

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Změny v produkci vybraných primárních metabolitů v
závislosti na napadení zelí hmyzími herbivory rodu
*Phyllotreta***

Diplomová práce

Autor: Bc. Radka Čechová

Studijní program: N 1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

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

Hradec Králové

červenec 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Změny v produkci vybraných primárních metabolitů v závislosti na napadení zelí hmyzími herbivory rodu *Phyllotreta*“ vypracovala samostatně a na základě uvedených literárních zdrojů.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Poděkování

Na prvním místě bych velmi ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za rady, čas a ochotu při řešení tohoto tématu.

Také bych ráda poděkovala panu Mgr. Matěji Semerákovi a paní RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za poskytnutí rad při analýzách a přípravě vzorků.

Velké díky patří také pánům doc. RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. et Ph.D., PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. a PharmDr. Rudolfu Andrýsovi, Ph.D. z katedry chemie Univerzity Hradec Králové za odborné rady při zpracování výsledků pomocí metody HPLC.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině za psychickou i finanční podporu během celého studia.

Anotace v českém jazyce

ČECHOVÁ, R. *Změny v produkci vybraných primárních metabolitů v závislosti na napadení zelí hmyzími herbivory rodu Phyllotreta*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Jiří Tůma. 89 s.

Tato diplomová práce zjišťuje především změnu koncentrací vybraných organických kyselin, aminokyselin a rozpustných proteinů v rostlinách zelí napadených dřepčíky rodu *Phyllotreta*. V teoretické části jsou popsány metabolické dráhy u rostlin a vybrané látky z nich pocházející. Poté následuje část metodiky, kde jsou popsány postupy jednotlivých pokusů, které zjišťovaly množství zkoumaných látek v rostlinách napadených dřepčíky. Rostliny byly umístěny do boxů, v kterých byl simulován nižší a vyšší stupeň napadení. Poté byly provedeny analýzy na měření obsahu vybraných primárních metabolitů pomocí různých metod, jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie, nebo měření vzorků na spektrofotometru. Většina zkoumaných látek měnila svou koncentraci v napadených rostlinách a tyto rozdíly byly nejmarkantnější u askorbové kyseliny, citronové kyseliny, glutamové kyseliny a fenylalaninu. Pomocí takových změn koncentrací primárních metabolitů může rostlina vyvíjet své obranné mechanismy a to jak z jednotlivých látek, nebo ze sekundárních metabolitů, které vznikají z těchto primárních prekurzorů.

Klíčové slova

Herbivorie, metabolismus rostlin, zelí, proteiny, organické kyseliny, aminokyseliny

Anotace v cizím jazyce

ČECHOVÁ, R. *Changes of the selected primary metabolite production in cabbage in dependence on the Phyllotreta insect herbivores attack*. Hradec Králové, 2016.

Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis

Supervisor Jiří Tůma. 89 p.

This diploma thesis primarily finds out change in the concentration of selected organic acids, amino acids and soluble proteins in cabbage plants infested by flea beetles from *Phyllotreta* genus. The theoretical part describes the metabolic pathways in plants and selected substances from them are described. Afterwards follows the part of methodology where the processes of single experiments that were looking for amount of the examined substances in plants infested by flea beetles are described. The plants were placed in boxes where lower and higher infestation levels were simulated. Subsequently, analysis were made to measure the content of selected primary metabolites by various methods such as high performance liquid chromatography or spectrophotometer measurements.. Most of the examined substances changed their concentration in the infested plants and these differences were the most noticeable in case of ascorbic acid, citric acid, glutamic acid and phenylalanine. By using such changes in primary metabolite concentrations, the plant can develop its defense mechanisms and not only from individual substances but also from secondary metabolites that originate from there primary precursors.

Key words

Herbivory, plant metabolism, cabbage, proteins, organic acids, amino acids

Obsah

Úvod	9
1 Teoretická část.....	11
1.1 Herbivorie jako součást biotického stresu u rostlin	11
1.2 Dřepčící (<i>Phyllotreta</i> sp.).....	12
1.3 Nejvýznamnější druhy dřepčίκů škodících na brukvovitých rostlinách....	13
1.3.1 Dřepčícík polní (<i>Phyllotreta undulata</i>)	13
1.3.2 Dřepčícík zelný (<i>Phyllotreta nemorum</i>).....	14
1.3.3 Dřepčícík černý (<i>Phyllotreta atra</i>).....	14
1.3.4 Dřepčícík černonohý (<i>Phyllotreta nigripes</i>)	15
1.3.5 Dřepčícík zlatohlavý (olejkový) (<i>Psylliodes chrysocephalus</i>).....	15
1.4 Reakce rostlin na stres způsobený herbivory	16
1.5 Mechanismy chemické obranné reakce rostlin.....	17
1.6 Metabolické dráhy rostlin	18
1.6.1 Syntéza sekundárních metabolitů.....	21
1.7 Působení stresu na metabolické dráhy rostlin.....	22
1.8 Zelí hlávkové bílé (<i>Brassica oleracea</i> convar. <i>Capitata</i> var. <i>alba</i>)	23
1.9 Organické kyseliny v hlávkovém zelí a jejich vlastnosti.....	24
1.9.1 Kyselina šťavelová.....	24
1.9.2 Kyselina askorbová	24
1.9.3 Kyselina citrónová	26
1.9.4 Kyselina fumarová	26
1.10 Aminokyseliny v hlávkovém zelí a jejich vlastnosti.....	27
1.10.1 Asparagová kyselina.....	27
1.10.2 Glutamová kyselina.....	27
1.10.3 Asparagin	27
1.10.4 Glutamin.....	28
1.10.5 Histidin	28
1.10.6 Glycin.....	28
1.10.7 Threonin.....	29
1.10.8 Arginin	29
1.10.9 Alanin	29

1.10.10	Tyrosin.....	29
1.10.11	Valin.....	30
1.10.12	Methionin.....	30
1.10.13	Fenylalanin.....	30
1.10.14	Isoleucin.....	30
1.10.15	Leucin.....	30
1.10.16	Lysin.....	31
1.11	Proteiny a jejich vlastnosti.....	31
2	Metodika.....	34
2.1	Popis experimentu.....	34
2.2	Příprava vzorků a metody stanovení.....	36
2.2.1	Rozpustné proteiny.....	36
2.2.2	Aminokyseliny.....	37
2.2.3	Organické kyseliny.....	38
2.3	Statistické zpracování výsledků.....	39
3	Výsledky a diskuze.....	41
3.1	Organické kyseliny.....	41
3.1.1	Kyselina šťavelová.....	41
3.1.2	Kyselina askorbová.....	42
3.1.3	Kyselina citronová.....	45
3.1.4	Kyselina fumarová.....	47
3.2	Aminokyseliny.....	49
3.2.1	Glutamová kyselina.....	50
3.2.2	Glycin.....	53
3.2.3	Arginin.....	56
3.2.4	Alanin.....	58
3.2.5	Tyrosin.....	60
3.2.6	Valin.....	61
3.2.7	Fenylalanin.....	63
3.2.8	Isoleucin.....	64
3.2.9	Leucin.....	66
3.2.10	Lysin.....	68
3.3	Rozpustné proteiny.....	69

Závěr.....	70
Seznam literatury	72
Přílohy	83

Úvod

Tématem této diplomové práce je výzkumná otázka, která se zabývá především změnou koncentrací primárních metabolitů v rostlinách zelí a jejich obranné funkce proti dřepčíkům (*Phyllotreta sp.*). Tato problematika byla vybrána z hlediska zajímavosti a s cílem zjistit, zda se rostliny mohou bránit proti hmyzím škůdcům sami bez pomoci chemických sloučenin. Všechny rostliny představují zdroj obživy a přátelské složení atmosféry na naší zeměkouli. Proto je důležité zjistit, zda jsou schopny se samostatně bránit, protože by mohlo dojít k omezení použití chemických látek, které zatěžují životní prostředí. Tyto látky pak z kontaminovaného prostředí přijímáme do těl, což může mít za následek zdravotní problémy.

První část práce se zabývá herbivorií obecně a následně je řešena problematika nejdůležitějších druhů dřepčíků, kteří velice často škodí na brukvovitých rostlinách. Tyto rostliny si lidé velmi oblíbili jako zeleninu a to především zelí, které se v české kuchyni často hojně používá. Uvedené rostliny se mohou některými způsoby bránit a obecná ochrana rostlin proti napadení býložravci je rozpracována v dalších částech práce. Ochranné mechanismy v rostlině probíhají hlavně díky sekundárním metabolitům, které vznikají z metabolitů primárních. V tu chvíli je nutné vědět, jak se mění koncentrace těchto prekurzorů. Tyto látky se již dlouhou dobu využívají v medicíně a farmakologii a v neposlední řadě také v potravinářském průmyslu. V následující části práce se nachází obecné poznatky o rostlině zelí, kterou jsme následně využili v praktických pokusech a analýzách. Poté pokračuje práce částí zabývající se primárními metabolity, které jsme zkoumali pomocí pokusů, které jsou popsány a vyhodnoceny v části praktické. Tyto primární metabolity jsou především organické kyseliny, aminokyseliny a rozpustné proteiny. Je zde popsáno, jak mohou tyto látky napomáhat rostlině při obraně proti biotickému stresu, především proti býložravosti. Po teoretické části práce následují kapitoly s metodikou, popisem experimentů, vyhodnocením výsledků a diskuzí.

Teoretická část je především sepsána z vědeckých článků, které jsou často rešerší, nebo vycházejí z vlastních experimentů. V praktické části bude rozpracován jak plán experimentu, tak i samotné výsledky, které se zjišťovaly pomocí různých metod. Experiment po odchytu dřepčíků probíhal v laboratořích Univerzity Hradec Králové.

Cílem práce je tedy zjistit, jak se mění koncentrace primárních metabolitů v rostlinách zelí a jak tato změna ovlivňuje obranné a ochranné možnosti rostlin. Tato problematika začíná být poslední dobou velmi diskutovanou, ale ještě není moc probádanou. Proto jsme si stanovili nulovou hypotézu **H₀**: „Po napadení

rostlin herbivorním hmyzem dochází ke změnám v jejich primárním metabolismu“. Budeme se snažit tuto domněnku buď potvrdit, nebo vyvrátit a to pomocí různých metod, které jsou uvedeny dále v textu práce.

Tato práce obsahuje pouze část velkého projektu, který se zabývá změnou primárních a sekundárních metabolitů v rostlinách zelí po napadení různými druhy herbivorů. Jedná se především o různé druhy rodu dřepčíků (*Phyllotreta sp.*) a také o různé druhy bělásků (*Pieris sp.*).

1 Teoretická část

1.1 Herbivorie jako součást biotického stresu u rostlin

Rostliny jsou přisedlé organismy, které jsou vystaveny velkému množství environmentálních stresů. Stresy mohou být jak abiotické (teplota, světlo, voda, minerály, aj.), tak biotické (patogeny, býložravci a podobně) (Molinier et al., 2006). Tato práce řeší především herbivorii, která velmi negativně (s malými výjimkami) působí na rostliny. Je to vztah mezi rostlinami a živočichy, kteří konzumují rostlinné orgány nebo jejich části (Stevens, 2010).

Býložraví živočichové mají často negativní efekt na růst, rozmnožování i celkové přežití rostlin. Díky těmto organismům rostliny často umírají před tím, než se stihnou rozmnožit a to může vést až k jejich vymizení (Brys et al., 2011). Velké množství fytofágů patří do skupiny hmyzu. Některé druhy hmyzu se krmí obecně na rostlinách a nevybírají si přímo určitý druh nebo skupinu rostlin. Existují však i druhy, které dávají přednost pouze některým rostlinám (Follet, 2017).

Živočichové, kteří si vybírají pouze jeden druh rostliny, se nazývají monofágními druhy a polyfágové jsou naopak živočichové, kteří nejsou specializovaní pouze na určitý druh rostlin (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Tito herbivoři mohou rostlinu poškozovat sáním, okusem, nebo požerem. Díky tomu může docházet ke změnám při růstu, transpiraci, fotosyntéze a toku živin rostlinou (Mihai et al., 2005). Často jsou konzumovány části rostlin, které obsahují velké množství živin prospěšných pro býložravce (Baraza et al., 2006).

Obranné mechanismy rostlin vznikly hlavně díky přírodnímu výběru, evolučním změnám a vznikem genetických mutací, které probíhaly náhodně v rostlinách a vedly ke vzniku nových sloučenin, které chránily a chrání rostliny proti živočišným škůdcům i patogenům. Díky vzniku takových látek mohlo přežít více rostlin, a tak se tyto poznatky postupně přenášely do dalších generací a stále dochází k postupnému zlepšení ochrany (Taiz et Zeiger, 2010).

Rostliny však musí bezpečně rozeznat, zda se jedná o poškození vyvolané herbivorem, nebo o stres vyvolaný abiotickými faktory jako je poškození pletiv pomocí krupobití nebo větru. Nedochozelo-li by k tomuto rozeznávání, rostliny by plýtvaly energií na tvorbu ochranných mechanismů. Rostlina tak musí bezpečně rozeznávat býložravce podle látek, které vypouštějí do rostliny po jejím narušení. Tyto látky se nejčastěji nacházejí ve slinách nebo jiných sekretech vylučovaných býložravcem (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

1.2 Dřepčící (*Phyllotreta* sp.)

Taxonomické zařazení dřepčίκů (Pokorný, 2014):

- Říše:** *Animalia* - živočichové
- Oddělení:** *Bilateria* - dvoustranně souměrní
- Pododdělení:** *Protostomia* - prvoústí
- Kmen:** *Arthropoda* - členovci
- Podkmen:** *Hexapoda* - šestinozí
- Třída:** *Insecta* - hmyz
- Podtřída:** *Pterygota* - křídlatí
- Řád:** *Coleoptera* - brouci
- Podřád:** *Polyphaga* - všežraví
- Čeleď:** *Chrysomelidae* - mandelinkovití
- Rod:** *Phyllotreta* - dřepčíc

Jedná se o početnou skupinu živočichů z čeledi mandelinkovitých (*Chrysomelidae*) (Ouda et al., 2013). Dřepčící jsou tedy drobní brouci, kteří škodí na brukvovitých rostlinách a dělí se do několika rodů, jako jsou *Chaetocnema*, *Phyllotreta* a *Psylliodes* (Šefrová, 2013). Tito brouci jsou velmi podobní bázlivcům, ale odlišuje je to, že mají silně rozšířená stehna, která jsou uzpůsobená ke skákání. Jsou to brouci malých rozměrů (1 – 5,5 mm) (Ouda et al., 2013). Tito herbivoři jsou temně zbarvení a některé druhy na sobě mají podélnou žlutou pásku na krovkách (Muška, 1999). Nejvíce druhů je vázáno na rostliny z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), brutnákovitých (*Boraginaceae*), brukvovitých (*Brassicaceae*), hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a krtičníkovitých (*Scrophulariaceae*) (Ouda et al., 2013).

Samičky kladou vajíčka do země, nebo na spodní okraje listů. Vylíhlé larvičky procházejí třemi přeměnami, stadiem předkukly a samotnou kuklou, ze které se líhnou samotní dospělci. Larvy se živí především kořeny, listy i květním pylem. Dospělí jedinci se líhnou asi po třech až pěti týdnech a ti se živí hlavně květním pylem a zelenými částmi rostlin. Řada druhů je vázána na kulturní rostliny, na kterých působí jako škůdci. Na poli, kde je monokultura chmele, řepy, olejin nebo obilovin se velmi rychle množí a na takových místech se jim velmi daří (Ouda et al., 2013).

Na brukvovitých rostlinách nejčastěji škodí dřepčíc polní (*Phyllotreta undulata*), dále dřepčíc zelný (*Phyllotreta nemorum*), dřepčíc černý (*Phyllotreta atra*) a dřepčíc černoohý (*Phyllotreta nigripes*). Mohou zlikvidovat až 30% plochy děložních lístků pěstovaných brukvovitých rostlin. Nejvíce dřepčící poškozují rostliny, když je během dne suché a teplé počasí a to především na okrajích

monokultur na polích. Vzešlé rostliny, které mají dostatečně vyvinutou asimilační plochu, jsou ohroženy pouze při velkém přemnožení těchto brouků a velkém napadení (Muška, 1999).

Napadené listy v sobě mají vykousané jamky, nebo okénka v průměru 1,5 – 2 mm. Pokud jsou brouci přemnoženi a napadení je velmi silné, dochází k likvidaci mladých rostlin (Muška, 1999).

1.3 Nejvýznamnější druhy dřepčků škodících na brukvovitých rostlinách

1.3.1 Dřepčík polní (*Phyllotreta undulata*)

Dospělec je 1,8 – 2,5 mm dlouhý a jeho svrchní strana těla je černá. Na krovkách má dva podélné černé proužky, které jsou výrazně zahnuté směrem dovnitř u báze krovek a naopak při vrcholu krovek jsou proužky mírně rozšířené. Báze holení a chodidel všech končetin jsou žlutočervené a stejnou barvu mají i první čtyři články tykadel (Anonym, 2018). Je známý především v chladnějších oblastech jako velmi nebezpečný škůdce brukvovitých rostlin. Jeho skokanské schopnosti jsou velmi dobré díky jeho zesíleným stehnům (Hanzák et al., 1973). Dospělec tohoto brouka je znázorněn na obrázku č. 1.



Obr. 1: Dřepčík polní (Stigenberg, 2018)

1.3.2 Dřepčík zelný (*Phyllotreta nemorum*)

Imago brouka je asi 2,4 – 3,1 mm dlouhé a jeho spodní strana je černá, štít má modravý nebo bronzový odlesk a na černých krovkách jsou dva podélné žluté pruhy. Tyto pruhy jsou u báze krovek mírně zahnuté dovnitř a u špice jsou zahnuté silněji, což je vidět na obrázku č. 2 (Šefrová, 2013). Tito brouci mají žlutá chodidla, holeně (všech končetin) i konce stehen (přední a střední končetiny). Žluté jsou i první tři články tykadel (Anonym, 2018).



Obr. 2: Dřepčík zelný (Deml, 2009)

1.3.3 Dřepčík černý (*Phyllotreta atra*)

Brouk dlouhý asi 1,7 – 2,6 mm, je černý na horní i spodní straně těla. Krovky a štít jsou výrazně tečkované, končetiny jsou hnědavé až černé. Druhý a třetí článek tykadel je žlutočervený, první článek je tmavěji žlutočervený. Následující články tykadel jsou černé (Anonym, 2018). Popsané znaky těla dřepčíka černého jsou dobře vidět na obrázku č. 3.



Obr. 3: Dřepčík černý (Schmidt, 2005)

1.3.4 Dřepčík černonohý (*Phyllotreta nigripes*)

Dospělý brouk, zobrazený na obrázku č. 4, má asi 1,8 – 2,5 mm dlouhé tělo. Jeho horní strana je kovově modrá, modrozelená nebo vzácně i černá (Šefrová, 2013). Jeho krovky mají metalický vzhled. Končetiny jsou o něco málo světlejší, než krovky a tělo, ale tykadla jsou spíše hnědé barvy (Döberl, 2010).



Obr. 4: Dřepčík černonohý (Deml, 2007)

1.3.5 Dřepčík zlatohlavý (olejkový) (*Psylliodes chrysocephalus*)

Dospělec tohoto dřepčíka je 3 – 4,6 mm dlouhý živočich, který se u nás řadí mezi největší jedince tohoto rodu brouků. Horní strana jeho těla je tmavě kovově modrá a pouze přední část hlavy je červenavá. Čelo a temeno hlavy je často tmavě zbarveno (Šefrová, 2013). Krovky jsou hluboce tečkované a tyto prohlubně vytváří deset pravidelných řad. Stehna zadních končetin jsou černá nebo kovově modrá a stehna prvních a druhých párů končetin jsou žlutá, jsou tmavší při jejich bázi. Holeně i chodidla jsou u všech párů končetin žluté (Anonym, 2018). To můžeme pozorovat na obrázku č. 5. Samičky dokážou naklást až tisíce vajíček najednou. Následné stadium larvy žije uvnitř listů brukvovitých rostlin a konzumují pletiva. Poté larvy vlezou do půdy, kde se přemění v dospělce, kteří se opět živí rostlinnými pletivy (Vig, 2003).



Obr. 5: Dřepčík zlatohlavý (olejkový) (Peters, 2009)

1.4 Reakce rostlin na stres způsobený herbivory

Jelikož jsou rostliny přisedlými organismy a nemohou se bránit únikem do prostoru, musí si vytvářet vlastní obranné a ochranné mechanismy. Tyto organismy proto musí být aktivní v regulaci špatných podmínek prostředí (Ballhom et al., 2001). Jak již bylo dříve zmíněno, v této práci bude řešen především stres biotický a to především u rostlin napadených herbivorním hmyzem.

Díky neustálému napadání flóry živočišnými druhy si rostliny vybudovaly velké množství obran, které se dělí do dvou základních kategorií (Chen, 2008):

- 1) konstitutivní obrany – aktivace těchto obran v rostlině probíhá již před napadením herbivora, ale tato reakce může zesílit i po ataku
- 2) indukované obrany – aktivace těchto obran probíhá po napadení rostlinných pletiv býložravcem. Tyto reakce se dělí do 3 základních skupin:
 - a. zjištění o napadení
 - b. přenos signálu
 - c. tvorba obranných chemických látek

Rostliny jsou ohroženy býložravými živočichy a to především hmyzem, který je nejpočetnější skupinou živočichů na světě. Rostliny mohou napadat i větší živočichové a ony se pak proti tomu brání pomocí mechanických obran. Tyto obrany představují hlavně trichomy, trny, sklerenchymatická pletiva, rychlá regenerace nebo vypouštění lepkavých látek a další. Mechanické obrany jsou tedy prvotní obranou, která je velmi důležitá (Novák et Skalický, 2008).

Další fází jsou chemické látky, které se tvoří v rostlinách, a to především díky jejich sekundárnímu metabolismu. Chemická obrana rostliny na býložravce působí buď přímo, nebo nepřímo. Přímá obrana využívá toxicity, antinutricity a nechutnosti látek, které jsou konzumovány. Nepřímá obrana způsobuje to, že rostlina přitahuje jiné organismy z jiných trofických úrovní, které likvidují škůdce (Mithöfer et Boland, 2012). Tyto látky se dělí do dvou základních kategorií a to kvalitativně významných (účinkují v malém množství) a kvantitativně významných (účinkují ve velkém množství) (Nagy et al., 2011).

Někdy je pro rostliny výhodnější rychlejší růst, než tvorba těchto obran, protože zde existuje šance, že býložravec rostlinu celou nespase a ona pak může lépe konkurovat o světlo s rostlinami v jejím okolí. Někdy se herbivoři na vytvořenou rostlinnou obranu mohou adaptovat (Arab et Trigo, 2011).

1.5 Mechanismy chemické obranné reakce rostlin

Abiotické faktory formovaly hlavní metabolické procesy rostlin už v dávných dobách, kdy rostliny přecházely z vody na souš a byly pod neustálým stresem. Jediným možným řešením byla úprava struktur rostlinných těl a metabolických drah dle aktuálního stavu vnějších podmínek a zajištění rychlé opravy poškozené části těla. Rostliny mají omezené možnosti vnitřní koordinace a výměny informací mezi orgány, protože nemají nervovou soustavu a také nemají některé evolučně mladší metabolické obranné mechanismy (proteinový imunitní systém). Rostliny jsou však vystaveny různým typům stresu a někdy jsou lokalizované na určité místo a systémové reakce celého organismu v tu chvíli nejsou nutné (Procházka et al., 1998).

Rostliny jsou schopny za určité situace syntetizovat neobvyklé látky, které mohou sloužit k jejich ochraně. Příkladem jsou neproteinové aminokyseliny, které nejsou začleněny do proteinů a jsou v rostlině přítomné ve volné formě. Příkladem může být neproteinový kanavalin, který je blízkým analogem argininu. Tyto látky většinou blokují syntézu, nebo příjem nových normálních aminokyselin. Některé se však mohou začleňovat do bílkovin, a pak díky tomu vznikají nefunkční proteiny. Jiné druhy rostlin produkují lektiny, což jsou obranné proteiny ze skupiny neproteinových aminokyselin vázající se na sacharidy, nebo proteiny, které obsahují sacharidové jednotky. Tyto látky jsou hlavně v luštěninách, pokud jsou zkonsumovány hmyzím škůdcem, tak zpomalují jeho růst a rozvoj (Taiz et Zeiger, 2010).

Škody, které způsobí herbivor spouští kaskádu signálních drah (příklad popsán na listech lilkové rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) (Pearce et al., 1991):

- 1) listy po poranění syntetizují prostemin, který je velkým prekurzorovým proteinem
- 2) prostemin je proteolyticky zpracováván a postupně vzniká krátký polypeptid systemin, který byl objeven a identifikován jako první polypeptidový hormon v rostlinách
- 3) systemin je poté organismem uvolňován z poškozených buněk a dostává se do apoplastu
- 4) následně se systemin transportuje pomocí floému v cévním svazku ven z poraněného listu rostliny
- 5) systemin se v cílových buňkách váže na plazmatickou membránu a iniciuje biosyntézu kyseliny jasmonové, která má důležitou úlohu v regulaci růstu a má významné účinky v rostlině
- 6) vzniklá kyselina v rostlině aktivuje expresi genů

Jako signální látka se může kromě kyseliny jasmonové v rostlině objevit například i kyselina abscisová, nebo salicylová. Kyselina jasmonová vzniká syntézou z kyseliny linolenové a indukuje transkripci hostitelských genů, které hrají důležitou roli v obranných mechanismech rostliny. Aktivuje také geny některých primárních metabolických drah rostliny, které mohou poskytovat prekurzory pro tvorbu některých alkaloidů (Taiz et Zeiger, 2010).

Když tedy rostlinu napadne herbivor, tak jsou její reakce řízeny komplexními signálními drahami. Tyto dráhy jsou chemické, fyzikální, směřují ke genové expresi a některým buněčným procesům (Howe, 2004). Deriváty kyseliny jasmonové (jasmonáty) regulují biosyntézu několika sekundárních metabolitů (alkaloidy, terpenoidy, fenylypropanoidy a antioxidanty). Jsou dva typy základních mechanismů pro produkci různých látek (Avanci et al., 2010):

- 1) tvorba látek s antinutričními nebo toxickými vlastnostmi
- 2) uvolňování těkavých látek, které vyvolávají nepřímou obranu (přivolání živočichů, kteří napadnou herbivora)

1.6 Metabolické dráhy rostlin

Základem metabolismu jsou asimilační (anabolické) a disimilační (katabolické) procesy probíhající v buňce. Zásadním jevem je pohlcování sluneční energie a její transformace na energii chemických vazeb. Díky těmto vazbám vznikají složité látky jako lipidy a sacharidy. Opačné procesy způsobují rozklad těchto složitých látek a vznik jednoduchých. Energie z nich se uvolňuje a často je uplatněna v metabolických procesech. Díky fotosyntéze a dýchání vznikají nejzákladnější primární metabolity v rostlinách (Novák, 2007).

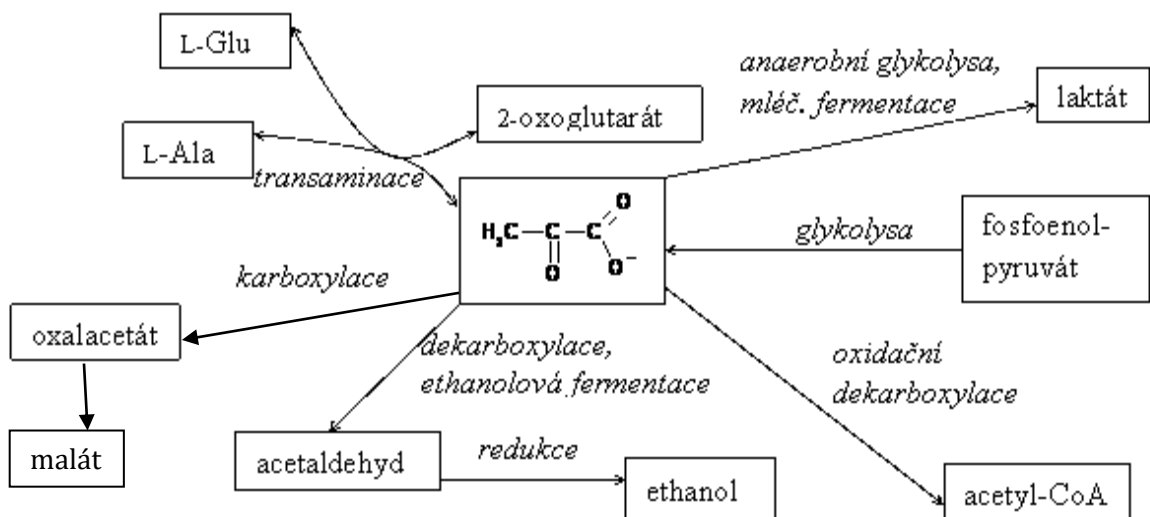
Fotosyntéza často poukazuje na působení stresových faktorů na rostlinu. Při snížení účinků fotosyntézy dochází ke ztrátám v zemědělské výrobě (Da Silva et al., 2011). Fotosyntéza je biochemický proces, při kterém dochází ke změně sluneční energie na energii chemických vazeb. Díky tomuto procesu vznikají převážně cukry, ale také neorganické látky jako je oxid uhličitý a voda, které napomáhají rostlině k dobrému růstu. Cukry vzniklé v zelených částech rostliny se pomocí floému konvertují do částí nezelených (Miyagawa et al., 2001). Cukry, které jsou primárními metabolity, vznikají hlavně díky tomuto procesu. Nejdůležitější součástí fotosyntézy jsou biochemické reakce, při kterých je oxid uhličitý přeměňován na sacharid (Břížďala, 2018).

Při stresu se rostlina brání změnou metabolismu sacharidů, které nejsou v buňce pouze jako základ pro biosyntetické reakce, nebo jako zdroj energie, ale i jako signální molekuly. Sacharidy mohou regulovat aktivitu enzymů a expresi genů, které souvisejí s transportem metabolitů a metabolismem látek v rostlinném těle

(Koch, 1996). Sacharidy také působí jako signální molekuly při odpovědi na stresový podnět. Například glukosa indukuje expresi řady genů a mezi nimi se nachází i gen pro extracelulární β -fruktosidasu a fenylalaninamoniomlyasu. To jsou důležité enzymy metabolismu sacharidů, dusíkatých látek a jiných sekundárních metabolitů. Také aktivuje proteinkiny, které mohou fosforylovat různé proteiny a nepřímo se podílí na aktivitě jiných látek (Ehness et al., 1997).

Tyto látky jsou následně využívány v procesu zvaném respirace, kde dochází k jejich štěpení a rozkladům na jednodušší sloučeniny (Novák, 2007). Respirace se skládá ze 4 základních pochodů, kdy pro tvorbu primárních metabolitů jsou nejdůležitější glykolýza a Krebsův (citrátový) cyklus.

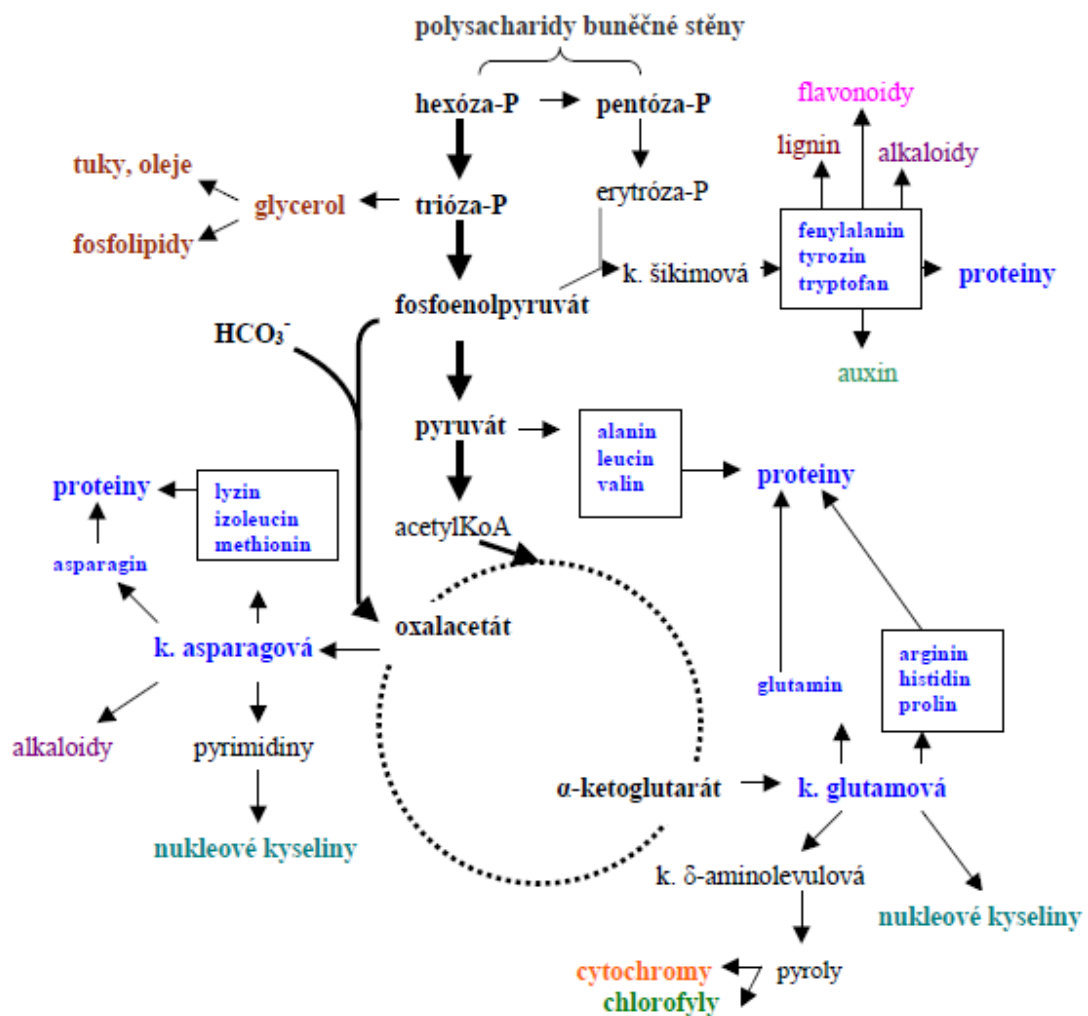
Glykolýza je především změna glukózy na pyruvát a při tom dojde ke vzniku adenosintrifosfátu (ATP) (Institut Galenus, 2018). Pyruvát je prekurzorem například pro vznik mastných kyselin, terpenoidů nebo aminokyselin (Furumoto et al., 2011). Z něho pomocí komplexu pyruvát-dehydrogenázy v mitochondriích vzniká acetyl-CoA, který se také nepřímo syntetizuje pomocí ethanolové fermentační cesty (Yui et al., 2003). Acetyl-CoA se může postupně přeměňovat transaminací na aminokyseliny. Pyruvát se může syntetizovat na různé látky. Tyto dráhy jsou znázorněny na obrázku č. 6 (Kodíček, 2004). Glykolýza je proces, který napomáhá vzniku mnoha látek a po ní následuje Krebsův cyklus (Institut Galenus, 2018). Mnoho syntetických drah, při kterých vzniká mnoho látek z pyruvátu je zobrazeno na obrázku č. 6.



Obr. 6.: Biochemické procesy vzniku různých sloučenin z pyruvátu (Kodíček, 2004)

Krebsův cyklus neboli citrátový cyklus či cyklus kyseliny citrónové je společná metabolická dráha sacharidů, lipidů a proteinů. Díky této metabolické dráze se uvolňuje nejvíce energie ze 4 fází respirace. Dochází zde k odbourávání a rozpadu

složitých látek na jednodušší. Postupně vzniká až oxid uhličitý (Břížd'ala, 2018). Největším významem této dráhy je získání energie, avšak vzniklé meziprodukty mohou být prekursory důležitých látek. Například citrát se v cytosolu štěpí na acetyl-CoA a oxalacetát a to při syntéze mastných kyselin, které vznikají ze sacharidů. Také dochází k přeměně meziprojektu malátu oxidační dekarboxylací na pyruvát a nikotinamidadenin dinukleotid (NADPH). Oxalacetát je také meziproduktem, který se zapojuje do metabolismu rostlin, a pomocí transaminace z něj opět mohou vznikat aminokyseliny. Stejně tak je to u α -ketoglutarátu. Z toho však vzniká kyselina glutamová, ze které mohou vznikat kromě aminokyselin i nukleové kyseliny (Kodíček, 2004). Nejdůležitější metabolické cykly jsou znázorněny níže na obrázku č. 7.



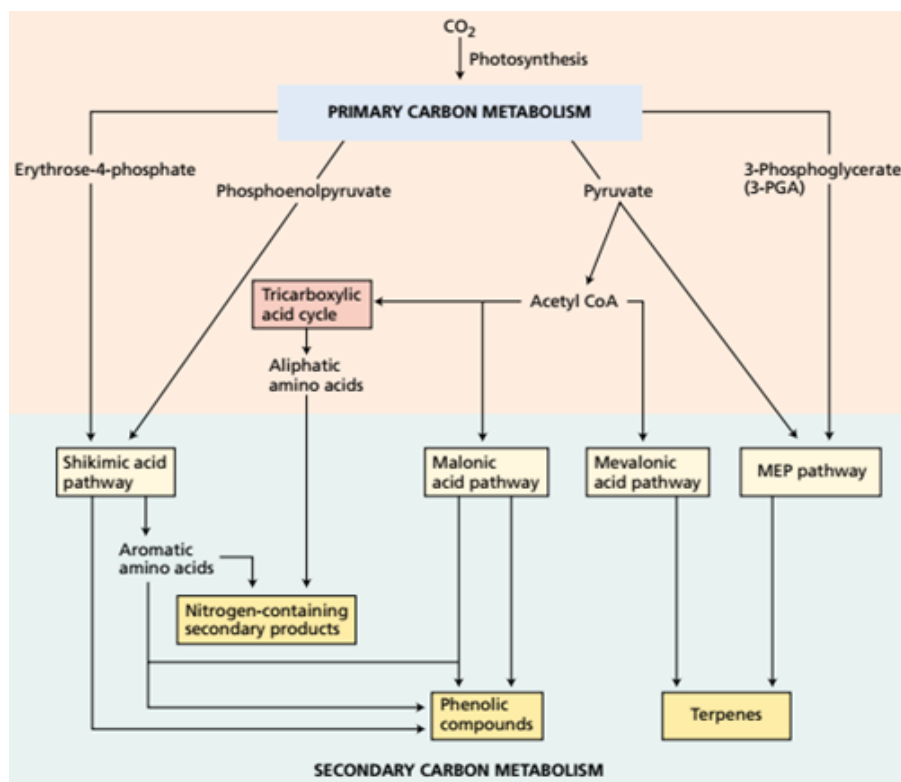
Obr. 7.: Glykolýza a Krebsův cyklus jako zdroj nově syntetizovaných metabolitů (Pavlová, 2007)

U rostlin je metabolismus primární a sekundární a ne vždy jde mezi nimi přesně určit hranice, protože jsou tyto děje hodně propojené. Primární metabolismus zahrnuje základní procesy nutné pro zabezpečení energie a stavebních složek

rostliny. Tyto procesy jsou často znázorňovány cyklickými schémata (např. citrátový cyklus, pentosový cyklus a podobně). Primárními metabolity jsou především sacharidy, tuky, proteiny, aminokyseliny a nukleové kyseliny. Tyto látky rostlina potřebuje ke správnému životu a účasti v základních biochemických reakcích. Sekundární metabolismus je spjat s primárním metabolismem a konečné produkty jsou velmi často odvozeny od primárních metabolitů. Sekundární metabolity nejsou většinou nezbytné pro život rostlin a spíše jsou pro ni užitečné. Mohou ji ochraňovat před napadením, nebo rostlina obsahuje léčivé látky, které se dají využít ve farmakologii. Také mohou být tyto látky určitou formou odpadu z těla rostliny. U některých rostlin jsou určité látky považovány za konečné sekundární metabolity a u jiných jako mezičlánek (intermediát) pro vznik jiného konečného produktu. (Novák, 2007; Krmečník et Kysilka, 2007).

1.6.1 Syntéza sekundárních metabolitů

Vznik sekundárních metabolitů pomocí syntézy je znázorněn na obrázku č. 8. Tyto látky rostlině pomáhají hlavně přežít v prostředí a být konkurenčně schopné (Verpoote et Aftermann, 2000). Sekundární metabolity se neúčastní procesů fotosyntézy nebo dýchání a každá rostlina obsahuje jiné typy těchto látek. Naopak primární metabolity jsou ve všech druzích rostlin stejné (Taiz et Zeiger, 2010).



Obr. 8.: Syntéza sekundárních metabolitů z metabolitů primárních (Taiz et Zeiger, 2010)

1.7 Působení stresu na metabolické dráhy rostlin

Při růstu rostlin se cukry často hromadí v rostlinných pletivech. To může způsobit stárnutí listů rostliny, čemuž napomáhá i stres. Toto a rostlinné hormony ovlivňují metabolismus cukrů. Zvýšené množství rostlinných sacharidů indukuje vznik fytohormonů a to hlavně ethylen a jasmonátů. Tyto hormony hodně napomáhají při senescenci rostlinných pletiv (Wingler et Roitsch, 2008). Cukry se však v rostlině nehromadí pouze při růstu, ale i jako odpověď na stresové situace (Krasenky et Jonak, 2012).

Jak již bylo dříve zmíněno, napadení rostliny hmyzím herbivorem se snižuje její fotosyntetická aktivita. Při tomto inhibování fotosyntézy se také zmenšuje účinnost fotosyntetických genů a ty tlumí fotosyntetické proteiny. Stres také ovlivňuje syntézu bílkovin, tím i enzymů, včetně nejdůležitějšího enzymu fotosyntézy (nejdůležitější v Calvinově cyklu) Rubisco. Díky tomu je ovlivněna rychlost fotosyntézy a produkce cukrů (Bilgin et al., 2010).

Proteiny u rostlin jsou během stresových situací ovlivněny na úrovni translace i post-tranlačních modifikací. Také je redukována proteosyntéza nepotřebných nebo málo potřebných bílkovin a naopak syntéza proteinových genů, které souvisejí s odpovědí na stresový podnět, je podněcována. Aby syntetizované proteiny mohly být rychle a správně poskládány, tak je indukována také syntéza tzv. heat-shock proteinů, které hrají roli při sbalení nově vznikajícího polypeptidového řetězce (Shu et al., 2011). Post-tranlační regulace proteinů zahrnují fosforylaci a defosforylaci, změnu aktivity enzymů, změnu asociace podjednotek v případě oligomerních proteinů a to vždy ve stresových podmínkách (Ehness et al., 1997).

Stres může negativně působit i na množství aminokyselin, které jsou stavební částí proteinů. Při malém množství aminokyselin v rostlině dochází k degradaci nepotřebných proteinů, z nichž se pomocí proteás získávají volné aminokyseliny (Hammond et al., 2011). Ty slouží rostlině i jako obranný mechanismus. Například volný prolin stabilizuje membránové struktury a pomáhá při detoxikaci reaktivních forem kyslíku a také působí jako osmoticky aktivní látka. Tato aminokyselina je ve vyšších koncentracích v částech rostliny, které jsou podrobeny stresu (Shu et al., 2011). Je důležité vědět, co se s aminokyselinami děje ve stresovaných rostlinných pletivech, protože mohou ovlivňovat syntézy některých enzymů (Rai, 2002).

1.8 Zelí hlávkové bílé (*Brassica oleracea convar. Capitata var. alba*)

Rostlina, která se řadí do skupiny košťálové zeleniny a do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Hlávkové zelí vzniklo z planě rostoucí brukve zelné, která normálně roste okolo Středozemního moře a části Atlantiku (Malý, 2003). Odtud byla tato rostlina také odvezena a byly z ní postupným křížením získány formy jako zelí, kapusta a další (Šapiro et al., 1988). Tyto druhy mají žlutý čtyřčetný květ a plodem je šešule. Konzumní částí rostliny je tzv. košťál, který se dělí na vnitřní a vnější. Vysoký vnitřní košťál udržuje pevnou hlávkou a vnější je tvořen převážně listy, květenstvím, hlavními nebo bočními pupeny či osními hlízkami, které jsou zpracovávány v potravinářském průmyslu (Malý, 2003).

Zelí používali při vaření již staří Řekové na přelomu 4. a 3. století před naším letopočtem. Staří Římané zelí dokonce povýšili nad všechny zeleniny a to nejen v kuchyni, ale i v léčitelství. Také ve středověku bylo považováno za jednu z nejdůležitějších potravin (Štěpničková, 2016).

Zelí má velmi vysokou nutriční hodnotu a je bohaté na vitaminy, minerální látky, bílkoviny, organické kyseliny a také vlákninu. Obsahuje hodně vitamínu C, E a S-methylmethioninu (dříve označován jako vitamin U), A, B1, B2 i K. Obsahuje také velké množství minerálních látek a to především fosforu, draslíku, hořčíku, síry, vápníku, železa a také zinku (Nový, 2014).

Rostliny z čeledi brukvovitých celkově obsahují mnoho látek ve svých pletivech a po napadení býložravcem aktivují různé obranné mechanismy, které vedou ke kvantitativní nebo kvalitativní změně ve výrobě jak primárních, tak sekundárních metabolitů. Tyto rostliny uvolňují signalizační molekuly, jako jsou hlavně kyselina jasmonová a salicylová, které způsobují přímou, nebo nepřímou aktivaci metabolických cest. To ovlivňuje produkci fyto-sloučenin, jako jsou sacharidy, aminokyseliny, organické sloučeniny, fenoly, glukosinoláty a proteiny. Tyto látky mají v rostlině antimikrobiální, antioxidační a antikarcinogenní vlastnosti. Také mohou působit antinutritivně ve stravě (Jahangir et al., 2009).

1.9 Organické kyseliny v hlávkovém zelí a jejich vlastnosti

Hlávkové zelí obsahuje velké množství organických látek, jako jsou vitaminy, bílkoviny, minerální látky, sacharidy, lipidy, kyseliny a další. V této kapitole budou zmíněny nejdůležitější organické kyseliny, které byly zkoumány.

1.9.1 Kyselina šťavelová

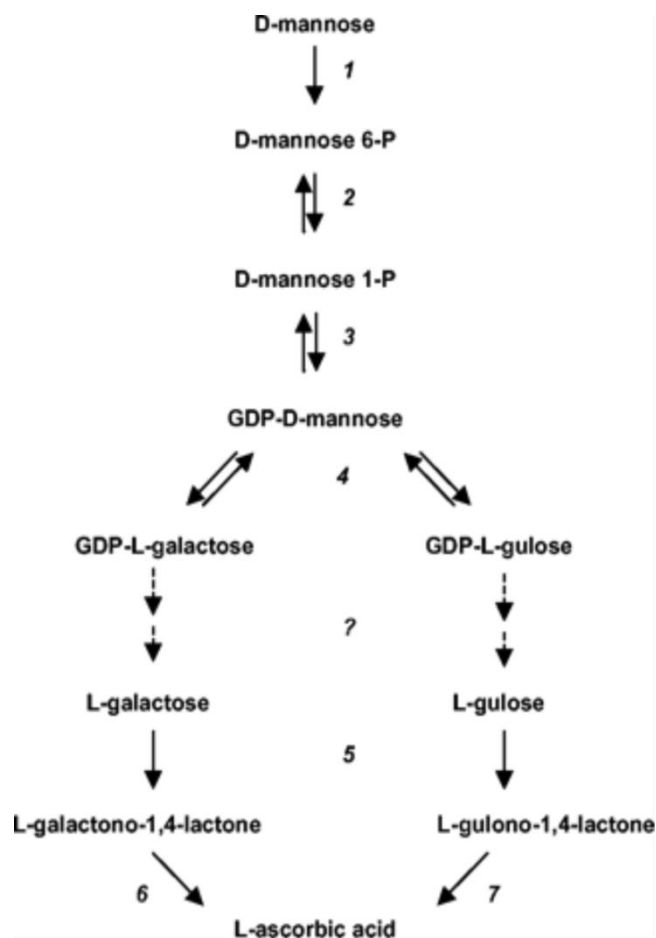
Kyselina šťavelová je silná dikarboxylová organická kyselina, kterou syntetizují jak rostliny, tak i bakterie, houby a někteří živočichové (Liang et al., 2015). Kyselina šťavelová (oxalová) je v rostlinách přítomna v listech, kořincích, stoncích, plodech i semenech a je nejpravděpodobněji nejsilnější organickou kyselinou v rostlinách. Vzniká nejspíše třemi možnými způsoby. Prvním je oxidace glykolátu nebo glyoxylátu při fotoreceptci, druhým je rozpad oxalacetátu, který je pravděpodobně katalyzovaný oxalacetázou a nebo třetí možností, kterou je rozpad kyseliny askorbové. Tato sloučenina reaguje s kationty, což vede ke vzniku šťavelanů (oxalátů). Kyselina šťavelová a šťavelany jsou v rostlinách syntetizovány v různých množstvích (Prasad et Shivay, 2017).

Nerozpustný oxalát vápníku (šťavelan vápenatý) hraje důležitou roli při regulaci vápníku, což je důležité pro správné fungování obrany rostliny. Oxalát vápníku je nejhojnější nerozpustný minerál tvořící různě velké částice v rostlinách. Tyto krystaly se hromadí nejvíce v plášti, který obklopuje sekundární cévní svazky v listech. Herbivoři, kteří konzumují krystaly oxalátu vápenatého, rostou pomaleji, nebo se jejich růst zpomalí úplně na určitou dobu. Také se může stát, že živočichové konzumující přemíru této obranné nerozpustné látky mohou umřít (Korth et al., 2006). Tato sloučenina brání rostlinu nejen proti herbivorům, ale také proti toxicitě hliníku, který se dostává do rostlin rostoucích na kyselých půdách (Prasad et Shivay, 2017).

1.9.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová, nebo také vitamin C je důležitým primárním metabolitem rostlin, který působí jako antioxidant, enzymový kofaktor a modulátor buněčné signalizace v celé řadě klíčových fyziologických procesů, včetně biosyntézy buněčné stěny, sekundárních metabolitů a fytohormonů. Tato látka zvyšuje u rostliny odolnost proti stresovým situacím vzniklým biotickým stresem. Také má tato látka fotoprotektivní vlastnosti a napomáhá správnému dělení buněk (Wolucka et al., 2005). Hmyz ji nedokáže ve svém těle syntetizovat, a proto musí živočichové vitamin C do svého těla dostávat ze stravy, která je nejvíce složena u herbivorů z pletiv nebo šťáv rostlin (Kerchev et al., 2013).

Vznik této kyseliny probíhá dvěma různými způsoby – L-galaktózová cesta a L- gulózová cesta. Tyto cesty jsou znázorněny na obrázku č. 9 (Wolucka et al., 2005).



Obr. 9.: Dvě cesty biosyntézy L-askorbové kyseliny (vitamin C) (Wolucka et al., 2005)

Nedostatek vitamínu C v rostlinách však způsobuje jejich předčasné stárnutí. Množství této látky v rostlinách často ovlivňuje methyljasmonát (Wolucka et al., 2005). Kyselina askorbová je nezbytná pro nutriční a antioxidační funkce u fytofágního hmyzu, ale jen v určitém množství. Při zvyšování množství této sloučeniny dochází k problémům s trávením rostlinného pletiva ve střevech hmyzu. Oxidace kyseliny askorbové produkuje aktivní druhy kyslíku, které jsou také ochrannou složkou v rostlině (Duffey et Stout, 1996). Tato kyselina ovlivňuje i aniony supeoxidových radikálů, hydroxylový radikál, peroxid vodíku a singletový kyslík v rostlinném pletivu, které se také účastní ochranných a obranných reakcí rostliny (Wolucka et al., 2005).

1.9.3 Kyselina citrónová

Organická trikarboxylová hydroxokyselina, která je jako jedna z nejčastějších obsažená v rostlinách a to hlavně v kyselých plodech jako jsou citróny. Najdeme ji však i v bramborách, obilí a dokonce i v mase a mléce (Lapčík et al., 2015; Davídek et al., 1983).

Cyklus kyseliny citrónové je jednou z hlavních metabolických cest, kterou využívají buňky k úplné oxidaci energetických složek na oxid uhličitý a vodu (Sokic-Lazic et Minter, 2008). Množství kyseliny citrónové se v rostlině odvíjí i od toho, zda je vše v rovnováze. V tu chvíli metabolismus funguje jak má a neprobíhá nadměrná, nebo naopak umírněná syntéza této látky (Pagagianni, 2007).

Je prokázáno, že u rostlin, které jsou vystaveny stresu, se množství kyseliny citrónové zvýšilo a to během pár hodin. Toto navýšení probíhalo exponenciálně (Sun et Hong, 2011).

Kyselina citrónová u brukvovitých rostlin napomáhá větší rezistenci vůči těžkým kovům v půdě. Obzvláště proti kadmii, které poškozuje kořenové buňky prostřednictvím cytoplazmatického smrštění a usazování kovů. Kyselina citrónová pomáhá obnovovat tvar a strukturu rostlinných pletiv (Najeeb et al., 2011). Dokonce napomáhá rostlinám při růstu, když se pod stresovou námahou zastaví v nějakém stadiu (Najeeb et al., 2009).

Také inhibuje růst bakterií, které se nalézají v půdě. Dokáže tyto organismy dokonce usmrtit. I v malých koncentracích se na místech, kde byla použita kyselina citrónová, neobjevily žádné živé bakterie (Phillips, 1999).

1.9.4 Kyselina fumarová

Jedná se o 2-butendiovou kyselinu, která patří mezi nenasycené dikarboxylové kyseliny (Davídek et al., 1983).

Kyselina fumarová se objevuje v rostlině po snížené metabolické aktivitě v Krebsově (citrátovém) cyklu. Toto omezení nejčastěji vyplývá ze stresové reakce, která proběhne v rostlinném pletivu (Pedreschi et al., 2009). Rostliny kumulují kyselinu fumarovou ve svých pletivech ve dne a v noci toto množství klesá. Odvozená sloučenina fumarát nejspíše slouží k udržování správného pH rostliny. Nejvíce fumarátu obsahují rostliny, které se nacházejí na podloží bohatém na dusík, nebo jsou tyto rostliny hnojeny (Pracharoenwattana et al., 2010).

Kyselina fumarová působí stejně jako kyselina citrónová antibakteriálně. Působí inhibičně na růst bakterií a to především proti patogenním bakteriím (He et al., 2011).

Sucho dohromady s atakem hmyzu způsobuje snižování metabolitů v rostlinném pletivu. Snižuje se množství jak primárních, tak i sekundárních metabolitů u brukvovitých rostlin (Gutbrodt et al., 2011).

1.10 Aminokyseliny v hlávkovém zelí a jejich vlastnosti

Aminokyseliny jsou základními složkami syntézy bílkovin a také jako prekurzory pro vznik sekundárních metabolitů (Vered et Gad, 2010). Aminokyseliny, a to především esenciální aminokyseliny, jsou nezbytnou složkou potravy všech živočichů. Jedná se především o cystein, isoleucin, leucin, lysin, tyrosin a valin. Čtyři esenciální aminokyseliny isoleucin, lysin, methionin a threonin vznikají z aspartátu. Tyto aminokyseliny nejsou pouze prekurzory pro sekundární metabolity, ale i pro vznik fytohormonů, jako je například ethylen (Georg et Vijay, 2010).

Jako obrana proti herbivorům fungují v rostlinách neproteinové aminokyseliny, které mohou mít přímé toxické účinky. Tyto účinky jsou podpořeny nesprávným zařazením látky do proteinů, obstrukcí primárního metabolismu a interferencí s hmyzími neurologickými procesy. Některé tyto aminokyseliny také dovolují rostlině ukládání dusíku v pletivech v nepoživatelné formě pro býložravce (Huang et al., 2011).

1.10.1 Asparagová kyselina

Asparagová kyselina neboli aspartát je tvořen transaminací oxalacetátu a může být odvozen z Krebsova cyklu působením fosfoenolpyruvát karboxylázy nebo fosfoenolpyruvát karboxykinázy (Azevedo et al., 2006). Je to neesenciální kyselina, která hraje důležitou roli při syntéze jiných aminokyselin a také v cyklu kyseliny citrónové. Jsou z ní například syntetizovány asparagin, arginin, lysin, methionin a isoleucin (Anonym, 2004). Slouží jako důležitá transportní a skladovací molekula dusíku v rostlinách. Když je rostlina vystavena stresu, dochází k rozpadu aminokyseliny a dusík je transportován do obranných mechanismů (Bolton, 2009).

1.10.2 Glutamová kyselina

Glutamová kyselina, označovaná též jako glutamát, je neesenciální aminokyselina patřící do skupiny proteinogenních aminokyselin (Anonym, 2004). Tato látka je katalyzována glutamátovou dekarboxylázou a 1-pyrrolin-5-karboxylát syntetázou. Při stresových situacích se z ní syntetizuje kyselina γ -aminobutyrová (GABA) a prolín (Liu et al., 2011).

1.10.3 Asparagin

Je to kódovaná neesenciální aminokyselina, která vzniká ligasovou reakcí amidací karboxylové skupiny kyseliny asparagové. Jejím odbouráváním vzniká v rostlině

oxalacetát (Kodíček, 2004). Tato látka je obecný transportér dusíku v rostlině a má klíčovou úlohu v procesu transaminace. Při napadení rostliny býložravcem se jeho koncentrace zvyšuje a to tak, že na asparagin se přenáší dusíkové ionty, které byly obsaženy v leucinu a isoleucinu (Gargallo-Garriga et al., 2010).

1.10.4 Glutamin

Glutamin je neesenciální kódovaná aminokyselina, která je amidem kyseliny glutamové. U rostlin tvoří zásobu metabolického dusíku. Je syntetizována amidací γ -karboxylové skupiny kyseliny glutamové (Kodíček, 2004). Množství glutaminu se po napadení rostliny býložravcem zvyšuje a sám je následně použit pro výrobu sekundárního metabolitu, který brání živočichovi v dalším napadání (Jyothsna et al., 2009).

1.10.5 Histidin

Látka, která se řadí do skupiny esenciálních a kódovaných aminokyselin se nazývá histidin. Tvoří často součásti aktivních center mnoha enzymů. Dekarboxylací této sloučeniny vzniká histamin (Kodíček, 2004). V rostlinách je důležitý pro vyrovnání se se stresem vzniklým po vystavení těžkým kovům a to především zinku a niklu. Po takové stresové situaci se tato aminokyselina v rostlinných pletivech hromadí a váže tyto rezidua kovů na sebe (Fišer et al., 2014). Po napadení rostliny býložravcem se však množství histidinu snížilo a docházelo ke zvyšování koncentrací jiných aminokyselin, jako jsou například prolin, tyrosin, nebo valin (Ángeles-López et al., 2016).

1.10.6 Glycin

Glycin, nejjednodušší aminokyselina, je neesenciální a je syntetizovaná ze serinu nebo glyoxylátu (Kodíček, 2004). Je to látka, která je důležitá při vzniku chlorofylu, je kumulovaný v cytoplazmě a chrání buňky před odvodněním. Tato látka se účastní mnoha metabolických přeměn, jako jsou například syntéza purinových zásad, porfyrinových barviv, nebo syntézy betainu (Kubíčková, 2016). Glycin betain je látkavyskytující se v rostlinách po vystavení stresové situaci (Chen et Murata, 2011).

Glycin si hmyzí zástupci mohou syntetizovat sami ve svých tělech a při okusu rostlin ho mohou vypouštět slinami do napadených rostlinných pletiv. Tím zabraňují rozpadu lyzinu, který musí do svého těla tímto způsobem dostávat. Glycin inhibuje aktivitu oleuropeinu, který se po napadení herbivorem v rostlině syntetizuje a díky této látce dochází k rozpadu již zmiňovaného lyzinu (Konno et al., 2009).

1.10.7 Threonin

Threonin je kódovaná esenciální glukogenní aminokyselina se dvěma chirálními uhlíky. Tato látka vzniká fosforylací homoserinu. Sám je pak prekurzorem pro vznik glycinu a izoleucinu (Mihulka, 2018). Rostliny se proti herbivorii brání tak, že enzym threonin-deamináza rozkládá ve střevech hmyzu aminokyseliny arginin a threonin na α -ketobutarát a amoniak. Poté co býložravci pozřou rostlinné pletivo obsahující tyto látky, může se u nich objevit karcinom střeva (Gonzales-Vigil et al., 2011).

1.10.8 Arginin

Nejbazičtější látka, která patří do skupiny kódovaných, glukogenních a neesenciálních aminokyselin je arginin (Kodíček, 2004). Je stejně jako threonin degradován enzymem threonin-deamináza, ale také enzymem argináza. Poté co jsou tyto aminokyseliny rozloženy, už je hmyz nedokáže změnit zpět a následně trpí nedostatkem těchto živin, které si sám nedokáže syntetizovat ve svém těle (Felton, 2005). Arginin je také prekursor pro syntézu putrascinu a polyaminů. To jsou látky, které se v rostlině účastní různých fyziologických pochodů, jako je například buněčné dělení, růst, diferenciaci a také jsou zapojeny do obranné odezvy rostlin a to jak na biotický, tak i abiotický stres. Polyaminy také indukují produkci oxidu dusnatého, který je významným mezibuněčným poslem s mnoha regulačními funkcemi (Adámková et Petřivalský, 2012).

1.10.9 Alanin

Alanin je aminoproteinová látka, která se řadí do skupiny kódovaných, glukogenních a neesenciálních aminokyselin (Kodíček, 2004). Je to sloučenina, jež stimuluje syntézu chlorofylu a zvyšuje aktivitu fotosyntézy. Tato látka je důležitá i pro kumulaci těžkých kovů v rostlinách. Alanin spoluvytváří komplexy fytochelatinů, které na sebe ionty těžkých kovů vážou (Tlust'oš et al., 2006). Proti napadení býložravcem se rostlina brání zvyšováním množství alaninu, tak dochází k rozpadu lyzinu, který hmyz potřebuje pro svůj růst. Samozřejmě tomuto průběhu napomáhají i rostlinné enzymy (Konno et al., 2010).

1.10.10 Tyrosin

Tyrosin je aromatická kódovaná ketogenní aminokyselina, která je spíše neesenciální, ale vzniká modifikací z esenciální aminokyseliny fenylalaninu (Smejkal, 2018). Tuto sloučeninu rostliny hromadí hlavně v mladých částech svých těl v reakci na napadení herbivorem. Živočichové se spíše zaměřují na mladší části rostlin, které v sobě mají hodně živin a jsou měkčí. Tyrosin snižuje nutricitu rostlinných pletiv a hmyz poté strádá a roste pomaleji (Lokvam et al., 2006).

1.10.11 Valin

Valin je kódovaná esenciální glukogenní aminokyselina (Kodíček, 2004). Po napadání rostlin býložravci se množství této látky v rostlinných pletivech markantně a prokazatelně zvyšuje. Neovlivňuje to pouze stres způsobený herbivory, ale k násobení množství valinu dochází i po napadení rostlin patogenem (Ángeles-López et al., 2016).

1.10.12 Methionin

Methionin je sloučenina, která se řadí mezi esenciální glukoplastické aminokyseliny. Prekurzorem pro vznik methioninu je asparát, který se přes různé meziprodukty vyvíjí v tuto látku (Pešková, 2011). Z něj se syntetizují glukosinoláty, což jsou sekundární metabolity s význačnými ochrannými účinky. Glukosinoláty mohou občas vznikat i z valinu nebo isoleucinu, ale z methioninu vznikají nejčastěji (Schranz et al., 2009).

1.10.13 Fenylalanin

Fenylalanin je kódovaná esenciální aminokyselina, jejíž postranní řetězec je výrazně hydrofóbní. Když se tato látka odbourává, vzniká tyrosin (Kodíček, 2004). Tato sloučenina slouží v napadené rostlině jako prekurzor pro fenylacetonitril, který tvoří obranný mechanismus rostliny před herbivorií (Noge et Tamogami, 2013). Také bylo zjištěno, že enzym fenylalanin amoniak-lyáza má zvýšenou aktivitu po biotické stresové situaci, což stimuluje obranné systémy (Hu et al., 2009).

1.10.14 Isoleucin

Esenciální aminokyselina, která svými vlastnostmi připomíná leucin a valin je isoleucin (Pešková, 2011). Konjugace této aminokyseliny s kyselinou jasmonovou (JA) zvyšuje aktivitu JA. Díky ní dochází v rostlině k různým metabolickým drahám, z nichž jako produkty vycházejí sekundární metabolity, které slouží k obraně rostliny (Woldemariam et al., 2012).

1.10.15 Leucin

Tato sloučenina je kódovaná esenciální ketogenní aminokyselina, která obsahuje hydrofóbní postranní řetězec. V bílkovinách tvoří tzv. leucinový zip, což je spojení mezi bílkovinami mezi α -helikálními úseky (Kodíček, 2004). Obranný mechanismus u této látky zajišťuje enzym leucinová animopeptidáza (LAP), která hraje přímou obrannou roli proti herbivorům. LAP má antinutritivní účinek ve střevech hmyzu, a tak živočichové, kteří požívají rostlinná pletiva s touto látkou, strádají. Tento enzym uvolňuje leucin a také arginin. Tato látka také reguluje signální dráhu zprostředkovanou jasmonovou kyselinou, která je velmi důležitá v obraně rostlin (Lomate et al., 2013).

1.10.16 Lysin

Lysin je esenciální kódovaná ketogenní aminokyselina, která má bazický charakter (Kodíček, 2004). Po napadení rostliny býložravcem se množství této aminokyseliny zvýšilo, ale není určeno, zda má tato látka protektivní účinky (Gómez et al., 2012).

1.11 Proteiny a jejich vlastnosti

Rostliny na působení stresu odpovídají tvorbou stresových proteinů, které jsou i za normálních okolností přítomné v buňce, ale v menším množství. Po stresové situaci se jejich počet mnohonásobně zvýší (Procházka et al., 1998). Nejdůležitější proteiny, které jsou spojovány s biotickým stresem u rostlin, jsou PR proteiny (pathogenesis related proteins), které se dělí do několika skupin (Lotan et al., 1989). V dnešní době jsou tyto látky děleny do 17 skupin podle vlastností a funkcí (Ebrahim et al., 2011). Jsou kódovány indukovanými geny (Fernandes et al., 2013). Jsou to nízkomolekulární proteiny extrahovatelné a stabilní při nízkém pH, termostabilní a vysoce rezistentní vůči proteázám. Tyto sloučeniny mají velmi kompaktní strukturu, což způsobuje jejich velkou odolnost. Největší akumulace těchto proteinů je v apoplastu buňky, ale vyskytují se i v buněčných stěnách (Edreva, 2005).

PR proteiny byly poprvé objeveny v listech tabáku (*Nicotiana tabacum*), které byly infikovány virem mozaiky tabáku. Následně byly identifikovány v mnoha dalších rostlinách, které byly vystaveny stresu (Kaur et al., 2017).

Po napadení rostlin se do otevřených ran mohou dostat různé infekce a rostlina se posléze musí bránit i tomu. K tomu slouží spolu s dalšími látkami PR proteiny (Heřmanová et al., 2006). Většina z nich je indukována účinkem signálních molekul jako jsou kyselina salicylová, jasmonová, nebo etylen (Loon et al., 2006). Mohou aktivovat geny, které kódují různé proteiny. PR proteiny se často hromadí v poškozených částech rostliny a postupně se dostávají pomocí rostlinných přenašečů i do jiných orgánů. Díky tomu může dojít k zabránění napadení neponičených pletiv herbivorem (Ebrahim et al., 2011). Mohou také indukovat systémově získanou rezistenci a mohou zabraňovat dalšímu napadání, nebo rozvoji infekce (Musidlak et al., 2017). Uvedené proteiny rostlina neobsahuje pouze pro obranné mechanismy, ale jsou důležité i pro její normální růst a vývoj. Po poškození rostlinných pletiv se však tyto látky akumulují a zvětšují své koncentrace. Mohou se také podílet na syntéze sekundárních metabolitů, které jsou v obranných mechanismech rostlin velmi důležité a hrají nejspíše nejdůležitější roli (Fernandes et al., 2013).

PR proteiny mohou působit jako hydrolázy, peroxidázy, chitinázy, antifugální látky, inhibitory proteázy a podobně (Kaur et al., 2017). Těchto proteinů je veliké množství a neustále jsou objevovány další a další látky, které se musí klasifikovat

a řadit do skupin podle účinnosti a složení (Heřmanová et al., 2006). Nejvýznamnějších je prvních 5 skupin PR proteinů. Ty mají inhibiční účinky proti mykotickým infekcím i biotickému a abiotickému stresu (Sudisha et al., 2011). Nejvíce je však probádána antifugální aktivita těchto látek, která ale často souvisí s tím, že herbivoři usnadňují vstup těchto infekcí přes poškozená pletiva, která napadají.

Proteiny PR-1

Tyto proteiny jsou často využívány jako markery pro studování indukované rezistence rostlin. Objeveny byly v tabáku (*Nicotiana tabacum*) a později i v mnoha dalších rostlinách (Heřmanová et al., 2006). Bylo dokázáno, že tento protein napomáhá rostlinám při obranných reakcích a sám je indukován pomocí kyseliny salicylové. Některé sloučeniny ze skupiny PR-1 proteinů jsou součástí hypersenzitivní reakce rostlin a mohou způsobovat i buněčnou smrt. Tyto látky však nejsou zapojeny pouze do obranných mechanismů rostliny, ale jsou důležité i pro její správný růst a vývoj (Rivière et al., 2018). Jsou to látky se stabilní strukturou, které jsou velmi odolné (Heřmanová et al., 2006). Homology těchto rostlinných proteinů byly nalezeny u hub, hmyzu i obratlovců (Pečenková et al., 2017).

Proteiny PR-2

PR-2 proteiny hrají také důležitou roli v obraně rostlin proti biotickému stresu. Tyto látky jsou závislé na kyselině abscisové, která inhibuje jejich funkci. Čím méně je tedy této kyseliny v rostlině, tím více ochranných proteinů se zde nachází. Naopak kyselina salicylová stejně jako u první skupiny proteinů funkci těchto sloučenin indukuje (Oide et al., 2013). Dále mají opět významnou úlohu proti houbovým patogenům, které pronikají ranami vzniklými po okusu rostlin býložravci. Mechanismem účinku je hydrolýza struktury glukanu, které obsahují buněčné stěny houbových patogenů, což následně vede k lyzi buněk (Heřmanová et al., 2006).

Proteiny PR-3

Tyto látky vykazují endochitinasovou aktivitu, což znamená, že pomocí enzymů narušují chitin v buněčných stěnách hub a opět tedy působí antifugálně (Heřmanová et al., 2006). Buněčná stěna s chitinem se pak oslabí a zvyšuje se osmotická citlivost té houby. Funkce těchto látek je regulována methyljasmonátem, ethylenem a gibereliny. Tato látka je také významnou sloučeninou při ochranných mechanismech rostlin proti býložravému hmyzu. Tyto proteiny však nepůsobí pouze proti biotickým stresům, ale i proti abiotickým. V rostlinných pletivech znásobují své množství především po vystavení velké koncentraci solí (Tang et al., 2017).

Proteiny PR-4

Opět se jedná o látky, které mají schopnost vázat se na chitin v buněčných stěnách hub. Tyto proteiny jsou velmi stabilní a vykazují vysokou odolnost vůči extrémnímu pH a také proti degradaci proteázami (Heřmanová et al., 2006). Působí však i na viry, které pronikají poničenými pletivy. Během nekrotické fáze se proteiny PR4 v rostlinných pletivech hromadí a bojují s infekcí (Guevara-Morato et al., 2010). Nepůsobí však pouze proti houbám, ale jako DNaza a RNaza proti napadení rostlin hmyzími škůdci (Singh et al., 2018). Tato látka je nejčastěji v rostlinách indukována pomocí rostlinného hormonu ethyleny (Guevara-Morato et al., 2010).

Protein PR-5

Skupina těchto látek je v rostlinách opět indukována po napadení býložravcem a následném proniknutí patogenu do rostlinného pletiva (Prasath et al., 2014). Syntéza těchto látek je zprostředkovávána hlavně pomocí methyljasmonátů, které se velmi často účastní syntézy sekundárních metabolitů rostlin. Tyto látky jsou velmi podobné traumatinu, což je protein intenzivně sladké chuti a nízké molekulové hmotnosti (Misra et al., 2016). Některé proteiny z této skupiny mohou působit změny v permeabilitě membrán, což může způsobovat až apoptózu. Velmi dobře působí proti houbovým patogenům a již se některé z nich využívají v lékařství a farmacii (Heřmanová et al., 2006).

2 Metodika

2.1 Popis experimentu

Semena bílého zelí (*Brassica oleracea convar. capitata*) byla zaseta 10. června do minisadbovačů. Přibližně po dvou týdnech, byly malé rostliny přesazeny do větších sadbovačů, což byly jednotlivé květináčky o rozměrech 5x5x5 cm. V těchto květináčích byl použit substrát složený z běžné zahradní zeminy, univerzálního substrátu a agropertilu. Tyto části byly v poměru 2:2:1. Zelí se zalévalo kohoutkovou a destilovanou vodou a bylo umístěno v pěstební komoře Fytotronu při patnáctihodinové periodě. Teplota při kultivaci činila 22 °C přes světelnou fázi a 17 °C přes fázi temnotní.

Následně probíhal odchyt škůdců na poli patřící družstvu Agrospol Bolehošť, které lze vidět na obrázku č. 10.. Na tomto poli byly rostliny zelí, které byly hodně napadeny dřepčíky (*Phyllotreta sp.*). Na jejich odchyt byly použity exhaustory.



Obr. 10.: Pole společnosti Agrospol Bolehošť (foto Radka Čechová)

Škůdci byli spolu s vzrostlým zelím umístěni 17. července do průhledných plastových boxů o objemu 29 litrů, které byly vybaveny větracími sítkami a zálivkovou hadičkou. Na dnech těchto boxů byl nasypán agropertil, aby nemohlo dojít při zalévání k utonutí škůdců. Pokus zahrnoval celkem 9 boxů. 3 boxy byly kontrola, která obsahovala pouze rostlinky zelí bez napadení. Do dalších boxů již byli umístěni dřepčíci a to tak, že ve třech boxech bylo po padesáti jedincích, což značilo nižší napadení a v dalších třech bylo sto brouků, kteří vytvářeli vyšší míru napadení rostlin. Kontrolní boxy byly ponechány 3 dny v klimaboxu, aby rostliny ještě povyroستly a tvořily v sobě látky odpovídající normálnímu okolnostem. Boxy s vyšší a nižší mírou napadení dřepčíky byly v klimaboxu ponechány 4 dny, aby bylo napadení na rostlinách co největší a v pletivech se co nejvíce měnily koncentrace primárních metabolitů. Boxy jsou zobrazeny na obrázku č. 11.



Obr. 11.: Boxy s rostlinami a škůdci (foto Radka Čechová)

Po uplynulých třech dnech byly odebrány listy z kontrolních rostlin a byly utvořeny vzorky pro analýzy. Následující den bylo to samé provedeno s poškozenými listy napadených rostlin ve zbývajících boxech. Listy napadené herbivory jsou zobrazeny na obrázcích č. 12 a 13.



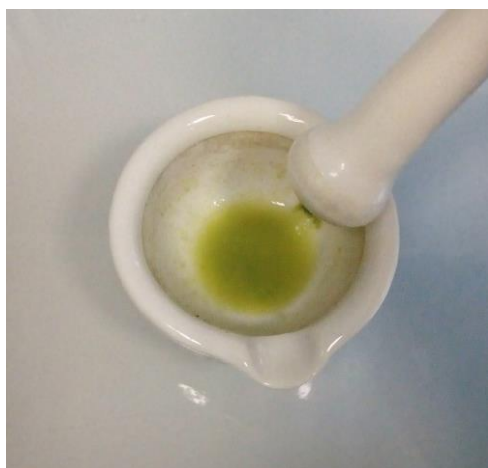
Obr. 12 a 13.: Listy hlávkového zelí s napadeným pletivem (foto Radka Čechová)

Postupy pro zhotovení vzorků budou popsány níže u přesně sledovaných látek. V poškozených listech byly sledovány látky jako rozpustné proteiny, kyselina salicylová, organické kyseliny (fumarová, šťavelová, citronová a askorbová) a vybrané aminokyseliny. Tyto látky se zjišťují z různě upravených rostlinných materiálů. Pro zjištění množství rozpustných proteinů se používá spektrofotometr, který stanovuje tyto látky z čerstvého rostlinného materiálu. Pro zjištění aminokyselin je třeba analyzovat sušinu a pro organické kyseliny je nutné zajistit mražený materiál.

2.2 Příprava vzorků a metody stanovení

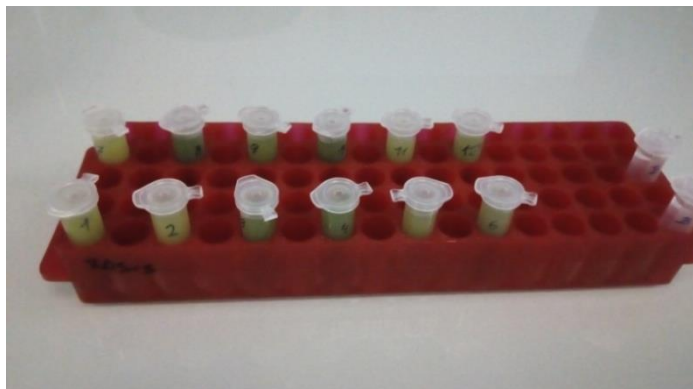
2.2.1 Rozpustné proteiny

Příprava vzorků z rostlin napadených dřepčíky probíhala dle Bradforda (Dučaiová et al., 2016). Po odebrání listů z rostliny z nich bylo naváženo množství 0,1 g čerstvé hmotnosti na analytických vahách. Tato část zeleného orgánu byla rozetřena spolu s pískem ve 2 ml fosfátového pufru, který vznikl smícháním K_2HPO_4 a KH_2PO_4 v poměru 1:1. Vzniklá směs je zobrazena na obrázku č. 14.



Obr. 14.: Rozetřený napadený list hlávkového zelí v misce s tloučkem (foto Radka Čechová)

Vzniklá směs byla slita do mikrozkušavek, které byly umístěny do centrifugy na 15 minut při 4 °C a 15 000 otáčkách. Tyto mikrozkušavky lze vidět na obrázku č. 15. Odstředěná směs byla z centrifugy vyndána a 30 μ l supernatantu se smíchalo s 970 μ l Bradfordova činidla. Tato směs se nechala 10 minut odstát a následně se měřila absorbance na spektrofotometru při 595 nm v plastových semi-mikro kyvetách. Hodnoty absorbance byly převedeny na hodnoty koncentrace.



Obr. 15.: Mikrozkušavky se vzniklou směsí před centrifugací (foto Radka Čechová)

Hodnoty koncentrace z absorbance se zjišťují pomocí dané rovnice, která je:

$$y = 0,5355x + 0,0164 \text{ [mg/30 } \mu\text{l]}.$$

Hodnoty absorbance se dosadí za hodnotu y a hodnota x, která vyjde, se musí ještě přepočítat na správné jednotky. To se provádí pomocí trojčlenky. Víme, že ve 2 ml supernatantu bylo rozetřeno 0,1 g listů. V 30 μl se tedy nacházelo 0,0015 g rozetřených listů. My jsme však potřebovali zjistit, kolik rozpustných proteinů se nachází v 1 gramu čerstvé hmotnosti rostlinného pletiva. Z předchozího propočtu víme, že v 0,0015 g se nachází množství x, které jsme již vypočítali. Tuto hodnotu pouze přepočítáme na hmotnost jednoho gramu v čerstvé hmotě poškozených, nebo i zdravých listů (kontrola).

2.2.2 Aminokyseliny

Příprava vzorků pro všechny analýzy aminokyselin byla provedena podle HPLC metody (Dučaiová et al., 2016). Odebrané listy se uložily do papírových sáčků a následně do sušárny na 24 hodin při 80 °C. Následně byla usušená hmota rozemleta a 0,1 g sušiny se nasypalo do 15 ml zkumavek. K suchému rozdrcenému rostlinnému pletivu bylo přidáno 10 μl 10Mm norvalinu a 1,5 ml nedenaturovaného 70% ethanolu. Takto vzniklá směs se 15 minut třepala a následně byla uložena do termobločku. U zkumavky se muselo pootevřít víčko, aby nevznikl přetlak a vařilo se to 10 minut při 120 °C. Posléze byly zkumavky se směsí vyndány a nechaly se postupně vychladnout. Poté byly umístěny do centrifugy na 5 minut při 4 000 otáčkách. Rotor centrifugy je zobrazen na obrázku č. 16. Vzniklý supernatant se odlil do mikrozkušavek a nechal se v centrifuze ještě jednou odstředit při 13 000 otáčkách po dobu 3 minut. Již hotový supernatant se přelil do 1,8 ml vialek a nechal se v nich odpařit při 60 °C. Toto odpařování probíhalo v dusíkové atmosféře.

Do původní 15 ml zkumavky se přidal 1 ml ethanolu a pokračovalo se jako v předchozím případě. Prvně byla směs umístěna do centrifugy na 5 minut při 4 000 otáčkách, supernatant byl slit a opět centrifugován při 13 000 otáčkách po dobu 3 minut. Změnou zde je pouze to, že se již vzniklý supernatant nevaří, ale přidává se stále do stejných vialek. Tento postup se následně opakoval ještě jednou celý. Odpařené vialky se vzniklou směsí se uzavřely a uchovaly v chladu. Pro analyzování se tato směs musela rozpustit v 0,5 ml mobilní fáze.



Obr. 16.: Centrifuga bez vzorků (foto Radka Čechová)

2.2.3 Organické kyseliny

Při přípravě vzorků a stanovení množství organických kyselin v rostlinách zelí se postupovalo dle údajů z disertační práce na téma: Toxicita těžkých kovů, jejich příjem, translokace a vliv na produkci ochranných a signálních látek u rostlin (Šimek, 2016). Lístky zelí se nechaly zmrazit a 0,5 g tohoto materiálu bylo rozetřeno. Poté bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru, který byl předem připraven. Na 1 litr tohoto pufru bylo použito 8,7 g NaCl, 1,82 g $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ a 0,23 g KH_2PO_4 a destilovaná voda. Vzniklá směs byla ve vodní lázni zahřívána 45 minut při 75 °C, což lze vidět na obrázku č. 17. Poté byla tato směs přendána do centrifugy, která směs odstředila při 3 000 otáčkách po dobu 15 minut. Výsledná směs byla opět vyhodnocována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na katedře chemie. Výsledky z katedry chemie byly v jednotkách mg/ml a v této práci je nutné znát hodnoty, které budou mít jednotky mg/g.

U všech organických kyselin se jednalo o stejný přepočítání z mg/ml na mg/g. Zjištěny byly hodnoty prvních koncentrací a následně byl proveden přepočítání na námi požadované jednotky. Nejprve jsme převedli mg/ml na mg/10 ml, což se uskutečnilo tak, že se celá koncentrace vynásobila deseti. Když víme, že bylo zamraženo 0,5 gramu čerstvé hmotnosti listů, vzniklý výsledek pouze vynásobíme dvěma a vznikne námi požadovaná koncentrace v jednotkách mg/g FW. FW tedy znamená hmotnost čerstvého rostlinného pletiva.



Obr. 17.: Vzorčky umístěné v provizorním držáku ve vodní lázni (foto Radka Čechová)

2.3 Statistické zpracování výsledků

Nejprve byl stanoven aritmetický průměr získaných hodnot, který byl spočítán pomocí vzorce:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Následně byla spočítána směrodatná odchylka, která je potřebná pro výpočet T-testu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Posléze byly vypočítány hodnoty T-testu, které byly porovnány s hodnotami ve statistických tabulkách:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} * \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Když jsou známy hodnoty testovacích kritérií, tak je nutné vypočítat stupeň volnosti, který se získá pomocí vzorečku:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

V těchto výše zmíněných vzorcích jsou tyto neznámé:

- nrozsah souboru
- n_1počet členů kontrolního souboru
- n_2počet členů souboru dřepčici 1/dřepčici 2
- x_inaměřené hodnoty
- \bar{x}aritmetický průměr
- \bar{x}_1aritmetický průměr kontrolního souboru
- \bar{x}_2aritmetický průměr členů souboru dřepčici 1/dřepčici 2
- ssměrodatná odchylka
- s_1směrodatná odchylka kontrolního souboru
- s_2směrodatná odchylka členů souboru dřepčici 1/dřepčici 2
- ttestovací kritérium
- vstupeň volnosti

Získané výsledky obsahu primárních metabolitů v rostlinách zelí byly statisticky vyhodnoceny na základě T-testu se zvolenou hladinou významnosti 5%, tedy $p=0,05$.

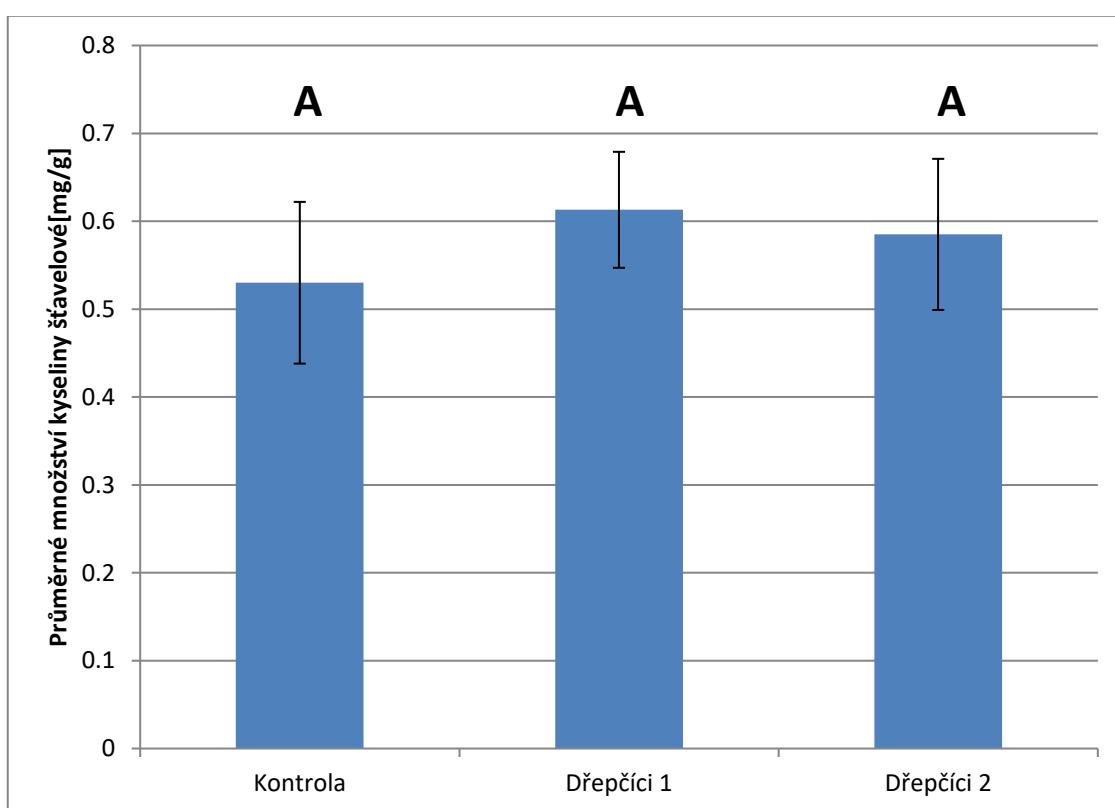
Pomocí těchto výpočtů získáme hodnoty, které jsou uvedeny v tabulkách níže. Pro proteiny a organické kyseliny je stupeň volnosti roven 10 a pro aminokyseliny je roven 4. Podle těchto hodnot a také podle hladiny významnosti se určilo, zda námi vypočítané testovací kritérium je statisticky významné, nebo naopak. Pokud vypočtené hodnoty byly vyšší než hodnoty udané v tabulce, byly statisticky významné a podle toho se zamítá, nebo potvrzuje nulová hypotéza. Kritická hodnota z tabulky pro proteiny a organické kyseliny je tedy **1,812** a pro aminokyseliny **2,132**.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Organické kyseliny

3.1.1 Kyselina šťavelová

Graf č. 1 udává množství kyseliny šťavelové v zelí. Získané hodnoty naznačují, že se koncentrace kyseliny šťavelové v rostlinném pletivu mírně zvyšují. Po nižší míře napadení jsou výsledky průměru o něco výraznější, než po vyšším napadení. T-test však statisticky neprokazuje žádný z těchto výsledků, protože mají nižší hodnotu, než stanovená kritická mez daná statistickými tabulkami.

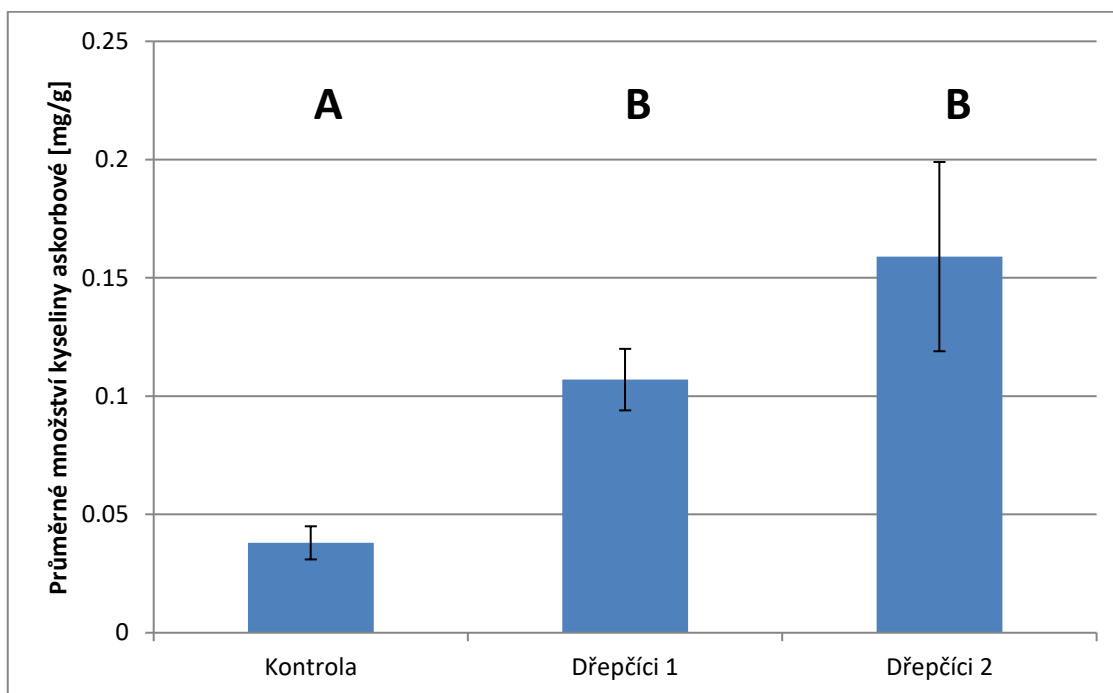


Graf č. 1.: Množství kyseliny šťavelové ve zkoumaných vzorcích

Množství kyseliny šťavelové se v rostlinách po napadení býložravým hmyzem zvyšuje. Tato kyselina je pro živočichy toxická a krystalický oxalát vápenatý slouží jako mechanická obrana, protože má výrazný abrazivní účinek na kusadla hmyzu (Bosh et Welte, 2016). U námi provedeného pokusu došlo ke zvýšení koncentrace kyseliny šťavelové. Tyto výsledky však nelze statisticky potvrdit. Náš názor je takový, že když by bylo zelí vystaveno okusu dřepčičků delší dobu, tak by mohly být koncentrace této organické kyseliny mnohem vyšší. Toto je však pouze domněnka a bylo by třeba uskutečnit další pokusy, které by tuto teorii potvrdily, nebo vyvrátily.

3.1.2 Kyselina askorbová

Čím vyšší stupeň napadení dřepčiky byl na rostlinky zelí vyvíjen, tím vyšší koncentrace kyseliny askorbové byly prokázány. Hodnoty, které dokazují zvyšování koncentrací této organické kyseliny, jsou uvedeny v grafu č. 2. Toto zvyšování bylo statisticky prokázáno pomocí T-testu, kdy kritická mez je stanovena pro hodnotu 1,812. Námi zjištěné hodnoty T-testu byly vyšší než stanovená kritická mez. Lze tedy říci, že čím vyšší napadení býložravcem bude na rostlinu vyvíjeno, tím bude množství této organické kyseliny markantněji.

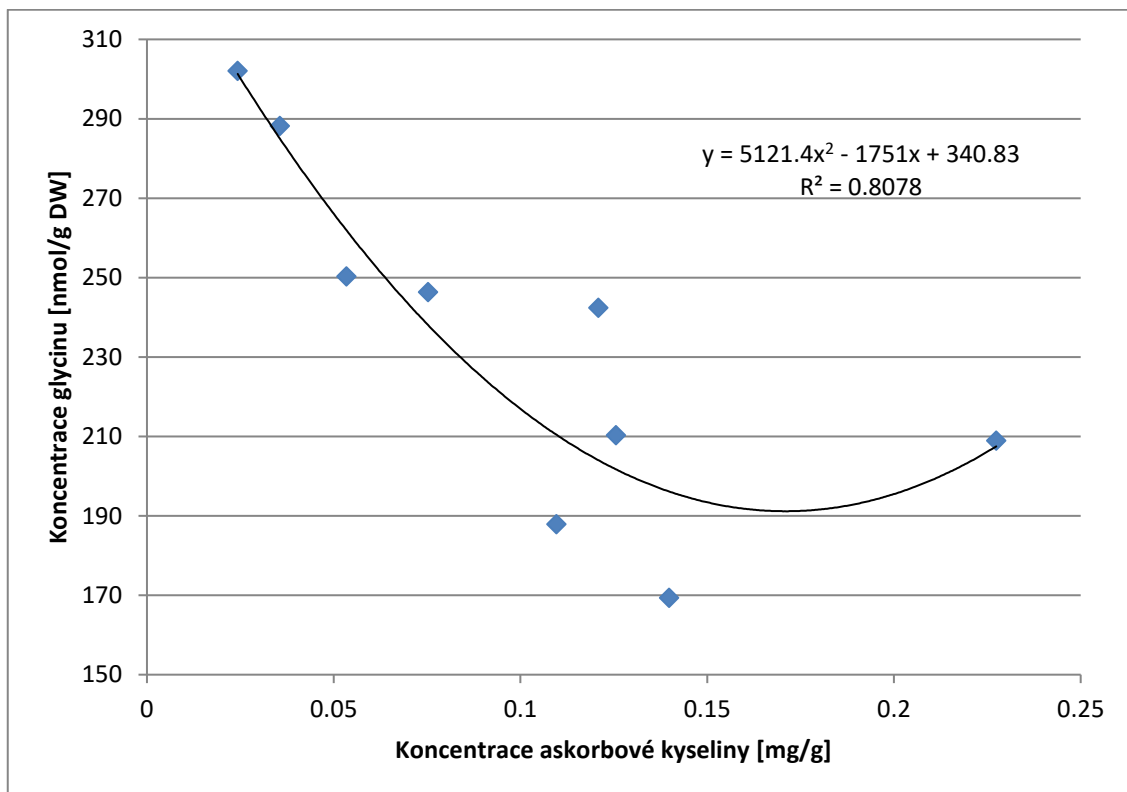


Graf č. 2.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny askorbové v zelí

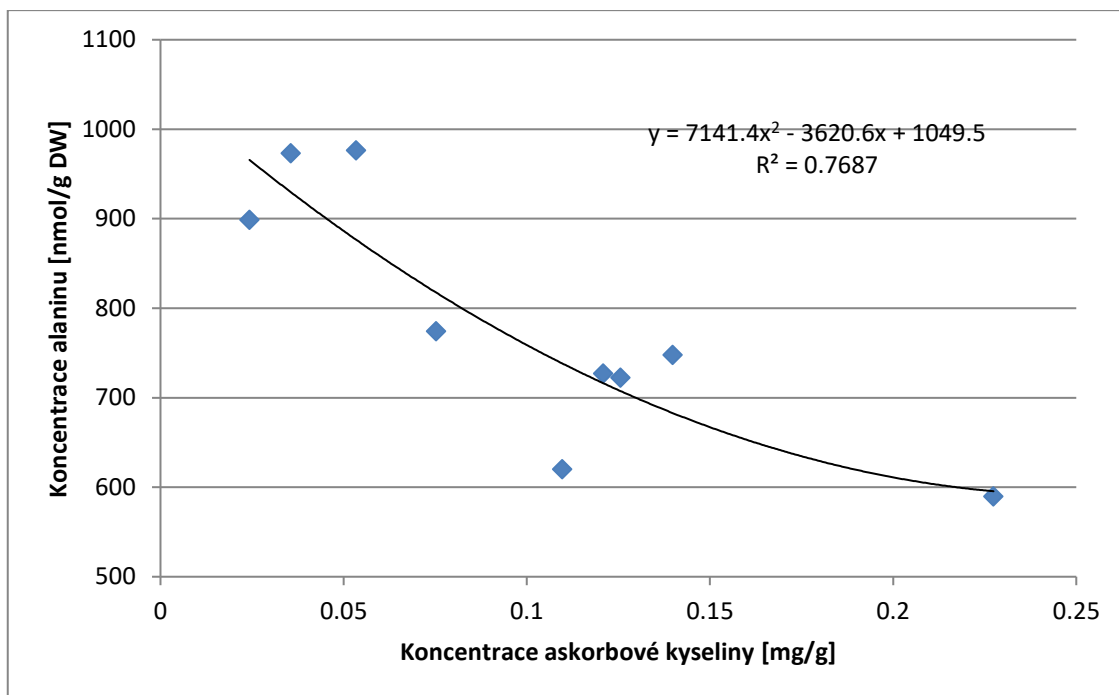
Kyselina askorbová je přítomna v nejvyšších koncentracích v chloroplastech a cytosolu rostlin. Slouží v rostlině jako antioxidant a enzymový kofaktor. Tato látka také reguluje různé fyziologické procesy a především zvyšuje v rostlině tolerantnost ke stresu. Také je tato kyselina využívána jako prekurzor pro tvorbu jiných organických kyselin (Yoshimura et Ishikawa, 2018). Studie dokládají, že se množství kyseliny askorbové v rostlinách zvyšuje jako odpověď na stresovou situaci (Armagan, 2017). Přesně takové výsledky byly získány pomocí námi provedených pokusů. Tato látka se mnohonásobně zvyšovala po vystavení zelí stresové situaci. Čím více dřepčíků ohrožovalo rostlinná pletiva, tím více vitamínu C se v nich tvořilo. Jestliže by byly rostliny vystaveny stresu ještě déle, tak by si nejspíše vytvořily ještě větší množství této látky ve svých pletivech. Po dosažení velmi vysokého stresu by však rostlina došla do neúnosné fáze a odumřela by.

Kyselina askorbová negativně koreluje s některými aminokyselinami. Příkladem takové aminokyseliny je glycin. Množství vitamínu C se zvyšuje po napadení rostliny herbivorem a množství glycinu se naopak snižuje. Tato korelace je zobrazena na grafu č. 3, kde hodnota regrese udává hodnotu, která se porovnává s hodnotou danou Spearmanovým korelačním koeficientem. Námí určená hodnota je vyšší, než určená mez v tabulkách. Díky tomu lze říci, že tato negativní závislost je statisticky prokazatelná. Velmi podobně koreluje kyselina askorbová s alaninem. Průkaznost této negativní korelace je dle hodnoty regrese ještě vyšší než u glycinu. Tato korelace je zobrazena na grafu č. 4.

Negativně koreluje askorbová kyselina také s lysinem, isoleucinem a valinem. Tyto regresní závislosti jsou velmi podobné dvěma zobrazeným. A také jsou prokazatelné pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

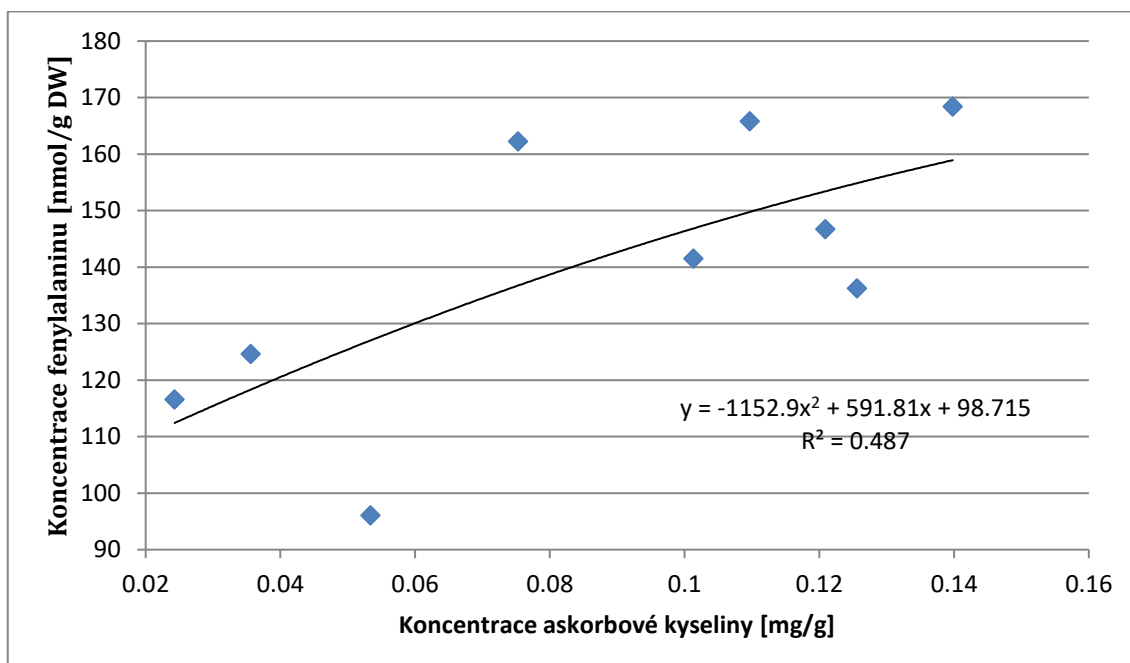


Graf č. 3.: Regresní závislost mezi kyselinou askorbovou a glycinem



Graf č. 4.: Regresní závislost mezi kyselinou askorbovou a alaninem

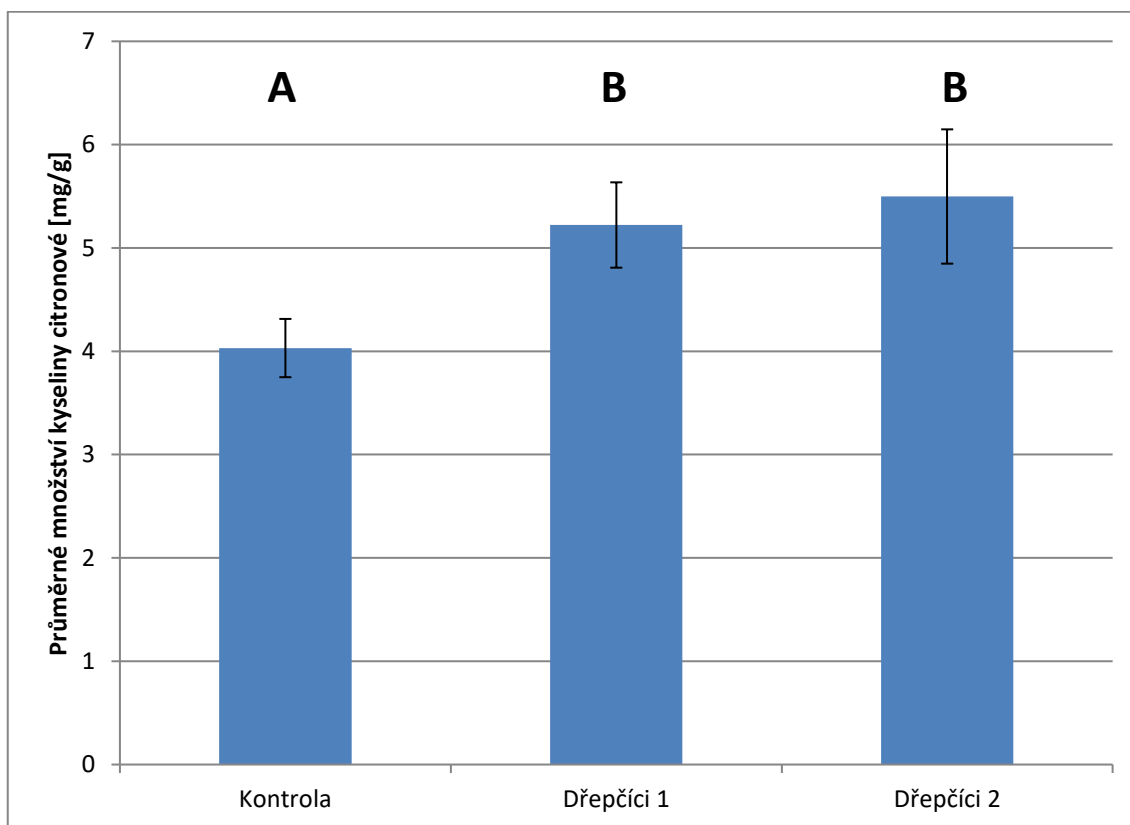
Pozitivně koreluje s askorbovou kyselinou pouze fenylalanin, který se po napadení rostliny syntetizuje v jejích pletivech. Tato korelace je znázorněna na grafu č. 5. Hodnota regrese je opět vyšší než daná mez statistickými stabulkami.



Graf č. 5.: Regresní závislost mezi kyselinou askorbovou a fenylalaninem

3.1.3 Kyselina citronová

Výsledky z grafu č. 6 naznačují, že v tomto případě také došlo ke zvýšení koncentrací organické kyseliny po napadení rostlin dřepčíky. Při vyšším napadení byly hodnoty vyšší než při nižším napadení. Z toho se dá usoudit, že je to reakce rostliny na napadení býložravcem. Může se jednat i o obranný mechanismus, nebo prekurzor ke vzniku jiných obranných látek. Statisticky bylo toto zvyšování koncentrací prokázáno i T-testem, kdy získané hodnoty byly opět vyšší než kritická hranice.

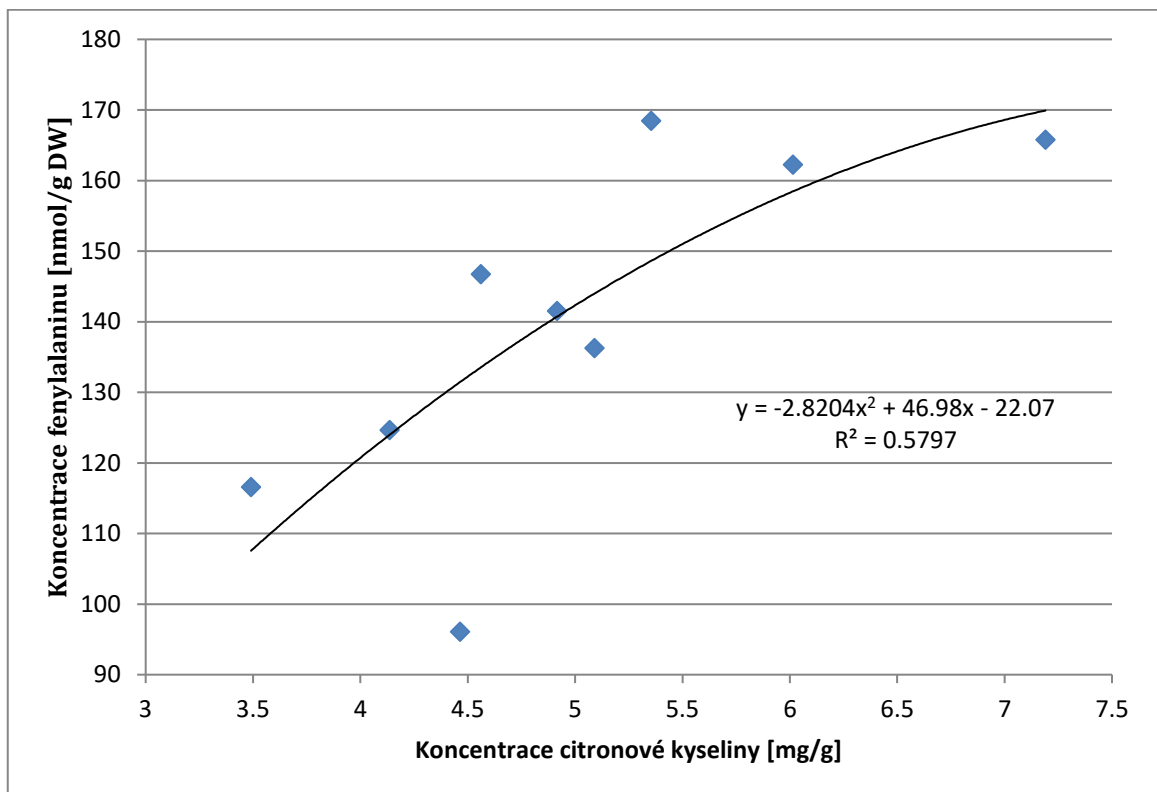


Graf č. 6.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny citronové ve vzorcích

Kyselina citronová slouží hlavně jako prekurzor pro tvorbu sekundárních metabolitů a to především alkaloidů. Ty jsou pro hmyzí škůdce často velmi jedovaté a rostlinu tím ochraňují (Balmer et al., 2013). Je prokázáno, že u rostlin, které jsou vystaveny stresu, se množství kyseliny citrónové zvyšuje. Toto navyšování probíhá během pár hodin a je exponenciální (Sun et Hong, 2011). Většina pokusů, které zjišťovaly koncentraci kyseliny citronové, byla provedena na rostlinách, které byly vystaveny vysokým koncentracím těžkých kovů a to především kadmiu. O biotickém stresu a změnách hodnot kyseliny citronové v rostlinách je prozatím zjištěno velmi málo. Díky provedenému pokusu však bylo zjištěno, že tato látka zvýšila mnohonásobně svou koncentraci v napadených listech zelí. Došlo k tomu, že množství kyseliny citronové se zvyšovalo úměrně k markantnějšímu napadení zelí dřepčíky. Když by byly rostliny

déle ponechány ve stresových podmínkách, tak by se mohlo množství kyseliny citronové ještě zvýšit, ale dle našeho názoru by se postupně koncentrace ustálila na určitých hodnotách. Toto jsou však jen doměnky a je nutné provést další pokusy, kterými se zjistí aktivita kyseliny citronové v rostlinách napadených hmyzími býložravci.

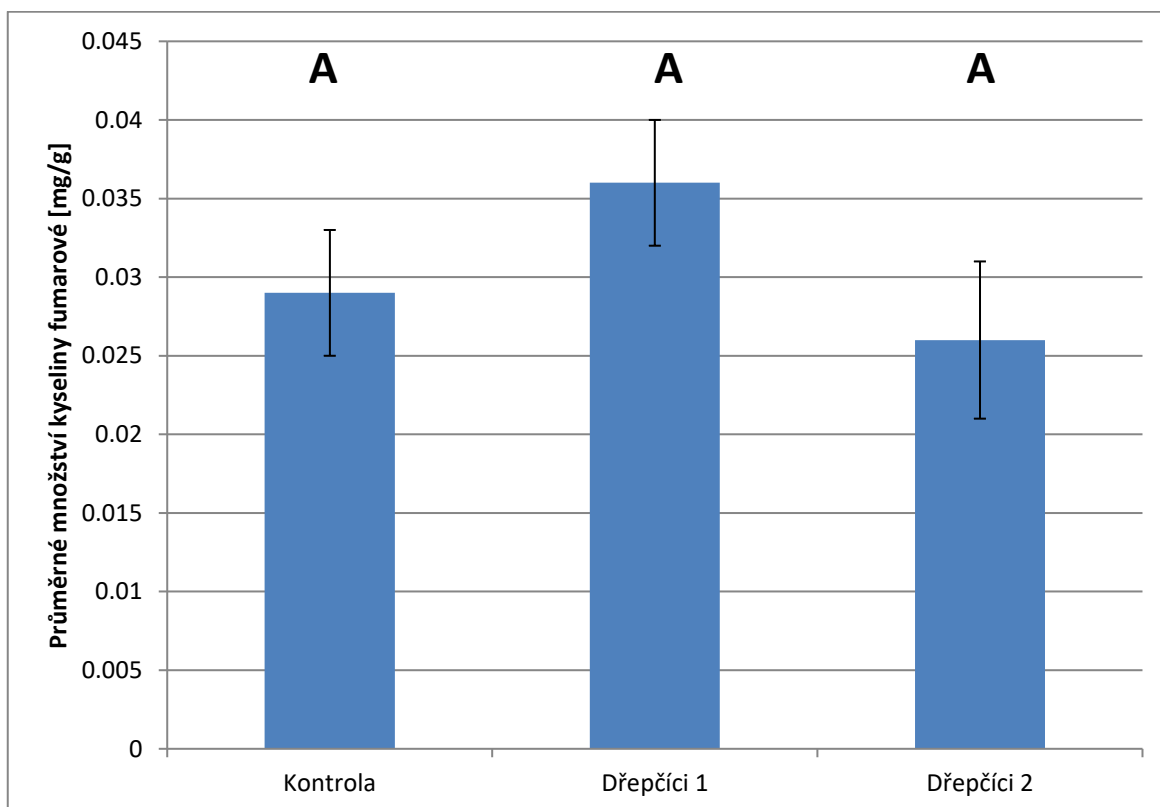
Jedinou látkou, která významně koreluje s kyselinou citronovou je fenylalanin. Tato korelace je pozitivní, což znamená, že když se zvyšuje množství této organické kyseliny, tak se úměrně k tomu zvyšuje i množství aminokyseliny. Tyto látky spolu mohou souviset a tvořit tak obranný mechanismus rostliny proti napadání herbivory. Tato pozitivní korelace je znázorněna na grafu č. 7. Daná hodnota regrese opět přesahuje kritickou mez statistické významnosti danou statistickými tabulkami.



Graf č. 7.: Regresní závislost mezi kyselinou citronovou a fenylalaninem

3.1.4 Kyselina fumarová

Získané hodnoty uvedené v grafu č. 8 poukazují na mírné zvýšení množství kyseliny fumarové v rostlinných pletivech po nižší míře napadení dřepčičky. Po vyšším napadení však došlo k razantnímu snížení této organické sloučeniny v listech zelí bílého. Toto je možné usoudit z hodnot aritmetického průměru. T-test však neprokázal statistickou významnost mezi kontrolou a dřepčičky 1 ani mezi kontrolou a dřepčičky 2. Statistická analýza T-testu mezi kontrolou a nižším napadením by byla prokazatelná na vyšší hladině pravděpodobnosti, než je 0,05.

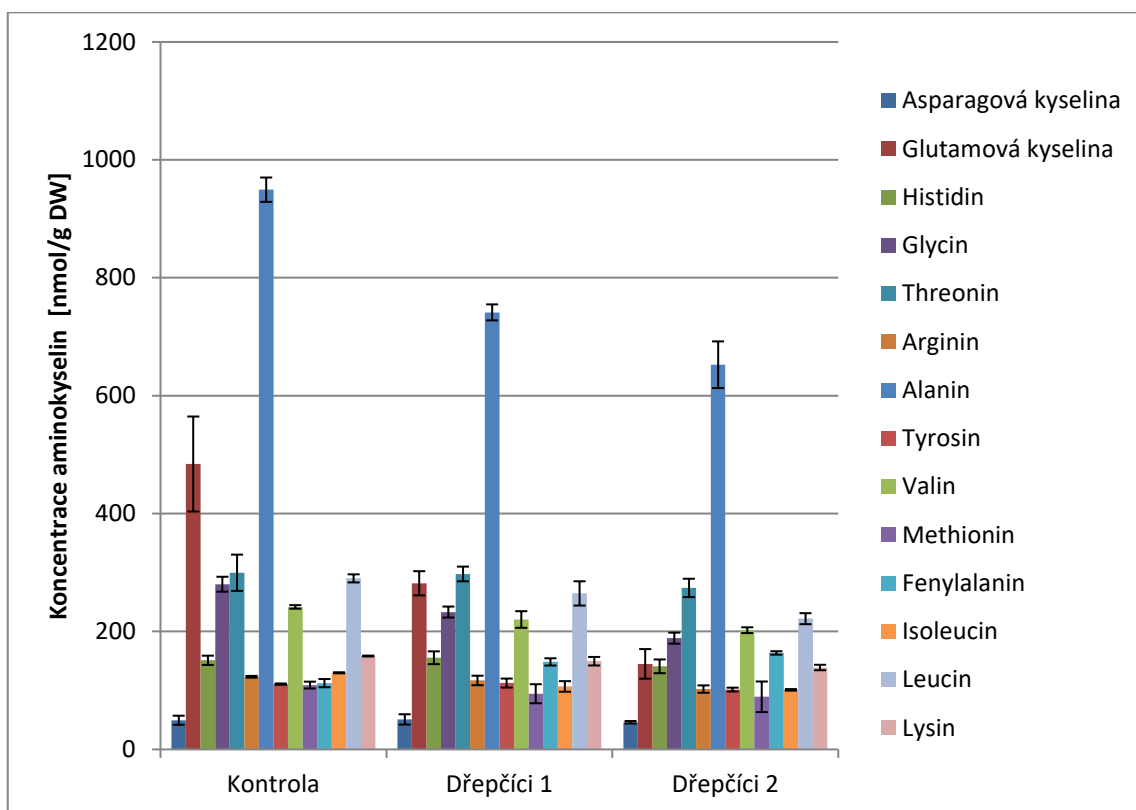


Graf č. 8.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny fumarové v zelí

V literatuře je uvedeno, že množství kyseliny fumarové v rostlinném pletivu se zvyšuje po napadení býložravcem, ale v jiných zdrojích naopak, že množství této kyseliny ve stresovaných rostlinách mírně ubývá. Autoři se odvolávají na možné chyby v měření, nebo při přípravě vzorků (Arany et al., 2007; Jänkänpää et al., 2013). V provedeném experimentu došlo k tomu, že rostliny po mírném napadení dřepčičky zvýšily koncentraci kyseliny fumarové ve svých pletivech. Naopak při intenzivnějším napadení došlo k poklesu množství této látky. Žádná změna této látky však nebyla statisticky potvrzena a není tedy významná. Tato organická kyselina by dle literárního průzkumu měla měnit svou koncentraci v napadeném rostlinném pletivu, proto by bylo dobré tyto pokusy uskutečnit znovu.

Při pokusech s bělásky došlo v rostlinném pletivu ke snižování koncentrace této látky. Rostliny napadaly housenky, které pletiva výrazněji poškodily, a proto by tato data mohla být průkaznější než od rostlin napadených dřepčíky (Daňková, 2018).

3.2 Aminokyseliny



Graf č. 9.: Zastoupení jednotlivých aminokyselin v sušině listů zelí

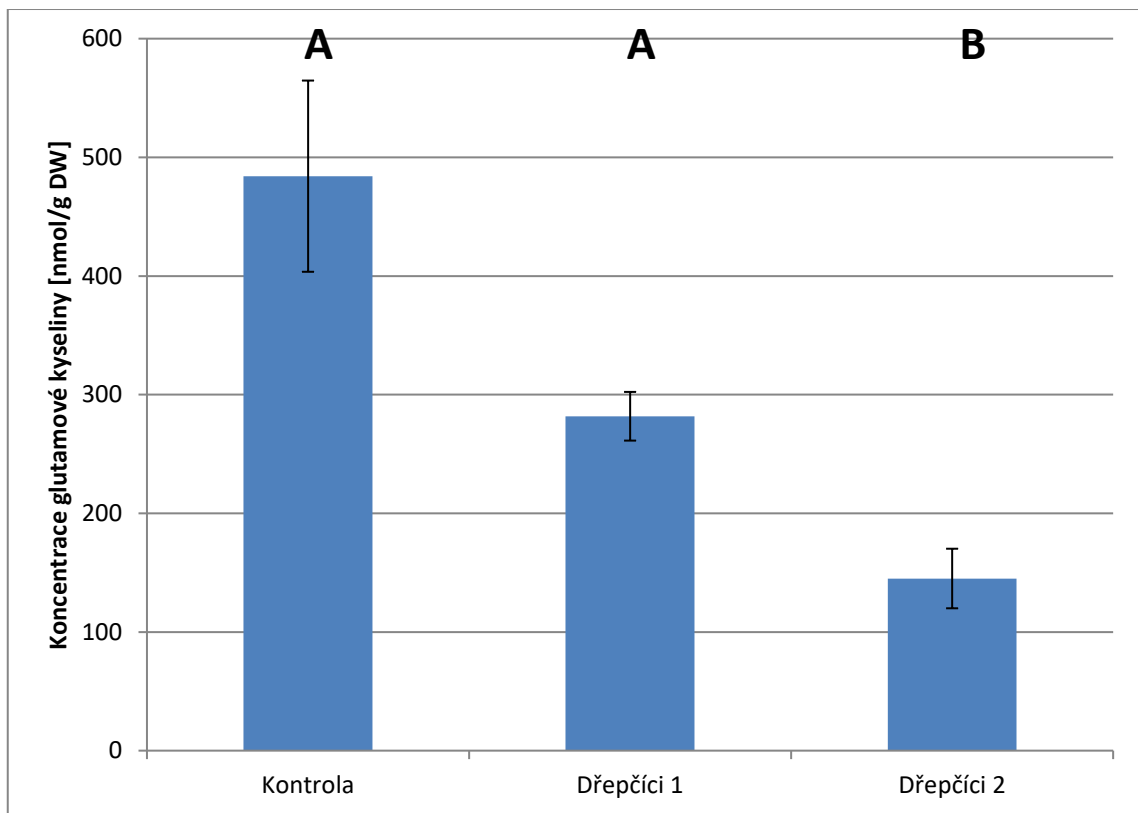
V grafu č. 9 jsou znázorněny průměry a standardní chyby průměru naměřených hodnot ve 3 odlišných vzorcích. U některých aminokyselin nebyla statisticky prokázána změna množství těchto primárních metabolitů mezi poškozenými a nepoškozenými zelenými částmi rostlin zelí. Statistické výsledky těchto aminokyselin jsou uvedeny v tabulkách, které se nacházejí v příloze této práce.

Aminokyseliny, které dále nebudou uvedeny, nesplňovaly podmínky pro statistické prokázání změny koncentrace v napadených rostlinách. K prokázání těchto látek by bylo nutné provést další pokusy, které by napomohly k jejich vyhodnocení. Pokud by došlo k dalším pokusům, mohlo by zde dojít k problému. Nemusí se podařit navodit úplně stejné podmínky, protože napadající hmyz nemusí rostlinu poškozovat tolik, nebo naopak ji poškodí více, než při prvním měření.

Následně budou uvedeny pouze aminokyseliny, jejichž množství se průkazně měnilo po napadení zelí dřepčiky.

3.2.1 Glutamová kyselina

Koncentrace glutamové kyseliny klesá spolu s vyšší mírou napadení zelí, což lze vidět na grafu č. 10. Hodnota T-testu počítaného mezi vzorky kontroly a vzorky z méně napadených rostlin však není statisticky významnou. To může být způsobeno velkými rozdíly mezi naměřenými hodnotami. Naopak T-test mezi kontrolou a dřepčíky s vyšším napadením vyšel statisticky významně, protože překonal kritickou mez 2,132. Velmi podobně, ale ještě o něco významněji vyšel T-test mezi vzorky s nižším a vyšším napadením dřepčíky. Velmi vysoké hodnoty vykazovaly také všechny směrodatné odchylky, což naznačuje velké rozdíly v naměřených hodnotách.

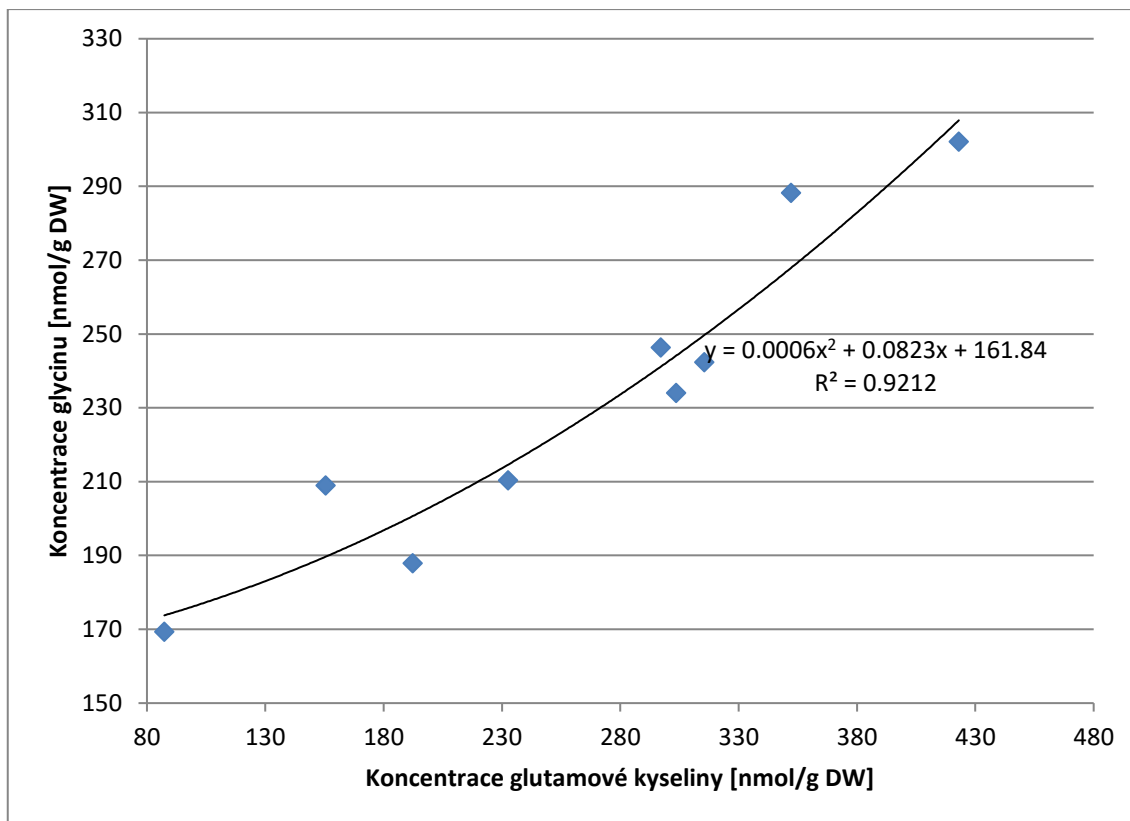


Graf č. 10.: Statistické vyhodnocení množství glutamové kyseliny ve vzorcích

Účinky glutamové kyseliny byly zkoumány již před několika desítkami let. Jedná se o sloučeninu, která podporuje krmení býložravých živočichů (Adams et al., 1988). Rostliny proto po napadení snižují koncentrace této látky ve svých pletivech. Díky tomu se mohou herbivoři přesouvat k jiným rostlinám, které glutamovou kyselinu obsahují a krmí se raději na nich.

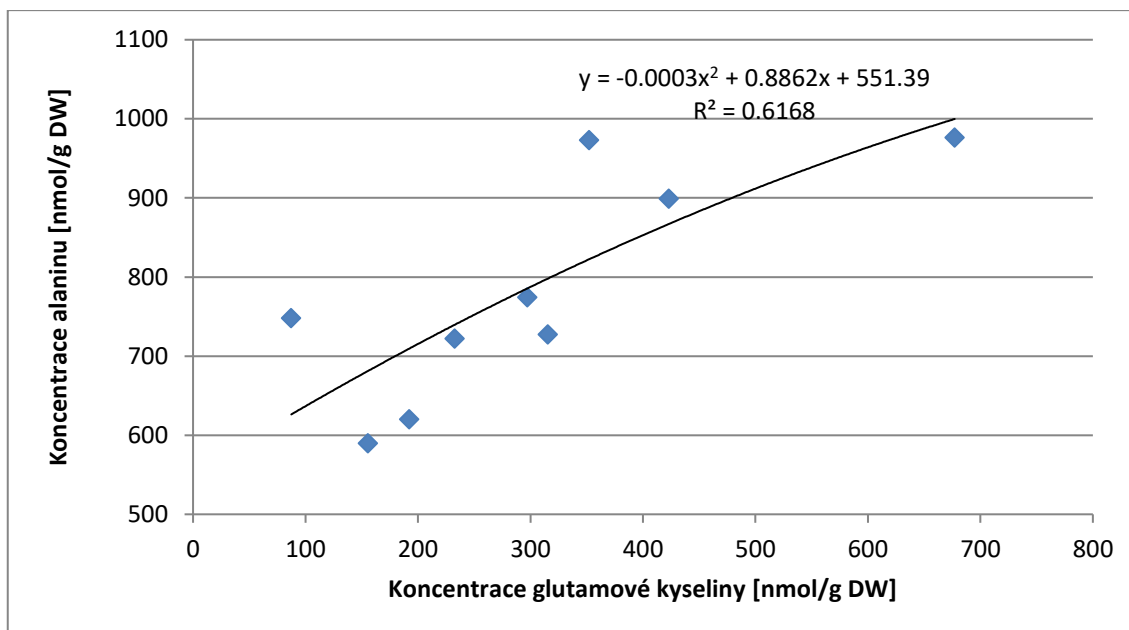
Po napadení rostlin zelí dřepčíky dochází ke snižování koncentrací této aminokyseliny. Pozitivně koreluje s aminokyselinou glycinem, který také v rostlinných pletivech ubývá po napadení býložravými brouky. Křivka, která spojuje hodnoty těchto aminokyselin je znázorněna na grafu č. 11 vyobrazeném

níže. Tato korelace je statisticky prokazatelná, protože hodnota regrese převyšuje Spearmanův koeficient. Můžeme tedy říci, že je větší pravděpodobnost než 95%, že tyto aminokyseliny po napadání býložravci v rostlinných pletivech ubývají a také, že spolu toto ubývání souvisí.



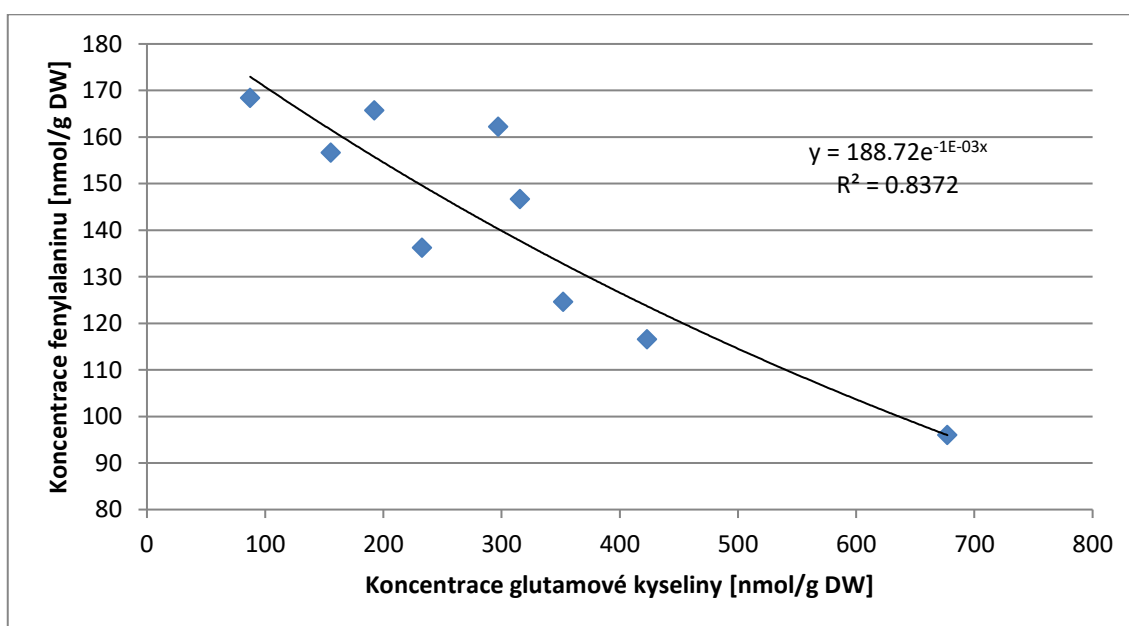
Graf č. 11.: Regresní závislost mezi glutamovou kyselinou a glycinem

Velmi podobně koreluje glutamová kyselina s alaninem. Tato korelace je také pozitivní, ale hodnota regrese nedosahuje tak velkých hodnot. Stále je však vyšší než kritická hodnota Spearmanova korelačního koeficientu daná statistickými tabulkami pro hodnotu pravděpodobnosti 0,05. Tato pozitivní korelace je znázorněna na grafu č. 12. Glutamová kyselina pozitivně koreluje i s aminokyselinou valinem, isoleucinem, leucinem a lysinem, ale hodnota regrese nedosahuje k takovým hodnotám. Stále převyšuje kritickou mez pro statistické potvrzení významné korelace, ale tato čísla jsou menší než dvě korelace výše zmíněné.



Graf č. 12.: Regresní závislost mezi glutamovou kyselinou a alaninem

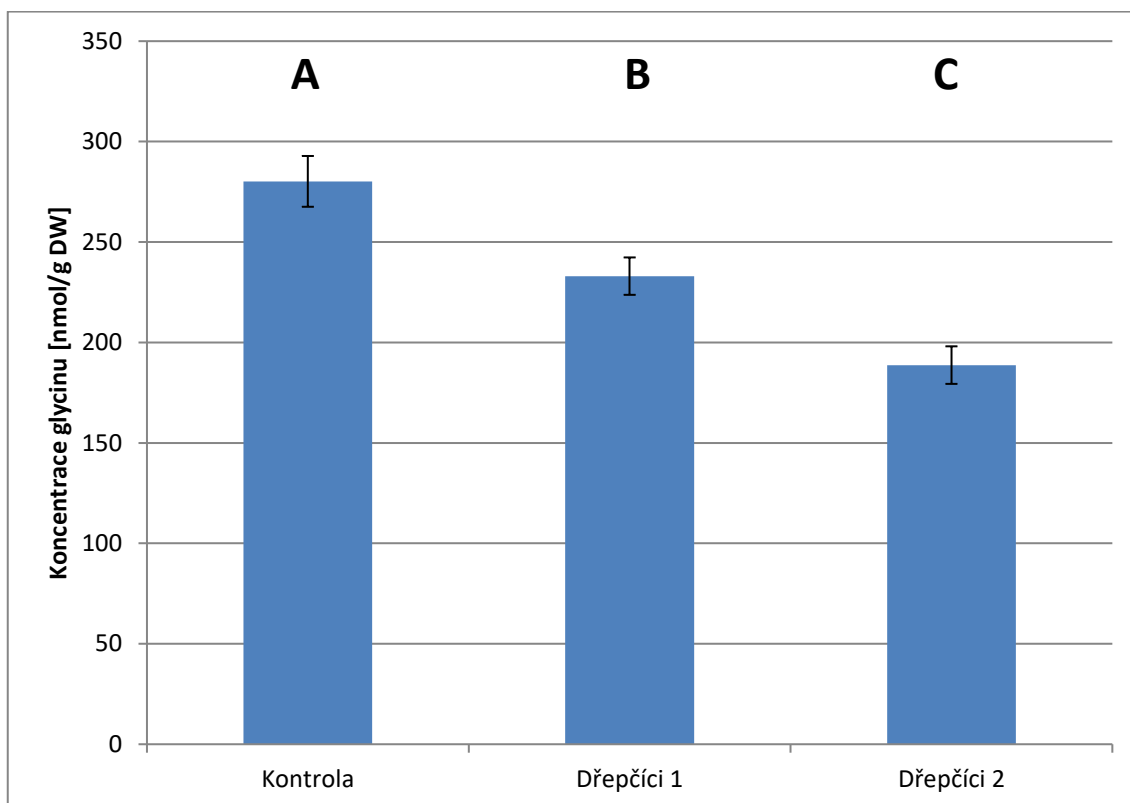
Negativně glutamová kyselina koreluje pouze s aminokyselinou fenylalaninem. Fenylalanin zvyšuje koncentraci v pletivech rostliny po napadení dřepčicí. Tato negativní korelace je velmi dobře statisticky prokazatelná, protože hodnota regrese je mnohem vyšší, než kritická mez pro Spearmanův korelační koeficient. Souvislost mezi těmito dvěma látkami můžeme s jistotou potvrdit při hodnotě pravděpodobnosti 0,05. Negativní korelace mezi těmito dvěma aminokyselinami je znázorněna na grafu č. 13.



Graf č. 13.: Regresní závislost mezi kyselinou glutamovou a fenylalaninem

3.2.2 Glycin

Z grafu č. 14 vyplývá, že množství glycinu v rostlinách zelí ubývá v závislosti na napadení dřepčíky. Čím je napadení vyšší, tím méně glycinu se v rostlinách nachází. Toto lze usoudit i z vypočítaných hodnot T-testu, které jsou vyšší než kritická mez stanovená statistickými tabulkami. Statisticky významné jsou nejen hodnoty nižšího a vyššího napadení dřepčíky od kontrolních vzorků, ale i mezi sebou.

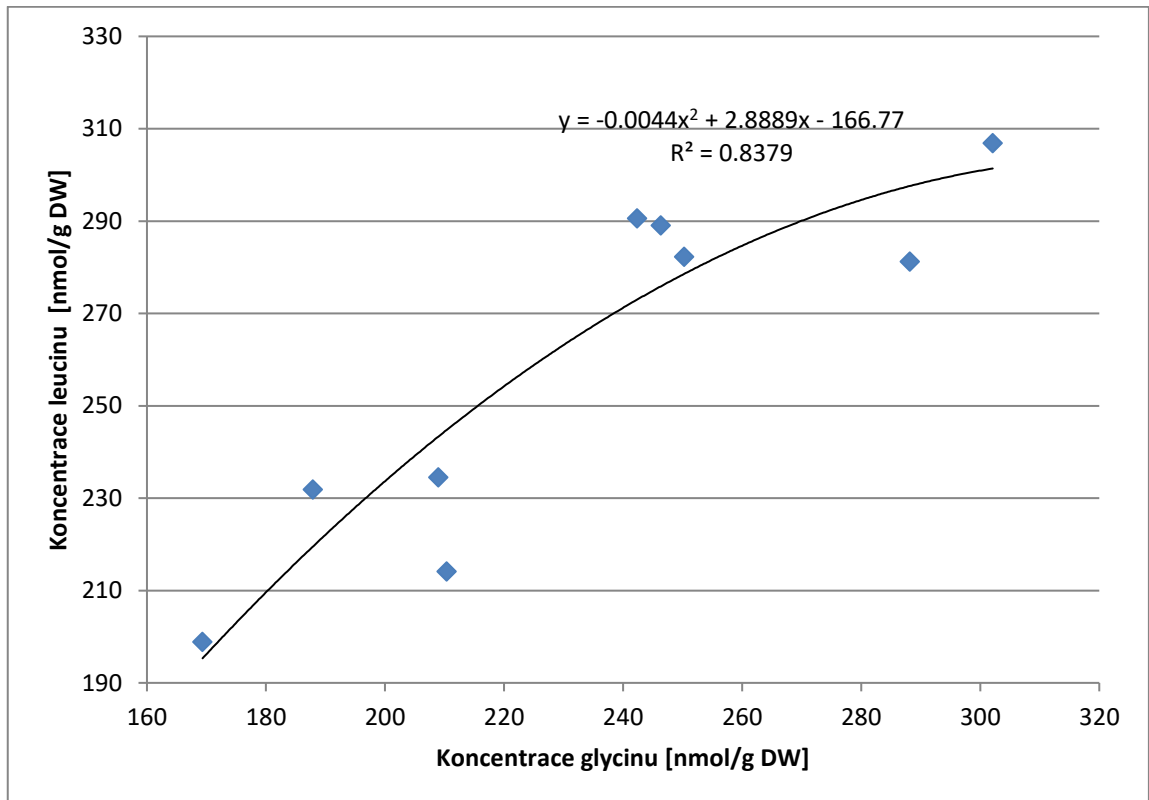


Graf č. 14.: Statistické vyhodnocení množství glycinu ve zkoumaných vzorcích

Množství aminokyseliny glycinu se u rostlin napadených dřepčíky snižuje mnohem průkazněji, než při napadení rostlin zelí housenkami bělásků. U bělásků došlo k výraznému snížení aminokyseliny poté, co byly k rostlinám přidány samičky bělásků, které zde nakladly vajíčka, a z těch se posléze vyvinuly housenky, které rostlinná pletiva poškozovaly okusem. Po přidání housenek k rostlinám zelí došlo ke snížení této aminokyseliny, ale nebylo to zde tak průkazné jako u předchozího případu (Daňková, 2018).

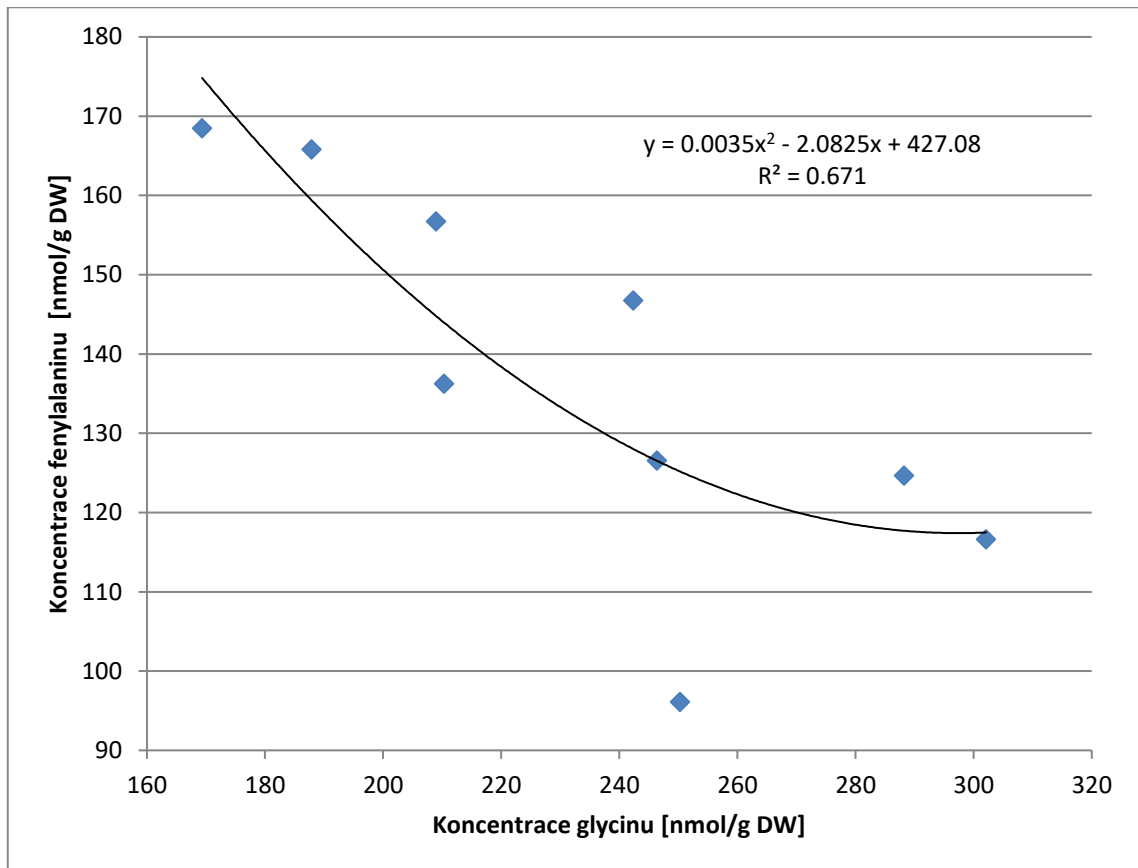
Glycin je důležitý při vzniku chlorofylu, je kumulovaný v cytoplazmě a chrání buňky před odvodněním. Účastní se mnoha metabolických přeměn, jako jsou například syntéza purinových zásad, porfyrinových barviv nebo syntézy betainu (Kubíčková, 2016). Glycin betain je látka vyskytující se v rostlinách po vystavení stresové situaci (Chen et Murata, 2011).

Aminokyselina glycin pozitivně koreluje s jinými aminokyselinami, jako jsou arginin, alanin, valin, isoleucin, leucin a lysin. Všechny tyto korelace jsou statisticky potvrzeny díky porovnání se Spearmanovým koeficientem. V následujícím grafu č. 15 je však znázorněna nejvýznamnější korelace glycinu a to s aminokyselinou leucinem. Tato korelace vypovídá o tom, že když se snižuje množství glycinu v rostlinném pletivu po napadení býložravým broukem, tak se snižuje i koncentrace aminokyseliny leucinu a dalších, které nejsou znázorněny na grafu, ale jsou výše zmíněny.



Graf č. 15.: Regresní závislost mezi glycinem a leucinem

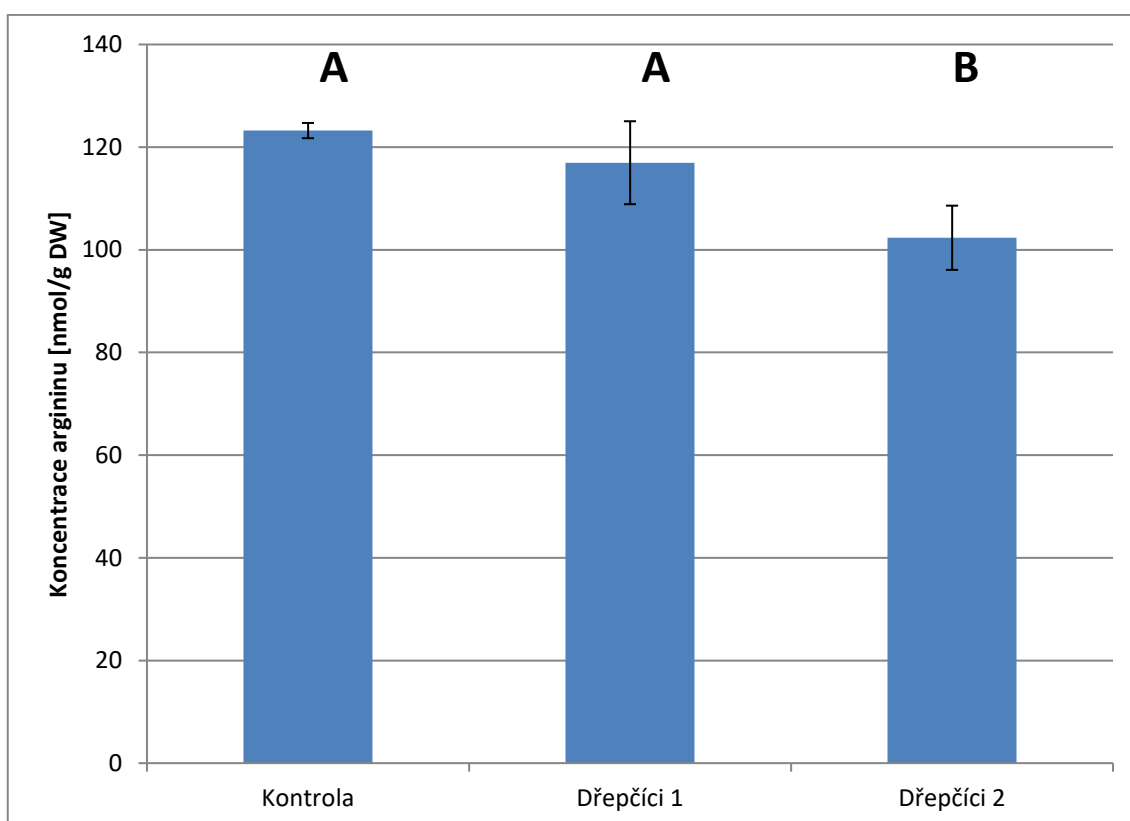
Glycin negativně koreluje pouze s aminokyselinou fenylalaninem podobně jako glutamová kyselina, což je vidět na grafu č. 16. Snižuje-li se množství glycinu v rostlinném pletivu po napadení herbivorem, tak se koncentrace fenylalaninu v poškozené části rostliny zvyšuje a tyto látky mají tedy opačný charakter působení na rostlinného škůdce.



Graf č. 16.: Regresní závislost mezi glycinem a fenylalaninem

3.2.3 Arginin

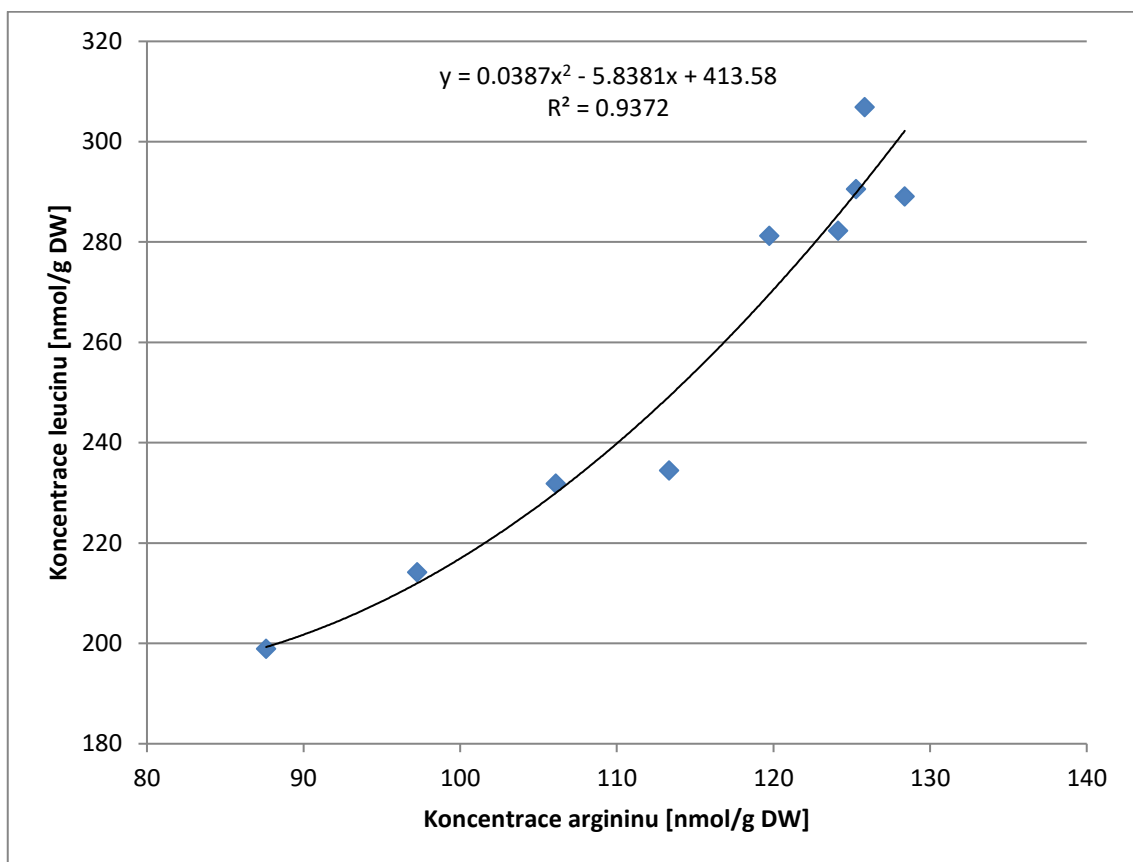
Množství argininu v rostlinách se snižuje tím více, čím je vyšší míra napadení rostlin zelí dřepčíky. Toto lze vidět v grafu č. 17. U nižšího stupně napadení nelze pomocí T-testu dokázat statistickou významnost těchto dat, protože nedosahují kritické hodnoty. Naopak u vyššího napadení hodnota T-testu přesahuje kritickou hranici určenou statistickými tabulkami. Vzorky s nižším a vyšším stupněm napadení mezi sebou nejeví žádné statisticky významné rozdíly, protože hodnota T-testu opět nedosahovala ke kritické hranici, která je dána statistickými tabulkami.



Graf č. 17.: Statistické vyhodnocení množství argininu v zelí

Arginin bývá degradován enzymem threonin-deamináza a enzymem argináza na jednodušší produkty, které hmyz nedokáže přeměňovat zpět na aminokyseliny a proto trpí nedostatkem argininu v potravě (Felton, 2005). Jeho množství určuje pochody fotosyntézy a správné fungování primárního metabolismu rostliny (Rojas et al., 2014). Arginin slouží jako prekursor pro syntézu putrascinu a polyaminů, což jsou látky, které se v rostlině účastní různých fyziologických pochodů, jako je buněčné dělení, růst, diferenciace a také jsou zapojeny do obranné odezvy rostlin a to jak na biotický, tak i abiotický stres. Polyaminy indukují produkci oxidu dusnatého, který je významným mezibuněčným poslem s mnoha regulačními funkcemi (Adámková et Petřivalský, 2012).

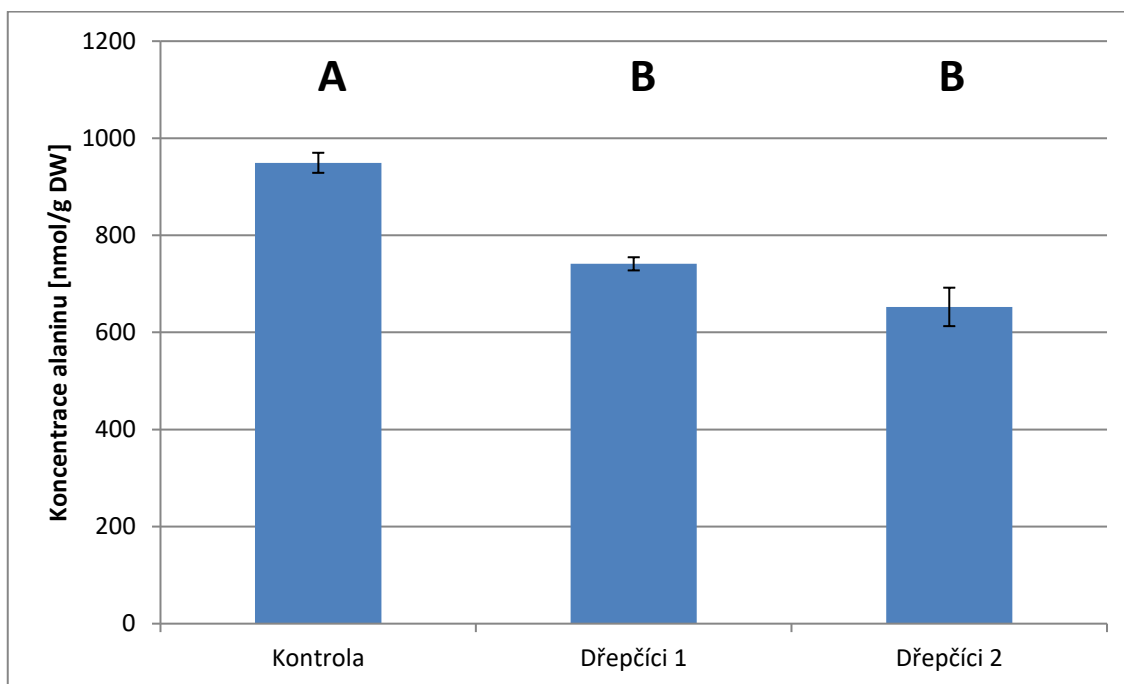
Z našeho výzkumu vyplývá, že množství argininu v poškozeném rostlinném pletivu se snižuje. Lze soudit, že dochází k rozpadu této látky pomocí výše zmíněných enzymů na jednodušší sloučeniny a rostlina se tak stává pro hmyz neatraktivní. Ke snižování množství však nemusí docházet pouze kvůli rozpadu této aminokyseliny v rostlinném pletivu. Ke snižování koncentrací této látky v napadeném pletivu dochází také u dalších aminokyselin, se kterými arginin pozitivně koreluje. Kromě již výše zmíněných, koreluje pozitivně s tyrosinem, valinem, isouleucinem, leucinem a lysinem. Nejvýznamnější a nejprůkaznější pozitivní korelace je s aminokyselinou leucinem, což je znázorněno na grafu č. 18. Negativně arginin koreluje pouze s fenylalaninem, ale hodnota regrese nedosahuje ke kritické mezi Spearmanova korelačního koeficientu, a proto nelze potvrdit ani vyvrátit, zda spolu množství těchto látek souvisí.



Graf č. 18.: Regresní závislost mezi argininem a leucinem

3.2.4 Alanin

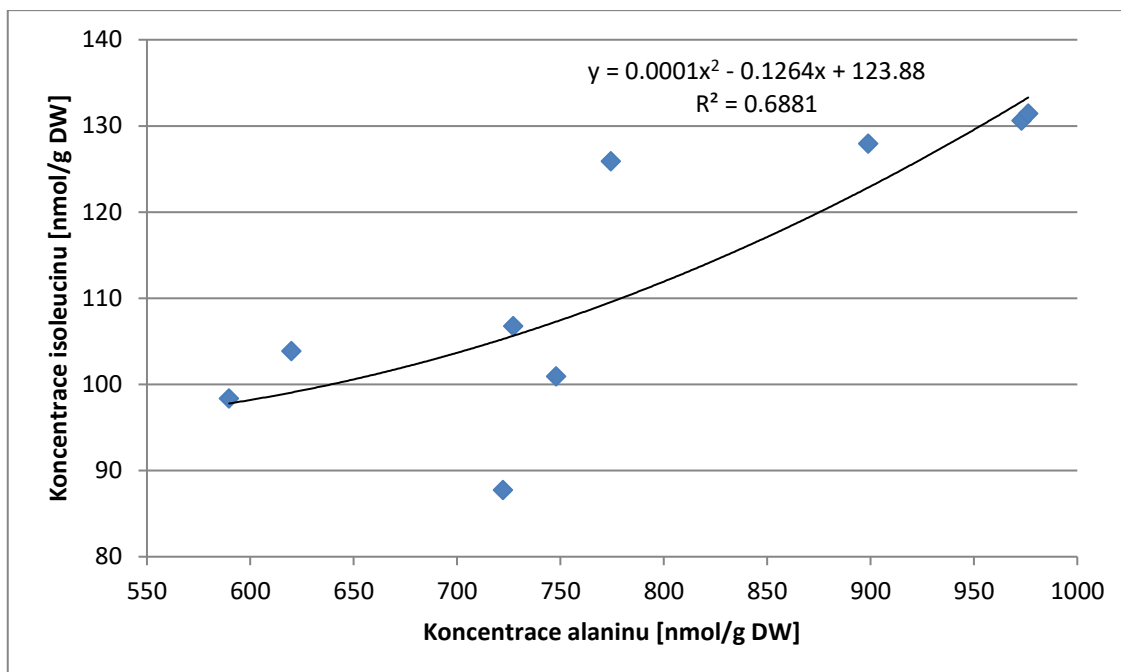
Graf č. 19 udává, že množství alaninu v rostlině se výrazně mění, když je napadena býložravým hmyzem. Čím většímu stresu je rostlina vystavena, tím méně alaninu je v jejích pletivech. Toto lze i statisticky dokázat pomocí T-testu, který má výrazně vyšší hodnotu, než kritická mez. Mezi hodnotami nižšího a vyššího napadení rostlin dřepčíky však nelze dokázat statistickou významnost, protože hodnota T-testu nedosahuje ke kritické mezi dané statistickými tabulkami.



Graf č. 19.: Statistické vyhodnocení množství alaninu v zelí

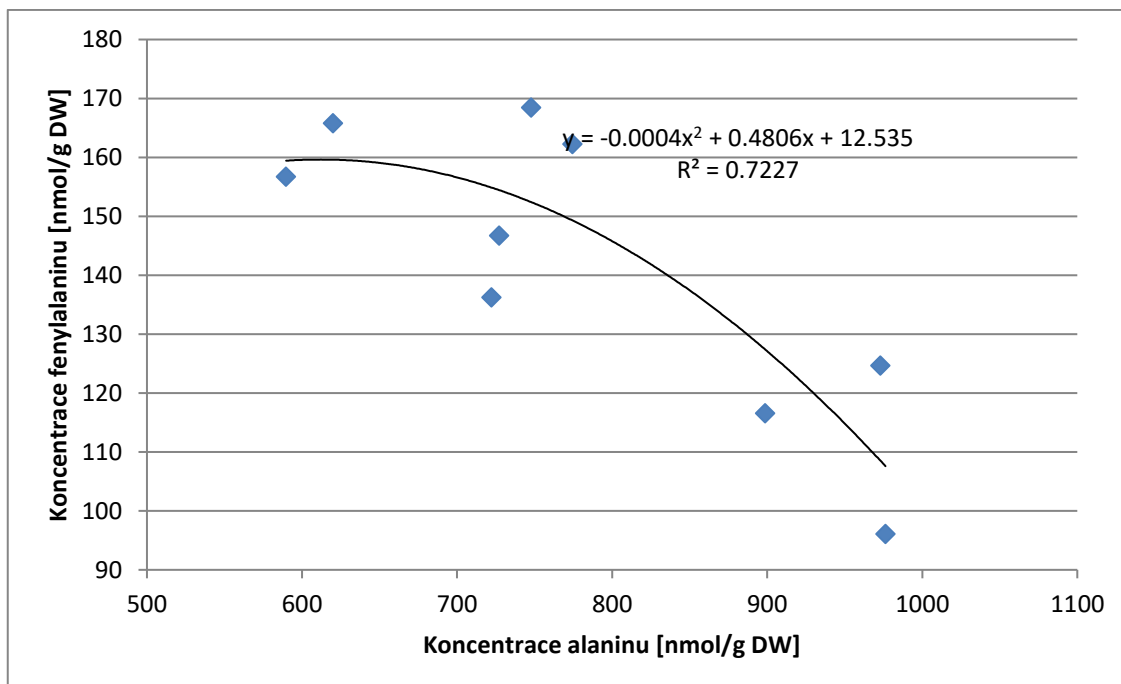
Alanin podobně jako arginin stimuluje syntézu chlorofylu a zvyšuje aktivitu fotosyntézy (Tlustoš et al., 2006). Proti napadení býložravcem se rostlina brání zvyšováním množství alaninu, čímž dochází k rozpadu lyzinu, který hmyz potřebuje pro svůj růst. Samozřejmě tomuto průběhu napomáhají i rostlinné enzymy (Konno et al., 2010).

Námi zjištěné výsledky však ukazují opak a to, že v napadené rostlině ubývá této aminokyseliny a tyto úbytky jsou velmi pravděpodobné. Jak již bylo zmíněno, došlo k úbytku alaninu po nižším napadení a k ještě markantnějšímu po vyšším napadení. Tyto rozdíly jsou nejspíše způsobeny různými rostlinami a býložravci, kteří je napadají. Tato aminokyselina prokazatelně snižuje koncentrace obsahu v rostlinném pletivu po jeho napadení. Stejně jako u alaninu k tomu dochází u mnoha dalších aminokyselin, jako jsou valin, isoleucin a další výše zmíněné. Nejmarkantnější pozitivní korelace je mezi alaninem a isoleucinem, což je znázorněno na grafu č. 20 níže.



Graf č. 20.: Regresní závislost mezi aminokyselinami alaninem a isoleucinem

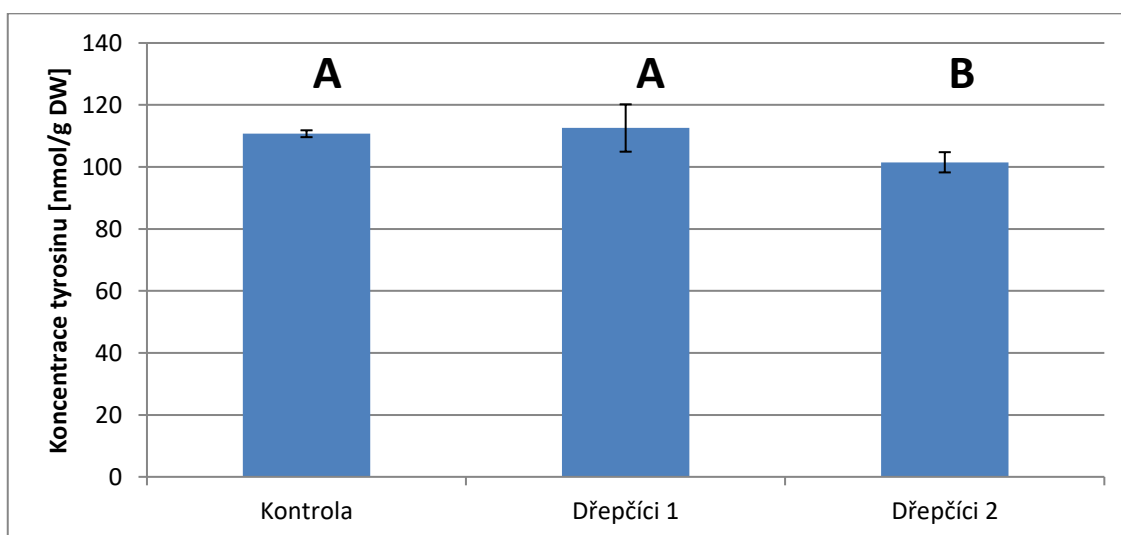
Alanin však koreluje i negativně a to s aminokyselinou fenylalaninem. Tato látka oproti alaninu po napadení rostliny herbivorem zvyšuje koncentraci v zelených částech rostliny. Díky tomu, že hodnota regrese je vyšší než kritická hranice u Spearmanova korelačního koeficientu, tak tuto domněnku můžeme potvrdit na hladině významnosti 0,05. Graf č. 21, na kterém je znázorněna tato negativní korelace, je níže.



Graf č. 21.: Regresní závislost mezi alaninem a fenylalaninem

3.2.5 Tyrosin

Výsledky v grafu č. 22 naznačují, že koncentrace tyrosinu v rostlině vystavené biotickému stresu spíše klesá. Při nižším napadení došlo k malému vzrůstu koncentrace této látky, což ukazuje aritmetický průměr těchto měření. U měření nižšího napadení však vyšla vyšší hodnota směrodatné odchylky, která ukazuje větší rozdíl mezi výsledky. U T-testu těchto hodnot nemůžeme prokázat statistickou významnost, protože výsledek nedosahuje kritické meze, která má hodnotu 2,132. Tuto mez lehce překročil výsledek druhého T-testu, který byl počítán mezi kontrolou a dřepčíky 2. Díky tomu můžeme říci, že je statisticky významné snižování tyrosinu v rostlinném pletivu. Mezi dřepčíky 1 a dřepčíky 2 T-test opět nedosahoval kritické meze, a tudíž rozdíl mezi těmito měřeními nejsou statisticky významné.



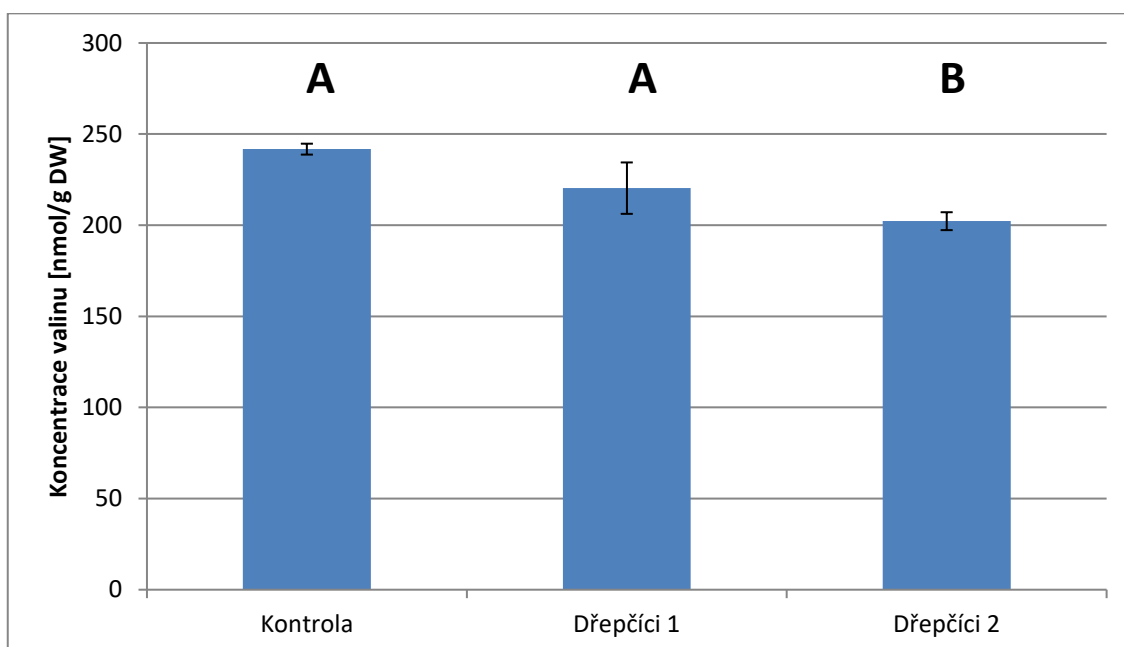
Graf č. 22.: Statistické vyhodnocení množství tyrosinu v zelí

Tyrosin se v rostlině po jejím napadení hromadí především v mladých částech listů. Tento typ rostlinného pletiva je totiž nejvíce napadán herbivory, protože je plný živin a je měkký. Tato aminokyselina snižuje v rostlinách nutriční hodnotu a hmyz po pozření roste pomaleji (Lokvam et al., 2006). Proteinogenní tyrosin dokáže být i toxický při vysokých koncentracích. Záleží však na druhu napadajícího hmyzu, protože každý druh reaguje na různé látky a koncentrace jinak (Bixenmann et al., 2016).

Námi získané výsledky toto neprokazují. Nižší stupeň napadení vykazuje mírné zvýšení této aminokyseliny v napadeném pletivu rostliny, ale u vyššího napadení došlo k výraznému snížení aminokyseliny. Toto snížení je statisticky prokazatelné, ale nesouhlasí s výsledky získanými v jiných výzkumech. Naše měření nejspíše není správné a mohlo dojít k chybě při výzkumu. Tato látka při zpracování korelovala pozitivně s více aminokyselinami, jako jsou například valin, leucin a lysin.

3.2.6 Valin

Graf č. 23 udává, že aminokyselina valin se v rostlinách, které jsou vystaveny biotickému stresu, vyskytuje v nižším množství než v rostlinách, které herbivoři nenapadli. Při nižším stupni napadení dřepčičky hodnoty T-testu nejsou statisticky průkazné, ale při silnějším napadení hodnota T-testu silně překračuje kritickou mez statistické významnosti. Mezi vyšším a nižším napadením také není statistická průkaznost, protože výsledek T-testu je mnohem nižší než kritická hranice. U nižšího napadení je velká směrodatná odchylka, což naznačuje velké rozdíly mezi naměřenými hodnotami. Tento rozdíl může ovlivňovat hodnotu T-testu, která je mnohem nižší než hladina průkaznosti. Dle aritmetického průměru lze usuzovat, že koncentrace této aminokyseliny v rostlině významně klesá, ale jak již bylo zmíněno, nelze toto snižování statisticky prokázat.

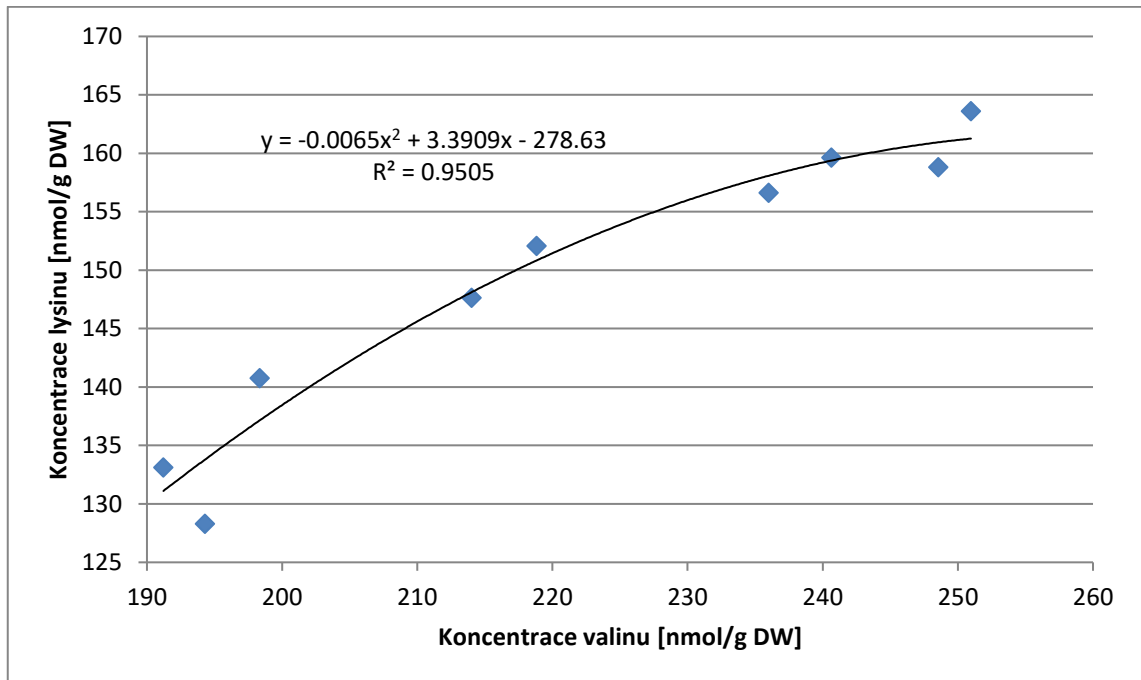


Graf č. 23.: Statistické vyhodnocení množství valinu v zelí

Po napadení rostlin býložravcem se obsah valinu v rostlinném pletivu snižuje. Snižování záleží na mohutnosti napadení rostliny (Ángeles-López et al., 2016). U rostlin zelí napadených běláskem došlo k velmi výraznému snížení valinu v rostlinném pletivu. Na vypěstované zelí se dostaly dospělé samičky, které na listy nakladly vajíčka, z nich se následně vyvinuly housenky, jež okusovaly zelené části rostlinek zelí (Daňková, 2018). Naše výsledky jsou velmi podobného rázu jako výsledky jiných pokusů na jiných rostlinách a s jinými herbivory.

Valin pozitivně koreluje s jinými aminokyselinami. Kromě již výše zmíněných jsou to lysin, leucin a isoleucin. Nejvýraznější korelace je mezi valinem a lysinem, kdy hodnota regrese silně překračuje kritickou mez danou Speamanovým korelačním

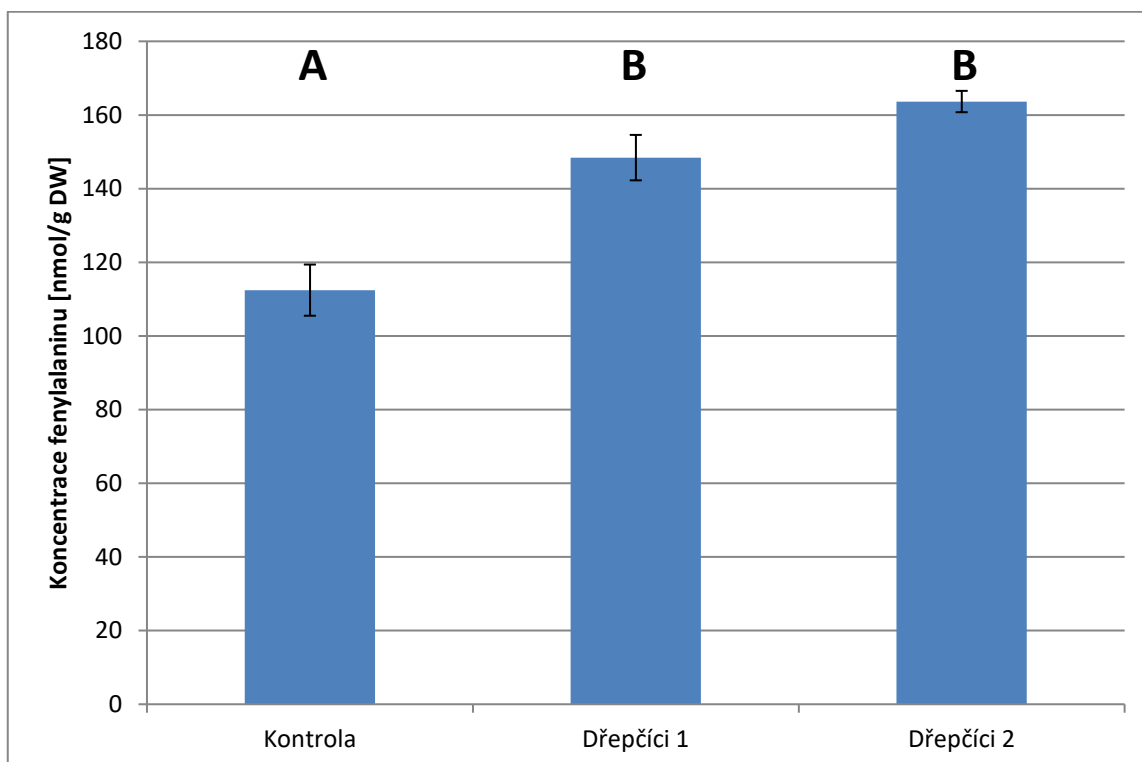
koeficientem udaným statistickými tabulkami. Tato pozitivní korelace je znázorněna v grafu č. 24, který je zobrazen níže.



Graf č. 24.: Regresní závislost mezi aminokyselinami valinem a lysinem

3.2.7 Fenylalanin

Po napadení rostlin zelí dřepčíky roste koncentrace aminokyseliny fenylalaninu v zelených pletivech, což naznačuje graf č. 25. To je dokázáno především statisticky významnými hodnotami T-testů a také podle aritmetických průměrů. Čím vyšší je stupeň napadení rostliny, tím vyšší je koncentrace této sloučeniny v listech zelí. Mezi nižším a vyšším stupněm napadení dřepčíky jsme však neprokázali statistickou průkaznost, protože hodnota vypočítaného T-testu nedosahovala kritické hranice pro průkaznost.



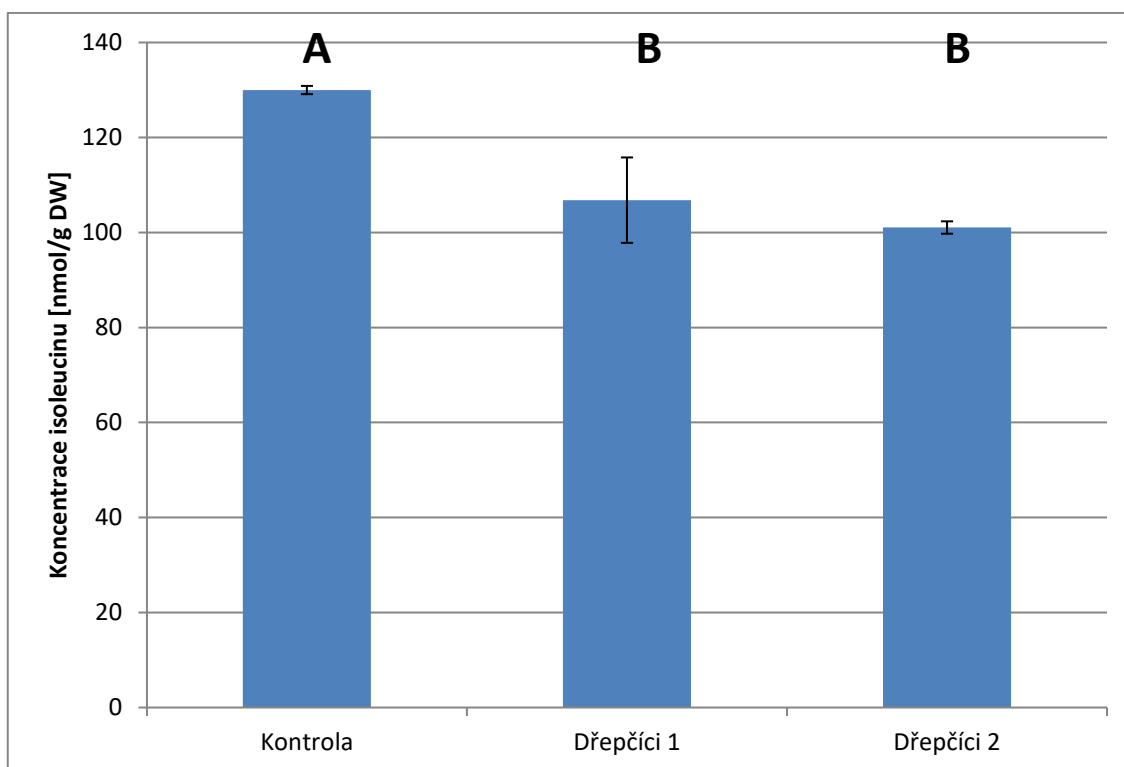
Graf. č. 25.: Statistické vyhodnocení množství fenylalaninu v zelí

Rostliny zelí napadené housenkami bělásků snižovaly koncentraci fenylalaninu. Nejvíce se snížilo množství kyseliny v rostlinách napadených přímo housenkami a nižší snížení bylo na rostlinách s nakladenými vajíčky bělásků a posléze vyvinutými housenkami (Daňková, 2018). Naše výsledky udávají přesně opačný průběh reakce rostliny. Po napadení rostlin dřepčíky došlo ke vzrůstu koncentrace aminokyseliny fenylalaninu. To může poukazovat na to, že se rostliny brání různým herbivorům různými mechanismy, nebo že námi naměřené výsledky nejsou správné.

Díky tomu, jak vyšly naše výsledky, většina korelací s jinými aminokyselinami byla negativní. Nejvýznamnější negativní korelace již byly zmíněny u výše uvedených aminokyselin.

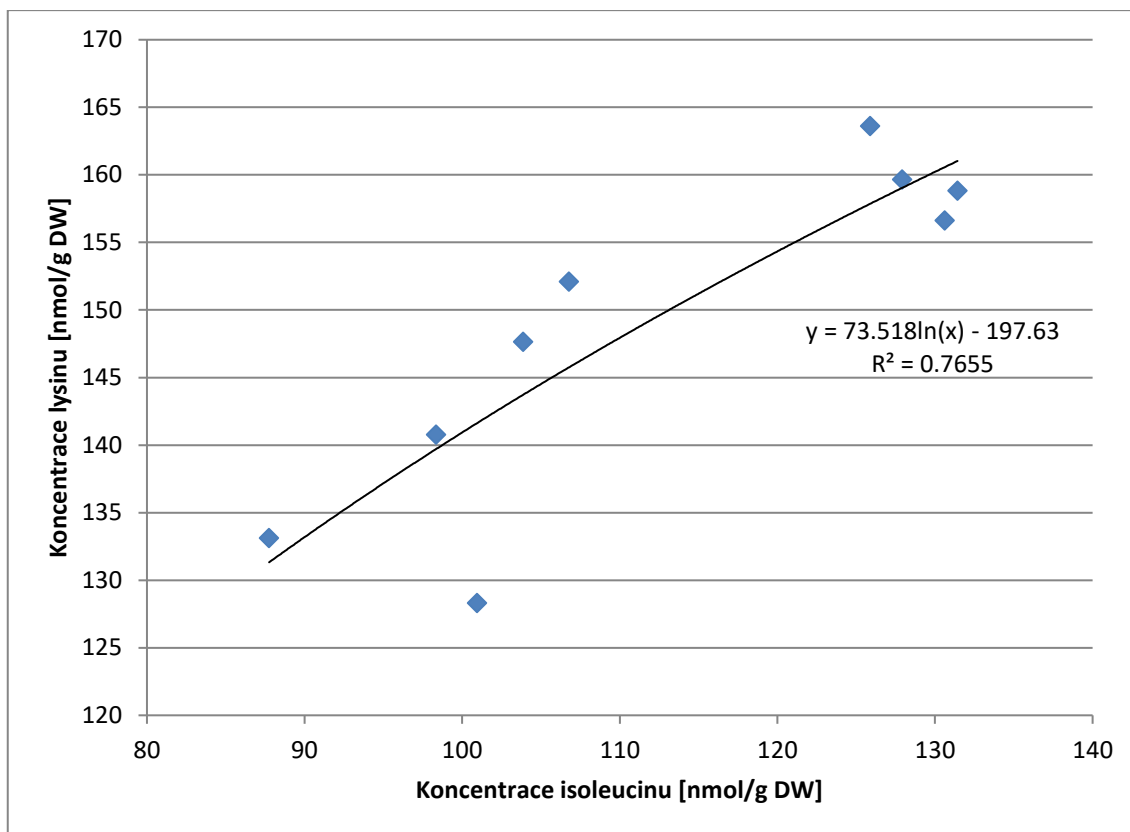
3.2.8 Isoleucin

Graf č. 26 ukazuje, že rostliny zelí obsahují aminokyselinu isoleucin, ale po napadení dřepčíkem se její koncentrace snižuje. T-test mezi kontrolním vzorkem a nižším napadením je o něco málo menší, než kritická mez stanovení statistické významnosti. Mezi kontrolním vzorkem a vyšší hladinou napadení dřepčíky došlo k prokázání statistické významnosti díky tomu, že vypočítaná hladina T-testu byla vyšší než kritická hranice daná statistickými tabulkami. Mezi nižším a vyšším napadením byl tento výsledek však velmi neprůkazný, protože hodnota T-testu vyšla velmi nízká.



Graf č. 26.: Statistické vyhodnocení množství isoleucinu v zelí

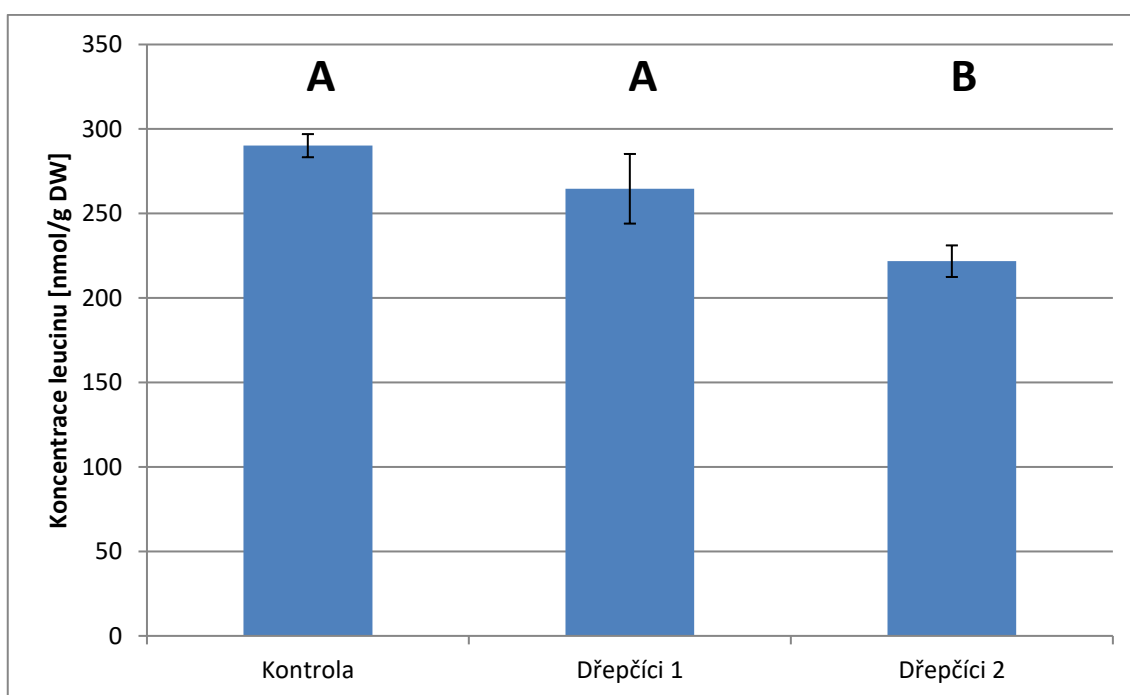
Isoleucin zvyšuje aktivitu jasmonové kyseliny, která je velmi důležitá při tvorbě sekundárních metabolitů. Ty rostlina využívá pro obranné reakce napadené rostliny (Woldemariam et al., 2012). Isoleucin však snižuje svoji koncentraci v napadených částech rostliny a to nejvíce v rostlinách zelí napadených bělásky a to tak, že se do boxu s rostlinkami dostaly samičky bělásků zelných, které na rostliny nakladly vajíčka, z nichž se postupně vyvinuly housenky, které napadaly rostlinná pletiva (Daňková, 2018). V rostlinách napadených dřepčíky také došlo ke snížení koncentrace této látky. Velmi podobně k tomu dochází u řady dalších aminokyselin. K úbytku dochází u leucinu, lysinu a dalších již dříve zmíněných aminokyselin. S většinou předchozích sloučenin koreluje tato aminokyselina pozitivně. Velmi průkazná je tato korelace mezi isoleucinem a lysinem, což je vidět na grafu č. 27.



Graf č. 27.: Regresní závislost mezi isoleucinem a lysinem

3.2.9 Leucin

Podle aritmetických průměrů v grafu č. 28 lze usuzovat, že koncentrace leucinu se v rostlině snižuje v závislosti na stádiu napadení dřepčíky. Tuto teorii však nelze dokázat pomocí T-testu. Ten nevychází díky vysoké hodnotě směrodatné odchylky u měřených hodnot nižšího napadení rostlin. Vyšší míra napadení je však podle tabulek statisticky významnou hodnotou. Mezi nižším a vyšším napadením rostlinek zelí dřepčíky však pomocí T-testu nelze dokázat statistickou významnost těchto dat, protože námi vypočítaná hodnota nedosahuje kritické meze dané statistickými tabulkami.

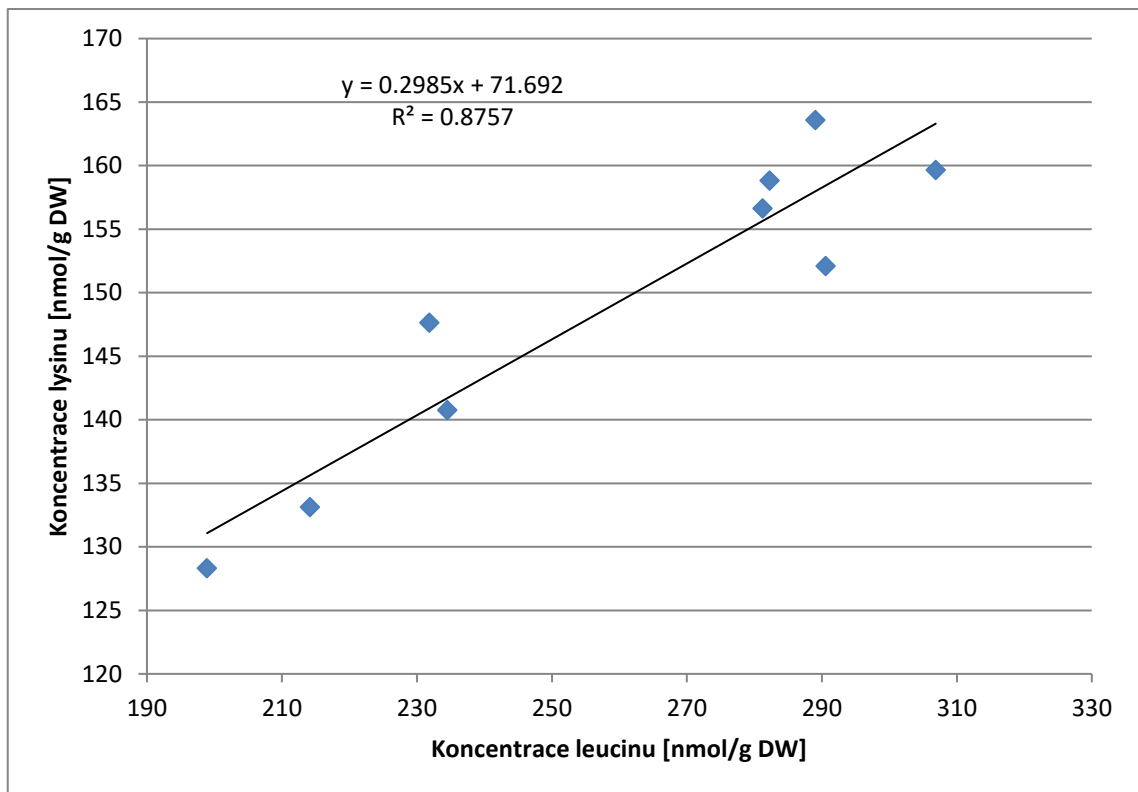


Graf č. 28.: Statistické vyhodnocení množství leucinu v zelí

Tato aminokyselina hraje u rostlin důležitou roli především díky enzymu leucin aminopeptidáza, který má antinutritivní účinky ve střevech hmyzu. Díky této sloučenině zástupci hmyzu strádají (Lomate et al., 2013). Sám leucin v napadeném rostlinném pletivu snižuje svou koncentraci a rostlina pak roste také pomaleji (Van Dame et Oomen, 2008). U napadených rostlin zelí dospělci bělásků, kteří nakladli na listy vajíčka, ze kterých se následně vylíhly housenky a ožíraly rostlinné části, došlo k velkému poklesu leucinu (Daňková, 2018).

V našich pokusech došlo k postupnému snižování koncentrace leucinu v rostlinném pletivu po napadení býložravcem. Po nižším stupni napadení byly výsledky neprůkazné, ale u vyššího napadení se statisticky potvrdily. Díky tomu, že se koncentrace této látky snižovala, tak můžeme říci, že pozitivně koreluje s různými aminokyselinami, které již byly výše zmíněné a také s lysinem. Tato pozitivní korelace mezi leucinem a lysinem je zobrazena na grafu č. 29, který se

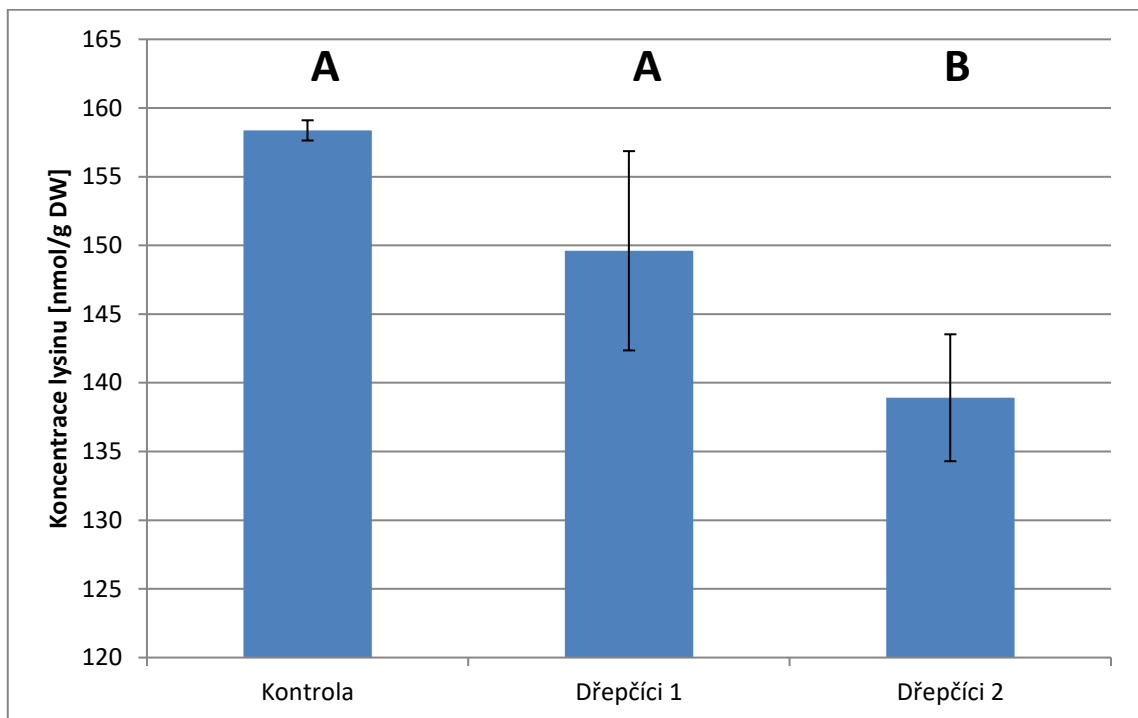
nachází pod tímto textem. Tato korelace je velmi výrazně statisticky průkazná, protože hodnota regrese přesahuje krajní mez udanou Spearmanovým korelačním koeficientem, který se nachází ve statistických tabulkách.



Graf č. 29.: Regresní závislost mezi aminokyselinami leucinem a lysinem

3.2.10 Lysin

Koncentrace této látky, uvedené v grafu č. 30, v zelí také klesá v závislosti na napadení dřepčíky. Toto lze konstatovat díky aritmetickému průměru hodnot, ale pomocí T-testu nelze potvrdit statistickou významnost u prvního případu. Zjištěná hodnota nedosahuje kritické meze dané tabulkami. Vyšší napadení dřepčíky porovnané s hodnotami kontroly vykazuje statistickou významnost, protože získaná data přesahují kritickou mez danou statistickými tabulkami. Mezi nižším a vyšším napadením však nelze statistickou významnost prokázat.

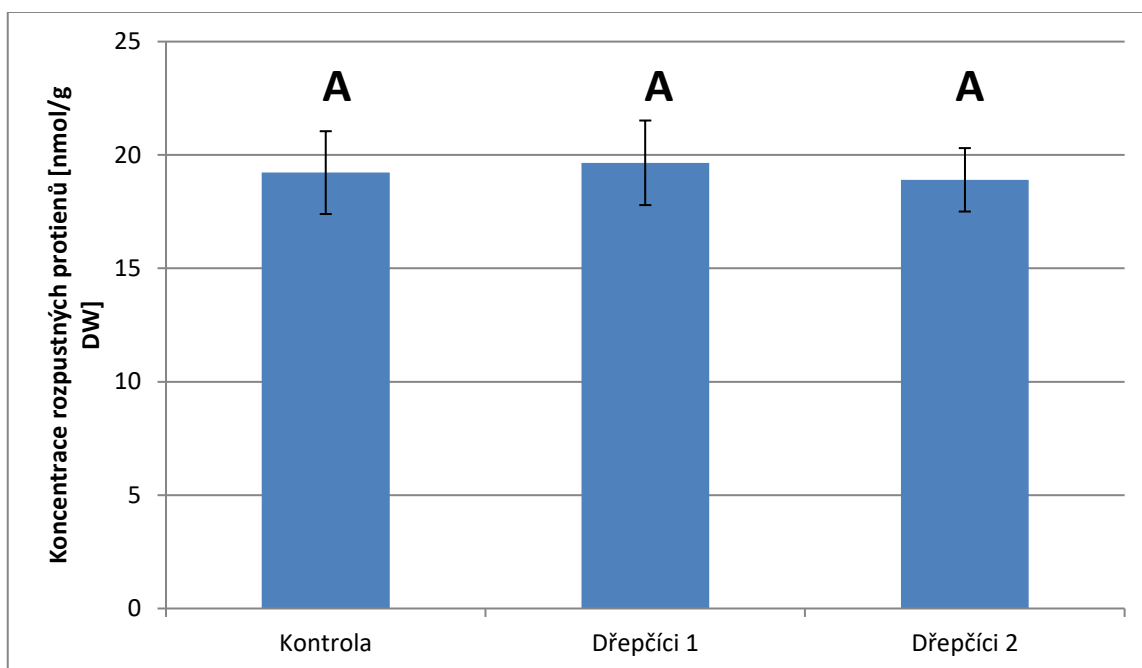


Graf č. 30.: Statistické vyhodnocení množství lysinu v zelí

Rostliny po napadení býložravcem často zvyšují množství lysinu ve svých pletivech. Není však jisté, zda má tato aminokyselina v rostlině protektivní úlohu (Gómez et al., 2012). V rostlinách zelí napadených bělásky, a to ať housenkami čerstvě vylíhlými, nebo housenkami staršími, došlo k výraznému snížení této látky v zelených částech (Daňková, 2018). V našem pokusu také došlo ke snižování koncentrace lysinu v rostlinném pletivu po napadení dřepčíky. Čím bylo napadení vyšší, tím menší množství aminokyseliny se nacházelo v listech zelí. Aminokyselina lysin tedy jako ostatní aminokyseliny spíše snižuje svou koncentraci v napadených pletivech, a proto s výraznou většinou aminokyselin pozitivně koreluje.

3.3 Rozpustné proteiny

Výsledky naznačují, že množství rozpustných proteinů v kontrolním vzorku bylo nižší, než ve vzorcích s nižší mírou napadení, což lze vidět v grafu č. 31. Naopak při vyšší míře napadení byla koncentrace proteinů nižší, než tomu tak bylo v nenapadených rostlinách. Získané hodnoty jsou dle T-testu statisticky neprůkazné, protože nedosahují kritické meze stanovené statistickými tabulkami.



Graf č. 31.: Množství rozpustných proteinů v zelí

Obvykle se množství proteinů v rostlině po jejím napadení zvyšuje. Po narušení rostlinného pletiva herbivorem se spouští obranná kaskáda indukovaná kyselinou jasmonovou. Tato kyselina také indukuje tvorbu obranných proteinů v rostlině, které nejčastěji působí proti houbovým patogenům. Ty se mohou do rostliny dostávat přes rány způsobené rostlinožravým hmyzem (Arimura et al., 2002).

V rostlinách zelí, které byly podrobeny napadení housenkami bělásky zelného, došlo k mnohem výraznějšímu zvýšení koncentrace těchto proteinů, což může poukazovat na to, že housenky bělásky rostliny více poškodily a nebo se přes rány jimi způsobené do rostlinného pletiva dostala patogenní infekce (Daňková, 2018).

V pokusu s dřepčičky nevyšly výsledky přesvědčivě. V rostlinách, kde by proteinů mělo být co nejvíce, jich bylo nejméně. Tyto výsledky mohou být ovlivněny tím, že naše rostliny nebyly podrobeny patogenové infekci ale pouze okusu dřepčičky, což jim tolik nevadilo. Proti tomu si tvořily jiné látky, které byly účinnější a stály organismus méně energie. Při nižším stupni napadení došlo k mírnému zvýšení koncentrace této látky, ale získaná data nebyla statisticky prokázána.

Závěr

Při řešení diplomové práce na téma „Změny v produkci vybraných primárních metabolitů v závislosti na napadení zelí hmyzími herbivory rodu *Phyllotreta*“ jsme došli k závěrům, že rostliny se proti napadení býložravců brání různými způsoby. Na základě našich pokusů bylo zjištěno, že u většiny primárních metabolitů dochází ke změně koncentrací v napadených pletivech rostlin. K významným změnám došlo u mnoha látek, ale zde uvedeme jen nejdůležitější a nejvýznamnější z nich.

- Askorbová kyselina prokazatelně zvýšila koncentraci v rostlinných pletivech, které napadli dřepčící. Čím více herbivorů rostlinu napadalo, tím více této organické kyseliny se tvořilo v jejích listech. Tato kyselina slouží v rostlině především jako antioxidant, čímž zvyšuje odolnost rostliny ke stresovým situacím.
- Citronová kyselina také významně zvýšila svůj obsah v napadených rostlinách dřepčičky v porovnání s kontrolními vzorky. Tato organická kyselina je velmi důležitou sloučeninou v Krebově (Citrátovém) cyklu, který slouží k tvorbě prekurzorů důležitých syntéz a redukčních ekvivalentů k výrobě energie, kterou napadené rostliny hojně využívají. Citronová kyselina může také souviset se změnou koncentrací fenylalaninu a také s ním tvořit obranný mechanismus rostliny proti napadání herbivory.
- Glutamová kyselina výrazně snížila svou koncentraci v rostlině po napadení dřepčičky. Data, která jsme získali, však byla s velkým rozptylem a bylo by třeba tento pokus zopakovat, aby se úplně prokázala správnost našeho tvrzení.
Tato aminokyselina je pro zvířata, která napadají rostliny, velmi důležitá, protože podporuje jejich trávení. Proto rostliny snižují koncentrace ve svých pletivech, aby zabránily přitažlivosti pro herbivory.
- Fenylalanin statisticky průkazně zvyšoval své množství v napadených částech rostlin zelí dřepčičky. V jiných pokusech však docházelo k tomu, že se množství této látky v napadených rostlinách snižovalo. To může vést k názoru, že každá rostlina se brání různým škůdcům různými způsoby.

Většina látek, které jsme zkoumali, změnila svou koncentraci v rostlinném pletivu po napadení býložravým hmyzem. Proto můžeme potvrdit naši nulovou hypotézu na hladině významnosti 0,05, která zněla: „Po napadení rostlin herbivorním hmyzem dochází ke změnám v jejich primárním metabolismu“. Z těchto látek primárního metabolismu vychází většina sekundárních metabolitů. Ty jsou také velmi důležité v obranných mechanismech rostlin.

Primární i sekundární metabolity také využívá člověk pro své potřeby a to především v medicíně, farmacii a potravinářském průmyslu. Tyto přírodní

látky, by mohly být využity například jako insekticidy, nebo spouštěče pro obranné mechanismy rostlin a byly by šetrnější k životnímu prostředí.

Důležité je také zmínit, že některé zkoumané látky spolu velmi výrazně korelovaly. Díky tomu můžeme soudit, že spolu tyto látky souvisí, a když se mění koncentrace jedné z nich, ovlivňuje to koncentrace jiné látky, popřípadě i mnoha dalších.

Pro úplné potvrzení nebo vyvrácení našich předpokladů a zjištěných výsledků by bylo třeba provést další výzkumná prošetření, která by potvrdila nebo vyvrátila námi získaná data.

Seznam literatury

Literární zdroje

- ADÁMKOVÁ Š., PETŘIVALSKÝ M. 2012. Vztah metabolismu a signálních funkcí oxidu dusnatého a polyaminů v rostlinách. *Chemické listy*, **106**, p. 166 – 173
- ADAMS M. A., JOHNSEN P. B., HONG-QI Z. 1988. Chemical enhancement of feeding for the herbivorous fish *Tilapia zillii*. *Aquaculture*, **72 (1 – 2)**, p. 95 – 107
- ÁNGELES-LÓPEZ Y., RIVERA-BUSTAMANTE R. F., HEIL M. 2016. Colonization by Phloem-Feeding Herbivore Overrides Effects of Plant Virus on Amino Acid Composition in Phloem of Chili Plants. *Journal of Chemical Ecology*, **42 (10)**, p. 985 – 988
- ARAB A., TRIGO J. 2011. Host plant invests in growth rather than chemical defense when attacked by a specialist herbivore. *J Chem Ecol*, **37**, p. 492 – 495
- ARANY A. M., JONG T. J., KIM H. K., DAM N. M., CHOI Y. H., VERPOORTE R., MEIJDEN E. 2007. Glucosinolates and other metabolites in the leaves of *Arabidopsis thaliana* from natural populations and their effects on a generalist and a specialist herbivore. *Chemoecology*, **18 (2)**, p. 65 – 71
- ARIMURA G., OZAWA R., NISHIOKA T., BOLAND W., KOCH T., KÜHNEMANN F., TAKABAYASHI J. 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, **29 (1)**, p. 87 – 98
- ARMAGAN K. 2017. Exogenous ascorbic acid improves defence responses of sunflower (*Helianthus annuus*) exposed to multiple stresses. *Acta Biologica Hungarica*, **68 (3)**
- AVANCI N., LUCHE D., GOLDMAN G., GOLDMAN M. 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and molecular research*, **9 (1)**, p. 484 – 505
- AZEVEDO R. A., LANCIEN M., LEA P. J. 2006. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids*, **30 (2)**, p. 143 – 162
- BALMER D., FLORS V., GLAUSER G., MAUCH-MANI B. 2013. Metabolomics of cereals under biotic stress current knowledge and techniques. *Frontiers in plant science*, **4 (82)**, p. 1 – 12
- BARAZA E., ZAMORA R., HÓDAR J. 2006. Conditional outcomes in plant – herbivore interactions: neighbours matter. *OIKOS*, **113**, p. 148 – 156
- BILGIN D. D., ZAVALA J. A., ZHU J., CLOUGH S. J., ORT D. R., DELUCIA E. H. 2010. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell & Environment*, **33 (10)**, p. 1597 – 1613

- BIXENMANN R. J., COLEY P. D., WEINHOLD A., KURSAR T. A. 2016. High herbivore pressure favors constitutive over induced defense. *Ecology and Evolution*, **6 (17)**, p. 6037 – 6049
- BOLTON M. D. 2009. Primary Metabolism and Plant Defense – Fuel for the Fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22 (5)**, p. 487 – 497
- BOSH T. J. M., WELTE C. U. 2016. Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. *Microbial biotechnology*, **10 (3)**, p. 531 - 540
- BRYS R., SHEFFERSON R. P., JACQUEMYN H. 2011. Impact of herbivory on flowering behaviour and life history trade-offs in a polycarpic herb: a 10-year experiment. *Oecologia*, **166**, p. 293-303.
- CANALES J., RUEDA-LÓPEZ M., CRAVEN-BARTLE B., AVILA C., CÁNOVAS F. M. 2012. Novel insights into regulation of asparagine synthetase in conifers. *Frontiers In Plant Science*, **3 (100)**, p. 1 – 15
- DA SILVA E. N., RIBEIRO R. V., FERREIRA-SILVA S. L., VIÉGAS R. A., SILVEIRA J. A. G. 2011. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. *Plant physiology and biochemistry*, **68 (1)**, p. 62 – 6
- DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. 1983. *Chemie potravin*, Státní nakladatelství technické literatury. Praha
- DÖBERL M. 2010. Contribution to the knowledge of the alticines from Iran, with description of a new *Phyllotreta* speciae (Col: Chrysomelidae: Alticinae). *Journal of Entomological Society of Iran*, **30 (1)**, p. 41 – 54
- DUČAIOVÁ Z., SAJKO M., MIHALIČOVÁ S., REPČÁK M. 2016. Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regul*, **79**, p. 81 – 94
- DUFFEY S. S., STOUT M. J. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insect. *Insect biochemistry and physiology*, **32 (1)**, p. 3 – 37
- EBRAHIM S., USHA K., SINGH B. 2011. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, p. 1043 - 1054
- EDREVA A. 2005. Pathogeneses-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, **31 (1-2)**, p. 105 – 124
- EHNESS R., ECKER M., GODT D. E., ROITSCH T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanism via signal transduction pathways involving protien phosphorylation. *The plant cell*, **9**, p. 1825 – 1841
- FALCO M. C., MARBACH P. A. S., POMPERMAYER P., LOPES F. C. C., SILVA-FILHO M. C. 2001. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genetics and Molecular Biology*, **24**, p. 1 – 4
- FELTON G. W. 2005. Indigestion is a plant's best defense. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **102 (52)**, p. 18771 - 18772

- FERNANDES H., MICHALSKA K., SIKORSKI M., JOSKOLSKI M. 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS Journal*, **280 (5)**, p. 1169 – 1199
- FIŠER J., NOVÁKOVÁ M., MACEK T. 2014. Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. *Chemické listy*, **108**, p. 566 – 571
- FOLLET, P. A. 2017. Insect-plant interactions: host selection, herbivory, and plant resistance – an introduction. *Entomol Exp Appl*, **162**, p. 1–3
- FÜRSTENBERG-HÄGG J., ZAGROBELNY M., BAK S. 2013. Plant defense against insect herbivores. *International journal of molecular science*, **14**, p. 10242 – 10297
- FURUMOTO T., YAMAGUCHI T., OSHIMA-ICHIE Y., NAKAMURA M., TSUCHIDA-IWATA Y., SHIMAMURA M., OHNISHI J., HATA S., GOWIK U., WESTHOFF P., BRÄUTIGAM A., WEBER A. P. M., IZUI K. 2011. A plastid sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature*, **476**, p. 472 – 475
- GARGALLO-GARRICA A., SARDANS J., PÉREZ-TRUJILLO M., PARELLA T., SECO R., FILELLA I., PENUELAS J. 2010. Metabolomic responses of *Quercus ilex* seedlings to wounding simulating herbivory. *SMASH Conference*, Santiago de Compostela, Spain
- GEORG J., VIJAY J. 2010. Recent Progress in Deciphering the Biosynthesis of Aspartate-Derived Amino Acids in Plants. *Molecular Plant*, **3 (1)**, p. 54 – 65
- GÓMEZ S., ORIAN S. M., PREISSER E. L. 2012. Exotic herbivores on a shared native host: tissue quality after individual, simultaneous, and sequential attack. *Oecologie*, **169 (4)**, p. 1015 – 1024
- GONZALES-VIGIL E., BIANCHETTI C. M., PHILLIPS G. N., HOWE G. A. 2011. Adaptive evolution of threonine deaminase in plant defense against insect herbivores. *Plant biology*, **108 (14)**, p. 5897 – 5902
- GUEVARA-MORATO M. Á., LACOPA M. G., GARCÍA-LUQUE I., SERRA M. T. 2010. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L³ plants with dual RNase and DNase activities. *Journal of Experimental Botany*, **61 (12)**, p. 3259 - 3271
- GUTBRODT B., MODY K., DORN S. 2011. Drought changes plant chemistry and causes contrasting responses in lepidopteran herbivores. *OIKOS synthesising ecology*, **120 (11)**, p. 1732 - 1740
- HAMMOND J. P., BROADLEY M. R., BOWEN H. C., SPRACKLEN W. P., HAYDEN R. M., WHITE P. J. 2011. Gene Expression Changes in Phosphorus Deficient Potato (*Solanum tuberosum* L.) Leaves and the Potential for Diagnostic Gene Expression Markers. *PLoS ONE*, **6 (9)**, p. 1 - 15
- HANZÁK J., MOUCHA J., ZAHRADNÍK J. 1973. SVĚTEM ZVÍŘAT V. BEZOBRTLÍ 2. Praha. Albatros. 451 s.
- HE C. L., FU B. D., SHEN H. Q., JIANG X. L., WEI X. B. 2011. Fumaric acid, an antibacterial component of *Aloe vera* L. *African Journal of Biotechnology*, **10 (15)**, p. 2973 – 2977

- HEŘMANOVÁ V., BÁRTA J., ČURN V. 2006. Antifugální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chemické listy*, **100**, p. 495 – 500
- HOWE G. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of plant growth regulation*, **23 (3)**, p. 223 – 237
- HU Z., ZHANG W., SHEN Y., FU H., SU X., ZHANG Z. 2009. Activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in poplar leaves induced by insect herbivory and volatiles. *Journal of Forestry Research*, **20**, p. 372
- HUANG T., JANDER G., DE VOS M. 2011. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry*, **72 (13)**, p. 1531 - 1537
- CHEN M. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect science*, **15**, p. 101 – 114
- CHEN T. H. H., MURATA N. 2011. Glycinebetaine protect plants against abiotic stress: mechanism and biotechnological applications. *Plant*, **34 (1)**, p. 1 – 20
- JAHANGIR M., ABDEL-FARID I. B., KIM H. K., CHOI Y. H., VERPOOTE R. 2009. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environmental and Experimental Botany*, **67 (1)**, p. 23 – 33
- JÄNKÄNPÄÄ H. J., FRENKEL M., ZULFUGAROV I., REICHEL T., KRIEGER-LISZKAY A., MISHRA Y., GERSHENZON J., MOEN J., LEE C., JANSSON S. 2013. Non-Photochemical Quenching Capacity in *Arabidopsis thaliana* Affects Herbivore Behaviour. *PLOS ONE*, **8 (1)**, p. 1 - 12
- JYOTHSNA Y., KAPIL M., USHA R. P. 2009. Effects of herbivore feeding on biochemical and nutrient profile of castor bean, *Ricinus communis* L. plants. *Allelopathy Journal*, **24 (1)**, p. 131 - 142
- KAUR A., PATI P. K., PATI A. M., NAGPAL A. K. 2017. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins os *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PLoS ONE*, **12 (9)**, p. 1 – 24
- KERCHEV P. I., KARPIŃSKA B., MORRIS J. A., HUSSAIN A., VERRALL S. R., HEDLEY V. E., FENTON B., FOYER C. H., HANCOCK R. D. 2013. Vitamin C and the Abscisic Acid-Insensitive 4 Transcription Factor Are Important Determinants of Aphid Resistance in *Arabidopsis*. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18 (16)**, p. 2091 – 2105
- KODÍČEK M. 2004. Biochemické pojmy – výkladový slovník. Praha. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (VŠCHT), 171 s., ISBN: 80-7080-551-X
- KOCH K. E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, **47**, p. 509 – 540
- KONNO K., HIRAYAMA C., SHINBO H., NAKAMURA M. 2009. Glycine addition improves feeding performance of non-specialist herbivores on the privet, *Ligustrum obtusifolium*: *In vivo* evidence for the physiological impacts of anti-nutritive plant defense with iridoid and insect adaptation with glycine. *Applied Entomology and Zoology*, **44 (4)**, p. 595 – 601

- KONNO K., HIRAYAMA C., YASUI H., OKADA S., SUGIMURA M., YUKUHIRO F., TAMURA Y., HATTORI M., SHINBO H., NAKAMURA M. 2010. GABA, β -Alanine and Glycine in the Digestive Juice of Privet-Specialist Insects: Convergent Adaptive Traits Against Plant Iridoids. *Journal of Chemical Ecology*, **36** (9), p. 983 – 991
- KORTH K. L., PARK D. S., GOGGIN F. L., WANG Q., GOMEZ A. K., LIU G., JIA L., NAKATA P. A. 2006. Medicago truncatula Mutants Demonstrate the Role of Plant Calcium Oxalate Crystals as an Effective Defense against Chewing Insects. *Plant Physiology*, **141**, p. 188 - 195
- KRASENKY J., JONAK C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, **63** (4), p. 1593 – 1608
- LAPČÍK O., WIMMER Z., OPLETAL L., MORAVCOVÁ J., ČOPÍKOVÁ J., DRAŠAR P. 2015. Přírodní látky kyselé chuti. *Chemické listy*, **109**, p. 488 – 491
- LIANG X., LIBERTI D., LI M., KIM Y., HUTCHENS A., WILSON R., ROLLINS J. A. 2015. Oxaloacetate acetylhydrolase gene mutants of Sclerotinia sclerotiorum do not accumulate oxalic acid, but do produce limited lesions on host plants. *Molecular Plant Pathology*, **16** (6), p. 559 – 571
- LIU C., ZHAO L., YU G. 2011. The Dominant Glutamic Acid Metabolic Flux to Produce γ -Amino Butyric Acid over Proline in *Nicotiana tabacum* Leaves under Water Stress Relates to its Significant Role in Antioxidant Activity. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53** (8), p. 608 – 618
- LOKVAM J., BRENES-ARGUEDAS T., LEE J. S., COLEY P. D., KURSAR T. A. 2006. Allelochemic function for a primary metabolite: the case of l-tyrosine hyper-production in *Inga umbellifera* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, **93** (8), p. 1109 – 1115
- LOMATE P. R., JADHAV B. R., GIRI A. P., HIVRALE V. K. 2013. Alterations in the *Helicoverpa armigera* Midgut Digestive Physiology after Ingestion of Pigeon Pea Inducible Leucine Aminopeptidase. *PLOS ONE*, **8** (9), p. 1 – 8
- LOON L. C., REP M., PIETERSE C. M. J. 2006. Signifikance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, p. 135 – 162
- LOTAN T., ORI N., FLUHR R. 1989. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *The Plant Cell*, **1**, p. 881 - 887
- MALÝ I. 2003. Pěstujeme květák, zelí a další košťálové zeleniny. Praha. Grada Publishing, 92 s., ISBN: 80-247-0409-9
- MIHAI ALDEA, JASON G. HAMILTON, JOSEPH P. RESTI, ARTHUR R. ZANGERL, MAYR. BERENBAUM & EVAN H. DE LUCIA. 2005. Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. *Plant, Cell and Environment*, **28**, p. 402-411
- MISRA R. C., SANDEEP, KAMTHAN M., KUMAR S., GHOSH S. 2016. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal

- pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis. *Scientific reports*, **6**, p. 1 – 14
- MITHÖFER A., BOLAND W. 2012. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual review of plant biology*, **63**, p. 431 – 450
 - MOLINIER J., GERHARD R., ZIPFEL C., HOHN B. 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, **442**, p. 1046 – 1049
 - MUSIDLAK O., NAWROT R., GOŹDZICKA-JÓZEPIAK A. 2017. Which Plant Proteins Are Involved in Antiviral Defense? Review on In Vivo and In Vitro Activities of Selected Plant Proteins against Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, p. 1 – 23
 - MYIAVAGA Y., TAMOI M., SHIGEOKA S. 2001. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nature biotechnology*, **19**, p. 965 – 969
 - NAGY M., GRANČAI D., MUČAJI P. 2011. Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok. Osveta, ISBN 978-80-8063-368-4
 - NAJEEB U., JILANI G., ALI S., SARWAR M., XU L., ZHOU W. 2011. Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, **186 (1)**, p. 565 – 574
 - NAJEEB U., XU L., ALI S., JILANI G., GONG H. J., SHEN W. Q., ZHOU W. J. 2009. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. *Journal of Hazardous Materials*, **170 (2-3)**, p. 1156 - 1163
 - NOGE K., TAMOGAMI S. 2013. Herbivore-induced phenylacetonitrile is biosynthesized from de novo-synthesized l-phenylalanine in the giant knotweed, *Fallopia sachalinensis*. *FEBS Letters*, **587 (12)**, p. 1811 – 1817
 - NOVÁK J. 2007. Jedovaté rostliny kolem nás. Praha. Grada Publishing, a. s., 176 s., ISBN: 978-80-247-1549-0
 - NOVÁK J., SKALICKÝ M. 2008. Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Powerprint, Praha., ISBN: 978-80-904011-1-2
 - OIDE S., BEJAI S., STAAL J., GUAN N., KALIFF M., DIXELIUS C. 2013. A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.*, **200 (4)**, p. 1187 – 1199
 - OUDA M., ČÍŽEK P., BOŽE P. 2013. Dřepčící (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) CHKO Cerová vrchovina – výsledky faunistického průzkumu v letech 2009 – 2012. **4**, p. 16-43
 - PAGAGIANNI M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, **25 (3)**, p. 244 – 263
 - PAVLOVÁ L. 2007. Fyziologie rostlin. Praha. Karolinum. 253 s., ISBN: 978-80-2460-985-0

- PEČENKOVÁ T., PLESKOT R., ŽÁRSKÝ V. 2017. Subcellular Localization of *Arabidopsis* Pathogenesis-Related 1 (PR1) Protein. *International Journal of Molecular Sciences*, **18 (825)**, p. 1 – 13
- PEDRESCHI R., FRANCK., LAMMERTYN J., ERBAN A., KOPKA J., HERTOOG M., VERLINDEN B., NICOLAÏ B. 2009. Metabolic profiling of 'Conference' pears under low oxygen stress. *Postharvest Biology and Technology*, **51 (2)**, p. 123 – 130
- PHILLIPS C. A. 1999. The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. *Letters in Applied Microbiol.*, **29**, p. 424-428
- PRACHAROENWATTANA I., ZHOU W., KEECH O., FRANCISCO P. B., UDOMCHALOTHORN T., TSCHOEP H., STITT M., GIBON Y., SMITH S. M. 2010. *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal*, **62 (5)**, p. 785 - 795
- PRASAD R., SHIVAY Y. S. 2017. Oxalic acid/oxalates in plants: from self-defence to phytoremediation. *Current Science*, **112 (8)**, p. 1665 – 1667
- PRASATH D., BALAGOPAL A., MAHANTESH V. ROSANA O. B., JAYASANKAR S., ANANDARAJ M. 2014. Comparative study of pathogenesis-related protein 5 (PR5) of different *Zingiberaceae* species. *Indian Journal of Biotechnology*, **33**, p. 178 – 185
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. A KOL. 1998. Fyziologie rostlin. Praha. Academia, 484 s., ISBN: 80-200-0586-2
- RAI V. K. 2002. Role of Amino Acids in Plant Responses to Stresses. *Biologia Plantarum*, **45 (4)**, p. 481 – 487
- RIVIÈRE M. P., MARAIS A., PONCHET M., WILLATS W., GALIANA E. Silencing of acidic pathogenesis-related *PR-1* genes increases extracellular β -(1 \rightarrow 3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, **59 (6)**, p. 1225 - 1239
- ROBERT C. A. M., ERB M., HIBBARD B. E., FRENCH B. W., ZWAHLEN C., TURLINGS T. C. J. 2012. A specialist root herbivore reduces plant resistance and uses an induced plant volatile to aggregate in a density-dependent manner. *Functional Ecology*, **26 (6)**, p. 1429 – 1440
- ROJAS C. M., SENTHIL-KUMAR M., TZIN V., MYSORE K. S. 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, **5 (17)**, p. 1 - 12
- SHU L., LOU Q., MA C., DING W., WU J., FENG F., LU X., LUO L., XU G., MEI H. 2011. Genetic, proteomic and metabolic analysis of the regulation of energy storage in rice seedlings in response to drought. *Proteomics*, **11 (21)**, p. 4122 – 4138
- SCHRANZ M. E., MANZANEDA A. J., WINDSOR A. J., CLAUSS M. J., MITCHELL-OLDS T. 2009. Ecological genomics of *Boechera stricta*: identification of a QTL

- controlling the allocation of methionine- vs branched-chain amino acid-derived glucosinolates and levels of insect herbivory. *Heredity*, **102**, p. 465 – 474
- SINGH A., JAIN D. TYAGI C., SINGH S., KUMAR S., SINGH I. K. 2018. *In silico* prediction of active site and *in vitro* DNase and RNase activities of *Helicoverpa*-inducible pathogenesis related-4 protein from *Cicer arietinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **113**, p. 869 – 880
 - SOKIC-LAZIC D., MINTEER S. D. 2008. Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, **24 (4)**, p. 939 – 944
 - STEVENS A. N. P. 2010. Predation, Herbivory, and Parasitism. *Nature Education*, **3 (10)**, p. 36
 - STIGENBERG J. 2017. Review of the genus *Townesilitus* (Hymenoptera, Braconidae) in Sweden, with description of a new species and a molecular characterization. *Ent. Tidskr.*, **138**, p. 137 – 150
 - SUDISHA J., SHARATHCHANDRA R. G., AMRUTHESH K. N., KUMAR A., SHEKAR SHETTY H. 2011. Pathogeneses Related Proteins in Plant Defense Response. *Plant Defense: Biological Control*, **12**, p. 379 – 403
 - SUN Y., HONG S. 2011. Effects of citric acid as an important component of the responses to saline and alkaline stress in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Growth Regulation*, **64 (2)**, p. 129 - 139
 - ŠAPIRO D. A KOL. 1988. Ovoce a zelenina ve výživě člověka. Praha. Státní zemědělské nakladatelství, 226 s., ISBN: 5-7860-0431-7
 - ŠEFROVÁ H. 2013. Škodliví činitelé cukrové řepy – živočišní škůdci – Dřepčící (*Alticinae*) škodící na řepě. *Listy cukrovarnické a řepářské*, **129 (11)**, p. 341 – 344
 - ŠIMEK J. 2016. Toxicita těžkých kovů, jejich příjem, translokace a vliv na produkci ochranných a signálních látek u rostlin. Disertační práce. PřF UHK, 108 s.
 - TAIZ L., ZEIGER E. 2010. Plant physiology, fifth edition. Sunderland. Sinauer Associates, 782 s., ISBN: 0878938664
 - TANG Y., LIU Q., LIU Y., ZHANG L., DING W. 2017. Overexpression of *NtPR-Q* Up-Regulates Multiple Defense-Related Genes in *Nicotiana tabacum* and Enhances Plant Resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science*, **8 (1963)**, p. 1- 10
 - TLUSTŠOŠ P., PAVLÍKOVÁ D., BALÍK J. 2006. Mechanismus příjmu rizikových prvků rostlinami a jejich hromadění v biomase. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*, p. 1 – 37
 - VAN DAM N. M., OOMEN M. W. A. T. 2008. Root and shoot jasmonic acid applications differentially affect leaf chemistry and herbivore growth. *Plant Signaling & Behavior*, **3 (2)**, p. 91 - 98
 - VERED T., GAD G. 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant*, **3 (6)**, p. 956 – 972

- VERPOOTE, R., ALFERMANN, A. W. 2000. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 297 s., ISBN 0-7923-6360-4
- VIG K. 2003. Data on the biology of cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephalus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, **68 (4)**, p. 231 - 237
- WINGLER A., ROITSCH T. 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant biology*, **10 (1)**, p. 50 – 62
- WOLDEMARIAM M. G., ONKOKESUNG N., BALDWIN I T., GALIS I. 2012. Jasmonoyl-l-isooleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-l-isooleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *The Plant Journal*, **72 (5)**, p. 758 – 767
- WOLDEMARIAM M. G., ONKOKESUNG N., BALDWIN I., GALIS I. 2012. Jasmonoyl-l-isooleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-l-isooleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *The Plant Journal*, **72 (5)**, p. 758 – 767
- WOLUCKA B. A., GOOSSENS A., INZÉ D. 2005. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, **56 (419)**, p. 2527 – 2538
- YOSHIMURA K., ISHIKAWA T. 2017. Chemistry and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer, Cham, ISBN: 978-3-319-74057-7
- YUI R., IKETANI S., MIKAMI T., KUBO T. 2003. Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1 α subunit in anther tapetum causes male sterility. *The Plant Journal*, **34 (1)**, p. 57 – 66

Internetové zdroje

- ANONYM. 2004. Aspartic acid [online]. Web pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [citováno 6.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-aspartic-acid#section=Top>
- ANONYM. 2004. Glutamic acid [online]. Web pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [citováno 6.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-glutamic-acid#section=Top>
- ANONYM. 2018. Škûdci olejnin. Pŕipraveno v râmci ŕešení projektu CZ.1.07/2.2.00/28.0020. Investice do rozvoje vzdĕlávání [online]. Web web2.mendelu.cz [citováno 19.1.2018]. Dostupné z WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=6301&typ=html
- BRŕÍŽĎALA J. 2018. Fotosyntéza [online]. Web e.chembook.eu [citováno 23.3.2018]. Dostupné z WWW: <http://e-chembook.eu/fotosynteza>

- BŘÍŽĎALA J. 2018. Krebsův cyklus a dýchací řetězec [online]. Web e.chembook.eu [citováno 25.3.2018]. Dostupné z WWW: <http://e-chembook.eu/krebsuv-cyklus-a-dychaci-retezec>
- DEML M. 2007. *Phyllotreta nigripes* (Fabricius, 1775) [online]. Web biolib.cz [citováno 21.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://www.biolib.cz/en/taxonimage/id37650/?taxonid=11939>
- DEML M. 2009. Dřepčík hajní *Phyllotreta nemorum* (Linnaeus, 1758) [online]. Web biolib.cz [citováno 21.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id77130/?taxonid=11938>
- INSTITUT GALENUS. 2018. Glykolýza [online]. Web galenus.cz [citováno 23.3.2018]. Dostupné z WWW: <http://www.galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-sacharidy-glykolyza>
- KRMEČNÍK P., KYSILKA J. 2007. Sekundární metabolismus rostlin [online]. Web biotox.cz [citováno 7.3.2018]. Dostupné z WWW: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/sekmetab.php>
- KUBÍČKOVÁ D. 2016. NOVÝ STANDARD VE HNOJENÍ MAKROPRVKŮ, MIKROPRVKŮ A AMINOKYSELINAMI PROLIN GLYCIN KYSELINA GLUTAMOVÁ [online]. Web docplayer.cz [citováno 6.4.2018]. Dostupné z WWW: <http://docplayer.cz/4361473-Novy-standard-ve-hnojeni-makroprvku-mikroprvku-a-aminokyselinami-prolin-glycin-k-ys-e-lin-a-g-l-u-ta-m-ova-prolin-g-lyci-n-glycin-kyselina-glutamova.html>
- MIHULKA S. 2018. Biotech slovník – threonin [online]. Web gate2biotech.cz [citováno 9.4.2018]. Dostupné z WWW: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=237>
- MUŠKA F. 1999. Vážní škůdce brukvovité zeleniny – dřepčící [online]. Web asz.cz [citováno 19.1.2018]. Dostupné z WWW: <http://www.asz.cz/redakce/tisk.php?lanG=cs&clanek=22047&slozka=5880&>
- NOVÝ B. 2014. Zelí hlávkové (*Brassica oleracea capitata* L.) [online]. Web celostnimedcina.cz [citováno 6.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://www.celostnimedcina.cz/zeli-hlavkove-brassica-oleracea-capitata-l.htm>
- PEŠKOVÁ K. 2011. Isoleucin [online]. Web ciselniky.dasta.mzcr.cz [citováno 9.4.2018]. Dostupné z WWW: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/KPAAE.htm>
- PEŠKOVÁ K. 2011. Methionin [online]. Web ciselniky.dasta.mzcr.cz [citováno 9.4.2018]. Dostupné z WWW: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/KPAAH.htm>
- PETERS J. 2009. Flohkäfer an Goldrute: Psylliodes? (11.08.09) --> P. chrysocephala [online]. Web insektenfotos.de [citováno 19.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://insektenfotos.de/forum/index.php?page=Thread&threadID=27691>

- POKORNÝ Z. 2014. Dřepčík zelný [online]. Web chovzvirat.cz [citováno 19.1.2018]. Dostupné z WWW: <http://www.chovzvirat.cz/zvire/1189-drepcik-zelny/>
- SCHMIDT U. 2005. Phyllotreta atra (Fabricius, 1775) [online]. Web kaefer-der-welt.cz [citováno 21.4.2018]. Dostupné z WWW: https://www.kaefer-der-welt.de/phyllotreta_atra.htm
- SMEJKAL P. 2018. L-TYROSIN [online]. Web nutrion.cz [citováno 9.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://www.nutrion.cz/info/detail.php?idzb=246>
- ŠTĚPNIČKOVÁ O. 2016. Staré dobré zelí: zelenina i lék od starověku po dnešek [online]. Web ireceptar.cz [citováno 6.4.2018]. Dostupné z WWW: <https://www.ireceptar.cz/zdravi/stare-dobre-zeli-zelenina-i-lek-od-staroveku-po-dnese/>

Ústní sdělení

- DAŇKOVÁ K. 2018. Změny v produkci vybraných primárních metabolitů u rostlin čeledi Brassicaceae v závislosti na napadení běláskem zelným, Univerzita Hradec Králové, diplomová práce – ústní sdělení

Přílohy

Tab. 1.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny šťavelové v zelí

Kyselina šťavelová	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	0,53 [mg/g]	0,613 [mg/g]	0,585 [mg/g]
Směrodatná odchylka	0,206	0,148	0,192
Standardní chyba průměru	0,092	0,066	0,086
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,738		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	0,437		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,259		

Tab. 2.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny askorbové v zelí

Kyselina askorbová	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	0,038 [mg/g]	0,107 [mg/g]	0,159 [mg/g]
Směrodatná odchylka	0,015	0,028	0,09
Standardní chyba průměru	0,007	0,013	0,040
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	4,839		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	2,978		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,239		

Tab. 3.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny citronové v zelí

Kyselina citronová	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	4,031 [mg/g]	5,222 [mg/g]	5,498 [mg/g]
Směrodatná odchylka	0,631	0,923	1,453
Standardní chyba průměru	0,282	0,413	0,650
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	2,384		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	2,072		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,358		

Tab. 4.: Statistické vyhodnocení množství kyseliny fumarové v zelí

Kyselina fumarová	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	0,029 [mg/g]	0,036 [mg/g]	0,026 [mg/g]
Směrodatná odchylka	0,009	0,01	0,011
Standardní chyba průměru	0,004	0,004	0,005
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	1,196		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	0,36		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,501		

Tab. 5.: Statistické vyhodnocení množství glutamové kyseliny v zelí

Glutamová kyselina	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	484,11 [nmol/g DW]	281,79 [nmol/g DW]	145,07 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	139,549	35,525	43,477
Standardní chyba průměru	80,571	20,511	25,102
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	1,987		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	3,281		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	3,444		

Tab. 6.: Statistické vyhodnocení množství glycinu v zelí

Glycin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	280,2 [nmol/g DW]	233,03 [nmol/g DW]	188,74 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	21,901	16,124	16,194
Standardní chyba průměru	12,645	9,309	9,35
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	2,453		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	4,749		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	2,742		

Tab. 7.: Statistické vyhodnocení množství argininu v zelí

Arginin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	123,23 [nmol/g DW]	116,97 [nmol/g DW]	102,35 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	2,57	13,995	10,835
Standardní chyba průměru	1,484	8,08	6,256
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,622		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	2,651		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,168		

Tab. 8.: Statistické vyhodnocení množství alaninu v zelí

Alanin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	949,41 [nmol/g DW]	741,29 [nmol/g DW]	652,54 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	35,782	23,486	68,549
Standardní chyba průměru	20,66	13,56	39,578
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	6,878		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	5,925		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,732		

Tab. 9.: Statistické vyhodnocení množství tyrosinu v zelí

Tyrosin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	110,72 [nmol/g DW]	112,56 [nmol/g DW]	101,5 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	1,915	13,23	5,656
Standardní chyba průměru	1,106	7,639	3,266
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,195		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	2,185		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,087		

Tab. 10.: Statistické vyhodnocení množství valinu v zelí

Valin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	241,74 [nmol/g DW]	220,34 [nmol/g DW]	202,22 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	5,186	24,416	8,505
Standardní chyba průměru	2,994	14,097	4,911
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	1,213		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	5,61		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,991		

Tab. 11.: Statistické vyhodnocení množství fenylalaninu v zelí

Fenylalanin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	112,44 [nmol/g DW]	148,42 [nmol/g DW]	163,65 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	12,027	10,685	5,018
Standardní chyba průměru	6,944	6,169	2,897
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	3,163		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	5,559		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,825		

Tab. 12.: Statistické vyhodnocení množství isoleucinu v zelí

Isoleucin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	129,99 [nmol/g DW]	106,81 [nmol/g DW]	101,05 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	1,502	15,575	2,255
Standardní chyba průměru	0,867	8,992	1,302
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	2,095		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	3,219		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,518		

Tab. 13.: Statistické vyhodnocení množství leucinu v zelí

Leucin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	290,12 [nmol/g DW]	264,6 [nmol/g DW]	221,76 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	11,852	35,679	16,192
Standardní chyba průměru	6,843	20,6	9,349
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,96		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	4,82		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,547		

Tab. 14.: Statistické vyhodnocení množství lysinu v zelí

Lysin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	158,37 [nmol/g DW]	149,61 [nmol/g DW]	138,91 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	1,274	12,563	8,001
Standardní chyba průměru	0,736	7,253	4,62
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,981		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	3,398		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	1,016		

Tab. 15.: Množství rozpustných proteinů v zelí

Rozpustné proteiny	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	19,222 [mg/g FW]	19,655 [mg/g FW]	18,905 [mg/g FW]
Směrodatná odchylka	4,083	4,171	3,128
Standardní chyba průměru	1,826	1,865	1,399
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,166		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	0,138		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,303		

Statisticky nevýznamné aminokyseliny

Tab. č. 16.: Množství asparagové kyseliny v zelí

Asparagová kyselina	Kontrola	Dřepčící 1	Dřepčící 2
Průměr	49,47 [nmol/g DW]	50,91 [nmol/g DW]	46,04 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	13,374	15,097	3,727
Standardní chyba průměru	7,722	8,717	2,152
T-test – Kontrola a Dřepčící 1	0,101		
T-test – Kontrola a Dřepčící 2	0,349		
T-test – Dřepčící a Dřepčící	0,443		

Tab. č. 17.: Množství asparaginu v zelí

Asparagin	Kontrola	Dřepčící 1	Dřepčící 2
Průměr	---	393,74 [nmol/g DW]	409,74 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	---	27,102	59,71
Standardní chyba průměru	---	15,648	34,475
T-test – Dřepčící 1 a Dřepčící 2	0,345		

Tab. č. 18.: Množství glutaminu v zelí

Glutamin	Kontrola	Dřepčící 1	Dřepčící 2
Průměr	---	113,57 [nmol/g DW]	---
Směrodatná odchylka	---	37,45	---
Standardní chyba průměru	---	21,622	---

Tab. č. 19.: Množství histidinu v zelí

Histidin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	151,16 [nmol/g DW]	155,5 [nmol/g DW]	140,95 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	13,602	18,765	20,168
Standardní chyba průměru	7,853	10,834	11,644
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,265		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	0,594		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,747		

Tab. č. 20.: Množství threoninu v zelí

Threonin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	299,67 [nmol/g DW]	297,6 [nmol/g DW]	273,96 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	53,298	21,632	26,895
Standardní chyba průměru	30,773	12,49	15,528
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,051		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	0,609		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,969		

Tab. č. 21.: Množství methioninu v zelí

Methionin	Kontrola	Dřepčici 1	Dřepčici 2
Průměr	109,14 [nmol/g DW]	94,46 [nmol/g DW]	89,28 [nmol/g DW]
Směrodatná odchylka	10,036	27,98	44,929
Standardní chyba průměru	5,794	16,155	25,941
T-test – Kontrola a Dřepčici 1	0,699		
T-test – Kontrola a Dřepčici 2	0,61		
T-test – Dřepčici 1 a Dřepčici 2	0,138		