

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Produkce flavonoidů a fenolických látek u Brassicaceae
v závislosti na napadení běláskem zelným

Diplomová práce

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| Autor: | Lucie Mašková |
| Studijní program: | N1501 Biologie |
| Studijní obor: | Systematická biologie a ekologie |
| Vedoucí práce: | doc. Ing. Jiří Tůma, CSc. |



Zadání diplomové práce

Autor: Lucie Mašková

Studium: S16BI011NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název diplomové práce: **Produkce flavonoidů a fenolických látek u Brassicaceae v závislosti na napadení běláskem zelným**

Název diplomové práce AJ: The production of flavonoids and fenolic compounds in Brassicaceae in dependence on the cabbage butterfly attack

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Bělásek zelný se vyskytuje pravidelně a způsobuje značné škody, zvláště na kvěťáku a bílém zelí, ale škodí i na hořčici a řeřiše aj. Flavonoidy a další látky fenolického charakteru jsou sekundární metabolity rostlin, které mohou fungovat v obraně rostlin proti herbivornímu hmyzu. Jejich účinek není zcela prozkoumán. Cílem práce je výzkum závislosti mezi napadením zvoleného druhu rostlin čeledi brassicaceae běláskem zelným a produkcí vybraných sekundárních metabolitů. Z napadených rostlin bude nutné odchytnout imaga běláška zelného. Oplozené samičky aplikovat na rostliny v kultivačních boxech. Zjistit reakci rostlin na nakladená vajíčka i poškození housenkami běláška. Provést analýzy rostlin na obsah vybraných metabolitů. Pomocí spektroskopických metod aj. budou stanoveny koncentrace fenolických látek, flavonoidů aj. i některé parametry oxidačního stresu (např. peroxid vodíku, superoxidový radikál aj.).

Riach A.C. et al. (2015): Analysis of plant leaf metabolites reveals no common response to insect herbivory by *Pieris rapae* in three related host-plant species. *Journal of Experimental Botany*, Volume: 66 (9): 2547-2556. doi:10.1093/jxb/erv045 Onkokesung N. et al. (2014) Modulation of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore *Pieris brassicae*. *Journal of Experimental Botany*, 65 (8): 2203-2217. DOI: 10.1093/jxb/eru096 Ahuja I. et al. (2010) Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy Sustainable Development* . 30: 311?348. DOI: 10.1051/agro/2009025

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Oponent: RNDr. Milan Skalický, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.10.2015

Prohlášení:

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

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za odbornou pomoc a připomínky, které mi při zpracování práce pomohly.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Matěji Semerákovi, za asistenci v laboratoři a cenné rady, RNDr. Zuzaně Kovalíkové, PhD, za pomoc s provedením experimentů a katedře chemie, za vyhodnocení některých vzorků.

Anotace

MAŠKOVÁ, L. *Produkce flavonoidů a fenolických látek u Brassicaceae v závislosti na napadení běláskem zelným*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Jiří Tůma. 55 s.

Tato diplomová práce se zabývá výzkumem závislosti produkce vybraných sekundárních metabolitů zvoleného druhu rostlin z čeledi Brassicaceae na napadení běláskem zelným. Pomocí spektrofotometrických metod byly zjištěny koncentrace fenolických látek, flavonoidů, kyseliny salicylové a některé parametry oxidačního stresu – peroxid vodíku a superoxidový radikál po aplikaci housenek a nakladení vajíček dospělci běláška zelného na rostliny.

Klíčová slova

bělásek zelný, flavonoidy, fenolické látky, čeleď Brassicaceae

Annotation

MAŠKOVÁ, L. *The production of flavonoids and fenolic componds in Brassicaceae in dependence on the large white attack*. Hradec Králové, 2018. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Jiří Tůma. 55 p.

This diploma thesis deals with the research of the dependence of the production of selected secondary metabolites of the selected plant species from the Brassicaceae family on the infestation with large white. Spectrophotometric methods have found concentrations of phenolic substances, flavonoids, salicylic acid and some parameters of oxidative stress - hydrogen peroxide and superoxide radicals after application of caterpillars and on the laid eggs of adults of large white on the plants.

Keywords

large white, flavonoids, phenolic substances, family Brassicaceae

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 8 |
| 2 | Literární přehled..... | 9 |
| 2.1 | Stres rostlin..... | 9 |
| 2.2 | Reakce rostlin na stres..... | 11 |
| 2.3 | Obranné mechanismy rostlin proti herbivorním škůdcům a patogenům. 11 | |
| 2.4 | Strukturní obranné mechanismy..... | 12 |
| 2.5 | Chemické obranné mechanismy..... | 13 |
| 2.5.1 | Sekundární metabolity..... | 14 |
| 2.5.1.1 | Biogeneze sekundárních metabolitů v rostlinách..... | 15 |
| 2.5.1.2 | Rostlinné fenolické látky..... | 17 |
| 2.5.1.3 | Kyselina salicylová..... | 19 |
| 2.5.1.4 | Flavonoidy..... | 20 |
| 2.5.2 | Oxidační vzplanutí..... | 23 |
| 2.5.2.1 | Hlavní funkce oxidačního vzplanutí..... | 24 |
| 2.5.2.2 | Mechanismy produkce ROS v reakci na patogeny..... | 24 |
| 2.6 | Signalizace napadení herbivorem uvnitř rostliny..... | 25 |
| 2.7 | Signalizace napadení herbivorem do vnějšího okolí rostliny..... | 26 |
| 2.8 | Průběh obranné reakce..... | 26 |
| 2.9 | Reakce rostliny na nakladená vajíčka..... | 27 |
| 3 | Metodika..... | 29 |
| 3.1 | Způsob odchyty škůdce běláška zelného..... | 29 |
| 3.2 | Rostlinný materiál použitý pro experiment..... | 30 |
| 3.3 | Pěstební boxy..... | 30 |
| 3.4 | Příprava rostlin před samotným vyhodnocením..... | 31 |
| 3.5 | Analýza rostlinného materiálu..... | 32 |
| 3.6 | Statistické zpracování výsledků..... | 33 |
| 4 | Výsledky..... | 35 |
| 5 | Diskuse..... | 41 |
| 6 | Závěr..... | 43 |
| 7 | Seznam použité literatury..... | 44 |
| 8 | Přílohy..... | 53 |

1 Úvod

Rostliny jsou stále ohrožovány nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Na rozdíl od živočichů jsou nepohyblivé a tím pádem jakémukoliv nebezpečí nemohou uniknout útekem.

Tyto nepříznivé vlivy souhrnně označujeme jako stresové faktory neboli stresory, které mohou mít povahu abiotickou, tedy neživou a biotickou, zahrnující živé organismy. Jedním z biotických faktorů je i napadání rostlin herbivorními škůdci, pro které jsou významné ty části rostlin s největším množstvím živin. Rostliny samozřejmě proti těmto vlivům bojují a to pomocí obranných mechanismů.

Obranné mechanismy rostlin mají za úkol zachovat homeostázu a zabránit poškození nebo smrti organismu. U rostlin došlo během evoluce k vytvoření řady těchto mechanismů, které umožňují úspěšně se útokům z vnějšího prostředí bránit. Mezi nejběžnější obranné mechanismy patří morfologické adaptace, jako je například tvorba trnů, trichomů a jiných obranných struktur a chemické adaptace, při kterých dochází například k tvorbě sekundárních metabolitů nebo k oxidačnímu vzplanutí. Sekundární metabolity byly dříve považovány za bezcenné odpadní látky. Dnes víme, že v rostlinách hrají důležitou obrannou roli. Mezi tyto sekundární metabolity patří flavonoidy a jiné fenolické látky, kterými se budeme v této práci zabývat. Téma této práce jsem zvolila z důvodu zajímavosti a také kvůli tomu, že tato tematika není ještě zcela prozkoumána.

Cílem práce bylo zjistit, jak jsou rostlinné obranné mechanismy schopny se s mírným stresem, v podobě herbivorního škůdce běláška zelného (*Pieris brassicae*), vypořádat. Provést analýzy na obsah vybraných sekundárních metabolitů a jiných obranných látek pomocí spektrofotometrických metod a zjistit změny jejich koncentrace v závislosti na napadení. Výzkum byl prováděn na rostlinách z čeledi Brassicaceae konkrétně na brukvi zelné (*Brassica oleracea*). Dalším cílem bylo zjistit, zda rostliny reagují rozdílně, pokud jsou napadeny housenkami běláška zelného nebo když jsou na ně nakladena pouze jeho vajíčka. Před zahájením pokusu byla stanovena hypotéza, že v rostlinách po napadení škůdцем dojde ke změnám v obsahu sekundárních metabolitů, zejména látek sloužících k obraně.

Tento experiment byl součástí dalších experimentů, kde byly pozorovány změny v produkci primárních metabolitů a tyto výsledky jsou součástí jiných prací. Při těchto pokusech nebyl použit pouze bělásek zelný, ale také dřepčík rodu *Phyllotreta*.

2 Literární přehled

2.1 Stres rostlin

Rostliny představují jednu z největších skupin autotrofních organismů na této planetě. Jsou důležitým zdrojem potravy pro velký počet organismů, a proto je fascinující, že ještě vůbec existují, když je na nich tolik jedinců závislých. Kromě toho musí čelit i nepříznivým vlivům vnějšího prostředí (Kumar, 2017).

Na světě totiž není místo, kde by rostliny nebyly vystaveny zátěžovým faktorům. Většina planety je plná míst s relativně extrémním vnějším zatížením. Díky evolučním procesům, které přinesly propracované kombinace morfologických, anatomických, fyziologických a behaviorálních vlastností, mohou rostliny svůj stav v zátěžových situacích optimalizovat (Orcutt et Nilsen, 2000).

Přirozené prostředí, ve kterém se rostliny nacházejí, tvoří složitá sada stresorů, které v rostlině vyvolávají nepříznivý stav neboli stres (Cramer et al., 2011). Tyto stresové faktory mohou mít povahu abiotickou nebo biotickou. Rostliny se jim díky přisedlé povaze nemohou vyhnout. Jsou pro ně hrozbou, jelikož jim zabraňují dosáhnout plného genetického potenciálu, omezují jejich produktivitu a způsobují zranění, nemoci nebo odchylky ve fyziologii (Krishania et al., 2013).

Abiotické stresory zahrnují v zásadě všechny neživé environmentální faktory, které mohou negativně nebo dokonce škodlivě ovlivnit růst a produktivitu rostlin. Patří sem například vysoká ozáření, nedostatek vody i zaplavení stanoviště vodou, extrémní teploty, dále nedostatek anorganických živin (dusík, fosfor, draslík a další) v půdě nebo zbytky chemikálií z lidské činnosti (Gong et al., 2013). Jsou to tedy takové podmínky prostředí, které snižují růst a výnosy rostlin pod optimální úroveň (Cramer et al., 2011).

Biotické stresory jsou naopak od stresorů abiotických živé organismy a v rostlinách vyvolávají biotický stres. Patří sem houby, bakterie, viry, konkurenční druhy rostlin a v neposlední řadě herbivorní živočichové včetně hmyzu (Shafique et al., 2014).

Herbivorie je důležitý vztah mezi rostlinami a živočichy. Herbivoři jsou takoví živočichové, kteří jsou přizpůsobeni ke konzumaci rostlinného materiálu (Stevens, 2010). Mohou mít velmi škodlivé účinky na růst, reprodukci a dokonce i přežití rostlin (Brys et al., 2011). Aby mohli dosáhnout maximálního příjmu živin, tak si mnoho z nich vyvinulo určité schopnosti, které jim umožňují určit, jaké rostliny obsahují málo defenzivních sloučenin a zároveň vyšší množství vysoce kvalitních živin. Některé druhy hmyzu, jako jsou motýli, mají na nohou chemické senzory, které jim umožňují ochutnat rostlinu předtím, než zkonsumují jakoukoli část. Herbivoři, kteří se živí cibulovinami, často používají svůj smysl pro detekci

hořkých sloučenin a přednostně se živí mladšími listy, které obsahují méně chemikálií (Stevens, 2010).

Rostlinná pletiva jsou hůře stravitelná než živočišná tkáň. Výživné látky jsou uvnitř tuhých buněčných stěn a obsahují mnoho molekul, které jsou obtížně stravitelné. Kvůli tomu mají herbivoři složitý zažívací systém. Ale i s tímto silným zažívacím systémem rostlinný materiál stále nemá tak vysoký obsah tuků a bílkovin jako zvířecí tkáň, takže herbivoři musí konzumovat velké množství potravy, aby si udrželi svoji tělesnou stavbu (Nelson, 2013). Mohou svým působením změnit kvalitu rostlin, což může později ovlivnit i ostatní skupiny škůdců (Pashalidou et al., 2015). Mezi tyto herbivorní živočichy a škůdce patří i housenky běláška zelného (Žižka, 2015).

Bělásek zelný (*Pieris brassicae*)

Tento denní motýl se vyskytuje ve volné krajině, na polích, loukách, zahradách, nebo parcích. Je bíle zbarvený až na rohy předních křídel, která jsou černá. Samička má navíc na prostředku křídel dvě černé skvrny. Spodní strana křídel je nažloutle bílá. Rozpětí křídel je 5 – 6,5 cm (Žižka, 2015). Specializovaný je převážně na rostliny z čeledi Brassicaceae. Škody způsobené housenkami můžou být v době přemnožení obrovské (Kumar, 2017).

Samičky kladou zlatožlutá vajíčka na rub listů zelí, kapusty, brukve, hořčice, ohnice atd. (Žižka, 2015). Kladena jsou do skupin (Rod, 2017).

Po 10 až 14 dnech se líhnou z vajíček housenky, které jsou bledě zelené s černými bradavičkami a s krátkými chloupky. Postupně začnou ožírat listy, až jsou celé proděravělé. To se stále opakuje, než zbydou pouze listová žebra. Zpočátku žijí housenky pospolitě, ale později se rozlezou. Stěhují se z jednoho pole na druhé (Mašl, 1873). Jsou to velice žraví škůdci (Pashalidou et al., 2015).

Proměna larvy v dospělce trvá přibližně měsíc. Poté, co má 4 - 5 centimetrů, tak se zakuklí. U bělásků toto kuklení probíhá většinou hromadně. Každoročně stihne bělásek zelný vytvořit dvě až tři nové generace, kdy první housenky se líhnou zjara - od dubna do června, druhé během léta - v červenci a v srpnu. Kolonie bělásků dokáže zničit celou úrodu. Nejenže se na ní živí, ale znehodnocuje ji i svým trusem. Díky konzumaci brukvovitých rostlin se v těle larev bělásků hromadí odpudivé a jedovaté látky, kterými zapáchají. To jim zajišťuje ochranu před některými druhy ptáků, pro které představují potenciální potravu. I přesto jsou vítaným pokrmem lumčíka žlutohého (*Apanteles glomeratus*), který se živí hemolymfou a tukem z jejich těl (Kocábková, 2012).

2.2 Reakce rostlin na stres

Přežití vyšších rostlin závisí na jejich schopnosti přizpůsobit se stresu. Proto se vyvinuly tak, aby reagovaly na stres tím, že mění své normální vzorce genové exprese a fyziologii (Cutt et Klessig, 1992).

To, jak bude rostlina na stres reagovat, závisí na více faktorech. Jednak na charakteru stresoru, jeho velikosti, rychlosti nástupu a době působení. U rostliny je rozhodující její fyziologický stav, genotyp a vývojové stadium. V přirozených podmínkách často působí více stresorů najednou a jejich efekt se obvykle vzájemně prohlubuje. Stres má u rostlin různou šíři projevů. Základní charakteristikou bývá trvalé zastavení růstu, což však nemusí platit vždy a pro všechny stresory. U některých rostlin může být naopak zvýšená růstová aktivita součástí obranných reakcí. Pokud na rostlinu začne působit stresor, dojde v rostlině k poplachové fázi, dále nastává fáze restituční, kdy se aktivují obranné mechanismy. Poté, co stres pomine, se rostlina vrací do původního stavu. Pokud stres nadále přetrvává, tak se rostlina buď dokáže přizpůsobit, nebo dojde k jejímu vyčerpání a postupnému úhynu (Pavlová, 2005).

2.3 Obranné mechanismy rostlin proti herbivorním škůdcům a patogenům

Protože rostliny herbivorním škůdcům a patogenům čelí po celé své životní období, postupně si vyvinuly velké množství obranných strategií (Wu et Baldwin, 2010). Tato schopnost bránit se je důležitá nejen pro rostliny rostoucí v jejich přirozeném prostředí, ale i pro rostliny využívané pro kultivaci (Kumar, 2017).

Co se týče škůdců v podobě hmyzu, tak na naší planetě jich existuje téměř milion a skoro polovina z nich se živí rostlinami. Tato probíhající bitva mezi rostlinami a hmyzem trvá více než 350 milionů let a během jejich vzájemné koevoluce si hmyz vyvinul schopnost lokalizovat hostitelskou rostlinu pomocí fyzikálních nebo chemických podnětů, které hostitelská rostlina vytváří (Wu et Baldwin, 2010).

Rostliny vyvinuli různé způsoby, jak útoky herbivorního hmyzu odrazit (Kumar, 2017). Reagují skrz složitý a nepravidelný obranný systém, který zahrnuje strukturní bariéry, toxické chemické látky a schopnost přitahovat přirozené nepřátele svých škůdců. Po napadení rostliny produkují nesčetné množství specializovaných metabolitů a proteinů, které mají toxické, repelentní nebo antinutriční účinky na útočníky (War et al, 2012).

Součástí obranného systému je tedy velké množství obranných mechanismů, které mají rostliny k dispozici a které se různým způsobem překrývají. Mohou se u nich vyskytovat stále, nebo se vytvářejí až po jejich napadení. Podle toho rostlinnou obranu můžeme rozdělit na aktivní a pasivní (Řepková, 2013).

- Aktivní (indukovaná) obrana je velice běžný a v rostlinách dobře prostudovaný typ obrany (Agrawal, 2000). K syntéze obranných látek dochází až po napadení herbivorem nebo patogenem (Mello et Silva-Filho, 2002). Tato obrana se tedy spouští hned po tom, co je rostlina poškozena. Je rychlá a dynamická. Hraje důležitou roli v ochraně rostlin před dalším poškozením a umožňuje se rostlině přizpůsobit na konkrétního útočníka. Po indukčním signálu rostliny začnou vytvářet specializované strukturní bariéry a produkovat chemické látky, jako jsou například sekundární metabolity, které mají na herbivory toxické nebo odpudivé účinky a buď je usmrcují, nebo zpomalují jejich vývoj. Tato obrana se ještě může navíc rozdělit na přímou a nepřímou. Přímá obrana přímo ovlivňuje útočníky přes toxické sloučeniny nebo morfologické vlastnosti, zatímco nepřímá obrana má za cíl přilákat přirozené nepřátele herbivorního hmyzu nebo jiných škůdců (War et al, 2012).
- Pasivní (konstitutivní) obrana chrání rostliny stále a nepotřebuje ke své aktivaci žádný indukční signál. Tvoří ji látky a struktury, které herbivory odpuzují svojí přímou toxicitou nebo snižováním stravitelnosti rostlinných pletiv (Mello et Silva-Filho, 2002).

Rostlinná obrana (ať už pasivní nebo aktivní) tedy zahrnuje jak fyzické bariéry, tak i chemické obranné látky. Mezi fyzické bariéry patří například trny, trichomy a kutikuly, které tvoří strukturní prostředky obrany. Do chemických obranných látek řadíme mnoho sekundárních metabolitů, které v rostlinách působí jako silné chemické zbraně a mají rozhodující význam v interakcích mezi rostlinami a jejich škůdci. Fungují jako toxiny, repelenty nebo je činí nepoživatelnými. Odhaduje se, že v rostlinách je více než 500 000 sekundárních metabolitů (Wu et Baldwin, 2010).

Tyto dva silné obranné systémy umožnily rostlinám přežít. Obrana je však nákladná, proto musí rostliny umět rozpoznat běžné mechanické poranění od opravdového napadení škůdcem. Mnoho studií prokázalo, že je dramatický rozdíl v tom, jak rostlina reaguje na nějaké běžné mechanické zranění a na zranění způsobené škůdcem, i když výsledek je v obou případech stejný – poškození a ztráta pletiv. K rozeznání příčiny poškození slouží rostlinám specifické receptory (Wu et Baldwin, 2010). Obranný mechanismus má schopnost rozpoznat signály z poškozených buněk a aktivuje imunitní opověď rostlin (War et al., 2012).

2.4 Strukturní obranné mechanismy

Tyto obranné mechanismy jsou první linií obrany a hrají důležitou roli v odolnosti rostlin. Přináší výhodu v přímém odrazování škůdců. Mezi jednotlivými typy můžou být velké rozdíly, od viditelných struktur po mikroskopické změny. Patří mezi ně například rostlinné trichomy, trny, vosková vrstva na povrchu, kutikula nebo lignifikace rostlinných pletiv (War et al., 2012).

Trichomy

Trichomy hrají důležitou roli v obraně rostlin proti velkému množství hmyzích škůdců (War et al., 2012). Slouží jako první linie obrany (Peiffer et al., 2009). Mají jak toxické, tak i zastrašující účinky, kterými odpuzují škůdce od kladení vajíček na rostliny a od jejich požívání ať už larvami nebo dospělci. Navíc jim zhoršují pohyblivost na povrchu rostlin a tím znemožňují přístupnost k listové pokožce. Mohou být rovné, spirálovité, zahnuté, rozvětvené nebo žláznaté. Právě žláznaté trichomy vylučují sekundární metabolity zahrnující flavonoidy, terpenoidy a alkaloidy. Ty mohou být jedovaté, repelentní nebo mohou hmyz a jiné organismy polapit. Tím vzniká kombinace mechanické a chemické obrany (War et al., 2012). Rostliny, které tyto ochranné mechanismy mají, bývají oproti lysým rostlinám ve výhodě. Kromě obrany před napadením působí i jako ochrana před vysoušením, silným slunečním zářením nebo před mrazem (Nogueira et al., 2013).

Trny

Trny vznikají přeměnou listů nebo stonku, a to díky působení vnějšího prostředí na rostliny (Slavíková, 2002). Experimenty ukázaly, že rostlinné trny snižují zájem býložravých škůdců o tyto rostliny (Milewski et al., 1990).

Kutikula

Rostlinná kutikula je extracelulární hydrofobní vrstva, která pokrývá pokožku všech půdních rostlin a poskytuje ochranu před vysycháním a vnějšími vlivy prostředí. Její hlavní složkou je polymerní kutin a kutikulární vosky. Je zřejmé, že fyziologická úloha kutikuly přesahuje svoji primární funkci jako transpirační bariéra a hraje důležitou roli v interakci s patogenními škůdci (Yeats et Rose, 2013).

Lignifikace rostlinných pletiv

Lignifikace rostlinných pletiv je jeden z dalších typů obranných mechanismů. Lignin hraje ústřední roli v obraně rostlin proti hmyzu a patogenům tím, že jim omezuje průnik do rostliny. Také snižuje výživovou hodnotu listu. Bylo zjištěno, že syntéza ligninu je indukována přímo herbivorem nebo patogenním škůdcem (War et al., 2012).

2.5 Chemické obranné mechanismy

Dalším silným obranným systémem rostlin jsou chemické obranné mechanismy. Většina chemických obranných látek je indukovaných a jejich produkce po útoku škůdce dramaticky stoupá. Indukované obrany jsou ve své podstatě horší než obrany konstitutivně rozvinuté, vzhledem k časovému zpoždění mezi prvním útokem a aktivací obrany. Kvůli tomuto zpoždění může být rostlina zranitelná hodinu nebo dokonce i několik dní, než se dočká aktivace svojí obrany. I tak je

tento způsob obrany u rostlin běžný. Tyto obrany jsou velice nákladné, a proto neprobíhají v rostlině stále, ale až po útoku škůdcem. Pravděpodobně se vyvinuly jako úsporná opatření, která rostlině dávají čas na jejich produkci. Pokud nejsou potřebné, tak je rostlina nemusí využít a tím ušetří energii na jiné důležité životní pochody (Baldwin, 1998).

Podle evolučních biologů vznikly dědičnými mutacemi, přirozeným výběrem a evolučními změnami. Náhodné mutace v základní metabolické cestě vedly ke vzniku nových sloučenin, které se staly toxickými nebo odstrašujícími pro herbivory a patogenní mikroby. Dokud tyto sloučeniny nebyly příliš toxické, tak náklady na jejich produkci byly nízké a rostliny díky nim měly vyšší fitness než rostliny bez nich a předaly je do dalších generací (Taiz et Zeiger, 2010).

Chemické obranné mechanismy jsou různorodé a vysoce dynamické. Defenzivní sloučeniny působí na škůdce buď přímo, kdy využívají svojí toxicity či nechutnosti nebo nepřímo uvolňováním těkavých organických sloučenin, které přitahují přirozené nepřátele rostlinných škůdců (War et al., 2012).

2.5.1 Sekundární metabolity

Do chemických obranných mechanismů řadíme mnoho sekundárních metabolitů, které jsou výsledným produktem sekundárního metabolismu rostlin (Novák, 2007). Rostlinná říše produkuje velké množství těchto organických látek (Klejdus et al., 2003).

Sekundární metabolismus je svými procesy úzce spjatý s metabolismem primárním (Novák, 2007). Neexistují mezi nimi žádné zásadní rozdíly a nelze najít žádné přesné hranice mezi nimi. V obou probíhají podobné chemické reakce a komplexní molekuly jsou syntetizovány z jednoduchých prekurzorů za pomoci enzymů (Edwards et Gatehouse, 1999).

Výsledkem primárního metabolismu jsou zejména cukry, aminokyseliny, proteiny, tuky a další. Ty jsou na rozdíl od sekundárních metabolitů životně důležité, nepostradatelné a zajišťují základní životní rostlinné pochody a účastní se základních biochemických reakcí (Novák, 2007). Tyto primární metabolity jsou základem biosyntetické produkce sekundárních metabolitů (Klejdus et al., 2003).

Rostliny produkují velice rozmanité spektrum sekundárních metabolitů, které nemají přímou funkci v jejich růstu, vývoji, v procesech fotosyntézy, respiraci, syntéze proteinů, diferenciaci nebo tvorbě sacharidů, proteinů a lipidů (Taiz et Zeiger, 2010).

Vyskytují se v menších množstvích a pocházejí hlavně z metabolismu cukrů a aminokyselin. V rostlinách většinou zůstávají a skladují se například ve vakuolách, buněčných stěnách nebo ve speciálních buňkách (Novák, 2007).

Po mnoho let nebyl význam většiny těchto rostlinných sekundárních metabolitů znám. Tyto sloučeniny byly považovány za bezvýznamné konečné produkty metabolismu nebo metabolické odpady. Průkopníky studia těchto látek byli organičtí chemici a to v devatenáctém a na začátku dvacátého století. O tyto látky se zajímali hlavně kvůli jejich možnému účinku jako léků, jedů nebo průmyslových materiálů (Taiz et Zeiger, 2010).

Díky důkazům ze studií fytochemie a biologie rostlin můžeme předpokládat, že sekundární metabolity jsou látky, díky kterým rostliny komunikují nebo reagují na vnější podněty. Jejich uvolňování je regulováno. Každý druh rostlin se vyvíjel až k jedinečné sadě mechanismů pro biosyntetickou regulaci sekundárních metabolitů (Pavarini et al., 2012).

U velkého množství z nich není dosud známa žádná funkce (Votrubová, 2010). Jejich úloha v obraně může spočívat v odstrašujícím účinku, toxickém účinku nebo působí jako prekurzory systémů fyzické obrany (Bennet et Wallsgrove, 1994). Dnes jsou tedy považovány za velice významné složky rostlin, které jsou pro tyto přisedlé organismy výhodné (Delgoda et Murray, 2017). Předpokládá se, že slouží především jako obrana proti herbivorním škůdcům a patogenům (Agrawal, 2000). Dále slouží jako atraktanty pro opylovače a roznašeče semen (Taiz et Zeiger, 2010). Rostliny, které tyto látky produkují, bývají odolnější než jedinci bez produkce obranných látek (Agrawal, 2000).

Některé sekundární metabolity sice mohou být pro herbivory požitelné, ale jejich zpracování je tak energeticky náročné a při jejich trávení může dojít k narušení homeostázy a ke změně pH tělních tekutin. Proto se potravě s těmito látkami raději vyhýbají (Guglielmo et al., 1996). Strukturně jsou velmi složité, proto je umělá syntéza obtížná nebo není vůbec možná (Bhatia, 2015). Každý organismus má svůj vlastní charakteristický soubor sekundárních metabolitů. Naše znalosti jsou však v této oblasti stále omezené (Verpoorte et Alfermann, 2000).

2.5.1.1 Biogeneze sekundárních metabolitů v rostlinách

Z tohoto hlediska dělíme rostlinné sekundární metabolity do tří skupin: polyketidy, terpeny a steroidy a látky, které vznikají z kyseliny šikimové (Baloun et al., 1989). Jednotlivé kroky v jejich biosyntéze jsou znázorněny na obr. č. 1.

Polyketidy

Polyketidy jsou v přírodě široce distribuovány a nacházejí se v rostlinách, mikrobech, hmyzu a v mořských organismech (Simpson et Amos, 2017). Jsou tvořeny celou řadou důležitých sloučenin s léčebnými účinky, jako jsou antibiotika, protirakovinná činidla, imunosupresiva a činidla snižující hladinu cholesterolu. Je důležité porozumět tomu, jak se v přírodě

tvoří, aby bylo možné odvozovat jejich deriváty a také je produkovat v ekonomicky významném množství (Kumar et al., 2004).

Jejich biosyntéza musí být katalyzována pomocí enzymů polyketid syntetáz. Existují tři typy: typ I, typ II a typ III. Typ I a II se vyskytuje většinou u mikrobů. V rostlinách, bakteriích a houbách pak typ III. Syntéza vychází z molekul acetyl-CoA. Ty jsou prostřednictvím malonyl-CoA kondenzovány. Díky enzymům jsou dvouhlíkaté molekuly řetězeny a modifikovány. Strukturní třídy sloučenin vznikajících z polyketidové dráhy zahrnují acetogeniny, antrachinony, flavonoidy a stilbeny. Sloučeniny obsahující fenylové skupiny získané z polyketidové dráhy obsahují hydroxylové a funkcionalizované hydroxylové skupiny, které jsou navzájem spojeny (Simpson et Amos, 2017).

Terpeny a steroidy

Terpeny nebo terpenoidy tvoří největší třídu sekundární metabolitů. Různé látky této třídy jsou obecně nerozpustné ve vodě. Jsou syntetizovány z acetyl-CoA nebo glykolytických meziproductů. Vznikají spojením pětiuhlíkového isoprenu. Všechny terpeny jsou tedy příležitostně označovány jako izoprenoidy. Klasifikovány jsou podle počtu pětiuhlíkatých jednotek, které obsahují. Dvě pětiuhlíkaté jednotky mají monoterpeny, tři mají seskviterpeny, čtyři mají diterpeny, šest mají triterpeny a osm jich mají tetraterpeny. Polyterpeny mají potom více jak osm sad (Taiz et Zeiger, 2010).

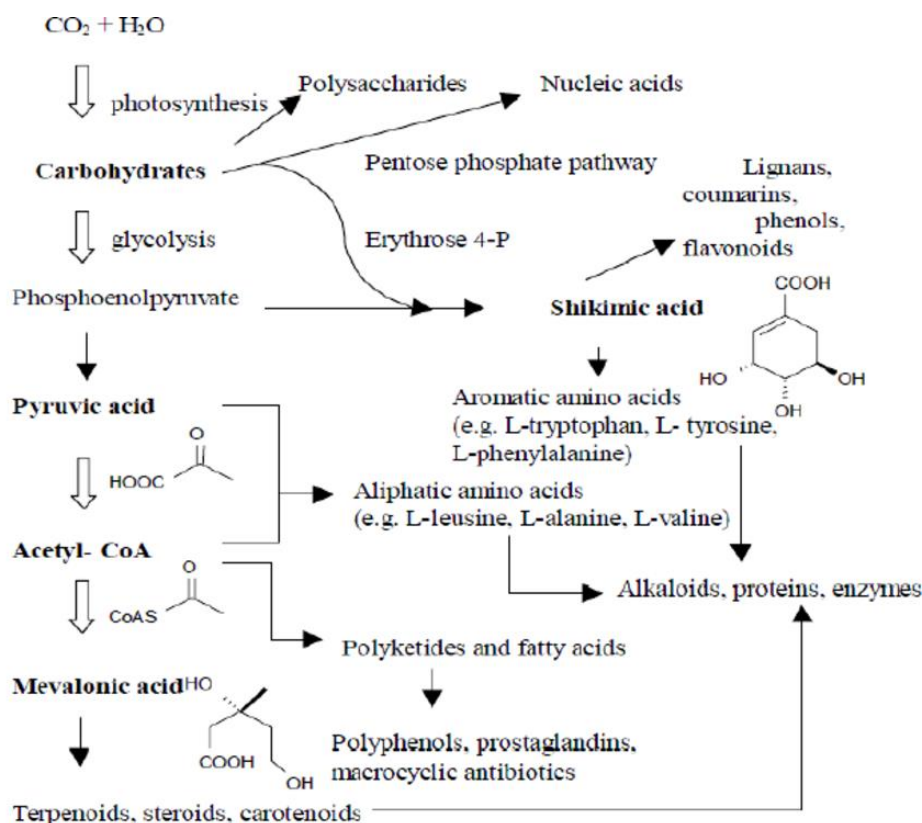
Mezi triterpeny se řadí organická sloučenina skvalen, jehož cyklizací vznikají steroidy- fytosteroly, do kterých patří kardioaktivní glykosidy, steroidní saponiny a alkaloidy (Baloun et al., 1989).

Látky vznikající z kyseliny šikimové

Látky vznikající z kyseliny šikimové musí projít cestou, která se nazývá Šikimátová dráha (Gharwalová, 2017).

Tato dráha sestává ze sedmi kroků, počínaje kondenzací fosfoenolpyruvátu a erytroso-4-fosfátu. Jejich kondenzace a cyklizace vedou k tvorbě kyseliny šikimové a končí syntézou kyseliny chorismové (Kougan et al., 2013).

Kyselina šikimová je prekurzorem aromatických kyselin, jako je fenylalanin, tyrosin a tryptofan. Poté je přeměněna na kyselinu skořicovou nebo kumarovou, popřípadě jiné fenylpropanové kyseliny (Gharwalová, 2017).



Obr. č. 1: Biogeneze sekundárních látek v rostlinách (Parsaeimehr et al., 2011).

2.5.1.2 Rostlinné fenolické látky

Rostlinné fenolické látky jsou nejčastějšími sekundárními metabolity v rostlinách (Edwards et Gatehouse, 1999). Hrají hlavní roli v obraně proti herbivorům, mikroorganismům a konkurenčním rostlinám (War et al., 2012).

Obecně jsou charakterizovány jako aromatické sekundární metabolity, které mají (nebo původně měly) jeden nebo více hydroxylů (OH skupina vázaná v organických sloučeninách) s charakteristickými kyselými vlastnostmi vázanými přímo na aromatickou (fenylovou) část molekuly. Tato vlastnost je využívána pro jejich detekci, izolaci, chemickou transformaci a je také zdrojem chemické reaktivity a často i biologických aktivit rostlinných fenolů (Harmatha, 2005).

Většina těchto sloučenin je odvozena z cesty kyseliny šikimové přes fenylypropanoidy, s malým počtem jednoduchých fenolů odvozených od kyseliny 3 - dehydro šikimové (Edwards et Gatehouse, 1999). Syntetizovány jsou hlavně z kyseliny skořicové, která vzniká z fenylyalaninu (Michalak, 2006). Tato reakce je katalyzována fenylyalanin amoniak lyázou (PAL), což je možná nejvíce prostudovaný enzym v sekundárním metabolismu rostlin (Taiz et Zeiger, 2010).

Vzhledem k jejich fyto toxicitě se fenolické metabolity zřídka vyskytují jako volné aglykony, ale jsou uchovávány jako glykosidické konjugáty ve vakuolách nebo jsou konjugovány s komponenty buněčné stěny (Edwards et Gatehouse, 1999).

V rostlinách mají různou funkci. Jejich zvýšenou produkci je možné pozorovat díky různým vlivům vnějšího prostředí a při působení stresových faktorů (Michalak, 2006). Oxidace fenolů katalyzovaná enzymem polyfenolická oxidáza (PPO) a peroxidáza (POD) je potenciální obranný mechanismus v rostlinách. Touto oxidací vznikají chinony, které se kovalentně vážou na bílkoviny v listech a inhibují jejich trávení u herbivorů. Navíc vykazují přímou toxicitu pro hmyz. Hrají také důležitou roli při cyklické redukci reaktivních forem kyslíku (ROS), jako jsou superoxidové anionty a hydroxidové radikály, peroxid vodíku nebo singletový kyslík, které naopak aktivují kaskádu reakcí vedoucích k aktivaci obranných enzymů (War et al., 2012). V posledních 25 letech došlo k významnému vývoji ve výzkumu, který je zaměřený na extrakci, identifikaci a kvantifikaci fenolických sloučenin (Khoddami et al., 2013).

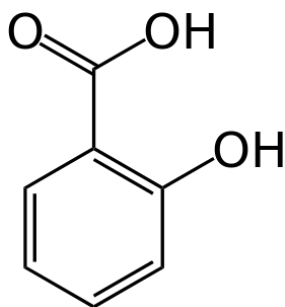
Chemicky jsou heterogenní skupinou, obsahující téměř 10 000 individuálních sloučenin (Taiz et Zeiger, 2010). Zahrnují hydroxybenzoové kyseliny, fenylypropanoidy a sloučeniny od nich odvozené (Edwards et Gatehouse, 1999).

Hydroxybenzoové kyseliny jsou jednoduchými deriváty fenylypropanoidových prekurzorů. Kyselina salicylová, která je důležitá v odolnosti rostlin vůči chorobám, je syntetizována z kyseliny skořicové. Další důležitou skupinou metabolitů kyseliny hydroxybenzoové jsou hydrolyzovatelné taniny vzniklé z vícenásobné esterifikace glukózy s kyselinou galovou. Hydroxybenzoové kyseliny mohou být také redukovány na odpovídající aldehydy a alkoholy, jako je vanilin (Edwards et Gatehouse, 1999).

Kyselina trans-skořicová, kyselina p-kumarová a jejich deriváty jsou jednoduché fenolické sloučeniny nazývané fenylypropanoidy. Obsahují benzenový kruh a postranní řetězec se třemi uhlíky. Fenylypropanoidy jsou důležitými stavebními prvky složitějších fenolických sloučenin (Taiz et Zeiger, 2010). Tvoří velkou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů, které jsou strukturně velice variabilní a mají široký rozsah biologických funkcí a účinků, a to jak v rostlině samotné, tak i v působení na organismy jiných druhů. Z hlediska účinků jsou fenylypropanoidy široce zastoupené téměř ve všech kategoriích, od těkavých a nízkomolekulárních atraktantů a repelentů, přes odstrašující a nepoživatelné prostředky, specifické juvenoidy a receptorové agonisty ekdysteroidů, antihormonální látky, chemosterilanty a toxiny, až po komplexní látky interferující s tvorbou a svlékáním kutikuly, ostatně tvořené také z části oligomérními fenoly (Harmantha, 2005).

Z metabolismu fenylypropanoidů je také odvozena syntéza ligninu, který není klasickým sekundárním produktem, ale má důležitou strukturní funkci v rostlinách (viz kapitola Strukturní obranné mechanismy) (Edwards et Gatehouse, 1999).

2.5.1.3 Kyselina salicylová



Obr. č. 2: vzorec kyseliny salicylové

Kyselina salicylová (SA, vzorec viz obr. č. 2) je jednou z četných fenolických sloučenin (Klessig et Malamy, 1994). Jako rostlinný hormon hraje důležitou roli při indukcii obrany rostlin proti různým biotickým a abiotickým stresorům prostřednictvím morfologických, fyziologických a biochemických mechanismů (War et al., 2011).

Široká škála prokaryotických a eukaryotických organismů včetně rostlin kyselinu salicylovou produkuje. Jak ji rostliny syntetizují, bylo studováno téměř půl století. Biochemické studie naznačují, že SA je syntetizována z fenylalaninu s benzoatem jako bezprostředním prekurzorem. Nedávné genetické analýzy naopak ukazují, že více než 90% SA je syntetizováno z izochorismátu. Zatímco úloha rostlinných izochorismátových syntetáz v produkci SA byla prokázána, nebyly identifikovány rostlinné enzymy, které konvertují isochorismát na SA. Proto její syntéza v rostlinách není ještě zcela definována (Chen et al., 2009).

Bylo prokázáno, že kyselina salicylová je signální molekulou, která se podílí jak na lokálních obranných reakcích v místech infekce, tak na vyvolání systémové rezistence. I když je stále nejasné, zda tato sloučenina může sloužit jako dálkový messenger signalizující přítomnost patogenu, její syntéza a akumulace jsou důležitými požadavky na obranné reakce (Durner et al., 1997). Akumuluje se převážně v listech a zde působí jako induktor exprese určité sady obranných proteinů či indukuje vznik antimikrobiálních látek (Vlot et al., 2009).

Pokud je rostlina infikována patogenem, dojde k široké škále biochemických a fyziologických reakcí. Předpokládá se, že většina těchto odpovědí rostliny chrání a snaží se omezit nebo dokonce odstranit patogen (Klessig et Malamy, 1994).

Kyselina salicylová vyvolává vyšší obranu spíše proti hmyzím škůdcům, kteří sají rostlinné šťávy, než proti škůdcům kteří rostliny okusují. Indukuje tvorbu ROS, které aktivně poškozují trávicí systém hmyzu, což vede ke snížení růstu a vývoje. Navíc SA signalizuje uvolňování těkavých látek rostlin, které přitahují přirozené nepřátele hmyzích škůdců (War et al., 2012).

2.5.1.4 Flavonoidy

Velkou podskupinou sekundárních metabolitů kategorizovanou jako fenolické sloučeniny jsou flavonoidy. Jsou to nízkomolekulární polyfenolické látky (Samanta et al., 2011). Představují jednu z největších a nejvíce studovaných tříd rostlinných specializovaných metabolitů, které jsou odvozené z fenylypropanoidu. Tato skupina zahrnuje odhadem asi 10 000 různých sloučenin (Dixon et Pasinetti, 2010).

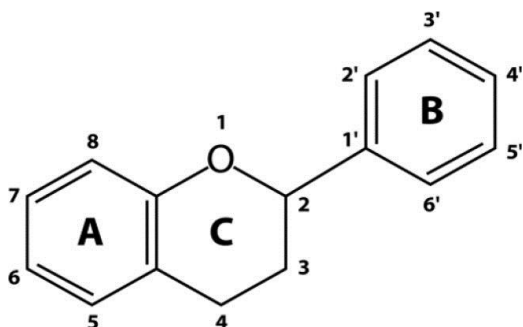
Syntetizovány jsou v cytoplazmě a poté se hromadí v malých vakuolách, které splynou s vakuolou centrální. Vše probíhá v epidermis a v primární kůře. Klíčové prekurzory pro syntézu flavonoidů jsou fenylyalanin a malonyl-CoA (Winkel - Shirley, 2001).

Přestože jejich široké rozšíření v rostlinné říši bylo již mnoho let známé, považovaly se původně za biologicky málo významné (Koes et al., 1993). Dnes, na rozdíl od minulosti, se všechny tyto sloučeniny již nepovažují za odpadní produkty, evoluční zbytky bez funkce nebo za konečné metabolické produkty, které jsou pro rostliny toxické a jsou proto uchovávány ve vakuolách. Víme, že mají širokou škálu biologických aktivit (Treutter, 2005). Mají pozitivní účinky nejen pro rostliny, ale i na zdraví lidí a zvířat a jsou středem zájmu v terapeutickém výzkumu (Dixon et Pasinetti, 2010).

Chemická struktura flavonoidů

Flavonoidy jsou deriváty 2 - fenylychromanu. V rostlinách se vyskytují většinou glykosidně vázané. Pravděpodobně se v živých rostlinných organismech účastní oxidačně redukčních pochodů. Podle stupně oxidace pyranového kruhu je dělíme do několika skupin (Spilková et al., 2016).

Základ flavonoidů tvoří patnácti uhlíkatý skelet (viz obr. č. 3), který je složený ze dvou šesti uhlíkatých aromatických kruhů (A a B) spojených prostřednictvím tří uhlíkatého heterocyklického pyranového kruhu (C), který obsahuje jeden atom kyslíku (Saxena et al., 2012). Rozdíly mezi flavonoidy jsou dány množstvím a pořadím hydroxylových skupin a také rozsahem alkylace a glykosylace (Heinrich et al., 2008).



Obr. č. 3: základní struktura flavonoidů

Hlavní funkce flavonoidů v rostlinách

Flavonoidy nejsou pro přežití rostlin nezbytné, nicméně to jsou bioaktivní látky a obecně hrají významnou roli v odolnosti rostlin. Je již dlouho známo, že jsou odpovědné za barvu a vůni květin a ovoce, čímž lákají opylovače (Samanta et al., 2011).

Další důležitou funkcí flavonoidů je ochrana rostlin před abiotickými i biotickými stresory (Samanta et al., 2011). Působí jako unikátní UV-filtry, kdy epidermální flavonoidy, které absorbují UV záření, chrání vnitřní tkáně listů a stonků (Treutter, 2005). Dále fungují jako signální molekuly, alelopatické sloučeniny, fytoalexiny, detoxikační činidla nebo jako antimikrobiální obranné sloučeniny. Zvyšují odolnost vůči mrazu a suchu (Samanta et al., 2011).

Pomáhají také rostlinám žít na půdách, které jsou bohaté na toxické kovy, jako je například hliník. Flavonoidy také chrání před reaktivními formami kyslíku a tak zabraňují peroxidaci lipidů (Treutter, 2005). Jejich význam v rostlinné biologii přesahuje jejich specifické funkce uvnitř rostliny (Dixon et Pasinetti, 2010).

Navíc, kvůli svým terapeutickým účinkům jako jsou antioxidační, protirakovinné, protizánětlivé, kardioprotektivní, a neuroprotektivní účinky, jsou flavonoidy rovněž považovány za farmaceuticky významné složky (Onkokesung et al., 2014).

Klasifikace flavonoidů

Jak uvádí Winkel-Shirley (2001), flavonoidy zahrnují šest hlavních skupin (bod 1. - 6.), které se nacházejí ve většině vyšších rostlin a tři menší podskupiny (bod 7. - 9), jejichž výskyt není tak rozšířený. Jsou to:

1. chalkony
2. flavony
3. flavonoly
4. flavonony
5. antokyany
6. taniny
7. aurony
8. isolavonoidy
9. stilbeny

Rozlišeny jsou na základě na jejich chemické struktury (Onkokesung et al., 2014).

Chalkony

Chalkon je triviální název 1, 3- difenylprop-2-en-1-onu. V přírodě můžeme nalézt některé deriváty chalkonu, kde hrají roli prekurzorů všech flavonoidů v metabolismu rostlin. Jde vlastně o otevřené deriváty flavonů. Díky biologickému testování přírodních i syntetických chalkonů bylo u různých derivátů zjištěno, že

mají široké spektrum účinků, například antibakteriální, antifungální, antivirové, antiprotozoální, antitumorózní, chemoprotektivní, gastroprotektivní, protizánětlivé a další (Chlupáčová et Opletalová, 2004).

Flavonoly a Flavony

Flavonoly jako fisetin, quercetin, kaempferol a myricetin jsou nejčastějšími rostlinnými flavonoidy a vyskytují se v mnoha druzích ovoce a zeleniny, např. v jablkách nebo v cibuli. Flavony jako apigenin, luteolin a baicalein jsou přítomny v relativně malých množstvích v zrnech, listové zelenině a bylinách (Esselen et Barth, 2014).

Flavonony

Flavonony jsou jednou z největších podskupin flavonoidů, které se přirozeně vyskytují u mnoha druhů ovoce a zeleniny, zejména těch, které mají tmavou barvu. Nachází se především v citrusových plodech a v některých aromatických bylinách, jako je máta (Ni, 2011).

Antokyany

Antokyany jsou ve vodě rozpustné přírodní pigmenty. Jsou zodpovědné za širokou škálu barev květů, plodů a jiných částí rostlin od oranžové, červené až fialové a modré. Nejběžnějšími antokyany v rostlinách jsou pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petulidin a malvidin. Za namodralou barvu je zodpovědný delphinidin, kyanidin a pelargonidin za zbarvení fialové a červené. Tvořeny jsou cukernou a necukernou částí. Nejčastěji zastoupenými cukry, které tvoří cukernou část, jsou xylóza, arabinóza, rhamnóza, glukóza a galaktóza. Necukerná část antokyanů se označuje jako antokyanidin (Chabinová et al., 2011).

Taniny (trísloviny)

Taniny jsou fenolické sloučeniny o vysoké molekulové hmotnosti. Vyskytují se v listech, ve dřevě, kůře nebo v plodech. Zatímco příbuzné fenolické sloučeniny, jako jsou jednoduché fenoly nebo neolignany, jsou charakterizovány a klasifikovány podle jejich chemické struktury, taniny jsou různorodou skupinou sloučenin, které souvisejí především s jejich schopností tvořit komplexy s bílkoviny. Taniny jsou tedy obvykle definovány jako ve vodě rozpustné polyfenolové látky schopné se vázat na proteiny (Hassanpour et al., 2011).

Taniny svými účinky silně působí na škodlivé účinky fytofágního hmyzu. Tím, že se vážou na proteiny, ovlivňují růst a vývoj hmyzu. Snižují účinnost absorpce živin a způsobují léze střev. Působí jako odstrašující prostředek mnoha hmyzích škůdců. Kondenzované taniny jsou oligomerní nebo polymerní flavonoidy, také známé jako proanthokyanidiny (War et al., 2012).

Aurony

Aurony jsou strukturálně izomery flavonů (Boumendjel, 2003). Způsobují žluté zbarvení květů některých okrasných rostlin (Nakayama et al., 2000). Tento druh flavonoidů je v dnešní době zatím málo prozkoumán a jeho výzkumy teprve začínají (Boumendjel, 2003).

Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou velkou podskupinou flavonoidů. Zahrnují isoflavony, isoflavanony, isoflavany, rotenoidy a pterokarpány. Co se týká jejich struktury, tak fenylový kruh B je připojen k heterocyklickému kruhu C v poloze 3 na rozdíl od ostatních flavonoidů, u kterých je v poloze 2 (Foudah et Abdel-Kader, 2017).

Známo je asi 629 struktur a z toho je popsáno přibližně 364 aglykonů. Od dalších tříd flavonoidů se odlišují vazbou benzenového kruhu v pozici 3 heterocyklického systému. Jejich struktura je založena na 3-fenylchromen-4-onu. Liší se v míře methylace, hydroxylace a glykosylace. Jsou zastoupeny v omezeném počtu čeledí a to u Fabaceae a Viciaceae. V menším množství se vyskytují i u čeledí Papilionaceae, Iridaceae, Myristicaceae, Compositae, Amaranthaceae a Rosaceae. Vyskytují se především v chloroplastech nadzemních částí rostlin, v malém množství i v kořenech (u některých druhů jsou pouze v kořenech, např. *Ononis spinosa*). V rostlinách jsou buď přítomny stále, nebo se tvoří až po působení stresu. Na jejich obsah má vliv řada biotických i abiotických faktorů. V rostlinách plní určité funkce v obranném systému. Chrání před infekcemi, tvoří se při klíčení semen, po napadení hmyzem a poškození škůdci. Po určitou dobu mohou tyto látky udržovat svoji biologickou aktivitu a ovlivňovat mikrobiální poměry v půdě (Klejdus et al., 2003).

Stilbeny

Stilbeny jsou malou skupinou sekundárních metabolitů patřících do flavonoidů. Jsou produkovány u řady druhů rostlin (Chong et al., 2009). Hrají důležitou roli při reakci rostlin na biotický a abiotický stres. Mnoho stilbenů jsou antimikrobiální sloučeniny, které jsou syntetizovány z důvodu obrany rostlin proti mikrobiálním patogenům a býložravcům (Paldrychová, 2015).

2.5.2 Oxidační vzplanutí

Oxidační vzplanutí je rychlá a přechodná výroba obrovského množství reaktivních forem kyslíku (Wojtaszek, 1997). Mezi tyto reaktivní sloučeniny patří superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály. Tento obranný mechanismus je první linií obrany leukocytů při styku s patogenem. Ukázalo se, že podobný obranný mechanismus mají i rostliny. Hlavním produktem této reakce u rostlin je peroxid vodíku (Wilhelm, 1997).

2.5.2.1 Hlavní funkce oxidačního vzplanutí

Je to jeden z nejdříve pozorovatelných aspektů obranné strategie rostlin (Wojtaszek, 1997). Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) prostřednictvím spotřeby kyslíku v tzv. oxidačním vzplanutí je jednou z nejčasnějších buněčných reakcí po úspěšném rozpoznání patogenu. V rostlinné buňce mohou ROS přímo způsobit zesílení stěn hostitelských buněk prostřednictvím zesíťování glykoproteinů, nebo dojde k lipidové peroxidaci a následnému poškození membrány (Torres et al., 2006). Dále mohou sloužit jako obranné látky, které působí toxicky přímo na napadající patogen a omezují tak jeho životaschopnost. Ve výsledku může dojít jak k omezení šíření patogenu, tak i k odumření rostlinných buněk v místě napadení. To znamená, že ROS jsou tedy toxické nejen pro patogeny, ale i pro rostlinné buňky (Wojtaszek, 1997). Je také zřejmé, že ROS jsou důležité signální molekuly, které zprostředkovávají aktivaci obranného genu (Torres et al., 2006).

ROS mají tedy dvojí funkci, kdy v nízkých koncentracích indukují expresi obranných genů a adaptivní reakce, zatímco ve vysokých koncentracích přispívají k buněčné smrti (Bhattacharjee, 2005).

Nejdříve byly pozorovány jako toxické vedlejší produkty aerobního metabolismu, které jsou odstraňovány pomocí antioxidantů a antioxidačních enzymů (Bailey-Serres et Mittler, 2006). Ty jsou lokalizovány v různých buněčných strukturách. Zahrnují neenzymové a enzymové systémy. Mezi účinné antioxidanty řadíme β karoten, askorbát, redukovaný glutathion a α -tokoferol (Piterková et al., 2005).

V posledních letech je zřejmé, že ROS hrají také důležitou signalizační roli v procesech jako je růst, vývoj, reakce na biotické a abiotické environmentální podněty a programovanou buněčnou smrt. Díky postupnému vývoji rostliny dokážou toxicitu těchto reaktivních forem překonat (Bailey-Serres et Mittler, 2006).

2.5.2.2 Mechanismy produkce ROS v reakci na patogeny

ROS se tvoří za normálních podmínek běžně jako vedlejší produkty postupných jedno-elektronových redukcí molekulárního kyslíku (Wojtaszek, 1997). Vznikají v řadě buněčných míst, včetně mitochondrií, chloroplastů, peroxizomů a na extracelulární straně plazmatické membrány (Bailey-Serres et Mittler, 2006). Jsou produkovány v nízkých koncentracích, protože buňky mají vyvinuté obranné mechanismy, které je udržují na co nejnižších hodnotách. Nicméně v nepříznivých podmínkách mohou být tyto obranné mechanismy prolomeny a dochází k takzvanému oxidačnímu vzplanutí, při kterém je produkováno velkého množství ROS (Wojtaszek, 1997).

Na jejich produkci se podílí několik enzymů hned po úspěšném rozpoznání patogenů. Přestože primární oxidační vzplanutí po rozpoznání patogenu nastává

v apoplastu, ROS produkované v jiných buněčných kompartmentech mohou mít také svoji funkci v obraně. V rostlinné buňce mohou být produkovány vysoké hladiny ROS jako vedlejší produkty metabolických procesů, zejména fotosyntézy (Torres et al., 2006).

2.6 Signalizace napadení herbivorem uvnitř rostliny

Odpovědi rostlin na zranění a herbivorii jsou regulovány signálními transdukčními dráhami, které fungují jak v místě zranění, tak v nepoškozených vzdálených listech (Li et al., 2002).

Pokud dojde k poškození vodivého pletiva xylému, začne do něj poškozeným místem vnikat vzduch a tím dojde ke změně tlaku a ke změně síly sání rostliny. Tato změna vyvolá v rostlině signál, který vychází ze zraněného místa a šíří se po rostlině do nepoškozených míst. Tyto hydraulické signály se mění na signály elektrické pomocí iontových pump nebo kanálů. Čím více se signál vzdaluje od místa poranění, tím je slabší. Hydraulické a elektrické signály jsou jedny z prvních prvků řetězce přenosu signálu v systémových reakcích, ale jejich spojení s biochemickými reakcemi ještě není dosud zcela vyřešeno (Schulze et al., 2005).

Nejlépe popsanou systémovou reakcí je signalizace pomocí systeminu. Systemin je 18 – aminokyselinový polypeptid, který se uvolňuje z míst poranění a reguluje aktivaci více než 20 obranných genů. Vzniká z proteinu prosysteminu proteolytickým štěpením. Prosystemin je pravděpodobně syntetizován v cytoplasmě. Systemin se poté váže na plazmatickou membránu a dojde k intracelulárnímu uvolňování kyseliny linolenové z membrán a její následné přeměně na kyselinu jasmonovou, což je silný aktivátor transkripce genu obrany (Ryan, 2000).

Kyselina jasmonová se začne hromadit v místě poranění a stimuluje výrobu mnoha obranných sloučenin, jako jsou oxidační enzymy, alkaloidy nebo těkavé látky. Výsledkem indukované rezistence v rostlinách je snížení ztrát způsobených herbivory a vyšší výnosy plodin (War et al., 2011).

Také spolu se svými deriváty přispívá k tvorbě sekundárních metabolitů, růstu a správnému vývoji rostliny (Podlešáková et al., 2012). Aktivuje také geny některých primárních metabolických drah, které poskytují prekurzory pro tvorbu některých alkaloidů (Baldwin et al., 2002).

Dalším příkladem signálních nebo regulačních molekul obranných mechanismů je kyselina salicylová nebo methyljasmonát. Jejich biosyntéza se při působení stresorů zvyšuje. Tyto signální molekuly taktéž spouští signální kaskádu, která pozitivně reguluje transkripci genů stresové odpovědi (Salačová et al., 2015).

2.7 Signalizace napadení herbivorem do vnějšího okolí rostliny

Rostliny mohou kromě signálů, které se šíří uvnitř jejich těl, vysílat i signály do vnějšího prostředí. Pokud jsou napadeny herbivorem, začnou do okolí uvolňovat těkavé látky, které přitahují přirozené nepřátele těchto herbivorů. Tento obranný mechanismus nazýváme jako nepřímá obrana (Baldwin et al., 2002).

Tento jev byl sledován na sazenicích kukuřice. Sazenice reagovaly na poškození hmyzím škůdcem tak, že začaly do okolí uvolňovat velké množství několika charakteristických terpenoidů a díky tomu se staly vysoce atraktivními pro parazitické vosy, které tyto hmyzí škůdce napadají. Analýzy ukázaly, že tyto těkavé látky nejsou produkovány pouze v místě poškození, ale vylučuje je celá rostlina. Pokud je tedy rostlina poraněna škůdcem, tak začne celá vysílat chemické signály (Turlings et Tumlinson, 1992).

Tato vysoce dynamická forma imunity je iniciována rozpoznáním ústních sekretů herbivorů a signálů z poškozených rostlinných buněk. Tyto počáteční signály jsou přenášeny uvnitř rostliny signálními transdukčními cestami, které zahrnují toky vápenatých iontů, fosforylační kaskády a zejména cestu jasmonátu, která hraje hlavní roli ve zvýšení odolnosti vůči širokému spektru hmyzu (Howe et Jander, 2008).

Díky pokusům s kukuřicí byl zjištěn velice důležitý fakt, a to ten, že ty sazenice, které byly vystaveny působení těkavých látek produkovaných sousedními napadenými rostlinami, produkovaly po napadení mnohem více kyseliny jasmonové než ty sazenice, které těmto látkám vystaveny nebyly. To znamená, že tyto těkavé látky připravují sousední rostliny na blížící se nebezpečí (Engelberth et al., 2004). Studie v terénu prokázaly zvýšenou odolnost vůči škůdcům u těch rostlin, které rostou po větru rostlin poškozených (Baldwin et al., 2002).

2.8 Průběh obranné reakce

Abychom mohli přesně a do hloubky porozumět reakcím rostlin na herbivorní škůdce, musíme podrobně znát to, jak rostlina tento útok zaznamenává. Herbivorní útok není omezen pouze na poranění rostlin okusem, ale je třeba rozlišit různé fáze napadení, jako například pouhý dotyk nebo naklazení vajíček (Hilker et Meiners, 2002).

V obraně rostlin proti škůdcům a patogenům hrají důležitou roli receptory, které jsou umístěné v cytoplazmatické membráně. Tyto transmembránové receptory rozpoznávají malé molekuly, které jsou typické pro patogenní organismy a nacházejí se na jejich povrchu. Jsou to takzvané PAMPs (patogen-associated molecular patterns). Poté, co je patogen buňkami identifikován díky interakci receptorů s těmito malými molekulami, přijme rostlina signál, který vede ke změně

hladiny transkripce některých genů a k produkci obranných látek, jako jsou například reaktivní formy kyslíku, které mají signalizační funkci a zároveň modifikují buněčnou stěnu rostlinné buňky (Salačová et al., 2015).

2.9 Reakce rostliny na nakladená vajíčka

Zatímco reakce rostlin na poškození herbivory jsou intenzivně studovány, studií, které se zabývají reakcemi rostlin na nakladená vajíčka býložravého hmyzu, je mnohem méně (Hilker et Meiners, 2002).

Je známo, že herbivorní škůdci vyvolávají v rostlinách masivní transkripční změny, avšak experimenty potvrdily, že rostliny reagují nejen na své škůdce, ale i na jejich nakladená vajíčka. Ta sice rostlinám ničím neškodí, ale později se z nich vylíhnou larvy, které už svým okusem rostliny ohrožovat začnou (Bruessow et al., 2010). Rostliny tedy po naklazení vajíček nečekají na to, až budou poškozeny vylíhnutými housenkami, ale začnou se bránit hned (Hilker et Meiners, 2002).

Reagují zvyšováním obranných mechanismů, které mohou ve výsledku zhoršovat vývoj nakladených vajíček nebo je dokonce usmrtit a to buď přímo, nebo nepřímo pomocí parazitoidů, které na tyto vajíčka nalákají. Tato reakce byla zaznamenána u borovice lesní (*Pinus sylvestris*), huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a brukve černé (*Brassica nigra*). Rostlina se také může bránit reprodukčním únikem, kdy například produkuje semena dříve než je normální (Pashalidou et al., 2015).

Přímá obrana

Přímá obrana zahrnuje růst nediferencovaných buněk, které nakladená vajíčka vyzdvihnou a tím zvýší pravděpodobnost jejich vyschnutí nebo pozdější sežrání larev predátory. Tento proces byl zaznamenán na luscích hrachu. Dalším prostředkem přímé obrany, tentokrát zaznamenaný na rýži, je produkce benzybenzoátu, což je látka, která dokáže vajíčka usmrtit. Dále na brukvi černé (*Brassica nigra*) a bramboru byla zaznamenána tvorba nekrózy v místě nakladených vajíček, což vedlo k vysušení vajíček a jejich odumření (Bruessow et al., 2010). Kromě toho dochází ještě k produkci látek, které odpuzují samičky, které si chystají vajíčka na rostlinu naklást (Hilker et Meiners, 2002).

Další experiment byl provedený na rostlině *Arabidopsis*. Bělásek zelný na ni nakladl vajíčka, což vyvolalo expresi stovek genů, včetně genů obrany a stresu, které jsou v rostlinách tvořeny při programované buněčné smrti. Kromě toho se v místě nakladených vajíček začala ukládat kalóza, produkoval se peroxidu vodíku a došlo k buněčné smrti (Bruessow et al., 2010).

Nepřímá obrana

Co se týká obrany nepřímé, tak ta zahrnuje produkci těkavých látek (mono- a seskviterpenů), což má za následek přilákání parazitoidů nakladených vajíček. Elicitory, které spouštějí uvolňování těkavých látek, nebyly dosud identifikovány, některé se však vyskytují v sekretech vejcovodů, které pokrývají povrch vajíčka. Anti-afrodiziakální samčí feromon benzylkyanid, který se vyskytuje v sekretu přídatných žláz pářících se samiček motýlů, je elicitor zodpovědný za změny na povrchu listů, které přitahují parazitoidy vajíček. Někteří parazitoidi vajíček tohoto sexuálního signálu mohou využít a samičku následují až k hostitelské rostlině, na kterou samička vajíčka naklade. Existují tedy důkazy, že rostliny nakladená vajíčka dokážou vnímat, ale poznatky o povaze elicitorů a buněčných a molekulárních reakcích na ně jsou stále omezené (Bruessow et al., 2010).

Byl proveden experiment, při kterém byly použity rostliny brukve černé (*Brassica nigra*) a škůdci bělásek zelný (*Pieris brassicae*) a můra zelná (*Mamestra brassicae*), přičemž tato můra klade vajíčka i na jiné než brukvovité rostliny. Jako predátoři byli použiti dva druhy parazitického blanokřídlého hmyzu – drobněnka (*Trichogramma brassicae*) a lumčík žlutohý (*Cotesia glomerata*). Výsledky ukázaly, že pokud na rostlinu naklade vajíčka její hlavní škůdce, bělásek zelný, začne rostlina produkovat látky, které přilákají parazitické vosičky. Pokud však na rostlinu byla nakladena vajíčka můry zelné, tak rostlina žádné látky do okolí neuvolňovala. Výsledkem studie tedy je, že rostliny dokážou reagovat na přítomnost škůdců ještě předtím, než dojde k jejich poškození. Reakce závisí na tom, kdo vajíčka na rostlinu naklade (Fatouros et al., 2012).

Z evolučního hlediska vyplývá otázka, zda si herbivoři budou schopni do budoucna vyvinout takové schopnosti, které jim umožní obranné mechanismy rostlin obcházet nebo dokonce využívat (Hilker et Meiners, 2002).

3 Metodika

3.1 Způsob odchyty škůdce běláška zelného

Pro tento experiment byl vybrán bělásek zelný, často se vyskytující škůdce. Jeho odchyt byl proveden na poli družstva Agrospol ve vesnici Bolehošť. Posbírány byly jak housenky, tak i dospělí jedinci a všichni byli posléze umístěni do předem připravených plastových boxů s předpěstovanými rostlinami (viz obr. č. 4). Na některé rostliny byla dospělci nakladena vajíčka, jak je vidět na obr. č. 5.



Obr. č. 4: Dospělci běláška zelného v připravených boxech (foto Semerák).



Obr. č. 5: Nakladená vajíčka (foto Semerák).

3.2 Rostlinný materiál použitý pro experiment

Použitým rostlinným materiálem byla předem předpěstovaná brukev zelná (*Brassica oleraceae*). Rostliny byly zasety 10. června 2017 do výsevných misek. Půdní substrát se skládal ze směsi běžné zahradní zeminy, univerzálního substrátu a agropertitu. Poměr jednotlivých složek byl 2 : 2 : 1. Kultivace probíhala při 15 hodinové fotoperiodě v pěstební komoře Fytotron za denní teploty 22 °C a noční teplotě 15 °C.

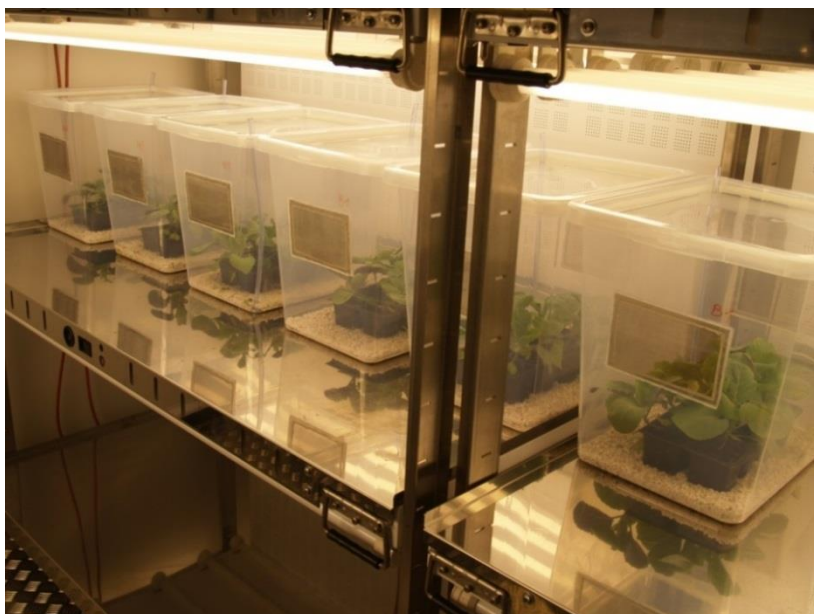
Po přibližně 2 týdnech byly rostliny přesazeny do větších sadbovačů o rozměrech 5x5x5 cm (viz obr. č. 6). Zálivkou, kterou byly rostliny pravidelně zalévány, byl roztok kohoutkové a destilované vody v poměru 1:1.



Obr. č. 6: Předpěstovaný rostlinný materiál brukev zelná (*Brassica oleraceae*) (foto Semerák).

3.3 Pěstební boxy

Celý experiment byl uskutečněn v plastových boxech o objemu 29 l, které jsou znázorněny na obr. č. 7. K těmto boxům byla přidělena větrací síťka a zálivková hadička. Na každé dno boxů byla nasypána vrstva agropertitu, aby nedošlo k úhynu odchycených škůdců. Pro tento pokus bylo použito celkem 9 těchto boxů, z čehož do 3 boxů byly umístěny nasbírané housenky (6-7 housenek na box), do dalších 3 byli umístěny dospělci běláška zelného (5 jedinců na box) a zbylé 3 boxy sloužily jako kontrola.



Obr. č. 7: Pěstební boxy s připraveným rostlinným materiálem (foto Semerák).

3.4 Příprava rostlin před samotným vyhodnocením

Po 3 dnech byly housenky z rostlin odstraněny a rostliny důkladně očištěny od trusu, aby při analýze nedošlo ke zkreslení výsledků. Poté byl rostlinný materiál odebrán a analyzován. Na obrázku č. 8 je vidět, jak byly listy poškozeny okusem.

Rostliny byly společně s dospělci bělásky zelného a jeho vajíčky kultivovány celkem 8 dní. Nicméně došlo k neočekávanému předčasnému vylíhnutí housenek z nakladených vajíček, což mohlo negativně ovlivnit výsledky.



Obr. č. 8: Znečištěné a okusem poškozené rostliny před analýzou (foto Semerák).

3.5 Analýza rostlinného materiálu

Následující postupy byly použity pro analýzu rostlinného materiálu všech 9 boxů (3 boxy s housenkami, 3 s nakladenými vajíčky a vylíhlými housenkami a 3 kontrolní boxy). Z každého boxu byly odebrány dva vzorky. Pouze pro vyhodnocení kyseliny salicylové byl z každého boxu odebrán pouze vzorek jeden.

Provedeny byly podle odborné publikace Dučaiová et al. (2016). Koncentrace superoxidového radikálu byla zjišťována tak, že byla sledována tvorba dusitanu z hydroxylaminu a to při vlnové délce 530 nm (Elstner et Heupel, 1976). Peroxid vodíku byl stanovován pomocí monitorování komplexu titanu a peroxidu při vlnové délce 410 nm (Jana et Choudhuri, 1981). Fenolické látky byly metodou Folin-Ciocalteu kvantifikovány (Singleton a Rossi, 1965) a flavonoidy odhadnuty pomocí metody AlCl_3 (Ordoñez et al., 2006). Analýza kyseliny salicylové byla provedena pomocí metody HPLC (Petruľová et al., 2014) Detailněji jsou postupy rozepsány níže.

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

Ve třetí misce bylo nejprve rozetřeno 0,1 g rostlinného materiálu ve 2 ml fosfátového pufru vzniklého smícháním hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) v poměru 1 : 1 spolu s trochou písku. Poté byl vzniklý supernatant převeden do mikrozkušavek a byl centrifugován 15 minut při 4 °C a 15 000 g_n .

Analýza superoxidu

Pro analýzu superoxidu bylo nejdříve smícháno 270 μl fosfátového pufru (PB), 30 μl 10 milimolárního hydroxyl aminu (HA) a 300 μl supernatantu. Po 15 minutách bylo přidáno 300 μl 17 milimolárního sulfanyl aminu (SA). Vše bylo promícháno. Po dalších 15 minutách bylo přidáno 300 μl alfaftyly aminu (NA), opět bylo promícháno. Opět po 15 minutách bylo přidáno 300 μl diethyl etheru (DE). Nakonec byla měřena absorbance ve skleněných kyvetách při vlnové délce 530 nm pomocí spektrofotometru.

Analýza peroxidu

Pro analýzu peroxidu byl smíchán 1 ml supernatantu a 0,5 ml chloridu titaničitého (TiCl_4). Tato směs látek byla opět centrifugována při 15 000 g_n a 4 °C po dobu 15 minut a poté byla změřena její absorbance při vlnové délce 410 nm ve skleněných kyvetách pomocí spektrofotometru.

Příprava supernatantů pro fenolické látky včetně flavonoidů

Ve třetí misce bylo rozetřeno 0,2 g rostlinného materiálu ve 2 ml 80% methanolu. Poté byl vzniklý supernatant centrifugován po dobu 15 minut při 10 °C a 14 000 g_n

Analýza fenolických látek

Pro analýzu fenolických látek bylo nejdříve smícháno 470 μ l vody a 30 μ l námi vytvořeného supernatantu. Poté bylo přidáno 975 μ l 2% uhličitanu sodného (Na_2CO_3) a 25 μ l Folin-Ciocalteuova činidla. Vše bylo po dobu 60 minut zahříváno na 45 °C ve vodní lázni. Nakonec byla měřena absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 750 nm ve skleněných kyvetách.

Analýza flavonoidů

Pro analýzu flavonoidů bylo nejdříve smícháno 0,5 ml supernatantu a 0,5 ml 2% chloridu hlinitého (AlCl_3). Vzniklá směs látek byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Nakonec byla měřena absorbance při vlnové délce 420 nm v *semi-mikro* plastových kyvetách.

Analýza kyseliny salicylové

Pro analýzu kyseliny salicylové bylo naváženo 5g rostlinného materiálu. Ten byl převeden do papírových sáčků a sušen 24 hodin při 80 °C. Následně bylo naváženo 0,15 g sušiny, která byla rozemleta a nasypána do mikrozkuřavky. K ní bylo přidáno 1,5 ml 75% methanolu. Směs byla třepána po dobu 24 hodin a následně centrifugována při 3 000 ot/min po dobu 15 minut. Poté bylo odpařeno 1,5 ml supernatantu ve vialkách v termobločku při 30 °C v dusíkové atmosféře. Před samotnou analýzou byla zbylá směs rozpuštěna v 200 μ l methanolu. Následně proběhla analýza metodou HPLC (ACN: 3,35% H_3PO_4 /40 : 60/, 235 nm) na katedře chemie.

3.6 Statistické zpracování výsledků

Naměřené hodnoty byly zpracovány do přehledných tabulek a sloupcových grafů pomocí počítačového programu MS Excel. Dále byly spočítány průměry a střední chyby průměru neboli standardní chyby průměru.

Jednosměrná analýza rozptylu (Anova) a Tukeyho test

Naměřené hodnoty byly dále statisticky zpracovány. Aby se zjistilo, zda jsou mezi nimi nějaké podstatné rozdíly, byla použita jednosměrná analýza rozptylu, neboli Anova s hladinou významnosti 5 %. To znamená, že pokud by byla hodnota p nižší, než 0,05, jsou mezi naměřenými hodnotami průkazné rozdíly. Tato hodnota totiž definuje, zda je výsledek analýzy významný či nikoli a je to nejmenší hladina, na které zamítáme.

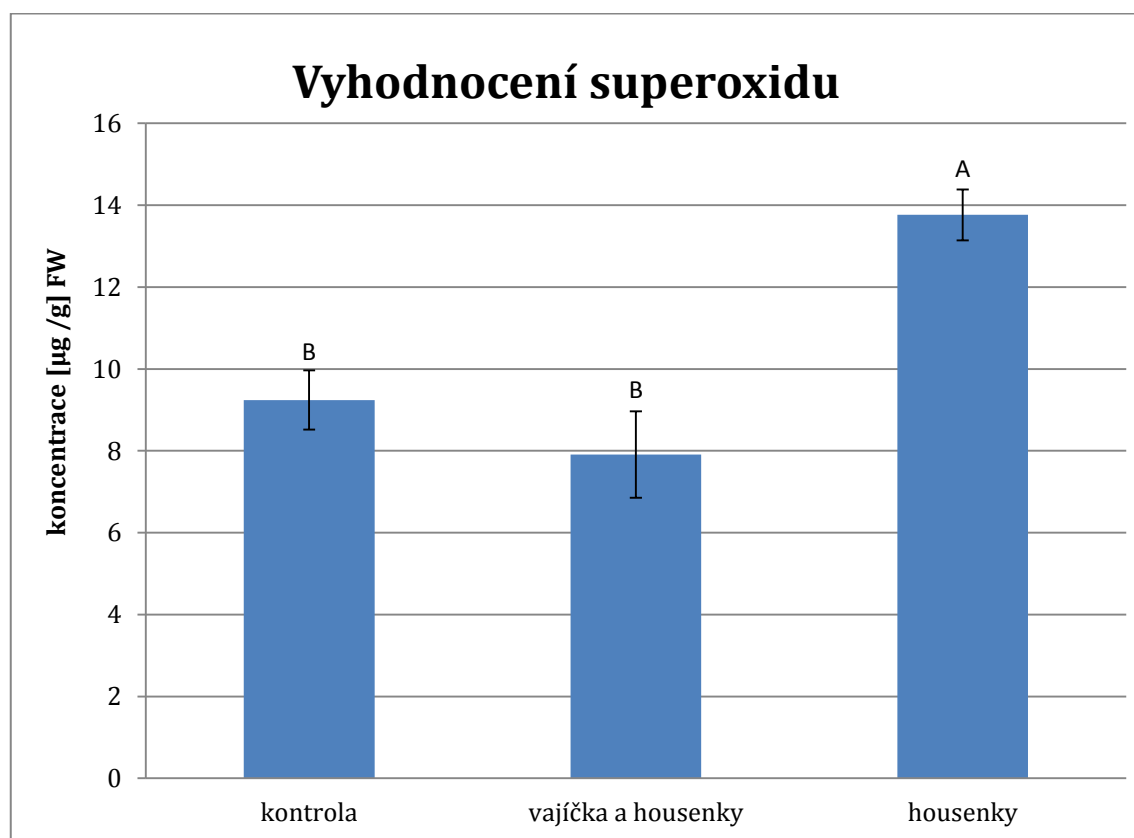
Pokud Anova odhalila nějak průkazné rozdíly, bylo nutné zjistit, zda jsou pouze mezi naměřenými hodnotami uvnitř konkrétní varianty nebo mezi variantami navzájem (kontrola, vajíčka a housenky a housenky). K tomu byl použit Tukeyho

test. Tento test se hodí při porovnávání stejně početných výběrů. Výstupy shrnují tabulky v příloze.

4 Výsledky

Hlavním výstupem praktické části této diplomové práce byla analýza sekundárních metabolitů jakožto obranných látek rostlin z čeledi Brassicaceae po napadení běláskem zelným, a to jak jeho housenkami, tak i jeho vajíčky. Je známo, že se rostliny po napadení herbivorním škůdcem brání. Jedním druhem obrany je i produkce aktivních chemických látek. Cílem bylo zjistit, zda dojde po aplikaci tohoto škůdce na rostliny k nějakým významným a prokazatelným změnám v produkci těchto látek.

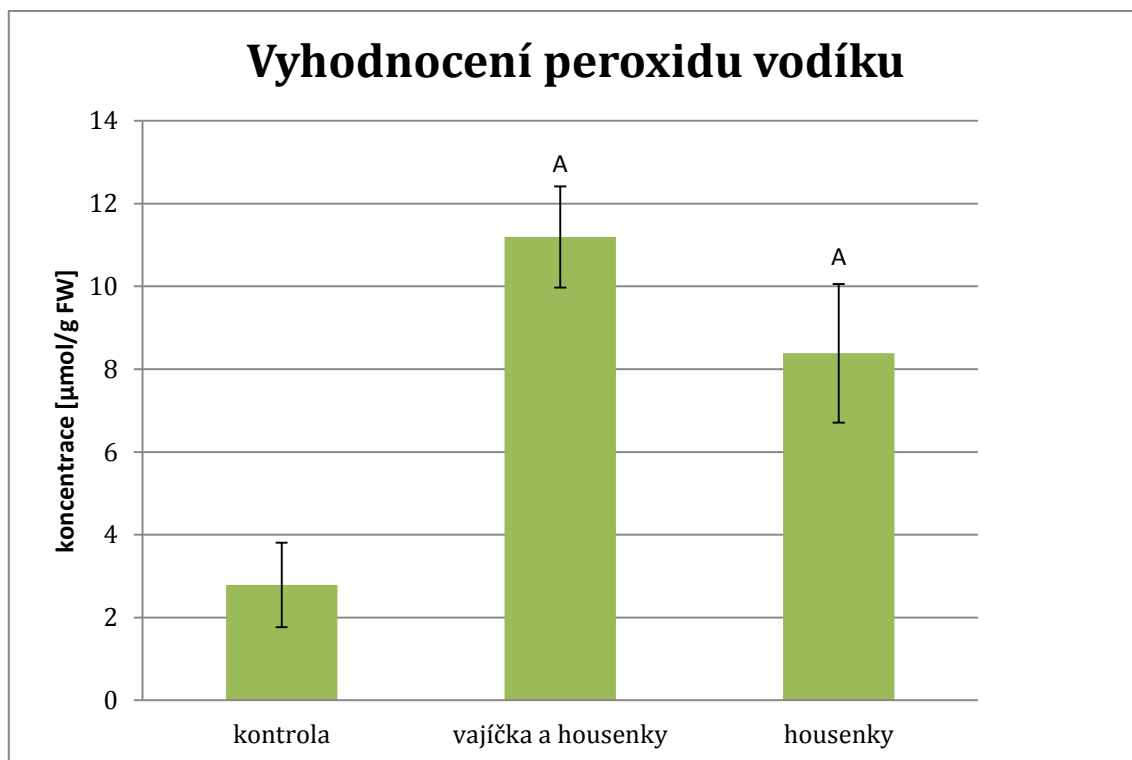
Následující vypracované grafy znázorňují naměřené průměrné hodnoty jednotlivých sekundárních metabolitů. K nim příslušné tabulky se zpracovanými daty jsou uvedeny v příloze diplomové práce.



Graf č. 1: Obsah superoxidu v listech brukve zelné u jednotlivých variant (mezi všemi variantami testováno $P < 0,05$)

V grafu č. 1 jsou znázorněny průměrné hodnoty každé varianty společně s chybovými úsečkami, které znázorňují standardní (střední) chybu průměru. Ta udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Průměrná hodnota kontrolní varianty je 9,240 [µg/g FW] a její standardní chyba 0,724 [µg/g FW]. U varianty vajíček a vylíhnutých housenek je průměrná hodnota 7,911 [µg/g FW] a standardní chyba 1,054 [µg/g FW]. Varianta pouze s housenkami má průměrnou hodnotu 13,765 [µg/g FW]

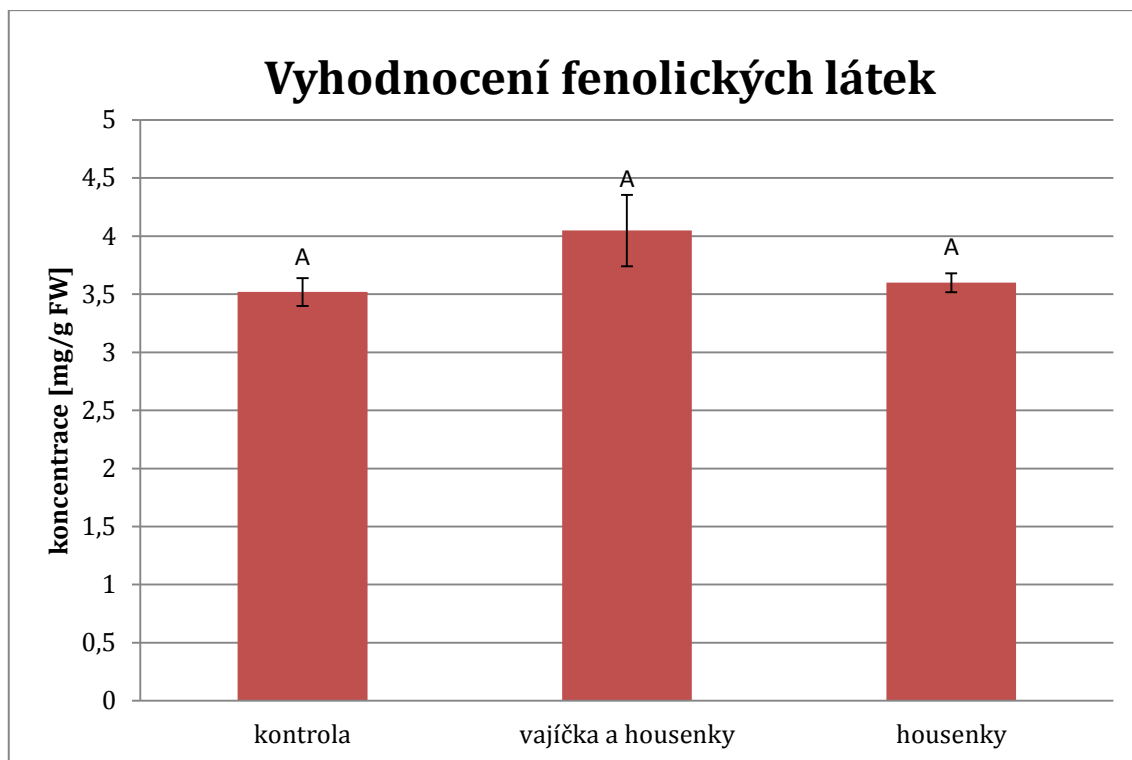
a standardní chybu 0,623 [$\mu\text{g/g FW}$]. Písmena nad jednotlivými sloupci značí, zda jsou mezi variantami průkazné rozdíly. Bylo zjištěno, že průkazný rozdíl je mezi naměřenými hodnotami varianty s housenkami a mezi kontrolou. Je patrné, že varianta s housenkami se oproti kontrole zvýšila, konkrétně o 49 %. Průkazný rozdíl byl také zjištěn mezi variantami vajíčka a housenky a pouze housenky. V tomto případě hodnota zkoumané látky vzrostla o 74 %. Naopak varianta s housenkami a vajíčky se oproti kontrole snížila.



Graf č. 2: Obsah peroxidu vodíku v listech brukve zelné u jednotlivých variant (mezi všemi variantami testováno $P < 0,05$)

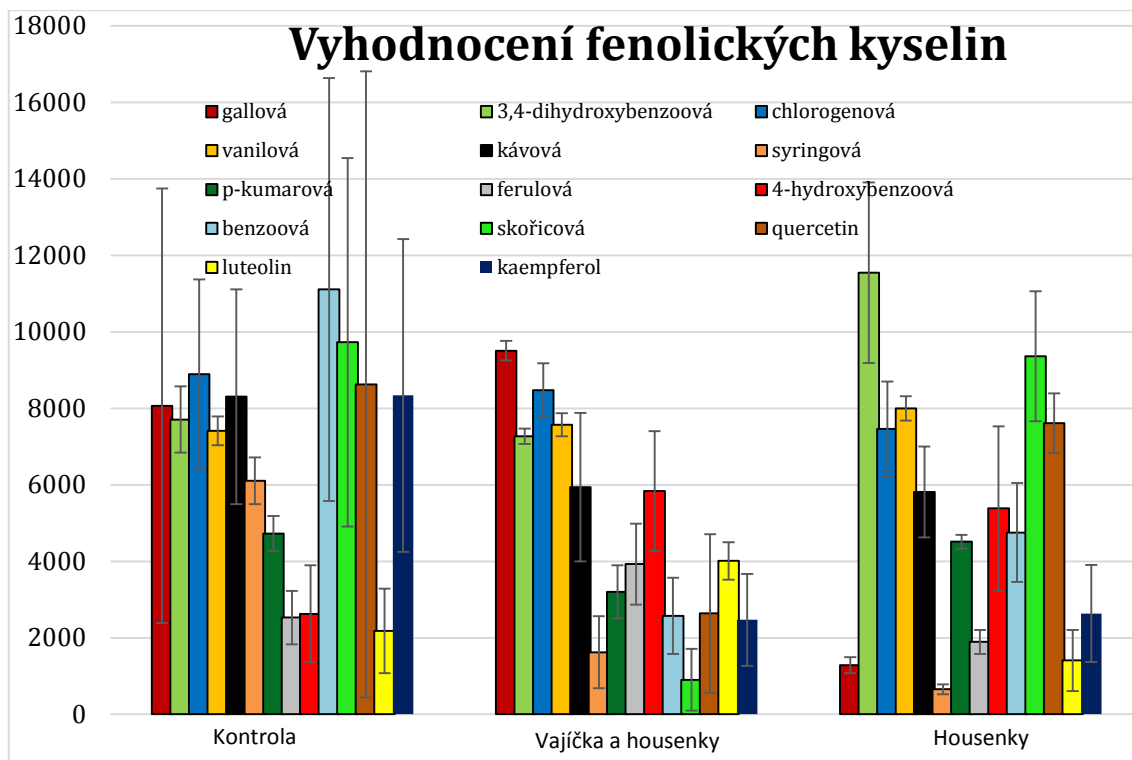
V grafu č. 2 jsou porovnávány naměřené hodnoty peroxidu vodíku u jednotlivých variant. Opět jsou uvedeny průměrné hodnoty a chybové úsečky, znázorňující standardní chybu průměru. Kontrolní varianta musela být z vyhodnocení vyřazena, jelikož u 4 měření ze 6 byly zjištěny chybně naměřené hodnoty.

Hodnoty dalších variant byly naměřeny správně a následně mezi sebou porovnány. Průměrná hodnota varianty vajíček a housenek je 11,196 [$\mu\text{mol/g FW}$] a standardní chyba 1,224 [$\mu\text{mol/g FW}$]. Varianta housenek má průměrnou hodnotu 8,385 [$\mu\text{mol/g FW}$] a standardní chybu 1,674 [$\mu\text{mol/g FW}$]. Po provedených testech bylo zjištěno, že mezi variantami nejsou významné rozdíly.



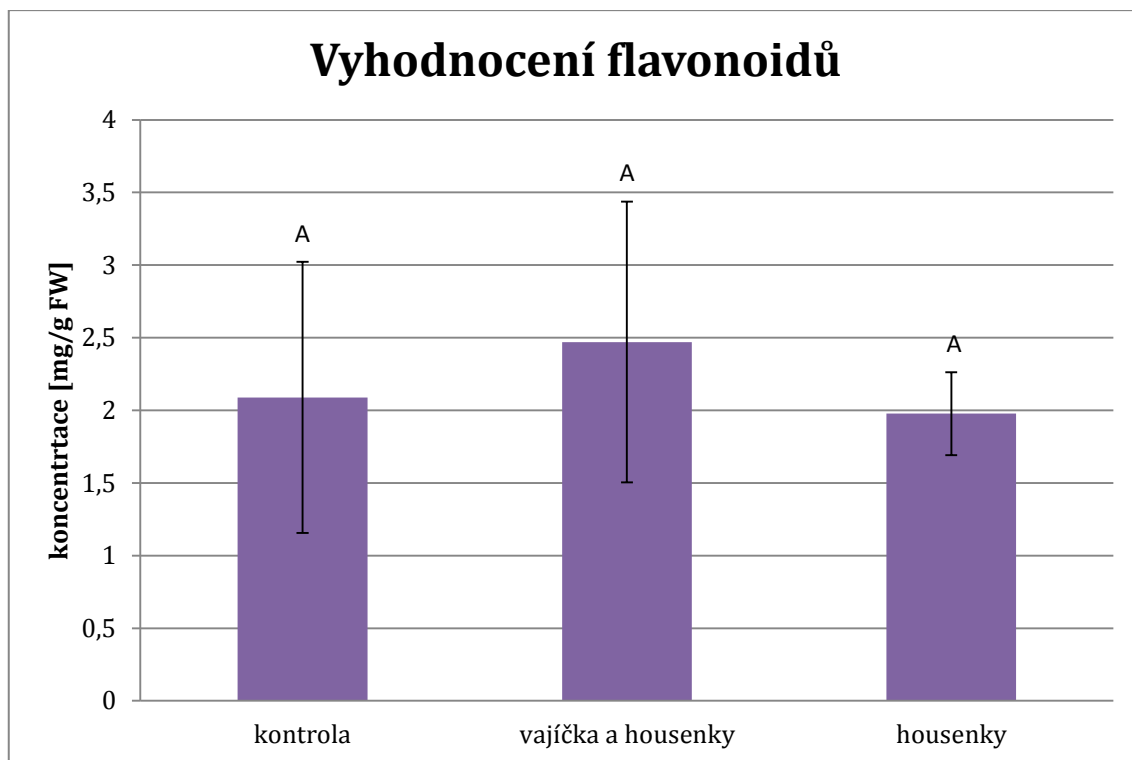
Graf č. 3a: Obsah fenolických látek v listech brukve zelné u jednotlivých variant (mezi všemi variantami testováno $P < 0,05$)

Graf č. 3a zobrazuje naměřené průměrné hodnoty jednotlivých variant u fenolických látek spolu s chybovými úsečkami znázorňujícími standardní chyby průměru. Průměrná hodnota u kontrolní varianty je 3,518 [mg/g FW] a standardní chyba 0,121 [mg/g FW]. Varianta vajíčka a housenky má průměrnou hodnotu 4,047 [mg/g FW] a standardní chybu 0,307 [mg/g FW]. Varianta pouze housenky má průměrnou hodnotu 3,598 [mg/g FW] a standardní chybu 0,082 [mg/g FW]. Testy odhalily, že mezi jednotlivými variantami nejsou průkazné rozdíly. Tyto fenolické látky byly dále podrobně analyzovány na jednotlivé fenolické kyseliny. Jejich množství je uvedeno v následujícím grafu č. 3b.



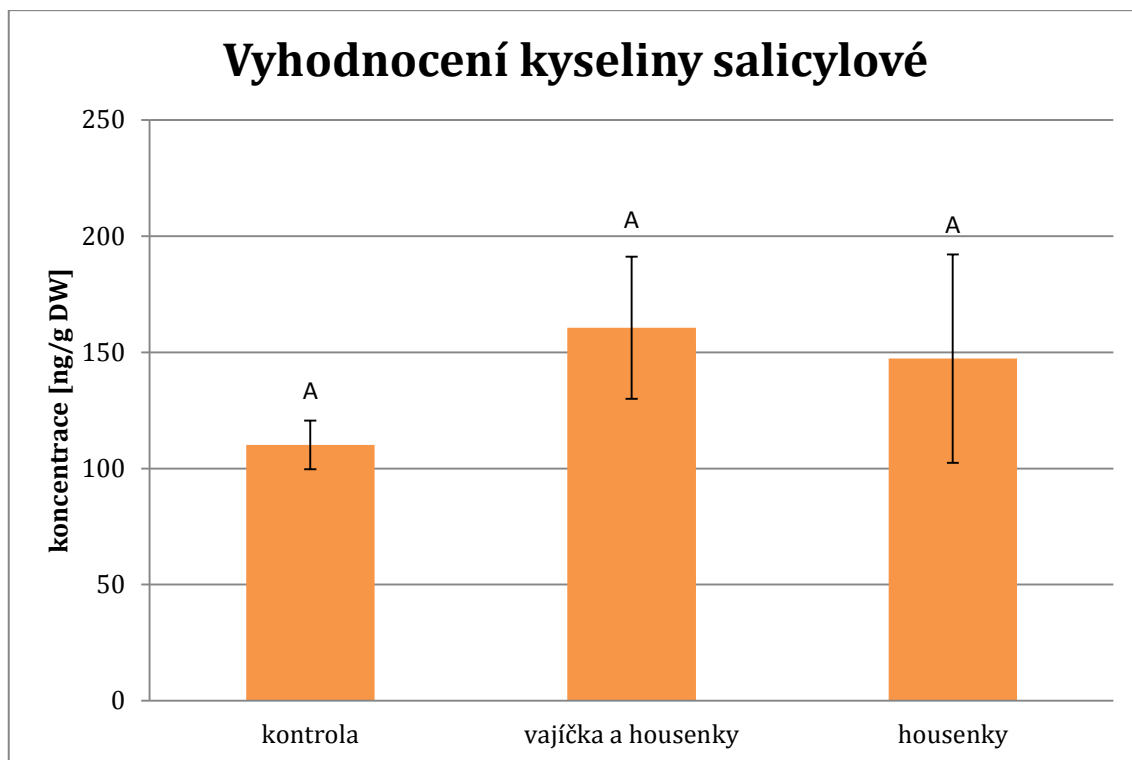
Graf č. 3b: Poměrné zastoupení fenolických látek u jednotlivých variant (mezi všemi variantami testováno $P < 0,05$)

Graf č. 3b znázorňuje poměrné hodnoty zastoupení čtrnácti fenolických kyselin u každé varianty měření. Provedené testy neprokázaly významné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



Graf č. 4: Obsah flavonoidů v listech brukve zelné u jednotlivých variant (mezi všemi variantami testováno $P < 0,05$)

Graf č. 4 znázorňuje naměřené průměrné hodnoty flavonoidů spolu s chybovými úsečkami, které znázorňují standardní chybu průměru. Průměrná hodnota kontrolní varianty činí 3,636 [mg/g FW] a standardní chyba je 0,934 [mg/g FW]. Varianta vajíčka a housenky má průměrnou hodnotu 3,704 [mg/g FW] a standardní chybu 0,966 [mg/g FW]. Průměrná hodnota varianty pouze housenky je 2,704 [mg/g FW] a její standardní chyba činí 0,286 [mg/g FW]. Mezi jednotlivými variantami nebyly prokázány významné rozdíly.



Graf č. 5: Obsah kyseliny salicylové v listech brukve zelné u jednotlivých variant (mezi všemi variantami testováno $P < 0,05$)

Poslední graf č. 5 zobrazuje naměřené průměrné hodnoty kyseliny salicylové spolu s chybovými úsečkami, které znázorňují standardní chybu průměru. Naměřená průměrná hodnota kontrolní varianty je 110,089 [ng/g DW] a standardní chyba 10,438 [ng/g DW]. Varianta vajíček s housenkami má průměrnou hodnotu 160,557 [ng/g DW] a standardní chybu 30,587 [ng/g DW]. Průměrná hodnota varianty pouze housenky činí 147,289 [ng/g DW] a standardní chyba je 44,819 [ng/g DW]. Opět nebyly zjištěny průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.

Byla provedena korelační a regresní analýza mezi hodnotami superoxidu a flavonoidů, superoxidu a fenolických látek, superoxidu a kyseliny salicylové, dále mezi flavonoidy a fenolickými látkami, flavonoidy a kyselinou salicylovou a fenolickými látkami a kyselinou salicylovou. Nebyla ale shledána žádná významná závislost.

5 Diskuse

Z provedených analýz vyplývá, že k jistým změnám v produkci vybraných sekundárních metabolitů po aplikaci housenek a nakladení vajíček oproti kontrolním variantám bez škůdců došlo, ale u většiny vzorků byly tyto rozdíly minimální, statisticky neprůkazné. Někdy to bylo způsobeno i velkým rozptylem naměřených hodnot. Jediný, ale za to výrazně prokazatelný rozdíl se vyskytoval u hodnot **superoxidového radikálu** po aplikaci a okusu housenek. Tato aktivní forma kyslíku má v rostlinách rozmanitou úlohu. Jednak vzniká při působení stresových faktorů jako nebezpečný produkt, dále hraje důležitou roli jako signální molekula, ale také je to látka toxická pro samotné patogeny a škůdce (Piterková et al., 2005) Ke vzrůstu koncentrace superoxidového radikálu tedy došlo o 49 % u varianty s housenkami.

Zkoumána byla i další aktivní formu kyslíku, konkrétně peroxid vodíku, který má v rostlině podobné vlastnosti jako superoxidový radikál. Nicméně u kontrolní varianty byly naměřeny čtyři chybné hodnoty ze šesti a proto nebylo statisticky vyhodnoceno porovnání mezi kontrolou a napadenými variantami. U stresovaných variant ale byly zaznamenány několikanásobně vyšší hodnoty. Statisticky byly mezi sebou hodnoceny dvě stresové varianty a to housenky a menší housenky s vajíčky, ale významné rozdíly se zde neprokázaly.

Podobným tématem se zabývá i Kerchev et al. (2011). Uvádí studii, která byla zaměřena právě na výzkum těchto aktivních forem kyslíku. Jako rostlinný materiál byl použit fazol měsíční a škůdcem byly housenky motýla blýskavky (*Spodoptera littoralis*). Bylo zjištěno, že k akumulaci reaktivních forem kyslíku dochází pouze po kontaktu hmyzu s rostlinou, ať už po okusu nebo sání šťáv, nikoli při obyčejném mechanickém narušení pletiv. Byla provedena detailní analýza, kdy byl fazol měsíční vystaven okusu těmito housenkami. Histochemické testy odhalily akumulaci peroxidu vodíku v místě okusu asi 3 hodiny po poškození. Elektronová mikroskopie společně s barvením pomocí CeCl_2 akumulaci peroxidu vodíku potvrdila a to především v buněčné stěně a apoplastu blízko místu poškození. Kromě toho byl peroxid pozorován i v částech rostliny, které byly od místa poškození vzdálenější, ale pouze bezprostředně po okusu, což dokazuje, že je peroxid vodíku důležitou signální molekulou. Extracelulární akumulace peroxidu je v souladu s tvorbou superoxidu prostřednictvím NADPH oxidáz na specifických místech společně s dismutací superoxidodismutáz.

Jak již bylo zmíněno, u ostatních zkoumaných metabolitů, konkrétně fenolických látek včetně flavonoidů a kyseliny salicylové nevyšel test anovy průkazný a tím pádem nebyly mezi kontrolními variantami a variantami stresovanými významné rozdíly. To může být vysvětleno tím, že housenky běláška zelného byly ponechány

na rostlinách příliš dlouhou dobu a rostliny tak byly vystaveny intenzivnímu okusu, což mohlo způsobit jejich vysílení a snížení produkce předpokládaného množství zkoumaných obranných látek.

Jedním z výše uvedených cílů bylo zjistit reakci rostliny na nakladená vajíčka dospělcem běláška zelného. Jak uvádí Nishid (2014), rostliny na ně dokážou reagovat. Jako příklad uvádí orixu japonskou (*Orixa japonica*), která produkuje silně odstrašující chemikálie, například flavonoidní triglykosid. Ten narušuje proces kladení vajíček. Další zjištěnou obrannou látkou byly deriváty od kyseliny hydroxybenzoové, které působí jak proti kladení vajíček, tak i proti okusu vylíhnutými housenkami.

Původním záměrem v naší analýze bylo zjistit, jak budou rostliny reagovat na nakladená vajíčka, zda se množství obranných látek oproti kontrole změní. Literatura uvádí, že z vajíček se housenky líhnou po více než 12 dnech (Chahil et Kular, 2013). Bohužel došlo k neočekávanému předčasnému vylíhnutí některých vajíček již po 8 dnech a malé housenky začaly listy okusovat, čímž byly výsledky experimentu částečně ovlivněny. Nicméně tyto housenky byly oproti nasbíraným housenkám mnohem menší a v nižším vývojovém larválním stupni a nebyly na rostlinách ponechány tak dlouho.

Na začátku výzkumu byla stanovena nulová hypotéza, ve které bylo předpokládáno, že dojde ke změně obsahu sekundárních metabolitů. To se nám sice signifikantně neprojevilo, ale některé hypotézy by bylo třeba ještě ověřit dalším výzkumem v této oblasti. Může to být způsobeno i větším rozptylem některých naměřených hodnot.

Paralelně s tímto výzkumem probíhala podobná studie, kdy bylo opět použito zelí bílé, a byly zkoumány stejné obranné látky. Jediný rozdíl byl v tom, že jako škůdce byl použit brouk z čeledi mandelinkovití, dřepčík rodu *Phyllotreta*. I v této studii nebyly naměřené hodnoty obranných látek nějak výrazně zvýšené a odlišné než hodnoty naměřené v tomto výzkumu (Kuchtíčková, 2018).

Problematika produkce obranných látek by mohla být do budoucna určitě rozšířena a mohla by vést například k vývoji pesticidů přírodního charakteru. Obranné látky by se mohly izolovat a aplikovat na rostliny. Přínosná může být také izolace flavonoidů, které mají významný vliv na lidské zdraví. Působí jako antioxidanty, které jsou důležité k deaktivaci volných radikálů, které se tvoří při oxidačním stresu a mohou poškodit významné látky, jako jsou bílkoviny nebo lipidy. Jejich hladina by se dala uměle zvýšit a poté by se daly dále využívat. Výzkum by se mohl také rozšířit o hodnocení a měření fytohormonů a sledování vývoje protektivních látek jako je například kyselina abscisová nebo ethylen. Určitě by bylo vhodné další výzkum rozšířit o množství testovaných vzorků.

6 Závěr

Z výsledků pokusů zaměřených na zjišťování změny koncentrace vybraných sekundárních metabolitů po napadení rostlin z čeledi Brassicaceae běláskem zelným lze učinit následující závěry:

Nejvýznamnějším výsledkem byl výrazný vzrůst koncentrace superoxidového radikálu u rostlin stresovaných okusem housenek běláška zelného oproti kontrolním vzorkům. Mezi těmito variantami byly zjištěny průkazné rozdíly.

U ostatních zkoumaných obranných látek, konkrétně flavonoidů, fenolických látek, kyseliny salicylové a peroxidu vodíku nebyl nárůst tak výrazný a statistické testy neprokázaly významné rozdíly mezi jednotlivými variantami. Díky tomu nemohla být potvrzena počáteční hypotéza. Nicméně tato problematika je velmi široká a bylo by vhodné jí do budoucna výzkumně dále rozpracovat a ověřit.

7 Seznam použité literatury

- AGRAWAL A. A. 2000. Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Ecology*. Vol. 81 (7), p. 1804 – 1813.
- BAILEY-SERRES J., MITTLER R. 2006. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*. Vol. 141, p. 311.
- BALDWIN I. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *PNAS*. Vol. 95(14), p. 8113-8118.
- BALDWIN I. T., KESSLER A., HALITSCHKE R. 2002. Volatile signaling in plant – plant – herbivore interactions: what is real? *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 5 (4), p. 351 – 354.
- BALOUN J., JAHODNÁŘ L., LEIERTO VÁ I., ŠTÍPEK S. 1989. Rostliny způsobující otravy a alergie. *Avicenum, Praha*, 235 p.
- BENNETT R. N., WALLSGROVE R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. Vol. 127(4), p. 617–633.
- BHATTACHARJEE S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*. Vol. 89 (7), p. 1113 – 1121.
- BHATIA S. 2015. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Books, 452 p. ISBN: 978-0-12-802221-4.
- BOUMENDJEL A. 2003 Aurones: A Subclass of Flavones with Promising Biological Potential. *Current Medicinal Chemistry*. Vol 10 (23), p. 2621-2630.
- BRUESSOW F., GOUHIER-DARIMONT C., BUCHALA A., METRAUX J. P., REYMOND P. 2010. Insect eggs suppress plant defence against chewing herbivores. *The Plant Journal*. Vol. 62, p. 876 – 885.
- BRY S. R., SHEFERSON R. P., JACUEMYN H. 2011. Impact of herbivory on flowering behaviour and life history trade-offs in a polycarpic herb: a 10- year experiment. *Oecologia*. Vol. 166, p. 293 – 303.
- CRAMER G. R., URANO K., DELROT S., PEZZOTTI M., SHINOZAKI K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*. Vol. 11, p. 1-14.
- CUTT J. R., KLESSIG D. F. 1992. Pathogenesis-related Proteins. In: Boller T., Meins F. (eds) *Genes Involved in Plant Defense*. *Plant Gene Research (Basic Knowledge and Application)*. Springer, Vienna, 368 p. ISBN 978-3-7091-6684-0.

DELGODA R., MURRAY J. E. 2017. Pharmacognosy : Fundamentals, Applications and Strategies. Elsevier Books, 738 p. ISBN: 9780128020999.

DIXON R. A., PASINETTI G. M. 2010. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. *Plant Physiology*. Vol. 154 (2), p. 453–457.

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.* Vol. 79, p. 81–94.

DURNER J., SHAH J., KLESSIG D. F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*. Vol. 2 (7), p. 266- 274.

EDWARDS R., GATEHOUSE J. A. 1999. Secondary Metabolism. In: Lea P. J., Leegood R. C. (eds) *Plant biochemistry and molecular biology*. Wiley. New York, 364 p. ISBN: 0-471-976822.

ELSTNER E. F., HEUPEL A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*. Vol. 70, p. 616–620.

ENGELBERTH J., ALBORN H. T., SCHMELZ E. A., TUMLINSON J. H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *PNAS*. Vol. 101 (6), p. 1781 – 1785.

ESSELEN M., BARTH S. W. 2104. Chapter Four - Food-Borne Topoisomerase Inhibitors: Risk or Benefit. *Advances in Molecular Toxicology*. Vol. 8, p. 123-171.

FATOUROS N. E., LUCAS-BARBOSA D., WELDEGERGIS B. T., PASHALIDOU F. G., VAN LOON J. J. A., DICKE M., HARVEY J. A., GOLS R., HUIGENS M. E. 2012. Plant Volatiles Induced by Herbivore Egg Deposition Affect Insects of Different Trophic Levels. *PLOS ONE*. Vol. 7(8), p. 1 -13.

GUGLIELMO CH. G., KARASOV W. H., JAKUBAS W. J. 1996. Nutritional Costs of a Plant Secondary Metabolite Explain Selective Foraging by Ruffed Grouse. *Ecology*. Vol. 77 (4), p. 1103-1115.

GHARWALOVÁ L. 2017. Obsah a distribuce fenolových sloučenin s antioxidační aktivitou v rostlině *Vitis vinifera*. *Bioprospect*. Vol. 27 (1), p. 10 – 13.

GHASEMZADEH A., JAAFAR H. Z. E. 2011. Effect of CO₂ Enrichment on Synthesis of Some Primary and Secondary Metabolites in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 12 (2), p. 1101-1114.

HARMANTHA J. 2005. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů. *Chemické listy*. Vol. 99, p. 622 – 632.

- HASSANPOUR S., MAHERI-SIS N., ESHRATKHAN B., MEHMANDAR F. B. 2011. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion*. Vol. 1 (1), p. 47 – 53.
- HEINRICH J., ŠVARCOVÁ I. VALENTOVÁ K. 2008. Plody *Lonicera caerulea*: Perspektivní funkční potrava a zdroj biologicky aktivních látek. *Chemické listy*. Vol. 102, p. 245 – 254.
- HILKER M., MEINERS T. 2002. Induction of plant responses to oviposition and feeding by herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Vol. 104 (1), p. 181 – 192.
- HOWE G. A., JANDER G. 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 59, p. 41 – 66.
- CHAHIL G. S., KULAR J. S. 2013. Biology of *Pieris brassicae* (Linn.) on different Brassica species in the plains of Punjab. *Journal of plant protection research*. Vol. 53 (1), p. 53-59.
- CHLUPÁČOVÁ M., OPLETALOVÁ V. 2004. Chalkony jako potenciální inhibitory aldoreduktasy. *Chemické listy*. Vol. 98, p. 320-323.
- CHEN Z., ZHENG Z., HUANG J., LAI Z., FAN B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 4(6), p. 493-496.
- CHONG J., POUTARAUD A., HUGUENEY P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*. Vol. 177 (3), p. 143 – 155.
- JANA S., CHOUDHURI M. A. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperm during aging. *Aquat Bot*. Vol. 12, p. 345–354.
- KERCHEV P. I., FENTON B., FOYER CH. H., HANCOCK R. D. 2011. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, Cell & Environment*. Vol. 35 (2), p. 441-453.
- KHODDAMI A., WILKES M. A., ROBERTS T. H. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. Vol. 18 (2), p. 2328-2375.
- KLEJDUS B., ŠTĚRBOVÁ D., STRATIL P., KUBÁŇ V. 2003. Identifikace a charakterizace isoflavonů v rostlinných extraktech za použití kombinace HPLC s hmotnostním detektorem a detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD-MS). *Chemické listy*. Vol. 97, p. 530-539.
- KLESSIG D. F., MALAMY J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*. Vol. 26 (5), p. 1439 – 1458.

- KOES R. E., QUATTROCCHIO J., MOL J. N. M. 1993. The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution. *BioEssays*. Vol. 16 (2), p. 123 – 132.
- KOUGAN G. B., TABOPDA T., KUETE V., VERPOORTE R. 2013. Simple Phenols, Phenolic Acids, and Related Esters from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*. In: Kuete V. (eds) *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*. Newnes. Dschang, 916 p. ISBN: 978-0-12-405927-6.
- KRISHANIA S., DWIVEDI P., AGARWAL K. 2013. Strategies of adaptation and injury exhibited by plants under a variety of external conditions: a short review. *Comunicata Scientiae*. Vol. 4(2), p. 103-110.
- KUMAR S. 2017. Plant secondary metabolites (PSMs) of Brassicaceae and their role in plant defense against insect herbivores – A review. *Journal of Applied and Natural Science*. Vol. 9 (1), p. 508 – 519.
- KUMAR P., KHOSLA CH., TANG Y. 2004. Manipulation and Analysis of Polyketide Synthases. *Methods in Enzymology*. Vol. 388, p. 269-293.
- LI L., LI CH., LEE G. I., HOWE G. A. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *PNAS*. Vol. 99 (9), p. 6416 – 6421.
- MAŠL K. 1873. Nejškodlivější motýlové a jejich housenky. *Hospodářské listy*. Vol. 2 (21), p. 174.
- MELLO M. O., SILVA-FILHO M. C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. Vol. 14 (2), p. 71 – 81.
- MICHALAK A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol. 15 (4), p. 523-530.
- MILEWSKI A. V., YOUNG T. P., MADDEN D. 1990. Thorns as induced defenses: experimental evidence. *Oecologia*. Vol. 86 (1), p. 70 – 75.
- NAKAYAMA T., YONEKURA-SAKAKIBARAM K., SATO T., KIKUCHI S., FUKUJ Y., FUKUCHI-MIZUTANI M., UEDA T., NAKAO M., TANAKA Y., KUSUMI T., NISHINO T. 2000. Aureusidin Synthase: A Polyphenol Oxidase Homolog Responsible for Flower Coloration. *Science*. Vol. 290 (5494), p. 1163-1166.
- NI M. S. 2011. *The natural health dictionary*. Ask Dr. Mao, 901 p. ISBN 978 – 0 – 9834098 -1 – 6.

- NISHIDA R. 2014. Chemical ecology of insect–plant interactions: ecological significance of plant secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Vol. 78 (1), p. 1-13.
- NOGUIERA A., EL OTTRA J. H. L., GUIMARÃES E., RODRIGUES MACHADO S., LOHMANN L. G. 2013. Trichome structure and evolution in Neotropical lianas. *Annals of botany*. Vol. 112 (7), p. 1331 – 1350.
- NOVÁK J. 2007. Jedovaté rostliny kolem nás. Grada Publishing a. s. Praha, 176 p. ISBN 978-80-247-1549-0.
- ONKOKESUNG N., REICHEL T. M., DOORN A., SCHUURINK R. C., LOON J. J. A., DICKE M. 2014. Modulation of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore *Pieris brassicae*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65 (8), p. 2203–2217.
- ORCUTT D. M., NILSEN E. T. 2000. *The Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors*. John Wiley & Sons. United States of America, 683 p. ISBN: 978-0-471-17008-2.
- ORDOÑEZ A. A. L., GOMEZ J. D., VATTUONE M. A. ISLA M. I. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.* Vol. 97, p. 452–458.
- PALDRYCHOVÁ M. 2015. Stilbeny – fytoalexiny se širokým potenciálem. *Bioprospect*. Vol. 25 (4), p. 85-89.
- PARSAEIMEHR A., SARGSYAN E., VARDANYAN A. 2011. Expression of Secondary metabolites in Plants and their useful perspective. *ABAH Bioflux*. Vol. 3 (2), p. 115-124.
- PASHALIDOU F. G., FATOUROS N. E., VAN LOON J. J. A., DICKE M., GOLS R. 2015. Plant-mediated effects of butterfly egg deposition on subsequent caterpillar and pupal development, across different species of wild Brassicaceae. *Ecological Entomology*. Vol. 40, p. 444 – 450.
- PAVARINI D. P., PAVARINI S. P., NIEHUES M., LOPES N. P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 176, p. 5–16.
- PAVLOVÁ L. 2005. *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, 253 p. ISBN 80-246-0985-1.
- PEIFFER M., TOOKER J. F., LUTHE D. S., FELTON G. W. 2009. Plants on early alert: glandular trichomes as sensors for insect herbivores. *New Phytologist*. Vol. 184(3), p. 644–656.

- PETRUŠOVÁ V., DUČAIOVÁ Z., REPČÁK M. 2014. Short-term UV-B dose stimulates production of protective metabolites in *Matricaria chamomilla* leaves. *Photochem Photobiol.* Vol. 90, p. 1061–1068.
- PITERKOVÁ J., TOMÁNKOVÁ K., LUHOVÁ L., PETŘIVALSKÝ M., PEČ P. 2005. Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy.* Vol. 99, p. 455 – 466.
- PODLEŠÁKOVÁ K., TARKOWSKÁ D., PĚNČÍK A., OKLEŠŤKOVÁ J., TUREČKOVÁ V., FLOKOVÁ K., TARKOWSKI P. 2012. Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy.* Vol. 106, p. 373-379.
- PROCHÁZKA S. 1998. *Fyziologie rostlin.* Praha. Academia, 484 p., ISBN: 80-200-0586-2.
- ROD J. 2017. *Choroby a škůdci na zahradě: identifikace, prevence a ochrana.* Grada Publishing a. s. Praha, 160 p. ISBN: 978–80–271–9753-8.
- RYAN C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* Vol. 1477 (1-2), p. 112 – 121.
- SAMANTA A., DAS G., DAS S. K. 2011. Roles of Flavonoids in Plants. *International Journal of pharmaceutical science and technology.* Vol. 6 (1), p. 12 – 35.
- SALAČOVÁ L., FALTUSOVÁ Z., OVESNÁ J. 2015. Jaké mechanismy využívají rostliny pro obranu proti houbovým patogenům. *Chemické listy.* Vol. 109, p. 613 – 618.
- SAXENA M., SAXENA J., RADHAN A. 2012. Flavonoids and Phenolic Acids as Antioxidants in Plants and Human Health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* Vol. 16 (2), p. 130 – 134.
- SHAFIQUE A., REHMAN S., KHAN A., KAZI A. G. 2014. Improvement of Legume Crop Production Under Environmental Stresses Through Biotechnological Intervention. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance.* Vol. 2, p. 1-22.
- SCHULZE E. D., BECK E., MÜLLER-HOHENSTEIN K. 2005. *Plant Ecology.* Springer Berlin. Heidelberg, 692 p. ISBN: 3-540-20833-X.
- SIMPSON D., AMOS S. 2017. *Pharmacognosy : Fundamentals, Applications and Strategies.* Elsevier Books, 738 p. ISBN: 978 – 0- 12- 802104-0.
- SINGLETON V. L., ROSSI J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* Vol. 16, p. 144–158.
- SLAVÍKOVÁ Z. 2002. *Morfologie rostlin.* Karolinum. Univerzita Karlova v Praze, 218 p. ISBN: 80-246-0327-6.

- SPIPKOVÁ J., MARTIN J., SIATKA T., TŮMOVÁ L., KAŠPAROVÁ M. 2016. Farmakognozie. Karolinum. Univerzita Karlova v Praze, 345 p. ISBN: 978-80-246-3264-3.
- STINTZI A., HEITZ T., PRASAD V., WIEDEMANN-MERDINOGLU S., KAUFMANN S., GEOFFROY P., LEGRAND M., FRITIG B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*. Vol. 75 (8), p. 687 – 706.
- TAIZ L., ZEIGER E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc, U.S, 690 p. ISBN: 0878938230.
- TORRES M. A., JONES J. D. G., DANGL J. L. 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*. Vol. 141, p. 373 – 378.
- TREUTTER D. 2005. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology*. Vol. 7 (6), p. 581 – 591.
- TURLINGS T. C. J., TUMLINSON J. H. 1992. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Plant Biology*. Vol. 89, p. 8399-8402.
- VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. 2009. *Chemie potravin*. OSSIS. Tábor, 1246 p. ISBN: 978-80-86659-17-6.
- VERPOORTE R. 2000. Secondary Metabolism. In: Verpoorte R., Alfermann A.W. (eds) *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Springer. Dordrecht, 293 p. ISBN 978-94-015-9423-3.
- VLOT A. C., DEMPSEY D. A., KLESSIG D. F. 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 47, p. 177-206.
- VOTRUBOVÁ O. 2010. *Anatomie rostlin*. Karolinum. Univerzita Karlova v Praze, 89 p. ISBN: 80-246-0327-6.
- WAR A. R., PAULRAJ M. G., AHMAD T., BUHROO A. A., HUSSAIN B., IGNACIMUTHU S., SHARMA H. CH. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 7 (10), p. 1306 - 1320.
- WAR A. R., PAULRAJ M. G., WAR M. Y., IGNACIMUTHU S. 2011. Herbivore- and Elicitor- Induced Resistance in Groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 6 (11), p. 1769 - 1777.
- WAR A. R., PAULRAJ M. G., WAR M. Y., IGNACIMUTHU S. 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 6 (11), p. 1787-1792.

WILHELM J. 1997. Rostliny se brání infekci podobně jako leukocyty. *Vesmír*. Vol. 76, p. 715.

WINKEL-SHIRLEY B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*. Vol. 126, p. 485 – 493.

WOJTASZEK P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*. Vol. 322 (3), p. 681 – 692.

WU J., BALDWIN I. 2010. New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual review of genetics*. Vol. 44 (1), p. 1-24.

YEATS T. H., ROSE J. K. C. 2013. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*. Vol. 163, p. 5 – 20.

Internetové zdroje

CHABINOVÁ J., ZÍTKA O., HÚSKA D., KLEJDUS B., KIZEK R. 2011. Optimization chromatographic isolation of anthocyanins. *MendelNet*. [online]. [cit. 8. 7. 2018]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2011/articles/30_chabinova_436.pdf

FOUDAH A. I., ABDEL-KADER M. S. 2017. Isoflavonoids. *IntechOpen*. [online]. [cit. 8. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/isoflavonoids>.

GONG Y., RAO L., YU D. 2013. Abiotic Stress in Plants. *IntechOpen*. [online]. [cit. 8. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/agricultural-chemistry/abiotic-stress-in-plants>.

KOCÁBKOVÁ L. 2012. Bělásek zelný: zahradní krasavec či zákeřný škůdce? *Živočich*. [online]. [cit. 5. 7. 2018]. Dostupné z: <http://www.zivocich.com/clanky/seznamte-se-s-zivocichem/d:belasek-zelny-zahradni-krasavec-ci-zakerny-skudce>.

NELSON R. 2013. Predation and Herbivory. *Untamedscience*. [online]. [cit. 27. 4. 2018]. Dostupné z: <http://www.untamedscience.com/biology/ecology/interactions-among-organisms/predation-and-herbivory/>.

ŘEPKOVÁ J. 2013. Odolnost rostlin k patogenům. *Genetika rostlin*. [online]. [cit. 27. 4. 2018]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/07-rezistence-k-patogenum.html>.

STEVENS A. N. P. 2010. Predation, Herbivory, and Parasitism. *Nature Education*. [online]. [cit. 27. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/predation-herbivory-and-parasitism-13261134>.

ŽIŽKA P. 2015. Bělásek zelný. *PrirodaCeska.cz*. [online]. [cit. 27. 4. 2018]. Dostupné z: <http://prirodaceska.cz/belasek-zelny/>.

Ústní sdělení

KUCHTÍČKOVÁ N. 2018. Produkce flavonoidů a fenolických látek u zelí v závislosti na napadení dřepčíky rodu *Phyllotreta* – diplomová práce – ústní sdělení.

8 Přílohy

Příloha č. 1: Naměřené hodnoty **superoxidu** pro jednotlivé varianty

| Měření | Kontrola - koncentrace [µg/g FW] | Vajíčka a housenky - koncentrace [µg/g FW] | Housenky - koncentrace [µg/g FW] |
|-------------------|--|---|--|
| 1. | 10,824 | 6,492 | 14,543 |
| 2. | 8,904 | 7,945 | 16,316 |
| 3. | 10,064 | 11,464 | 11,370 |
| 4. | 10,424 | 6,612 | 12,757 |
| 5. | 9,718 | 10,891 | 14,036 |
| 6. | 5,505 | 4,066 | 13,570 |
| průměr | 9,240 | 7,911 | 13,765 |
| std. chyba | 0,724 | 1,054 | 0,623 |

*FW= hmotnost čerstvého materiálu

Příloha č. 2: Naměřené hodnoty **peroxidu** pro jednotlivé varianty

| Měření | Kontrola - koncentrace [µmol/g FW] | Vajíčka a housenky - koncentrace [µmol/g FW] | Housenky - koncentrace [µmol/g FW] |
|-------------------|--|---|--|
| 1. | - | 12,669 | 10,799 |
| 2. | 0,281 | 6,125 | 9,187 |
| 3. | - | 8,195 | - |
| 4. | 5,285 | 12,278 | 1,646 |
| 5. | - | 14,506 | 6,540 |
| 6. | - | 13,404 | 13,752 |
| průměr | 2,783 | 11,196 | 8,385 |
| std. chyba | 1,021 | 1,224 | 1,674 |

Příloha č. 3: Naměřené hodnoty **fenolických látek** pro jednotlivé varianty

| Měření | Kontrola - koncentrace [mg/g FW] | Vajíčka a housenky - koncentrace [mg/g FW] | Housenky - koncentrace [mg/g FW] |
|-------------------|--|---|--|
| 1. | 3,321 | 4,891 | 3,960 |
| 2. | 3,766 | 4,602 | 3,560 |
| 3. | 3,815 | 4,225 | 3,359 |
| 4. | 3,773 | 4,228 | 3,674 |
| 5. | 3,434 | 2,547 | 3,649 |
| 6. | 2,998 | 3,787 | 3,387 |
| průměr | 3,518 | 4,047 | 3,598 |
| std. chyba | 0,121 | 0,307 | 0,082 |

Příloha č. 4: Naměřené hodnoty **flavonoidů** pro jednotlivé varianty

| Měření | Kontrola - koncentrace [mg/g FW] | Vajíčka a housenky - koncentrace [mg/g FW] | Housenky - koncentrace [mg/g FW] |
|-------------------|--|---|--|
| 1. | 2,952 | 8,702 | 2,547 |
| 2. | 2,826 | 4,194 | 4,199 |
| 3. | 2,848 | 2,777 | 2,628 |
| 4. | 8,709 | 2,530 | 2,440 |
| 5. | 2,388 | 1,552 | 2,434 |
| 6. | 2,089 | 2,470 | 1,977 |
| průměr | 3,636 | 3,704 | 2,704 |
| std. chyba | 0,934 | 0,966 | 0,286 |

Příloha č. 5: Naměřené hodnoty **kyseliny salicylové** pro jednotlivé varianty

| Měření | Kontrola - koncentrace [ng/g DW] | Vajíčka a housesky - koncentrace [ng/g DW] | Housesky - koncentrace [ng/g DW] |
|-------------------|--|---|--|
| 1. | 113,600 | 234,133 | 93,333 |
| 2. | 86,400 | 111,466 | 91,466 |
| 3. | 130,266 | 136,133 | 257,066 |
| průměr | 110,089 | 160,577 | 147,289 |
| std. chyba | 10,438 | 30,587 | 44,819 |

*DW= hmotnost sušiny

Příloha č. 6: Analýza rozptylu pro jednotlivé metabolity

| Typ sekundárního metabolitu | Superoxid | Fenolické látky | Flavonoidy | Kyselina salicylová |
|-----------------------------------|-----------|--------------------|------------|------------------------|
| p hodnota | 0,001 | 0,207 | 0,669 | 0,658 |

Příloha č. 7: Tukeyho test pro superoxid

| Porovnávané skupiny | p hodnota | Vyhodnocení testu |
|---------------------|-----------|-------------------|
| A vs B | 0,560 | Nevýznamný rozdíl |
| A vs C | 0,008 | **p < 0,01 |
| B vs C | 0,001 | **p < 0,01 |

** velmi významné rozdíly mezi hodnotami

A= kontrola, B= vajíčka a housesky, C= housesky