velkohlavé na Ci

H0 – Bekyně velkohlavá nemá vliv na Ci

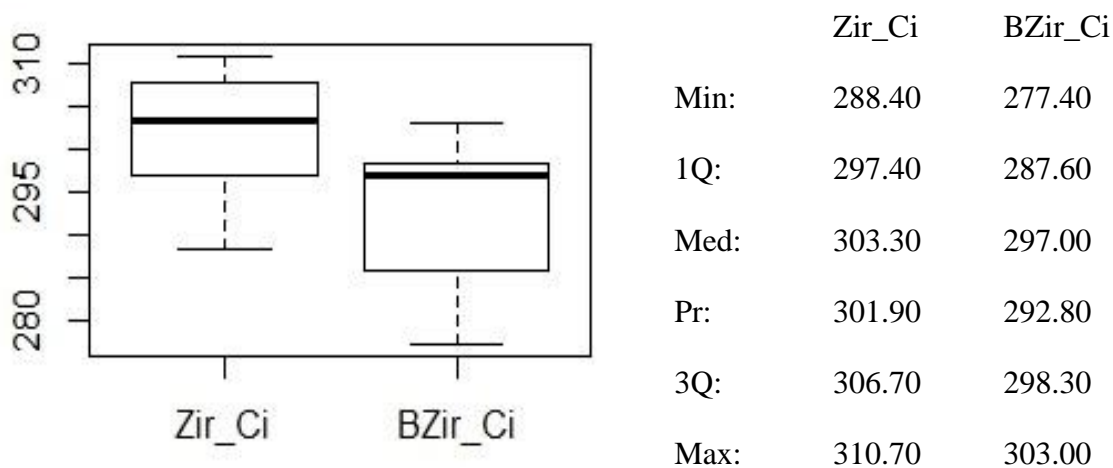
H1 – Bekyně velkohlavá má vliv na Ci

```
Zir_Ci=c(303.3,303.3,288.4,309.7,295.8,305.7,297.9,310.7)
```

```
BZir_Ci=c(277.4,298.2,303.0,282.1,298.5,296.2,297.8,289.5)
```

```
Ci=data.frame(Zir_Ci, BZir_Ci)
```

summary(Ci); boxplot(Ci) - vliv bekyně velkohlavé na Ci sazenic buku lesního.



Graf 8 - Vliv bekyně velkohlavé na Ci rostliny: Ci – Intracelulární koncentrace CO₂, Zir_Ci – vliv bekyně velkohlavé na data Ci; BZir_Ci – hodnoty Ci bez vlivu bekyně velkohlavé (R); střední hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

```
var.test(Ci$Zir_Ci, Ci$BZir_Ci):
```

F = 0.69422, num df = 7, denom df = 7, p-value = 0.6422

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval:0.1389853; 3.4675597

H0 nelze zamítnout. Bekyně velkohlavá nemá vliv na Ci.

- Vliv bekyně velkohlavé na Trmmol

H0 – Bekyně velkohlavá nemá vliv na Trmmol

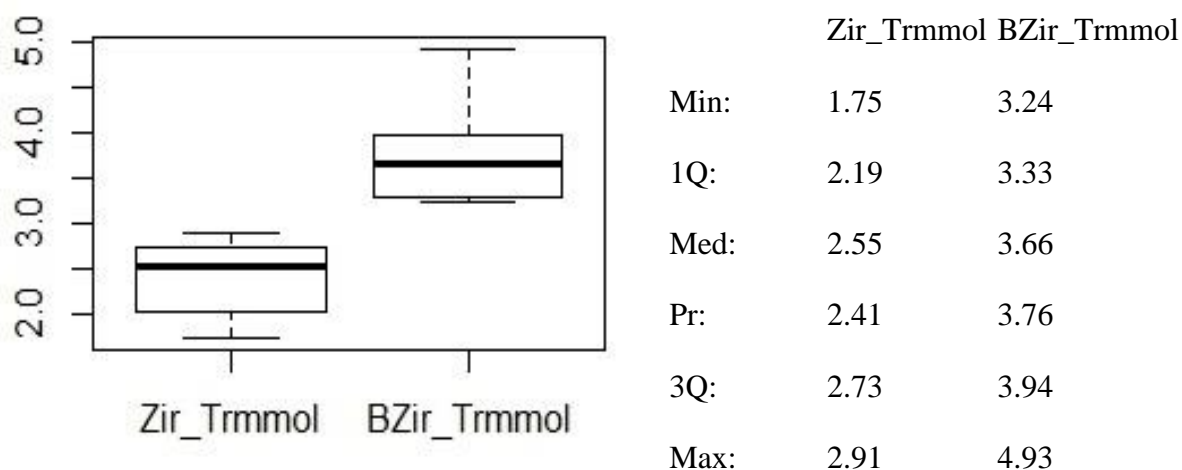
H1 – Bekyně velkohlavá má vliv na Trmmol

```
Zir_Trmmol=c(1.7512,1.7512,2.4538,2.9070,2.7121,2.3360,2.6387,2.7621)
```

```
BZir_Trmmol=c(3.3533,3.2670,4.1028,3.2444,4.9292,3.6727,3.6417,3.8867)
```

```
Trmmol=data.frame(Zir_Trmmol, BZir_Trmmol)
```

summary(Trmmol); boxplot(Trmmol) - vliv bekyně velkohlavé na Trmmol sazenic buku lesního.



Graf 9 - Vliv bekyně velkohlavé na Trmmol rostliny: Trmmol – Transpirace, Zir_Trmmol – vliv bekyně velkohlavé na data Trmmol; BZir_Trmmol – hodnoty Trmmol bez vlivu bekyně velkohlavé (R); průměrná hodnota – Med, horní 75% kvantil – 3Q, dolní 25% kvantil – 1Q, horní maximální hodnota – Max, dolní minimální hodnota – Min.

```
var.test(Trmmol$Zir_Trmmol, Trmmol$BZir_Trmmol):
```

F = 0.63277, num df = 7, denom df = 7, p-value = 0.5607

alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1

95 percent confidence interval:0.1266824;3.1606139

H0 nelze zamítnout. Bekyně velkohlavá nemá vliv na Trmmol.

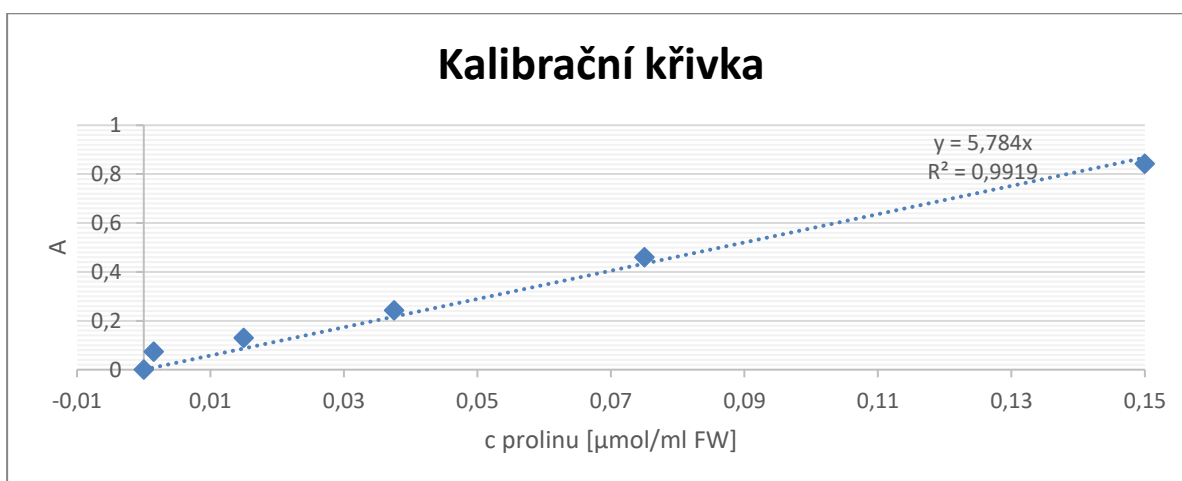
Příloha č. 2

Vliv dodávaného brassinosteroidu na koncentraci prolinu

- Kalibrační křivka

Tabulka 3 – Naměřená data pro kalibrační křivku. Vzorky známé koncentrace prolinu, změřena na spektrometru: c – koncentrace v čerstvém vzorku, A – absorbance.

C [$\mu\text{mol/ml FW}$]	A
0	0
1,50E-03	0,074
1,50E-02	0,130
3,75E-02	0,243
7,50E-02	0,460
1,50E-01	0,843



Graf 10 - Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace prolinu: A – absorbance při vlnové délce 520 nm; c – koncentrace prolinu kalibrační řady [$\mu\text{mol/ml FW}$].

- Výpočet koncentrace prolinu

$$A = 0,738$$

$$V_{\text{Toluenu}} = 800\mu\text{l}$$

$$m_{\text{vz}} = 150\text{mg} = 0,15\text{g}$$

$$\text{Prekoncentrační faktor} = V_{\text{vz}}/\text{Alikvotní objem} = 1000\mu\text{l}/400\mu\text{l} = 2,5$$

$$a \text{ (směrnice kalibrační křivky)} = 5,784$$

Koncentrace vzorku z kalibrační křivky:

$$c_{\text{AMK kalibrační křivky}} = A/a = 0,738/5,784 = 0,1276 \mu\text{mol/l FW}$$

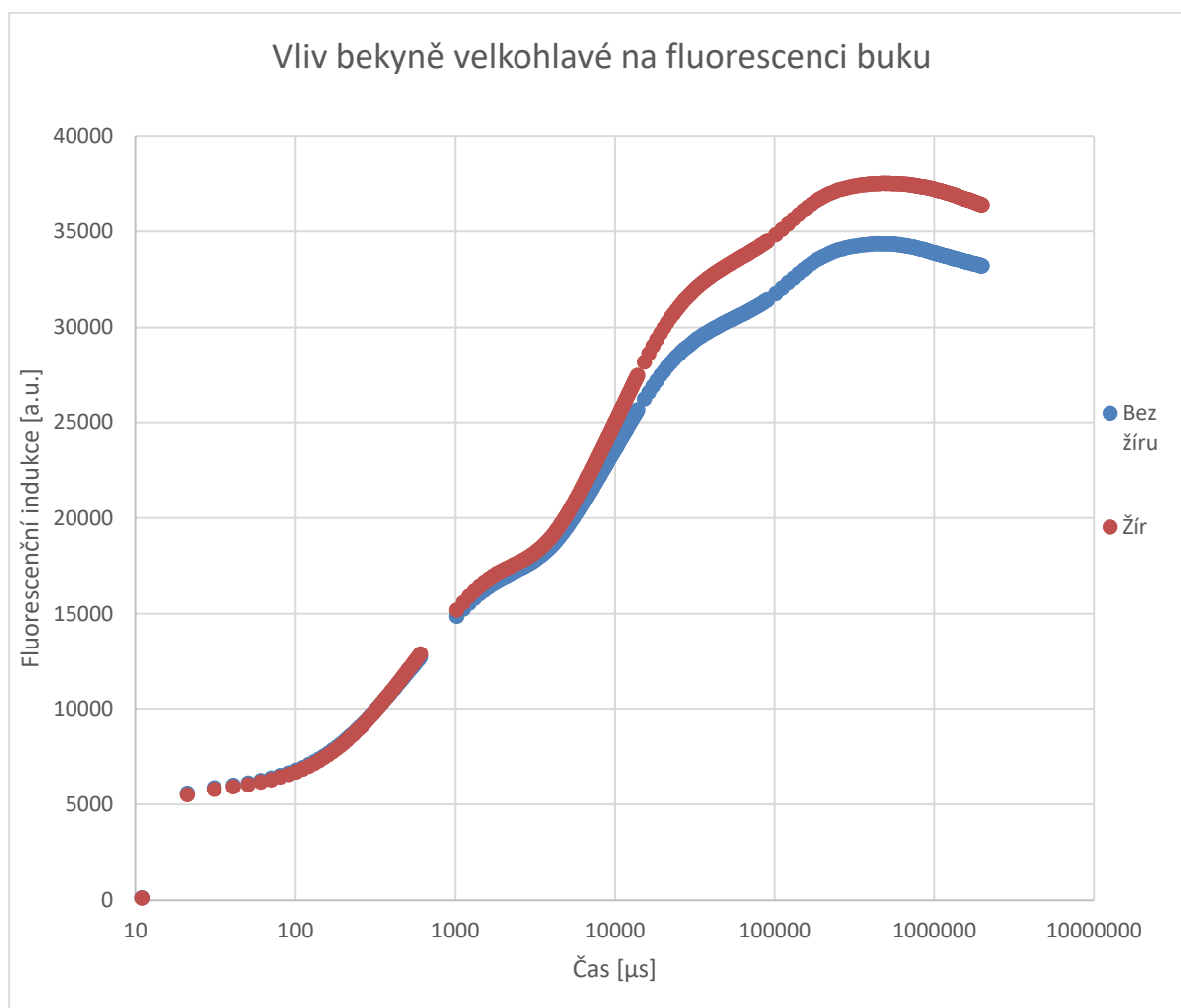
Přepočet na hmotnost vzorku listů

$$c_{\text{AMK přepočtená na hmotnost}} = c_{\text{AMK kalibrační křivky}} * V_{\text{Toluenu}}/m_{\text{vz}}/\text{Prekoncentrační faktor} = 0,1276 * 800/0,15/0,25 = 0,2722 \mu\text{mol/g FW}$$

Příloha č. 3

Rychlá fáze fluorescenční indukce

- Průměr naměřených hodnot fluorescenční indukce při vlivu žíru bekyně velkohlavé a bez vlivu fytopatogenu.



Graf 11 – Vliv bekyně velkohlavé na fluorescenci vzorku listů buku: Žír – průměr hodnot naměřených na vzorcích listů buku, které byly vystaveny vlivu bekyně velkohlavé, Bez žíru – průměr hodnot naměřených na vzorcích listů buku, které nebyly vystaveny vlivu bekyně velkohlavé.

Tabulka 4 – Fluorescenční parametry vypočítané z *Graf 11*: Fo – min. fluorescence, Fj – fluorescence ve 2 ms od startu aktinického světla, Fi – fluorescence ve 30 ms od startu aktinického světla, Fm – maximální fluorescence, Fv – maximální variabilní fluorescence, Vj – relativní variabilní fluorescence 2 ms od startu aktinického světla, Vi – relativní variabilní fluorescence ve 30 ms od startu aktinického světla, Phi_Po – maximální kvantový výtěžek, Pi_Abs – „performance index“.

	žír		bez žíru	
	průměr	SD	průměr	SD
Fo	5806,00	185,09	5874,67	472,72
Fj	17166,67	414,23	16751,33	1449,40
Fi	31692,00	851,16	29024,67	2584,89
Fm	37430,33	1456,16	34230,00	2854,15
Fv	31624,33	1365,10	28355,33	2877,55
Vj	0,36	0,01	0,38	0,02
Vi	0,82	0,02	0,82	0,01
Phi_Po	0,85	0,01	0,83	0,02
Pi_Abs	6,22	0,86	4,87	1,48

Bekyně velkohlavá má vliv na fluorescenci vzorků listů buku lesního.