

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Produkce flavonoidů a fenolických látek u zelí v závislosti na napadení dřepčíky rodu *Phyllotreta*

Diplomová práce

Autor: Bc. Nikola Kuchtíčková
Studijní program: N 1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: Tůma Jiří, doc. Ing. CSc.

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor:	Bc. Nikola Kuchtíčková
Studium:	S16BI008NP
Studijní program:	N 1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Název bakalářské práce:	Produkce flavonoidů a fenolických látek u zelí v závislosti na napadení dřepčíky rodu <i>Phyllotreta</i>
Název bakalářské práce AJ:	The production of flavonoids and fenolic compounds in cabbage in dependence on the attack of the <i>Phyllotreta</i> flea beetles

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Rostoucí intenzita pěstování a nárůst ploch plodin z čeledi Brassicaceae, spolu s mírnou zimou v letech 2013-2016, přispělo k významnému rozšíření dřepčíků rodu *Phyllotreta* a dřepčíka olejkového. Škody na porostech způsobují dospělci i larvy. Při napadení rostlin herbivorním hmyzem jsou aktivovány různé obranné mechanismy. Jedním z nich je zvýšená produkce látek sekundárního metabolismu. Cílem práce je výzkum závislosti mezi napadením rostlin zelí dřepčíky a produkcí vybraných sekundárních metabolitů, především flavonoidů a dalších látek fenolického charakteru. Z napadených porostů zelí bude nutné odchytnout dospělé jedince dřepčíka a aplikovat je na rostliny zelí v kultivačních boxech. Simulovat tak nízký a vyšší stupeň napadení dřepčíky. U rostlin zdokumentovat stupeň napadení a provést analýzy na obsah vybraných metabolitů: Pomocí spektroskopických metod aj. budou stanoveny koncentrace fenolických látek, flavonoidů aj. a některé parametry oxidačního stresu (např. peroxid vodíku, superoxidový radikál aj.).

Li X.Q. et al. (2016): Plant genotypes affect aboveground and belowground herbivore interactions by changing chemical defense. *Oecologia* 182 (4):1107-1115. DOI: 10.1007/s00442-016-3719-x
Ahuja I. et al. (2010) Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy Sustainable Development* . 30: 311-348. DOI: 10.1051/agro/2009025
Kuzina V. Et al. (2009) Identification of Defense Compounds in *Barbarea vulgaris* against the Herbivore *Phyllotreta nemorum* by an Ecometabolomic Approach. *Plant Physiology*, 151:1977-1990. DOI: 10.1104/pp.109.136952

Garantující pracoviště:	Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce:	doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.
Oponent:	PharmDR. Marie Kašparová, Ph.D.
Datum zadání závěrečné práce:	15.1. 2017

Prohlášení:

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

V Hradci Králové dne

Bc. Nikola Kuchtíčková

Poděkování:

Na úvod bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za odborné vedení a za rady, které významně přispěly ke zpracování této diplomové práce.

Anotace

Kuchtíčková, N. *Produkce flavonoidů a fenolických látek u zelí v závislosti na napadení dřepčíky rodu Phyllotreta*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Tůma Jiří, doc. Ing. CSc. 70 s.

Diplomová práce se zabývá sekundárními metabolity rostlin, a to především produkcí flavonoidů a dalších fenolických látek u zelí v závislosti na napadení dřepčíky rodu *Phyllotreta*. Rostoucí intenzita pěstování a nárůst ploch plodin z čeledi *Brassicaceae*, spolu s mírnou zimou v letech 2013-2016, přispělo k významnému rozšíření dřepčičků tohoto rodu. V teoretické části jsou podávány informace o stresových faktorech působící na rostliny, se zvýšeným zájmem o herbivorii fytofágního hmyzu. Praktická část je zaměřena na experiment, při kterém by se prokázala zvýšená produkce obranných látek u brukvovitých rostlin na základě intenzity napadení dřepčíky.

Klíčová slova

Fenolické látky, flavonoidy, stresový faktor, herbivorie, fytofágní hmyz

Annotation

Kuchtíčková, N. *The production of flavonoids and fenolic compounds in cabbage in dependence on the attack of the Phyllotreta flea beetles*. Hradec Králové, 2018. Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis supervisor Tůma Jiří, Asooc. Prof. Ing. PhD. 70 p.

The diploma thesis deals with secondary metabolites of plants, mainly with the production of flavonoids and other phenolic substances in cabbage depending on infestation of strains of Phyllotreta. Growing intensity of cultivation and cultivating areas of crops of the Brassicaceae family, along with a mild winter in years 2013-2016, contributed to the significant expansion of Phyllotreta. The theoretical part contains information on stress factors affecting plants, with an increased interest in herbivores of phytophagous insects. Practical part is focused on an experiment that would prove increased production of defensive substances in Brassicaceae plants based on the level of Phyllotreta attack.

Keywords

fenolic compounds, flavonoids, stress factor, herbivory, phytophagous insects

Obsah

1	Úvod a cíl práce	8
2	Literární přehled.....	10
2.1	Stresové faktory působící na rostlinu.....	10
2.2	Aktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species)	14
2.3	Fytofágní hmyz	15
2.4	Obrana rostlin proti hmyzím herbivorům	17
2.4.1	Náklady na obranu a princip rozdělování zdrojů v rostlině.....	18
2.5	Sekundární metabolity	19
2.6	Fenolické látky a flavonoidy	22
2.6.1	Historie flavonoidů	24
2.6.2	Chemická struktura flavonoidů	24
2.6.3	Klasifikace	25
2.6.4	Biosyntéza flavonoidů	29
2.6.5	Fenoly a flavonoidy v obraně proti fytofágnímu hmyzu	31
2.7	Rostliny z čeledi <i>Brassicaceae</i> a jejich hlavní škůdci	33
2.7.1	Významní hmyzí škůdci <i>Brassicales</i>	33
3	Metodika experimentu	39
3.1	Materiál	39
3.2	Příprava experimentu.....	40
3.3	Statistické zpracování dat.....	42
3.4	Analýza vzorků.....	42
3.4.1	Použité chemikálie a přístroje	42
3.4.2	Principy a postupy použitých analytických metod	43
3.4.3	Příprava vzorků pro analýzu a získávání dat.....	45
4	Výsledky.....	48
4.1	Obsah aktivních forem kyslíku	48
4.2	Obsah fenolických látek a flavonoidů	49
4.3	Obsah kyseliny salicylové	50
4.4	Relativní zastoupení jednotlivých fenolických kyselin	51
4.5	Regresní analýza.....	52
5	Diskuze	54
5.1	Změny v hodnotách ROS vlivem stresu vyvolaném dřepčíky.....	54

5.2	Změny v hodnotách fenolických látek a flavonoidů vlivem stresu vyvolaném dřepčíky .	54
5.3	Změny v hodnotách kyseliny salicylové vlivem stresu vyvolaném dřepčíky	55
5.4	Regresní analýza.....	56
6	Závěr a doporučení.....	57
	Seznam obrázků	59
	Seznam grafů a tabulek.....	59
	Seznam použité literatury	61
	Přílohy	68

1 Úvod a cíl práce

Rostliny neodmyslitelně patří do našeho běžného života, obklopují nás a zajišťují nejen lidem ale i všem dalším organismům rostlinnou složku potravy. Jsou nedílnou součástí přírody a hrají pro život na Zemi klíčovou roli. Jedná se o organismy, jež dokáží přeměňovat anorganické sloučeniny na látky organické a dále jsou schopny fotosyntézy a tím produkce životně důležitého kyslíku, tvořícího druhou hlavní složku zemské atmosféry.

Rostlinné organismy nejsou schopny aktivního pohybu, nemohou se podobně jako živočichové pohybovat z místa na místo, a proto bývají velmi často ovlivňovány prostředím, které na ně působí. Musí si tedy zajistit ochranu před působením vnějších faktorů, které by rostlinu mohly fyzicky poškodit nebo by mohly způsobit její úhyn. Mezi faktory životně ovlivňující tyto organismy řadíme abiotické faktory, jako je například působení větru, UV záření, vysokých i nízkých teplot, nedostatek vody a živin v půdě a přítomnost toxických látek v prostředí. Jsou to dále biotické faktory, do kterých patří herbivorní živočichové spásající rostliny, patogenní mikroorganismy, jako jsou bakterie, houby a viry. Dále pak vzájemné ovlivňování rostlin mezi sebou, kam zařadíme parazitismus a alelopatii. Tyto faktory vedly rostliny k vybudování si ochranného mechanismu v podobě buď mechanické obrany nebo chemické obrany v podobě sekundárních metabolitů.

Sekundární metabolity pomáhají rostlině reagovat na změny podmínek v životním prostředí. Fenolické látky představují jednu z nejčtetnějších heterogenních skupin látek v rostlinné říši, jejichž biochemické a fyzikální vlastnosti umožňují různorodou biologickou aktivitu v těle rostlin, ale i mikrobů a živočichů. Fenoly zahrnují skupinu sloučenin zvaných jako flavonoidy, jejichž základní chemickou strukturu tvoří patnácti uhlíkatý skelet.

Cílem této diplomové práce bylo prostudovat dostupnou literaturu týkající se fenolických látek, zejména flavonoidů a jejich produkce u rostlin, jako odpověď na působení herbivorních živočichů, zejména fytofágního hmyzu. Dále pak navrhnout pracovní hypotézy a sestavit experiment při kterém by se prokázala zvýšená produkce obranných látek u brukvovitých (*Brassicaceae*) rostlin na základě intenzity napadení dřepčíky rodu *Phyllotreta*. Předmětem výzkumu je i zájem o aktivní formy kyslíku a

kyselinu salicylovou, poukazující na rostlinný organismus zažívající stres z napadení fytofágním hmyzem.

Byli navrženy a testovány tyto pracovní hypotézy:

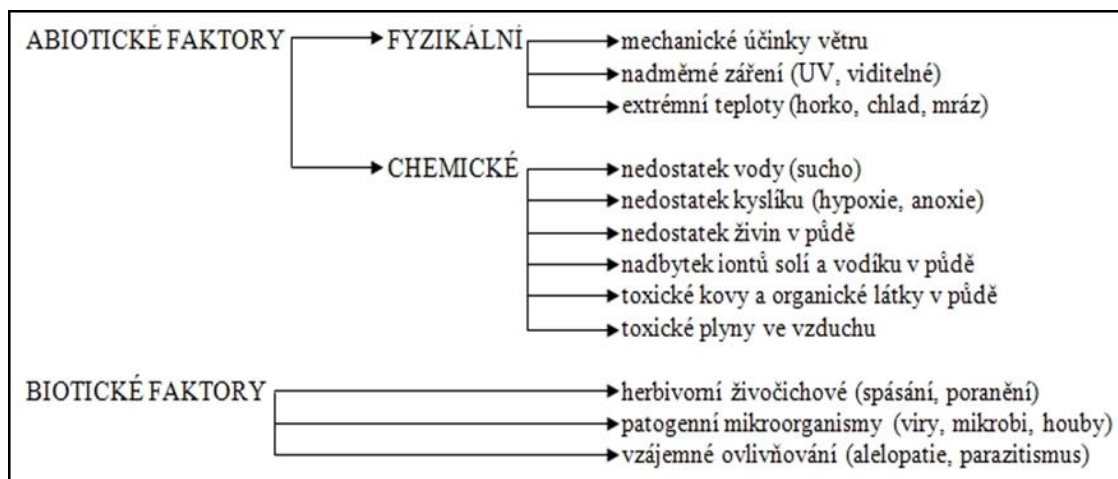
Pracovní hypotéza **H1**: Předpokládáme, že obsah aktivních forem kyslíku a obranných látek bude vyšší u rostlin napadených fytofágním hmyzem, oproti rostlinám kontrolním.

Pracovní hypotéza **H2**: Předpokládáme, že obsah aktivních forem kyslíku a obranných látek se bude zvyšovat s intenzitou napadení.

2 Literární přehled

2.1 Stresové faktory působící na rostlinu

Rostliny jsou na rozdíl od volně se pohybujících živočichů pevně spjaty s místem svého růstu, nemohou tedy před nepříznivými vlivy prostředí utéct nebo se schovat. Životní prostředí je soubor vnějších podmínek stanoviště a vnějších faktorů, jejichž působení je rostlina vystavena. Mohou zpomalovat její životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést až k uhynutí rostliny. Jejich genetická výbava proto musí být dostatečně plastická, aby si dokázaly s touto nevýhodou poradit a mohly se účinně bránit. Stresové faktory mohou být abiotické (fyzikálně-chemické) či biotické povahy (Obr. 1). Mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů odlišně, a to především v důsledku různě vyvinutých obranných struktur. Růst a vývoj rostliny je vedle dopadajícího slunečního záření, teploty, dostupností vody a minerálních látek, také významně ovlivňován interakcí s ostatními živými organismy na daném stanovišti. Biotické faktory jsou povahy biologické, živý organismus ovlivňuje jiné organismy, nebo skupiny organismů, a to buď přímo, nebo nepřímo. Přímé biotické vlivy můžeme charakterizovat jako vazbu dvou i více druhů organismů na sebe, vazbu cizopasníků v těle hostitele a vazbu kořisti a dravce. Pokud se organismy přímo neseťkávají, ale ovlivňují se a navzájem si spotřebovávají zdroje, jedná se o nepřímé biotické vlivy. Mezi vlivy působící na rostliny patří zejména působení patogenů, jako jsou viry, bakterie, houby, působení konkurenčních druhů rostlin ve smyslu alelopatie nebo parazitismu a poškození způsobené živočichy, z nichž nejvýznamnější roli hraje herbivorie (Procházka et al., 1998; Píterková et al., 2005; Pavlová, 2006; Smýkal, 2015).



Obrázek 1: Přehled nejdůležitějších stresových faktorů (Procházka et al., 1998)

Proměnlivé podmínky vnějšího prostředí působí často negativně na rostlinu, které se pod tlakem stresových faktorů ocitají ve stresu. Stres je dynamický komplex mnoha reakcí. Mechanismy obrany proti stresu lze rozdělit do dvou kategorií (Procházka et al, 1998; Gómez et al., 2007):

1. Mechanismy zabraňující tomu, aby rostlina byla vystavena stresovému faktoru (avoidance mechanisms). Tato obrana zahrnuje mechanickou bariéru rostliny, jež má dlouhodobý a pasivní charakter. Jedná se například o silnou kutikulu na listech, rezervoáry vody a řady organických látek, výraznou impregnaci buněčných stěn. Kromě mnoha morfologických a morfogenetických adaptací k omezení herbivorie mohou rostliny také uniknout v čase a prostoru tím, že vytváří řídké populace, mají nepravidelný cyklus či krátkou délku života. Díky této strategii jsou pro herbivory těžko dostižitelné.
2. Aktivní obrana rostlin (tolerance mechanisms). Tento mechanismus obrany omezuje negativní dopad stresů až po jejich proniknutí do rostliny k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V tuto chvíli se spouští řetězec změn, označovaného jako stresové reakce.

Průběh a výsledek stresové reakce závisí na délce a intenzitě působení stresového faktoru, ale i na samotné rostlině, a to zejména na jejím genotypu, na stádiu vývoje, vitalitě a adaptačních schopnostech. Studium vlivu stresu na rostlinu je komplikováno nejen tím, že často působí více stresových faktorů současně ale i tím, že působení

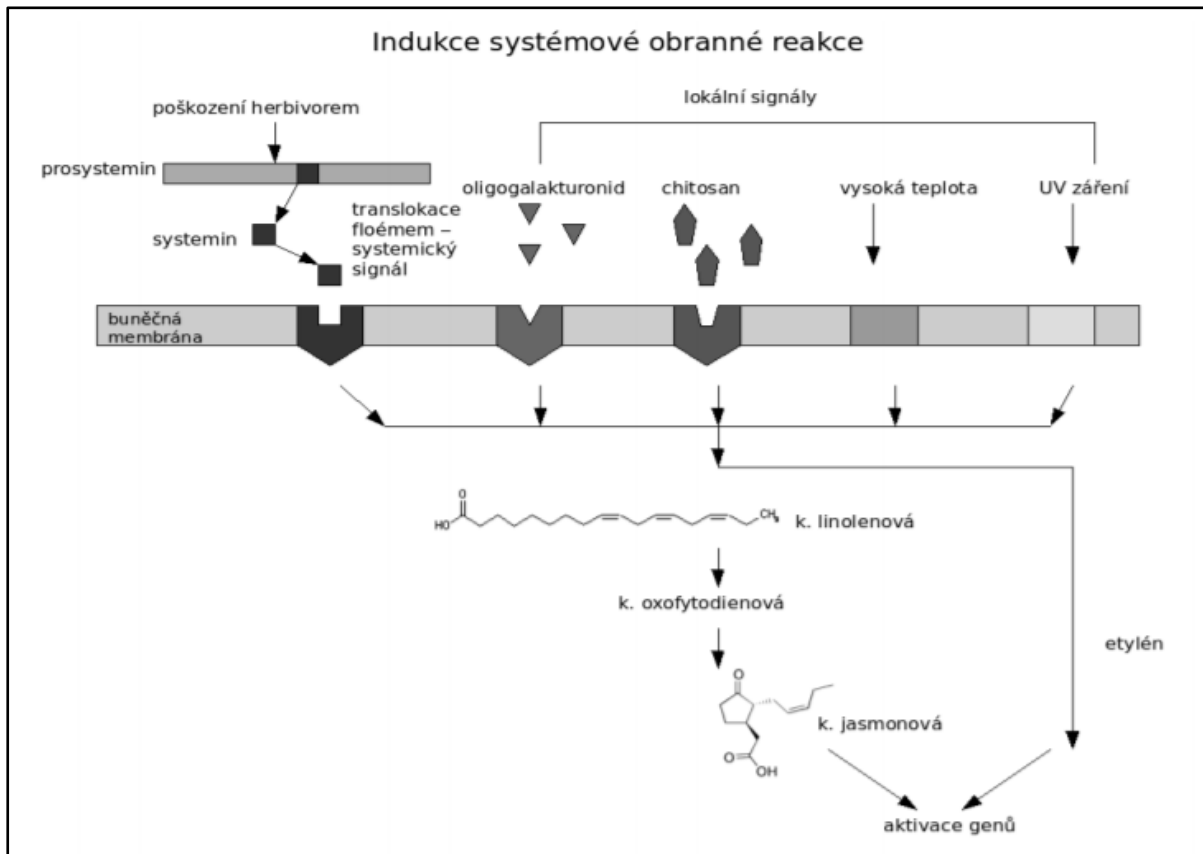
stresorů bývá obvykle omezeno na část rostliny, ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech a dochází k systémové stresové reakci (Procházka et al., 1998; Piterková et al., 2005).

Příkladem systémové reakce může být signalizace pomocí systeminu, která je v současné době asi nejlépe prozkoumanou signální dráhou přenášející informaci o napadení herbivory. V místě působení se systemin váže na receptor, čímž se aktivuje intracelulární řetězec vedoucí k uvolnění kyseliny linolenové z cytoplasmatické membrány. Kyselina je dále přeměněna na phytodienoic acid (PDA) a na jeden z nejdůležitějších hormonů uvolňovaných v rostlině při stresu, kyselinu jasmonovou (JA). JA signalizace hraje významnou roli při obranné reakci rostlin na napadení herbivory, včetně housenek, brouků a dalších (Orcutt et Nilsen, 2000; Schulze et al., 2005; Browse and Howe, 2008). Kempema et al. (2007) uvádí, že ne všichni herbivoři aktivují signalizaci JA v rostlinách, někteří mohou aktivovat signalizaci pomocí kyseliny salicylové (SA) a tím dokonce potlačovat JA, avšak výsledky výzkumů ukazují, že JA hraje dominantní roli v odolnosti rostlin proti útoku herbivorů.

Řetězec reakcí vedoucí k syntéze kyseliny jasmonové začíná tvorbou allen-epoxidu, který je pak přeměněn na cyklickou 12 – oxophytodienovou kyselinu, z níž jsou tři acetátové zbytky odstraněny beta-oxidací, což vede ke vzniku 7-iso-jasmonátu, který může být rychle přeměněn na stabilní jasmonát. Tato látka se vyskytuje ve všech rostlinných částech jako účinný regulátor růstu, převládá však v mladých pletivech. Methylester jasmonátu má těkavý charakter a byl identifikován v jasmínu jako vonná složka. Těkavá povaha methyljasmonátu umožňuje rostlinám mimo jiné bezkontaktní přenos signálu o napadení k sousedním rostlinám. Napadená rostlina začne vylučovat methyljasmonát do ovzduší, molekuly vstupují do rostlin průduchy a tento signál je dále po rostlině šířen vodivými pletivy. Přítomnost methyljasmonátu vede ke zvýšení produkce obranných látek, například inhibitorů proteináz, alkaloidů, fenolických látek, glukosinolátů a to ještě předtím, než je rostlina napadena. Přenos signálu o napadení vzduchem funguje i mezidruhově (Orcutt et Nilsen, 2000; Schulze et al., 2005).

Na obrázku 2. je znázorněno zjednodušené schéma indukce systémové obranné reakce. Po poškození rostlinného pletiva se začne z prekursoru prosysteminu tvořit signální peptid systemin. Ten je transportován po rostlině floémem. Po jeho navázání na receptory, nebo vlivem jiných vnějších faktorů se z plazmatické membrány uvolňuje

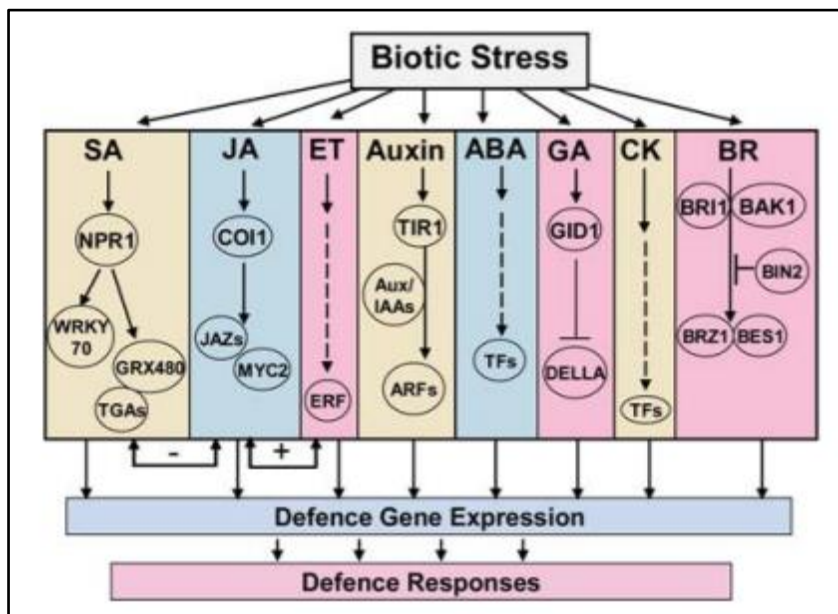
kyselina linolenová, což vede dále ke tvorbě jasmonátu. Na indukcii exprese genů pro tvorbu obranných látek se jasmonát často podílí spolu s etylénem, nicméně základní molekulární mechanismy nejsou přesně známy (Jones et Bari, 2009).



Obrázek 2: Schéma indukce systémové obranné reakce (upraveno podle Wasternack et Parthier, 1997).

Ochrana rostlin proti napadení herbivorů zahrnuje mnoho signálů, které jsou zprostředkovány sítí fytohormonů. Rostlinné hormony hrají klíčovou roli při regulaci růstu, rozvoje a obranných mechanismů (War et al., 2012). Jones et Bari (2009) ve své práci uvádějí, že významný pokrok v rostlinných hormonech byl dosažen v roce 2006, kdy byly pochopeny role kyseliny salicylové (SA), jasmonátů (JA) a ethylenu (ET) v reakcích rostlin na biotický stres. Množství SA se zvyšuje obvykle v blízkosti místa napadení, zatímco stresový hormon kyselina jasmonová je přítomna až za prstencem působení kyseliny salicylové. Ačkoli jsou obranné dráhy SA a JA / ET vzájemně antagonistické, jsou i důkazy o synergických interakcích. To značí, že aktivace signalizace obrany, kterou rostlina využije závisí na povaze a intenzitě útoku. V přírodním prostředí, se rostliny často vyrovnávají s několika útočníky, a proto používají

komplexní regulační mechanismy pro vyvolání účinných obranných reakcí proti různým patogenům a škůdcům. Jak rostliny upřednostňují jednu reakci nad druhou však není známo (Adie et al., 2007; Jones et Bari, 2009; Janda, 2018). Nedávné studie naznačují že další hormony se účastní obranné signalizaci, jako je kyselina abscisová (ABA), auxin, kyselina gibberelová (GA), cytokinin (CK), brassinosteroidy (BR) a peptidové hormony, ale jejich role je méně prostudována (Jones et Bari, 2009). Podíl hormonů na rostlinné obraně proti biotickým faktorům je znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3: Podíl hormonů na rostlinné obraně proti biotickým faktorům (Jones et Bari, 2009)

2.2 Aktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species)

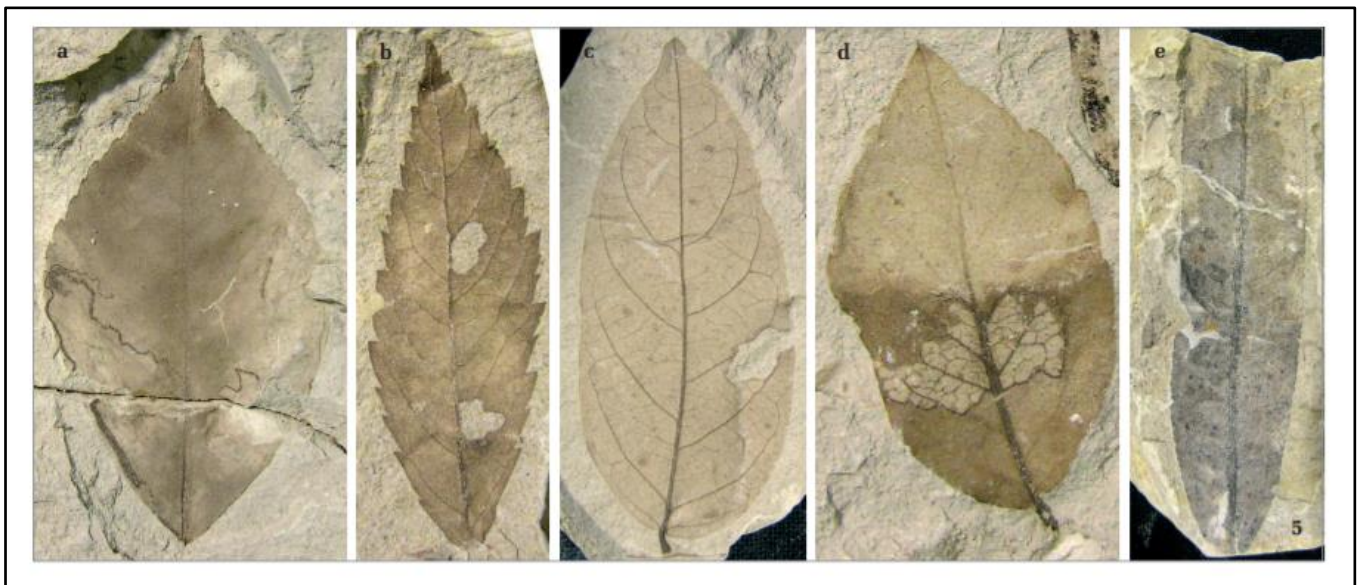
Fotoinhibice a fotooxidace se všeobecně u rostlin projevují jen ve stresových podmínkách. Za normálních růstových podmínek je v rostlinné buňce produkce aktivních forem kyslíku nízká, avšak působí-li na rostlinu stresové faktory, které narušují její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení aktivních forem kyslíku v buňce, např. v chloroplastech. ROS slouží v biologických systémech jako signální molekuly pro expresi genů, nebo jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu způsobují poškození až zánik buňky. Rostliny si během evoluce vyvinuly systém na odstranění toxických forem kyslíku. Aktivní formy kyslíku jsou singletový kyslík, superoxidový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíku a jejich akumulace

může poškodit buněčné komponenty. Mohou inaktivovat enzymy, oxidovat proteiny a poškozovat DNA a RNA buňky. Reakcí s nenasycenými mastnými kyselinami dochází k peroxidaci esenciálních membránových lipidů intracelulárních organel, což ovlivňuje respirační aktivitu mitochondrie a způsobuje ztrátu schopnosti chloroplastu fixovat oxid uhličitý (CO₂). Dále dochází k peroxidaci plazmalemy, což vede k úniku buněčného obsahu a buněčné smrti. Detoxikace toxických forem kyslíku enzymatickou cestou je katalyzována různými enzymy jako je superoxiddizmutáza, askorbát a glutathionperoxidáza, monoaskorbátreduktáza, dehydroaskorbátreduktáza, glutathionreduktáza a kataláza. Neenzymatické antioxidanty jsou malé molekuly jako např. kyselin askorbová, glutathion, alfa-tokoferol, karotenoidy, polyamidy, různé cukry a v neposlední řadě i flavonoidy. (Piterková et al., 2005; Hernández et al., 2009; Řepková, 2013).

2.3 Fytofágní hmyz

Herbivorie neboli býložravost je jedním z nejvýznamnějších vztahů mezi rostlinou a živočichem. Jedná se o jeden z mnoha biotických stresových faktorů, který působí na rostlinu a má na ni přímý vliv, jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole. Herbivorní živočichové mohou poškozovat rostlinu, v případě vespělých obratlovců, spásáním, okusem, či způsobem vlastním fytofágnímu hmyzu, jako je minování (vyžírání chodbiček) nebo sání tekutin z rostlinných pletiv. Rostliny a hmyz spolu koexistují již více než 400 milionů let. Během této doby se vyvinuli interakce, které ovlivňují jednotlivé organismy na všech úrovních, od základních biochemických až po populační genetiku. Některé z těchto vztahů jsou vzájemně prospěšné, jako je opylení, ale většina interakcí zahrnuje kolonizaci rostlin hmyzem, před kterou se rostliny musí chránit. Právě fytofágní hmyz má největší vliv na rostliny. Dvě třetiny všech známých herbivorů jsou brouci (Coleoptera) a housenky motýlů (Lepidoptera). Jejich potravní specializace je podrobněji prozkoumaná zejména u druhů škodících na pěstovaných plodinách, neboť je potřeba se proti nim bránit. Méně informací se ví o nárocích hospodářsky nevýznamných druhů (Schoonhoven et al., 1998; Špryňar et Strojček, 2012; Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Současná rozmanitost rostlin a fytofágního hmyzu představuje do značné míry výslednici jejich vzájemného působení, jehož počátek je doložen z doby konce spodního karbonu před 324 miliony let. Do této doby spadají vůbec nejstarší doklady nejen výskytu vlastních fyzických pozůstatků hmyzu ale i hmyzího žíru, přítomné hlavně na listech dvouděložných rostlin (Obr.4 a-e). Na obrázku (a) je ukázka vzácného nálezu minujícího žíru na listu rostliny z čeledi čajovníkovitých (*Theaceae*). Pravděpodobným původcem byl motýl z čeledi drobníčkovití (*Nepticulidae*). Následuje (b) příklad dutinového žíru se slabě vyvinutou reakcí okolního pletiva na listu ostružiníku Merianova (*Rubus merianii*). Dále (c) hluboký okrajový žír s jasně patrnou proliferační reakcí okolního pletiva na listu rodu vistárie (*Wisteria*). Kostrový žír (d) symetricky rozložený po obou stranách středové žilky listu zástupce vyhynulého rodu *Ternstroemites*. Poslední obrázek (e) je příkladem jiné než herbivorní interakce. Jedná se o nález listu vyhynulé vrby Haidingerovy (*Salix haidingeri*) se stopami po kladení vajíček (ovipozici) vážek z čeledi šídlatkovití (*Lestidae*). Nejstarší doložitelný příklad hmyzí herbivorie byl popsán na kaprad'osemenné rostlině druhu *Triphyllopteris austrina* z konce spodního karbonu Austrálie (Špryňar et Strejček, 2012; Knor et Prokop, 2014).



Obrázek 4: **Demonstrace fosilních nálezů hmyzího žíru (a-d) a stopy po kladení vajíček (e)** (Knor et Prokop, 2014)

Obecně lze hmyzí herbivory rozdělit na specialisty (monofágy) a generalisty (polyfágy). Lze konstatovat, že potravní generalisté, kteří se mohou živit často navzájem nepříbuznými druhy rostlin, jsou u hmyzu v menšině. Dokáží tolerovat širokou škálu rostlinných obranných látek, ale pokud narazí na rostlinu, jenž má účinné látky, na které nejsou specializovaní, může mít pro ně tato interakce fatální následky. Specialisté využívají pouze omezené množství druhů hostitelských rostlin. Tento hmyz se přizpůsobil obranným látkám vylučovaným rostlinami, a dokonce je dokáže využívat ve vlastní prospěch. Příkladem je obrana před predátory nebo nalezení dalších hostitelských rostlin. Zřetelně převládající užší potravní specializace se jeví jako výhodná z evolučních a ekologických důvodů (snazší nalezení ekologické niky, vazba na hostitele během koevoluce, únik před konkurencí a před predátory, účinnější využití potravního zdroje atd.) (Ali et Agrawal, 2012; Špryňar et Strejček, 2012).

Ve chvíli, kdy herbivor začne požírat rostlinu, objeví se několik obranných signálů, které mohou vést k různým druhům obrany, jako odpověď metabolismu. Rostliny mají také schopnost rozpoznat, zda je mechanicky poškozena například vlivem větru nebo krupobitím, či je požírána právě hmyzím herbivorem. Dále dokážou rozpoznat polohu nakladených hmyzích vajíček na svých orgánech. Tyto schopnosti jsou zcela nezbytné proto, aby rostlina nemusela investovat velké množství energie zbytečně. Svou energii tak může směřovat ve správnou chvíli pouze do obranné interakce proti hmyzím herbivorům. Fytofágní hmyz může hrát roli v přenosu rostlinných patogenů, která způsobují u rostlin různá onemocnění. Choroby snižují růst a produktivitu rostlin. Mezi původce rostlinných chorob se řadí submikroskopické organizmy, jako jsou viry a viroidy a mikroskopické organizmy, mezi něž patří houby, bakterie, hlístice, prvoci a parazitické zelené řasy (Capinera, 2008; Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

2.4 Obrana rostlin proti hmyzím herbivorům

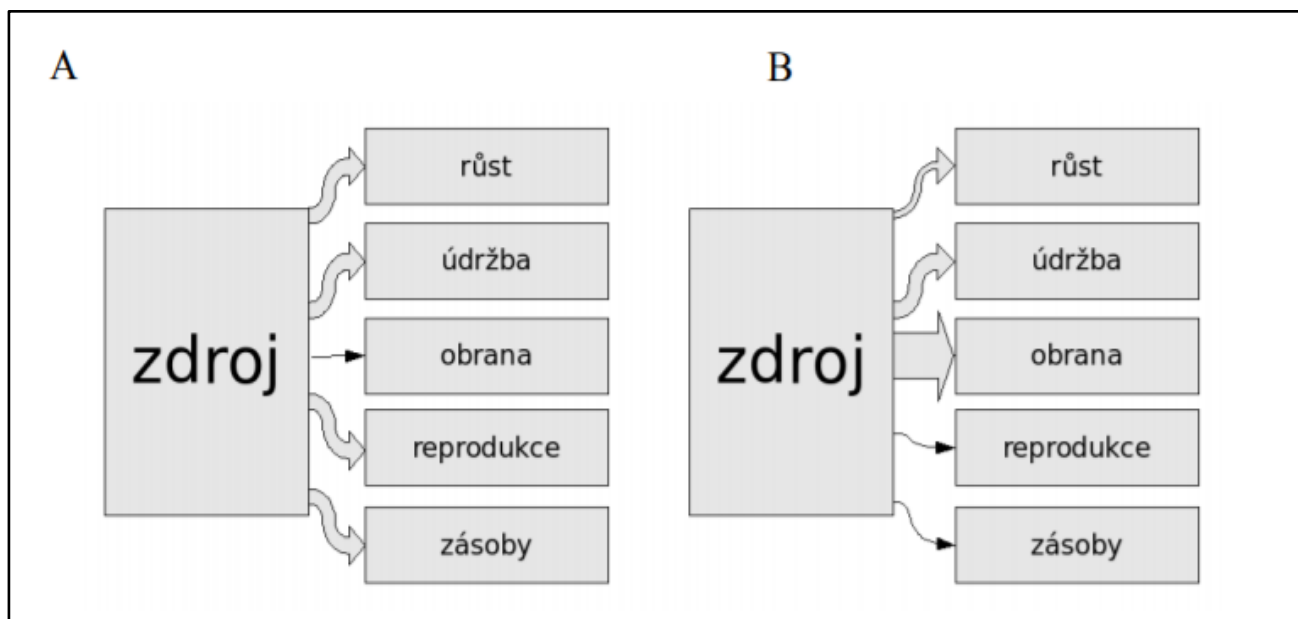
Obrany lze rozdělit na konstitutivní a indukované. Konstitutivní obrany jsou předem vytvořené mechanické a chemické obrany rostlin, které jsou aktivované již před napadením. Jedná se o přítomnost kutikuly, buněčné stěny a různých antimikrobiálních látek v těle rostliny, které jsou přítomné i bez působení stresového faktoru. Oproti tomu indukované obrany se u rostliny vyskytnou až po napadení jejích pletiv herbivorem. K aktivaci vyžadují určitou formu indukčního signálu. Obranné látky mohou být u

rostlin syntetizovány zcela indukovaně, nebo mohou být přítomny konstitutivně, ale jejich množství závisí na působení stresových faktorů (Chen, 2008; Řepková, 2013).

Dále se mohou obrany rozdělit na přímé a nepřímé. Přímá obrana je zprostředkována vlastní rostlinou. Formou přímé mechanické obrany jsou vosky, chloupky, trichomy, trny, ztlustlé listy nebo forma chemické obrany, kam se řadí produkce toxických chemických látek, jako jsou například terpenoidy, alkaloidy, antokyany, fenoly a chinony, které působí na škůdce toxicky a mohou způsobovat i smrt. Nepřímá obrana spočívá v produkci extraflorálního nektaru a směsi těkavých látek, které přirozeně vábí predátory škůdců a poskytuje jim úkryt pro zvýšení efektivity přirozených nepřátel herbivorů (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

2.4.1 Náklady na obranu a princip rozdělování zdrojů v rostlině

Na počátku výzkumu obrany rostlin proti herbivorii se předpokládalo, že rostlinné obranné mechanismy jsou pro růst i celkovou fitness rostliny velmi nákladné, neboť zde vyvstává fakt, že rostliny dosahují nejvyšší odolnosti proti napadení herbivory teprve až po známkách poranění. Pokud jsou obranné mechanismy pro rostlinu výhodné pro fitness, vyvstává otázka, proč nejsou znaky podmiňující odolnost přítomné stále. Odpovědí by mohl být fakt, že zvýšená odolnost skutečně znamená zvýšené energetické a materiálové výdaje, takže znaky odolnosti se nejčastěji objevují až je-li to opravdu potřeba. Feeney (1976) a Clark a Harwell (1992) uvádějí, že není-li rostlina napadena, tedy za nepřítomnosti herbivorů dochází k maximální alokaci zdrojů do růstu a reprodukce, údržby a zásobování. Naopak, jak můžeme vidět na obr.5. Schéma rozdělování zdrojů v rostlině, jakékoliv mechanismy obrany rostlin (chemické nebo morfologické) spotřebovávají energii a další zdroje v rostlině na úkor jiných procesů jako je růst, údržba struktur, příjem iontů, a v největší míře pak reprodukce a zásobování.



Obrázek 5: Schéma rozdělování zdrojů v rostlině: A rozdělení zdrojů bez napadení, B rozdělení zdrojů po napadení herbivorem (upraveno podle Feeney, 1976; Clark et Harwell, 1992)

2.5 Sekundární metabolity

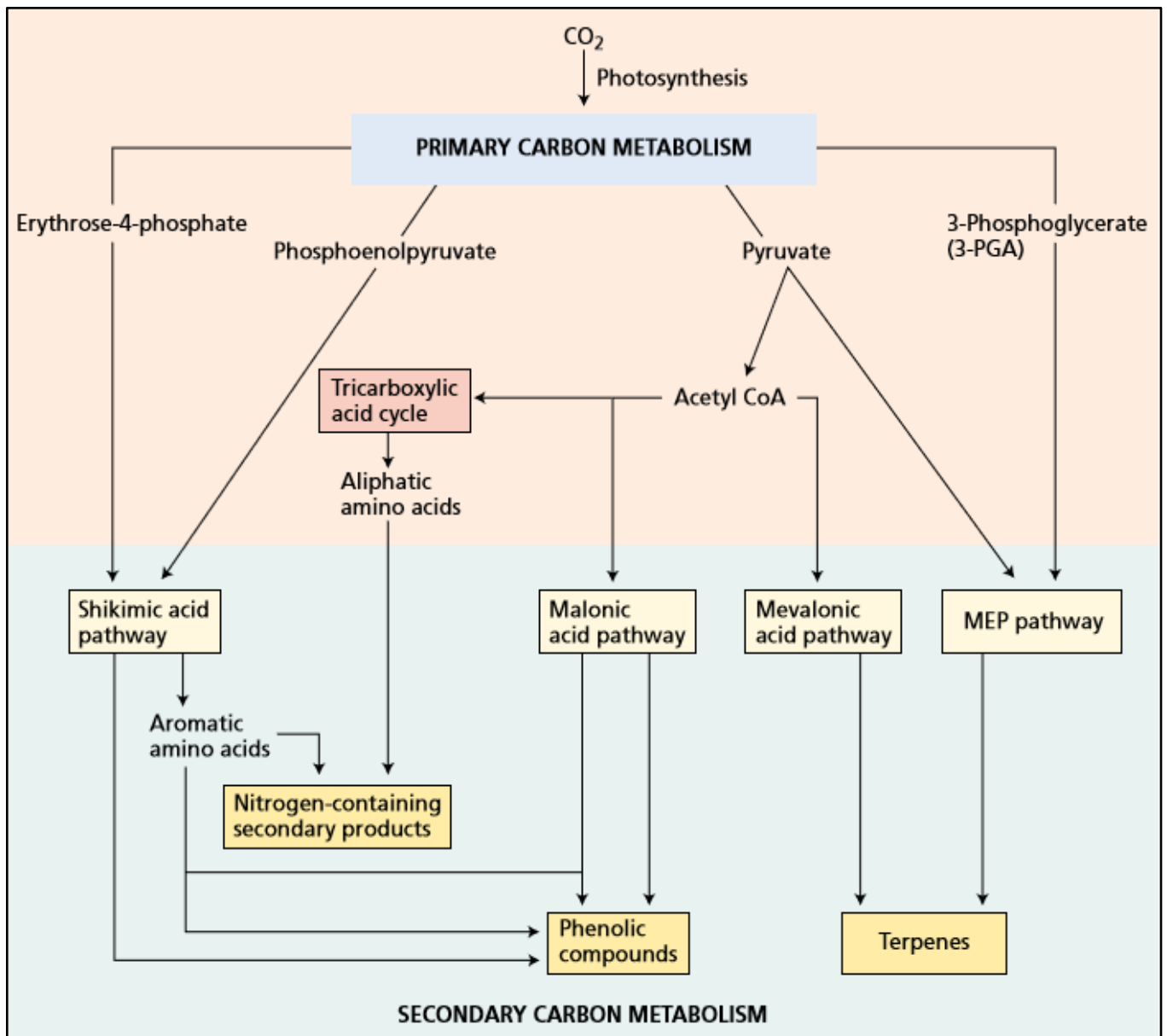
Metabolismem se rozumí soubor regulovaných biochemických reakcí, které organismům zajišťují nezbytnou energii pro jejich funkce a stavební látky. Jednotlivé reakce jsou zařazené do tzv. metabolických drah (reakční řetězce a cykly), které mohou sloužit buď k biosyntéze látek (anabolismus), nebo k jejich štěpení (katabolismus). Veškeré přírodní látky produkované rostlinami vznikají na základě metabolických procesů jako primární a sekundární metabolity (Macholán, 2003).

Primární metabolity jsou produkty primárního metabolismu, do kterého řadíme biogenezi nukleových kyselin, většiny sacharidů, proteinogenních aminokyselin, proteinů a některých karboxylových kyselin. Vedle těchto reakcí probíhají v cytosolu také biochemické reakce, které nejsou životně nezbytné pro rostlinu. Sekundární metabolismus, jehož produktem jsou sekundární metabolity probíhá jen v některých biologických druzích, nebo jen v určitých fázích jejich vývoje. Produkce těchto látek může být typická jen pro některá pletiva nebo skupiny buněk. Oba tyto metabolismy spolu úzce souvisí a prolínají se, nelze je tedy ostře oddělit. Některé konečné produkty metabolických drah jednoho rostlinného druhu, představuje pouhé meziprodukty v

metabolismu jiného druhu. Obrázek 6. znázorňuje v zjednodušené formě dráhy podílející se na biosyntéze sekundárních metabolitů a jejich propojení s primárním metabolismem (Taiz et Zeiger, 2010; Musilová et al., 2012; Tůma, 2012; Spilková et al., 2016).

Po mnoho let nebyl význam většiny sekundárních metabolitů rostlin znám. Tyto sloučeniny byly považovány za jednoduše bezfunkční konečné produkty metabolismu nebo metabolické odpady. Studium těchto látek bylo průkopem organických chemiků devatenáctého a počátku dvacátého století, kteří se o tyto látky zajímali z důvodu jejich významu jako léků, jedů, chutí a průmyslových materiálů (Taiz et Zeiger, 2010). Sekundární metabolity mají mnoho rozličných funkcí, mohou například sloužit jako efekторы jiných organismů (vůně, barviva, insekticidy, antibiotika, toxiny), přenašeče informací (hormony), ale také jako skladovací formy odpadních produktů primárního metabolismu. Jiné metabolity sloužící k obraně a ke komunikaci mohou být, společně s dalšími nízkomolekulárními látkami, vylučovány ve formě rostlinných exsudátů pomocí kořenového systému rostlin do okolní rhizosféry (Taiz et Zeiger, 2010; Musilová et al, 2012).

Kořenové výměšky se podílejí na utváření vzájemných vztahů mezi různými druhy organismů. Rostliny ovlivňují chemické vlastnosti okolní zeminy složením svých exsudátů, a tím mění i probíhající chemické reakce, což se dále projeví ve složení bakteriálních společenstev. Produkce exsudátů, společně s produkcí fyto toxinů, a jejich vylučováním do rhizosféry slouží jako jeden z prostředků mezidruhové konkurence. Látky obsažené v exsudátech mohou ale také sloužit ke komunikaci a napomáhat sousedním rostlinám odolávat patogenním organismům, které jsou přítomny v okolním prostředí. Rostliny takto ovlivňují nejen mikroorganismy ale také hmyz žijící v blízkosti jejich kořenů. Pozitivní vztahy zahrnují symbiózu např. s mykorhizními houbami a bakteriemi přítomnými v půdě, naopak negativní vztahy jsou mezi rostlinou a parazitujícími bakteriemi a plísněmi nebo hmyzem. Téměř všechny ekosystémy obsahují širokou škálu organismů, které jak pozitivně, tak i negativně ovlivňují vývoj rostlin. Všechny vztahy jsou velmi dynamické, a protože dochází k neustálým změnám, je potřeba aby rostlina na ně reagovala a neustále se adaptovala (Taiz et Zeiger, 2010; Musilová et al, 2012).



Obrázek 6: Dráhy podílející se na biosyntéze sekundárních metabolitů a jejich propojení s primárním metabolismem (Taiz et Zeiger, 2010)

Rostlinné obrany jsou produktem evoluce, jak uvádí Taiz et Zeiger (2010). Podle evolučních biologů byla obrana rostlin vyvinuta prostřednictvím dědičných mutací, přirozeného výběru a evolučních změn. Náhodné mutace v základních metabolických drahách vedly k vzniku nových sloučenin, které byly toxické nebo odstrašující pro herbivory a patogenní mikroorganismy. Dokud tyto sloučeniny nebyly příliš nepříznivé pro samotné rostliny a metabolické náklady na jejich výrobu nebyly příliš vysoké, měly tyto rostliny větší reprodukční schopnost než rostliny, které nebyly chráněny. Takže obhájené rostliny nechaly více potomků a přenesly své obranné vlastnosti do dalších generací.

Sekundární metabolity, které působí na fytofágní hmyz odpudivě až toxicky, lze rozdělit do dvou kategorií, a to na látky kvalitativně významné a kvantitativně významné. Látky kvalitativně významné (např. alkaloidy, glykosidy, glukozinoláty) jsou látky vyskytující se v rostlině v malých koncentracích, zato jsou ale pro živočichy velmi toxické. Rostliny s tímto mechanismem obrany jsou před většinou býložravců dobře chráněny, nicméně bývají ohrožovány specializovanými škůdci, kteří získali koevolučním procesem dokonalou rezistenci vůči příslušnému toxinu. Látky kvantitativně významné (např. ligniny, taniny, fenolické látky) jsou látky, které nejsou příliš toxické, ale jsou rostlinou produkovány ve větším množství, způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu. Syntéza těchto metabolitů je energeticky náročná a rostliny, které jsou jimi vybaveny, mají obvykle pomalejší růst. Jedná se ovšem o bezpečnou ochranu před poškozením, neboť jen málo živočišných druhů ji dokáže překonat (Procházka et al., 1998; Taiz et Zeiger, 2010).

2.6 Fenolické látky a flavonoidy

Z hlediska rostlinné fyziologie lze sekundární metabolity rostlin, dle Taiz et Zeiger (2010) rozdělit do tří chemicky odlišných skupin látek. Jedná se o terpeny, fenoly a sloučeniny obsahující dusík. Terpenoidy (izoprenoidy) představují největší a nejrozmanitější třídu chemických látek mezi nesčetnými sloučeninami produkujícími se v rostlinách. Rostliny využívají terpenoidní metabolity pro řadu základních funkcí růstu a vývoje, ale využívají je i pro specializované chemické interakce a obranu v abiotickém a biotickém prostředí (Tholl, 2015). Sloučeniny obsahující dusík jsou většinou syntetizovány z běžných aminokyselin a patří sem alkaloidy, glykosidy,

neproteinové aminokyseliny, lektiny a sirné rostlinné metabolity (Taiz et Zeiger, 2010). Početnou skupinu metabolitů představují právě fenolické látky (fenoly), které jsou rozšířeny v celé rostlinné říši. Zahrnují téměř 10 000 sloučenin, jejichž biosyntéza probíhá dvěma primárními syntetickými dráhami, které probíhají v nadzemních tkáních. Jsou jimi dráha šikimátová a acetátová, někdy také zvaná polyketidová nebo malonová. Tyto látky jsou většinou uloženy ve vakuolách a často se vyskytují ve značných koncentracích. Představují velmi rozsáhlou a různorodou skupinu sloučenin, zahrnující látky od jednoduchých derivátů benzenu, kyseliny benzoové a skořicové, přes flavonoidy, antokyany a kumariny až po látky složité, jako jsou tríslovininy či lignin (Procházka et al., 1998; Taiz et Zeiger, 2010; Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Fenolické sloučeniny představují jednu z nejčtenějších heterogenních skupin látek v rostlinné říši. Jejich chemická rozmanitost, fyzikální a biochemické vlastnosti umožňují různorodou biologickou aktivitu v těle rostlin, mikrobů, ale i živočichů. Z tohoto množství fenolických látek bylo identifikováno více jak 4000 variant chemických struktur flavonoidů (Buer, 2010; Taiz et Zeiger, 2010; Kumar et Pandey, 2013).

Téměř všechny skupiny flavonoidů i každá jednotlivá flavonoidní sloučenina má schopnost působit jako antioxidant. Jejich antioxidační účinky závisí na uspořádání funkčních skupin ve struktuře. Některé tyto látky jsou významnými inhibitory peroxidace lipidů *in vitro*, chrání lipidy před oxidačním poškozením různými mechanismy. Flavonoidy účastníci se antioxidačních procesů v membráně vykazují mírně hydrofobní (luteolin a epigallocatechin) až silně hydrofilní charakter (glykosidy flavonolů a antokyany). Další vykazují antioxidační aktivitu hluboko ve fosfolipidové dvojvrstvě, kde chrání lipidy a membránové proteiny. Naproti tomu více hydrofilní flavonoidy chrání povrch membrány. Flavonoidy obsažené v chloroplastech chrání lipidy thylakoidních membrán před peroxidací. Flavonoidy byly rovněž zjištěny v jádrech rostlinných buněk. ROS mohou způsobit oxidační poškození DNA, je tedy potřeba ochranná funkce jaderných flavonoidů. Dále také působí jako ochrana před působením UV záření, a tím i nepřímo chrání buněčné složky před fotooxidací (Hernández et al., 2009; Kumar et Pandey, 2013; Řepková, 2013).

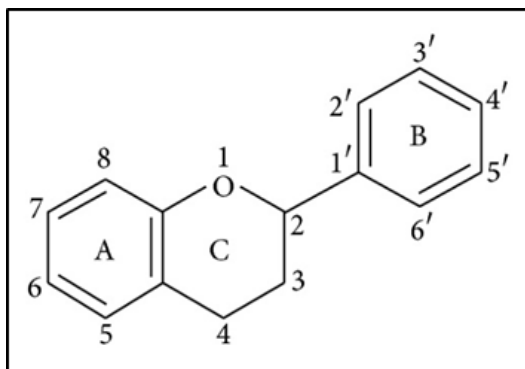
2.6.1 Historie flavonoidů

Díky jedné z hlavních úloh flavonoidů, jež jsou součástí červených, modrých a fialových pigmentů v rostlinách získaly tyto produkty sekundárního metabolismu v průběhu let velkou pozornost. Od prvního popisu vlivu kyseliny a zásady na rostlinné pigmenty Robertem Boylem v roce 1664 do konce 20. století bylo shromážděno množství informací o struktuře, chemické a biologické aktivitě a biosyntéze těchto sloučenin. Jedny z prvních flavonoidů byly identifikovány a pojmenovány jako vitamin P v roce 1936-1938 Albertem Szeng-Gyorgyiem, významným maďarským biochemikem, který získal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Od jejich objevu vědec izoloval více než 4000 flavonoidů. Byl také tím, kdo objevil vitamín C. Nicméně chemická rozmanitost flavonoidů vylučuje jejich klasifikaci jako jediný vitamin. V padesátých letech devatenáctého století byl oficiálně zaveden pojem flavonoidy a tyto látky byly přesně strukturně charakterizovány. Zahrnoval tedy sloučeniny rostlinných polyfenolů obsahující flavonový skelet. Následně v letech 1940 – 1970 probíhalo intenzivní studium farmakologických účinků flavonoidů a postupně vznikaly různé preparáty jako Venorutin, Iproflavon a další. American Society of Biological Chemists a American Institute of Nutrition v roce 1968 odmítly vitaminovou povahu flavonoidů, doporučily stažení flavonoidních farmak z trhu a navrhly užívání pojmu bioflavonoidy. Od roku 1990 až doposud probíhá tvorba nové databáze flavonoidů a jiných polyfenolů, jakožto nejvýznamnější skupiny chemoprotektivních látek (Winkel-Shirley, 2001; Zloch, 2003; MLAsyle, 2014).

2.6.2 Chemická struktura flavonoidů

Základem chemické struktury všech flavonoidů je patnácti uhlíkatý skelet (2-fenylbenzo- γ -pyran), složený ze dvou benzenových jader A a B, spojený přes heterocyklický tříuhlíkatý pyran (C) jak je vidět na obrázku 7. Tato struktura je výsledkem dvou samostatných biosyntetických drah. Kruh A při syntéze nejčastěji vzniká jako produkt acetátové (polyketidové) dráhy, zatímco kruhy B a C vznikají v dráze šikimátové. Mohou být rozděleny do různých tříd, přičemž se jednotlivé sloučeniny v rámci třídy liší v navázání různých substituentů. Hydroxylové skupiny jsou obvykle přítomny v pozici 4, 5 a 7 ale mohou být nalezeny i v jiné pozici. Většina flavonoidů se v přírodě vyskytuje ve formě glykosidů, kdy se příslušný sacharid většinou pojí na uhlík v poloze

3, 5 nebo 7. Sacharidovou část tvoří nejčastěji glukóza, lze ale najít i flavonoidy substituované galaktózou, xylózou a arabinózou, méně často pak s manózou, fruktózou, kyselinou glukuronovou a galakturonovou (Wolgast et Anklam, 2000; Taiz et Zeiger, 2010; Danihelová et Šturdík, 2011; Kumar et Pandey, 2013).



Obrázek 7: **Základní struktura flavonoidu** (Kumar et Pandey, 2013)

2.6.3 Klasifikace

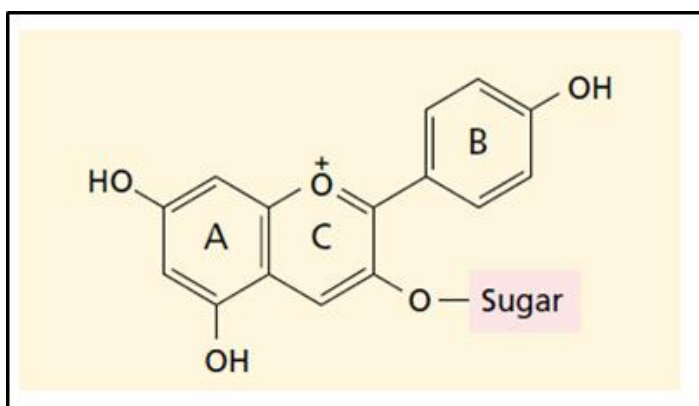
Rozdělení flavonoidů do skupin se u různých autorů liší, což je zapříčiněno úhlem pohledu, dle kterého se snaží látky klasifikovat. Pro tuto práci byla vybrána klasifikace dle Taiz et Zeiger (2010) do čtyř základních skupin:

1. Antokyany a antokyanidiny
2. Flavony
3. Flavonoly
4. Isoflavony (isoflavonoidy)

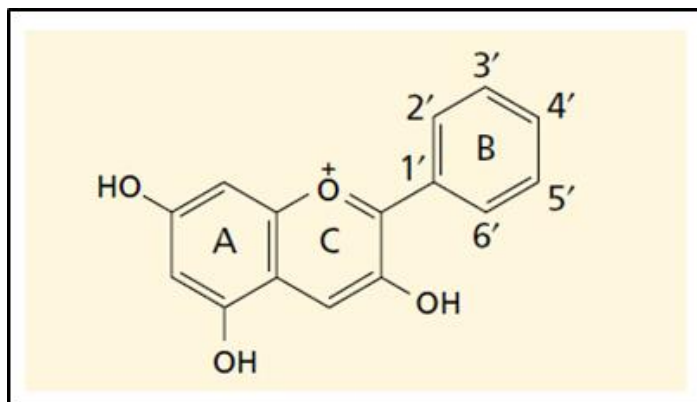
2.6.3.1 Antokyany a antokyanidiny

Při interakci rostlina-živočich, výhodné pro obě strany, mohou být zapojeny i sekundární metabolity. Rostliny lákají živočichy na vizuální a čichové podněty a ti se pak požitím nektaru nebo ovocné dřevě zapojují do roznosu pylu a semen. Karotenoidy a flavonoidy jsou dvě hlavní skupiny barevných pigmentů. Poskytují ale i ochranu rostlin před působení UV záření. Antokyany jsou nejrozšířenější skupinou pigmentů ze skupiny flavonoidů, které jsou odvozené od fenylalaninu, jsou rozpustné ve vodě,

syntetizovány v cytosolu a lokalizovány ve vakuole a vázány na pektiny. Jsou odpovědné za červené, růžové, fialové a modré zbarvení. Specifická barva je dána nejen jejich hodnotou pH a strukturou, kdy se se stoupajícím počtem -OH skupin na postranním fenolovém jádře prohlubuje odstín barvy, ale také přítomností iontů kovů (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Často lze zastihnout různě zbarvené květy na téže rostlině (lecha jarní, plicník lékařský), což je dáno jejich odlišným stářím. Antokyany (Obr. 8) jsou glykosidy, jejichž skelet je substituovaný cukernou složkou. Je-li cukr ve struktuře nepřítomen, jedná se o látky zvané antokyanidiny (Obr.9). (Macholán, 2003; Koplík, 2008; Tanaka, 2008; Taiz et Zeiger, 2010).



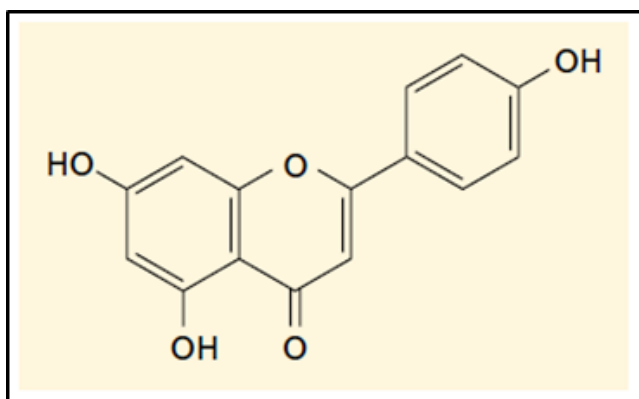
Obrázek 8: **Antokyany** (Taiz et Zeiger, 2010)



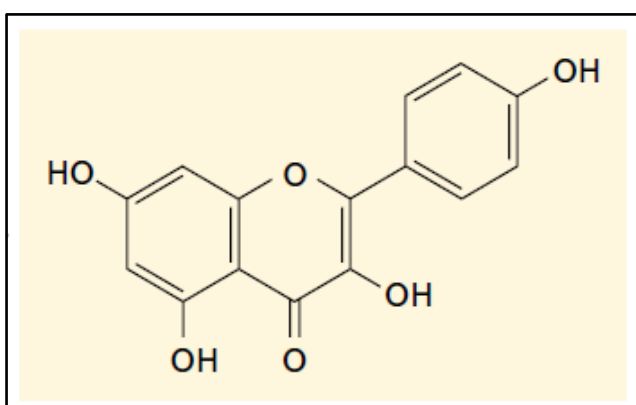
Obrázek 9: **Antokyanidiny** (Taiz et Zeiger, 2010)

2.6.3.2 Flavony a flavonoly

Flavony (Obr. 10) a flavonoly (Obr. 11) jsou další dvě významné skupiny flavonoidů nalezené v květech rostlin. Tyto látky jsou absorbující světlo kratších vlnových délek, které nejsou pro lidské oko viditelné. Hmyz, jako jsou včely, vnímají ultrafialové spektrum barev a dokážou tedy na tyto látky reagovat. Flavonoly často v květu tvoří symetrické vzory, nápadné pro hmyz a jsou jimi vnímány jako určení polohy pylu a nektaru. Tyto sloučeniny nejsou přítomny jen v květech ale i v zelených částech rostlin, kde zajišťují ochranu buněk před nadměrným působením UV záření. Do skupiny flavonů patří například látky apigenin, bajkalein, chrysin, isorhoifolin, luteolin a jiné, a do skupiny flavonolů astragalin, hyperosid, myricetin, kemferol, kvercitrin, kvercetin a rutin (Koplík, 2008; Taiz et Zeiger, 2010).



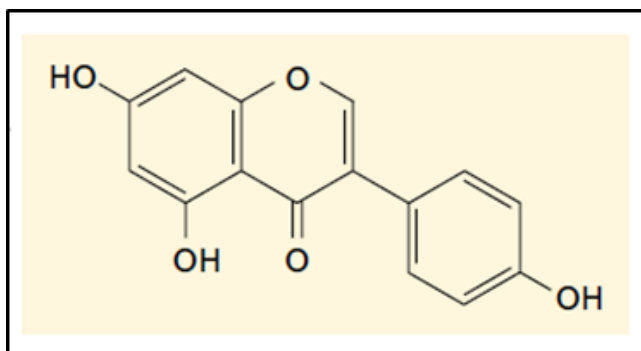
Obrázek 10: **Flavony** (Taiz et Zeiger, 2010)



Obrázek 11: **Flavonoly** (Taiz et Zeiger, 2010)

2.6.3.3 Isoflavony (isoflavonoidy)

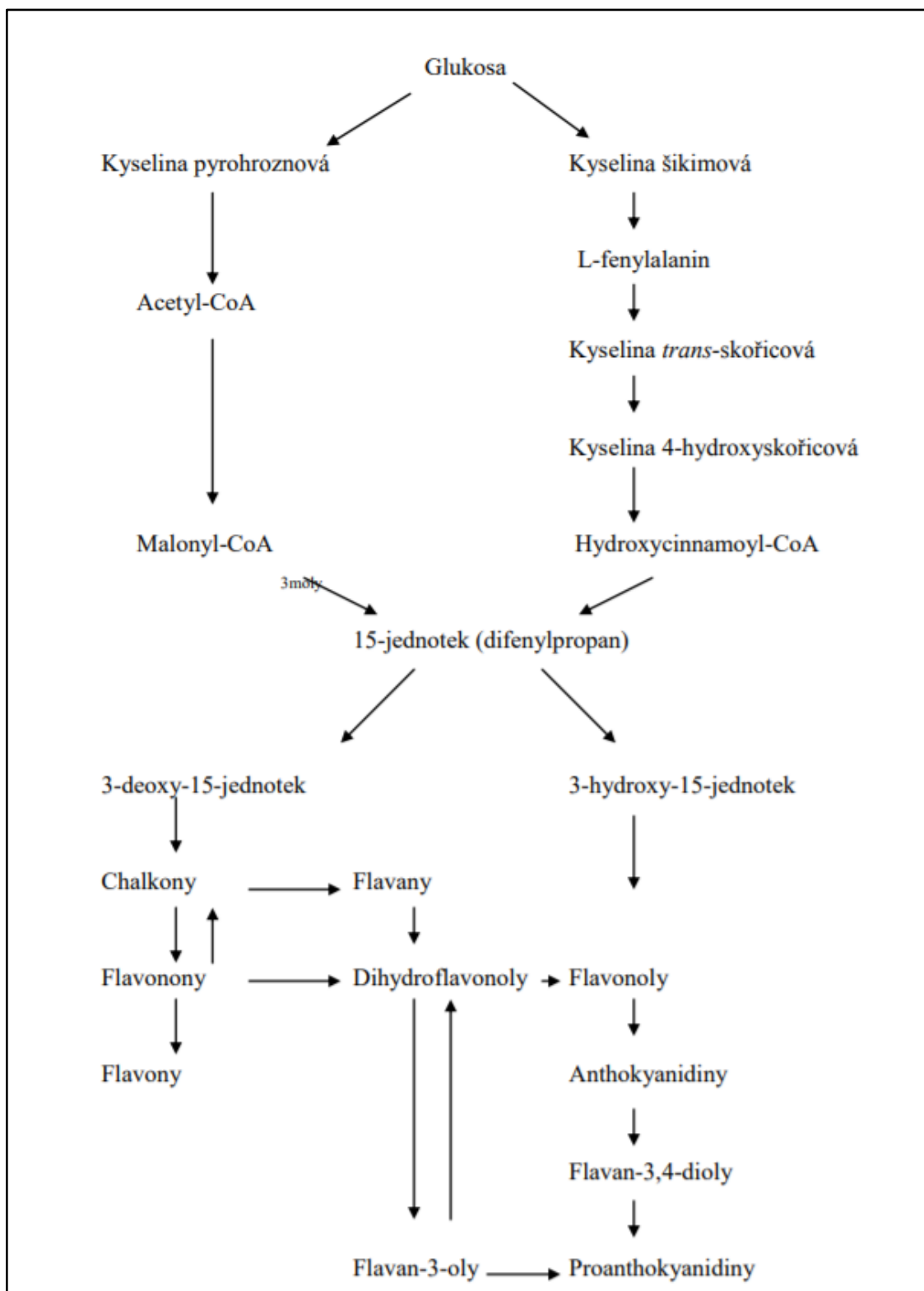
Isoflavony (isoflavonoidy) jsou skupinou flavonoidů, v jejichž skeletu je poloha aromatického kruhu (B) posunuta (Obr. 12). Existuje asi 629 známých struktur a z toho je popsáno okolo 364 aglykonů. Jsou zastoupeny v rostlinné říši v menší míře než ostatní flavonoidy. Tato skutečnost je potvrzena faktem, že jsou tyto látky zastoupeny v omezeném počtu čeledí. Nacházejí se v čeledi *Fabaceae* a *Viciaceae*. V menší míře se vyskytují i v čeledi *Papilionaceae*, *Iridaceae*, *Myristicaceae*, *Amaranthaceae* a *Rosaceae*. Jsou významnými antioxidanty, protože obsahují ve své struktuře hydroxylové skupiny, které snadno poskytují vodík volným radikálům. Některé mají insekticidní účinky, jiné mají anti-estrogenní účinky. Například ovce, spásající jetel bohatý na isoflavonoidy, často trpí neplodností. V posledních letech se staly tyto látky známější pro svou roli tzv. fytoalexinů. Jsou to sloučeniny s antimikrobiálními účinky, které jsou syntetizovány zejména v boji při napadení rostlin bakteriemi nebo plísněmi. Lze sem zařadit látky daidzein, formononetin, biochanin A, genistein a glycitein jakožto i jejich glykosidy daidzin, genistin, ononin a sissostein (Klejdus et al., 2003; Koplík, 2008; Hanganu et al, 2010; Taiz et Zeiger, 2010).



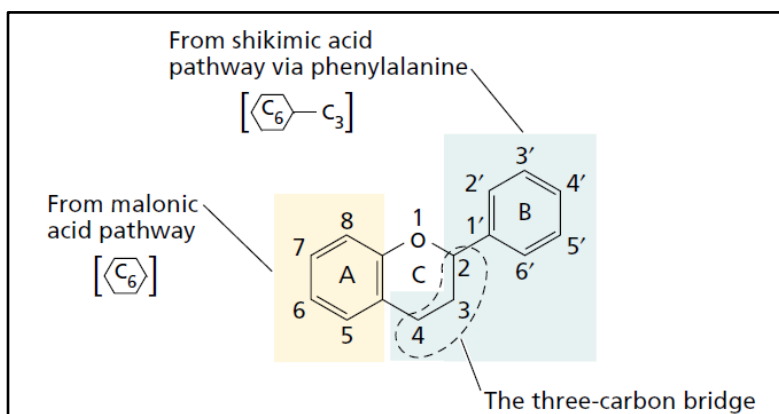
Obrázek 12: **Isoflavon** (isoflavonoid) (Taiz et Zeiger, 2010)

2.6.4 Biosyntéza flavonoidů

Rostlinné fenoly se biosyntetizují několika různými způsoby a tvoří z metabolického hlediska heterogenní skupinu. Biosyntéza flavonoidů (Obr. 13) probíhá dvěma primárními syntetickými dráhami, kterými je dráha šikimátová a acetátová, někdy také zvaná polyketidová nebo malonová. Kyselina šikimová se účastní biosyntézy většiny rostlinných fenolů. Dráha malonové kyseliny, ačkoli je důležitým zdrojem fenolických sekundárních produktů v houbách a bakteriích, má menší význam ve vyšších rostlinách. Výchozí sloučeninou obou drah je glukóza. Kyselina octová ve své aktivní formě jako acetyl-CoA, později pak jako malonyl-CoA, se může přeměnit primární cestou na mastné kyseliny nebo se může stát výchozí látkou pro sekundární cestu, kde dochází k syntéze kruhu A ve struktuře flavonoidů. Produkty primární šikimátové dráhy vedou ke vzniku aromatických aminokyselin (např. fenylalaninu, tyrosinu, tryptofanu), a produkty sekundární šikimátové dráhy vedou k vzniku fenylpropanu. Jedním z meziproductů cesty je kyselina šikimová, která dala název celé této reakci. Známý širokospektrální herbicid glyfosát (komerčně dostupný jako Roundup) zabíjí rostliny blokováním kroků této dráhy. Kyselina šikimová je přítomna v rostlinách, houbách a bakteriích, ale není u zvířat. Zvířata nemají možnost syntetizovat tři aromatické aminokyseliny kterými je již zmiňovaný fenylalanin, tyrosin a tryptofan. Proto jsou základními živinami ve výživě zvířat. Nejhojnější třídy sekundárních fenolických sloučenin v rostlinách jsou odvozeny od fenylalaninu odstraněním molekuly amoniaku za vzniku kyseliny skořicové. Tato reakce je katalyzována fenylalanin amoniak lyázou (PAL), což je možná nejvíce studovaný enzym v sekundárním metabolismu rostlin. PAL je umístěn v místě mezi primárním a sekundárním metabolismem, takže reakce, kterou katalyzuje, je důležitým regulačním krokem při tvorbě mnoha fenolických sloučenin. Aktivita PAL je zvýšena faktory prostředí, jako jsou nízká hladina živin, světlo a houbové infekce. Fenylpropanová dráha, běžně se vyskytující ve vyšších rostlinách, je základem syntetických drah vedoucích ke vzniku mnoha látek a mj. i flavonoidů. Tato cesta je pravděpodobně nezbytná pro přežití suchozemských rostlin, neboť rostlinná složka, jako je lignin, hraje důležitou mechanickou a strukturní roli. Podobně jako kruh A jsou kruhy B a C odvozeny z metabolismu glukózy, vznikají však dráhou šikimátovou (Obr. 14) (Wolgast et Anklam, 2000; Taiz et Zeiger, 2010).



Obrázek 13: Schéma biosyntézy flavonoidů (dle Rice-Evans et al., 1996; Wollgast a Anklam, 2000)



Obrázek 14: Vznik základní struktury flavonoidů (Taiz et Zeiger, 2010)

2.6.5 Fenoly a flavonoidy v obraně proti fytofágnímu hmyzu

Fytofágní hmyz má velmi úzkou potravní vazbu na hostitelskou rostlinu. Insekticidní aktivita flavonoidů má různé mechanismy, jakými brání rostlinu před fytofágním hmyzem. Metabolity mohou hmyz odstrašit, mohou působit jako inhibitory trávení, nebo mohou působit toxicky a zavinit úmrtí jedince. Flavonoidy rozpustné v tucích na listech tvoří fenolové pryskyřice, které odrazují hmyz a můžou se vázat s rostlinnými proteiny za vzniku tříslovin (taniny), které mají trpkou chuť a pro herbivory jsou nechutné (Andersen et Markham, 2006; Špryňar et Strejček, 2012). Na druhou stranu specializovaný hmyz je schopný flavonoidy detoxikovat, nebo je dokonce využít ve svůj prospěch a např. je inkorporovat do své kutikuly nebo hemolymfy jako obranu před predátory. Při studii herbivorie na podzemnici olejné (*Arachis hypogaea*) bylo dokázáno, že flavonol kvercetin a jeho glykosid spolu ve spojení mají vliv na úmrtnost larev blyškavky druhu *Spodoptera litura*. Hostitelské druhy nejsou rezistentní vůči působení flavonolů této podzemnice olejné, jsou však odolné k flavonolům volně žijícího druhu podzemnice *Arachis Kempff-mercadoi*. Experimenty odhalily pozitivní korelaci mezi obsahem flavonolů rostlin a úmrtností larev těchto dvou navzájem si příbuzných druhů rostlin (Treutter, 2005).

Existuje další řada příkladů, kdy se fenolické látky podílejí na obraně rostlin proti fytofágnímu hmyzu. Pšeničné kultivary obsahující fenoly jsou mnohem méně atraktivní pro mšici střežchovou (*Rhopalosiphum padi*). Vrby drsnokvěté (*Salix dasyclados*), které obsahovaly třikrát méně fenolických látek než kontrolní rostliny, byly výrazně

atraktivnější pro býložravého brouka bázlivce čárkovaného (*Galerucella lineola*). Listy jahodníku (*Fragaria sp.*) obsahují fenolické látky založené na katecholu, které poskytují odolnost vůči svilušce chmelové (*Tetranychus urticae*), protože fenoly se kovalentně váží na trávicí enzymy svilušky a inaktivují je (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Na základě studia obranných mechanismů rostlin před škůdci byly provedeny testy aplikované na lilek (*Solanum melongena L.*) a škůdce druhu *Leucinodes orbonalis G.* Vše bylo porovnáno s kontrolní nenapadenou rostlinou. Produkce flavonoidů a fenolických látek obecně se zvýšila u napadených rostlin a byla pozorována jejich role v odolnosti rostlin. Kyselina gallová, kyselina kávová, kyselina hydroxybenzoová, kyselina chlorbenzoová, epikatechin a obsah kyseliny vanilinové se zkvantifikoval, jen obsah kyseliny chlorogenové se snížil. Spolu s těmito fenolickými látkami bylo rovněž nalezeno dalších 8 neidentifikovaných fenolů. Dále se značně zvýšilo množství celkových antioxidantů v napadených rostlinách. Bylo tedy prokázáno, že oxidační poškození v důsledku požití škůdci vedlo ke zvýšené produkci fenolických látek a enzymů, které hrají hlavní roli v obraně rostlin (Prasannalaxmi et Rani, 2016).

Isoflavonoidy se vyskytují s rostlinách jako látky konstituční nebo se objevují následkem působení stresu či za obou okolností. Plní určité funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti poškození semen, infekci ale i proti napadení hmyzem a poškození škůdci (Klejduš et al. 2003). Jeden z nejznámějších a komerčně hodnotných flavonoidních insekticidů je rotenoidní skupina isoflavonoidů, zejména rotenon. Tato sloučenina je přítomna v kořenech a nadzemních částech mnoha tropických druhů bobovitých rostlin (*Fabaceae*), včetně rostlin rodu kožnatec (*Derris sp.*), lonchkar (*Lonchocarpus sp.*), koželusk (*Tephrosia sp.*). Rotenon chrání rostlinu před širokým spektrem škůdců, včetně brouků, housenek a mšic. Metabolit působí tak, že specificky inhibuje dehydrogenázu NADH, potřebnou v mitochondriálním dýchacím řetězci (Andersen et Markham, 2006).

2.7 Rostliny z čeledi *Brassicaceae* a jejich hlavní škůdci

Brukvovité (*Brassicaceae*) je velká čeleď vyšších dvouděložných rostlin z řádu brukvotvarých (*Brassicales*). Celosvětově zahrnují 375 rodů a více než 3200 druhů a jsou bohatě zastoupeny i v květeně České republiky. Jsou to byliny většinou s drobnými květy se čtyřmi kališními a korunními lístky, dvěma tyčinkami s kratšími nitkami ve vnějším kruhu a čtyřmi tyčinkami ve vnitřním kruhu s delšími nitkami a jedním dvouploidolistovým pestíkem s nepravou placentární přehrádkou, dozrávajícím v šešuli nebo v šešulku (Rosypal et al. 2003). Čeleď zahrnuje významné zemědělské plodiny, jako jsou zelí, kapusta, květák, ředkev, růžičková kapusta, hořčice, brokolice, pekingské zelí, křen, řepka aj. Brukev zelná (*Brassica oleracea*) je dvouletá bylina pocházející ze Středozeší a pěstuje se v mnoha variantách, jako kedluben, květák, zelí a dalších. Křen selský (*Armoracia rusticana*) je vytrvalá bylina pocházející také ze Středozeší, s válcovitým kořenem a velkými celistvými vroubkovanými listy. Řepka olejka (*Brassica napus*) se pěstuje zejména pro olejnatá semena. Jako krmivo se pěstují další odrůdy brukve, a to tuřín a vodnice. Některé druhy jsou pěstovány jako okrasné rostliny i skalničky a mají význam také v přírodní medicíně. Mnoho z nich patří mezi plevele. Z plevelných a rumištních druhů je hojný penízeček rolní (*Thlaspi arvense*), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa – pastoris*) a plevel, který je významným objektem genetických a dalších studií huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Archeologické důkazy o významu této čeledi pochází z roku 5000 př.n.l. a jsou považovány za nejstarší pěstované rostliny známých v té době lidem, jak napovídají písemné záznamy datující se od cca. 1500 př.n.l. (Rosypal et al. 2003; Ahuja et al., 2010; Grulich, 2012).

2.7.1 Významní hmyzí škůdci *Brassicales*

Hmyz je považován za škůdce, pokud ohrozí lidské zdraví jako parazit nebo přenašeč chorob a dále jako ničitel staveb (termiti) nebo škůdce na zemědělských plodinách. Škůdci ovlivňují produkci brukvovitých plodin po celém světě. Hlavní zástupci hmyzu napadajících brukvovité plodiny po celém světě a ovlivňující zásadním způsobem jejich produkci, jsou znázorněny na obrázku 15.

Lepidoptera (motýli)

Zápředníček polní (*Plutella xylostella*) je drobný motýl rozšířen po celém světě všude tam, kde se pěstují brukvovité plodiny. Housenky se v porostech zdržují na spodní straně. Malé housenky skeletují listy (pokožka zůstává zachována) a starší housenky se přesouvají na mladé křehké listy a u zelí také dovnitř hlávek. Při větším počtu housenek na 1 rostlinu ožerou celé listy s výjimkou silnějších žebek. Žír housenek může narušit tvorbu hlávky u zelí, květáku a brokolice. V některých případech ztráta výnosu plodin činí téměř 90 % (Ahuja et al, 2010; Kovaříková et al., 2017). Kovolessklec cizokrajný (*Trichoplusia ni*) se živí různými druhy rostlin a je důležitým škůdcem na brukvovitých plodinách. Často napadají brokolici, květák, zelí, kapustu a hořčici. Larvy se živí listím a měkkými nadzemními částmi a způsobují nepravidelné otvory. Můra zelná (*Mamestra brassicae*) je důležitým škůdcem na kapustách a můra druhu *Mamestra configurata* je škůdce olejnatých semen a řepky olejky. Mladé larvy se živí na spodní straně listů a zanechávají za sebou nepravidelně tvarované otvory. Bělásci druhu *Pieris brassicae*, *Pieris rapae* a *Pieris napi* se specializují na rod *Brassicaceae* a jsou modelovými druhy v oblasti biologie hmyzích škůdců. *P. brassicae* je považován za škůdce na brukvovitých rostlinách jak na polích, tak v zahradách. Poškození listů způsobené *P. rapae* je mírné, avšak situace může být vážná v období, kdy dojde k přemnožení housenek. *P. napi* larvy se živí především divokými druhy rostlin, ale může způsobit i významné ztráty na zemědělských plodinách (Ahuja, 2010).

Hymenoptera (blanokřídli)

Pilatka řepková (*Athalia rosae*) se živí mnoha druhy rostlin. Hostitelskými rostlinami jsou kromě řepky také četné kulturní druhy jako řepice, hořčice, vodnice, tuřín, ředkev olejná a plané druhy, jako jsou ohnice, hořčice rolní, peníze rolní a hulevník lékařský. Na mladých rostlinách způsobují mladé housenice postupně ze spodní strany listů okénkování a dírkování, starší housenice boční žír až holožír. Imaga neškodí (Kazda et al., 2008; Ahuja et al, 2010).

Diptera (dvoukřídli)

Květilka zelná (*Delia radicum*) a moucha druhu *Delia floralis* jsou považovány za ekonomicky významné škůdce brokolice, zelí a dalších. Larvy způsobují větší či menší škody na rostlinách prostřednictvím požíráání kořenového systému rostlin. Poškozené

kořeny bývají následně napadány bakteriální nebo houbovou infekcí. Míra úmrtnosti rostlin je neobvykle vysoká. Samičky bejloalky kapustové (*Dasineura brassicae*) kladou vajíčka do malých šesulí, kde dojde k vylíhnutí larev. Larvy enzymaticky rozpouští stěnu šesule. Natrávený obsah následně vysávají (Kazda et al., 2008; Ahuja et al, 2010; Rotrekl et Kolařík, 2011).



Obrázek 15: Hlavní hmyzí škůdci, kteří napadají rostliny *Brassicaceae* na celém světě (Ahuja, 2010)

Homoptera (stejnokřídli)

Mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*), mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) a mšice trýzelová (*Lipaphis erysimi*) jsou významnými škůdci v zahradnictví, a to jak na poli, tak i ve sklenících. Po většinu roku jsou v populaci pouze samičky a ty se množí partenogeneticky. Až v podzimní populaci mšic se objevují samečkové a ti se páří se samičkami. Tito škůdci škodí sáním vody a živin z floému z podzemních i nadzemních částí rostlin. Sání způsobuje zakrslý růst, kadeření, svinování čepelí a změny ve zbarvení listů. Napadení mšicemi může vést až k 75% ztrátě výnosu plodin (Ahuja et al, 2010; Bohdalová, 2016).

Coleoptera (Brouci)

Mezi brouky škodících na brukvovitých plodinách patří dřepčící rodu *Phyllotreta* a *Psylliodes*, blískáček (*Meligethes*) a krytonosec (*Ceutorhynchus*). Krytonosec zelný (*Ceutorhynchus assimilis*) škodí na řepce olejce a způsobuje snížený výnos v těžce zamořených polích. Jedná se o oligofágní hmyz, vyvíjí se na druzích brukvovitých rostlin. Dospělci vyžírají na listech drobné otvory a nezpůsobují větší škody. Samice kladou vajíčka jednotlivě do drobných jamek, které vyhloubily noscem na kořenovém krčku nebo hlavním kořenu. Žír larev způsobuje vznik polokulovitých nebo kulovitých nádorů. Dorostlé larvy opouštějí hálky a kuklí se v hliněném kokonu v půdě (Kazda et al., 2008; Ahuja et al, 2010).

Dospělci blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) nakusují ještě před květem poupata řepky, aby se dostali k pylu. Nakousaná poupata jsou v celém květenství nepravidelně rozmístěna. Důsledkem je nepravidelné nasazení květů, případně šešulí. Larvy se živí pylem a prakticky neškodí. Vylíhlí brouci se opět živí pylem (mohou škodit na semenných porostech brukvovité zeleniny). Blýskáček patří mezi nejdůležitější škůdce řepky. V 80. a 90. letech minulého století byli dospělci nejzávažnější škůdci ozimé řepky. Největší škody způsobují za chladného počasí v období před květem, kdy řepka pomalu rozkvétá. Každoročně se proti němu ošetřuje 70 – 80 % ploch. Velké škody způsobuje i v současnosti na porostech jarní řepky – v mimořádných případech mohou ztráty na výnosech dosáhnout až 80 % (Kazda et al., 2008; Ahuja et al, 2010).

Dřepčící jsou malí brouci, většinou 1,9–3,5 mm dlouzí, tělo mají dopředu zúžené, kapkovitého tvaru. Tykadla jsou dlouhá nitkovitá, mají velmi silné zadní nohy a dokáží

skákat až metr daleko. Tento brouk přezimuje ve spadném listí a škodí na brukvovité zelenině, ředkvičkách, ředkvích, křenu, kapustě, kedlubnech, ale mohou škodit i na balkónových rostlinách (Řehořová, 2007). Z několika druhů dřepčků rodu *Phyllotreta* se nejčastěji objevují na podzim dřepčik černý (*Phyllotreta atra*) a dřepčik černoohý (*Phyllotreta nigripes*). Dřepčik černý je jako dospělý brouk dlouhý 1,7 – 2,6 mm, horní a spodní strana těla je černá. Krovky a štít jsou hrubě tečkované. Druhý a třetí článek tykadel je žlutočervený, první článek je tmavší a zbylé články jsou černé a končetiny jsou hnědavé až černé barvy. Dřepčik černoohý dosahuje délky 1,8 – 2,5 mm, horní strana těla je kovově modrá, modrozelená a výjimečně může být i černá. Krovky jsou hedvábně lesklé, hustě a silně nepravidelně tečkované. Štít je více bronzový než krovky a směrem k hlavě se zúžuje. Končetiny i tykadla jsou hnědavé až černé barvy. Na jarní řepce kromě těchto dvou druhů se přidávají ještě dřepčik polní (*Phyllotreta undulata*) a dřepčik zelný (*Phyllotreta nemorum*). Dřepčik polní je 1,8 – 2,5 mm dlouhý jako dospělec, horní strana těla je černá a na krovkách jsou patrné dva podélné žluté proužky. Ty jsou výrazně zahnuty dovnitř k vrcholu krovek i k jejich bázi a mírně rozšířeny ve výši středního páru nohou. První čtyři články tykadel jsou žlutočervené a zbylé černé. Chodidla všech končetin jsou žlutočervená. Dřepčik zelný v dospělosti dosahuje délky 2,4 – 3,1 mm, horní strana těla je černá a štít je s modravým nebo bronzovým odleskem. Na krovkách jsou patrné dva úzké podélné žluté pruhy, které jsou u báze mírně zahnuty dovnitř a u vrcholu zahnuté silněji. Holeně a chodidla jsou u všech končetin žluté. První tři články tykadel jsou žluté barvy a zbylé články jsou barvy černé (Anonymous, 2018). Dospělci ožírají klíčními rostlinkám děložní lístky, tím rostliny nevzcházejí. U vzešlých rostlin vyžirají do listů mělké jamky nebo malé dírky. Lísty někdy mohou být hustě proděravělé. Na jaře se vyskytují především na brukvovité zelenině nebo jarní řepce a dalších brukvovitých plodinách. Larvy se živí většinou kořínky v půdě a nezpůsobují škody. Jen u dřepčika zelného larvy minují v listech, ale způsobené škody nejsou velké. Dřepčici se mohou vyskytnout v mimořádně velkém množství. Dřepčik olejkový, nebo také zlatohlavý (*Psylliodes chrysocephala*) měří 3 – 4,6 mm v dospělosti a patří k našim největším dřepčikům. Horní strana těla je tmavě kovově modrá a jen přední část hlavy je do červena. Krovky jsou hluboce pravidelně tečkované. Stehna předních a středních končetin jsou žlutá a zadních končetin černá nebo kovově modrá. Holeně a chodidla jsou u všech končetin žlutá. Tento brouk škodí perforací listů řepky podobně jako ostatní druhy dřepčků, ale obvykle až koncem září a v říjnu. Podzimní škody způsobené brouky nejsou příliš významné. Larvy se zavrtávají

do řapíků, které prožirají. Poškození rostlin larvami zvyšuje nebezpečí poškození houbovými chorobami (Kazda et al., 2008; Ahuja et al, 2010; Anonymous, 2018).

Hodnocení výskytu hmyzích škůdců a posuzování jejich početnosti je velmi důležité pro rozhodování se k použití chemických přípravků k ochraně pěstované plodiny. Při aplikaci chemických přípravků, kterými si zemědělec pojišťuje případné škody na výnosu, by se měl brát v úvahu stupeň napadení, početnost škůdce apod., protože díky neuváženému používání přípravků může dojít k rychlejšímu vzniku rezistence k účinným látkám. U řady škůdců jsou v současné době stanoveny jejich prahy škodlivosti i metoda monitoringu, které určují nutnost jejich regulace. U dřepčků rodu *Phyllotreta* se hodnotí požerky na děložních a prvních pravých listech rostlin. Za práh škodlivosti se počítá ztráta 10 % listové plochy. Požerky u dřepčika olejkového se hodnotí do čtyř pravých listů společně s dřepčiky rodu *Phyllotreta* a pak se hodnotí napadení na podzim a brzy zjara. Zde se využívá metoda žlutých misek a vizuální sledování požerků a počtu brouků, také vizuálně nebo smýkáním. Práh škodlivost je při vzcházení a na podzim dán ztrátou 10 % listové plochy a zjištění jednoho až třech brouků na jeden metr řádků či sto brouků ve třech žlutých miskách za jeden den. Brzy na jaře je to jedna až dvě larvy na jednu rostlinu (Rotrekl, 2013).

Preventivním opatřením proti dřepčíkům může být podpora jejich přirozených nepřátel, jakými jsou například střevlíci, drabčící, parazitické vosičky nebo rejsci. Další možností je raný výsev na jaře, údržba vlhké půdy pravidelným zaléváním a nastýláním, a zároveň časté kypření, protože významným problémem je teplé a suché počasí v době, kdy rostliny vzcházejí. Toto dřepčíkům vyhovuje a zvyšuje se tak nebezpečí poškození porostů. Porosty plodiny se dají chránit jemnými sítěmi proti hmyzu nebo textiliemi. Lze i smísit kulturu se špenátem a salátem. Přímou ochranou je metoda „protřepávání“ rostlin smetákem nebo rukama, brouci prchají a zčásti se již nevrátí. Dále je možný odchyt pomocí lepových pastí nebo pravidelný postřik odvarem z pelyňku nebo vrtiče. Základem pro zabránění škod, způsobené dřepčiky je v současné době setí mořeného osiva (Anonymous, 2009, 2018).

3 Metodika experimentu

Pro tuto experimentální práci byl zvolen jeden krátkodobý pokus v délce jednoho vegetačního období. Byl sledován vliv fytofágního brouka dřepčíka rodu *Phyllotreta* ve dvou různých intenzitách napadení rostlin čeledi *Brassicaceae*. Pozornost byla věnována obranným mechanismům proti napadení, zejména produkce sekundárních metabolitů a projevům poukazujícím na rostlinný stres v podobě zvýšení aktivních forem kyslíku v těle rostlin.

3.1 Materiál

Rostlinný materiál

Pro experiment byl vybrán rostlinný materiál druhu zelí hlávkové bílé (*Brassica oleracea convar. capitata var. alba*) patřící do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Zelí bílé bylo zaseto 10. června do výsevních misek. Přibližně po dvou týdnech byly mladé rostlinky přesazeny do větších sadbovačů. Rozměr jednotlivých komůrek sadbovače byl 5 x 5 x 5 cm. Jako půda byla zvolena běžná zahradní zemina, univerzální substrát a agroperlit v poměru 2 : 2 : 1. Rostliny byly pravidelně zalévány kohoutkovou a destilovanou vodou v poměru 1 : 1. Kultivace probíhala v pěstební komoře Fytotron při 15ti hodinové fotoperiodě přičemž denní teplota činila 22 °C a noční 17 °C.

Živočišný materiál

Živočišný materiál zahrnoval fytofágní brouky dřepčíky rodu *Phyllotreta*. Jedná se o brouky poškozující rostliny okusem. Odchyt škůdců umožnilo na svých polích družstvo Agrospol Bolehošť (viz. obrázek 16). Sběr dřepčičů probíhal pomocí exhaustoru, který nám umožnil nalezeného brouka nasát do komory v počtu potřebném k experimentu. Komora byla následně vyprázdněna do připravených boxů s rostlinami.



Obrázek 16: **Odchyt škůdců na poli družstva Agrospol Bolehošť** (foto Kuchtíčková, 2017)

3.2 Příprava experimentu

Všechny rostliny měly vyvinuté listy, některé byly zelené, jiné nažloutlé. Škůdci byli spolu s rostlinami umístěni 17. července do průhledných plastových boxů o objemu 29 litrů, vybavených větracími sítkami a zálivkovou hadičkou. Na dno každého boxu byla nasypána vrstva agropertitu, aby nedošlo k utonutí škůdců (Obr.17). Celkem pokus zahrnoval 9 pěstebních boxů a v každém z nich bylo umístěno 8 rostlin v sadbovači. Ve 3 pěstebních boxech byly kontrolní rostliny bez jakéhokoliv vlivu herbivorů, v šesti boxech byli umístěni škůdci a to tak, že ve 3 boxech byly rostliny napadeny 50ti brouky na box (slabší napadení) a ve zbylých 3 bylo umístěno 100 brouků na box (silnější napadení). Po 4 dnech následoval odběr rostlinného materiálu z kontrolních boxů a boxů napadených rostlin škůdci. Listy rostlin vykazovaly poškození typické pro napadení brouky rodu *Phyllotreta*, kteří u vzešlých rostlin vyžírají do listů mělké jamky nebo malé dírky. Listy byly místy hustě proděravělé, jak lze vidět na obrázku 18.



Obrázek 17: **Boxy připravené s rostlinami a škůdci k experimentu** (foto Kuchtíčková, 2017)



Obrázek 18: **Žír dřepčků na listech rostlin** (foto Kuchtíčková, 2017)

3.3 Statistické zpracování dat

Výsledný protokol obsahoval koncentrace superoxidu v $\mu\text{g/g}$ FW (čerstvá hmotnost), peroxidu v $\mu\text{mol/g}$ FW, fenolických látek (i konkrétních fenolických kyselin), flavonoidů v mg/g FW a kyseliny salicylové v ng/g DW (suchá hmotnost) u všech variant pokusu. Ze získaných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a standardní chyba průměru. V programu Excel (Microsoft, USA) byla data přehledně zpracována do tabulek a grafů. Data byla dále statisticky zpracována pomocí analýzy rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance), jež je založena na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných výběrových souborů, a to na hladině významnosti, jež byla stanovena na 5% ($p = 0,05$). Pokud byla hodnota p nižší než 0,05, znamená to, že byly mezi hodnotami průkazné rozdíly. Tyto rozdíly mohou být pouze mezi naměřenými hodnotami uvnitř konkrétní varianty, nebo mezi variantami navzájem. Toto lze odhalit za pomoci Tukeyho testu, který se hodí při porovnávání stejně početných výběrů. Bylo to tedy provedeno tak, že byla analyzována data každého metabolitu ve všech variantách a následně byly zjišťovány rozdíly mezi jednotlivými variantami. Dále byla provedena regresní analýza přibližující vztah mezi jednotlivými metabolity.

3.4 Analýza vzorků

3.4.1 Použité chemikálie a přístroje

Chemikálie a roztoky:

Fosfátový pufr (K_2HPO_4 a KH_2PO_4 v poměru 1:1)

Hydroxylamin

Sulfanylamid

Naftylamin

Diethylether

Chlorid titaničitý - TiCl_4

Methanol (75 %, 80 %)

Uhličitan sodný - Na_2CO_3 (2 %)

Folin-Ciocalteuovo činidlo

Chlorid hlinitý - AlCl_3 (2 %)

Přístroje:

Analytické váhy

Blokový ohřívač

Centrifuga

Spektrofotometr

Sestava HPLC

Sušárna

Třepačka

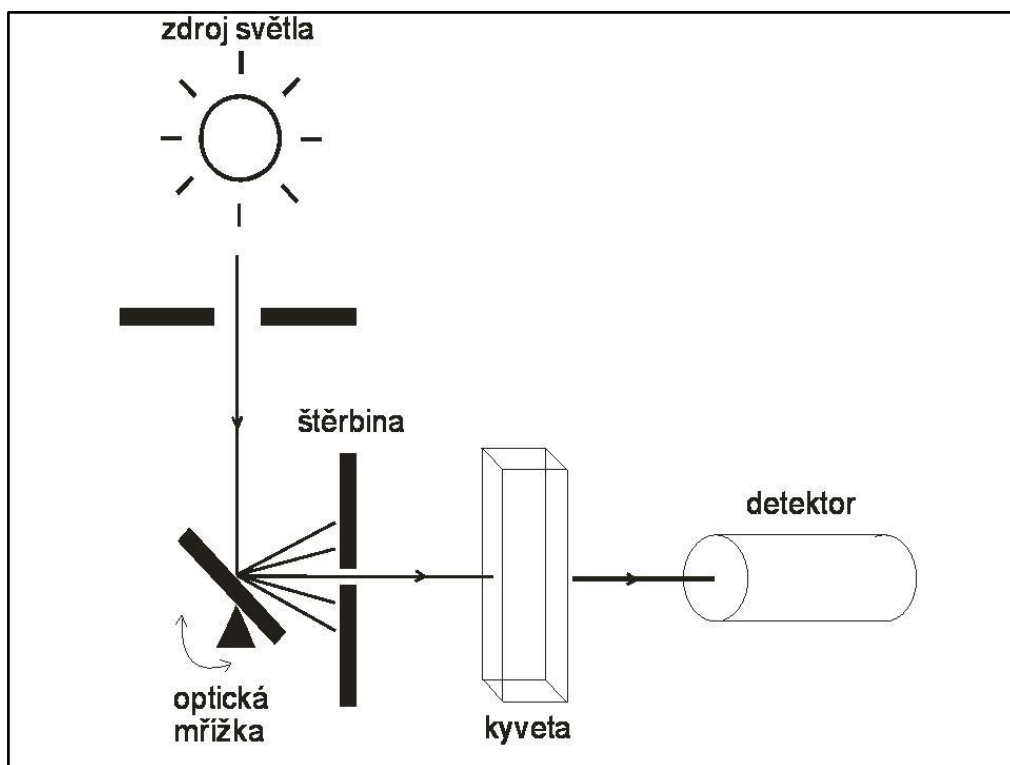
3.4.2 Principy a postupy použitých analytických metod

Superoxidový radikál a peroxid vodíku, dále fenolické látky (i konkrétní fenolické kyseliny) a flavonoidy byly stanoveny spektrofotometricky z čerstvého rostlinného materiálu a kyselina salicylová byla analyzována v sušině vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) podle Petruš'ova' et al. (2014).

Spektrofotometrické měření

Fotometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá absorpci látek ve viditelném spektru elektromagnetického záření. Fotometricky je měřeno zeslabování intenzity toku světelného paprsku kyvetou, uvnitř které je vzorek. Podle způsobu detekce lze rozlišit metodu subjektivní a objektivní. V případě subjektivní metody se pracuje s viditelným zářením a detektorem je lidské oko a v případě objektivní metody je detektorem přístroj, tzv. fotometr. Spektrofotometrie je objektivní fotometrickou metodou, pracující s viditelným nebo UV zářením. Pomocí přístroje lze změřit záření, které vzorek pohltí. Měřeními jsou získána absorpční spektra, která jsou graficky vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce. Absorpcí elektromagnetického záření molekulou dochází ke změně elektronového stavu látky. Pomocí matematicko – fyzikální rovnice plynoucí z Lambertova–Beerova zákona lze popsat závislost absorbance na koncentraci a tloušťce kyvety. Absorpční (extinkční) koeficient vyjadřuje schopnost látky absorbovat světlo, respektive elektromagnetické záření a je pro dané látky charakteristický. (Hejsková, 2016). Spektrofotometr se skládá ze zdroje záření, čímž může být halogenová žárovka, žárovka s wolframovým vláknem, xenonová lampa, vodíková výbojka, deuteriová výbojka, laser. Dále monochromátoru, jde o interferenční filtr, disperzní hranol nebo mřížku, a prostoru, do kterého lze umístit kyvetu se vzorkem a

detektoru. Schéma je zobrazeno na obrázku 19. Vyhodnocujícím zařízením je počítač zobrazující hodnoty měřených absorbancí.

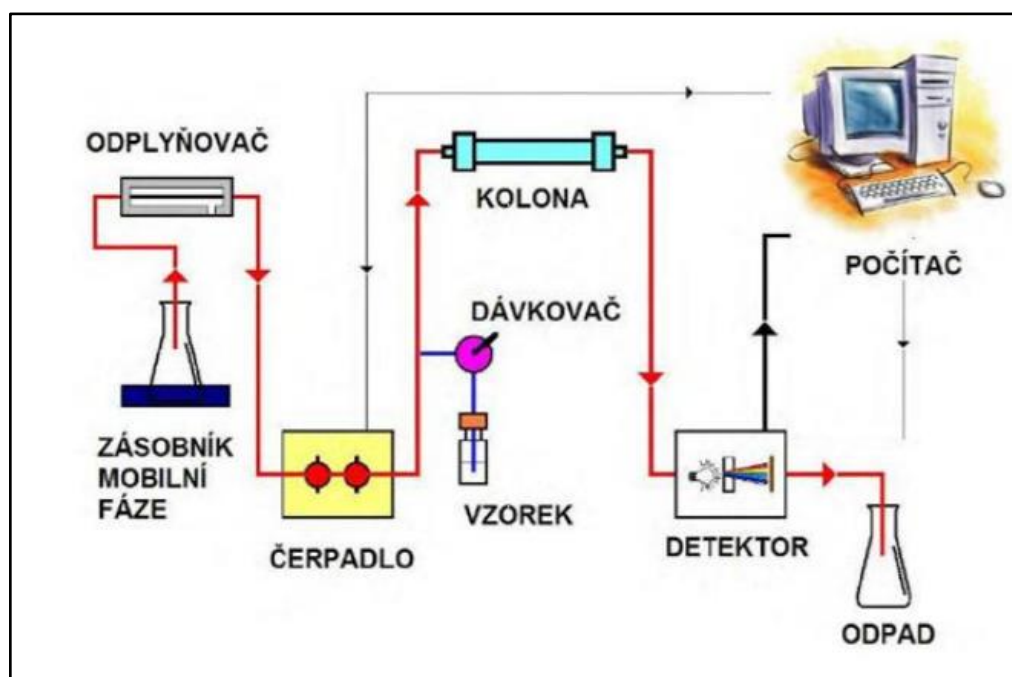


Obrázek 19: Schéma uspořádání spektrofotometru (Anonymous)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) je definována jako fyzikálně-chemická metoda, založená na distribuci látek mezi tzv. stacionární (SF) a mobilní fází (MF). Stacionární fáze bývá tuhá látka nebo kapalina, ukotvená na tuhém nosiči, zatímco mobilní fáze je tvořena výhradně tekutinou. Stacionární fáze je umístěna v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze hnaná pomocí vysokotlakého čerpadla v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Na fázovém rozhraní mezi SF a MF dochází k opakovanému dynamickému procesu sorpce a desorpce stanovovaných látek, který je pro každou látku charakterizován tzv. distribuční konstantou (KD). Distribuční konstanta udává poměr rovnovážné koncentrace látky strávené ve stacionární fázi k rovnovážné koncentraci látky strávené v mobilní fázi. Pro rozdělení dvou látek je potřeba, aby se jejich distribuční konstanty dostatečně lišily. Schéma kapalinového chromatografu si lze prohlédnout na obrázku

20. Mobilní fáze je podle potřeby smíchána z vodné a organické složky. Pomocí vysokotlakého čerpadla je přiváděna na kolonu. Mezi čerpadlem a kolonou je umístěno zařízení které dávkuje vzorek. Z něho je vzorek proudem mobilní fáze unášen na kolonu. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, z něhož je signál veden do počítače. Při vyhodnocení chromatogramu HPLC se porovnávají „píky“ vzorků se standardy (Cvačka, 2010; Nováková et Douša, 2013).



Obrázek 20: Schéma kapalinového chromatografu (Cvačka, 2010)

3.4.3 Příprava vzorků pro analýzu a získávání dat

Z čerstvého rostlinného materiálu byly připraveny supernatanty následujícími postupy a použity k přípravě konečných vzorků pro analýzu aktivních forem kyslíku a fenolických látek a flavonoidů. Kyselina salicylová byla analyzována v sušině. Listy proto byly sušeny 24 hodin při 80 °C. Postupy k namíchání vzorků byly použity podle publikace Dučaiová et al. (2016). Byly uplatněny známé metody. Superoxidový radikál byl zjišťován sledováním tvorby dusitanu z hydroxylaminu při 530 nm (Eltner a Heupel 1976) a peroxid vodíku pomocí monitorování komplexu titanu a peroxidu při 410 nm dle Jany a Choudhuri (1981). Fenolické látky byly kvantifikovány metodou Folin-Ciocalteu (Singleton a Rossi 1965) a flavonoidy pomocí metody $AlCl_3$ (Ordoñez et al.,

2006). Kyseliny salicylová byla zjišťována HPLC metodou podle Petruľova' et al. (2014).

Příprava supernatantů (superoxidový radikál, peroxid vodíků)

0,1 g čerstvého materiálu bylo rozetřeno pomocí třecí misky a tlučku ve 2 ml fosfátového pufru, vzniklého smícháním K_2HPO_4 a KH_2PO_4 v poměru 1:1. Připravený vzorek byl přelit do mikrozkušavky a centrifugován 15 minut při 4 °C a 15 000 otáček.

Příprava supernatantů (fenoly, flavonoidy)

0,2 g čerstvého materiálu bylo rozetřeno pomocí třecí misky a tlučku ve 2 ml 80 % methanolu. Připravený vzorek byl přelit do mikrozkušavky a centrifugován 15 minut při 10 °C a 14 000 otáček.

Příprava vzorků pro analýzu aktivních forem kyslíku

Postup

SUPEROXID

Bylo smícháno 270 μ l fosfátového pufru, 30 μ l hydroxylaminu a 300 μ l supernatantu. Po 15ti minutách bylo přidáno 300 μ l sulfanylaminu, promícháno a po dalších 15ti minutách bylo přidáno 300 μ l naftylaminu, opět promícháno a opět po 15ti minutách přidáno 300 μ l diethyletheru a promícháno. Absorbance byla měřena ve skleněných kyvetách ve spektrofotometru při 530 nm.

PEROXID

Byl smíchán 1 ml supernatantu s 0,5 ml $TiCl_4$ a vzorek byl centrifugován 15 minut při 4 °C a 15 000 otáček. Absorbance byla měřena ve skleněných kyvetách ve spektrofotometru při 410 nm.

Příprava vzorků pro analýzu fenolických látek a flavonoidů

Postup

FENOLY

Bylo smícháno 470 μ l vody a 30 μ l supernatantu, přidáno 975 μ l 2 % Na_2CO_3 a 25 μ l Folin-Ciocalteuova činidla. Vzorek byl zahřát v blokovém ohříváči na 45 °C po dobu 60 minut. Absorbance byla měřena ve skleněných kyvetách ve spektrofotometru při 750 nm.

FLAVONOIDY

Bylo smícháno 0,5 ml supernatantu a 0,5 ml 2 % AlCl_3 . Vzorek byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Absorbance byla měřena v semi-mikro plastových kyvetách ve spektrofotometru při 420 nm.

Příprava vzorků pro analýzu kyseliny salicylové

Postup

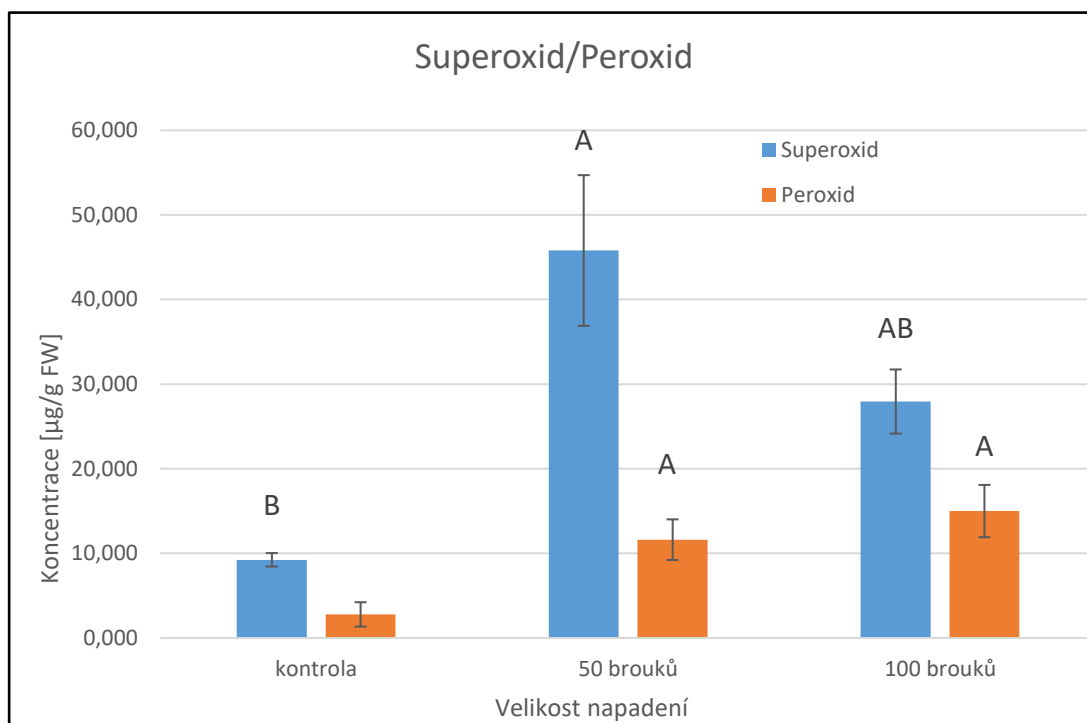
Pro přípravu supernatantu bylo rozemleto 0,15 g sušiny, nasypáno do mikrozkušavky a přidáno 1,5 ml 75 % methanolu. Vzorek byl třepán v třepačce po dobu 24 hodin a dále centrifugován po dobu 15 minut při 3 000 ot/min. Dále byl 1,5 ml supernatantu odpařen ve vialkách v termobločku při 30 °C pod dusíkem a před analýzou rozpuštěn v 200 μl methanolu. Vzorek byl analyzován metodou HPLC (ACN: 3,35% H_3PO_4 /40 : 60/, 235 nm).

4 Výsledky

4.1 Obsah aktivních forem kyslíku

Průměrný obsah superoxidu byl nejvyšší u varianty s menším napadením (45,797 $\mu\text{g/g}$ FW) a nejnižší u kontrolních rostlin (9,240 $\mu\text{g/g}$ FW). Rostliny s vyšším napadením vyprodukovaly méně superoxidu než v případě nižšího napadení a to pouhých 27,944 $\mu\text{g/g}$ FW. Bohužel v případě peroxidu v kontrolní variantě absorbance u 4 z 6 vzorků vyšla v záporných hodnotách, průměr byl tedy vypočítán jen ze dvou hodnot. Z grafu tedy vyplývá že nejnižší průměrný obsah peroxidu byl u kontroly s hodnotou 2,783 $\mu\text{g/g}$ FW) a s intenzitou napadení se zvyšovala. Průměrný obsah superoxidu ve variantě s nižším napadením byl 11,621 $\mu\text{g/g}$ FW a s vyšším napadením 15,001 $\mu\text{g/g}$ FW. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu 1. Chybové úsečky značí standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a standardní chyby průměru jsou obsaženy v tabulce 1 (superoxid) a 2 (peroxid) viz. přílohy.

U obou metabolitů byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce 6). U peroxidu se analýza prováděla jen u varianty s nižším a vyšším napadením (analýza vyšla neprůkazně), neboť kontrola neměla dostatečné množství analyzovaných vzorků, jak již bylo zmíněno výše. U superoxidu vyšla analýza rozptylu průkazně, byl tedy proveden Tukeyho test, pomocí něhož bylo zjištěno, že je průkazný rozdíl pouze mezi kontrolou a variantou s nižším napadením, a to dokonce na hladině významnosti 1 %. Hodnota p je 0.0010053. Neprůkazné rozdíly jsou mezi kontrolou a vyšším napadením a mezi variantou s nižším napadením a vyšším napadením s hodnotami p 0.0777530 a 0.0943476. Tyto hodnoty p jsou jen nepatrně vyšší než 0,05 (viz. tabulka 7, přílohy).

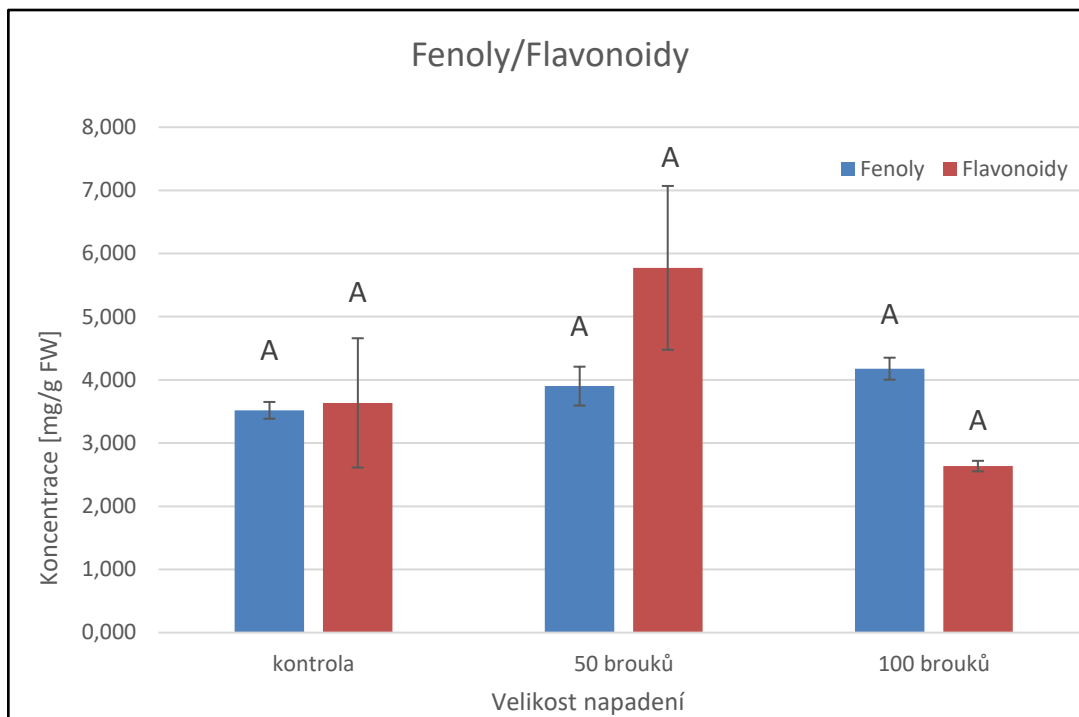


Graf 1: **Obsah superoxidu a peroxidu v rostlinách u jednotlivých variant** (Hodnoty ve sloupcích označené stejným písmenem se výrazně neliší podle Tukeyho testu (testováno mezi všemi variantami $P < 0,05$, $n = 6$))

4.2 Obsah fenolických látek a flavonoidů

Průměrný obsah fenolických látek se směrem od kontroly, přes nižší napadení po vyšší napadení mírně zvyšoval. Obsah byl nejvyšší u varianty s vyšším napadením (4,177 mg/g FW), mírně se snížil u varianty s nižším napadením (3,901 mg/g FW) a nejnižší byl u kontrolních rostlin (3,518 mg/g FW). V případě flavonoidů byl průměrný obsah nejvyšší u varianty s nižším napadením s hodnotou 5,773 mg/g FW a nejnižší obsah v případě vyššího napadení (2,635 mg/g FW). Obsah flavonoidů v kontrolních rostlinách byl 3,636 mg/g FW. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu 2. Chybové úsečky značí standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a standardní chyby průměru jsou obsaženy v tabulce 3 (fenoly) a v tabulce 4 (flavonoidy) viz. přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce 6). U obou metabolitů byly hodnoty neprůkazné.



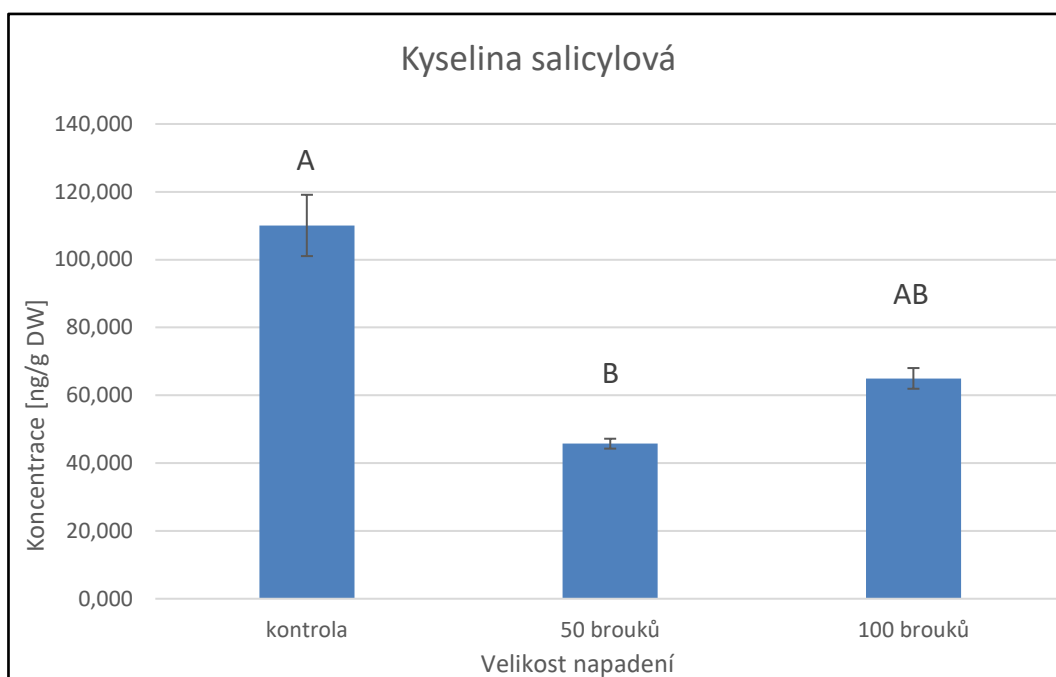
Graf 2: **Obsah fenolů a flavonoidů v rostlinách u jednotlivých variant** (Hodnoty ve sloupcích označené stejným písmenem se výrazně neliší podle Tukeyho testu (testováno mezi všemi variantami $P < 0,05$, $n = 6$))

4.3 Obsah kyseliny salicylové

Průměrný obsah kyseliny salicylové byl nejvyšší u kontrolní varianty, a to v množství 110,089 ng/g DW (suché hmotnosti). Ve zbylých variantách se obsah této látky razantně snížil. V případě varianty s nižším napadením byla její hodnota 45,733 ng/g DW a v případě s vyšším napadením 64,978 ng/g DW. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu 3. Chybové úsečky značí standartní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a standartní chyby průměru jsou obsaženy v tabulce 5 viz. přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce 6) a protože vyšla průkazně, byl proveden Tukeyho test, pomocí něhož bylo zjištěno, že rozdíly na hladině významnosti 5 % jsou patrné mezi kontrolou a variantou s nižším napadením, kdy hodnota p je 0.0117234 a mezi kontrolou a variantou s vyšším napadením s hodnotou p 0.0307816. Neprůkazný rozdíl je mezi variantou s nižším napadením a vyšším napadením s

hodnotou p 0.4014674, která se oproti předešlých neprůkazných variant výrazně vychyluje od hodnoty 0,05 (viz. tabulka 7, přílohy).



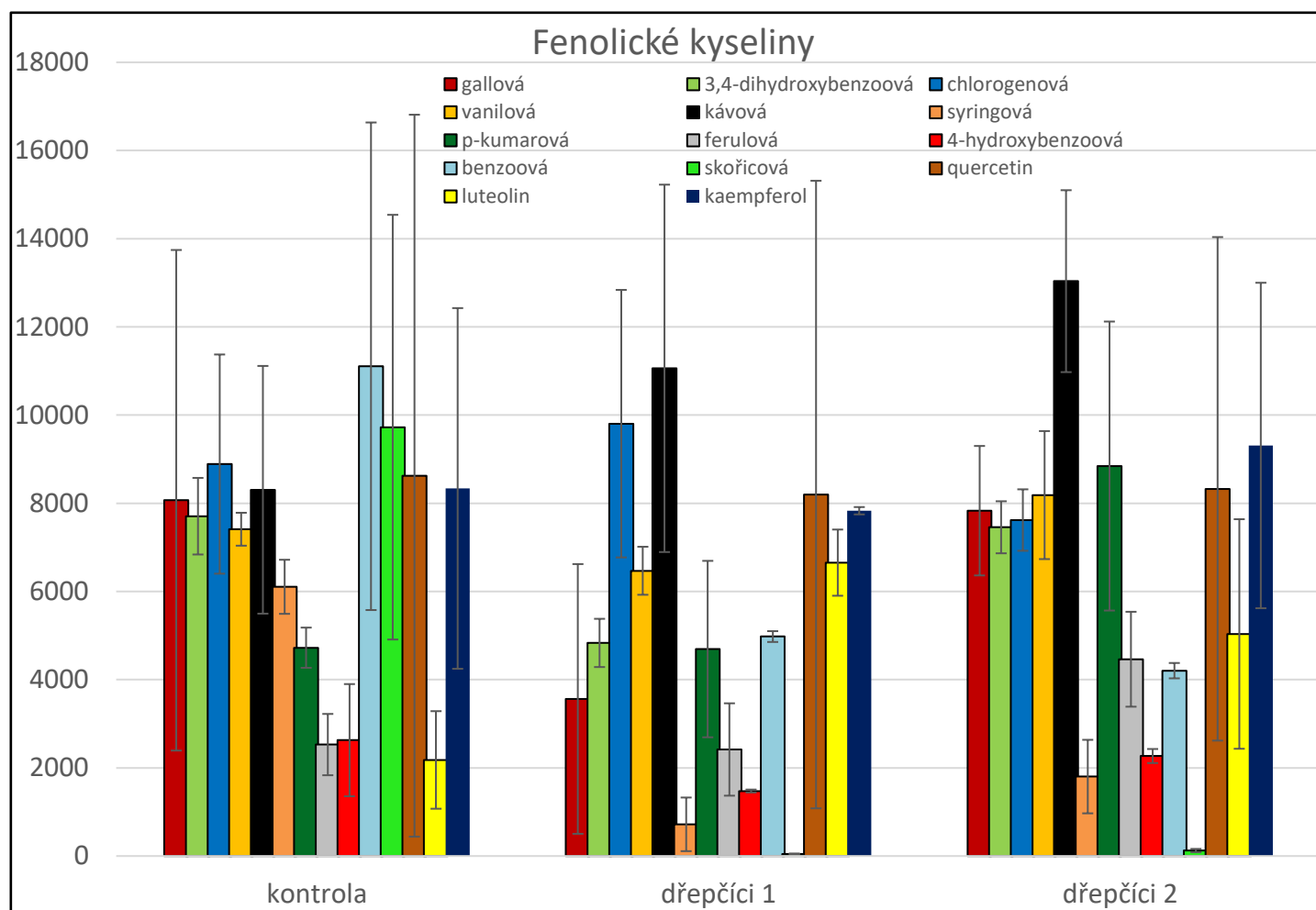
Graf 3: **Obsah kyseliny salicylové v rostlinách u jednotlivých variant** (Hodnoty ve sloupcích označené stejným písmenem se výrazně neliší podle Tukeyho testu (testováno mezi všemi variantami $P < 0,05$, $n = 3$))

4.4 Relativní zastoupení jednotlivých fenolických kyselin

Ve vzorkách všech variant byly zjišťovány fenolické kyseliny spektrofotometrickou metodou a jejich relativní zastoupení je zobrazeno v grafu 4. Výsledky nelze brát nijak absolutně, neboť vzorky nebyly měřeny s použitím standardů. Z tohoto důvodu lze pouze sledovat relativní rozdíly mezi obsahem téže látky v různých variantách. V grafu nejsou uvedeny jednotky, hodnoty byly použity přímo z hmotnostního spektrometru a vyjadřují velikost plochy pod vrcholem grafu, který odpovídá výskytu příslušné látky.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 %. Bohužel téměř nikde až na kyselinu syringovou (hodnota p je 0.0251) nevyšel žádný průkazný rozdíl mezi variantami, a to zejména proto, že rozptyl mezi hodnotami v rámci jedné varianty je většinou příliš velký (velké chybové úsečky v grafu). Konkrétní hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce 8. Protože analýza rozptylu vyšla průkazně u kyseliny

syringové, byl proveden Tukeyho test, pomocí něhož bylo zjištěno, že rozdíly na hladině významnosti 5 % jsou patrné mezi kontrolou a variantou s nižším napadením, kdy hodnota p je 0.0274653 a mezi kontrolou a variantou s vyšším napadením s hodnotou p 0.0414965. Neprůkazný rozdíl je mezi variantou s nižším napadením a vyšším napadením s hodnotou p 0.7522504 (viz. tabulka 9, přílohy).

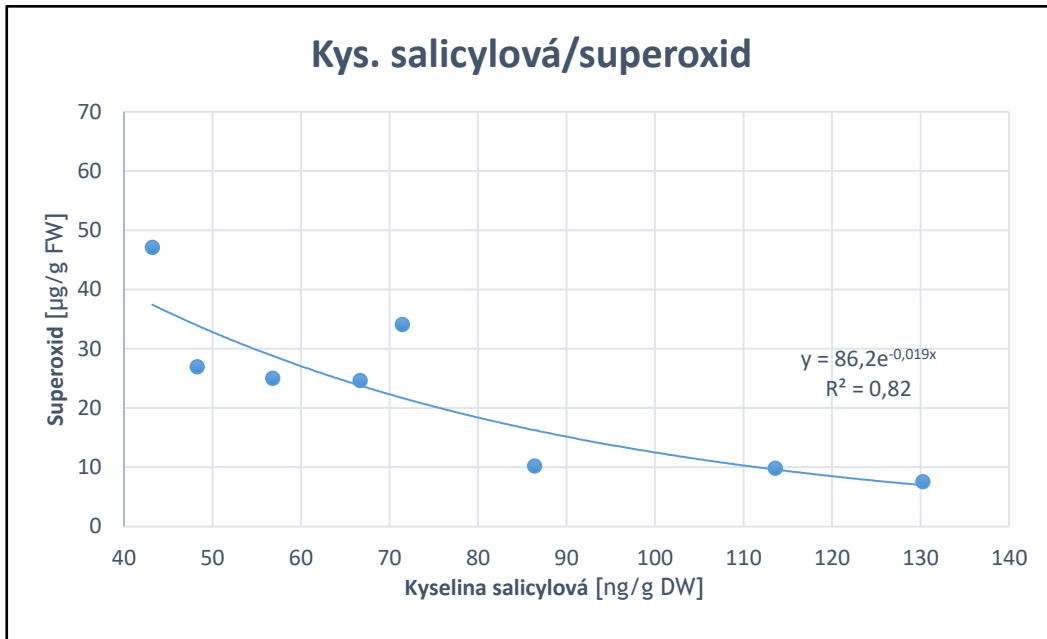


Graf 4: Relativní zastoupení jednotlivých fenolických kyselin

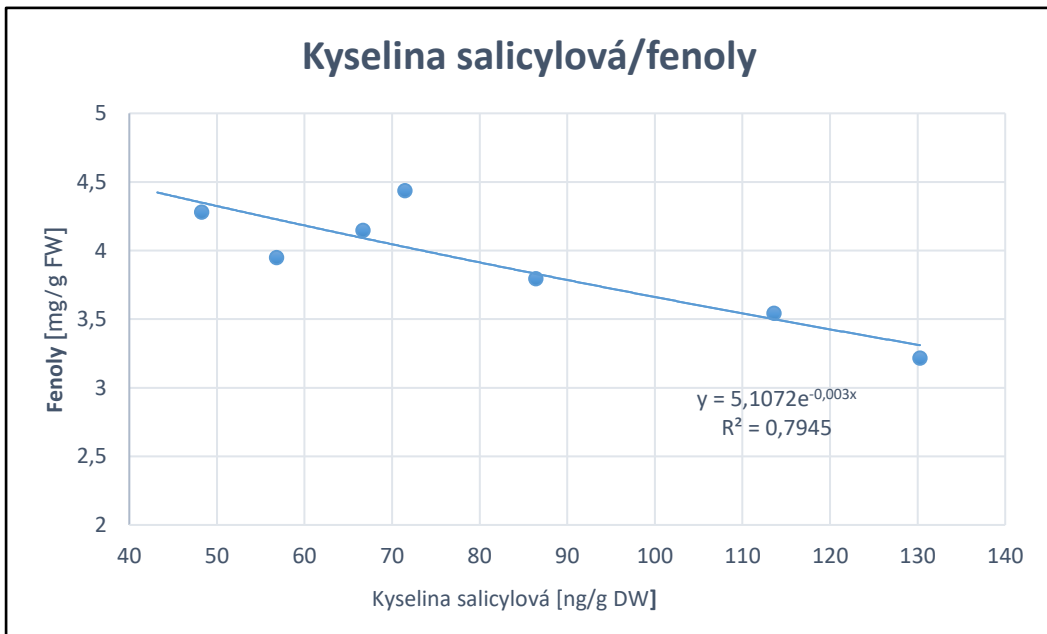
4.5 Regresní analýza

Byla porovnána závislost mezi metabolity navzájem. Závislost se podařilo vysledovat pouze u dvou dvojic, a to mezi kyselinou salicylovou a superoxidem a kyselinou salicylovou a fenoly. Vztah byl posuzován podle tabulky kritických hodnot Spearmanova korelačního koeficientu. Ve vztahu kys. salicylová/superoxid pro n=8 je

kritická hodnota 0,6905. V grafu 5. je patrné, že hodnota $R=0,82$ převyšuje kritickou hodnotu. Jedná se o průkaznou negativní regresi. Znamená to tedy, že mezi těmito metabolity je těsný vztah. Pro vztah kys. salicylová/fenoly kritická hodnota pro $n=7$ je 0,7450. Z grafu 6. vyplývá, že je i mezi těmito metabolity těsný vztah, protože hodnota $R=0,7945$. I v tomto případě se jedná o průkaznou negativní regresi.



Graf 5: Závislost mezi obsahem kyseliny salicylové a superoxidu



Graf 6: Závislost mezi obsahem kyseliny salicylové a fenolů

5 Diskuze

Tato experimentální práce se zaměřila na sekundární metabolity v rostlinách produkované vlivem působení fytofágního hmyzu. Kultivace proběhla v řízených podmínkách klimaboxu. Rostlinný materiál byl analyzován na obsah aktivních forem kyslíku, fenolické látky (celkově i konkrétní fenolické kyseliny), flavonoidní látky a kyselinu salicylovou.

5.1 Změny v hodnotách ROS vlivem stresu vyvolaném dřepčíky

Fotoinhibice a fotooxidace, jak uvádí Piterková et al. (2005), se všeobecně u rostlin projevují jen ve stresových podmínkách. ROS (aktivní formy kyslíku) byly analyzovány ve vzorcích, a to zejména superoxidový radikál a peroxid vodíku. V případě peroxidu, jak již bylo uvedeno, průměrnou hodnotu u kontrolní varianty lze využít pouze orientačně, přesto byl pozorován nárůst u stresovaných variant, jak vyplývá z grafu 1 (avšak mezi nižším a vyšším napadením je statisticky neprůkazný rozdíl). Z grafu dále vyplývá, že se obsah superoxidu zvýšil ve variantách s napadenými rostlinami oproti kontrolní variantě. Nepotvrdila se hypotéza, že se s rostoucí intenzitou napadení zvýší i množství ROS v pletivech, neboť varianta s nižším napadením vyprodukovala více superoxidu než ve variantě s vyšším napadením. Výsledky mohou být ovlivněny i faktem, že rostliny vyvinuly účinné obranné mechanismy, které odstraňují ROS a chrání tím buňky proti oxidačnímu poškození (Piterková, 2005) a mimo jiné i faktem, že námi sledované flavonoidy (téměř všechny skupiny i každá jednotlivá sloučenina) mají schopnost působit jako antioxidanty a jejich antioxidační účinky závisí na uspořádání funkčních skupin ve struktuře (Hernandéz, 2009).

5.2 Změny v hodnotách fenolických látek a flavonoidů vlivem stresu vyvolaném dřepčíky

Stěžejní pro tuto práci byla analýza fenolických látek a flavonoidů a jejich insekticidní aktivita. Ta má různé mechanismy, jakými brání rostlinu před fytofágním hmyzem. Metabolity mohou hmyz odstrašit, mohou působit jako inhibitory trávení, nebo mohou působit toxicky a zavinit úmrtí jedince (Andersen et Markham, 2006). V grafu 2. jsou znázorněny průměrné obsahy fenolických látek a flavonoidů. Průměrný obsah fenolických látek se směrem od kontroly, přes nižší napadení po vyšší napadení mírně

zvyšoval, bohužel rozdíly mezi variantami nejsou statisticky průkazné. Statistická neprůkaznost mezi jednotlivými variantami je i v případě flavonoidů. Jejich průměrný obsah byl nejvyšší u varianty s nižším napadením a nejnižší obsah v případě vyššího napadení. Nabízí se zde otázka, jak je možné, že se neprokázala hypotéza zvýšeného obsahu těchto metabolitů u rostlin napadených fytofágním hmyzem. Odůvodněním by mohla být dlouhá doba trvání negativního vlivu dřepčků. Odběr rostlinného materiálu proběhl po 4 dnech od počátku působení brouků, kteří u vzešlých rostlin vyžírali do listů mělké jamky nebo malé dírky až byl list místy proděravělý. Naskytá se zde domněnka, že rostliny už od počátku identifikace ohrožení začaly produkovat zvýšené množství fenolických látek a flavonoidů, aby si pojistily obranu před škůdci, až se vyčerpaly a již nebyly schopny další sloučeniny vyprodukovat. V době, kdy byly rostliny sklizeny již nebylo v listech takové množství obranných látek, jaké se očekávalo. Další možností vysvětlení by mohlo být to, že dřepčci ve snaze přežít na velmi omezeném prostoru s omezeným zdrojem potravy, nechutnost listů způsobenou obrannými látkami ignorovali. I toto hledisko mohlo přispět k rychlejšímu vyčerpání rostlin. Feeney (1976) a Clark a Harwell (1992) uvádějí, že mechanismy obrany rostlin spotřebovávají energii a další zdroje v rostlině na úkor jiných procesů a znamenají pro rostlinu velké energetické a materiálové výdaje.

Ve vzorkách všech variant byly zjišťovány i konkrétní fenolické kyseliny (14 látek) a jejich relativní zastoupení, jež je zobrazeno v grafu 4. V něm lze sledovat relativní rozdíly mezi obsahem téže látky v různých variantách. Ze čtrnácti kyselin vyšel statisticky průkazný rozdíl pouze u kyseliny syringové, kde jsou rozdíly patrné mezi kontrolou a variantou s nižším napadením a mezi kontrolou a variantou s vyšším napadením. U ostatních kyselin nevyšel žádný průkazný rozdíl mezi variantami, a to zejména proto, že rozptyl mezi hodnotami v rámci jedné varianty je většinou příliš velký.

5.3 Změny v hodnotách kyseliny salicylové vlivem stresu vyvolaném dřepčiky

Kyselina salicylová, jako jeden z obranných fytohormonů také patří do skupiny fenolických látek a byla analyzována zvlášť. I pro tuto látku byly stanoveny hypotézy, že se bude její množství zvyšovat od kontrolní varianty k variantám napadených škůdci.

Avšak dle získaných dat budou tyto hypotézy zamítnuty, protože průměrný obsah kyseliny salicylové byl nejvyšší u kontrolní varianty a ve zbylých variantách se obsah této látky razantně snížil. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu 3. Mezi variantou s nižším napadením a vyšším napadením je neprůkazný rozdíl. Proč bylo nejvyšší množství naměřeno právě v kontrolní variantě a pak se razantně snížilo u variant s dřepčíky by mohla objasnit regresní analýza.

5.4 Regresní analýza

Regresní analýza porovnávala závislost mezi metabolity navzájem. Byla provedena mezi všemi metabolity navzájem ale závislost se podařilo vysledovat pouze mezi kyselinou salicylovou a superoxidem a mezi kyselinou salicylovou a fenoly. Z grafu 5. a 6. vyplývá, že je mezi metabolity těsný vztah a že se jedná o průkaznou negativní regresi, to znamená, čím méně je v rostlině kyseliny salicylové, tím více je superoxidu/fenolů a naopak. Podíváme-li se znovu na grafy se superoxidem, fenoly a kyselinou salicylovou, zjistíme, že tento vztah potvrzují. Kyseliny salicylové je v kontrolní variantě nejvyšší obsah, který se snižuje s napadením. U fenolů a superoxidu je to naopak. V kontrolních variantách je obsah nejnižší a s napadením se zvyšuje.

Zvýšené množství superoxidu se dá vysvětlit tím, že aktivita NADPH-oxidas a peroxidas buněčné stěny je často spojována s tzv. oxidačním vzplanutím („oxidative burst“). To je chápáno jako jedna z hlavních odpovědí rostlinných buněk na stres, ať už abiotický nebo biotický. Produkce ROS vzroste, stejně jako intenzita obranných mechanismů buněk a způsobují vážný oxidační stres (Habánová et Berka, 2018). Kyselina salicylová je stresovým fytohormonem, stejně jako kyselina jasmonová a měla by se produkce zvyšovat s napadením rostliny. Podle Jandy (2018) se vyskytuje v blízkosti místa napadení, zatímco stresový hormon kyselina jasmonová je přítomna až za prstencem působení kyseliny salicylové. Její produkce by tedy mohla být potlačena fenolickými látkami a aktivními formami kyslíku, jak vyplývá z grafů. Nabízí se i myšlenka, že i v tomto případě, stejně jako v případě produkce fenolických látek a flavonoidů byly rostliny vyčerpány.

6 Závěr a doporučení

Byly stanoveny dvě hypotézy, pro splnění stanoveného cíle. V hypotéze H1 jsme předpokládali, že obsah aktivních forem kyslíku a obranných látek bude vyšší u rostlin napadených fytofágním hmyzem, oproti rostlinám kontrolním a v hypotéze H2 jsme předpokládali, že obsah aktivních forem kyslíku a obranných látek se bude zvyšovat s intenzitou napadení.

Dle výsledných dat lze potvrdit H1 u aktivních forem kyslíku. Poznatky o peroxidu jsou pouze orientační. H2 v případě superoxidu neplatí, neboť z grafu 1 je patrný vyšší obsah u varianty s nižším napadením, avšak statisticky je rozdíl mezi variantami vyššího a nižšího napadení neprůkazný. U peroxidu je z grafu patrný nárůst s intenzitou napadení ale opět je rozdíl statisticky neprůkazný.

Hypotézu H1 u fenolických látek nelze potvrdit, i přes to, že se průměrný obsah směrem od kontroly, přes nižší napadení po vyšší napadení mírně zvyšoval, jak je vidět v grafu 2, byl statisticky neprůkazný. Z grafu je dále patrné, že obsah flavonoidů se zvýšil oproti kontrole u varianty s nižším napadením, tak ale obsah byl nejnižší u varianty s vyšším napadením a hodnoty zase vyšly neprůkazně.

V případě kyseliny salicylové jsou obě hypotézy vyvráceny, protože se ukázalo, že nejvyšší obsah je v kontrolní variantě a s napadením razantně klesá. Mezi variantami s nižším napadením a vyšším napadením není statisticky průkazný rozdíl.

Dále se podařilo vysledovat závislost mezi kyselinou salicylovou a superoxidem a kyselinou salicylovou a fenoly a v obou případech se jedná o průkaznou negativní regresi.

Konečný závěr z této výzkumné práce je, že s intenzitou napadení produkce obranných látek buď příliš nesouvisí nebo souvisí minimálně. Zdá se, že rostliny se od počátku napadení brání stejným množstvím produkovaných látek bez ohledu na to, o jaké množství škůdců se jedná. Je ale možné, že není tak patrný rozdíl mezi napadením 50 brouky a 100 brouky, bylo by potřeba větší rozmezí v počtu škůdců. Dalším poznatkem může být fakt, že se rostliny postupem času pod vlivem herbivorie vyčerpávají. V příštím

experimentu by bylo vhodné prozkoumat obranné látky již od prvního dne napadení fytofágním hmyzem po určitou dobu, ovšem experiment by byl náročný v tom smyslu, že by bylo potřeba, aby za tak krátkou dobu byly rostliny škůdci poškozeny. Z toho důvodu by bylo lepší menší množství rostlin na variantu. Celá problematika tedy vyžaduje ještě další výzkum, modifikaci metod a potvrzení, případně vyvrácení dosažených výsledků.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Přehled nejdůležitějších stresových faktorů (Procházka et al., 1998)	11
Obrázek 2: Schéma indukce systémové obranné reakce (upraveno podle Wasternack et Parthier, 1997).	13
Obrázek 3: Podíl hormonů na rostlinné obraně proti biotickým faktorům (Jones et Bari, 2009)	14
Obrázek 4: Demonstrace fosilních nálezů hmyzího žíru (a-d) a stopy po kladení vajíček (e) (Knor et Prokop, 2014).....	16
Obrázek 5: Schéma rozdělování zdrojů v rostlině: A rozdělení zdrojů bez napadení, B rozdělení zdrojů po napadení herbivorem (upraveno podle Feeney, 1976; Clark et Harwell, 1992)	19
Obrázek 6: Dráhy podílející se na biosyntéze sekundárních metabolitů a jejich propojení s primárním metabolismem (Taiz et Zeiger, 2010)	21
Obrázek 7: Základní struktura flavonoidu (Kumar et Pandey, 2013)	25
Obrázek 8: Antokyany (Taiz et Zeiger, 2010).....	26
Obrázek 9: Antokyanidiny (Taiz et Zeiger, 2010)	26
Obrázek 10: Flavony (Taiz et Zeiger, 2010).....	27
Obrázek 11: Flavonoly (Taiz et Zeiger, 2010).....	27
Obrázek 12: Isoflavon (isoflavonoid) (Taiz et Zeiger, 2010)	28
Obrázek 13: Schéma biosyntézy flavonoidů (dle Rice-Evans et al., 1996; Wollgast a Anklam, 2000)	30
Obrázek 14: Vznik základní struktury flavonoidů (Taiz et Zeiger, 2010)	31
Obrázek 15: Hlavní hmyzí škůdci, kteří napadají rostliny <i>Brassicaceae</i> na celém světě (Ahuja, 2010)	35
Obrázek 16: Odchyt škůdců na poli družstva Agrospol Bolehošť (foto Kuchtíčková, 2017)	40
Obrázek 17: Boxy připravené s rostlinami a škůdci k experimentu (foto Kuchtíčková, 2017) .	41
Obrázek 18: Žír dřepčíků na listech rostlin (foto Kuchtíčková, 2017)	41
Obrázek 19: Schéma uspořádání spektrofotometru (Anonymous).....	44
Obrázek 20: Schéma kapalinového chromatografu (Cvačka, 2010).....	45

Seznam grafů a tabulek

Graf 1: Obsah superoxidu a peroxidu v rostlinách u jednotlivých variant (Hodnoty ve sloupcích označené stejným písmenem se výrazně neliší podle Tukeyho testu (testováno mezi všemi variantami $P < 0,05$, $n = 6$)	49
Graf 2: Obsah fenolů a flavonoidů v rostlinách u jednotlivých variant (Hodnoty ve sloupcích označené stejným písmenem se výrazně neliší podle Tukeyho testu (testováno mezi všemi variantami $P < 0,05$, $n = 6$)	50
Graf 3: Obsah kyseliny salicylové v rostlinách u jednotlivých variant (Hodnoty ve sloupcích označené stejným písmenem se výrazně neliší podle Tukeyho testu (testováno mezi všemi variantami $P < 0,05$, $n = 3$)	51
Graf 4: Relativní zastoupení jednotlivých fenolických kyselin	52
Graf 5: Závislost mezi obsahem kyseliny salicylové a superoxidu	53

Graf 6: Závislost mezi obsahem kyseliny salicylové a fenolů.....	53
Tabulka 1: Superoxid – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant	68
Tabulka 2: Peroxid – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant	68
Tabulka 3: Fenoly – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant	68
Tabulka 4: Flavonoidy – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant.....	68
Tabulka 5: Kyselina salicylová – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant.....	69
Tabulka 6: Analýza rozptylu u jednotlivých metabolitů	69
Tabulka 7: Tukeyho test pro superoxid a kyselinu salicylovou (A – kontrola, B – nižší napadení, C – vyšší napadení).....	69
Tabulka 8: Analýza rozptylu jednotlivých fenolických kyselin	70
Tabulka 9: Tukeyho test pro kyselinu syringovou (A – kontrola, B – nižší napadení, C – vyšší napadení).....	70

Seznam použité literatury

Adie, B.A. et al., 2007: *ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis*. Plant Cell, vol. 19, pages 1665–1681.

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

Ali, J. G. et Agrawal, A. A., 2012: *Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense*. Trends in plant science, vol. 17, issue 5, pages 293-302.

Andersen, Q. et Markham, K., 2006: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis Group. ISBN – 10: 0-8493-2021-6

Bari, R. et Jones, J.D.G., 2009: *Role of plant hormones in plant defence responses*. Plant Mol Biol., vol. 69, pages 473–488.

Browse, J. et Howe, G.A. 2008: *New weapons and a rapid response against insect attack*. Plant Physiology, vol. 146, pages 832–838.

Buer, Ch. et al., 2010: *Flavonoids: New Roles for Old Molecules*, Journal of Integrative Plant Biology, vol. 52, issue 1, pages 98-111.

Capinera, J. L., 2008: *Encyclopedia of entomology*. Springer. Netherlands, pages 3853-3885, ISBN: 978-1-4020-6359-6.

Clark, C. W., et Harwell, D. C., 1992: *Inducible defenses and the allocation of resources: a minimal model*., American Naturalist, vol. 139, pages 521-539.

Danihelová, M. et Šturdík, E., 2011: *Flavonoid natural sources and their importance in the human diet*., Potravinárstvo, vol. 5, issue 4, pages 12-24.

Dučaiová, Z. et al., 2016: *Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of Matricaria chamomilla after methyl jasmonate elicitation*. Plant Growth Regul, vol. 79, pages 81–94.

- Elstner, E.F. et Heupel, A., 1976: *Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase*. Analytical Biochemistry, vol. 70, pages 616-620.
- Feeney, P., 1976: *Plant apparancy and chemical defense*. In: Wallace J.W., Mansell R.L. (eds) Biochemical Interaction Between Plants and Insects. Recent Advances in Phytochemistry, vol. 10, pages 1-40.
- Furstenberg-Hagg, J., Zagrobelny, M., Bak, S., 2013: *Plant defense against insect herbivores*. International journal of molecular science. 14, pages 10242-10297.
- Gómez et al., 2007: *Costs and benefits of induced resistance in a clonal plant network*. Oecologia, vol. 153, issue 4, pages 921–930.
- Habánová, H. et Berka, M., 2018: *Peroxid vodíku v životě rostlin*. Chemické listy, vol. 112, pages 421-426.
- Hejsková, V., 2016: *UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze
- Hernández, I. et al., 2009: *How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?* Trends in plant science, vol. 14, issue 3, pages 125-132.
- Chen, M., 2008: *Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review*, Insect science, vol. 15, pages 101 – 114.
- Jana, S. et Choudhuri, M.A., 1981: *Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperm during aging*. Aquatic Botany, vol. 11, pages 67-77.
- Janda, M., 2018: *V obraně rostlin mají i hormony své místo*. Vesmír, vol. 97, pages 126.
- Kazda, J. et al., 2008: *Metodika integrované ochrany řepky*, ISBN 978-80-87065-08-2.
- Kempema, L.A. et al., 2007: *Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids*. Plant Physiology, vol.143, pages 849–865.

- Klejduš, B. et al., 2003: *Identifikace a charakterizace isoflavonů v rostlinných extraktech za použití kombinace HPLC s hmotnostním detektorem a detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD-MS)*. Chemické Listy, vol. 97, pages 530-539
- Knor, S. et Prokop, J., 2014: *Fosilní doklady asociací rostlin a hmyzu*, Živa, vol. 5, pages 194-197.
- Kumar, S. et Pandey, A. K., 2013: *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*, The Scientific World Journal, vol. 2013, Article ID 162750, pages 16.
- Macholán, L, 2003: *Sekundární metabolity*. Masarykova univerzita v Brně, ISBN 80-210-3068-2.
- Musilová, L. et al., 2012: *Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik.*, Chemické listy, vol. 106, issue 11, pages 1029-1033.
- Nováková L. et Douša M., 2013: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. a II.*, Praha
- Orcutt, D.M. et Nilsen, E.T., 2000: *Herbivory and Plant Stress*, in: Orcutt, D.M. et Nilsen, E.T., *The Physiology of Plants Under Stress*. John Willey & Sons, New York, pages 264-327.
- Ordoñez, A.A.L. et al., 2006: *Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts*. Food Chemistry, vol. 97, pages 452-458.
- Pavlová, L., 2006: *Fyziologie rostlin*. Praha, Karolinum. ISBN 8024609851.
- Petrůvová, V. et al., 2014: *Short-term UV-B Dose Stimulates Production of Protective Metabolites in *Matricaria chamomilla* Leaves*. Photochem Photobiol, pages 1061–1068.
- Piterková, J. et al., 2005: *Oxidativní stres: Lokalizace aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu.*, Chemické listy, vol. 99, pages 455-466.
- Prasannalaxmi, K. et Rani, P.U., 2016: *Interactions between herbivore *Leucinodes orbonalis* G. and its host plant *Solanum melongena* L.: A study on insect induced direct plant responses*, Allelopathy journal, vol. 37, issue 2, pages 273-286.

- Procházka, S. et al., 1998: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996: *Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids*. Free Radical Biology and Medicine, vol. 20, pages 933-956.
- Rosypal, S. et al., 2003: *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia. ISBN 978-80-86960-23-4
- Rotrekl, J., 2013: *Sledování hmyzích škůdců polních plodin a jejich prahy škodlivosti*. Zemědělský výzkum, spol. s r.o.
- Řepková, J., 2013: *Genetika rostlin*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-6408-9.
- Schoonhoven, L. M., Jermy, T., van Loon, J. J. A., 1998: *Insect-Plant-biology: From Physiology to Evolution*. Chapman and Hall; London, UK, ISBN: 0412587009.
- Schulze, E.D., Beck, E., Müller-Hohenstein, K., 2005: *Biotic stress: herbivory, infection, allelopathy*, in: Schulze, E.D., Beck, E., Müller-Hohenstein, K., Plant Ecology. Springer, Berlin, pages 235-252.
- Singleton, V.L. et Rossi, J., 1965: *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture, vol. 16, pages 144–158.
- Spilková, J. et al., 2016: *Farmakognozie*. Karolinum. ISBN 9788024632643
- Špryňar, P. et Strejček, J., 2012: *Potravní vazby herbivorního hmyzu – nástroj pro hodnocení biotopů a krajiny*, Živa, vol. 4, pages 200-202.
- Taiz, L. et Zeiger, E., 2010: *Plant physiology*, 5.vyd., Massachusetts U.S.A: Sunderland. ISBN 978-0878938667.
- Tholl, D., 2015: *Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants*. Biotechnology of Isoprenoids, pages 63-106.
- Treutter, D., 2005: *Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis.*, Plant Biology, vol. 7, issue 6, pages 581–591.

Tůma, J., 2012: *Fyziologie rostlin v obrázcích*. Hradec Králové.

War, A.R. et al., 2012: *Mechanisms of plant defense against insect herbivores*. Journal Plant Signaling & Behavior, vol. 7, issue 10, pages 1306-1320

Wasternack, C. et Parthier, B., 1997: *Jasmonate-signalled plant gene expression*. Trends in Plant Science, vol. 2, pages 302-307.

Winkel-Shirley, B., 2001: *Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology.*, Plant Physiology, vol. 126, pages 485-493.

Wollgast, J. et Anklam, E., 2000: *Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification*, Food Research International, vol. 33, issue 6, pages 423-447.

Internetové zdroje

Anonymous, 2009: *Dřepčici* [cit. 2018 – 07 – 14]. Dostupné z WWW: <<http://cz.natur-im-garten.at/start.asp?ID=27816>>.

Anonymous, 2018: *Škůdci olejnin* [cit. 2018 – 07 – 14]. Dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=6301&typ=html>.

Bohdalová, Z., 2016: *Mšice – miniaturní, ale ohrožující škůdci*. [cit. 2018 – 06 – 14]. Dostupné z WWW: <<http://www.magazinzahrada.cz/rady-a-tipy/msice-miniaturni-ale-ohrozujici-skudci.html>>.

Cvačka, J., 2010: *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii*. [cit. 2018 – 06 – 14]. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>>.

Grulich, V., 2012: *BRASSICACEAE Burnett – brukvovité / kapustovité*. [cit. 2018 – 06 – 14]. Dostupné z WWW: <<https://botany.cz/cs/brassicaceae/>>.

Hanganu, D. et al., 2010: *Phytochemical Analysis of Isoflavons from some Fabaceae Species Extracts*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. [cit. 2018 – 05 – 04]. Dostupné z WWW: <<http://search.proquest.com/openview/3b8928660f6a9c35bf7f08f4842c8089/1?pq-origsite=gscholar>>.

Koplík, R., 2008: *Rostlinné fenoly a flavonoidy*. Přednášky z předmětu Speciální analýza potravin. [cit. 2018 – 05 – 04]. Dostupné z WWW: <<http://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>>.

Kovaříková, K. et al., 2017: *Zápředníček polní - významný škůdce brukvovité zeleniny a řepky*. [cit. 2018 – 06 – 14]. Dostupné z WWW: <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/zaprednicek-polni-vyznamny-skudce-brukvovite-zeleniny-a-repky>>.

MLA style, 2014: *"Albert Szent-Györgyi - Biographical"*. Nobelprize.org. Nobel Media AB, [cit. 2018 – 05 – 29]. Dostupné z WWW:

<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1937/szent-gyorgyi-bio.html>.

Rotrekl, J. et Kolařík, P., 2011: *Květilka zelná - nebezpečný škůdce ozimé řepky*. [cit. 2018 – 06 – 14]. Dostupné z WWW: <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/kvetilka-zelna-nebezpecny-skudce-ozime-repky>>.

Řehořová, K., 2007: *Škůdci zeleniny - dřepčící* [cit. 2018 – 07 – 14]. Dostupné z WWW: <<https://chovatelka.cz/clanek/skudci-zeleniny-drepcici>>.

Smýkal P., 2015: *Biologické a genetické aspekty rezistence rostlin (k biotickým stresorům)*. Katedra botaniky. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého. [cit. 2018 – 05 – 22]. Dostupné z WWW: <http://botany.upol.cz/pagedata_cz/vyukove-materialy/197_7-smykalbiologicke-a-geneticke-aspekty-rezistencerostlin-2015.pdf>.

Tanaka, Y. et al., 2008: *Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids*. [cit. 2018 – 04 – 16]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476875>>.

Zloch, Z., 2003: *Krátká historie bioflavonoidů*, Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni, [cit. 2018 – 05 – 22]. Dostupné z WWW: <<https://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=46>>.

Přílohy

Tabulka 1: **Superoxid** – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant

Varianta	Aritmetický průměr [µg/g FW]	Standartní průměru chyba
Kontrola	9,240	0,793
50 brouků	45,797	8,901
100 brouků	27,944	3,795

Tabulka 2: **Peroxid** – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant

Varianta	Aritmetický průměr [µg/g FW]	Standartní průměru chyba
Kontrola	2,783	1,444
50 brouků	11,621	2,402
100 brouků	15,001	3,090

Tabulka 3: **Fenoly** – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant

Varianta	Aritmetický průměr [mg/g FW]	Standartní průměru chyba
Kontrola	3,518	0,133
50 brouků	3,901	0,308
100 brouků	4,177	0,174

Tabulka 4: **Flavonoidy** – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant

Varianta	Aritmetický průměr [mg/g FW]	Standartní průměru chyba
Kontrola	3,636	1,023
50 brouků	5,773	1,297
100 brouků	2,635	0,084

Tabulka 5: Kyselina salicylová – Aritmetický průměr a standartní chyba průměru všech variant

Varianta	Aritmetický průměr [ng/g DW]	Standartní chyba průměru
Kontrola	110,089	9,040
50 brouků	45,733	1,463
100 brouků	64,978	3,053

Tabulka 6: Analýza rozptylu u jednotlivých metabolitů

Sekundární metabolit	Superoxid	Peroxid	Fenolické látky	Flavonoidy	Kyseliny salicylová
Hodnota p	0.0013	0.4081	0.1341	0.0916	0.0107

Tabulka 7: Tukeyho test pro superoxid a kyselinu salicylovou (A – kontrola, B – nižší napadení, C – vyšší napadení)

Superoxid	Dvojice variant	Hodnota p	Vyhodnocení
	AvB	0.0010053	** p<0.01
	AvC	0.0777530	neprůkazné
	BvC	0.0943476	neprůkazné
Kyselina salicylová	Dvojice variant	Hodnota p	Vyhodnocení
	AvB	0.0117234	* p<0.05
	AvC	0.0307816	* p<0.05
	BvC	0.4014674	neprůkazné

Tabulka 8: Analýza rozptylu jednotlivých fenolických kyselin

Fenolická kyselina	gallová	3,4-dihydroxybenzoová	chlorogenová	vanilová	kávová	syringová	p-kumarová
Hodnota p	0.6606	0.0931	0.7823	0.5698	0.5049	0.0251	0.4057
Fenolická kyselina	ferulová	4-hydroxybenzoová	benzoová	skořicová	quercetin	luteolin	kaempferol
Hodnoty p	0.3032	0.6844	0.3964	0.1316	0.9991	0.3439	0.9612

Tabulka 9: Tukeyho test pro kyselinu syringovou (A – kontrola, B – nižší napadení, C – vyšší napadení)

Syringová kys.	Dvojice variant	Hodnota p	Vyhodnocení
	AvB	0.0274653	* p<0.05
	AvC	0.0414965	* p<0.05
	BvC	0.7522504	neprůkazné