

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie



**Česká
zemědělská
univerzita
v Praze**

Vliv různých koncentrací CO₂ a teploty při růstu dřevin na nutriční hodnotu pletiv pro housenky bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*)

Diplomová práce

Autor: Bc. Barbora Dvořáková

Vedoucí práce: prof. Ing. Bc. Jaroslav Holuša, Ph.D.

2022

Czech University of Life Sciences

Faculty of Forestry and Wood Sciences

Department of Forest Protection and Entomology



**Česká
zemědělská
univerzita
v Praze**

**Influence of different concentrations of CO₂ and temperature during tree growth on
the nutritional value of tissues for caterpillars of *Lymantria dispar***

Diploma thesis

Written by: Bc. Barbora Dvořáková

Thesis supervisor: prof. Ing. Bc. Jaroslav Holuša, Ph.D.

2022

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Barbora Dvořáková

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Vliv různých koncentrací CO₂ a teploty při růstu dřevin na nutriční hodnotu pletiv pro housenky bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*)

Název anglicky

Influence of different concentrations of CO₂ and temperature during tree growth on the nutritional value of tissues for caterpillars of *Lymantria dispar*

Cíle práce

Srovnat vliv potravy ze stromů pěstovaných za různých režimů na růstové parametry housenek bekyně velkohlavé

Metodika

Pomocí laboratorního experimentu budou porovnány růstové parametry housenek bekyně velkohlavé, krmené potravou pěstovanou za podmínek kombinace dvou různých teplot a dvou různých koncentrací CO₂. Takto vypěstovaná rostlinná pletiva budou přidána do speciální agarové směsi a budou předložena housenkám bekyně jako potrava, za konstantní teploty v klimaboxu. Budou zhodnoceny růstové parametry housenek pomocí indexů jako je relativní rychlost růstu (relative growth rate), přibližná stravitelnost (approximate digestibility), efektivita přeměny požitých potravy do biomasy těla (efficiency of conversion of ingested food), efektivita přeměny strávené potravy do biomasy těla (efficiency of conversion of digested food).

Harmonogram práce:

Leden – květen 2020 – experimenty v laboratoři

červen-říjen 2020 – zpracování dat

Leden 2021 – předložení literární rešerše a zpracovaných dat ke kontrole

Březen 2021 – předložení výsledků a diskuse diplomové práce

Doporučený rozsah práce

40 s

Klíčová slova

Lymantria dispar; potrava; dub; CO₂; teplota

Doporučené zdroje informací

- Couture, J. J., & Lindroth, R. L. (2012). Atmospheric change alters performance of an invasive forest insect. *Global Change Biology*, 18(12), 3543-3557.
- Couture, J. J., Meehan, T. D., & Lindroth, R. L. (2012). Atmospheric change alters foliar quality of host trees and performance of two outbreak insect species. *Oecologia*, 168(3), 863-876.
- Hättenschwiler, S., & Schafellner, C. (1999). Opposing effects of elevated CO₂ and N deposition on *Lymantria monacha* larvae feeding on spruce trees. *Oecologia*, 118(2), 210-217.
- Kula, E., Pešlová, A., Martinek, P., Mazal, P. (2013) The development of caterpillars of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) feeding on food affected by nitrogen. *Sumarski List* 137:51–60
- Williams, R. S., Lincoln, D. E., & Norby, R. J. (2003). Development of gypsy moth larvae feeding on red maple saplings at elevated CO₂ and temperature. *Oecologia*, 137(1), 114-122.
- Xu, H., Xie, H., Wu, S., Wang, Z., & He, K. (2019). Effects of elevated CO₂ and increased N fertilization on plant secondary metabolites and chewing insect fitness. *Frontiers in Plant Science*, 10, 739.
- Zvereva, E. L., & Kozlov, M. V. (2006). Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant–herbivore interactions: a metaanalysis. *Global change biology*, 12(1), 27-41.
-

Předběžný termín obhajoby

2021/22 LS – FLD

Vedoucí práce

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ochrany lesa a entomologie

Konzultant

Mgr. David Musiolek, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 26. 7. 2021

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 6. 10. 2021

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 04. 01. 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Vliv různých koncentrací CO₂ a teploty při růstu dřevin na nutriční hodnotu pletiv pro housenky bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*) vypracovala samostatně pod vedením prof. Ing. Bc. Jaroslava Holuši, 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

Podpis autora

Poděkování

Za odborné vedení mé diplomové práce, rychlost, trpělivost, mnoho rad a lidskosti děkuji prof. Ing. Bc. Jaroslavu Holušovi, Ph.D. Dále děkuji Mgr. Davidovi Musiolkovi, Ph.D. za vedení provedeného experimentu a rady při tvorbě této diplomové práce. Děkuji Ing. Soně Skopalové za spolupráci při tvorbě metodiky experimentu. Děkuji RNDr. Alině Kalyniukové, Ph.D. za provedení chemické analýzy vzorků experimentu. Poděkování také patří celé mé rodině za podporu během mých studií.

Abstrakt

Probíhající klimatická změna na Zemi má nepochybně vliv na interakci lesních škůdců a jejich hostitelských dřevin. Zvyšující se obsah CO₂ a neustále narůstající teplota ovzduší mohou ovlivnit ontogenetický vývoj těchto škůdců. Změna v koncentraci CO₂ v ovzduší má za následek nárůst poměru C:N v rostlinných pletivech, a to může mít vliv na nutriční hodnotu rostlin. V námi provedeném experimentu jsme se zaměřili na vývoj housenek bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*), které jsme krmili několika druhy potravy. Tato potrava byla připravena ze sazenic pěstovaných v přesně definovaných podmínkách růstu, určité koncentrace CO₂ a teploty. Zkoumali jsme rozdíly ve vývoji housenek krměných smrkovou a dubovou potravou a zda nebyly rozdíly mezi jednotlivými skupinami potravy pouze v rámci dubu nebo smrku. Zjistili jsme, že housenky prospívaly nejlépe na skupinách potravy připravených z dubu a hůře na potravě připravené ze smrku. Rozdíly mezi skupinami v rámci samostatné dřeviny nebyly signifikantní. Dále jsme po provedení chemické analýzy listů a jehlic zjistili, že dubová potrava obsahovala největší množství sekundárních metabolitů rostliny a proč housenky prospívaly na této potravě nejlépe zůstává nadále otázkou.

Klíčová slova: *Lymantria dispar*, potrava, dub, CO₂, teplota

The climate change has had a significant impact on interactions between forest pests and their host plants. Increased levels of atmospheric CO₂ and constantly increasing temperature of atmosphere can significantly affect the performance of these forest pests. Increased levels of CO₂ increase the C:N balance of plant tissues, which can result in lower food quality. This study focuses on ontogenetic larval development of gypsy moth (*Lymantria dispar*). The caterpillars were fed on different kinds of diet. The diets were prepared from seedling raised in strictly defined growth conditions including certain CO₂ concentration and temperature. We focused on determining differences in larval development of caterpillars fed on spruce diet and on oak diet, also tried to investigate differences between diets prepared only from spruce or oak seedlings. We found that caterpillars fed on oak diets showed better growth rates than caterpillars fed on spruce diets. Our data didn't show any differences between diets prepared only from oak or from spruce. We also implemented a chemical analysis of leaves and needles and found that oak diet contained more plant secondary metabolites than spruce diet. Explanation why caterpillars better performed on oak diets still remains unclear.

Key words: *Lymantria dispar*, diet, oak, CO₂, temperature

Obsah

1	Úvod	10
2	Cíl práce	11
3	Literární přehled	12
3.1	Bekyně velkohlavá (<i>Lymantria dispar</i> L.)	12
3.2	Rozšíření.....	12
3.3	Biologie.....	12
3.3.1	Vzhled.....	12
3.3.2	Vajíčka	13
3.3.3	Housenky.....	13
3.3.4	Kukla.....	14
3.3.5	Životní cyklus.....	14
3.4	Monitoring a obranná opatření	14
3.5	Interakce herbivorního hmyzu a hostitelských rostlin.....	15
3.6	Stres působící na rostliny	15
3.7	Klimatická změna a lesní ekosystém	16
3.8	Teplo a jeho vliv na vývoj rostlin	17
3.9	Oxid uhličitý (CO ₂) a jeho vliv na rostliny	17
3.10	Klimatická změna a její účinky na přítomnost škůdců	18
4	Metodika	21
4.1	Metodika experimentu	21
4.1	Chemická analýza asimilačních orgánů.....	31
4.2	Statistické zpracování.....	31
5	Výsledky	32
6	Diskuze	49
7	Závěr	53
8	Seznam použité literatury	54
9	Přílohy	61

Seznam obrázků

Obrázek 1: Instary housenek bekyně velkohlavé	13
Obrázek 2: Globální klimatická změna – související biotické a abiotické stresové faktory a jejich vliv na produkci sekundárních metabolitů (PSC – plant secondary compounds) v lesních dřevinách.....	20
Obrázek 3: Vývoj teplot a fotofáze ve fytofotoch. 1.....	21
Obrázek 4: Vývoj teplot a fotofáze ve fytofotoch. 2.....	22
Obrázek 5: Vývoj teplot a fotofáze ve fytofotoch. 3.....	22
Obrázek 6: Vývoj teplot a fotofáze ve fytofotoch. 4.....	22
Obrázek 7: Pšeničný agar s hubkou vajíček	24
Obrázek 8: Petriho miska s housenkami a kouskem pšeničného agaru	24
Obrázek 9: Stříkačky naplněné pšeničným agarem.....	26
Obrázek 10: Příprava smrkového agaru	26
Obrázek 11: Stříkačky naplněné smrkovým agarem	26
Obrázek 12: Příprava pšeničného agaru.....	28
Obrázek 13: Experimentální housenky s potravou	29
Obrázek 14: Klimabox s experimentálními housenkami	29
Obrázek 15: Přírůst čerstvé hmotnosti housenek živících se na potravě ze sazenic smrku pěstovaných za různých podmínek.....	33
Obrázek 16: Vyprodukovaný trus housenek živících se na potravě ze sazenic smrku pěstovaných za různých podmínek.....	35
Obrázek 17: Přírůst živé hmotnosti housenek živících se na potravě ze sazenic dubu pěstovaných za různých podmínek.....	36
Obrázek 18: Vyprodukovaný trus housenek živících se na potravě ze sazenic dubu pěstovaných za různých podmínek.....	38
Obrázek 19: AD index – přibližná stravitelnost	39
Obrázek 20: RGR index - relativní tempo růstu.....	41
Obrázek 21: ECD index - účinnost přeměny strávené potravy.....	43
Obrázek 22: ECI index - účinnost přeměny přijaté potravy.....	45

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam druhů potravy podle podmínek růstu	25
Tabulka 2: Seznam jednotlivých složek potravy a jejich množství	27
Tabulka 3: Ověření normality váhy trusu housenek krmených na daném druhu potravy	32
Tabulka 4: Ověření normality přírůstu nevysušených housenek krmených na daném druhu potravy	32
Tabulka 5: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	34
Tabulka 6: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	36
Tabulka 7: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	37
Tabulka 8: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	39
Tabulka 9: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	40
Tabulka 10: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	42
Tabulka 11: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	44
Tabulka 12: Porovnání hodnot Scheffého testem.....	46
Tabulka 13: Průměrný obsah alelochemických látek v jednotlivých druzích potravy ...	47
Tabulka 14: Průměrný obsah cukrů v jednotlivých druzích potravy	48
Tabulka 15: Porovnání závislosti alelochemických látek s nutričními indexy	48

Seznam zkratk

VOC	Těkavé organické látky (Volatile organic compound)
PSC	Sekundární metabolity rostlin (Plant secondary compounds)
NVD	Nízká koncentrace CO ₂ , vysoká teplota a sběr v dubnu
ZVD	Zvýšená koncentrace CO ₂ , vysoká teplota, sběr v dubnu
NNK	Nízká koncentrace CO ₂ , nízká teplota, sběr v dubnu
NVK	Nízká koncentrace CO ₂ , vysoká teplota, sběr v květnu
ZNK	Zvýšená koncentrace CO ₂ , nízká teplota, sběr v květnu
ZVK	Zvýšená koncentrace CO ₂ , vysoká teplota, sběr v květnu
AD	Přibližná stravitelnost (Approximate digestibility)
RGR	Relativní tempo růstu (Relative grow rate)
ECI	Účinnost přeměny přijaté potravy (Efficiency of conversion of ingested food)
ECD	Účinnost přeměny strávené potravy (Efficiency of conversion of digested food)
FW	Čerstvá váha (Fresh weight)
DW	Suchá váha (Dry weight)
WC	Obsah vody (Water content)

1 Úvod

Bekyně velkohlavá (*Lymantria dispar* L.) patří mezi nebezpečné hmyzí škůdce lesních porostů. Tento listožravý škůdce dokáže při silných gradacích svým žírem les významně poškodit. K nárůstu její početnosti obvykle vedou nepříznivé klimatické podmínky, které dřeviny oslabují a ten se tak stává snadně dostupnou potravou pro housenky b. velkohlavé. Bekyně velkohlavá je polyfágní druh, dokáže se živit na různých druzích rostlin. Nejčastějším hostitelem je dub (*Quercus*), v případě nouze však housenky požírají i smrk (*Picea*) nebo dokonce zemědělské plodiny (Fox et al., 2013).

Na Zemi dochází neustále ke klimatickým změnám. V důsledku antropogenní činnosti – provozu elektráren, spalování paliv atd., roste průměrná roční teplota ovzduší a mění se koncentrace oxidu uhličitého CO₂ v atmosféře. Obsah oxidu uhličitého v ovzduší je pouze 0,04 %, nicméně změny i v takto malé koncentraci mají zásadní vliv na fungování přírodních ekosystémů (Hamilton et al., 2001).

Stromy rostoucí v různých klimatických podmínkách se musí na nové podmínky adaptovat. Adaptace jsou buď morfologické nebo chemické. Tyto změny mění nutriční hodnotu asimilačních orgánů, kterými se herbivorní hmyz živí a ovlivňují jeho vývoj. Zvýšení koncentrace oxidu uhličitého vede ke zvyšování sacharidů v rostlinných orgánech a pokud dojde ke zvýšení sacharidů, klesá množství dusíku. Zvyšuje se poměr C:N (Lincoln et al., 1984), tím klesá množství proteinů a rostlina se tak stává méně výživnou. S nárůstem množství CO₂ v ovzduší se zvyšuje i množství sekundárních metabolitů (obraných látek rostlin). Teplota vzduchu ovlivňuje rychlost fotosyntézy a pokud se zvýší, zrychluje se i tvorba rostlinné biomasy (Sinclair, Weiss 2010).

Herbivorní hmyz, který se živí nutričně méně kvalitními listy hostitelských rostlin, reaguje zvýšením množství zkonsumované potravy. Prodloužením žíru se prodlužuje celková doba vývoje housenek a pravděpodobně se snižuje plodnost samic (Lindroth et al., 1997b).

2 Cíl práce

Srovnat vliv potravy ze stromů pěstovaných za různých režimů na růstové parametry housenek bekyně velkohlavé.

3 Literární přehled

3.1 Bekyně velkohlavá (*Lymantria dispar* L.)

Bekyně velkohlavá (*Lymantria dispar* Linnaeus, 1758) je druh motýla (Lepidoptera), patřící do čeledi Erebidae. Housenky bekyní jsou jedny z nejvíce nebezpečných listožravých škůdců, které se živí listy listnatých i jehličnatých stromů. Většinou žijí ve slabých populacích, které pro lesní ekosystémy nepředstavují velkou hrozbu, nicméně pokud dojde k vysokému nárůstu populací v důsledku různých příčin (např. klimatických změn), mohou housenky svým žírem les poškodit nebo dokonce zahubit. Existují dva poddruhy bekyní, asijské, u kterých jsou samice schopny létat, a evropské, které schopnost letu nemají. Oba tyto poddruhy jsou významnými škůdci ve svých přirozených areálech (Keena et al., 2007).

3.2 Rozšíření

Asijský poddruh se vyskytuje v jižní Evropě, jižní Africe, střední a jižní Asii a Japonsku. Evropský poddruh žije v lesích mírného pásu západní Evropy. Evropský poddruh byl zavlečen do Kanady v roce 1912 a do Severní Ameriky 1869. Asijský poddruh se postupně rozšířil do Německa a ostatních evropských států, kde se kříží s evropským poddruhem, dále byl zavlečen do USA i Kanady a výskyt byl zaznamenán i v Anglii (Kang et al., 2017).

3.3 Biologie

3.3.1 Vzhled

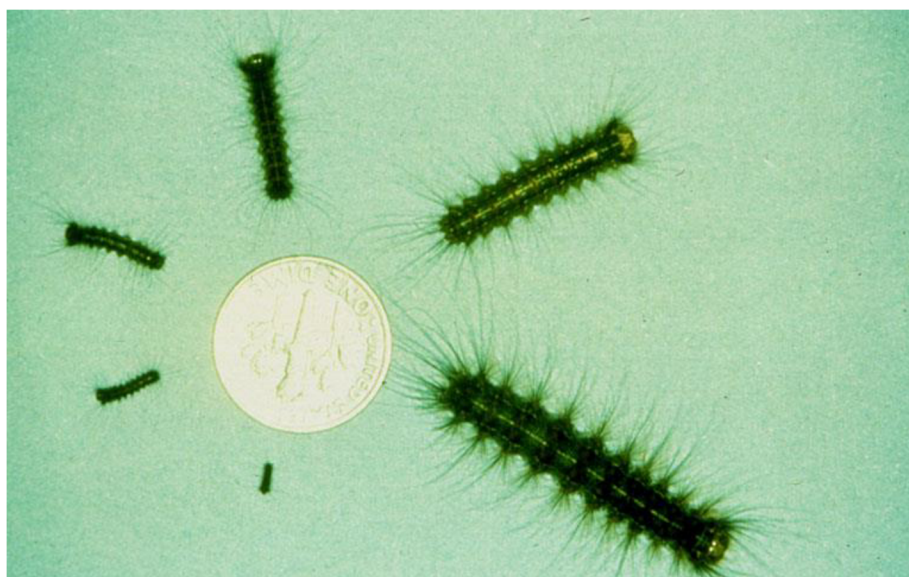
Oba poddruhy bekyní velkohlavé jsou svým vzhledem téměř totožné. Dospělé samice jsou bíle až krémově zbarvené s hnědošedými znaky na předních křídlech, jejich tělo je větší než tělo samců a zadeček mají rezavě zbarvený. Tykadla jsou nitkovitá. Rozpětí křídel u samic dosahuje 55–70 mm (Wallner, 2000a). Dospělci samců mají na křídlech hnědé skvrny a jsou hnědě zbarvení, rozpětí křídel je od 35 do 40 mm. Tykadla mají narozdíl od samic hřebenitá. Obě pohlaví mají na předních křídlech tmavou skvrnu ve tvaru půlměsíce, samci mají tykadla celkově delší a hustší (Kimoto, Duthie-Holt, 2006).

3.3.2 Vajíčka

Samice kladou vajíčka v tzv. zrcátcích na spodní část kmenů nebo kolem větví. Lze je také nalézt na omítkách domů, dřevěných skládkách atd. Vaječné snůšky jsou vejčité, tři až šest cm široké a obsahují 100–1000 vajíček (Wallner, 2000a). Vajíčka jsou pokryta snědou až žluto-oranžovou zbarvenou vrstvou chloupků ze samičího zadečku, které mohou časem působením slunečního záření zbledat (Brandt, 1994). Housenky ve vajíčkách přezimují, procházejí diapauzou a začínají se rodit v průběhu dubna. Vaječné snůšky mají v sobě malé dírky od líhnoucích se housenek (Wallner, 2000a).

3.3.3 Housenky

Nově vylíhlé larvy jsou tři mm velké, nahnědlé a během 24 hodin zčernají (Wallner, 2000a). Housenka bekyně velkohlavé prochází pěti až šesti instary. Housenky prvního a třetího instaru jsou černé s dlouhými chloupky, druhý instar jsou housenky hnědé s krátkými chloupky (Kimoto, Duthie-Holt, 2006). Ve čtvrtém, pátém a šestém instaru mají housenky velice podobný vzhled, jsou světle až tmavě šedě zbarveny a mají žlutou skvrnku na hrudi. Velikost a vzhled jednotlivých instarů zobrazuje obrázek 1. Tělo je pokryto dlouhými tmavými a zlatými chlupy. Na těle nesou dvě řady bradavek. Prvních pět řad bradavek je modře zbarveno, šestý pár je červený, ale jsou známy i jiné barevné kombinace (Kimoto, Duthie-Holt, 2006). Po vylíhnutí a opuštění hubky housenky šplhají do korun stromů. Jejich prvním cílem je rozšířit se do okolí pomocí vláken a dlouhých chloupků na těle (tzv. aerosety) s využitím větru. Druhým cílem housenek je žít. Housenka se živí listy nebo jehličím, dokud neprojde všemi instary a na konci června po dokončení žíru si upřede zámotek a zakuklí se. Dospělá larva je pět až devět cm dlouhá (Wallner, 2000a).



Obrázek 1: Instary housenek bekyně velkohlavé (USDA Forest Service - Region 2 - Rocky Mountain Region , USDA Forest Service, Bugwood.org)

3.3.4 Kukla

Kukla bekyně velkohlavé je hnědě zbarvená s drobnými chloupky. Stádium kukly trvá týden až 14 dní a kukly lze většinou nalézt na spodní straně větví nebo v záhybech kůry (Hrabák, 1985).

3.3.5 Životní cyklus

Samice klade vajíčka na kmeny stromů v tzv. hubkách, které pokryje rezavohnědými chloupky. Vajíčka na kmenech přezimují a podle klimatických podmínek se začínají líhnout na přelomu dubna a května. Čerstvě vylíhlé housenky jsou světlé barvy a postupem času ztmavnou. Housenky poté vylézají do korun stromů, kde ožirají listy, v případě nouze se živí i na jehličnatých dřevinách. Při extrémním nedostatku potravy se housenky živí podrostem, bylinami nebo sousedními polními plodinami (McEwan et al., 2009). V červenci se housenky začínají kuklit. Kuklí se v místech, kde jsou chráněny před přímým deštěm (pod větvemi, praskliny kůry). Stádium kukly trvá 14 dní a na přelomu července a srpna se líhnou motýli. Samice se drží v místě, kde se vylíhly, nelétají a kladou ihned vajíčka. Samci b. velkohlavé jsou narozdíl od b. mnišky aktivní během dne, vyhledávají samice, které jsou schopny oplodnit i v úzkých štěrbinách kmene (Wallner, 2000a).

3.4 Monitoring a obranná opatření

Na lokalitách s historickým výskytem přemnožení b. velkohlavé nebo pro ně atraktivních plochách je nutné tyto plochy pravidelně kontrolovat. Kontrola se provádí v porostech, kde se zvolí dvě linie a na 100 vybraných stromech na každé z nich se počítají snůšky hubek, které samice vytváří na bázích kmenů. Tato metoda se označuje jako Turčekova metoda a provádí se každý rok. Za kritickou hodnotu se považuje jedna až šest hubek na jeden kmen. Další možností je umístování feromonových pastí v době rojení. Do pasti se umístí feromonový odparník a odparník fumigujícího insekticidu. Tato metoda se v praxi moc nepoužívá z důvodu absence dat z minulosti a není s čím data porovnat. Proti b. velkohlavé je možno chemicky zasahovat leteckým postřikem. Stříká se biopreparáty, blokátory syntézy chitinu atd. (Novotný et al., 1997).

3.5 Interakce herbivorního hmyzu a hostitelských rostlin

Herbivorní hmyz je potravně vázán na určité druhy hostitelských rostlin, které mu poskytují svými pletivy výživu. Výskyt a prospívání herbivorního hmyzu proto úzce souvisí s kvalitou daného hostitele. Hlavním zdrojem energie pro hmyz je organický uhlík. Tělo hmyzu je tvořeno převážně proteiny (dusíkaté látky) a hmyz musí přijmout velké množství dusíku. Fitness hmyzu také ovlivňuje fosfor. Fosforu je v rostlinách méně než v těle hmyzu, což nutí hmyz konzumovat více rostlinné potravy. Tyto tři prvky jsou makroprvky. Kromě makroprvků jsou pro hmyz důležité i mikroprvky – draslík, hořčík a vápník (Awmack, 2002). Tyto chemické prvky slouží jako stavební prvky vnější kostry a udržují homeostázu (Joern et al., 2012).

Pro hmyz kromě chemického složení potravy jsou stejně důležité i fyzikální vlastnosti rostliny. Tloušťka listů, jejich stáří, velikost listové plochy, jejich hustota a obsah vody (Awmack, 2002).

Rostlinná pletivo je tvořeno uhlíkatými látkami (sacharidy), celulórou, hemicelulózou a ligninem (Schoonhoven, 2005).

Kvalita hostitelských rostlin může být ovlivněna řadou faktorů, mezi které např. patří stres způsobený vnějšími podmínkami nebo dostupností živin z půdy. Pokud je rostlina pod stresem, začne se vůči tomuto stresu bránit chemickými nebo morfologickými změnami. Mezi morfologické změny a adaptace patří např. voskování listů, ztloustnutí buněčné stěny, což znesnadňuje hmyzu požívání pletiv rostliny. Mezi chemické změny patří tvorba sekundárních metabolitů (alkaloidy, terpeny, fenoly, glykosidy), které mají za úkol herbivorní hmyz odpuzovat nebo ho zabít (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Listy žeroucí herbivoři jsou sekundárními metabolity ovlivněny podstatně více než mízu sající hmyz. Je to proto, že mízu sající hmyz nepožírá buněčnou hmotu, ale jen ji narušuje. Vyhne se tak řadě obranných látek, nicméně mu trvá delší dobu, než získá potřebné množství živin, než je tomu u listožravých druhů (Giacometti et al., 2018).

3.6 Stres působící na rostliny

Stres rostlin je stav, kdy na rostlinu působí určitý stresor biotického nebo abiotického původu a rostliny jsou nuceny odolávat tlaku, který na ně působí. Rostliny se brání aktivací různých obranných mechanismů. Mezi abiotické stresory patří vítr, sníh, teplota, voda, pH půdy atd. Biotické stresory jsou biologického původu a řadíme sem různé druhy patogenních hub a živočichů. Stres dělíme na primární a sekundární. Primární stres způsobují vnější faktory působící na rostlinu např. vysoká teplota, která způsobí stres sekundární, tj. nedostatek vody pro rostlinu. Míra poškození rostliny závisí na délce a intenzitě působení stresu. Stresory jsou obecně uznávány jako faktory, které mohou narušovat trvalou udržitelnost ekosystémů (Ward, Masters, 2007).

3.7 Klimatická změna a lesní ekosystém

Poškození a zhoršení zdravotního stavu lesa klimatickými změnami je jednou z největších obav lidstva. Změny klimatu jsou často způsobeny antropogenní činností. Děje se tak v důsledku spalování fosilních paliv, využíváním půdy, odlesňováním a provozem průmyslu. Následně se mění míra působení skleníkových plynů jako např. oxidu uhličitého (CO₂) nebo ozonu (O₃). V roce 2008 byla koncentrace CO₂ v atmosféře o 40 % vyšší, než tomu bylo před průmyslovou revolucí (Kadrnožka, 2008).

Klimatická změna znamená zrychlení dynamiky klimatu a v důsledku této změny dochází ke změnám i v ekosystémech a k jejich poškození. Jedním z nejvýznamnějších faktorů je neustálé střídání teplot, kdy jsou porosty vystaveny extrémně vysokým teplotám se střídáním optimálních podmínek a také změny v distribuci srážek. Klima na Zemi se neustále otepluje. Zvýšená teplota na Zemi je doprovázena často i extrémním suchem, které má pro rostliny negativní důsledky (Mastiláková, 2017).

Změna klimatu vychází ze změny působení skleníkového efektu. Skleníkový efekt znamená, že část slunečního záření projde atmosférou a dopadá na zemský povrch. Povrch Země se tak zahřívá a způsobuje nárůst energie (infračerveného záření), které se odráží zpět do vesmíru. Infračervené záření při tomto zpětném odrazu je zčásti pohlceno skleníkovými plyny a odraženo zpět k zemskému povrchu (Houghton, 2005). Skleníkovým plynem je i voda (Boucher et al., 2004; Zverjaev et al., 2008). Voda se v atmosféře zadržuje v krátkých časových úsecích, CO₂ a další skleníkové plyny až stovky let. Pokud dojde ke zvýšení obsahu CO₂ nebo jiných plynů v ovzduší, zvyšuje se zároveň množství infračerveného záření a tím dochází k nárůstu průměrné roční teploty na Zemi (Nátr, 2000).

Mezi teplotou a množstvím CO₂ existuje dlouhodobá korelace (Petit et al., 1999). Změny klimatu mají pro les negativní i pozitivní důsledky. Mezi pozitivní faktor můžeme zařadit zvýšenou koncentraci CO₂ a prodloužení vegetační doby. Negativním důsledkem je zvýšená teplota ovzduší a pokles množství srážek (Burgess et al., 2010).

Lesy nejsou vystaveny jen působením klimatické změny, ale z části jí i ovlivňují. Les akumuluje a uvolňuje uhlík, zadržuje vodu a brání změnám ve složení půdy. Les si vytváří své mikroklima, k tomu potřebuje ekologickou stabilitu, tj. vhodné druhové složení dřevin a vhodně zvolený způsob hospodaření (O'Connor, 2017).

Lesní půda, zejména humusová vrstva dokáže vázat uhlík. Při oběhu uhlíku v atmosféře hrají důležitou roli asimilační orgány a kořeny rostlin. Lesy tvoří přibližně 1/6 globálního objemu uhlíku. Příjem uhlíku do lesních ekosystémů probíhá jen v rámci fotosyntézy. Do atmosféry se uvolňuje autotrofní a heterotrofní respirací nebo rozkladem mrtvého dřeva. Z abiotických druhů disturbancí nejvyšší ztrátu uhlíku způsobují lesní požáry (De Groot et al., 2006).

Klimatická změna a invazivní hmyz jsou dva nepřehlédnutelné faktory, které ovlivňují trvalou udržitelnost ekosystémů (Bjorkman, Niemela, 2015).

3.8 Teplota a jeho vliv na vývoj rostlin

Vývoj rostlin je velmi závislý na teplotě okolního prostředí, jelikož rostliny nejsou schopny regulovat svou tělesnou teplotu. Při změnách okolní teploty se mění i enzymatické procesy rostlin a tím i jejich vývoj. Tyto reakce probíhají pouze za určité teploty. Při optimální teplotě dosahují rostliny nejvyšších přírůstků a pokud se teplota zvýší na prahovou teplotu daného druhu rostliny, její vývoj se zpomalí či úplně zastaví (teplotní maximum a minimum). Každý druh rostliny má teplotní optimum, maximum a minimum na jiné úrovni, proto je význam „extrémní teploty“ velice relativní. Např. u kukuřice (*Zea mays* L.) bude teplotní extrém mnohem na vyšší úrovni (33–40 °C), než na sezónní zelenině jako je brokolice (*Brassica oleracea* L.), u které je maximální teplota od 25–30 °C (Hatfield et al., 2015).

Růst rostliny znamená nárůst její biomasy jako důsledek probíhající fotosyntézy (Sinclair, Weiss 2010). Van't Hoffovo pravidlo říká, že se reakční rychlost exponenciálně zvyšuje společně s teplotou. Při zvýšení teploty o 10 °C dojde až k trojnásobnému zrychlení reakcí (Procházka, 2003). Pokud dojde ke zvýšení CO₂ v atmosféře, roste tím i optimální teplota rostlin a proces fotosyntézy se zrychluje. Rychlost fotosyntézy závisí i na respiraci rostlin, která také s rostoucí teplotou roste (Cannell, 1998).

3.9 Oxid uhličitý (CO₂) a jeho vliv na rostliny

Oxid uhličitý a jeho koncentrace v atmosféře jsou výrazně ovlivněny antropogenní činností. Obsah CO₂ v ovzduší roste s počtem elektráren spalujících fosilní paliva, zemědělských spalovacích aktivit, počtem lesních požárů atd. (Miner, 2010). Má vliv na radiční bilanci (poměr množství pohlcovaného a emitovaného záření) na Zemi a následnou změnu klimatu (Nátr, 2006). V předindustriální době byl obsah CO₂ v ovzduší 280 ppm, v roce 2000 368 ppm a v roce 2100 se očekává 540–970 ppm (Zvereva et al., 2006). CO₂ ovlivňuje procesy probíhající v rostlině a také vztah rostlin k jejich škůdcům. Nejvýznamněji rychlost fotosyntézy, kdy rostliny produkují více biomasy, dále rostlina mění ukládání zásobních látek a počet průduchů rostlin se snižuje (Medlyn et al., 2001). Fotosyntéza se dělí na dvě části. První část se nazývá světelná fáze, dochází zde k uvolňování kyslíku a rozkladu vody. Po světelné fázi následuje temnostní fáze. V temnostní fázi se redukuje CO₂ a vytvářejí se sacharidy, které slouží jako energie. Dochází zde k nárůstu množství uhlíku v rostlinách (Procházka, 1998). Při ovlivnění procesu fotosyntézy se mění i stavba listů, kde fotosyntéza probíhá. Změna struktury listů se projevuje nejvíce při dospívání rostlin, nejvíce jsou tedy ohroženy mladé rostliny. Dlouhodobě má zvýšená koncentrace uhlíku možný negativní důsledek pro ekosystémy z důvodu poklesu koncentrace živin a vodní zdrojů (Norby et al., 2010; Norby, Zak, 2011).

Biomasa na Zemi vzniká fotosyntézou ze vzdušného CO₂. Zvýšení množství CO₂ urychluje růst stromů (Ainsworth, Long, 2005). Změna množství CO₂ ovlivňuje ukládání dusíku a tím jsou ovlivněny rostlinné komunity a jejich růst (Tilman, 1987). Zvýšené množství CO₂ snižuje koncentraci dusíku a zvyšuje koncentraci nestrukturálních karbohydrátů (NSC), fenolických látek, poměr C:N a zvyšuje koncentraci sekundární metabolitů (Ayres et al., 2000). Při vyšším poměru C:N se předpokládá, že zvýšené množství CO₂ dovolí rostlinám využít sacharidy ze sekundárních metabolitů k tvorbě obranných látek proti herbivornímu hmyzu (Coviella, Trumbler, 1999). Odezva stromů na zvýšení O₃ může být velice variabilní a závisí na stupni citlivosti daného jedince (Karnosky et al., 1999).

3.10 Klimatická změna a její účinky na přítomnost škůdců

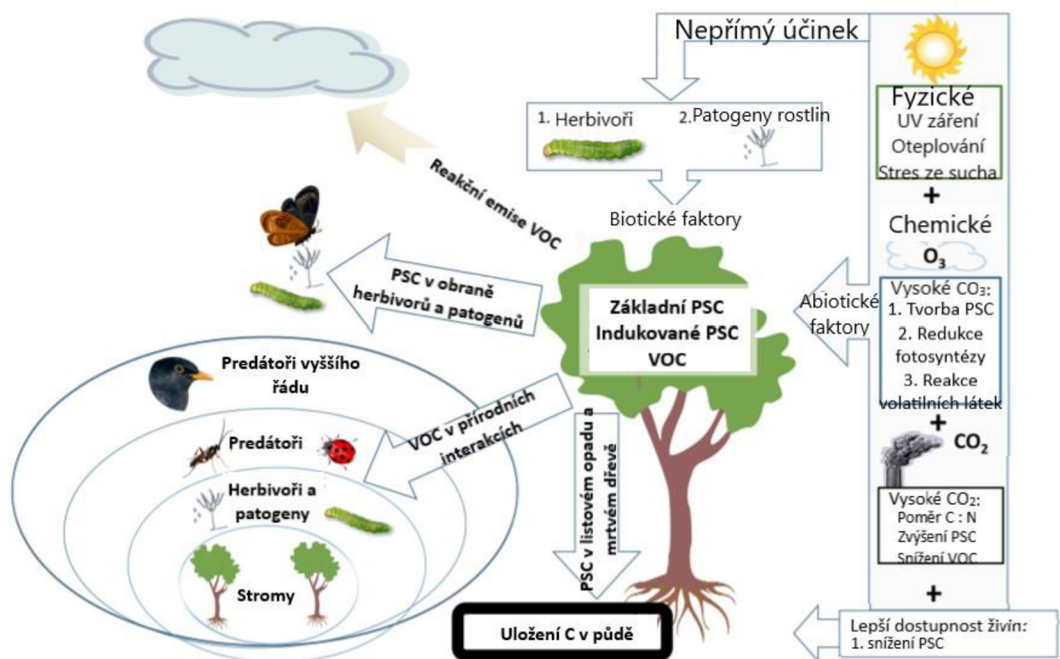
Předpokládané zvyšování množství atmosférického CO₂ a průměrné teploty na Zemi může ovlivnit vztah rostlin a rostlinných škůdců v důsledku přímého působení teploty na vývoj hmyzu a nepřímých důsledcích zvýšení teploty, a tím obohacení fytochemikálií o CO₂, které mají velký vliv na vývoj herbivorního hmyzu (Williams et al., 2003). Očekává se, že průměrná teplota na Zemi v tomto století vzroste o 1,5–4,5 °C a tím se zdvojnásobí i množství CO₂ (Houghton et al., 1996). V řadě již provedených studií bylo dokázáno, že změny v obsahu CO₂ a O₃ v ovzduší mění strukturu a chemické složení listů, a tím může ovlivnit výskyt hmyzích škůdců na rostlině (Lindroth, 1996, 2010; Zvereva, Kozlov, 2006; Valkama et al., 2007). Pokud dojde ke snížení kvality listů rostlin, a tím potravy herbivorů, hmyz je nucen si potravu kompenzovat (Lincoln et al., 1986; Fajer 1989; Williams et al., 1994; Docherty et al., 1996; Hughes, 1997) a dochází k vyšší mortalitě hmyzu (Osbrink et al., 1987; Fajer, 1989). Hmyz krmící se na rostlinách může ovlivnit primární produkci rostlin a hraje významnou roli v sekvestraci uhlíku, tzn. dlouhodobé zachytávání oxidu uhličitého z atmosféry a jeho ukládání v rostlinách, aby se zpomalilo nebo dokonce odvrátilo globální oteplování (Williams et al., 2003). Kalamity škůdců mohou snižovat možnost stromů přeměňovat antropogenní dusík na dlouhodobý dusík, a tím obranu stromů proti ztrátě listů nebo zamezení jejich růstu (Mattson, Addy, 1975; Cook et al., 2008).

Kalamity bekyně velkohlavé také ovlivňuje cyklus živin (Lovett et al., 2002) a zachování živin v ekosystémech (Townsend et al., 2004), jelikož kvůli žíru (v extrémních případech až 100 % listů) nedochází k dopadu listů na zem a jejich rozkladu (Couture et al., 2012).

Nutriční kvalita rostlin je dána zejména poměrem C:N látek v pletivech rostliny. Pokud dojde ke změně plynného složení v ovzduší (nárůstu CO₂), změní se nutriční hodnota jehlic/listů. Rostliny, které rostou v podmínkách zvýšeného CO₂ změní poměr C:N tak, že se zvýší koncentrace uhlíku a koncentrace dusíku se sníží. Aby herbivorní hmyz do sebe dostal potřebné množství dusíkatých látek, musí zvýšit spotřebu potravy, aby do sebe dokázal nutnou dávku těchto látek dostat. Dále při zvýšení CO₂ v ovzduší

dojde ke zvýšení obsahu sacharidů v rostlině a sníží se obsah dusíku, sníží se množství proteinů a rostlina se tak stává méně výživnou (Lincoln et al., 1984).

Několika experimenty bylo dokázáno, že přírůst housenek bekyně velkohlavé se snížil, když se zvýšilo množství CO₂ v atmosféře (Hättenschwiler, Schafellner, 2004). Také bylo dokázáno, že se zvýšením oxidu uhličitého v ovzduší se snižuje koncentrace listového dusíku (Cotrufo et al., 1998). Tyto změny v koncentraci ovlivňují i poměr C:N, množství karbohydrátů a alelochemikálií na bázi uhlíku v rostlinách. Čím je množství dusíku v rostlině vyšší, tím je pro herbivorní hmyz potrava chutnější, hmyz konzumuje rychleji a rychleji se vyvíjí (Hättenschwiler, Schafellner, 1999). Se změnami podmínek se mění i produkce primárních a sekundárních metabolitů rostlin (Zavala et al., 2017). Při zvýšení koncentrace oxidu uhličitého se zvyšuje množství taninů a gossypolu a snižuje tvorbu proteinů (Chen et al., 2005b). U semen řepky se za těchto podmínek zvýšil obsah fenolických látek (Reddy et al., 2004). Je tedy zřejmé, že rostliny rostoucí v podmínkách zvýšeného CO₂ jsou chudším zdrojem živin pro herbivorní hmyz. Housenky živící se těmito listy na tyto změny reagují delším vývojem (Lindroth et al., 1997b) a sníženou plodností samic (Traw et al., 1996). Přímé účinky ovlivňující úspěšnost hmyzu jako je zvýšená teplota, jsou pro hmyz mnohem důležitější než ostatní faktory, které ovlivňují klima Země (Bale et al., 2002). Schéma přímých a nepřímých účinků ovlivňující hmyz a jiné živočichy zobrazuje obrázek 2.



Obrázek 2: Globální klimatická změna – související biotické a abiotické stresové faktory a jejich vliv na produkci sekundárních metabolitů (PSC – plant secondary compounds) v lesních dřevinách (Holopainen, 2018)

Odezva na stres probíhající skrze sekundární metabolity v listech rostliny je znázorněna šipkami na levé straně obrázku. Sekundární metabolity nacházející se v listech rostliny poskytují obranu proti herbivorům a patogenům. Sekundární metabolity v listovém opadu ovlivňují nejvíce dostupnost živin stromů a rhizosférní organismy. V mrtvém dřevě jsou důležitou součástí ukládání oxidu uhličitého a uložené sekundární metabolity by mohly zpomalit rozklad mrtvého dřeva rozkládajícími organismy (dekompozitoři) a uvolnit CO₂ do ovzduší. Volatilní sekundární metabolity (VOC - volatile organic compounds) ovlivňují přírodní vztahy mezi organismy když stromy rostou, zatímco reaktivní volatilní látky ovlivňují atmosféru a mohou ovlivnit atmosfericko-biologický vztah okolního prostředí (Holopainen, 2018).

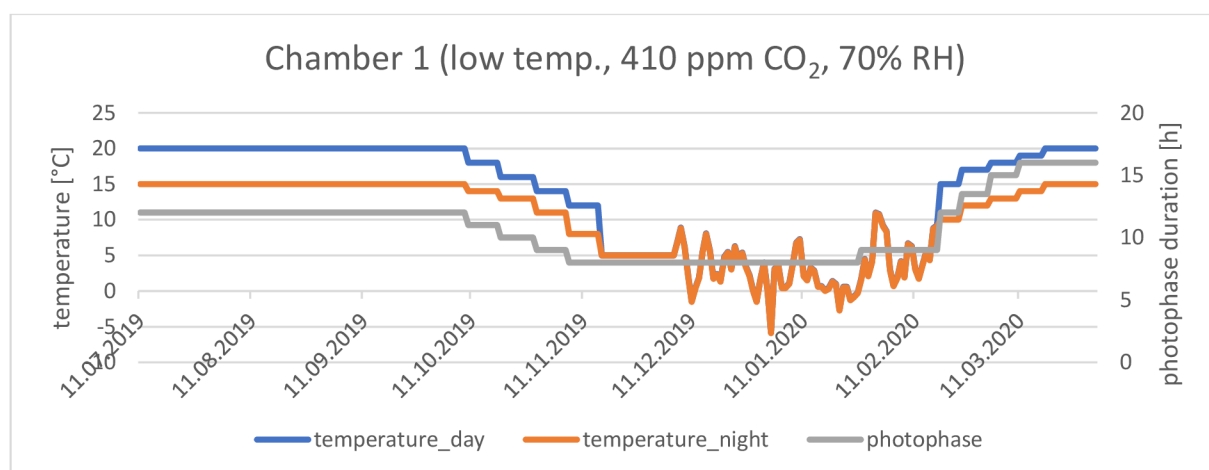
4 Metodika

4.1 Metodika experimentu

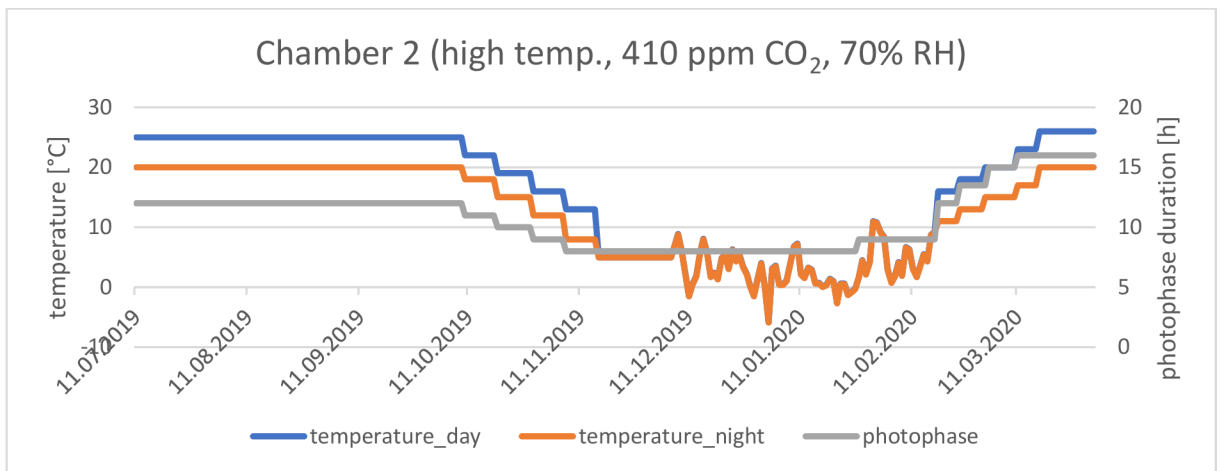
Pro provedení experimentu bylo nutné vypěstovat sazenice v přesně definovaných podmínkách, které zahrnovaly vlhkostní režim a teplotu ovzduší se stanoveným množstvím CO₂. Sazenice se pěstovaly ve fytokomorách Step- In Fytoscope FS-SI 3400 na Fakultě lesnické a dřevařské v Praze (Příloha 1). Pro experiment se využily čtyři fytokomory, tedy čtyři různé růstové podmínky pro sazenice.

Do každé fytokomory bylo umístěno devět čtyřletých sazenic smrku ztepilého a devět dvouletých sazenic dubu. Sazenice byly pěstovány samostatně v pětilitrových květináčích a udržovány ve třech různých vlhkostních režimech: trvalá zálivka dle libosti, trvalé mírné sucho a střídavý režim vysokého zamokření a sucha. Každá z těchto skupin byla aplikována na tři sazenice z každé fytokomory. Pro rozlišení sazenic podle druhu zálivky se použily barevné gumičky, které se na sazenice přivázaly. Sazenice byly do fytokomor umístěny dne 11. července roku 2019. Od 10. listopadu do 6. prosince se teplota a fotoperioda postupně snižovaly. 7. prosince se sazenice přemístily ven (kvůli vegetačnímu klidu) a byly zde ponechány až do 17. února roku 2020. Poté byly opět umístěny do fytokomor a fotoperioda s teplotou se postupně zvyšovaly. Dynamika hodnot použitých parametrů fytokomor v čase je znázorněna na obrázku 3–6.

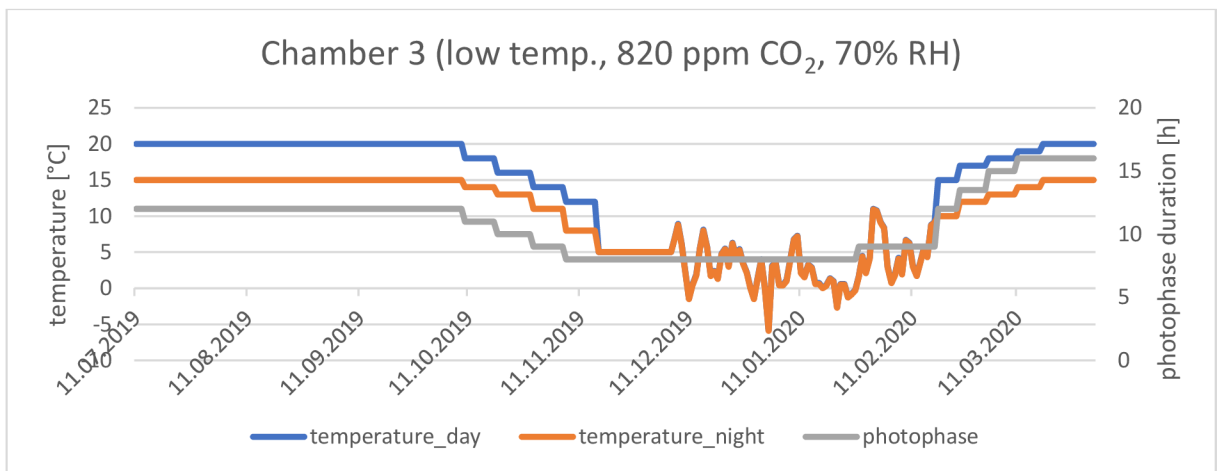
Pro experiment byly použity dvě koncentrace CO₂ aplikované vždy ve dvou fytokomorách. Jedna skupina měla 410 ppm CO₂, druhá skupina dvojnásobek, tj. 820 ppm. V každé skupině se stejným množstvím CO₂ se fytokomory rozdělily na „nízkou“ (20 °C ve dne, 15 °C v noci) a „vysokou“ (25 °C ve dne a 20 °C v noci) teplotu ovzduší. RH bylo u všech fytokomor na stejné hodnotě, a to 70 % (Příloha 2).



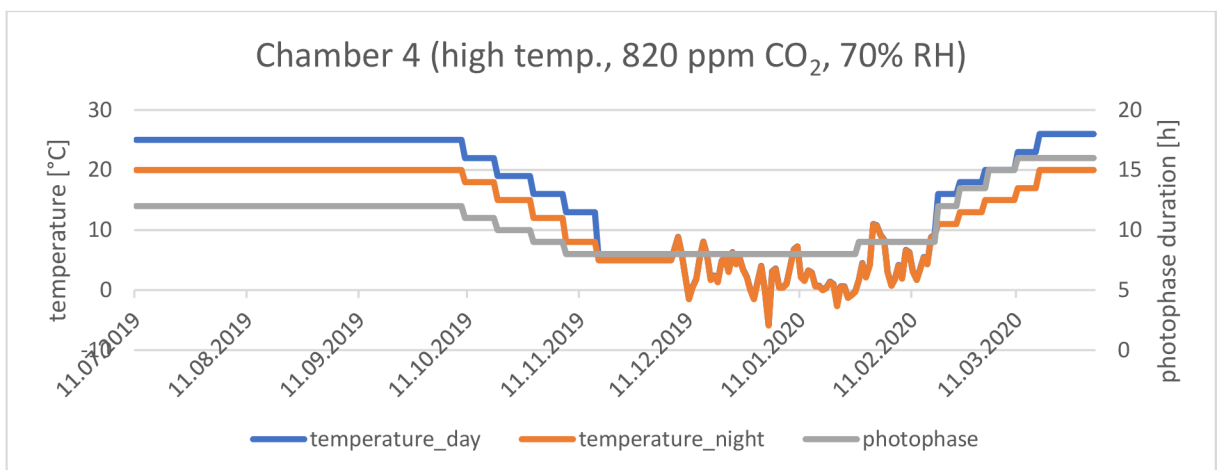
Obrázek 3: Vývoj teplot a fotofáze ve fytokomoře č. 1



Obrázek 4: Vývoj teplot a fotofáze ve fytkomoře č. 2



Obrázek 5: Vývoj teplot a fotofáze ve fytkomoře č. 3



Obrázek 6: Vývoj teplot a fotofáze ve fytkomoře č. 4

V dubnu roku 2020 byla odebrána polovina dostupných jehlic ze sazenic smrků z fytokomory č. 2 a fytokomory č. 4 (tj. rostoucích při vysoké teplotě obou koncentracích CO₂). Odběr druhé části vzorků proběhl v květnu 2020 se všemi ostatními sazenicemi. Odběr proběhl ve dvou měsících (jeden sběr duben, druhý v květnu), protože nutriční hodnota jehlic v dubnu a květnu může být odlišná. Dubnový odběr však byl proveden pouze na smrcích vzhledem k celkově malému množství listů na dubech a potřebě poměrně velkého množství biomasy pro realizaci experimentu s žírem housenek b. velkohlavé. Odebrané listy a jehlice byly ihned zváženy, vloženy do papírových sáčků a zamraženy v kapalném dusíku. Jehlice se poté namlely v mlýně na jemný prášek, ze kterého se dále připravovaly potravinové směsi. Část vzorků se ponechala pro chemickou analýzu.

Před provedením skutečného experimentu byl v únoru a březnu 2021 proveden zkušební experiment, aby byly eliminovány metodické chyby. Testovalo se různé množství potravy, více druhů agarů a několik různých postupů. Ztráta velice limitovaného množství potravinové směsi byla eliminována i takovými detaily, jako je míchání směsi skleněnou tyčinkou, protože na metličce by ulpívala část některých přísad (listová složka). Sledovala se délka instarů, množství zkonsumované potravy, množství vyprodukovaného trusu a celková vitalita housenek.

Pro provedení experimentu byla použita laboratorní kultura bekyně velkohlavé (USDA). Před umístěním vajíček a potravy do klimaboxů se klimaboxy vyčistily, aby nedocházelo k případné kontaminaci vzorků z nečistot lednice. Do připraveného klimaboxu se umístila nádoba s vodou pro udržování vyšší vlhkosti, nastavila se teplota ovzduší na 20 °C a fotoperioda s režimem 16 hodin den, osm hodin noc.

Zahájení experimentu proběhlo dne 6.9. 2021, kdy byla připravena potrava podle originálního receptu v polovičním množství. Na dno plastové krabičky (250ml) se rozlila tenká vrstva navařené potravinové směsi, na které se líhnoucí housenky později živily. Vaječné hubky se rozdělily do více krabiček, aby se housenky netísnily. U takto připravených krabiček (Obrázek 7) se propíchal jehlou víko, pod které se umístil neparfémovaný ubrousek a umístily se do klimaboxu. Před vylíhnutím se krabičky pravidelně kontrolovaly a vysoušely se z nich kapky zkondenzované vody, aby se zabránilo plesnivění vajíček a utopení vylíhlých housenek.



Obrázek 7: Pšeničný agar s hubkou vajíček. Foto: Barbora Dvořáková

Obrázek 8: Petriho miska s housenkami a kouskem pšeničného agaru. Foto: Barbora Dvořáková

Housenky se v krabičkách ponechaly až do druhého instaru. Po prvním svlékání byly housenky rozděleny po 15 kusech na jednu Petriho misku o průměru šest cm a nadále jim byla předkládána potrava po kouskách (Obrázek 8).

Po umístění bekyní do Petriho misek se připravily potravinové agary s listovou složkou. Během jednoho dne byla připravena potrava pro všechny typy vzorků (celkem 10). Kvůli omezenému množství jehlic smrku a listů dubu bylo nutné smíchat vzorky sazenic příslušného druhu dřeviny z jednotlivých fytokomor dohromady, tedy neuvažovat o jednotlivých závlivkových režimech, ale pouze o teplotě ovzduší a koncentraci CO₂.

Po smíchání vzniklo deset různých typů listových vzorků a z těch se později připravila potrava. V tabulce 1 je uvedena použitá váha jehlic/listů pro jednotlivé vzorky k vaření. Recept pro navaření potravy je navržen pro 165 g listové složky, tedy všechny navážky se upravily pro každý vzorek zvlášť podle dostupného množství vzorku.

Tabulka 1: Seznam druhů potravy podle podmínek růstu

ID vzorku	druh	měsíc sběru	CO ₂	teplota	váha (g)
NVD smrk	<i>P. abies</i>	duben	normální	vysoká	35
ZVD smrk	<i>P. abies</i>	duben	zvýšené	vysoká	40
NNK smrk	<i>P. abies</i>	květen	normální	nízká	40
NVK smrk	<i>P. abies</i>	květen	normální	vysoká	40
ZNK smrk	<i>P. abies</i>	květen	zvýšené	nízká	40
ZVK smrk	<i>P. abies</i>	květen	zvýšené	vysoká	40
NNK dub	<i>Q. robur</i>	květen	normální	nízká	20,81
NVK dub	<i>Q. robur</i>	květen	normální	vysoká	23,46
ZNK dub	<i>Q. robur</i>	květen	zvýšené	nízká	20,88
ZVK dub	<i>Q. robur</i>	květen	zvýšené	vysoká	34,15

Recept pro vaření potravy z listů/jehlic:

Pro získání 1 kg potravy je potřeba:

165 g listové složky v prášku

22 g agaru

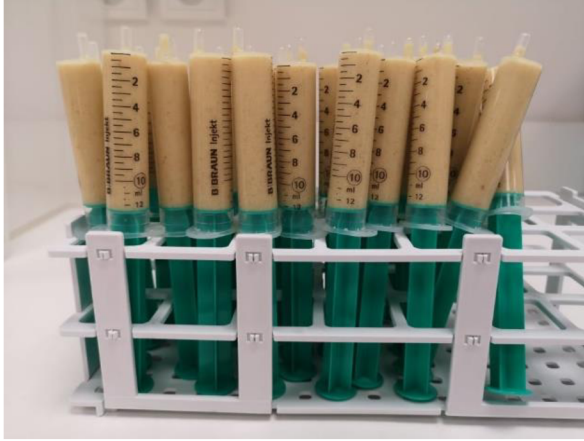
810 ml destilované vody

2 g kyseliny sorbové

1 g methyl parabenzen

Jednotlivé složky potravy zobrazuje tabulka 2. Podrobný postup přípravy byl následující. Nejprve se navázil agar a ten vmíchal do odměřené nezahřáté destilované vody. Poté se voda s rozmíchaným agarem vložila do mikrovlnné trouby a vařila až do úplného rozpuštění agaru. Když byl agar důkladně rozpuštěn, vmíchalo se navážené množství listové složky v prášku. Tato směs se ponechala zchladnout v pokojové teplotě na 50–60 °C (Obrázek 10). Když směs dosáhla požadované teploty,

vmíchaly se ostatní složky potravy – kyselina sorbová a methyl parabenzen. Pro zjednodušení a zároveň vyšší přesnost množství potravy (stejný tvar/váha), která se později podávala housenkám, byl agar rozlit do injekčních stříkaček, ze kterých stačilo po odříznutí vršku potravinovou směs vytlačit podle stupnice stříkačky a směs odříznout (Obrázek 9 a 11).



Obrázek 9: Stříkačky naplněné pšeničným agarem. Foto: Barbora Dvořáková



Obrázek 10: Příprava smrkového agaru. Foto: David Musiolek



Obrázek 11: Stříkačky naplněné smrkovým agarem. Foto: Barbora Dvořáková

Tabulka 2: Seznam jednotlivých složek potravy a jejich množství

Potrava z pšeničných klíčků	
Pšeničné klíčky	60 g
Agar, jemně mletý	7,5 g
Voda, destilovaná	407 ml
Kasein	12,5 g
Vitamín C	2,5 g
Wessonova solná směs	4 g
Kyselina sorbová	1 g
Metylparaben	0,5 g
Chlortetracyklin, HCl	0,05 g
Vitamínová směs	5 g
Citrát železitý	0,05 g

Recept pro vaření potravy byl následující:

Pšeničné klíčky se namlely na jemný prášek, pro experiment byl použit elektrický mlýnek na kávu. Do odměřeného množství destilované vody se rozmíchal agar a přivedl se k varu. Jakmile byl agar ve vodě dobře rozpuštěn, vmíchaly se namleté klíčky společně s kaseinem. Poté se směs odložila a nechala se vychladnout na teplotu 50–60 °C, aby po přidání dalších složek potravy nedošlo k jejich poškození vysokou teplotou. Po dosažení požadované teploty se do směsi přidala vitamínová směs a další potřebné ingredience. Po důkladném rozmíchání bylo potřeba směs rozlít do Petriho misek (Obrázek 12) a po zchladnutí se směs uschovala a skladovala v lednici při teplotě 4 °C, víkem dolu, po dobu až 3 týdny. Petriho misky s potravou se zafixovaly parafilmem, aby se zamezilo vysychání a kontaminaci potravy z nečistot v lednici.



Obrázek 12: Příprava pšeničného agaru. Foto: Barbora Dvořáková

Dne 27.9. byla většina housenek svléknutých do L3, proto byly přemístěny do nových Petriho misek. Housenkám se již podala experimentální potrava z listů a jehličí. Pro každý druh potravy bylo použito celkem 40 ks housenek (osm misek po pěti housenkách).

Housenky se sledovaly pravidelně v krátkých časových intervalech. Jakmile se housenka dostala do premolt stadia, pro které je charakteristická vystouplá hlava a nepřijímání potravy, byla přemístěna do Petriho misky a ponechána bez potravy až do svlékání do L4. Bylo tak zajištěno, že housenka bude žrát přesnou váhu potravy pouze v požadovaném čtvrtém instaru.

Housenky se kontrolovaly každé cca dvě až tři hodiny, aby byly co nejdříve po svlékání umístěné jednotlivě na experimentální potravu. U každé housenky byla zaznamenána její hmotnost a byla ji poskytnuta potrava z příslušné agarové směsi o váze cca 1,5 g. Také byl zaznamenán přesný čas nasazení housenky na agar. Poté byly umístěny do klimaboxu (Obrázek 13 a 14). Po třech dnech žíru se housence přidal nový kousek potravy, aby experiment nebyl ovlivněn vyschnutím agarové směsi předložené housenkám. Housenky se na potravě ponechaly po dobu přesně pěti dnů, aby nedocházelo ke svlékání do pátého instaru a housenky tak mohly být opět zváženy a zaznamenána jejich hmotnost na konci čtvrtého instaru. Po zvážení housenek se umístily jednotlivě do 2-ml zkumavek a byly zamrazeny pro další zpracování. Kromě housenky se také sebral veškerý její trus a zbylá potrava, které se také uložily do mrazáku, aby mohly být později společně se vzorky celého experimentu vysušeny

a zváženy. U každého druhu potravinového agaru se použilo od 25 do 28 experimentálních housenek.

Pro vyšší přesnost experimentu se změřila i míra vysychání potravinových směsí v průběhu pěti dnů. Po shromáždění většího množství vzorků (trusinek, housenek, nedožrané potravy) se postupně vysušovaly v sušárně při teplotě 60 °C po dobu jednoho týdne. Po týdnu sušení se opět všechny vzorky ihned zvážíly a hodnoty se zaznamenaly. U potravy se zaznamenala živá váha a po ukončení žíru housenek a následném vysušení suchá váha zbylé potravy. Trus se vážil pouze vysušený. U housenek se zjišťovala živá (fresh weight) i suchá váha (dry weight) na konci i začátku sledovaného období.



Obrázek 13: Klimabox s experimentálními housenkami. Foto: David Musiolek

Obrázek 14: Experimentální housenky s potravou. Foto: David Musiolek

Počáteční suché hmotnosti housenek byly vypočteny na základě poměrů FW:DW (fresh weight/dry weight) housenek, které se ihned po svlečení do čtvrtého instaru zamrazily. Obsah vody v housenkách se vypočítal poměrem z živé hmotnosti housenek na začátku a hmotnosti vysušených housenek na konci sledovaného období $[(FW-DW)*100]/FW$. Tyto hodnoty se zaznamenaly u každé experimentální housenky. Z těchto získaných hodnot se vypočítala průměrná hodnota pro každý druh potravy a hodnota byla následně použita pro výpočet (odhad) suché hmotnosti housenek na začátku sledovaného období. Výpočet takto suché hmotnosti housenek se vypočítal jako poměr hmotnosti housenek na začátku sledovaného období a vypočítaného průměrného obsahu vody (WC) v housenkách $FW-[(FW*WC)/100]$. Hmotnost sušiny předkládané potravy se vypočítala stejným způsobem jako suchá počáteční hmotnost housenek.

Pro vyhodnocení experimentu byly vypočteny následující nutriční indexy:

1) Relativní tempo růstu (Relative grow rate)

$$\text{RGR} = (\log W_2 - \log W_1) / t$$

W2..suchá hmotnost housenky na konci

W1..suchá hmotnost housenky na začátku

t..délka sledovaného období (dny)

2) Přibližná stravitelnost (%) (Approximate digestibility)

$$\text{AD} = [(Q-F)/Q]*100$$

Q..suchá hmotnost sežrané potravy

F..suchá hmotnost vyprodukovaného trusu

3) Účinnost přeměny přijaté potravy (%) (Efficiency of conversion of ingested food)

$$\text{ECI} = [(W_2 - W_1)/Q]*100$$

4) Účinnost přeměny strávené potravy (%) (Efficiency of conversion of digested food)

$$\text{ECD} = [(W_2 - W_1)/(Q-F)]*100$$

Tyto indexy jsou běžně používanými nutričními indexy (Castagneyrol et al., 2018).

4.1 Chemická analýza asimilačních orgánů

Kromě sledování prospívání samotných housenek se provedla i chemická analýza asimilačních orgánů sazenic, které byly v experimentu využity pro přípravu jednotlivých druhů potravy. Znalost chemických látek obsažených v listech/jehlicích je důležitá pro porovnání výsledků prospívání housenek s množstvím sekundárních metabolitů v rostlině. Průměrný obsah alelochemických látek zobrazuje tabulka 13. Kromě koncentrace obranných látek se provedla i analýza obsahu sacharidů (Tabulka 14). Pro zjištění vlivu obranných látek na prospívání housenek byl průměrný obsah těchto látek porovnán s jednotlivými nutričními indexy a jejich závislost vyobrazuje tabulka 15. Přesný postup chemické analýzy lze najít v příloze 3.

4.2 Statistické zpracování

Pro zvolení vhodných statistických testů bylo nutné ověřit, zda data mají normální rozdělení. Po ověření normality (Kolmogorovo-Smirnovým, Lillieforsovým a Shapiro-Wilkovým testem) (Tabulka 3 a 4) byla pro srovnání středních hodnot (váha živých housenek, váha vysušených housenek, váha vysušeného trusu, indexy relativního tempa růstu, přibližné stravitelnosti, účinnosti přeměny přijaté potravy a účinnost přeměny strávené potravy) použita jednofaktorová ANOVA. Po zamítnutí nulové hypotézy, tzn., že střední hodnoty nebyly statisticky signifikantně odlišné, byl pro odhalení rozdílů mezi jednotlivými treatmenty použit test mnohonásobného porovnání, Schéffeho test. Výsledky použití tohoto testu zobrazují tabulky 5–12, kde jsou hvězdičkami označeny homogenní skupiny výše vyjmenovaných závislých proměnných, jejichž střední hodnoty se nelišily.

Ke statistickému vyhodnocení všech výsledků experimentu byl použit program STATISTICA 12.0.

5 Výsledky

Ověření normality pomocí Kolmogorovo-Smirnových testem, Lillieforsůvým testem a Shapiro-Wilkůvým testem je uvedeno v tabulce 3 a 4.

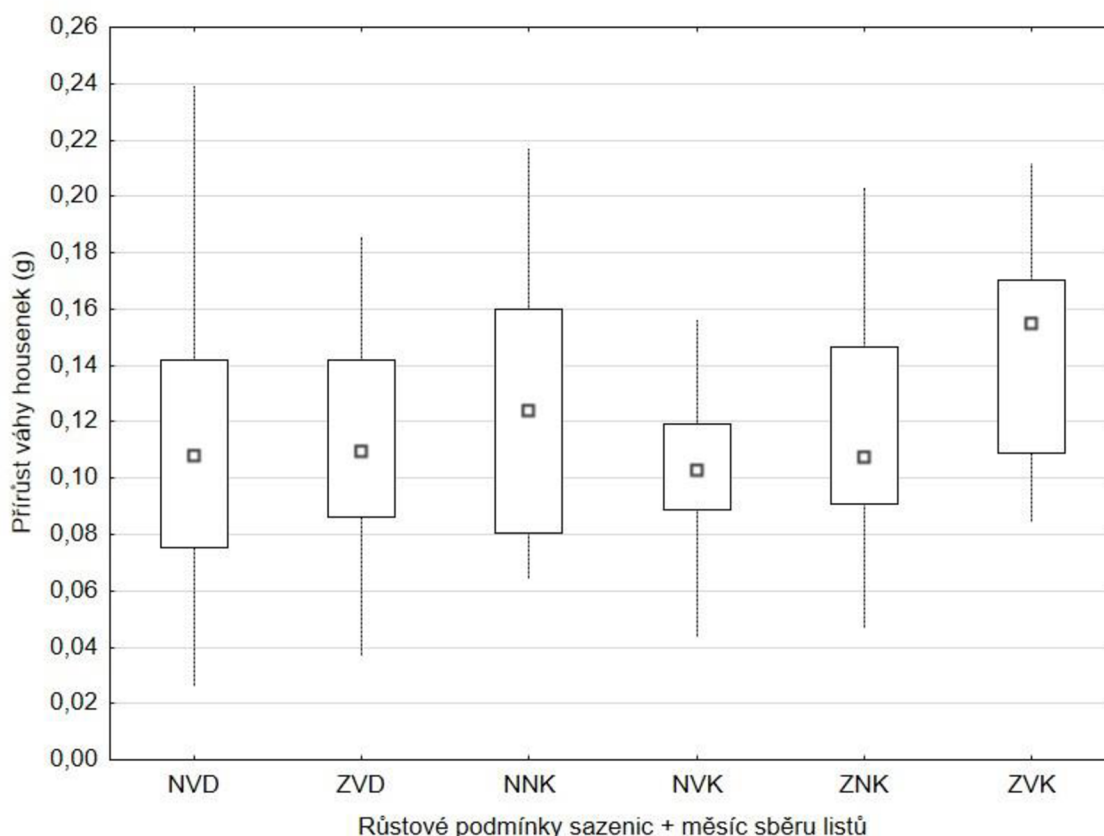
Tabulka 3: Ověření normality váhy trusu housenek krmených na daném druhu potravy

Potrava	K-S	p	Lilliefors p	Shapiro-Wilk	p
NNK dub	0,11577	0,2	0,2	0,97814	0,8181
NVK dub	0,8054	0,2	0,2	0,96388	0,49706
ZNK dub	0,1903	0,2	0,05	0,86648	0,00368
ZVK dub	0,11429	0,2	0,2	0,96769	0,5201
NVD smrk	0,11769	0,2	0,2	0,95134	0,38793
ZVD smrk	0,14168	0,2	0,2	0,96032	0,63748
NNK smrk	0,1197	0,2	0,2	0,94046	0,13777
NVK smrk	0,12745	0,2	0,2	0,96263	0,57068
ZNK smrk	0,10626	0,2	0,2	0,9594	0,56055
ZVK smrk	0,1035	0,2	0,2	0,97309	0,66541

Tabulka 4: Ověření normality přírůstu čerstvých housenek krmených na daném druhu potravy

Potrava	K-S	p	Lilliefors p	Shapiro-Wilk	p
NNK dub	0,14875	0,2	0,1	0,94453	0,15758
NVK dub	0,92889	0,2	0,2	0,96125	0,43989
ZNK dub	0,1687	0,2	0,1	0,93152	0,13198
ZVK dub	0,13718	0,2	0,15	0,9389	0,10364
NVD smrk	0,14036	0,2	0,2	0,95918	0,52764
ZVD smrk	0,957	0,2	0,2	0,98051	0,96158
NNK smrk	0,13589	0,2	0,2	0,92849	0,7132
NVK smrk	0,12523	0,2	0,2	0,94475	0,27013
ZNK smrk	0,16187	0,2	0,2	0,92611	0,1468
ZVK smrk	0,13773	0,2	0,15	0,95298	0,23519

pozn. zamítnuté hodnoty červenou barvou



Obrázek 15: Přírůst čerstvé hmotnosti housenek živících se na potravě ze sazenic smrku pěstovaných za různých podmínek (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK... zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

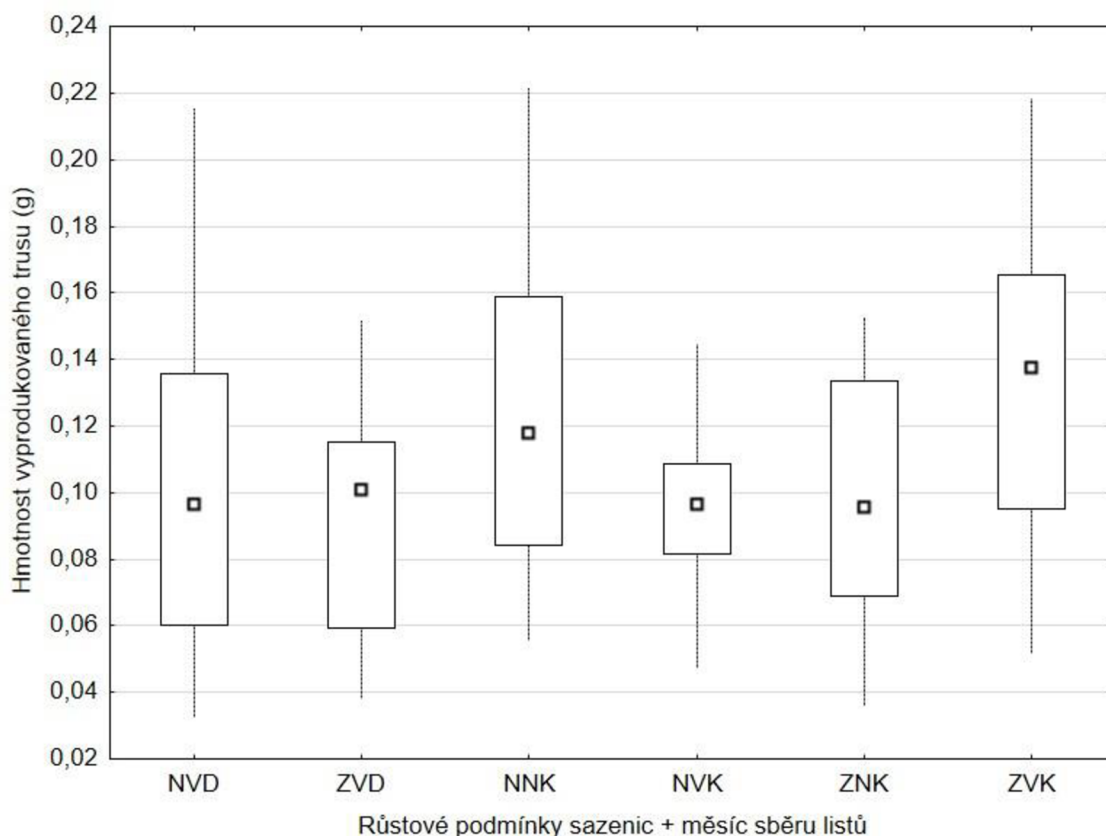
Housenky krmené na potravě z jehlic sebraných v květnu vážily více než housenky krmené na potravě z jehlic sebraných v dubnu. Největší přírůst měly housenky krmené na potravě za zvýšeného množství CO₂ (820 ppm) a vysoké teploty. Druhé největší přírůsty měly housenky krmené na potravě za normálního množství CO₂ (410 ppm) a nízké teploty. Přírůsty na ostatních potravních skupinách jsou podobné (Obrázek 15). Normalita byla splněna (Tabulka 4).

Tabulka 5: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny
NVK	0,104089	****
NVD	0,111540	****
ZVD	0,113206	****
ZNK	0,118228	****
NNK	0,124462	****
ZVK	0,144496	****

Současný efekt: $F(5, 121)=2,9594$, $p=,01480$

Podle tabulky 5 nejsou mezi jednotlivými druhy potravy ze smrku rozdíly v přírůstu živé hmotnosti housenek.



Obrázek 16: Vyprodukovaný trus housenek živících se na potravě ze sazenic smrku pěstovaných za různých podmínek (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

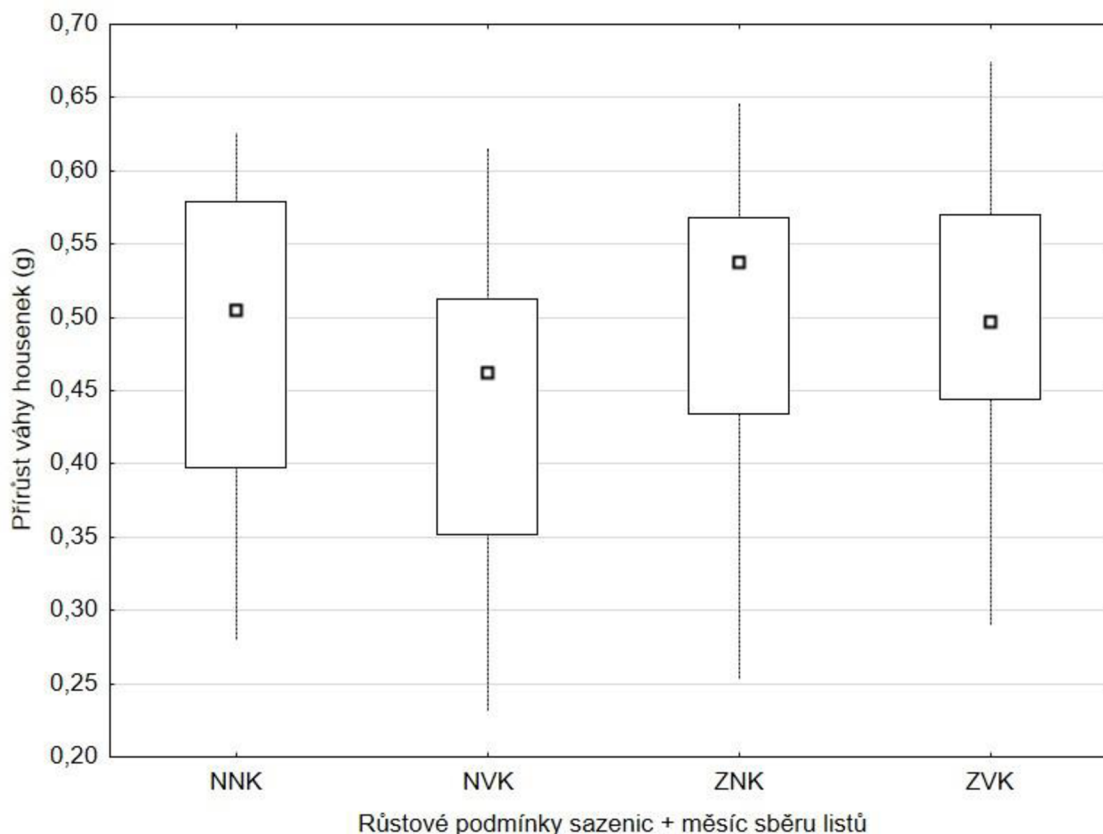
Housenky krmené na potravě z jehlic sazenic pěstovaných za zvýšeného množství CO₂ (820 ppm) produkovaly nejvíce trusu. Druhá nejvyšší produkce trusu byla housenek krměných na potravě z jehlic sazenic pěstovaných za podmínek normální (nízké) koncentrace CO₂ (410 ppm) a nízké teploty (Obrázek 16). Množství produkovaného trusu odpovídá přírůstu housenek na předchozím grafu (Obrázek 15). Normalita byla splněna (Tabulka 3).

Tabulka 6: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny
ZVD	0,092653	****
NVK	0,098028	****
ZNK	0,098283	****
NVD	0,102760	****
NNK	0,124569	****
ZVK	0,133389	****

Současný efekt: $F(5, 121)=4,0628, p=,00192$

Podle tabulky 6 není rozdíl mezi váhami trusu housenek krmených různými druhy potravy připravené ze smrku.



Obrázek 17: Příklad živé hmotnosti housenek živících se na potravě ze sazenic dubu pěstovaných za různých podmínek (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

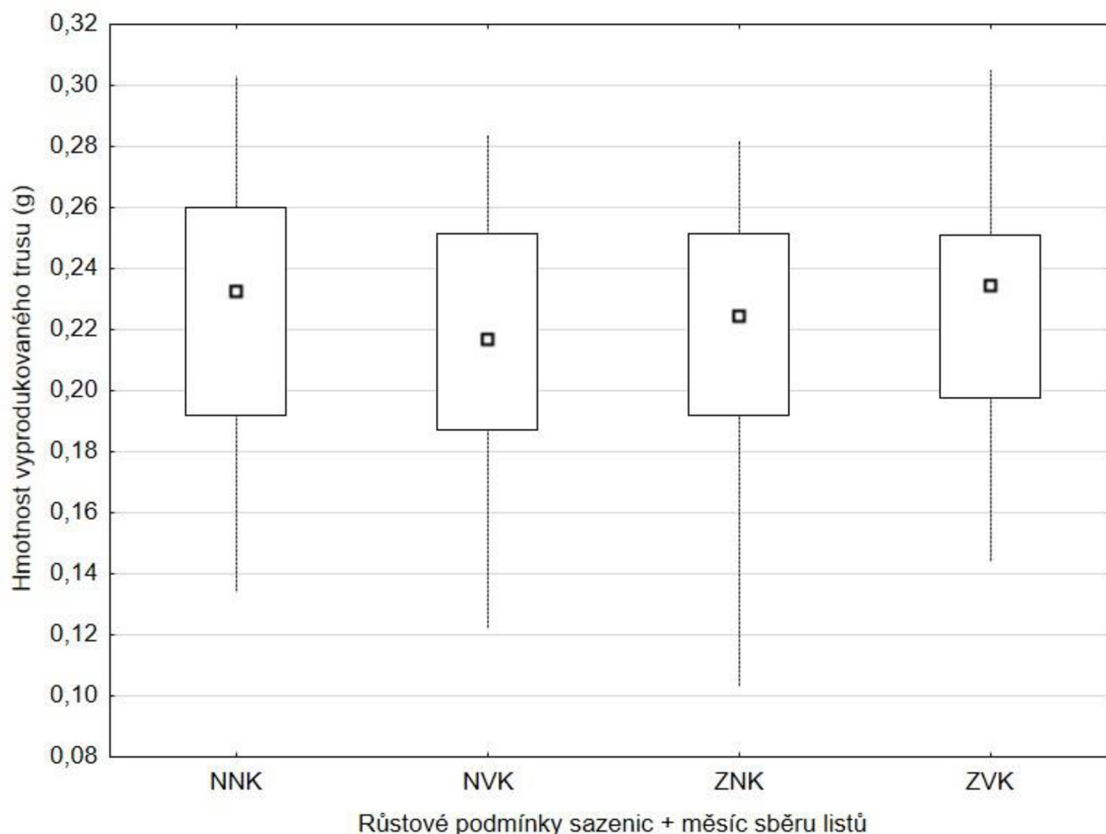
Housenky krmené na potravě z listů dubu měly vyšší přírůst než housenky krmené smrkovou potravou (obrázek 15). Nejvyšší přírůst měly housenky krmené na potravě z listů sazenic pěstovaných za podmínek zvýšeného množství CO₂ (820 ppm) a nízké teploty. Na potravě z listů sazenic pěstovaných za normální (nízké) koncentrace CO₂ (410 ppm) a nízké teploty a zvýšené koncentrace CO₂ (820 ppm) a vysoké teploty měly housenky stejný přírůst. Nejnižší přírůst měly housenky na potravě ze sazenic pěstovaných za podmínek normálního množství CO₂ (410 ppm) a vysoké teploty (Obrázek 17). Normalita byla splněna (Tabulka 4).

Tabulka 7: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny
NVK	0,447344	****
NNK	0,485989	****
ZVK	0,495467	****
ZNK	0,503174	****

Současný efekt: $F(3, 98)=1,5246, p=,21292$

Podle tabulky 7 nejsou mezi jednotlivými druhy potravy z dubu rozdíly na přírůstu živé hmotnosti housenek.



Obrázek 18: Vyprodukovaný trus housenek živících se na potravě ze sazenic dubu pěstovaných za různých podmínek (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

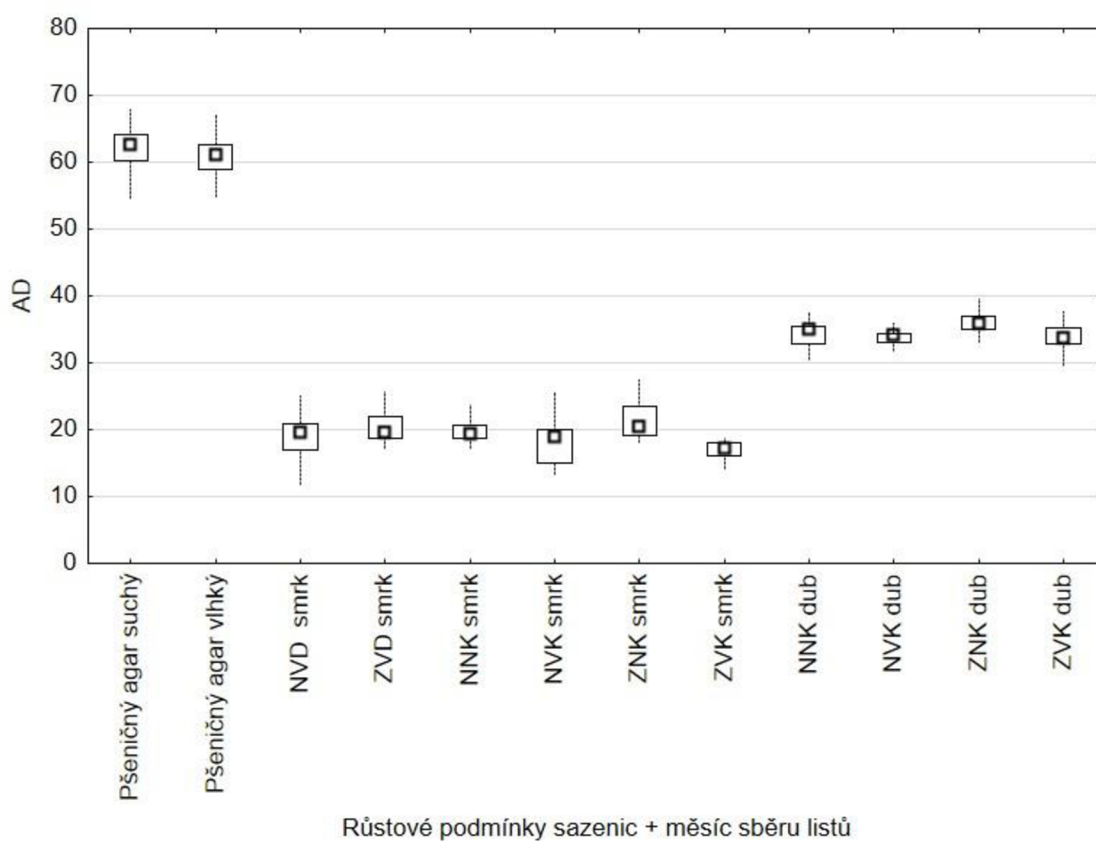
Housenky krmené na potravě z listů dubů produkovaly podobné množství trusu na všech druzích potravu. Nejmenší množství trusu měly housenky krmené potravou z listů sazenic pěstovaných za podmínek normální (nízké) koncentrace CO₂ (410 ppm) a vysoké teploty (Obrázek 18). Normalita byla splněna (Tabulka 3).

Tabulka 8: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny
ZNK	0,214326	****
NVK	0,214824	****
ZVK	0,223619	****
NNK	0,224419	****

Současný efekt: $F(3, 98)=,40007, p=,75325$

Podle tabulky 8 není rozdíl mezi váhami trusu housenek krmených různými druhy potravy připravené z dubu.



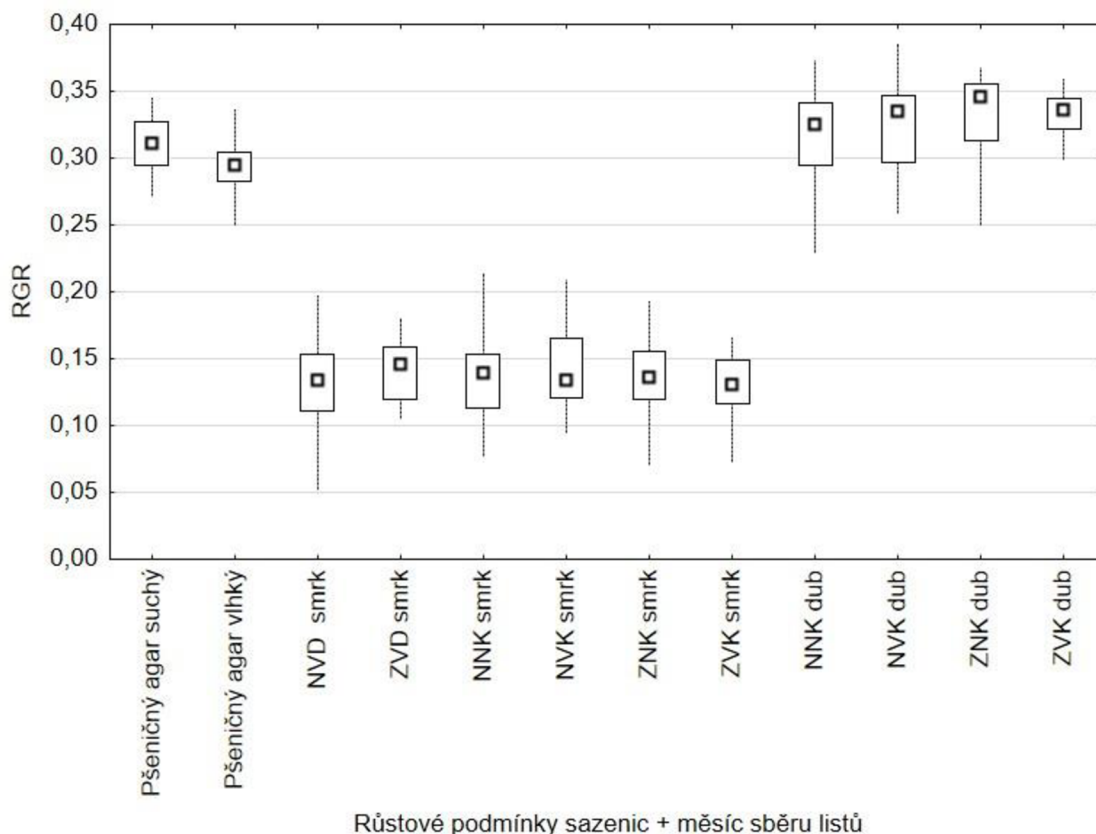
Obrázek 19: AD index – přibližná stravitelnost (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

Tabulka 9: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny			
ZVK smrk	16,93081	****			
NVK smrk	18,30926	****			
NVD smrk	18,87599	****	****		
NNK smrk	19,66802	****	****		
ZVD smrk	20,21120	****	****		
ZNK smrk	21,65347		****		
NVK dub	33,71683			****	
ZVK dub	33,89484			****	
NNK dub	34,43096			****	
ZNK dub	35,99208			****	
Pšeničný agar vlhký	61,02108				****
Pšeničný agar suchý	62,10790				****

Současný efekt: $F(11, 292)=1459,6, p=0,0000$

Potrava připravená z dubu byla pro housenky b. velkohlavé stravitelnější než potrava připravená ze smrku. Nejlépe stravitelnou byla potrava z pšeničného agaru. Pro důkaz, že různý obsah vody v potravě neovlivňuje stravitelnost potravy, byly porovnány dva vzorky potravy připravené z pšenice (vzorek s malým obsahem vody a vzorek s vysokým obsahem vody) (Obrázek 19). Není rozdíl mezi stravitelností potravy u různých druhů potravy z dubu. U smrku byla nejstravitelnější potrava ZNK, která se jako jediná lišila od ostatních druhů potravy smrku (Tabulka 9).



Obrázek 20: RGR index - relativní tempo růstu (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; ; NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

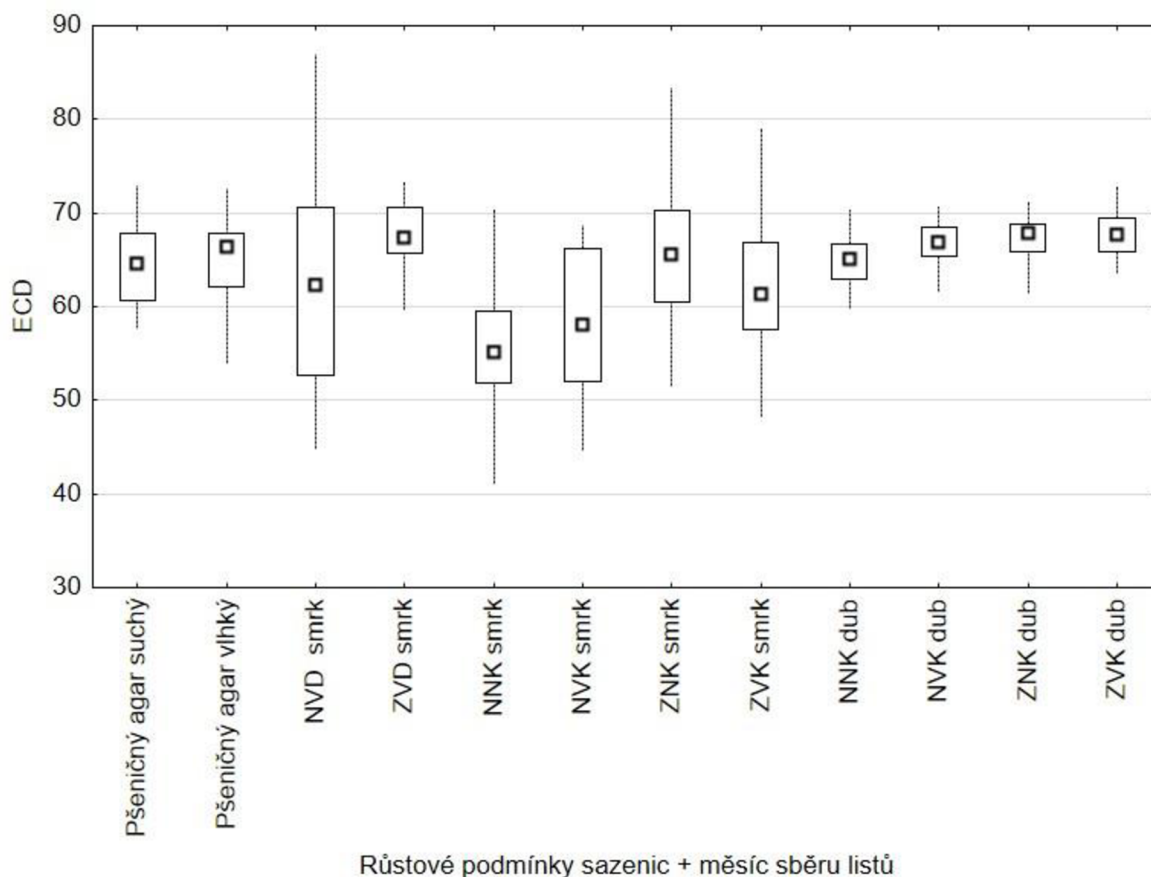
Housenky krmené potravou z dubu rostly nejrychleji ze všech druhů předkládané potravy. Nejnižší přírůstek měly housenky krmené potravou ze smrku (Obrázek 20).

Tabulka 10: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny		
ZVK smrk	0,128479	****		
NVD smrk	0,131536	****		
NNK smrk	0,136034	****		
ZNK smrk	0,136214	****		
ZVD smrk	0,142244	****		
NVK smrk	0,142712	****		
Pšeničný agar vlhký	0,292450			****
Pšeničný agar suchý	0,309480		****	****
NNK dub	0,317276		****	****
NVK dub	0,324290		****	****
ZVK dub	0,332738		****	
ZNK dub	0,334256		****	

Současný efekt: $F(11, 296)=273,64, p=0,0000$

Relativní tempo růstu bylo nejnižší na potravách ze smrku. Nebyl rozdíl mezi prospíváním housenek mezi jednotlivými druhy smrkové potravy. Nejvyšší hodnoty ve srovnání s ostatními variantami byly u housenek krměných na potravách ZVK a ZNK. Tyto dvě varianty byly nejvíce odlišné od ostatních variant potravy, ale nebyly odlišné od ostatních skupin v rámci dubu (Tabulka 10).



Obrázek 21: ECD index - účinnost přeměny strávené potravy (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; ; NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

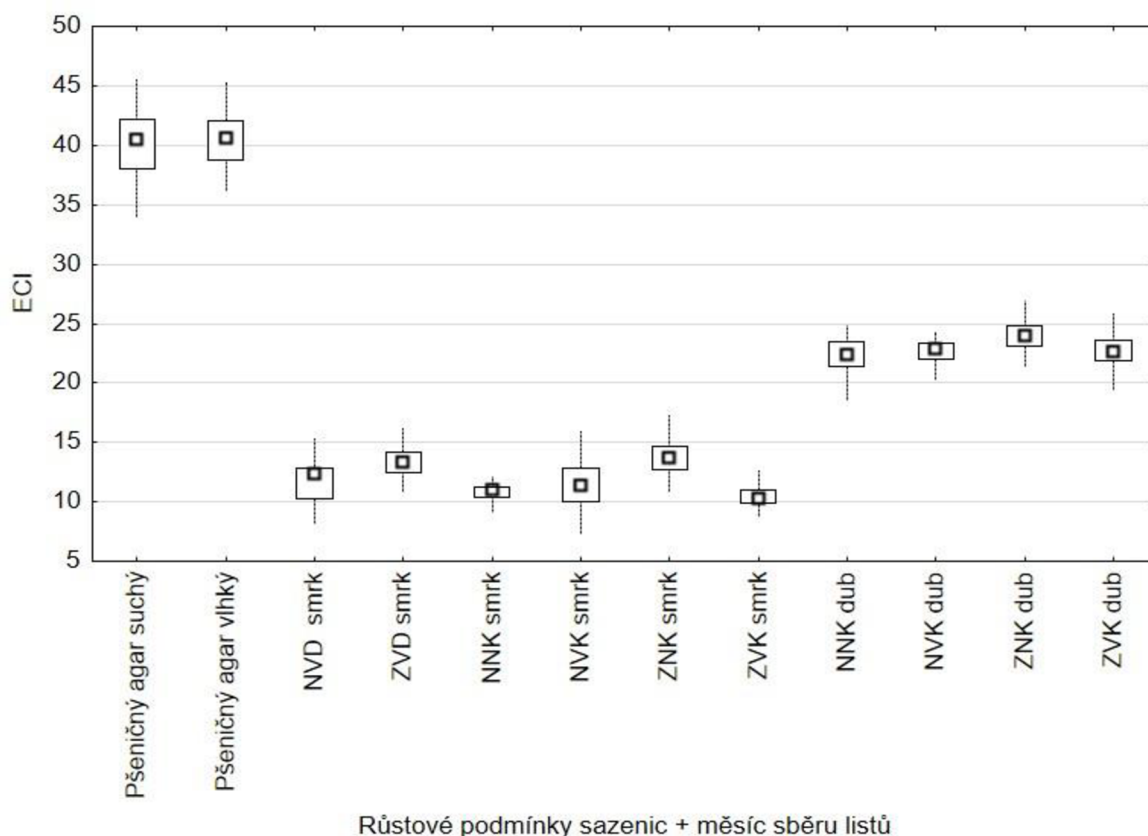
Účinnost přeměny strávené potravy byla u všech druhů potravy stejná (Obrázek 21).

Tabulka 11: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny		
NNK smrk	56,03208			****
NVK smrk	58,59854		****	****
NVD smrk	62,14697	****	****	****
ZVK smrk	62,52485	****	****	****
Pšeničný agar suchý	64,57668	****	****	
NNK dub	64,93657	****	****	
Pšeničný agar vlhký	65,21303	****	****	
ZNK smrk	66,16781	****	****	
NVK dub	66,77296	****	****	
ZNK dub	67,33119	****		
ZVK dub	67,61088	****		
ZVD smrk	67,82474	****	****	

Současný efekt: $F(11, 280)=9,2236$, $p=,00000$

Účinnost přeměny strávené potravy u různých druhů potravy se významně nelišila (Tabulka 11).



Obrázek 22: ECI index - účinnost přeměny přijaté potravy (čtvereček...medián; krabice...25% a 75% kvantil; úsečky...minimum a maximum; ; NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu).

Účinnost přeměny přijaté potravy byla nejvyšší u housenek krmených na potravě z pšenice. U housenek krmených potravou ze smrku byla tato účinnost nejnižší (Obrázek 22).

Tabulka 12: Porovnání hodnot Scheffého testem

Potrava	Medián	Homogenní skupiny			
ZVK smrk	10,51307	****			
NNK smrk	10,73857	****			
NVK smrk	11,42254	****	****		
NVD smrk	11,75508	****	****		
ZVD smrk	13,38504		****		
ZNK smrk	13,72852		****		
NNK dub	22,36377			****	
NVK dub	22,62640			****	
ZVK dub	22,68912			****	
ZNK dub	24,06810			****	
Pšeničný agar suchý	40,02864				****
Pšeničný agar vlhký	40,39950				****

Současný efekt: $F(11, 290)=1077,9, p=0,0000$

Účinnost přeměny přijaté potravy byla nejnižší u smrku a nejvyšší u pšeničného agaru. Ve skupině smrkových potrav byla nejvíce přeměnitelná potrava ZVD a ZNK, která se ale nelišila od potrav NVK a NVD (Tabulka 12).

Tabulka 13: Průměrný obsah alelochemických látek v jednotlivých druzích potravy (NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

Potrava	Celkový obsah fenolů		Celkový obsah flavonoidů		Celkový obsah kondenzovaného taninu		Celkový obsah tříslovin	
	Průměr, mgTA/g	Směr. Odchylka	Průměr, mg/g	Směr. Odchylka	Průměr, mgCD/g	Směr. Odchylka	Průměr, mgTA/g	Směr. Odchylka
NVD smrč	49,24	0,83	31,2	0,6	1,47	0,01	0,40	0,03
NNK smrč	49,87	3,69	34,3	0,4	6,59	0,01	0,42	0,01
ZVD smrč	52,42	6,02	27,4	0,9	2,17	0,04	0,36	0,00
NVK smrč	65,81	0,83	33,7	0,6	1,10	0,04	0,42	0,07
ZNK smrč	51,84	0,27	27,8	0,2	2,25	0,03	0,35	0,02
ZVK smrč	52,16	1,39	33,5	0,5	4,95	0,06	0,39	0,02
NNK dub	91,67	2,12	36,3	0,7	6,21	0,10	0,47	0,03
NVK dub	52,74	1,75	25,9	0,4	3,28	0,01	0,30	0,00
ZNK dub	74,01	2,90	32,5	0,3	5,66	0,01	0,43	0,00
ZVK dub	77,35	0,86	26,5	1,4	6,21	0,03	0,46	0,02

Tabulka 14: Průměrný obsah cukrů v jednotlivých druzích potravy ((NVD...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; ZVD...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v dubnu; NNK...nízká koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; NVK...nízká koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu; ZNK...zvýšená koncentrace CO₂ a nízká teplota, sběr v květnu; ZVK...zvýšená koncentrace CO₂ a vysoká teplota, sběr v květnu)

Potrava	Sacharóza		Fruktóza		Glukóza		Rafinóza	
	Průměr, mg/g	Směr. Odchylka	Průměr, mg/g	Směr. Odchylka	Průměr, mg/g	Směr. Odchylka	Průměr, mg/g	Směr. Odchylka
NVD smrč	20,4	1,0	3,1	0,1	2,4	0,3	0,11	0,02
NNK smrč	23,4	0,7	2,6	0,2	1,9	0,0	0,09	0,01
ZVD smrč	24,5	1,3	3,0	0,1	2,6	0,1	0,13	0,02
NVK smrč	21,1	0,2	2,2	0,2	1,3	0,2	0,15	0,03
ZNK smrč	23,5	0,8	3,0	0,1	2,3	0,1	0,22	0,01
ZVK smrč	20,4	0,1	2,2	0,1	1,1	0,3	0,09	0,03
NNK dub	27,5	0,1	3,1	0,1	2,7	0,0	0,22	0,11
NVK dub	26,9	0,1	2,8	0,3	2,6	0,1	0,24	0,03
ZNK dub	25,7	0,8	2,8	0,1	2,3	0,3	0,25	0,01
ZVK dub	23,9	0,4	3,8	0,1	3,9	0,4	0,29	0,01

Tabulka 15: Porovnání závislosti alelochemických látek s nutričními indexy (AD...Přibližná stravitelnost; RGR... Relativní tempo růstu; ECD... Účinnost přeměny strávené potravy; ECI... Účinnost přeměny přijaté potravy)

Průměrný index	Průměrný obsah fenolů		Průměrný obsah flavonoidů		Průměrný obsah kondenzovaného taninu		Průměrný obsah tříslovin	
	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²
AD	0,0149	0,5437	0,7146	0,0176	0,1509	0,2397	0,4488	0,0735
RGR	0,0226	0,4981	0,6441	0,028	0,1237	0,27	0,5116	0,0557
ECD	0,4568	0,071	0,085	0,3255	0,7713	0,0112	0,5152	0,0548
ECI	0,0276	0,4747	0,5011	0,0584	0,1726	0,219	0,5973	0,0364

6 Diskuze

Housenky krmené na potravě připravené z dubu měly vyšší přírůst hmotnosti než housenky krmené na potravě ze smrku. To potvrzuje předpoklad, že housenkám bekyně velkohlavé se lépe daří na listnatých dřevinách a jehličnaté dřeviny vyhledávají až v případě nouze (Pogue et al., 2007).

Ontogenetický vývoj housenek b. velkohlavé velmi ovlivňuje druh hostitelské dřeviny. Housenky nejlépe prospívají na listnatých dřevinách. Při srovnání různých druhů dřevin housenky nejlépe rostly a přežívaly na bříze (*Betula* spp.), buku (*Fagus sylvatica* L.), dubu (*Quercus* spp.) a javoru (*Acer* spp.) (Barbosa et al., 1979). Důvodem proč housenky preferují listnaté dřeviny může být koncentrace obranných látek, jako jsou fenolické látky (např. glykosidy) nebo alkaloidy, které jsou obsaženy v jehličnatých dřevinách. Na druhou stranu tvrdost jehlic není rozhodujícím faktorem při výběru hostitelské dřeviny (Barbosa et al., 1979). Housenky b. velkohlavé se vyhýbají i určitým druhům listnatých dřevin, jako je jasan (*Fraxinus* spp.) nebo ptačí zob (*Ligustrum vulgare* L.) (Schedl, 1936). Gansner a Herrick (1985), zjistili jen 0,07% defoliaci jasanu s porovnáním s dubem, kde defoliace byla téměř 100%. Listnaté dřeviny také lépe snášejí defoliaci než jehličnaté dřeviny (Keena et al., 2020).

Vývoj fytofágního hmyzu je zprostředkován kombinací různých faktorů přítomných v pletivech hostitelských dřevin. Mezi tyto faktory patří nutriční hodnota asimilačních orgánů, ale i alelochemické složky, které se také odrážejí na kvalitě hostitelské dřeviny (Scriber, Slansky 1981; Stamp, 1990). Mezi alelochemikálie patří hlavně alkaloidy, fenoly, terpenoidy, glykosidy a flavonoidy (Piršelová, 2014). Tyto látky jsou specifické vždy pro určitý druh hmyzu a odrazují hmyz svou hořkou chutí, toxicitou, mohou ovlivnit reprodukční cyklus nebo regulaci růstu herbivorů. Nemusejí být vždy škodlivé, ale naopak housenky některých druhů hmyzu tyto látky mohou využít i ke své obraně (Herms, Mattson, 1992).

Hwang et al. (1997) provedli studium vzájemné interakce *Lymantria dispar* a *Malacosoma disstria* s několika klony topolu (*Populus tremuloides*). Použili housenky druhého a čtvrtého instaru, kterým nechali konzumovat listy topolů a výsledky poukázaly na podstatné rozdíly u obou druhů hmyzu v důsledku konzumace listů různých klonů topolů. Srovnány byly výsledky přírůstků housenek, mortalita a stravitelnost potravy. Výsledky ukázaly, že fenolové glykosidy byly dominantním faktorem odpovědným za různé prospívání housenek. Prospívání hmyzu tedy pravděpodobně velmi závisí i na genetické struktuře jejich hostitele.

McCormick et al. (2019) porovnali prospívání housenek b. velkohlavé na čtyřech hostitelských dřevinách, dubu, buku, javoru a smrku. Zjistili, že housenky japonského poddruhu b. velkohlavé nejlépe prospívaly na dubové potravě, housenky evropského poddruhu na bukové potravě a asijský poddruh nejlépe prospíval na dubové a bukové zároveň. Všechny tři poddruhy housenek prospívaly nejhůře na smrku. Přežívání

na javoru bylo na prostřední hodnotě mezi dubem/bukem a smrkem. Dále zjistili, že housenky evropského poddruhu preferovaly potravu dubu a buku před javorem, ale nikdy si nevybraly potravu smrku, čemuž odpovídají i naše výsledky. Japonský poddruh preferoval pouze dub a buk a asijský poddruh housenek druh potravu nerozlišoval. To, že housenky nejvíce odmítaly smrk, může být vysvětleno tím, že smrk produkuje více sekundárních metabolitů, zatímco listnaté dřeviny obsahují více volatilních látek (McCormick et al., 2019).

Na to, že samotný obsah fenolů nemusí vždy snižovat fitness hmyzu, poukazují i výsledky následující práce. Joseph et al. (1991) porovnávali kvalitu dvou hostitelských dřevin b. velkohlavé, bílou olši (*Alnus rhombifolia*) a douglasku tisolistou (*Pseudotsuga menziesii*). Housenkám předkládali potravu z těchto dvou dřevin. Housenkám se na potravě z olše dařilo mnohem lépe než na potravě z douglasky, i když olše měla vyšší hodnoty fenolických látek. Kromě fenolických látek měla potrava z olše i vyšší obsah dusíku. Právě dusík pravděpodobně udělal potravou výživnější. Proč je potrava výživnější je složité popsat, jelikož vyšší koncentrace fenolů, jiných toxinů a jejich vzájemná interakce s dusíkem není známa. Housenky si raději vyberou potravu, která obsahuje více taninů, než potravu, která obsahuje jiné alelochemikálie (seskviterpeny, alkaloidy...) (Barbosa, Krischik, 1987). V přírodě tedy výběr hostitelské dřeviny více závisí na obsahu taninů než na celkovém obsahu listových fenolů (Lechowicz, 1983). Horší prospívání housenek v experimentu Josepha et al. (1991) bylo způsobeno pravděpodobně vyšší koncentrací terpenů a nižším obsahem dusíku.

Roth et al. (1994), zjistili negativní korelaci mezi rychlostí růstu larev a koncentrací fenolických látek v listech mladých topolů (*Populus deltoides*). Listové fenolické látky a kyselina askorbová mohou v důsledku vzájemné interakce ovlivnit housenky b. velkohlavé. Appel (1993) navrhl, že oxidací fenolických látek v trávicím ústrojí hmyzu vznikají chinony, které mohou snižovat stravitelnost potravu. Pokud se toxicita fenolických látek skutečně projevuje oxidací, pak obrana může nastat dvěma způsoby. Hmyz může využít redukčních činidel, jako je kyselina askorbová, k převedení chinonu zpět na formu fenolu. Takové schopnosti byly zjištěny u housenek černopásky (*Helicoverpa zea*) (Felton, Duffey, 1992). Pokud podobný obranný systém funguje i u housenek b. velkohlavé, pak by nedostatek kyseliny askorbové snižoval možnost obrany proti toxinům po požití fenolických látek, a tím zhoršil výkonnost hmyzu. Dále mohou housenky spoléhat na oxidační polymeraci fenolických látek. V tomto případě udržování „oxidačních podmínek“ ve střevech by podporovalo oxidaci fenolů na chinony a následná rychlá polymerace sloučenin by zabránila toxickým účinkům (Appel, 1993). Nedostatek kyseliny askorbové by tak usnadnil deaktivaci účinků fenolických látek. Pokud tyto možnosti obrany proti fenolickým látkám využívají i housenky b. velkohlavé, mohlo by to být vysvětlením, proč v námi provedené studii nejvíce prospívaly housenky na potravě z dubu, i přesto, že jsme v této potravě zjistili nejvyšší obsah fenolických látek.

Fenolické sloučeniny ovlivňují herbivorní hmyz negativním způsobem. Jak moc jsou látky škodlivé určuje jejich konkrétní kombinace s jinými látkami. Například, listnaté stromy mírného pásma produkují velké množství fenolických sloučenin, ale většina z nich produkuje i jiné látky, které mohou být mnohem více toxické než samotné fenoly. Kombinace různých sloučenin fenolů a jejich negativní vliv na housenky b. velkohlavé studoval Barbehenn et al. (2013), ale žádné signifikantní výsledky nebyly zjištěny.

I když je u mnoha druhů hmyzu známo, že nutriční hodnota je ovlivněna změnou teploty, je méně známo, jak ovlivňuje vývoj hmyzu (Stamp, Yang, 1996). Provedené studie umělé stravy u bekyně velkohlavé potvrdily, že faktory jako je teplota a množství dusíku v potravě nemají vliv na ontogenetický vývoj housenek (Lindroth et al., 1997a). Ověření toho, zda kvalita potravy může být ovlivněna teplotou je důležité z hlediska neustále probíhající globální změny teplot (Houghton et al., 1996). Kvalita listů se totiž může snížit zvýšením koncentrace CO₂ v ovzduší. Předchozí studie prokázaly, že zvýšené množství CO₂ může změnit klíčové složky potravy hmyzu, které jsou důležité pro fitness hmyzu, což má vliv na růst, ontogenetický vývoj a množství konzumované potravy (Coviella, Trumble, 1999). Souvislosti toho, jak intenzivní je vliv teploty při změnách klimatu na hostitelské dřeviny a hmyz není doposud uspokojivě objasněn.

V námi provedeném experimentu jsme pěstovali sazenice dvou druhů dřevin (smrk a dub) ve čtyřech různých klimatických podmínkách, tj. kombinace různých koncentrací CO₂ a teploty, abychom ověřili interakce mezi těmito faktory a jejich případný vliv na kvalitu hostitelské potravy herbivorního hmyzu a jeho vývoj.

Pro vyhodnocení vlivu kvality potravy na vývoj housenek jsme použili indexy, které byly využity již v některých provedených experimentech, např. Castagneyrol et al. 2018, Roth et al. 1994. Podle indexu přibližné stravitelnosti potravy (AD) se ukázalo, že potrava připravená z dubu je pro housenky lépe stravitelná než potrava ze smrku.

V našem experimentu byla v rámci smrkové potravy nejstravitelnější ta potrava, která byla připravená ze sazenic pěstovaných za vysoké koncentrace CO₂, nízké teploty a jehlice byly odebrány v dubnu. Tato kombinace byla totiž jako jediná signifikantně odlišná od ostatních druhů potravy smrku. Rozdíl mezi jednotlivými skupinami potravy z dubu nebyl prokázán. Po porovnání indexu stravitelnosti s indexem účinnosti přeměny potravy (ECI) vyšel index účinnosti přeměny nižší. To může být vysvětleno adaptací housenek po-regulačními procesy, ale ne před-regulačními procesy, tedy proto, aby si housenky kompenzovaly nižší kvalitu potravy (Scott et al., 2010). Také můžeme spekulovat, že důvodem může být vyšší podíl natrávené biomasy, která se ztratila v důsledku rozdílné enzymatické aktivity po trávení (Scott et al., 2010).

Nejvyšší rozdíl mezi potravou připravené z dubu a připravené ze smrku se projevil na RGR indexu, tedy relativním tempu růstu. Nejvyšší tempo růstu měly housenky krmené na potravě z dubu, který byl pěstován za podmínek zvýšeného množství CO₂,

nízké teploty a listy byly sebrány v květnu. To odporuje předpokladu, že housenky krmící se na potravě za zvýšeného množství CO₂ prosperují mnohem méně kvůli sníženému množství listového dusíku (Hättenschwiler, Schafellner, 2004). Výsledky naznačují důležitost provedení dalších studií a zjišťování hlubších fyziologických procesů odehrávajících se v rostlině pod měnícími se podmínkami klimatu. U indexu ECD, účinnosti přeměny strávené potravy, se u jednotlivých skupin housenek neprojevil rozdíl. Tento výsledek mohl být způsoben tím, že housenky krmené potravou ze smrku mohou být na konci sledovaného období menší nebo se housenkám celkově nedařilo, a pokud by se sledovaly po delší časový úsek, mohly by housenky vykazovat případnou mortalitu.

Naše výsledky nesouhlasí s výsledky předchozích studií (Hättenschwiler et al., 1999; Roth et al., 1995), při kterých byl zjištěn vliv zvýšeného CO₂ na množství zkonsumované potravy. Zde je důležité poznamenat, že naše studie se kvůli limitovanému množství listového materiálu prováděla pouze na jednom druhu listožravého hmyzu po krátké časové období, a pokud by housenky byly sledovány delší dobu, mohly by výsledky přinést jiná zjištění. Další studie prováděné v budoucnu by měly zahrnout více druhů listožravých škůdců a druhy být sledovány delší časové období, aby se výsledky studie daly generalizovat. Ačkoliv je bekyně velkohlavá běžný listožravý druh, není jasné, zda by výsledky studie byly shodné, pokud by se pro experiment použily například housenky bekyně mnišky (*Lymantria monacha*).

Navzdory tomu, že jsme byli v našem experimentu limitováni určitými faktory (množství materiálu, časové období atd.), je naše studie jednou z mála, která se doposud zabývala zjišťováním vlivu klimatické změny na vývoj herbivorního hmyzu podáváním potravy ze sazenic, které byly pěstovány v přesně nasimulovaných podmínkách růstu. Většina studií se zabývá pouze hodnocením poškození rostlin určitým škůdcem (Alalouni et al., 2014, Huang et al., 2017).

7 Závěr

V experimentu, který jsme provedli, prospívaly housenky lépe na potravách připravených z dubu než ze smrku. Metody, které jsme použili k vyhodnocení, neodhalily rozdíl mezi prospíváním housenek v rámci skupin potrav z jednoho druhu dřeviny. Chemická analýza asimilačních orgánů sazenic, které jsme použili k přípravě potravy odhalila, že nejvyšší množství obranných látek rostlin se nacházelo v listech dubu.

Z výsledku je zřejmé, že druh hostitelské dřeviny hraje mnohem vyšší roli v prospívání a růstu housenek než klimatické podmínky, které hostitelské dřeviny ovlivňují. Výsledky potvrzují fakt, že housenky b. velkohlavé preferují listnaté dřeviny oproti jehličnatým dřevinám. Složitost vztahů mezi klimatickými podmínkami, hostitelskými dřevinami a herbivory naznačují výsledky práce, kde housenky prospívaly lépe na dubové potravě i přes vyšší množství obranných látek v listech těchto sazenic. Proč se housenkám nejlépe dařilo na těchto sazenicích zůstává otázkou.

8 Seznam použité literatury

- AINSWORTH, Elizabeth A.; LONG, Stephen P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New phytologist*, 2005, 165.2: 351-372.
- ALALOUNI, Urwa, et al. Does insect herbivory on oak depend on the diversity of tree stands?. *Basic and Applied Ecology*, 2014, 15.8: 685-692.
- APPEL, Heidi M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19.7: 1521-1552.
- AWMACK, Caroline S.; LEATHER, Simon R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual review of entomology*, 2002, 47.1: 817-844.
- AYRES, Matthew P.; LOMBARDERO, Maria J. Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *Science of the Total Environment*, 2000, 262.3: 263-286.
- BALE, Jeffery S., et al. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global change biology*, 2002, 8.1: 1-16.
- BARBEHENN, Raymond V., et al. Physiological benefits of feeding in the spring by *Lymantria dispar* caterpillars on red oak and sugar maple leaves: nutrition versus oxidative stress. *Chemoecology*, 2013, 23.1: 59-70.
- BARBOSA, Pedro, et al. Host-plant preferences and their induction in larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 1979, 26.2: 180-188.
- BARBOSA, Pedro; KRISCHIK, Vera Aber. Influence of alkaloids on feeding preference of eastern deciduous forest trees by the gypsy moth *Lymantria dispar*. *The American Naturalist*, 1987, 130.1: 53-69.
- BJORKMAN, Christer; NIEMELA, Pekka (ed.). *Climate change and insect pests*. CABI, 2015.
- BOUCHER, O.; MYHRE, G.; MYHRE, A. Direct human influence of irrigation on atmospheric water vapour and climate. *Climate Dynamics*, 2004, 22.6: 597-603.
- BRANDT JP. Gypsy moth. Northern Forestry Centre. *Forestry (leaflet) vol. 29*. Canadian Forest Service, Natural Resources Canada, Edmonton, Alberta, Canada, 1994.
- BURGESS, Paul J.; MOFFAT, Andy J.; MATTHEWS, Robin B. Assessing climate change causes, risks and opportunities in forestry. *Outlook on AGRICULTURE*, 2010, 39.4: 263-268.

- CANNELL, M. G. R.; THORNLEY, J. H. M. Temperature and CO₂ responses of leaf and canopy photosynthesis: a clarification using the non-rectangular hyperbola model of photosynthesis. *Annals of Botany*, 1998, 82.6: 883-892.
- CASTAGNEYROL, Bastien; MOREIRA, Xoaquín; JACTEL, Hervé. Drought and plant neighbourhood interactively determine herbivore consumption and performance. *Scientific reports*, 2018, 8.1: 1-11.
- MCCORMICK, Andrea, et al. Divergent behavioural responses of gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars from three different subspecies to potential host trees. *Scientific reports*, 2019, 9.1: 1-12.
- COOK, Bruce D., et al. Using light-use and production efficiency models to predict photosynthesis and net carbon exchange during forest canopy disturbance. *Ecosystems*, 2008, 11.1: 26-44.
- COTRUFO, M. Francesca; INESON, Phil; SCOTT, Andy. Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biology*, 1998, 4.1: 43-54.
- COUTURE, John J.; LINDROTH, Richard L. Atmospheric change alters performance of an invasive forest insect. *Global Change Biology*, 2012, 18.12: 3543-3557.
- COVIELLA, Carlos E.; TRUMBLE, John T. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. *Conservation Biology*, 1999, 13.4: 700-712.
- DE GROOT, William J., et al. Developing a global early warning system for wildland fire. *Forest Ecology and Management*, 2006, 234.1: S10.
- DOCHERTY, Maureen, et al. Carbon dioxide-induced changes in beech foliage cause female beech weevil larvae to feed in a compensatory manner. *Global Change Biology*, 1996, 2.4: 335-341.
- FAJER, E. D. The effects of enriched CO₂ on plant-insect herbivore interactions: growth responses of larvae of the specialist butterfly *Junconia coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecologia*, 1989, 81: 514-520.
- FELTON, G. W., et al. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 1992, 38.4: 277-285.
- FOX, Richard. The decline of moths in Great Britain: a review of possible causes. *Insect Conservation and Diversity*, 2013, 6.1: 5-19.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, Joel; ZAGROBELNY, Mika; BAK, Søren. Plant defense against insect herbivores. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.5: 10242-10297.
- GANSNER, David A. *Host preferences of gypsy moth on a new frontier of infestation*. US Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, 1985.

- GIACOMETTI, Romina, et al. Stink bug *nezara viridula* sustains late MAPKs phosphorylation status and induces expression of genes related with cell wall rearrangement in developing soybean seeds. *Arthropod-Plant Interactions*, 2018, 12.4: 531-541.
- HAMILTON, J. G.; THOMAS, R. B.; DELUCIA, E. H. Direct and indirect effects of elevated CO₂ on leaf respiration in a forest ecosystem. *Plant, Cell & Environment*, 2001, 24.9: 975-982.
- HATFIELD, Jerry L.; PRUEGER, John H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and climate extremes*, 2015, 10: 4-10.
- HÄTTENSCHWILER, Stephan; SCHAFELLNER, Christa. Gypsy moth feeding in the canopy of a CO₂-enriched mature forest. *Global Change Biology*, 2004, 10.11: 1899-1908.
- HÄTTENSCHWILER, Stephan; SCHAFELLNER, Christa. Opposing effects of elevated CO₂ and N deposition on *Lymantria monacha* larvae feeding on spruce trees. *Oecologia*, 1999, 118.2: 210-217.
- HERMS, Daniel A.; MATTSON, William J. The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*, 1992, 67.3: 283-335.
- HOLOPAINEN, Jarmo K., et al. Climate change effects on secondary compounds of forest trees in the northern hemisphere. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 1445.
- HOUGHTON, Ed. *Climate change 1995: The science of climate change: contribution of working group I to the second assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, 1996.
- HOUGHTON, John. Global warming. *Reports on Progress in Physics*, 2005, 68.6: 1343.
- HRABÁK, Rudolf. *Kapesní atlas našich motýlů*. Státní zemědělské nakladatelství., 1985.
- HUANG, Wei, et al. A mechanism for sequence specificity in plant-mediated interactions between herbivores. *New Phytologist*, 2017, 214.1: 169-179.
- HUGHES, L.; BAZZAZ, F. A. Effect of elevated CO₂ on interactions between the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) and the common milkweed, *Asclepias syriaca*. *Oecologia*, 1997, 109.2: 286-290.
- HWANG, S.-Y.; LINDROTH, Richard L. Clonal variation in foliar chemistry of aspen: effects on gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia*, 1997, 111.1: 99-108.
- CHEN, Fajun, et al. Effects of elevated CO₂ and transgenic Bt cotton on plant chemistry, performance, and feeding of an insect herbivore, the cotton bollworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2005, 115.2: 341-350.

JOERN, Anthony; PROVIN, Tony; BEHMER, Spencer T. Not just the usual suspects: insect herbivore populations and communities are associated with multiple plant nutrients. *Ecology*, 2012, 93.5: 1002-1015.

JOSEPH, G., et al. White alder and Douglas-fir foliage quality and interegg-mass influences on larval development of gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of chemical ecology*, 1991, 17.9: 1783-1799.

KADRNOŽKA, Jaroslav. *Globální oteplování země: příčiny, průběh, důsledky, řešení*. VUTIUM, 2008.

KALLARACKAL, Jose; ROBY, T. J. Responses of trees to elevated carbon dioxide and climate change. *Biodiversity and Conservation*, 2012, 21.5: 1327-1342.

KANG, Tae Hwa; HAN, Sang Hoon; LEE, Heung Sik. Genetic structure and demographic history of *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebidae) in its area of origin and adjacent areas. *Ecology and evolution*, 2017, 7.21: 9162-9178.

KARNOSKY, D. F., et al. Effects of tropospheric O₃ on trembling aspen and interaction with CO₂: results from an O₃-gradient and a FACE experiment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1999, 116.1: 311-322.

KEENA, M. A.; GRINBERG, P. S.; WALLNER, W. E. Inheritance of female flight in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental entomology*, 2007, 36.2: 484-494.

KEENA, Melody A.; RICHARDS, Jessica Y. Comparison of survival and development of gypsy moth *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae) populations from different geographic areas on North American Conifers. *Insects*, 2020, 11.4: 260.

KIMOTO, Troy Teruo Mori; DUTHIE-HOLT, Marnie; DUMOUCHEL, Louise. *Guide des insectes forestiers exotiques*. Agence canadienne d'inspection des aliments, 2006.

LECHOWICZ, Martin J. Leaf quality and the host preferences of gypsy moth in the northern deciduous forest. In: *Talerico, Robert L.; Montgomery, Michael, tech. coords. Proceedings, forest defoliator--host interactions: A comparison between gypsy moth and spruce budworms; 1983 April 5-7; New Haven, CT. Gen. Tech. Rep. NE-85. Broomall, PA: US Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station: 67-82.*, 1983, 85: 67-82.

LINCOLN, D. E.; COUVET, D.; SIONIT, N. Response of an insect herbivore to host plants grown in carbon dioxide enriched atmospheres. *Oecologia*, 1986, 69.4: 556-560.

LINCOLN, D. E.; SIONIT, N.; STRAIN, B. R. Growth and feeding response of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to host plants grown in controlled carbon dioxide atmospheres. *Environmental entomology*, 1984, 13.6: 1527-1530.

LINDROTH, Richard L., et al. CO₂-mediated changes in tree chemistry and tree-Lepidoptera interactions. *Carbon dioxide and terrestrial ecosystems*, 1996, 105-120.

- LINDROTH, Richard L., et al. Variation in temperature and dietary nitrogen affect performance of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.). *Physiological Entomology*, 1997, 22.1: 55-64.
- LOVETT, Gary M., et al. Insect defoliation and nitrogen cycling in forests: laboratory, plot, and watershed studies indicate that most of the nitrogen released from forest foliage as a result of defoliation by insects is redistributed within the ecosystem, whereas only a small fraction of nitrogen is lost by leaching. *BioScience*, 2002, 52.4: 335-341.
- MASTILÁKOVÁ, Monika. Akumulace a lokalizace sekundárních metabolitů s ochrannou funkcí u obilnin pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a vybraných stresových faktorů klimatické změny. 2017.
- MATTSON, William J.; ADDY, Norton D. Phytophagous insects as regulators of forest primary production. *Science*, 1975, 515-522.
- MCEWAN, Ryan W.; RIESKE, Lynne K.; ARTHUR, Mary A. Potential interactions between invasive woody shrubs and the gypsy moth (*Lymantria dispar*), an invasive insect herbivore. *Biological Invasions*, 2009, 11.4: 1053-1058.
- MEDLYN, Belinda E., et al. Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytologist*, 2001, 149.2: 247-264.
- MINER, Reid, et al. *Impact of the global forest industry on atmospheric greenhouse gases*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010.
- NÁTR, Lubomír. Země jako skleník. *Proč se bát CO₂*, 2006, 1.
- NÁTR, Lubomír. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. ISV, 2000.
- NORBY, Richard J., et al. CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107.45: 19368-19373.
- NORBY, Richard J.; ZAK, Donald R. Ecological lessons from free-air CO₂ enrichment (FACE) experiments. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 2011, 42.
- NOVOTNY, J.; TURCANI, M. A new strategy for the ecological control of the gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lepidoptera). *Biologia (Slovak Republic)*, 1997.
- O'CONNOR, Christopher D., et al. Disturbance and productivity interactions mediate stability of forest composition and structure. *Ecological Applications*, 2017, 27.3: 900-915.
- OSBRINK, Weste LA; TRUMBLE, John T.; WAGNER, Robert E. Host suitability of *Phaseolus lunata* for *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) in controlled carbon dioxide atmospheres. *Environmental entomology*, 1987, 16.3: 639-644.

- PETIT, Jean-Robert, et al. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 1999, 399.6735: 429-436.
- PIRŠELOVÁ, Beáta. Význam alelopatie z hľadiska pestovania cukrovej repy. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 2014, 130.12.
- POGUE, Michael. A review of selected species of *Lymantria* Hübner (1819)(Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) from subtropical and temperate regions of Asia, including the descriptions of three new species, some potentially invasive to North America. 2007.
- PROCHÁZKA, S. et al. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 1998. 484 s
- PROCHÁZKA, S., et al. *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia, 2003.
- REDDY, Gadi VP, et al. Elevated atmospheric CO₂ affects the chemical quality of Brassica plants and the growth rate of the specialist, *Plutella xylostella*, but not the generalist, *Spodoptera littoralis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, 52.13: 4185-4191.
- ROTH, Sherry K.; LINDROTH, Richard L. Elevated atmospheric CO₂: effects on phytochemistry, insect performance and insect-parasitoid interactions. *Global Change Biology*, 1995, 1.3: 173-182.
- ROTH, Sherry K.; LINDROTH, Richard L.; MONTGOMERY, Michael E. Effects of foliar phenolics and ascorbic acid on performance of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Biochemical systematics and ecology*, 1994, 22.4: 341-351.
- SCOTT, Ian M.; THALER, Jennifer S.; SCOTT, Jeffrey G. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to jasmonate-mediated induced defense in tomato. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36.5: 490-499.
- SCRIBER, J. M.; SLANSKY JR, F. The nutritional ecology of immature insects. *Annual review of entomology*, 1981, 26.1: 183-211.
- SCHEDL, Karl E. *Der Schwammspinner (Porthetria dispar L.) in Euroasien, Afrika und Neuengland*. Paul Parey, 1936.
- SCHOONHOVEN, Louis M., et al. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand, 2005.
- SINCLAIR, Thomas R.; WEISS, Albert. *Principles of ecology in plant production*. CABI, 2010.
- STAMP, Nancy E. Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *Oecologia*, 1990, 82.1: 107-113.
- STAMP, Nancy E.; YANG, Yuelong. Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. *Ecology*, 1996, 77.4: 1088-1102.

- TILMAN, David. Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecological monographs*, 1987, 57.3: 189-214.
- TOWNSEND, Philip A.; ESHLEMAN, Keith N.; WELCKER, Chris. Remote sensing of gypsy moth defoliation to assess variations in stream nitrogen concentrations. *Ecological Applications*, 2004, 14.2: 504-516.
- TRAW, M. B.; LINDROTH, R. L.; BAZZAZ, F. A. Decline in gypsy moth (*Lymantria dispar*) performance in an elevated CO₂ atmosphere depends upon host plant species. *Oecologia*, 1996, 108.1: 113-120.
- VALKAMA, Elena; KORICHEVA, Julia; OKSANEN, Elina. Effects of elevated O₃, alone and in combination with elevated CO₂, on tree leaf chemistry and insect herbivore performance: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 2007, 13.1: 184-201.
- WALLNER, W. E. *Lymantria monacha* Pest Report. Exotic Forest Pest Information System for North America. 2000a.
- WARD, Nicola L.; MASTERS, Gregory J. Linking climate change and species invasion: an illustration using insect herbivores. *Global Change Biology*, 2007, 13.8: 1605-1615.
- WILLIAMS, R. S.; LINCOLN, D. E.; THOMAS, R. B. Loblolly pine grown under elevated CO₂ affects early instar pine sawfly performance. *Oecologia*, 1994, 98.1: 64-71.
- WILLIAMS, Ray S.; LINCOLN, David E.; NORBY, Richard J. Development of gypsy moth larvae feeding on red maple saplings at elevated CO₂ and temperature. *Oecologia*, 2003, 137.1: 114-122.
- ZAVALA, Jorge Alberto; GOG, L.; GIACOMETTI, Romina. Anthropogenic increase in carbon dioxide modifies plant–insect interactions. *Annals of Applied Biology*, 2017, 170.1: 68-77.
- ZVEREVA, E. L.; KOZLOV, M. V. Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant–herbivore interactions: a metaanalysis. *Global change biology*, 2006, 12.1: 27-41.
- ZVERYAEV, Igor I.; WIBIG, Joanna; ALLAN, Richard P. Contrasting interannual variability of atmospheric moisture over Europe during cold and warm seasons. *Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography*, 2008, 60.1: 32-41.

9 Přílohy

Příloha 1: Fytokomory na Fakultě lesnické a dřevařské v Praze. Foto: David Musiolek



Příloha 2: Sazenice ve fytokomoře. Foto: David Musiolek



Příloha 3 – Metodika chemické analýzy asimilačních orgánů sazenic

LC-qTOF-MS/MS analysis of polyphenolic compounds

LC-MS-qTOF metabolomic analysis was carried out using on Agilent 1290 Infinity II coupled with Agilent 6546 LC/MS QTOF system (Agilent, USA) and Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1x50 mm, 1.8 μ m), (Agilent, USA). Mobile phase A contained 0.05 % formic acid and mobile phase B was consisted of acetonitrile. The gradient elution was: 0–1 min, 100% A; 1–7 min, 35% A; 7–8 min, 100% A; 8–8.01, 100% A, 8.01–10 min, 100% A. The flow rate of mobile phase was set at 1.1 mL min⁻¹ (Huang, 2020). The column temperature was set at 35 °C. The injection volume was 1 μ L. The system was operated at negative ionization mode. The optimization of qTOF parameters were previously optimized using the standards. The qTOF parameters was as follows: scan range 100–1000 m/z; drying gas temperature, 350 °C; sheath gas flow rate, 12.0 L/min; sheath gas temperature, 400 °C; capillary voltage, 5.0 kV; nozzle voltage 0.9 kV; fragmentor, 140 V; collision energy at 10, 20 and 40 eV. MS/MS data were acquired at scan range was 50–800 m/z, 0.5 min retention time window, isolation window 1.3 amu and an aquisition rate of 2 spectra s⁻¹. The list of target compounds is presented in Table 16. During the analysis two reference masses: 112.9855 m/z and 966.0007 m/z were continuously measured to mass correction. The data collection was carried out using Agilent Mass Hunter Acquisition software. The data analysis was performed using Qualitative Analysis 10.0 and Q-TOF Quantitative analysis.

Table 2 List of compounds monitoring by LC-MS-qTOF in negative ionization mode.

Compound	Formula	Mass	Retention time, min	Fragments
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.1607	2.93	609.1459; 300.0273
Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304.0596	2.90	303.0499 285.0404; 177.0195; 125.0245
Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.0783	2.21	289.0715; 245.0819; 203.0716; 151.0402;

				125.0244; 109.0296
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302.0420	3.75	301.0336; 273.0389; 178.9981; 151.0037; 121.0295
Gallic acid	$C_7H_6O_5$	170.0216	0.56	169.0141; 125.0245; 79.0189;
Procyanidin B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.1411	2.15	577.1343; 451.1019; 425.0876; 289.0713; 161.0243; 125.0242
Myricetin	$C_{15}H_{10}O_8$	318.0367	3.29	317.0305; 178.9982; 151.0039. 137.0241; 109.0298
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	286.0476	4.13	285.0404; 171.0451; 107.0138
Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	354.0941	2.23	353.0873; 191.0560; 85.0392

Extraction procedure for determination of polyphenolic compounds

20 mg of freeze-dried and homogenized samples were accurately weighted and 500 μ L of methanol:water (70:30 v/v) was added. Then, the sample were well-mixed using vortex. After, the sample were placed into ultrasonic bath with ice for 10 minutes. Then, the tubes were centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and filtered through PTFE syringe filter (0.22 μ m) prior to LC-qTOF-MS/MS analysis.

Determination of total phenolic content (TPC)

TCT was performed according to Makkar at al. 1993. Briefly, 20 μ L of extract was placed to the test tube and make up the volume to 0.5 mL of water. Then, 250 μ L of the FolinCiocalteu reagent was added. After 3 min, 1 mL of 20% sodium carbonate was added. The test tube was well mixed and kept in the dark place for 40 min. The absorbance was recorded at 725 nm using spectrophotometer. The concentration of TPC was expressed in tannin acid equivalent.

Determination of non-tannins phenols content (TnTPC)

The 50 mg of polyvinylpyrrolidone was weighted into 2 mL test tube. Then, 0.5 mL of water and 0.5 mL of extract was added. The solution was vortexing and kept at 4 °C for 15 min. After, the centrifugation for 10 min at 13000 rpm, the supernatant was transferred to the new test tube. The procedure of determination of non-tannins phenols content was similar to TCP, but the taken aliquot was in two times higher

Determination of total flavonoid content (TFC)

The determination TFC was carried out slightly modified according to Baba 2015. Briefly, 75 μ L of sample extract was placed into the 2 mL test tube and 465 μ L of water was added . Then, 5 % solution of 5 % NaNO₂ was added. After 5 minutes, 1 mL of 10 % aluminium trichloride was added. After, 15 minutes the absorbance was measures at 510 nm, against blank. The concentration of flavonoid content was expressed as mg quercetin equivalent per g dry weight.

Determination of total condensed tannin content (TCT)

The total flavonoid content was determined following the method described by Porter, 1986. 75 μ L of sample and 225 μ L of 70% acetone was placed to 2-mL test tube. Then, 1.5 mL of butal-HCL reagent was added (butanol-HCL reagent was prepared

by mixing of 95 ml of butanol and 5 mL of concentrated HCL (37%). After, 50 μ L of ferric reagent was added (ferric reagent was prepared as 2 % ferric ammonium sulfate in 2N HCl). The solution was well mixed and placed to the thermoshaker () for 1h at 95 °C and 1000 rpm. When the solution was cooled, the absorbance was recorded at 550 nm. The concentration of TCT was expressed in cyanidin equivalent (mg g⁻¹).