

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta lesnická a dřevařská
Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Anatomická stavba floému smrku ztepilého

Bakalářská práce

Autor: Martina Kábelová

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

2022

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bc. Martina Kábelová

Lesnictví
Lesnictví

Název práce

Anatomická stavba floému smrku ztepilého

Název anglicky

Norway spruce phloem anatomy

Cíle práce

Cílem práce je rešerše dostupné literatury zabývající se anatomickou stavbou floémové části u smrku ztepilého, aktualizace informací týkajících se dlouhotrajektorového transportu u lesních dřevin se zaměřením na floémovou část a pořízení bohaté obrazové dokumentace.

Metodika

Bakalářská práce bude představovat kombinaci rešeršní a praktické činnosti. Rešerše bude shrnovat poslední poznatky o stavbě floému evropských dřevin a přehled současných teorií pohybu látek floémem. Praktická část práce se zaměří na pořizování řezů floémové části smrku ztepilého a identifikaci jednotlivých anatomických struktur s využitím mikroskopu (Leica DVM6, Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Jeho součástí je i software na měření objektů v pořízených snímcích. Odběr se uskuteční z části kmene, popř. větvi v počtu min. 30 vzorků ze smrků pocházejících z pokusných ploch projektu Extemit v Kostelci v průběhu vegetační sezóny 2021. Jednotlivé struktury ve floému budou identifikovány a dle možností změřeny (obvod, plocha, délka). Získaná data budou vyhodnocena v programu Statistica se zaměřením na detekci rozdílů mezi stromy s odlišnými morfologickými parametry. Rešerše bude odevzdána v průběhu září 2021.

Doporučený rozsah práce

30-40 stran

Klíčová slova

průvodní buňka, sacharidy, sítkovice, teorie tlakového toku látek

Doporučené zdroje informací

- Franceschi, V.R., Krekling, T., Berryman, A.A., Christiansen, E., 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *Am. J. Bot.* 85, 601–615.
- Gricar, J., Prislán, P., De Luis, M., Gryc, V., Hacurová, J., Vavrčík, H., Čufar, K., 2015. Plasticity in variation of xylem and phloem cell characteristics of Norway spruce under different local conditions. *Front. Plant Sci.* 6, 730.
- Jyske, T.M., Suuronen, J.-P., Pranovich, A. V, Laakso, T., Watanabe, U., Kuroda, K., Abe, H., 2015. Seasonal variation in formation, structure, and chemical properties of phloem in *Picea abies* as studied by novel microtechniques. *Planta* 242, 613–629.
- Nagy, N.E., Franceschi, V.R., Solheim, H., Krekling, T., Christiansen, E., 2000. Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (Pinaceae): anatomy and cytochemical traits. *Am. J. Bot.* 87, 302–313.
- Poorter, H., 2004. Larcher, W. *Physiological plant ecology*. 4th edn. *Ann. Bot.* 93, 616–617.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.

Předběžný termín obhajoby

2021/22 LS – FLD

Vedoucí práce

doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 31. 1. 2022

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

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 15. 2. 2022

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 26. 03. 2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Anatomická stavba smrku ztepilého vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Ivana Tomáškové, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne.....

.....
Bc. Martina Kábelová

Poděkování

Děkuji vedoucí své práce, doc. Ing. Ivaně Tomáškové, Ph.D., za ochotu, trpělivost a laskavost, s níž mne vedla při jejím vzniku. Poděkovat chci též svému manželovi a dětem, pro něž doba mého studia nebyla jednoduchá.

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o anatomii a funkci floému smrku ztepilého. Rešeršní část shrnuje současné poznatky o floému. Úvodem charakterizuje smrk ztepilý jako naši hospodářsky nejvýznamnější a zároveň v současné době nejohroženější dřevinu a přibližuje jeho ekologické nároky a přirozené rozšíření. Dále se rešerše věnuje anatomii floému včetně specifikace rozdílu mezi floémem krytosemenných a nahosemenných rostlin. Zvláštní pozornost je v práci věnována obranné funkci floému (zejména roli buněk polyfenolického parenchymu) a mechanismu dálkového transportu asimilátů. Münchova teorie tlakového toku látek z 30. let 20. století je stále uznávána za platnou, zároveň však existují rozpory, na něž reagují další teorie a pokoušejí se tyto rozpory uchopit a vysvětlit – v současné době je to teorie relé, koncept floému jako vysokotlaké trubice a kanálový model.

Praktická část je zaměřena na pořízení řezů floémem a následné zachycení jemné struktury floému prostřednictvím digitálního mikroskopu, včetně změření některých anatomických struktur. Dále byla zkoumána tloušťka floému různých jedinců a analyzována závislost této veličiny na morfologii daného stromu, konkrétně na tloušťce jeho kmene, i na dalších parametrech; vzdálenosti od paty a relativní lokalizaci v kmenovém profilu. Při statistickém vyhodnocení byla využita regresní analýza, GLM modely a jednofaktorová ANOVA. Výsledkem praktické části práce bylo zjištění, že tloušťka kmene je statisticky významnou proměnnou, která vysvětluje variabilitu tloušťky lýka z 10 %. Vliv ostatních proměnných nebyl prokázán. Výstupem praktické části je též bohatá obrazová dokumentace floému včetně změření a zhodnocení některých anatomických struktur, konkrétně provazců a shluků buněk polyfenolického parenchymu, které hrají klíčovou roli v obranných reakcích.

Klíčová slova: průvodní buňka, sacharidy, sítkovice, teorie tlakového toku látek

Abstract

This bachelor thesis deals with the anatomy and function of the phloem of the spruce. The review part summarizes the current knowledge about the phloem. The introduction characterizes the Norway spruce as our most economically important and currently most endangered tree species and presents its ecological requirements and natural distribution. Next, the research focuses on the anatomy of the phloem, including the specification of the difference between the phloem of Angiosperms and Gymnosperms. Particular attention is paid to the defensive functions of the phloem (especially the role of polyphenolic parenchyma cells) and the mechanism of long-distance transport of assimilates. Münch's pressure flow theory of from the 1930s is still recognized as valid, but at the same time there are contradictions to which other theories are responding and attempting to grasp and explain - currently the relay theory, the concept of the phloem as a high-pressure tube, and the channel model.

The practical part focused on taking sections of the phloem and then capturing the fine structure of the phloem using a digital microscope, including measuring some of the anatomical structures. Furthermore, the phloem thickness of different individuals was investigated and the dependence of this variable on the morphology of the tree in question, specifically on the thickness of its trunk, as well as on other parameters; distance from the base and relative localization in the trunk profile was analyzed. Regression analysis, GLM models and one-factor ANOVA were used in the statistical evaluation. As a result of the practical part of the work, it was found that stem thickness is a statistically significant variable that explains 10 % of the variation in phloem thickness. The influence of other variables was not demonstrated. The practical part also resulted in a rich pictorial documentation of the phloem, including the measurement and evaluation of some anatomical structures, namely the fascicles and cell clusters of the polyphenolic parenchyma, which play a key role in defence reactions.

Keywords: companion cell, carbohydrates, sieve elements, pressure flow theory

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Charakteristika smrku ztepilého (Picea abies)	12
3.1.1	Základní charakteristika druhu Picea abies.....	12
3.1.2	Rozšíření a ekologie.....	12
3.1.3	Hospodářský význam smrku ztepilého	14
3.2	Anatomie a funkce floému	16
3.2.1	Charakteristika vybraných struktur rostlinných buněk a pletiv	16
3.2.2	Anatomie a funkce floému obecně.....	17
3.2.3	Specifika floému krytosemenných a nahosemenných rostlin	19
3.2.4	Role floému v obranných reakcích smrku ztepilého.....	20
3.3	Asimilační tok	24
3.3.1	Složení floémové šťávy.....	24
3.3.2	Pohyb látek floémem.....	25
4	Metodika	30
4.1	Metodika odběru vzorků lýka.....	30
4.2	Metodika přípravy mikroskopických preparátů	30
4.3	Statistické zhodnocení	33
5	Výsledky	34
5.1	Analýza vztahu mezi tloušťkou lýka a vysvětlujícími proměnnými.....	34
5.2	Mikroskopické řezy floémem, velikost a uspořádání PP buněk.....	37
6	Diskuse.....	42
6.1	Závislost tloušťky floému na vysvětlujících proměnných	42
6.2	Pořízení mikroskopické obrazové dokumentace a změření některých anatomických elementů floému.....	42
7	Závěr	44
8	Bibliografie	46

Seznam obrázků

Obrázek č. 1 – Schéma chemické stavby sloučenin podílejících se na obranných reakcích smrku ztepilého	22
Obrázek č. 2 – Schematické znázornění třech typů plnění floému	26
Obrázek č. 3 – Typy vyprazdňování floému	29
Obrázek č. 4 – Set pro přípravu pryskyřice k zalití vzorku	31
Obrázek č. 5 – Silikonová forma	32
Obrázek č. 6 – Mikrotom	32
Obrázek č. 7 – Fotografie floému pořízená digitálním mikroskopem Leica s prvky lýka měřenými přímo v rámci mikroskopování	33
Obrázek č. 8 – Výstup regresní analýzy vztahu průměru kmene a tloušťky lýka .	34
Obrázek č. 9 – Radiální řez floémem	38
Obrázek č. 10 – Tangenciální řez floémem s podélným uspořádáním PP buněk .	38
Obrázek č. 11 – Radiální řez floémem s patrnými zbytky kůry	39
Obrázek č. 12 – Kambium, tangenciální řez	39
Obrázek č. 13 – Oměřený detail shluku PP buněk	40
Obrázek č. 14 – Radiální řez floémem	40
Obrázek č. 15 – Shluk PP buněk extrémních rozměrů	41
Obrázek č. 16 – Tangenciální řez floémem s měřeným shlukem i provazcem PP buněk	41

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 – GLM model, test 3 vysvětlujících proměnných	35
Tabulka č. 2 – LSD test závislosti tloušťky lýka na jednotlivých sekcích	36

Seznam grafů

Graf č. 1 – Závislost tloušťky lýka na průměru kmene	35
Graf č. 2 – Průměrná tloušťka lýka v jednotlivých sekcích	36

1 Úvod

Floém neboli lýko je vodivým pletivem, které rozvádí v těle rostlin produkty fotosyntézy (asimiláty) a široké spektrum dalších látek. Pro strom je životně důležitou strukturou; pokud dojde k jeho narušení ve vyšší míře, strom umírá. Protože je floém plný výživných látek, stává se cílem útoků podkorního hmyzu. Například v současné době probíhající útok několika druhů lýkožrouta na smrkové porosty, který vyústil do kalamity bezprecedentních rozměrů a rozvratu velké části smrkových porostů v ČR, je právě útokem na floém napadaných stromů.

Zároveň je floém stěžejním místem obranných reakcí stromů, které zahrnují pestrou škálu dějů. Prohloubení našich znalostí o anatomii a funkci floému může přispět k lepší ochraně smrkových porostů a k zakládání a pěstování porostů zdravých, odolných a stabilních. Toto téma lze asi označit za jednu z velkých výzev lesnictví, neboť na jedné straně je smrk ztepilý v ČR dřevinou hospodářsky stěžejní nahraditelnou, na druhé straně však postupující klimatická změna, která přináší epizody sucha a kontinuální nárůst teplot, problematizuje podmínky právě pro pěstění smrku, který je vyššími teplotami a nedostatkem vláhy oslabován.

Floém byl donedávna strukturou relativně méně prozkoumanou, snad proto, že v porovnání s vnitřní dřevnatou částí kmene je jeho hospodářský význam zanedbatelný. V posledních letech je však jeho funkci a anatomii věnováno více pozornosti a vznikla tak řada studií přinášejících nové poznatky o floému. Tato práce přináší přehled současného poznání o funkci a anatomii floému, přičemž zvláštní pozornost je věnována otázce mechanismu transportu látek floémem a obranným odehrávajícím se ve floému. Praktická část přináší mikroskopickou obrazovou dokumentaci floému a zkoumá povahu a některé zákonitosti rozměrů floému.

Naše poznání o floému se v uplynulých desetiletých i díky novým technologiím znásobilo. Přesto zůstává řada otázek otevřených a nabízí tak pole k další výzkumné práci.

2 Cíle práce

Cílem teoretické části práce je tvorba rešerše shrnující současný stav poznání o anatomii floému evropských dřevin se zaměřením na nahosemenné, resp. anatomické rozdíly mezi floémem nahosemenných a krytosemenných rostlin, dále aktualizace přehledu teorií o pohybu látek floémem a zpracování tématu role floému v obranných reakcích, kterým se zabývají výzkumy posledních let, a přinášejí tak nové poznatky i hypotézy.

Cílem praktické části práce je pak pořízení mikroskopové obrazové dokumentace, identifikace struktur floému a rozměru, zejména pak možnosti pořizování mikroskopických řezů v různých směrech lýkové části (tangenciální a příčné řezy).

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika smrku ztepilého (*Picea abies*)

3.1.1 Základní charakteristika druhu *Picea abies*

Smrk ztepilý je jehličnatý jednodomý stálezelený strom dorůstající výšky 30-50, výjimečně i téměř 70 m. Dožívá se 300-400, popř. až 600 let. Má pyramidální, přeslenitě větvenou korunu. Charakteristický je pro něj plochý kořenový systém, z čehož vyplývá jeho zranitelnost vůči abiotickým vlivům (viz dále – Rozšíření a ekologie). Plodit začíná ve věku 60 let v intervalu 4-5 let. Kvete v dubnu až červnu. Semena jsou umístěna v šiškách typu morinda a dozrávají na podzim prvního roku. Smrk ztepilý je extrémně proměnlivý druh, a to jak při srovnání různých populací, tak v rámci jedné populace. Variují šišky (varianty *obovata*, *acuminata*, *europaea*), tvar koruny (široká či úzká forma, nasazení větví konvexní/konkávní, tvar koruny válcovitý/kuželovitý/parabolický atd.), větvení (zachvojení hřebenité/deskovité/svazčité), kořenový systém (vedle plochého nalezneme i srdcovitý, výjimečně dokonce i křulový) i jehlice (osluněné mají čtvercový průřez, zastíněné jsou plošší) (Musil, 2007).

Taxonomicky se smrk ztepilý (*Picea abies*) řadí mezi rostliny nahosemenné (*Gymnospermae*), řád borovicotvaré (*Pinales*), čeleď borovicovité (*Pinaceae*) (Pikula, 2003). Smrk ztepilý je v ČR jedinou autochtonní dřevinou rodu *Picea*, v Evropě se vyskytují druhy tři (*P. abies*, *P. omorika*, *P. obovata*) a celosvětově bylo identifikováno cca 40 druhů tohoto rodu (Musil, 2007).

3.1.2 Rozšíření a ekologie

Výskyt smrku ztepilého v rámci Evropy dělíme do dvou oblastí; Středoevropsko-balkánské a Severoevropské (Skandinávsko-ruské). Ve Středoevropsko-balkánské oblasti je smrk ztepilý horskou a podhorskou dřevinou s ostrůvkovitým areálem. V Severoevropské oblasti pak tvoří souvislé porosty v nižší nadmořské výšce – v nížinách a pahorkatinách; do pohoří zde vystupuje jen ojediněle. V České republice se smrk přirozeně vyskytuje v mezofytiku (stupeň suprakolinní a submontánní) a oreofytiku (stupeň montánní, supramontánní a subalpínský). Zatímco ve stupni suprakolinním (200-550 m n.m.) a submontánním (450-800 m

n.m.) roste roztroušeně, stupně montánní (750-1100 m n.m.) a supramontánní (1000-1370 m n.m.) jsou těžištěm jeho výskytu. Ve stupni subalpínském (1200-1602 m n.m.) se pak vyskytuje roztroušeně až ojediněle do výšky 1300-1400 m n.m., kde tvoří horní hranici lesa. V mezofytiku roste na chladnějších, podmáčených lokalitách, v inverzních údolích, roklinách, na okrajích rašelinišť. V Krkonoších vytváří klimaxové porosty s příměsí jeřábu ptačího, v montánním stupni smíšené porosty s bukem, jedlím a klenem. V podhůří (stupeň submontánní) je příměsí v bučinách. V mezofytiku se rovněž vyskytuje jako příměs ve stinných údolích, ale může být dominantní dřevinou na prameništích a podél lesních vodotečí, na okrajích rašelinišť či v podmáčených jedlových smrčínách. Nejnižší v České republice, a nejspíš i ve střední Evropě, se roste v Labských pískovcích v klimaticky inverzních soutěskách v nadmořské výšce 140 m n.m. Na většině území ČR je jeho výskyt nesouvislý, extrazonální, pouze na menšině území v supramontánním a částečně i v montánním stupni přirozeně tvoří v souvislé, zonální porosty. V posledních 200 letech došlo k významnému druhotnému rozšíření smrku do míst přirozených jedlobučin, bučin a později i doubrav, kdy zastoupení smrku uměle vzrostlo cca pětinasobně – přirozené zastoupení smrku se pohybuje mírně nad 11 procenty (Musil, 2007). Současným trendem je však snižování zastoupení smrku; zatímco v roce 2000 zaujímal smrk 54,1 % z celkové plochy porostní půdy, v roce 2020 to bylo 48,8 % a tento trend bude nadále pokračovat vzhledem k tomu, že jeho využití v rámci umělé obnovy kontinuálně klesá; ze 43,3 % v roce 2000 až na 30 % v roce 2020. (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020, 2021) Doporučené zastoupení smrku v našich lesích je 36,5 % (Musil, 2007).

Smrk je některými autory považován za světlomilnou dřevinu, která v mládí snáší zástín (Maděra, 2001), jinými za polostinnou až stinnou dřevinu (Musil, 2007). Tvoří semknuté porosty, které silně zastiňují půdní povrch. Je náročný na půdní vlhkost a snáší i trvalé zamokření. Na teplo a sucho je citlivý, jeho růst pak stagnuje a strom snadno podléhá škůdcům (Chmelař, 1981). Pro zdárný růst vyžaduje roční srážky alespoň v minimální výši 800 mm (Musil, 2007). Závažné škody kalamitního rozsahu jsou v posledních několika letech na našem území působeny zejména lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) doprovázeným lýkožroutem

lesklým (*Pityogenes chalcographus*) a lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*) (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020, 2021). Smrk není náročný na půdní složení. Na vápencích bývá vytlačován bukem. Svým spadem půdu okyseluje a může způsobit podzolizaci zejména na chudých půdách. Díky plochému kořenovému systému dokáže růst i na velmi mělkých půdách, má však sklon k vývratům. Smrk špatně snáší znečištěné ovzduší (viz úhyn smrkových porostů v Krušných horách). Není náročný na klima a snáší i velmi nízké teploty, škodí mu však sníh a vítr (Chmelař, 1981); v ČR mu vyhovuje krátká vegetační perioda a krátké chladné léto. Pro svůj růst a realizaci celého reprodukčního cyklu mu postačuje vegetační doba v délce 2-2,5 měsíce (Musil, 2007). Vůdčí dřevinou je přirozeně v 8. lesním vegetačním stupni (smrkový vegetační stupeň), který je charakterizován vegetační dobou v délce 60-100 dnů, průměrnou teplotou vzduchu 2,5-4 °C, průměrnými ročními srážkami 1200-1550 mm a nadmořskou výškou 1050-1350 m n. m. (Pikula, 2003). Jedinci rostoucí v mírnějších polohách s dlouhou vegetační dobou jsou ohroženi rozvojem červené hniloby (Chmelař, 1981). Červená hniloba je působena dřevokaznou houbou *Heterobasidion annosum*, která do porostů proniká šířením spor vzdušnou cestou na dlouhé vzdálenosti. Spory často kolonizují řezné plochy pařezů, mycelium houby se pak šíří prostřednictvím kořenových dotyků a kořenových srůstů porostem. Napadení kořenovníkem má za následek snížení přírůstu a vývraty v kořenech i oddenkové části, ve dřevě pak v konečné fázi infekce působí bílou voštinovitou hnilobu, a to až do 5-12 m výšky kmene (Černý, 1989).

3.1.3 Hospodářský význam smrku ztepilého

Dřevo smrku ztepilého je lehké a pevné a je to strom velmi rychle rostoucí – rychlost růstu dosahuje až 0,6 m za rok. Z těchto důvodů je naší nejvýznamnější a nejhojněji pěstovanou hospodářskou dřevinou. Je využíván velmi univerzálně jako zdroj stavebního dříví, řeziva, celulózy, rovněž jako vánoční stromek a též v zahradnictví a krajinářství – existuje na 160 kultivarů tohoto druhu (Bitner, 2012). Kultivary smrku nacházejí uplatnění v parkových úpravách i v zahradách, např. kultivar *Argentea*, který má stříbrné či stříbrnošedé zbarvení jehlic, *Emsland* – sloupovitý habitus s tmavozelenými jehlicemi či *Procumbens* – poléhavý keř nepravidelného vzrůstu s hustými větvemi (Vreštiak, 1994). Dřevo smrku se

používá též jako palivo či rezonanční dřevo pro výrobu hudebních nástrojů. Historicky měl význam jako zdroj pryskyřice pro výrobu kalafuny, terpentýnu a bednářské smůly, a v lidovém léčitelství byl z jeho mladých výhonů připravován odvar s vysokým obsahem vitamínu C k léčbě kurdějí.

Vzhledem ke svému hospodářskému významu je smrk v současné době druhotně rozšířen i na mnoha nevhodných stanovištích, kde je ale náchylnější k podlehnutí škůdcům, jako je kůrovec a mniška (Maděra, 2001). Smrk je u nás pěstován v širokém rozpětí od lužních lesů až po osmý výškový stupeň, často ve stejnověkových monokulturách, které vždy znamenají vyšší stupeň ohrožení porostu, a to i ve výškovém optimu smrku, tj. v 5.-8. lesním vegetačním stupni (Slodičák, 2007). Klimatické podmínky ve smyslu nerovnoměrně rozložených srážek a kontinuálně rostoucích teplot přinesly v posledních letech výrazné ohrožení a rozklad smrkových porostů na území ČR kalamitních rozměrů. Z tohoto hlediska byl kritickým rok 2015, kdy průměrný roční úhrn srážek činil pouhých 79 % oproti normálu, pouhých 532 mm, a zároveň průměr ročních teplot dosáhl hodnoty 9,4 °C, což bylo 1,9 °C nad normálem (Hydrologická ročenka České republiky ..., 2016). Růst teplot je pak pozorován dlouhodobě, a na našem území se jedná průměrně zvýšení 0,24 °C/10 let. Následkem vyšších teplot je vyšší výpar, který i při zachování standardních srážkových úhrnů ohrožuje vegetaci nárůstem půdního vláhového deficitu (Český hydrometeorologický ústav, 2015). V roce 2020 bylo u nás celkově vytěženo 35,75 m³ surového dříví, z toho 95 % činila nahodilá těžba a 73 % přímo nahodilá těžba způsobená hmyzem, převážně podkorním hmyzem na smrku. Útokům podkorního hmyzu nedaří předcházet instalací feromonových lapačů a stromových lapáků. Změna klimatu přináší nejen expanzi podkorního hmyzu, ale větší působení bořivého větru, na nějž je smrk rovněž citlivý. V posledních letech je proto snaha o snížení zastoupení smrku v našich lesích, viz kapitola 3.1.2 (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020, 2021).

3.2 Anatomie a funkce floému

3.2.1 Charakteristika vybraných struktur rostlinných buněk a pletiv

Tento odstavec si neklade za cíl zevrubný popis funkčních struktur rostlinné buňky, popř. rostlinných pletiv. V rámci popisu anatomie a funkce floému, jeho plnění a vyprazdňování i přiblížení teorií toku látek floémem, však budou v této práci zmíněny některé buněčné struktury. Zde je přehled vybraných termínů a jejich definice:

Apoplast – prostory v rostlinném těle vně protoplastu, tj. mezi plazmalemou a buněčnou stěnou a mezibuněčné prostory (Lux, 2017).

Cytoplazma – veškerý obsah rostlinné buňky uvnitř plazmatické membrány s výjimkou jádra. Obsahuje soustavu membrán - tzv. endomembránový systém, buněčné organely (ribozomy, plastidy, mitochondrie, vakuoly), plazmatickou membránu (plazmalemu), cytoskelet a cytozol – kapalinu, která vytváří tekuté prostředí buňky.

Plazmalema – cytoplazmatická membrána ohraničující obsah buňky – cytoplazmu s organelami. Přiléhá z vnitřní strany k buněčné stěně. Je selektivně propustná pro různé látky, jimž umožňuje vstupovat do buňky či ji opouštět.

Plazmodezma – kanálek v buněčné stěně vystlaný plazmalemou, který propojuje sousední buňky a umožňuje transport malých molekul (do relativní molekulové hmotnosti 700-1000).

Protoplast – celý živý obsah buňky uvnitř buněčné stěny. Je tvořen cytoplazmou a jádrem. tj. jádro, buněčné organely a vnitřní buněčné membrány (Procházka, 1998).

Sítková políčka – propojení jednotlivých sítkových elementů prostřednictvím perforací buněčné stěny. Sítková políčka vznikají z plazmodezem na protilehlých koncích sítkových článků. Vzniklými póry prochází plazmalema. Velikost pórů umožňuje průchod molekul.

Symplast – protoplasty všech rostlinných buněk propojené plazmodezmami; kontinuální propojení celého rostlinného těla (Lux, 2017).

Vakuola – část vnitřního prostoru rostlinné buňky oddělená od svého okolí membránou (tonoplastem). Slouží jako zásobárna vody a variabilního širokého spektra látek (rezervních proteinů, pigmentů, alkaloidů. Podílí se též na buněčném trávení a izoluje a rozkládá odpadní látky. Membrána ohraničující vakuolu se nazývá tonoplast (Procházka, 1998).

3.2.2 Anatomie a funkce floému obecně

Cévní systémy rostlin se vyvinuly v souvislosti s přechodem rostlin z vodního prostředí na souš. V průběhu evoluce se rostlinné tělo diferenciovalo na jednotlivé orgány – kořeny, stonek, fotoasimilační aparát a další (De Schepper, 2013). Potřeba spojení mezi těmito specializovanými orgány vedla k rozvoji dvou vodivých systémů; floému a xylému. Xylém je síť mrtvých buněk, které vedou vodu a minerální látky od kořenů k listům (Knoblauch, 2012). Floém se dělí na vodivou a nevodivou část. Vodivá část je tvořena živými buňkami, vede a distribuuje asimiláty v těle rostliny. Nevodivá část je tvořena již staršími buňkami, u nichž došlo ke ztrátě vodivosti, tento floém si však nadále uchovává řadu důležitých funkcí. (R. Pace, 2020). Zprostředkováváním dopravy asimilátů do celého těla rostliny floém plní zásadní funkci v její výživě a růstu. Kromě toho je významná i jeho signální funkce – přeprava signálních molekul tělem rostliny, viz kapitola 3.3.1, a dále funkce obranná a zásobní, viz níže (Dinant, 2010). Floém vzniká činností laterálního meristému – kambia, které se rozprostírá po obvodu kmene, a dělí se dvěma směry; dostředivě za vzniku xylému a odstředivě za vzniku floému. Životnost floému je nízká – pouze jedno až dvě vegetační období, a každým rokem je proto produkována nová vrstva floému, zatímco stará odumírá (Amoroso, 2017). Rozlišujeme floém jarní a pozdní. Vývoj jarního floému je řízen převážně endogenně a jeho struktura je velmi stabilní, bez většího vlivu klimatických výkyvů. Skládá se z 3-5 vrstev buněk, z nichž 1-2 vrstvy jsou buňky přezimující z předchozí sezóny. Struktura pozdního floému je proměnlivější a vyvíjí se v šířce 2-12 buněčných vrstev (Gričar, 2021). Fakt, že počet buněk floému je oproti xylému daleko méně ovlivněn klimatickými faktory, dokládá jeho větší význam pro přežití stromu. Z klimatických faktorů je pak pozorován pozitivní vliv vyšších únorových teplot (Gričar, 2014). Amoroso (2017) uvádí, že oproti xylému se floém začíná u smrku ztepilého tvořit o 3-5 týdnů dříve. V nepříznivých podmínkách nebo při

snížené vitalitě stromu se pak nemusí vytvořit xylémový letokruh vůbec, novou vrstvu floému však strom produkuje vždy, neboť na ní závisí jeho přežití v nastávající sezóně (Amoroso, 2017).

Tkáně floému a xylému jsou v rostlině vedeny paralelně podél dělivé tkáně – kambia. Obě tkáně jsou vzájemně funkčně propojeny (Epron, 2019). Probíhá mezi nimi výměna vody a rozpuštěných látek - tzv. radiální transport. Mezi xylémem a floémem se takto mohou pohybovat ionty a molekuly vody, sacharidů, vápníku, hořčíku, dusíku, aminokyselin a dalších látek, přičemž některé látky se pohybují obousměrně (např. cukry, voda), jiné převážně ve směru z floému do xylému a další z xylému do floému (např. aminokyseliny) (Aubry, 2019). V listové žilnatině se nachází v jednom cévním svazku jedna céva xylému a pod ní jedna až dvě cévy floému (Procházka, 1998).

Základními složkami floému jsou sítkové elementy, průvodní buňky a buňky floémového parenchymu. Funkční sítkové elementy jsou tvořeny živými buňkami protáhlého tvaru. U krytosemenných jsou propojeny sítkovými políčky, (viz kapitola 3.2.3, kterými probíhá asimilační proudění. Komplex těchto podélně propojených sítkových elementů se nazývá sítkovice. U nahosemenných není struktura sítkových políček tak zřetelně vyvinuta (Procházka, 1998).

Sítkové buňky jarního floému jsou větší a jejich hlavní funkcí je vedení floémové šťávy. Sítkové buňky pozdního floému jsou užší a přítomnost axiálního parenchymu (viz níže) v pozdním floému naznačuje, že hlavní funkce pozdního floému je odlišná od jarního – tento floém je zodpovědný především za ukládání zásobních látek (Gričar, 2021). **Průvodní buňky** tvoří se sítkovými elementy úzce provázaný komplex (čs-pb komplex), jehož funkcí je nakládání a vykládání floému, dálkový transport asimilátů a dalších rozpuštěných látek a kontrola nad povahou látek vstupujících do a vystupujících z čs-pb komplexu (Oparka, 1999). V průběhu evoluce došlo ke specializaci sítkových elementů pro jejich vodivou funkci. Tato specializace obnáší programovanou destrukci některých buněčných organel; vyvinuté sítkové elementy postrádají například vakuolu, cytoskelet a ribozomy. Snižuje se také počet mitochondrií, přičemž zbývající mitochondrie jsou dilatované a otázka jejich funkčnosti teprve musí být zodpovězena. V sítkových elementech

ale zůstává plazmatická membrána a endoplazmatické retikulum. Rozpad jádra se liší u krytosemenných a nahosemenných a zmiňují ho v kapitole 3.2.3. Vzhledem ke značnému přizpůsobení sítkových elementů jejich vodivé funkci a související ztrátě organel je jednou z důležitých funkcí průvodních buněk je produkce potřebných buněčných metabolitů (například většiny, ne-li všech proteinů) a jejich přísun do sítkových buněk (Van Bel, 2000). Rozlišujeme tři druhy průvodních buněk: řádné, transferové a intermediální. Řádné doprovodné buňky se účastní apoplastického plnění floému. Mají hustou cytoplazmu a jen velmi málo plazmodezmat, protože symplastické spojení s okolím by narušovalo apoplastický průběh plnění floému (běžné doprovodné buňky musí být vůči svému okolí „utěsněné“). Doprovodné buňky transferové rovněž mají jen málo plazmodezmat a podílejí se na apoplastickém plnění floému. Naproti tomu buňky intermediální (zprostředkující) disponují hustou a rozvětvenou sítí plazmodezmat. Mohou mít hustou cytoplazmu, obsahují velké množství drobných vakuol a jsou větší než jiné typy doprovodných buněk. Floém je jimi plněn symplasticky (Slewinski, 2013).

Floémový parenchym rozdělujeme na axiální a paprskový. Jednou z jeho funkcí je funkce zásobní – uchovává vodu i asimiláty (Gričar, 2015). Paprskový parenchym zprostředkovává komunikaci mezi floémem a xylémem – vzájemnou výměnu vody i asimilátů (Jyske, 2015). Velmi významné obranné funkci axiálního parenchymu je v této práci věnována samostatná podkapitola.

3.2.3 Specifika floému krytosemenných a nahosemenných rostlin

Vývojově mladší krytosemenné rostliny mají oproti nahosemenným vyvinutější, specializovanější typ buněk vodivých pletiv umožňující efektivnější tok asimilátů. Sítkové elementy krytosemenných rostlin se nazývají sítkové články a jsou podélně propojeny perforovanými sítkovými políčky. Sítkové elementy nahosemenných se nazývají sítkové buňky. Místa jejich propojení – sítkové plošky, mají oproti krytosemenným menší perforaci. Sítkové plošky jsou umístěny na laterálních stěnách a sešikmených koncích stěn sítkových buněk (Procházka, 1998). Primitivnější stavbu vodivých elementů nahosemenných dokládá i fakt, že zatímco sítková políčka sítkových článků krytosemenných jsou propojena širšími a hojnějšími plazmodezmami, které se svým zvětšeným průměrem liší od plazmodezem zajišťujících laterální spojení mezi sousedícími buňkami, sítkové

buňky nahosemenných mají plazmodezmy velikostně nerozlišené. I ty se však mohou v koncových částech vyskytovat hojněji než v bočních částech buňky. Výživa sítkových článků u krytosemenných je zajištěna specializovanými parenchymatickými buňkami – tzv. průvodními buňkami. U nahosemenných tyto buňky nazýváme Strasburgerovy (popř. albuminové) buňky. Zatímco průvodní buňky vznikají dělením jedné a též mateřské buňky, u nahosemenných toto pravidlem není. Funkce Strasburgerových buněk je však obdobou buněk průvodních. Rozdíly mezi těmito taxonomickými skupinami najdeme též v uspořádání axiálního parenchymu; u nahosemenných je uspořádán v soustředných, střídajících se vrstvách, u krytosemenných se uspořádání těchto buněk objevuje v mnoha variacích – např. v pásech, centricky po obvodu sítkových článků nebo rozptýleně (R. Pace, 2020).

Sítkové články krytosemenných zcela postrádají jádro, zatímco sítkové buňky nahosemenných zbytky jádra obsahují (Van Bel, 2000). Liesche (2015) uvádí zásadní rozdíly v anatomii floému krytosemenných a nahosemenných dřevin, které mají vliv i na jejich funkci. Sítkové elementy nahosemenných jsou oproti krytosemenným delší a tenčí. Dále, zatímco axiální propojení sítkových elementů u krytosemenných je tvořeno široce otevřenými plazmodezmami sítkové desky, u nahosemenných jsou plazmodezmy užší. Rozdílná anatomie je příčinou vyššího hydraulického odporu v nahosemenných, což způsobuje výrazně pomalejší pohyb floémové šťávy. Zatímco ve vzorku 20 krytosemenných stromů byla naměřena průměrná rychlost pohybu šťávy 56,3 cm/hod, u 26 nahosemenných to bylo 21,9 cm/hod (konkrétně u *Picea abies* byla naměřena rychlost 18,3 cm/hod) (Liesche, 2015). Sítkové elementy nahosemenných se také liší tvarem průřezu; u krytosemenných rostlin je kruhový, u nahosemenných obdélníkový. Nahosemenné mají nižší efektivní poloměr sítkových elementů, v důsledku čehož je jejich vodivost oproti krytosemenným rovněž nižší (JENSEN, 2012).

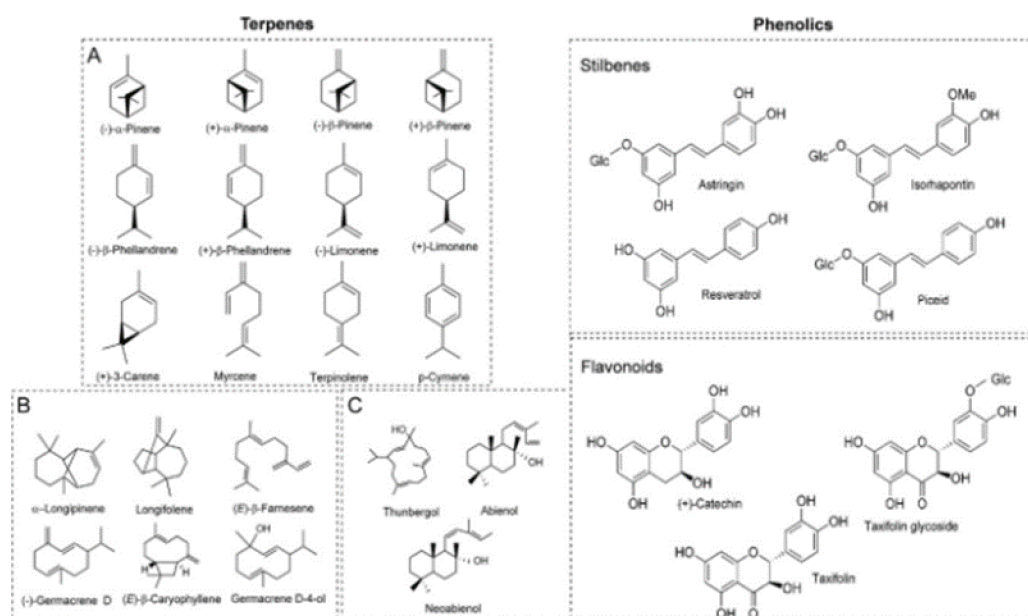
3.2.4 Role floému v obranných reakcích smrku ztepilého

V souvislosti s globální klimatickou změnou, významnými epizodami sucha a rozvojem kůrovcových kalamit, které vedou až k rozpadu smrkových porostů, nabývá na významu porozumění obranným reakcím jehličnanů vůči napadení biotickými činiteli, zejména kůrovcem. Obranné reakce představují širokou škálu

mechanismů rozložených v čase i prostoru a majících různý charakter. Rozlišujeme obranu konstitutivní, kterou můžeme charakterizovat jako trvalou připravenost stromu bránit se napadení, a dále obranu indukovanou, která se rozvíjí jako reakce na napadení stromu, jeho poranění a vstup patogenu do jeho pletiv. Dále můžeme rozlišit obranu mechanickou (např. fyzikální vlastnosti kůry, kamenné buňky, krystaly šťavelanu vápenatého) a chemickou (sekundárními metabolity) (Franceschi, 2005). Floém smrku ztepilého se skládá ze sítkových buněk, albuminových buněk, paprskového parenchymu s pryskyřičnými kanálky, axiálního floémového parenchymu a místy se vyskytujícími bloky silnostěnných kamenných buněk (Franceschi, 1998). Floém vytváří některými z těchto struktur mnohačetnou obranu charakteru konstitutivního i indukovaného, mechanického i chemického.

Pryskyřičné kanálky mají význam v konstitutivní i indukované, v mechanické i chemické obranné reakci. Kromě kanálků, které se ve floému nacházejí vždy v radiální formě, jsou tvořeny paprskovým parenchymem, který je obklopuje. Některé z nich zabíhají až do bělového dřeva. V reakci na napadení se ve floému některých jehličnanů začínají tvořit i axiální traumatické pryskyřičné kanálky, u rodu *Pinaceae* ovšem tyto vznikají pouze v xylému. Pro chemickou obranu prostřednictvím pryskyřice je podstatný obsah terpenů – převážně monoterpenů (C_{10}) a diterpenů (C_{20}), a dále seskviterpenů. Jejich uvolněním dojde k vypláchnutí rány, mají odpuzující účinek a kůrovce mohou též fyzicky zachytit a zneškodnit. Paradoxně však tento mechanismus obranné reakce založený na vylučování pryskyřice, který je pro *Pinaceae* typický, využívá kůrovec ve svůj prospěch; sloučeniny obsažené v pryskyřici mu slouží jako prekurzor pro syntézu agregačních feromonů, které mu umožňují vést na napadený strom masivní útok, což je pro úspěšnou strategii útoku klíčové (Schaller, 2008) Ve floému jednotlivě či ve shlucích rozptýlené kamenné buňky, které vznikají ze stárnoucích buněk axiálního parenchymu, poskytují částečnou mechanickou bariéru proti pronikání biotických škůdců. Zcela zásadní roli v obraně konstitutivní i indukované hrají buňky axiálního parenchymu (pro svůj vakuolární obsah jsou též nazývány **polyfenolickým parenchymem – dále PP buňky**). Tyto buňky syntetizují a ve svých vakuolách ukládají fenolické sloučeniny, které mají antifungální a hmyz

odpuzející účinky a snižují schopnost hmyzu strávit rostlinné pletivo. PP buňky uchovávají tyto sloučeniny stabilně, což tvoří konstitutivní složku jejich obrany. Zároveň však reagují na napadení syntézou dalších fenolických sloučenin, které se typově mohou lišit od těch konstitutivně produkovaných a vykazují větší toxicitu pro invazivní organismy, a v tomto případě již jde o obranu indukovanou (Franceschi, 2005). Prekurzorem pro syntézu většiny sekundárních fenolických sloučenin je fenylalanin, důležitými enzymy pro syntézu fenolů jsou například chalkon a stilben syntázy. Přesná povaha fenolických sloučenin v PP buňkách zatím není známa, do současnosti se podařilo identifikovat pouze jednodušší z nich – stilbeny a flavonoidy (Vega, 2015). Přítomnost fenolických látek ve vakuole se projevuje žlutou fluorescencí při nasvícení modrým světlem a rovněž je potvrzuje přítomnost stěžejního enzymu podílejícího se na syntéze fenolů – fenylalaninu amonné lyázy. Charakter vakuolárního obsahu se mění v závislosti na ročním období; v průběhu jara a léta klesá jeho hustota, uprostřed léta dosahuje světlého zabarvení a homogenního vzhledu, na podzim probíhá jeho zahušťování a v době vegetačního klidu je hustě zbarvený a zrnitý. Jeho charakter se rovněž mění v reakci na útok (Schaller, 2008).



Obrázek č. 1 – Schéma chemické stavby sloučenin podílejících se na obranných reakcích smrku ztepilého. A) C_{10} monoterpeny, B) C_{15} seskviterpeny C) C_{20} diterpeny. Pravá část obrázku: stilbeny, flavonoidy (Vega, 2015).

Podle vakuolárního obsahu bylo rozlišeno několik typů PP buněk. Na základě jejich četnosti, rozmístění a typu lze predikovat, zda strom bude k napadení invazivním organismem vnímavý, či zda projeví větší rezistenci (která je ovšem vždy limitována silou útoku). Odolnější zkoumané klony měly ve vakuolách PP buněk fenolické sloučeniny odlišného vzhledu, který zřejmě indikuje nižší molekulovou hmotnost (nebo slabší polymerizaci) oproti obsahu vakuol vnímavějších klonů. Rozdíl v četnosti PP buněk byl následující: u vnímavých klonů byly PP buňky uspořádány vždy v jedné řadě vždy po devíti řadách sítkových buněk. U klonů odolných byly PP uspořádány ve dvou řadách, a k tomu ještě jednotlivě rozptýleny mezi sítkovými elementy. Vyjádřeno počtem PP buněk na plochu floému, rezistentní klony měly průměrně 210 PP buněk/ mm² floému a citlivé klony 150 PP buněk/ mm² floému. V reakci na zranění dochází ve floému k dělení paprskových buněk, což je zřejmě prvním krokem tvorby traumatických pryskyřičných kanálků. Dále dochází ke čtyřnásobnému zvětšení PP buněk a změně polyfenolického obsahu jejich vakuol. Tyto reakce jsou signifikantně výraznější u rezistentních klonů. V některých vakuolách PP buněk se vyskytují též krystaly šťavelanu vápenatého, který tvoří další složku konstitutivní mechanické obrany stromu (Franceschi, 1998). PP buňky se dále podílejí na tvorbě peridermu kolem napadené oblasti, což je dlouhodobá obranná reakce, pomocí níž strom danou oblast izoluje a opravuje poškozená pletiva (Franceschi, 2005). Zajišťují též přenos signálů, které aktivují obrannou reakci, mezi PP buňkami a paprskovými buňkami. Obsahují zásobní látky; škrobová zrna a lipidy, jejichž funkcí není jen tvoření energetických rezerv, ale též jsou využívány při syntéze chemických sloučenin v rámci indukované obrany. Díky této pestré škále obranných mechanismů jsou PP buňky považovány za hlavní místo konstitutivní i indukované obrany (Schaller, 2008). Je pozoruhodné, že míra schopnosti indukované obrany hraje roli ve volbě kůrovce, zda daný strom hromadně napadne. Jinými slovy, kůrvec je schopen odolnost stromu rozpoznat, a to dokonce dříve, než se indukovaná obranná reakce stromu na napadení může plně rozvinout (Schiebe, 2012). Zatímco například v změny v genové transkripci probíhají v řádu minut až hodin po útoku, trvá vytvoření funkčních traumatických pryskyřičných kanálků a peridermu rány několik týdnů (Vega, 2015). Při napadení je strom nejprve kolonizován jedním či několika jedinci,

kteří prostřednictvím agregačních feromonů přilákají stovky až tisíce brouků během několika hodin či dnů, přičemž síla útoku je pro jeho úspěšnost stěžejní. V případě některých jedinců *Picea abies* však bylo pozorováno, že část z těchto průkopníků útoku bylo utopeno v pryskyřici a zbytek strom po několika dnech opustilo, aktivita brouků tedy nepřešla do přivolání dalších jedinců jejich druhu, ale od pokračování útoku bylo upuštěno. Tyto rezistentní stromy se vyznačovaly signifikantně silnější indukovanou reakcí na poranění (která se ovšem plně rozvinula až v řádu týdnů). Konkrétně u nich oproti jedincům, kteří byli vystaveni a podlehlí hromadnému útoku kůrovce, byly v rámci indukované obrany zaznamenány zejména vyšší hladiny monoterpenů, diterpenů, seskviterpenů a 4 z 20 sledovaných fenolických sloučenin (myricetin, estragol, laricitrin a neznámý derivát koniferylalkoholu), a dále četnější tvorba traumatických pryskyřičných kanálků o větší velikosti. Mechanismus, jímž kůrovec rozpozná a volí strom se slabší indukovanou obranou a zanechává útoku na jedince s obranou silnou, však nebyl doposud prokázán (Schiebe, 2012).

3.3 Asimilační tok

3.3.1 Složení floémové šťávy

Floémová šťáva je tvořena širokým spektrem organických a anorganických látek. Převážná většina těchto látek se vyskytuje v obdobných koncentracích i v okolních buňkách (Oparka, 1999). Floémová šťáva má mírně zásaditý charakter pohybující se v hodnotách 7,3 – 8,5 pH. Nejhojněji zastoupenými látkami jsou sacharidy, aminokyseliny a ionty draslíku. Tyto tři látky jsou zároveň osmoticky aktivní a hrají tak důležitou roli v osmoticky podmíněném transportu látek floémem na dlouhé vzdálenosti, viz kapitola 3.3.2. Z cukrů se ve floémové šťávě nachází hlavně sacharóza, oligosacharidy (rafinóza, stachyóza, verbaskóza, ajugóza) a polyalkoholy (manitol, sorbitol). Oligosacharidy se vyskytují u rostlinných druhů, které plní floém aktivně symplasticky, polyalkoholy u těch, které mají plnění apoplastické či pasivně symplastické, viz kapitola 3.3.2. Dusík je floémem transportován převážně ve formě aminokyselin, případně i dusičnanů. Aminokyseliny jsou zastoupeny v široké škále a různých poměrech v závislosti na druhu rostliny. Z dalších organických sloučenin lze zmínit přítomnost polyaminů a organických kyselin (např. kyselina jablečná, jantarová, citrónová).

Z anorganických iontů je zastoupen v první řadě draslík, který hraje roli ve vzniku osmotického tlaku, podílí se tedy funkčně na toku šťávy floémem. Přítomný fosfát, bikarbonát, malát a další anionty se podílejí na regulaci pH floémové šťávy. Dále se vyskytuje například fosfor, hořčík, sodík, stopové prvky (železo, měď, mangan, zinek, bór, molybden), vitamíny (thiamin, kyselina askorbová). Volné ionty vápníku se podílejí na signalizační funkci floému a jejich obsah ve šťávě významně stoupá jako reakce na poranění rostliny. Šťáva dále obsahuje pestrou škálu sekundárních metabolitů, jejichž druh a obsah se liší v závislosti na druhu rostliny. Jsou přítomny též fytohormony, např. auxin, cytokininy, gibbereliny, kyselina abcisová a další. Šťáva obsahuje škálu proteinů, z nichž některé se podílejí na dálkové signalizaci, další (enzymy) mají význam pro antioxidační obranné reakce a redoxní regulaci. Funkcí P-proteinů je pak zabránit úniku floémové šťávy s cennými asimiláty při poranění tím, že okamžitě a vratně zablokují sítkové elementy (Dinant, 2010). Floémová šťáva přenáší též tři druhy RNA; virové RNA, endogenní buněčné mRNA a malé nekódující RNA. Prostřednictvím virových RNA se v případě napadení rostliny virem patogeny šíří celým tělem rostliny. Endogenní buněčné mRNA pravděpodobně slouží jako signální molekuly na dlouhé vzdálenosti, které ovlivňují buněčné dělení v cílových tkáních, a tím i vývoj rostliny. Malé nekódující RNA jsou zřejmě rovněž signálními molekulami, způsobující umlčování genů, což je forma obranných reakcí např. proti množení virů v těle rostliny (Kehr, 2007).

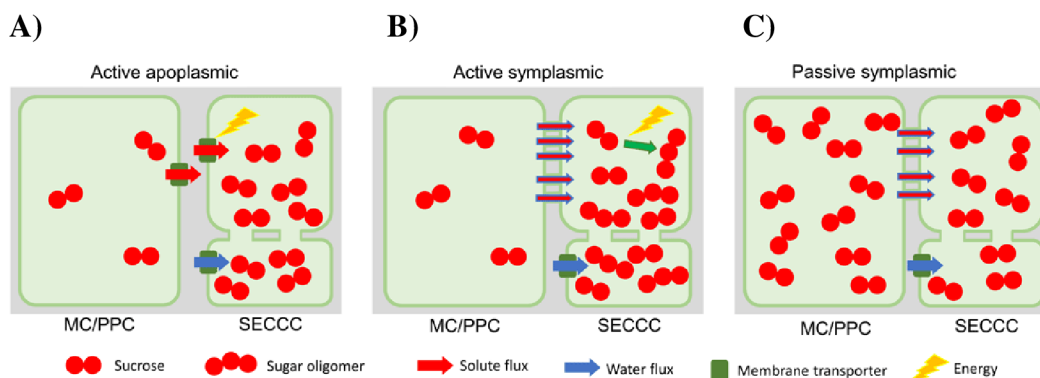
Obsah jednotlivých organických a anorganických látek obsažených ve floémové šťávě je dynamický a mění se v závislosti na mnoha faktorech: teplota, perioda den-noc, ontologické stadium rostliny, dostupnost dusíku a vody, poranění rostlin, napadení rostliny patogenními činiteli (Dinant, 2010).

3.3.2 Pohyb látek floémem

Floémová šťáva se pohybuje z míst **zdrojů**, kterými jsou plně rozvinuté, fotosyntetizující listy, k **sinkům**; heterotrofním orgánům rostliny, kam floém dodává živiny pro využívané pro růst, dýchání či skladování, a také signální molekuly, které řídí vývoj rostliny (Liesche, 2017). Ne všechny sinky jsou přitom zásobeny stejným zdrojem – šťáva se pohybuje v rostlinném těle po drahách zvaných ortostichy, které propojují zdrojové orgány (listy) umístěné na stonku ve

svislých řadách nad sebou. Projevem toku šťávy v ortostichách je například pozorování šíření virové infekce v těle rostliny, kdy kolonizace probíhá od místa vstupu infekce právě podél dané ortostichy (Dinant, 2010). Mechanismus pohybu látek floémem můžeme rozdělit na tři základní fáze: plnění floému (loading), transport a vyprazdňování floému (unloading) (Liesche, 2017). Kromě plnění v místě zdroje a vyprazdňování s místě sinku je floém vyprazdňován, a dokonce i plněn i podél celé své délky. Toto průběžné vyprazdňování floému slouží k růstu kmene. Opětovné plnění pak zřejmě hraje roli v udržování potřebného tlaku ve floému (Epron, 2019).

K **plnění floému** dochází v místě zdroje, tedy tam, kde se nacházejí volné, lokálně nespoteřované asimiláty. Jsou rozlišovány tři typy plnění floému: apoplastické, pasivní symplastické a aktivní symplastické (polymerová pasta). Apoplastický typ plnění je aktivním procesem, který probíhá přes plazmatickou membránu prostřednictvím transportérů sacharózy s využitím protonové pumpy. Na tomto typu plnění se podílejí doprovodné buňky řádné a transferové a typický je nízký výskyt plazmodezem – doprovodné buňky jsou symplasticky téměř izolovány od sousedních, aby nedocházelo ke ztrátám sacharózy do okolí (Slewinski, 2013).



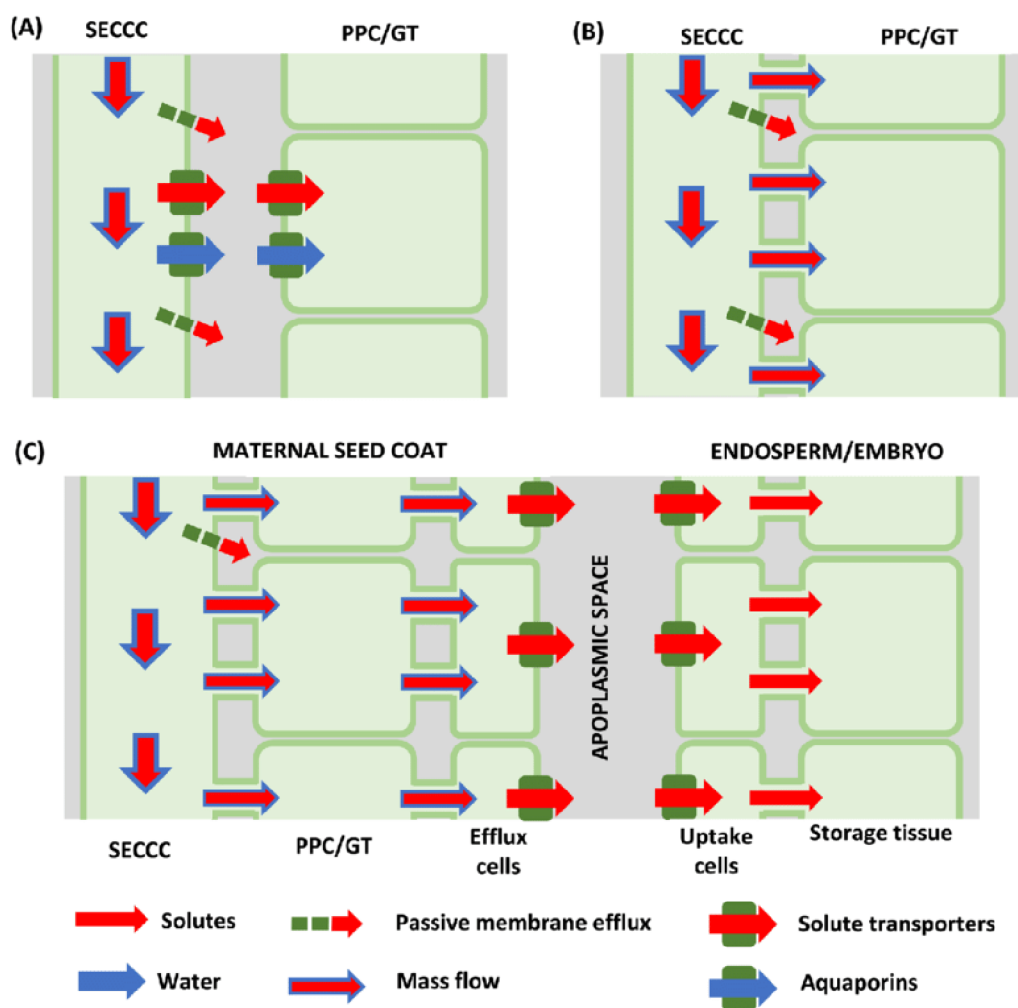
Obrázek č. 2 – Schematické znázornění třech typů plnění floému. A) Aktivní apoplastický – molekuly sacharózy asimilované v buňkách mezofylu (MC) difundují do buněk floémového parenchymu (PPC) a odtud jsou transportéry sacharózy v plazmatické membráně přenášeny do doprovodných buněk (SECCC), komplex čs-pb je symplasticky izolován. B) Polymerová pasta – molekuly sacharózy vstupují z buňky floémového parenchymu do intermediální doprovodné buňky četnými plazmodezmami. V doprovodné buňce probíhá za spotřeby energie syntéza složitějších sacharidů, které vzhledem ke své velikosti nemohou plazmodezmami projít zpět do parenchymatické buňky, hromadí se v doprovodné buňce a vstupují do sítkových elementů. C) Pasivní symplastické plnění – parenchymatické buňky obsahují velké množství molekul sacharózy, která vstupuje do komplexu čs-pb četnými plazmodezmami mechanismem koncentračního spádu bez spotřeby energie (Liesche, 2017).

Další typ plnění; zachycování polymerů neboli polymerová past, využívá tzv. intermediální doprovodné buňky. Do nich difunduje přes plazmodezmy molekula sacharózy a zde dochází k syntéze na větší molekuly rafinózy nebo stachyózy. Tyto molekuly jsou větší než sacharóza a velikost plazmodezem ve směru zdroje jim neumožňuje návrat do listového mezofylu, dochází k hromadění těchto molekul v komplexu čs-pb, odkud jsou floémem transportovány na dlouhé vzdálenosti. Tento typ plnění je aktivní; energie je spotřebovávána na syntézu složitějších molekul ze sacharózy. Třetí typ, pasivní symplastické plnění, je typické pro dřeviny včetně vysokých stromů. Tento typ plnění předpokládá udržování vysokých koncentrací sacharózy v mezofylu asimilačních orgánů. Sacharóza pak vstupuje difuzí do čs-pb komplexu četnými plazmodezmami bez využití metabolické energie, hnací silou je zde rozdíl koncentrací rozpuštěných látek. Kromě sacharózy jde často i o cukerné alkoholy. Mechanismus pasivního plnění floému je vývojově starší a primitivnější (De Schepper, 2013).

Všeobecně přijímanou teorií o **transport látek floémem na dlouhé vzdálenosti** je Münchova teorie tlakového toku z roku 1930. Princip pohybu látek spočívá v rozdílu tlaků ve floému v oblasti zdroje a v oblasti sinku. U zdroje, kde je floém plněn, vzniká tímto plněním vyšší osmotický potenciál, a proto je do floému v této oblasti nasávána voda z blízkých xylémových tkání. Tím roste v daném místě tlak, který posouvá šťávu floémem do míst s menším tlakem. Místa s menším tlakem jsou oblasti sinků, kde je floém vyprazdňován a osmotický potenciál a následně i tlak zde klesá, protože přebytečná voda se zde navrácí do xylému. Dosavadní výzkumy podporují Münchovu teorii, zůstávají však některé otázky či nesrovnalosti, na něž reagují hypotézy doplňující tuto základní teorii (Knoblauch, 2016). Matematické modely tlakového toku látek ukázaly, že Münchova teorie uspokojivě vysvětluje tok látek v bylinách. Problémem je však transport ve dřevinách, kde transport probíhá na daleko větší vzdálenosti, a tudíž také potřebný tlak v potrubním systému by měl být vyšší. Ve skutečnosti je to právě naopak; tlak vyvíjený ve vysokých stromech je nižší než v bylinách a není dostatečný, aby překonal odpor floému v sítkových elementech. Na tento rozpor reaguje tzv. teorie relé. Ta předpokládá ve floému existenci menších funkčních jednotek (relé), mezi nimiž jsou rozpuštěné látky aktivně transportovány. Tato teorie není jednoznačně

přijímána a bude třeba ověřit její platnost. Další teorií je koncept floému jako vysokotlaké trubice, kde tlak je rovnoměrně rozložen po celé délce floému a neslouží primárně k posunu floémové šťávy, ale má spíše funkci ochrannou (rychlé utěsnění floému buněčnými úlomkami v případě poranění). Podle této teorie je koncentrace rozpuštěných látek udržována v jednotné hladině v celé délce floému. Roli zde hraje tlakový rozdíl mezi floémem a okolními tkáněmi, do nichž jsou látky rovnoměrně uvolňovány proto, že tlak v nich je nižší. Jakmile jsou rozpuštěné látky z floému odváděny, ať už kdekoli, jejich koncentrace ve floému klesá, a to je signálem pro další plnění floému v místech zdrojů (Turgeon, 2010). Jiným pokusem vysvětlit pohyb látek floémem při nízkém tlaku ve vysokých dřevinách je „kanálový model“ (*Canal Transport Model*). Ten předpokládá, že přes sítkové elementy neprochází veškerá floémová šťáva, ale pouze látky v ní rozpuštěné s minimem tohoto rozpouštědla. Tento princip snižuje požadavky na výši tlaku ve floému, protože objem přepravovaných látek je daleko nižší. Uvnitř sítkového elementu se pak látky pohybují prostřednictvím recirkulačního toku z jednoho konce na druhý. Tento model umožňuje teoreticky tok látek při tlaku, který víceméně neroste se vzdáleností transportu (Johnson, 2013).

K **vyprazdňování floému** dochází v místech sinku, a to třemi způsoby – apoplasticky, symplasticky nebo převážně symplasticky s apoplastickým krokem. Tyto tři způsoby se v rostlinách nacházejí současně a jejich výskyt se odvíjí od toho, do jakého orgánu je floém vyprazdňován; například přechod látek do meristémů je symplastický, v kořenech apoplastický a u vyvíjejících se semen symplastický s apoplastickým krokem. Apoplastickým vyprazdňováním opouští floém přibližně 60-70 % asimilátů (Milne, 2018). Ty mohou procházet plazmatickou membránou třemi různými mechanismy; pasivní difuzí, zprostředkovanou difuzí nebo aktivně za spotřeby energie. Symplastické vyprazdňování probíhá zejména hromadným tokem (Liesche, 2017).



Obrázek č. 3 – Typy vyprazdňování floému. A) Apoplastický – asimiláty opouštějí komplex *čs-pb* (SECCC) sacharózovými transportéry umístěnými v plazmatické membráně, komplex *čs-pb* je symplasticky izolován. B) Symplastický – k vyprazdňování floému dochází hromadným tokem přes četné plazmodezmy. C) Symplastický s apoplastickým krokem – molekuly sacharózy vstupují hromadným tokem symplasticky do buněk floémového parenchymu. Odtud jsou přenášeny prostřednictvím transportérů sacharózy do apoplazmy semen a následně z apoplazmy do endospermu či embrya opět prostřednictvím transportérů (Liesche, 2017).

4 Metodika

4.1 Metodika odběru vzorků lýka

Vzorky byly získány na experimentálním pracovišti projektu Extemit v Kostelci nad Černými lesy v blízkosti obce Skalice. Zájmový porost s dominantním zastoupením smrku ve věku 90 let s příměsí DB, BK a MD se nachází ve třetím, tedy dubobukovém LVS. Vzorky lýka byly odebrány ze smrků z osmi sekcí v relativních vzdálenostech pokrývajících rovnoměrně podélnou osu kmene. Každý odebraný výřez byl oměřen ze třech stran, protože tloušťka lýka byla velmi proměnlivá po obvodu. Výřezy pocházely pouze ze západní strany kmene, a kromě průměru kmene byla měřena i vzdálenost od paty kmene. Celkem bylo oměřeno 10 stromů a z každého bylo odebráno 8 sekcí. Sekce 8 ale byla ze statistického hodnocení odstraněna z důvodu nulového rozptylu a průměru hodnot 0.

Přehled umístění sekcí na kmenech stromů:

Sekce 1.	2 metry výšky stromu
Sekce 5.	pod první zelenou větví
Sekce 3.	uprostřed mezi sekcemi I. a V.
Sekce 2.	uprostřed mezi sekcemi I. a III.
Sekce 4.	uprostřed mezi sekcemi III. a V.
Sekce 6.	nad prvním přeslenem se zelenými větvemi
Sekce 7.	uprostřed mezi sekcí V. a vrcholem
Sekce 8.	uprostřed mezi sekcí V. a VII.

4.2 Metodika přípravy mikroskopických preparátů

Mikroskopické pořizování snímků bylo zahájeno přípravou preparátů. Odebrané, skalpelem nařezané vzorky byly zality pryskyřicí, která vznikla smícháním třech ingrediencí; a) Benzyldimethylaminu (BDMA) – jde o čirou, světle žlutou kapalinu s aminových zápachem, používanou jako iniciátor při výrobě epoxidových pryskyřic b) pryskyřicí a c) vytvrzovačem pryskyřice (resin hardener). Vzorky byly vloženy do silikonové formy a ponechány ke ztuhnutí v troubě při 60 °C po dobu 24 hodin. Následně byly vzorky vloženy do mikrotomu. Pryskyřice se ovšem lámala, a navíc tím vzorek lýka výrazně změnil tvar. Vzorky zamražené v dusíku

při -180°C rovněž nebylo možné řezat na mikrotomu, neboť pletivo se změnilo na výrazně pružnější materiál a před nožem uhýbalo. Řešením bylo naložení do fixačního roztoku (90% etanolu, 5%formaldehydu a 5% kyseliny octové) a pořízení tenkých vzorků pod zvětšovací sklem s využitím jednostranné žiletky pro mikroskopii. Obrazy byly pořízeny na mikroskopu Leica DVM6 (Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), měření objektů bylo umožněno modulem v rámci softwaru určeného k ovládání mikroskopu.

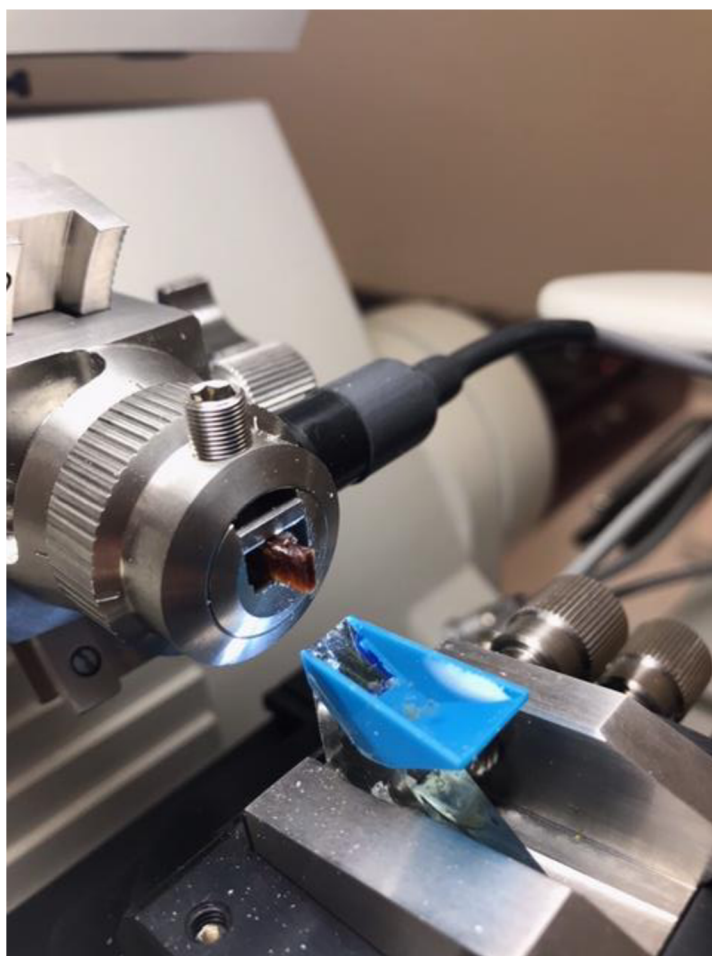
Digitální mikroskop Leica DMV8 byl pro pořízení snímků zvolen z několika důvodů. Oproti běžnému optickému mikroskopu digitální mikroskop nemá okulár, ale přenáší mezilehlý obraz, vznikající v ohnisku objektivu, digitální kamerou na monitor v reálném čase. Zobrazení na monitoru umožňuje měření elementů preparátu a ukládání získaných dat přímo v počítači, což usnadňuje dokumentaci výsledků. Nabízí možnost vyššího rozlišení a pořizované snímky dosahují vyšší kvality. Součástí mikroskopu je integrované prstencové a koaxiální světlo, které umožňuje osvětlení v ose objektivu.



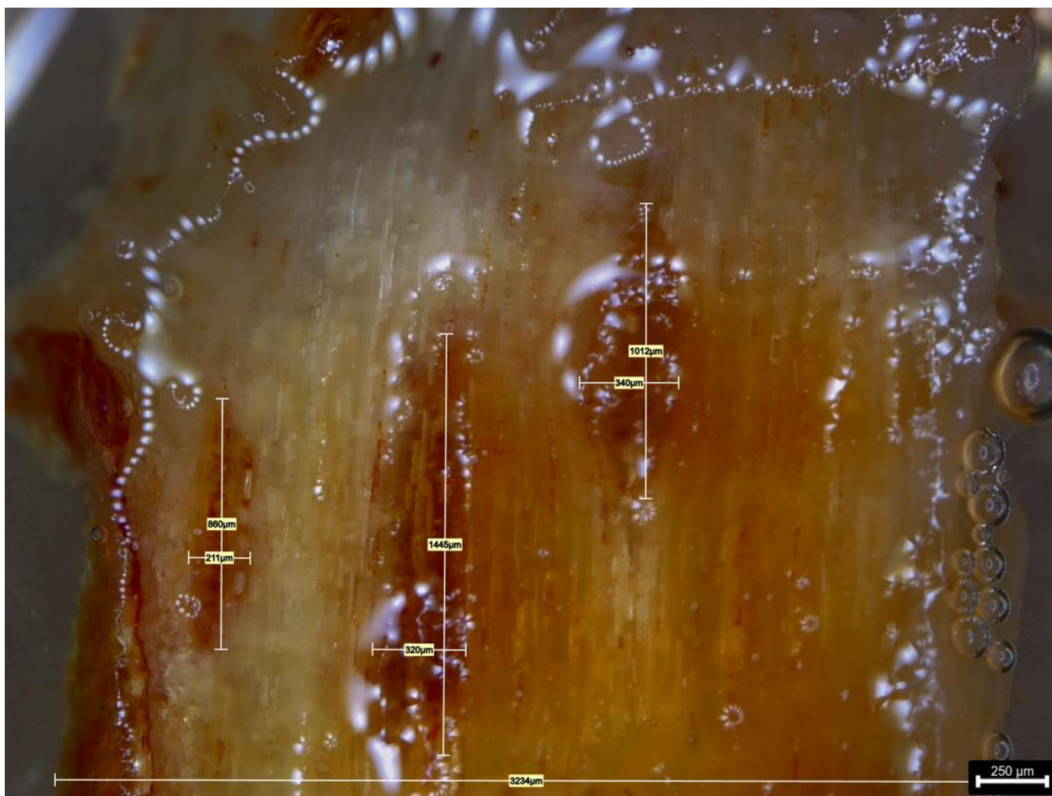
Obrázek č. 4 – Set pro přípravu pryskyřice k zalití vzorku.



Obrázek č. 5 – Silikonová forma



Obrázek č. 6 - Mikrotom



Obrázek č. 7 – Fotografie floému pořízená digitálním mikroskopem Leica s prvky lýka měřenými přímo v rámci mikroskopování

4.3 Statistické zhodnocení

V rámci statistického hodnocení (Statistica, TIBCO Software Inc.) tloušťky lýka ve vertikálním profilu kmene byla využita jedna regresní analýza, jejímž cílem bylo prokázat vztah mezi sekci kmene a tloušťkou lýka.

Kromě multivariantní regrese byly využity GLM modely, prostřednictvím kterých měly být zohledněny další faktory, které tloušťku lýka ovlivňují (např. vzdálenost od paty kmene).

Dále byly hodnoceny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sekcemi ve vertikálním profilu kmene s využitím jednofaktorové ANOVY.

5 Výsledky

5.1 Analýza vztahu mezi tloušťkou lýka a vysvětlujícími proměnnými

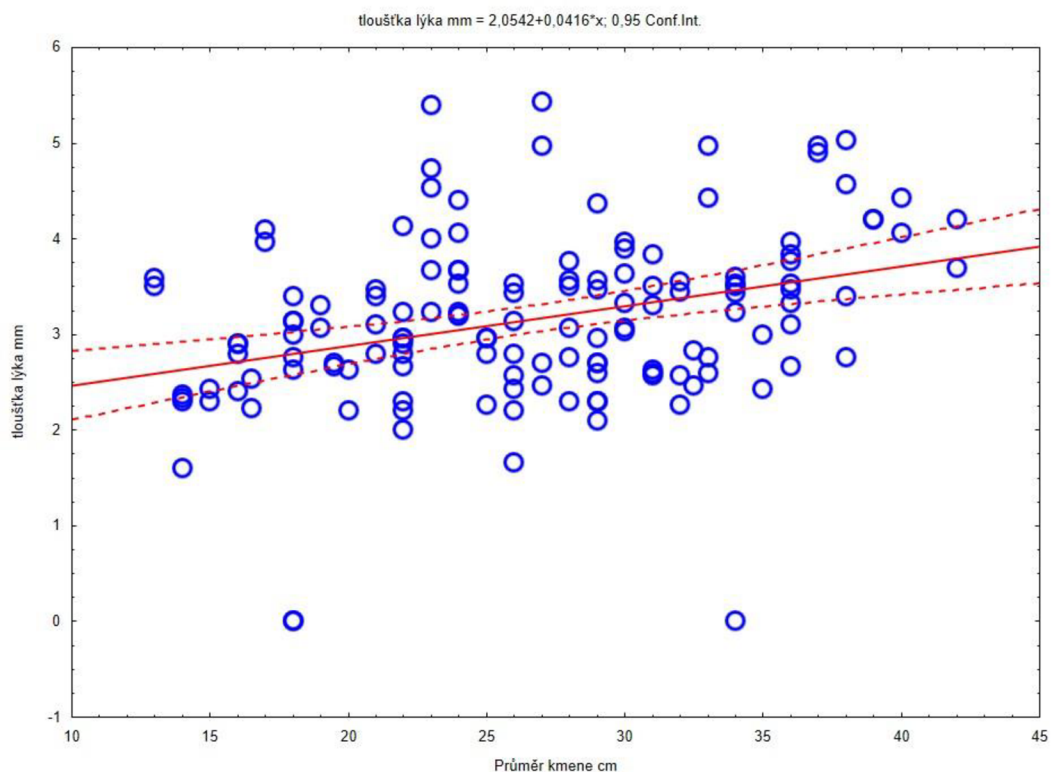
V rámci praktické části práce byla měřena tloušťka lýka deseti vybraných stromů v sedmi (resp. osmi, ale osmá sekce byla následně vyřazena) různých relativně stanovených výškových sekcích kmene a analyzována závislost tloušťky lýka na několika vysvětlujících proměnných; průměru kmene, relativně stanovené sekci, vzdálenosti odběrového místa od paty stromu a interakcí mezi těmito dvěma proměnnými. Analýza pracovala s velikostí výběru 140 naměřených hodnot.

Regresní analýza vztahu mezi průměrem kmene a tloušťkou lýka prokázala, že průměr kmene měřený od paty kmene hraje významnou roli v odhadu tloušťky lýka, ale adjustovaný koeficient determinance není příliš vysoký; $R^2 = 0,103$, použitý model tedy vysvětluje 10 % variability tloušťky lýka.

```
Multiple Regression Results
Dependent: tloušťka lýka      Multiple R = ,33146971      F = 17,03391
                               R2 = ,10987217      df = 1,138
No. of cases: 140             adjusted R2 = ,10342197      p = ,000063
                               Standard error of estimate: ,851769780
Intercept: 2,054246750      Std. Error: ,2781167      t( 138) = 7,3863      p = ,0000
Průměr kmene b* = ,331
(significant b* are highlighted in red)
```

Obrázek č. 8 – Výstup regresní analýzy vztahu průměru kmene a tloušťky lýka

Závislost tloušťky lýka na průměru kmene znázorňuje graf č. 1. Můžeme konstatovat statisticky významný vztah přímé úměry, kdy s růstem tloušťky kmene o 1 cm roste tloušťka lýka průměrně o 0,331 mm (regresní koeficient udávající sklon křivky), přičemž intercept je roven 2,05 mm a tato křivka závislosti vysvětlující spojitě proměnné se pohybuje v 95% konfidenčním intervalu znázorněném přerušovanou čarou.



Graf č. 1 – Závislost tloušťky lýka na průměru kmene

Dalším výstupem bylo vyhodnocení analyzovaných dat s využitím generalizovaného lineárního modelu. Cílem této analýzy bylo objasnit vliv dalších faktorů na tloušťku lýka, konkrétně vliv vzdálenosti od paty kmene, interakce mezi průměrem kmene a touto vzdáleností, a opět samotným průměrem kmene. Hodnoty na výstupu jsou zachyceny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – GLM model, test 3 vysvětlujících proměnných

	SS	Df	MS	F	p
Intercept	0,67098	1	0,67098	1,03352	0,311138
Průměr kmene cm	10,20180	1	10,20180	15,71401	0,000118
Vzdálenost od paty kmene m	1,92442	1	1,92442	2,96422	0,087399
Průměr kmene*Vzdálenost od paty kmene	0,01699	1	0,01699	0,02617	0,871720
Error	88,29351	136	0,64922		

SS ... sum of squares, Df ... degrees of freedom, MS ... mean square, F ... F value, P ... p value

Z hodnot v tabulce je patrné, že jediným statisticky významným faktorem ovlivňujícím tloušťku lýka, je ze třech ověřovaných faktorů je právě průměr kmene, kde byla závislost prokázána opět s vysokou pravděpodobností $(1-p)*100$, tj. 99,9 % s vysvětlenou variabilitou rovnou 10,2 %, což potvrzuje výsledky předchozí regrese analýzy.

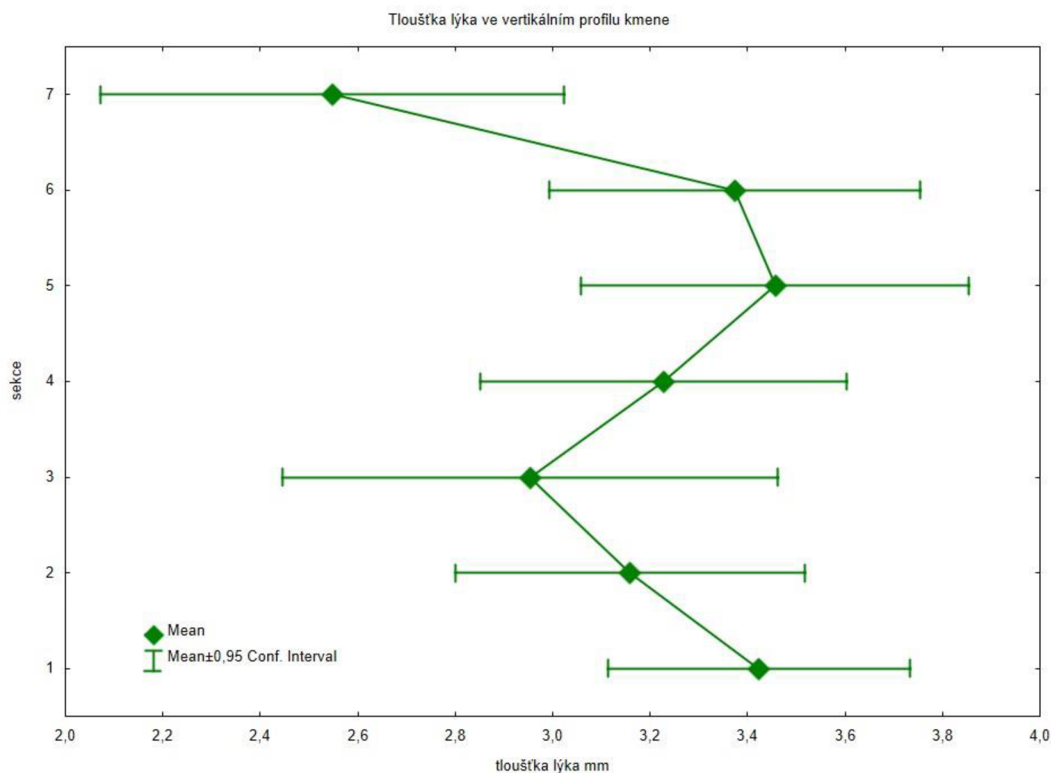
Třetí použitý test, LSD post-hoc test, byl použit se záměrem analyzovat závislost tloušťky lýka na jednotlivých sekcích vertikálního profilu kmene.

Tabulka č. 2 – LSD test závislosti tloušťky lýka na jednotlivých sekcích

1		0,335514	0,088805	0,478176	0,903414	0,855569	0,001749
2	0,335514		0,455948	0,798870	0,278497	0,434319	0,027562
3	0,088805	0,455948		0,317662	0,068610	0,127918	0,141172
4	0,478176	0,798870	0,317662		0,406434	0,597772	0,014261
5	0,903414	0,278497	0,068610	0,406434		0,761639	0,001177
6	0,855569	0,434319	0,127918	0,597772	0,761639		0,003106
7	0,001749	0,027562	0,141172	0,014261	0,001177	0,003106	

Tabulka č. 2 obsahuje p hodnoty při vzájemném porovnání průměrných tlouštěk lýka mezi všemi jednotlivými sekcemi. Z tabulky vyplývá, že statisticky významný je rozdíl v tloušťce lýka v sedmé sekci (tučně zvýrazněné hodnoty), a to oproti všem sekcím s výjimkou sekce č. 3.

Graf č. 2 – Průměrná tloušťka lýka v jednotlivých sekcích



V grafu č. 2 vidíme, tyto průměrné hodnoty tloušťky lýka začínají v sekci 1., tj. ve výšce dvou metrů od paty kmene, na 3,4 mm, pak až do sekce 3. tloušťka lýka klesá (sekce je umístěna v polovině kmenové části stromu bez větví), pak opět stoupá a

kulminuje v sekci č. 5., v sekci č. 6 opět klesá a totálního minima v rámci testovaných sekcí dosahuje v sekci č. 7, což je střed korunové části stromu. Z pohledu možného napadení podkorním hmyzem je zajímavá skutečnost, že lýko je nejmohutnější právě pod první zelenou větví, kde také dochází pod přesleny často k zavrtání hmyzu. Na bázi kmene dosahuje lýko stejného průměru, ale borka je mnohem mohutnější a pravděpodobnost, že bude hmyz zalitý pryskyřicí jedním z četných pryskyřičných kanálků ještě v borce, je vysoká.

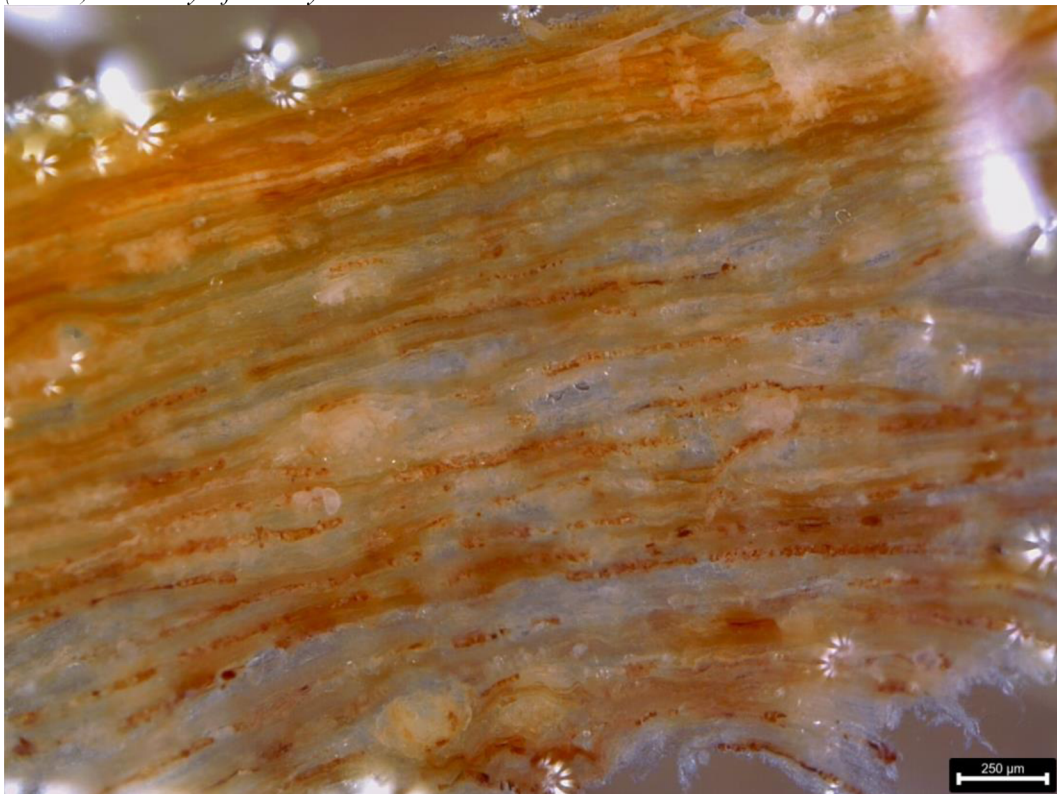
5.2 Mikroskopické řezy floémem, velikost a uspořádání PP buněk

V rámci praktické části práce bylo dále pořízeno množství mikroskopických snímků příčných a tangenciálních řezů floémem a u vybraných snímků byly oměřeny vnitřní anatomické struktury – s největší pravděpodobností se jednalo o shluky či provazce PP buněk. V případě uspořádání PP buněk do provazců byla měřena jejich délka, která byla velmi variabilní; pohybovala se od 72 do 2293 μm . U PP buněk uspořádaných do shluků byla měřena šířka a délka těchto shluků, přičemž šířka se pohybovala v rozmezí 186-1155 μm , délka pak dosahovala hodnot 326-3731 μm .

V lýku byly nalezeny všechny elementy uváděné v literatuře, tedy sítkové buňky, albuminové buňky, pryskyřičné kanálky, floémový parenchym, a jako nejvýraznější struktury se pak jevily buňky s tmavě okrovým obsahem, které vyplňovaly nejčastěji celý vnitřek buněk a které se staly objektem našeho zájmu. Podle dostupné literatury (Vega, 2015) by se mělo jednat o tzv. polyphenolic parenchyma cells (PP cells neboli PP buňky), ale definitivně by měly povahu buněk určit až histochemické analýzy za použití vanilínu. Nebyly nalezeny nebo identifikovány kamenné buňky a sklerenchymatická vlákna. Měření anatomických elementů se s ohledem na komplikovanost tvorby řezu ukázalo jako problematické, proto bylo přistoupeno k měření pouze tloušťky lýka ve vertikálním profilu a měření PP buněk v rámci mikroskopických preparátů. Vzhledem k tomu, že jsou téměř všechny struktury v lýku živé buňky, ani zalití do fixačního roztoku neřeší problematiku deformování buněk ve směru tlaku řezacího nástroje. Měření takových objektů je pak vyloučeno nebo je zatíženo obrovskou chybou.



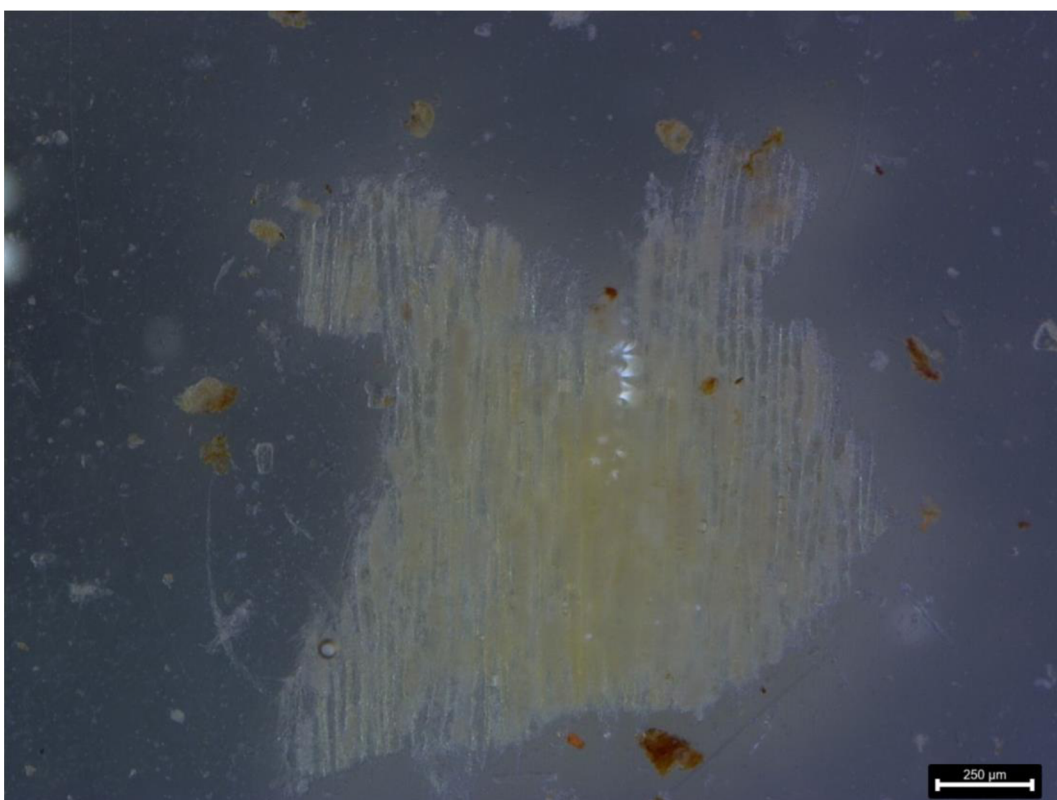
Obrázek č. 9 – Radiální řez floémem. Na snímku floému jsou dobře patrné barevně odlišené (tmavší) PP buňky s fenolickým vakuolárním obsahem.



Obrázek č. 10 – Tangenciální řez floémem s podélným uspořádáním PP buněk



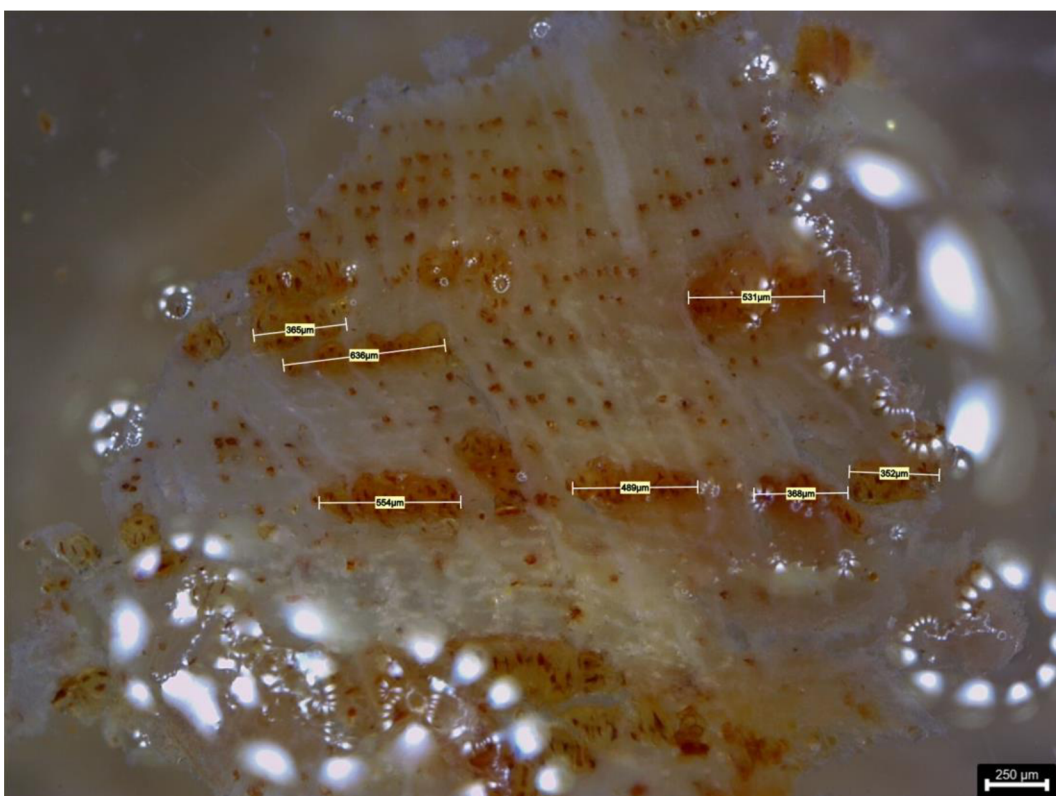
Obrázek č. 11 – Radiální řez floémem s patrnými zbytky kůry. (Pravý dolní roh snímku).



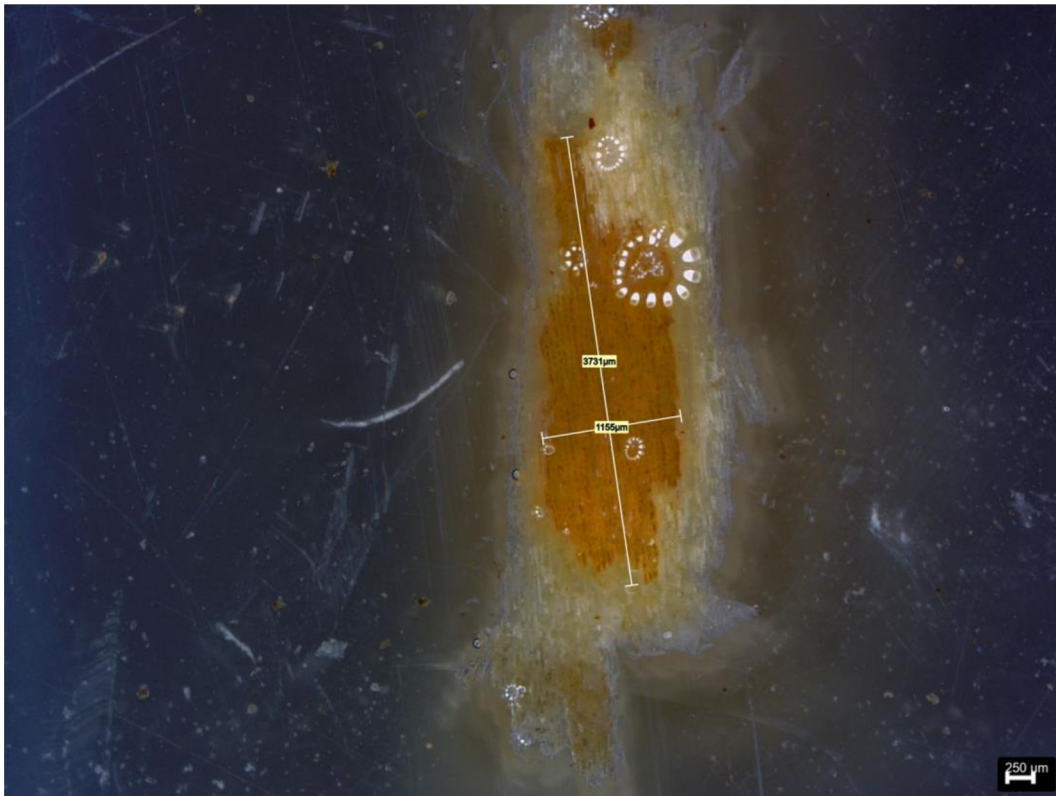
Obrázek č. 12 – Kambium, tangenciální řez



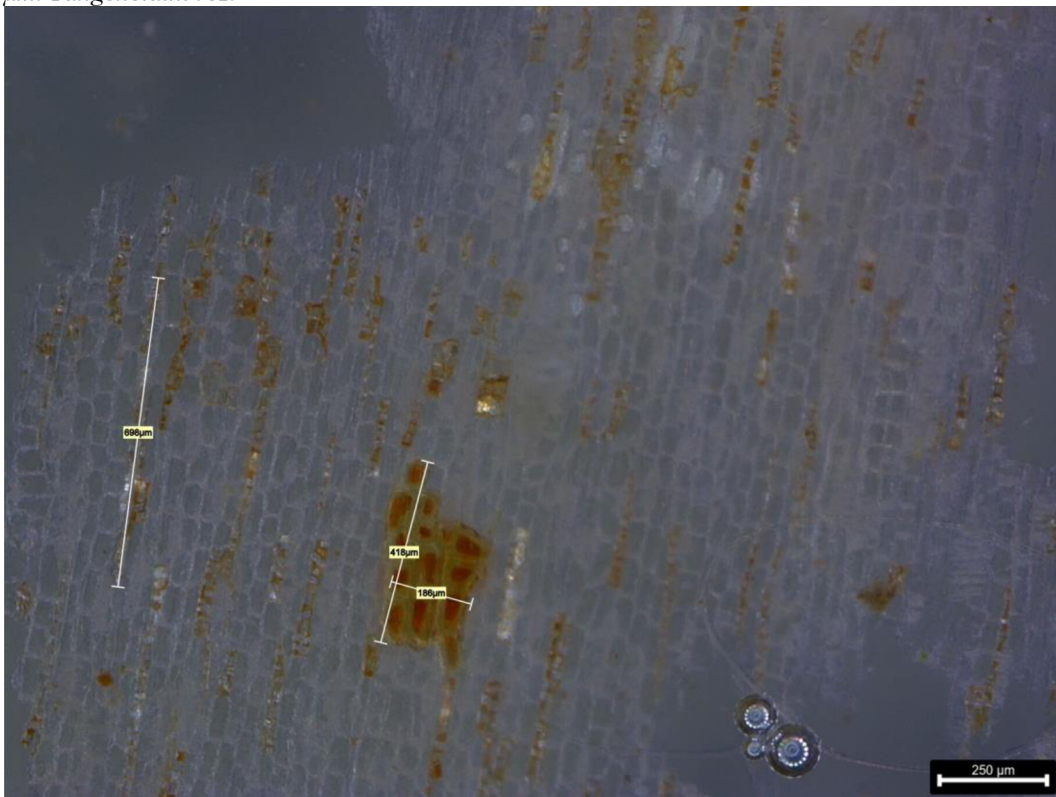
Obrázek č. 13 – Oměřený detail shluku PP buněk. Rozměry 489x1588 μm. Tangenciální řez.



Obrázek č. 14 – Radiální řez floémem. PP buňky jsou uspořádány do provazců relativně vyrovnaných délek v rozmezí 352-636 μm.



Obrázek č. 15 – Shluk PP buněk extrémních rozměrů. (V rámci provedených měření); 1155x3731 µm. Tangenciální řez.



Obrázek č. 16 – Tangenciální řez floémem s měřeným shlukem i provazcem PP buněk. Délka provazce 698 µm, rozměry shluku 186x418 µm. Na snímku je mimořádně dobře patrná buněčná stavba pletiva floému.

6 Diskuse

6.1 Závislost tloušťky floému na vysvětlujících proměnných

Statistickou analýzou byla prokázána závislost tloušťky floému na průměru kmene. Tato závislost vysvětluje přibližně 10 % variability tloušťky floému, kdy s průměrem kmene měřeném u paty stromu roste i tloušťka lýka, přičemž u ostatních použitých proměnných (sekce, vzdálenost od paty, interakce vzdálenosti od paty a průměru kmene) nebyl prokázán statisticky významný vliv. Otázkou tedy zůstává oněch 90 % variability tloušťky lýka. Do budoucna se nabízí zkoumání vlivu dalších možných faktorů, které nebylo předmětem této práce, například vliv oslunění, pedologických poměrů, dostupnosti vody, konkurenčních poměrů či genotypu jedince. Prostor k lepšímu porozumění zákonitostem růstu lýka nabízí i jeho proměnlivost po obvodu, např. v závislosti na orientaci vůči světovým stranám či konkurenci.

Změřené tloušťky lýka u na jednotlivých sekcích, kdy nejvyšší hodnoty byly zaznamenány pod první zelenou větví, tedy v místech, kde strom zároveň bývá často napaden podkorním hmyzem, naznačily možnou spojitost mezi tloušťkou lýka v této části kmene a preferencemi hmyzu napadnout strom právě zde. Zaznamenaný trend vývoje tloušťky lýka v závislosti na sekcích však nebyl v tomto bodě prokázán jako statisticky významný, a bylo by proto potřeba platnost tohoto poznatku hlouběji ověřit prostřednictvím více měření a následné analýzy hodnot.

6.2 Pořízení mikroskopické obrazové dokumentace a změření některých anatomických elementů floému

Pořízení obrazové dokumentace se ukázalo být výzvou, jak vyřešit některé technické problémy a najít funkční postup přípravy preparátů k mikroskopování. Po několika neúspěšných pokusech (příprava preparátu zalitím do pryskyřice a sušením v troubě, příprava zamražením v dusíku) se podařilo tento technický problém překonat naložením vzorků do fixačního roztoku a následné rozřezání jednostrannou žiletkou pro mikroskopii. Přestože tento postup se ukázal funkčním, je otázkou, zda je postupem nejvhodnějším a za úvahu by stálo ověřit například metodu řezání na mikrotomu za pomoci upevnění vzorku v bezové duši. Je však potřeba, aby vzorek byl ve fixačním činidle, jinak velmi rychle vysychá.

Při následném pořizování snímků a oměřování anatomických subtilních struktur floému se volba digitálního mikroskopu jeví být vhodnou až nezbytnou, neboť oproti mikroskopu optickému umožňuje větší zvětšení, vyšší kvalitu obrazu a měření objektů přímo při mikroskopování. Výhodná je i možnost uložení naměřených dat přímo při měření do PC, což snižuje pracnost postupu, časovou náročnost a pravděpodobnost chyby.

7 Závěr

Rešeršní část práce přibližuje smrk ztepilý jako dřevinu mimořádného hospodářského významu a dotýká se i současných problémů s pěstováním smrkových porostů. Shrnuje anatomické charakteristiky floému a přináší vhled do odlišností krytosemenných a nahosemenných rostlin. Přináší aktuální poznatky o transportu látek floémem na dlouhé vzdálenosti. Zde je stále platná Münchova teorie, která však beze zbytku nedokáže vysvětlit některé aspekty transportu, na což reaguje několik dalších teorií, o kterých práce rovněž pojednává (teorie relé, koncept floému jako vysokotlaké trubice a kanálový model) a jejichž platnost ještě bude třeba ověřit. Neopominutelným tématem se ukázala být role floému v obranných reakcích smrku ztepilého, které je v současné době věnována velká pozornost a jejíž poznání může hrát důležitou roli v pěstování odolných smrkových porostů, které by dokázaly lépe odolávat útokům podkorního hmyzu, jimiž jsou porosty i v souvislosti s klimatickou změnou ohrožovány.

Praktická část zahrnovala analýzu závislosti tloušťky floému na několika vybraných faktorech a pořízení řezů floému a následnému zachycení jeho struktury digitálním mikroskopem se současným změřením některých anatomických struktur lýka. Bylo prokázáno, že tloušťka lýka roste s průměrem kmene u paty stromu. Vliv dalších ověřovaných faktorů se naopak víceméně nepotvrdil. Při zkoumání změn tloušťky lýka v podélném profilu kmene (v relativně stanovených sekcích) byl shledán statisticky významný rozdíl pouze v úrovni kmene v polovině jeho korunové části, kde dochází k významnému poklesu tloušťky floému. Křivka průběhu tloušťky dále naznačila, že nejvyšších hodnot lýko dosahuje v místě nasazení koruny stromu, což nastolilo otázku souvislosti s lokalizací útoků podkorního hmyzu, kterým je právě toto místo voleno pro zavrtání se do stromu. Zodpovězení této otázky však již překračuje záběr této práce.

V rámci praktické části dále bylo pořízeny mikroskopické snímky floému a změřeny některé vnitřní anatomické struktury, konkrétně shluky a provazce buněk polyfenolického parenchymu. V tomto bodě se velkou výzvou ukázalo být nalezení vhodné technologie přípravy vzorku k mikroskopování. Po několika neúspěšných pokusech se řešením ukázalo být naložení vzorků do fixačního roztoku a následné

rozřezání jednostrannou žiletkou. Pozorování buněk floémového polyfenolického parenchymu ukázalo, že tyto buňky se ve floémové tkáni vyskytují jako provazce či shluky, přičemž velikost těchto struktur je velice variabilní.

Naše poznání o anatomii a funkci floému se v uplynulých letech velmi prohloubilo, přesto však mnohé otázky zůstávají. Nakolik funkční jsou reziduální orgány, například dilatované mitochondrie, v sítkových elementech? Jaká je přesná povaha fenolických sloučenin v PP buňkách? Jakým mechanismem kůrovec identifikuje stromy se silnější obrannou reakcí? Která z teorií dálkového transportu navazující na Münchovu teorii je správná? Možná žádná z nich? Floém tak nabízí široké pole pro další zkoumání.

8 Bibliografie

- AMOROSO, Mariano M., Lori D. DANIELS, Patrick J. BAKER a J. Julio CAMARERO, 2017. *Dendroecology: Tree-Ring Analyses Applied to Ecological Studies* [online]. 1. Switzerland: Springer [cit. 2021-10-02]. ISBN 978-3-319-61668-1. Dostupné z: 10.1007/978-3-319-61669-8
- AUBRY, Emilie, Sylvie DINANT, Françoise VILAINE, Catherine BELLINI a Rozenn LE HIR, 2019. Lateral Transport of Organic and Inorganic Solutes. *Plants* [online]. **8**(1) [cit. 2021-12-04]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants8010020
- BITNER, Richard L., 2012. *Jehličnany: kapesní atlas*. Vyd. 1. Praha: Knižní klub. ISBN 978-80-242-3139-6.
- ČERNÝ, Alois, 1989. *Parazitické dřevokazné houby*. 1. vyd. Praha: SZN. Lesnictví, myslivost a vodní hospodářství. ISBN 80-209-0090-x.
- ČESKÝ HYDROMETEOROLOGICKÝ ÚSTAV, 2015. *Změna klimatu* [online]. Praha: Český hydrometeorologický ústav [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/zmena-klimatu/zakladni-informace>
- DE SCHEPPER, Veerle, Tom DE SWAEF, Ingvar BAUWERAERTS a Kathy STEPPE, 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* [online]. **64**(16), 4839-4850 [cit. 2021-10-20]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ert302
- DINANT, Sylvie, Jean-Louis BONNEMAIN, Christine GIROUSSE a Julia KEHR, 2010. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *Comptes Rendus Biologies* [online]. **333**(6-7), 504-515 [cit. 2021-10-23]. ISSN 16310691. Dostupné z: doi:10.1016/j.crv.2010.03.008
- EPRON, Daniel, Masako DANNOURA, Teemu HÖLTTÄ a Ram OREN, 2019. Introduction to the invited issue on phloem function and dysfunction. *Tree Physiology* [online]. **39**(2), 167-172 [cit. 2021-10-23]. ISSN 1758-4469. Dostupné z: doi:10.1093/treephys/tpz007
- FRANCESCHI, Vincent R., Trygve KREKLING, Alan A. BERRYMAN a Erik CHRISTIANSEN, 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *American Journal of Botany* [online]. **85**(5), 601-615 [cit. 2021-10-24]. ISSN 00029122. Dostupné z: doi:10.2307/2446529
- FRANCESCHI, Vincent R., Paal KROKENE, Erik CHRISTIANSEN a Trygve KREKLING, 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* [online]. **167**(2), 353-376 [cit. 2021-12-10]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x
- GRICAR, J., P. PRISLAN, V. GRYC, H. VAVR IK, M. DE LUIS a K. UFAR, 2014. Plastic and locally adapted phenology in cambial seasonality and production of xylem and phloem cells in *Picea abies* from temperate environments. *Tree Physiology* [online]. **34**(8), 869-881 [cit. 2021-10-24]. ISSN 0829-318X. Dostupné z: doi:10.1093/treephys/tpu026
- GRIČAR, Jožica, Katarina ČUFAR, Klemen ELER, Vladimír GRYC, Hanuš VAVRČÍK, Martin DE LUIS a Peter PRISLAN, 2021. Transition Dates from Earlywood to Latewood and Early

Phloem to Late Phloem in Norway Spruce. *Forests* [online]. **12**(3) [cit. 2021-10-24]. ISSN 1999-4907. Dostupné z: doi:10.3390/f12030331

GRIČAR, Jožica, Peter PRISLAN, Martin DE LUIS, Vladimír GRÝC, Jana HACUROVÁ, Hanuš VAVRČÍK a Katarina ČUFAR, 2015. Plasticity in variation of xylem and phloem cell characteristics of Norway spruce under different local conditions. *Frontiers in Plant Science* [online]. **6** [cit. 2021-10-24]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2015.00730

Hydrologická ročenka České republiky ...: Hydrological yearbook of the Czech Republic ..., 2016. Praha: Český hydrometeorologický ústav. ISBN 978-80-87577-66-0. ISSN 2533-6312.

CHMELÁŘ, Jindřich, 1981. *Dendrologie s ekologií lesních dřevin*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.

JENSEN, KÅRE HARTVIG, JOHANNES LIESCHE, TOMAS BOHR a ALEXANDER SCHULZ, 2012. Universality of phloem transport in seed plants. *Plant, Cell & Environment* [online]. **35**(6), 1065-1076 [cit. 2021-10-23]. ISSN 01407791. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02472.x

JOHNSON, RJ a MJ CANNY, 2013. Phloem Translocation of Organic Compounds: A Possible Mechanism to Assist Osmotically-Generated Pressure Flow in Tall Trees. *Independent researcher* [online]. Oxford, UK [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: doi:DOI: 10.14294/WATER.2012.9

KEHR, J. a A. BUHTZ, 2007. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany* [online]. **59**(1), 85-92 [cit. 2021-10-23]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erm176

KNOBLAUCH, Michael, Jan KNOBLAUCH, Daniel L MULLENDRE et al., 2016. Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *ELife* [online]. **5** [cit. 2021-10-21]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.15341

KNOBLAUCH, Michael a Karl OPARKA, 2012. The structure of the phloem - still more questions than answers. *The Plant Journal* [online]. **70**(1), 147-156 [cit. 2021-12-05]. ISSN 09607412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04931.x

LIESCHE, J., C. WINDT, T. BOHR, A. SCHULZ a K. H. JENSEN, 2015. Slower phloem transport in gymnosperm trees can be attributed to higher sieve element resistance. *Tree Physiology* [online]. **35**(4), 376-386 [cit. 2021-10-23]. ISSN 0829-318X. Dostupné z: doi:10.1093/treephys/tpv020

LIESCHE, Johannes a John PATRICK, 2017. An update on phloem transport: a simple bulk flow under complex regulation. *F1000Research* [online]. **6** [cit. 2021-10-22]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.12577.1

LUX, Alexander, Milan BALÁŽ, Marie KUMMEROVÁ, Aleš SOUKUP, Olga VOTRUBOVÁ, Jun ABE, Shigenori MORITA a Thomas ROST, 2017. *Obrazový průvodce anatomii rostlin: Visual guide to plant anatomy*. Vydání 1. Praha: Academia. Živá příroda. ISBN 978-80-200-2620-0.

- MADĚRA, Petr a Luboš ÚRADNÍČEK, 2001. *Dřeviny České republiky*. Písek: Matice lesnická. ISBN 80-86271-09-9.
- MUSIL, Ivan a Jan HAMERNÍK, 2007. *Jehličnaté dřeviny: přehled nahosemenných i výtrusných dřevin : lesnická dendrologie 1*. Vyd. 1. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1567-9.
- OPARKA, Karl J. a Robert TURGEON, 1999. Sieve Elements and Companion Cells—Traffic Control Centers of the Phloem. *The Plant Cell* [online]. **11**(4), 739-750 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.11.4.739
- PIKULA, Jiří, 2003. *Stromové a keřové dřeviny lesů a volné krajiny České republiky*. Vyd. 1. Brno: CERM. ISBN 80-7204-280-7.
- PROCHÁZKA, Stanislav, 1998. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2.
- R. PACE, Marcelo, 2020. Phloem: Cell Types, Structure, and Commercial Uses. GONZALEZ, Ana, María RODRIGUEZ a Nihal GÖREN SAĞLAM, ed. *Plant Science - Structure, Anatomy and Physiology in Plants Cultured in Vivo and in Vitro* [online]. IntechOpen [cit. 2022-04-05]. ISBN 978-1-78984-746-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.88162
- SCHALLER, Andreas, 2008. *Induced plant resistance to herbivory*. [Berlin]: Springer. ISBN 978-1-4020-8181-1.
- SCHIEBE, Christian, Almuth HAMMERBACHER, Göran BIRGERSSON et al., 2012. Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia* [online]. **170**(1), 183-198 [cit. 2022-03-25]. ISSN 0029-8549. Dostupné z: doi:10.1007/s00442-012-2298-8
- SLEWINSKI, Thomas L., Cankui ZHANG a Robert TURGEON, 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* [online]. **4** [cit. 2021-10-20]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2013.00244
- SLODIČÁK, Marian a Jiří NOVÁK, 2007. *Růst, struktura a statická stabilita smrkových porostů s různým režimem výchovy: Growth, structure and static stability of norway spruce stands with different thinning regime*. Vyd. 1. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce. Folia forestalia Bohemica. ISBN 978-80-863-86-91-1.
- TURGEON, Robert, 2010. The Puzzle of Phloem Pressure. *Plant Physiology* [online]. **154**(2), 578-581 [cit. 2021-10-21]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.110.161679
- VAN BEL, Aart J. E. a Michael KNOBLAUCH, 2000. Sieve element and companion cell: the story of the comatose patient and the hyperactive nurse. *Functional Plant Biology* [online]. **27**(6) [cit. 2022-03-29]. ISSN 1445-4408. Dostupné z: doi:10.1071/PP99172
- VEGA, Fernando E. a Richard W. HOFSTETTER, ed., 2015. *Bark Beetles: biology and ecology of native and invasive species*. London: Academic Press. ISBN 978-0-12-417156-5.

VREŠTIAK, Pavol a Zdeněk OSVALD, 1994. *Všechno o jehličnanech*. Čes. vyd. Praha: Slovart. ISBN 80-85871-35-1.

Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020, 2021. Praha: Ministerstvo zemědělství v nakladatelství Lesnická práce. ISBN 978-80-7434-625-5.