

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Změny v produkci vybraných primárních
metabolitů u rostlin čeledi Brassicaceae v závislosti na
napadení běláskem zelným

Diplomová práce

Autor:	Kristýna Daňková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.



Zadání diplomové práce

Autor: Kristýna Daňková

Studium: S16BI005NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název diplomové práce: **Změny v produkci vybraných primárních metabolitů u rostlin čeledi Brassicaceae v závislosti na napadení běláskem zelným**

Název diplomové práce AJ: The changes of selected primary metabolite production in Brassicaceae plants in dependence on the cabbage butterfly attack

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Bělásek zelný je obávaným škůdcem čeledi Brassicaceae. Jednou z reakcí rostlin na napadení herbivory je produkce tzv. sekundárních metabolitů. Syntéza těchto látek vychází z několika málo prekurzorů primárního metabolismu (např. acetyl-CoA, aminokyselin, organických kyselin, které jsou součástí hlavní metabolické osy glykolýza a Krebsův cyklus). Cílem práce je výzkum závislosti mezi napadením vybraného druhu rostlin čeledi Brassicaceae běláskem zelným a produkcí některých aminokyselin, včetně změn jejich poměru. Sledovány budou i vybrané organické kyseliny (např. fumarová, šťavelová, citronová, askorbová). Z napadených rostlin bude nutné odchytout imaga běláška zelného. Oplozené samičky aplikovat na rostliny v kultivačních boxech. Zjistit reakci rostlin na nakladená vajíčka i poškození housenkami běláška. Provézt analýzy rostlin na obsah vybraných metabolitů např. metodami HPLC.

Riach A.C. et al. (2015): Analysis of plant leaf metabolites reveals no common response to insect herbivory by *Pieris rapae* in three related host-plant species. *Journal of Experimental Botany*, Volume: 66 (9): 2547-2556. doi:10.1093/jxb/erv045 Ahuja I. et al. (2010) Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy Sustainable Development* . 30: 311-348. DOI: 10.1051/agro/2009025 Singh B.K. et al. (1999): Plant amino acids. *Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker Inc. ISBN 0824702042.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Oponent: RNDr. Milan Skalický, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.10.2015

Prohlášení:

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

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za jeho čas a ochotu a také za poskytnutí cenných rad, které mi pan docent při zpracování práce poskytl. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Matěji Semerákovi za jeho rady a výpomoc a paní RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za poskytnutí informací k pracovním postupům a výpočtům. Díky patří také katedře chemie za pomoc při vyhodnocování vzorků. Nakonec bych chtěla poděkovat rodině za finanční a psychickou podporu.

Anotace

DAŇKOVÁ, K. (2018): *Změny v produkci vybraných primárních metabolitů u rostlin čeledi Brassicaceae v závislosti na napadení běláskem zelným*. Hradec Králové, Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Jiří Tůma. 67 s.

Předmětem výzkumu této diplomové práce je zjištění závislosti mezi napadením vybraného druhu rostlin čeledi Brassicaceae běláskem zelným a produkcí některých aminokyselin, organických kyselin (fumarová, citronová, askorbová, šťavelová) a rozpustných proteinů včetně změn jejich poměru. V práci jsou uvedeny základní charakteristiky vybraného škůdce, sledovaných primárních metabolitů a popsány základní metabolické procesy, které při stresu probíhají. Z napadených rostlin byla odchycena imaga běláška zelného. Oplozené samičky byly aplikovány na rostliny v kultivačních boxech. Pomocí metod, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo spektrofotometrie, byly zjištěny změny koncentrací sledovaných látek jako reakce rostlin na nakladená vajíčka a poškození housenkami běláška.

Klíčová slova

herbivorie, bělásek zelný, primární metabolity, Brassicaceae

Annotation

DAŇKOVÁ, K. (2018): *The changes of selected primary metabolite production in Brassicaceae plants in dependence on the cabbage butterfly attack*. Hradec Králové, Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Diploma Thesis supervisor Jiří Tůma. 67 p.

The aim of this diploma thesis is to find out the dependence between the infestation of selected plant species of Brassicaceae with large white and the production of certain amino acids, organic acids (fumaric, citric, ascorbic, oxalic) and soluble proteins, including changes in their ratio. The thesis presents the basic characteristics of the selected pest, the primary metabolites and the basic metabolic processes under stress. From the infested plants, a large white image was captured. The fertilized females were applied to the plants in the cultivation boxes. Using methods such as high performance liquid chromatography or spectrophotometry, were detected changes at concentrations of the monitored substances as a plant reaction on the laid eggs and on the damage by caterpillars.

Keywords

herbivory, large white, primary metabolites, Brassicaceae

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	11
2.1	Stres rostlin.....	11
2.2	Herbivorie – významný vztah mezi rostlinou a živočichem	13
2.2.1	Bělásek zelný – škůdce rostlin	13
2.3	Obranné mechanismy rostlin proti napadení herbivory.....	14
2.4	Konstitutivní obrana	15
2.4.1	Přímá konstitutivní obrana.....	15
2.4.2	Nepřímá konstitutivní obrana	16
2.5	Indukovaná obrana.....	16
2.5.1	Přímá indukovaná obrana	16
2.5.2	Nepřímá indukovaná obrana.....	16
2.6	Signalizace a průběh stresové reakce	17
2.7	Účinky stresu na primární metabolismus rostlin z čeledi Brassicaceae	18
2.8	Primární metabolismus.....	19
2.8.1	Vliv abiotického stresu.....	20
2.8.2	Vliv biotického stresu.....	21
2.9	Základní charakteristika vybraných primárních metabolitů	22
2.10	Organické kyseliny	23
2.10.1	Kyselina askorbová	23
2.10.2	Kyselina šťavelová.....	24
2.10.3	Kyselina citrónová.....	25
2.10.4	Kyselina fumarová.....	26
2.11	Aminokyseliny	27
2.12	Proteiny	30
3	Metodika	34
3.1	Vybrané rostliny vystavené stresu	34
3.2	Odchyt škůdce běláška zelného	34
3.3	Pěstební boxy	34
3.4	Očištění a kultivace rostlin před analýzou.....	35
3.5	Příprava vzorků pro analýzu.....	36

4	Výsledky a diskuze	40
5	Závěr	49
6	Seznam použité literatury	50
7	Seznam příloh	59

1 Úvod

Tématem mé diplomové práce jsou změny v produkci vybraných primárních metabolitů u rostlin čeledi Brassicaceae v závislosti na napadení běláskem zelným. Toto téma jsem si zvolila ze zajímavosti a také proto, abych zjistila, zda a v jakém rozsahu dochází ke změně koncentrace vybraných produkovaných látek rostlin z čeledi Brassicaceae při napadení herbivory.

Rostliny z čeledi Brassicaceae, hlavně pro pokus použítá brukev zelná (*Brassica oleracea*), jsou pro člověka důležitým zdrojem potravy (Verkerk et al., 1997). Jsou zdrojem glukosinulátů, flavonoidů, vitamínů, jako jsou například karotenoidy (mohou se přeměnit na vitamín A), tokoferol (též vitamín E), kyselina askorbová (též vitamín C) a kyselina listová (též vitamín B), minerálních živin, jako je měď, zinek, fosfor a mangan. Rostliny z čeledi Brassicaceae obsahují nejrůznější fytoproteiny jako je brassicin, brassilexin, camalexin aj., fenoly - feruloyl, kyselina kávová, p - kumarová, antokyany, quercetin aj. (Moreno et al., 2006). Obsah všech těchto látek závisí na podmínkách růstu před sklizní a po sklizni, na skladování, zpracování a na celkovém stavu rostliny (Rickman et al., 2007). Zmíněné látky jsou známé pro jejich biologické aktivity (Halkier et Gershenzon., 2006; Stoewsand, 1995; Tomas-Barberan et Espin, 2001), včetně antioxidantů (Tung et al., 2009; Sakihama et al., 2002; Sun et Liu, 2008) a protirakovinových a protizánětlivých aktivit (Habib et al., 2008). Bylo prokázáno, že např. brokolice, zelí a hořčice snižují riziko vzniku rakoviny (Kristal et Lampe, 2002; Wang et al., 2004).

Během růstu jsou rostliny vystaveny abiotickým a biotickým stresovým faktorům. Významný je vliv herbivorů, přičemž častým škůdcem rostlin z čeledi Brassicaceae je bělásek zelný (*Pieris brassicae*), který rostlině nejvíce škodí ve fázi housenky, kdy dochází k rychlému úbytku biomasy. Proti stresovým faktorům včetně herbivorie si však rostliny vyvinuly obranné mechanismy, pomocí kterých se dokážou bránit. V reakci na tyto stresové faktory rostliny zvyšují produkci primárních a sekundárních metabolitů (Sudha et Ravishankar, 2002; Schutzendubel et Polle, 2002), jako jsou například aminokyseliny, organické kyseliny a obranné proteiny (Moreno et al., 2006), které hrají důležitou roli v přímé nebo nepřímé obraně rostlin (Sakihama et al., 2002; Sharma et Dietz, 2006).

Hlavním cílem práce bylo zjistit závislosti mezi napadením zvoleného druhu rostlin čeledi Brassicaceae běláskem zelným a produkcí vybraných aminokyselin, organických kyselin a proteinů, včetně změn jejich poměru. Tato práce je součástí širšího výzkumu, kdy byly zkoumány změny ve složení primárních, ale také sekundárních metabolitů. Změny byly pozorovány také při působení dřepčíků rodu *Phyllotreta* a výsledky byly použity pro další diplomové práce. V teoretické

části jsem si kladla za cíl vytvořit souvislé charakteristiky o vybraném škůdci a rostlině z čeledi Brassicaceae a o procesech, které v rostlině při působení stresoru probíhají. Tato část práce vychází především z vědeckých článků, které se této problematice věnují. Praktická část je přímo zaměřena na výzkum v produkci vybraných primárních metabolitů při napadení rostliny běláskem zelným. Dalším cílem bylo zjistit, zda rostliny reagují rozdílně, pokud jsou napadeny housenkami běláška zelného nebo když jsou na ně nakladena pouze jeho vajíčka.

V této diplomové práci byla na počátku experimentu stanovena hypotéza - H_0 : „Po napadení rostlin herbivorním hmyzem dochází ke změnám v jejich primárním metabolismu“. Tyto změny by se měly projevit i po naklazení vajíček.

2 Literární přehled

2.1 Stres rostlin

Stres je funkčním stavem rostliny, kdy je rostlina vystavena mimořádným negativním podmínkám (stresorům). Rostlina se proti nim brání a vlivem působení stresu aktivuje své obranné mechanismy, které mají za cíl zachovat homeostázu a zabránit poškození nebo smrti rostliny (Bláha et al., 2003). Základní dělení stresových faktorů je na abiotické a biotické (Atkinson et Urwin, 2012).

Abiotický stres

Abiotický stres je stres vyvolaný neživými faktory působením nadbytku či nedostatku fyzikálních nebo chemických elementů. U rostlin snižuje jejich růst a výnosnost. Jedná se převážně o tyto faktory (Gonzalez et al., 2003):

1) Chemické faktory:

- nedostatek H₂O
- nedostatek O₂
- nedostatek živin v půdě
- snížená koncentrace solí v půdě
- výskyt toxických plynů ve vzduchu
- přítomnost toxických kovů a organických látek v půdě

2) fyzikální faktory:

- nadměrné světelné záření
- UV-záření
- mechanické účinky větru
- vysoká, nízká teplota

Biotický stres

Biotický stres je stres vyvolaný naopak živými organismy. Ty ve svém životním prostředí běžně vstupují do různých vztahů s dalšími organismy svého druhu i mezidruhově. Mezi biotické stresory je možné řadit patogenní mikroorganismy, jako jsou např. viry, bakterie, dále houby, hmyzí a živočišní škůdci, ale také rostliny. Biotický stres reguluje expresi mnoha rostlinných genů, které jsou zapojené například do biosyntézy glukosinulátů, terpenoidů, produkce inhibitoru

proteáz a dalších látek (Hilker et Fatouros, 2015). Stres může u rostlin způsobit závažná poškození, například po infekci rostlinné buňky patogenem může dojít k hypersenzitivní reakci (smrti infikovaných buněk), opadu plodů a napadených listů (Hnilička et al. 2003).

Tak jako na abiotický stres, tak i na biotický stres rostliny reagují. Rostliny jsou schopné rozeznat napadení patogenem, a to pomocí signálních látek zvaných elicitory, které rostlinné buňky rozeznávají svými receptory. Tyto látky v rostlinách spouštějí poplachový signál, který vyzývá rostliny k tvorbě obranných látek. Poplachový signál dokážou rostliny přenášet po celém svém těle. Mezi mechanismy systémové obrany rostlin patří systémově získaná rezistence, kdy poplachový signál přenáší kyselina salicylová. U indukované systémové reakce hraje hlavní roli kyselina jasmonová (Hamilton et Coleman, 2001).

Působení biotických a abiotických stresorů ovlivňuje u rostlin tvorbu primárních i sekundárních metabolitů, které mohou obsahovat účinné látky s využitím ve farmaceutickém průmyslu. Pakliže stresor pozitivně ovlivňuje tvorbu žádoucích látek, lze chápat jeho efekt pozitivně jako stimulaci, nabuzení obranných mechanismů rostliny (Zhao et al., 2005). Bylo zjištěno, že elicitory dávají podnět k aktivaci genů nezbytných pro syntézu tzv. fytoalexinů, což jsou nízkomolekulární obranné látky sekundárního metabolismu, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují. Dnes je známo více než 300 fytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. Například jsou známy fytoalexiny typu isoflavonoidů, terpenoidů či stilbenů. U rostlin čeledi Fabaceae převažují flavonoidy a isoflavonoidy, u čeledi Solanaceae převažují seskviterpeny, u Poaceae diterpeny, či furanokumariny u čeledi Apiaceae. Využití stimulačního efektu specifických látek se nazývá elicítace. V jedné rostlině se může vytvořit i více různých fytoalexinů. Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů (Procházka et al., 1998).

Rostliny reagují na napadení herbivorem dokonce již ve fázi ukládání vajec herbivorního hmyzu na rostlinu (Pashalidou et al., 2015). Rostliny mají na vajíčka buď přímý negativní vliv tím, že dokážou vylučovat různé obranné těkavé látky, čímž vajíčko mohou poškodit nebo vyvolat jeho úmrtí, což může odrazovat hmyz před dalším kladením vajec na rostlinu, anebo mají nepřímý vliv, kdy rostliny dokážou informovat parazitoidy o přítomnosti vajec, která se mohou stát jejich potravou. Některé studie prokázaly, že kromě této přímé a nepřímé obrany rostlin vůči nakladeným vajíčkům, mohou vajíčka sloužit jako varovný signál pro rostliny a tím mohou dopředu nastartovat své obranné mechanismy dříve, než dojde k vylíhnutí larev, které způsobují obrovské škody na rostlinné biomase (Hilker et Fatouros, 2015). Již bylo prokázáno, že mnoho druhů rostlin z čeledi Brassicaceae interaguje s *Pieris brassicae*, kdy byl při expozici vajec zjištěn zpomalený růst a snížení kvality napadené rostliny, což způsobilo rychlejší úmrtí vajec. Nicméně

velmi záleží na druhu zkoumané rostliny. Účinky nakladení vajec herbivorního hmyzu na rostliny byly zatím prokázány např. u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), borovice lesní (*Pinus sylvestris*) a u brukve černé (*Brassica nigra* L). Je tedy potřeba dalších studií, které by interakci herbivorního hmyzu s rostlinami rozšířily a objasnily (Pashalidou et al., 2015).

2.2 Herbivorie – významný vztah mezi rostlinou a živočichem

Herbivoři ovlivňují populace rostlin nejen přímým okusem, ale také sáním, požerem, sešlapem i přímou pastvou. Mohou u rostlin způsobovat rozdíly v růstu, příjmu živin nebo i změny při transpiraci a fotosyntéze. Při napadení rostliny herbivorem dochází ke značným změnám v toku živin a vody v cévních svazcích (Mihai et al., 2005).

Velmi časté jsou interakce cévnatých rostlin a herbivorního hmyzu. Herbivoři se dle specializace dělí na potravní specialisty (zahrnující monofágy a oligofágy) a na potravní generalisty (zahrnující polyfágy). Monofágové jsou specializovaní pouze na jeden druh rostliny. Mezi monofágní hmyz patří zástupci z řádu Hemiptera, Coleoptera nebo mnohé larvy z řádu Lepidoptera. Oligofágní hmyz se stravuje na více rostlinných druzích, ale všechny tyto druhy spadají do jedné čeledi. Příkladem oligofágního hmyzu je například bělásek zelný (*Pieris brassicae*) stravující se na rostlinách z čeledi Brassicaceae nebo mandelinka (*Leptinotarsa decemlineata*) živící se na rostlinách z čeledi Solanaceae. Polyfágní hmyz má možnosti výběru a živí se rostlinami z různých čeledí. Příkladem polyfágního hmyzu je mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), která se živí na jedincích z více než padesáti čeledí (Schoonhoven et al., 2005).

2.2.1 Bělásek zelný – škůdce rostlin

Bělásek zelný je považován za škůdce na brukvovitých rostlinách jak na polích, loukách, tak i v zahradách. Tento druh se vyskytuje hojně, není ohrožen a je přizpůsoben intenzivně obhospodařované krajině. V posledních letech je v mnoha oblastech výrazně hojnější méně známý bělásek řepový (Čechmánek et Hrabák, 2006).

Obecná charakteristika běláška

Bělásek zelný patří do třídy hmyzu, řádů motýlů a čeledi běláskovitých (Pieridae). Jedná se o nápadně velkého denního motýla, jehož líc křídel je bílý a v zešpičatělém apexu předního křídla má velkou černou skvrnu (Reichholf, 2004). Samice mají navíc dvě oválné černé skvrny. Bělásek zelný je rozšířen po celé Evropě včetně Skandinávie, dále obývá Blízký a Střední Východ po Himaláje a je také zavlečen do Chile. V České republice je rozšířen po celém území. Vyskytuje se převážně na loukách a zahradách, v místech dostatečného množství nektaru. Na rostliny působí negativně hlavně housenky, které rostliny ničí nejen okusováním, ale zeleninu

znehodnocují i trusem. Chutná jim především zelí a květák, rovněž brokolice, kapusta i kedluben. Díky konzumaci brukvovitých rostlin se v těle bělásků hromadí odpudivé a jedovaté látky, kterými zapáchají. Chrání se tak před některými druhy ptáků, pro které představují potenciální potravu (Čechmánek et Hrabák, 2006).

Rozmnožování a životní cyklus

V rámci hmyzu patří motýli mezi vývojově pokročilejší řády, pro které je charakteristická tzv. proměna dokonalá. Vývoj se u nich dělí na 4 stadia: vajíčko, housenka (larva), kukla a dospělec (imago). Housenka představuje ve vývoji motýla stadium růstu, které je rozděleno do několika růstových fází tzv. instarů, oddělených svlékáním. V průběhu posledního svlékání se housenka promění v kuklu. Housenka je stadiem, které nejvíce přijímá potravu, dospělec zase stadiem, které se účastní rozmnožování a podílí se na rozšiřování areálu výskytu. Dospělci se často shromažďují na typických stanovištích, kde samci aktivně vyhledávají samičky. Pro každý druh jsou před samotným pářením typické námluvní rituály, které částečně zabraňují mezidruhovému křížení (hybridizaci). Samotná kopulace u bělásky zelného trvá jen několik minut. Bělásek zelný obvykle za sezónu vytvoří dvě generace. První generace bělásky, létající od konce dubna do počátku června, je méně početná a znatelné škody nepůsobí. Naopak druhá generace, která se vyskytuje od července do září, je početnější a způsobuje větší škody (Čechmánek et Hrabák, 2006).

Životní cyklus začíná naklazením 20 až 100 kusů žlutých vajíček, která jsou kladena ve shlucích na spodní stranu listů brukvovitých rostlin. Přibližně po 10 – 14 dnech se vajíčka změň v larvy (housenky), které jsou žlutozelené se žlutými proužky a místy tmavými skvrnami. Kukla je také žlutozelená - žlutá, tmavě skvrnitá. Stadium kukly obvykle trvá jeden měsíc, poté se z kukly vyvine dospělý motýl (Lohmann, 2006).

Rostliny se mohou proti poškození běláskem a jinými herbivory bránit různými morfoloogickými, biochemickými a molekulárními mechanismy, nebo k němu mohou být tolerantní (War et al., 2012). Často však není jisté, zda se jedná o toleranci nebo rezistenci (Turley et al., 2013).

2.3 Obranné mechanismy rostlin proti napadení herbivory

Rostliny si na obranu proti herbivorům vyvinuly obranné mechanismy, pomocí kterých se brání. Obranu rostlin dělíme na konstitutivní, jejíž obranné znaky jsou stále přítomny a na indukovanou, která nastává až po napadení herbivory (War et al., 2011). Morfoloogické struktury, jako jsou trichomy a trny, jsou typickými znaky konstitutivní obrany. Pokud je však pravděpodobnost výskytu herbivora nízká, je optimální indukovaná ochrana, protože produkce obranných složek dopředu je velmi nákladná (War et al., 2012).

2.4 Konstitutivní obrana

Rostliny si vyvinuly různé strategie ke svému ochránění před herbivory a patogeny. Převažují strategie konstitutivní, které jsou neustále přítomny (War, et al., 2012; Frost et al., 2008). Většina stálezelených trvalých rostlin postrádá indukovanou obranu a důležitější pro jejich ochranu je obrana konstitutivní (War, et al., 2012).

2.4.1 Přímá konstitutivní obrana

Tato přímá forma obrany zahrnuje jakékoliv znaky rostliny, které samy o sobě přímo ovlivňují výkon útočících herbivorů, a tím zvyšují fitness rostliny v prostředí s herbivory (Kessler et Baldwin, 2002). Za přímou obranu je považována limitace zásob potravy, kdy rostliny zlepšují mechanické bariéry proti krmícímu se hmyzu, například posílením buněčných stěn. Bylo zjištěno, že pšenice (*Triticum aestivum* L.), které byly ošetřeny křemíkem, měly škodlivý efekt na vývoj mšic (*Schizaphis graminum*) (Goussain et al., 2005).

Mechanická obrana

Klíčovou roli v mechanické obraně rostlin mají znaky rostlin, jako jsou např. trichomy, tuhé listy, trny a začlenění granulovaných minerálů (štavelan vápenatý, oxid křemičitý) do rostlinných pletiv, epikutikulární vosky, latex a pryskyřice (Hanley et al., 2007).

Chemická obrana

Rostliny si kvůli neustálým útokům herbivorů a patogenů vyvinuly široký soubor obran. Důležitá je chemická obrana, při které rostliny syntetizují obranné látky, jako jsou primární a sekundární metabolity (Hartmann, 2004).

Produkovanými primárními metabolity jsou například celé řady aminokyselin, obranných proteinů a organických kyselin (Hildman et al., 1992). Řada sekundárních metabolitů je pro herbivory toxická, a proto se také dokážou chovat jako obranné složky. Mezi tyto metabolity patří např. alkaloidy, terpeny, fenoly či glykosidy (Pearce et al., 1991).

Vizuální obrana

Mezi tento typ obrany řadíme aposematismus a mimikry. Aposematické zbarvení je dobře známým jevem u zvířat, ale u rostlin mu bylo věnováno jen málo pozornosti. Jedná se o nápadné varovné zbarvení, které slouží k varování predátora před nebezpečností (jedovatostí, nepoživatelností). Další obrana je pomocí mimiker, kdy jeden jedinec napodobuje druhého blíže nepříbuzného jedince (Lev-Yadun et Inbar, 2002).

2.4.2 Nepřímá konstitutivní obrana

Příkladem nepřímé konstitutivní obrany jsou extra - florální nektária a domatia. Extra - florální nektária se uplatňují například klákání mravenců na rostlinu, přičemž poté mravenci rostlinu chrání před herbivory. Domatia jsou malé struktury na listech některých rostlin, které poskytují úkryt pro přirozené nepřátele škůdců těchto rostlin před přirozenými nepřáteli nebo před abiotickým stresem. Domatia reprezentují mutualistické spojení mezi roztoči a rostlinami, kde roztoči pomáhají rostlině redukovat hustotu fytofágních členovců a domatia poskytují roztočům ochranu. Např. domatia na révě (*Vitis riparia*) poskytují ochranu před dravými členovci pro dva druhy roztočů (*Orthotydeus lambi*, *Amblyseius andersoni*) (Walter et Odowd, 1992).

2.5 Indukovaná obrana

Změny, které v rostlinách nastávají po poškození nebo po působení stresu, se nazývají indukované odpovědi. Tyto odpovědi se někdy mohou chovat jako indukovaná ochrana, což jsou reakce rostliny na zranění herbivorem nebo invazi mikroparazitů, které sníží negativní následky útoku na rostlinu (War et al., 2012). V experimentu na ředkvi (*Raphanus raphanistrum*) vyvolaná odpověď na herbivorii housenky běláška řepkového (*Pieris rapae*) na začátku sezóny snížila následnou herbivorii sarančete. Herbivorie na prvních listech také ovlivnila hustotu trichomů a velikost listů následných. Třetí nově vytvořené listy na indukované rostlině byly větší a měly vyšší hustotu trichomů než u normálních rostlin (Agrawal, 1999). Bylo zjištěno, že indukovaná odpověď tabáku (*Nicotiana attenuata*) má negativní dopad na růst a vývoj larvy lišaje (*Manduca sexta*). Když jsou novorozené larvy omezeny na rostliny, které jsou indukovány methyljasmonátem, zažívají vyšší míru mortality a pomaleji se vyvíjejí (van Dam et al., 2000).

2.5.1 Přímá indukovaná obrana

Touto obranou se rostliny brání produkcí chemikálií, které způsobují fyzické poškození hmyzu. Rostliny mohou například produkovat nadměrné množství proteáz po útoku hmyzu, které dokážou vstřebat hmyzí strukturní proteiny poté, co jsou přijaty do hmyzích střev, což způsobuje poškození herbivorů (Chen, 2008).

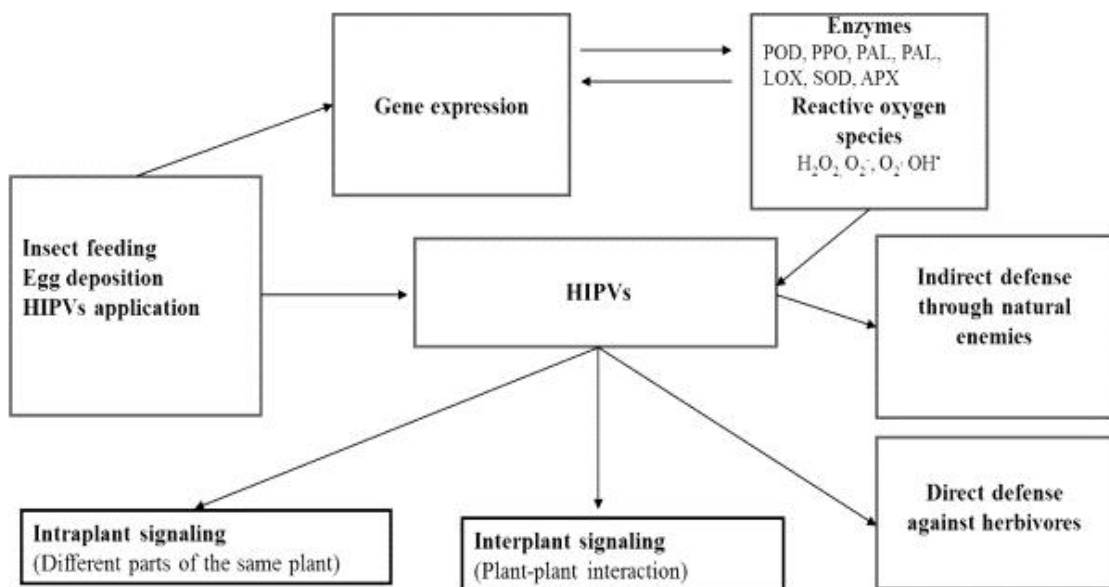
2.5.2 Nepřímá indukovaná obrana

Touto obranou je schopnost rostlin odpovědět na útok herbivorů vylučováním směsi látek, které lákají přirozené nepřátele herbivorů. Tyto směsi by měly být dobře rozpoznatelné pro predátory a snadno rozlišitelné od běžných vůní. Látky jsou vypouštěny až několik hodin po začátku poškození rostliny herbivory (Turlings et al., 1990).

Těkavé látky

Rostliny mohou reagovat na herbivory také indukcí těkavých látek. Ty se podílejí na rostlinné komunikaci s přirozenými nepřáteli herbivorního hmyzu, sousedními rostlinami a různými částmi poškozených rostlin (Bruce et Pickett, 2007). Těkavé látky se v reakci na napadení herbivorem uvolňují z listů, květů, plodů do atmosféry a také z kořenů do půdy (War et al., 2011).

Těkavé látky jsou sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností a vznikají různými metabolickými cestami. Většinou se tyto látky řadí k terpenoidům, fenylypropanoidům, benzenoidům a mastným kyselinám a jejich derivátům. Mnoho rostlinných těkavých látek včetně aldehydů, alkoholů a esterů je odvozeno od aminokyselin, jako je alanin, valin, leucin, izoleucin a methionin. Například bylo zjištěno, že methionin je prekurzor vzniku těkavých látek obsahujících síru jako je dimethylsulfid aj. (Wyllie a Fellman, 2000). Je známo, že při indukci těkavých látek hrají důležitou roli fytohormony (JA) (War et al., 2011). Hlavní úlohy těkavých látek v rostlinách jsou znázorněny na obrázku č. 1.



Obr. č. 1: Úloha herbivory indukovaných rostlinných těkavých látek. POD-peroxidáza, PPO-poylfenol oxidáza, PAL-fenylalanin, LOX-lipoxygenáza, SOD-superoxid, APX-askorbát peroxidáza (War et al., 2012)

2.6 Signalizace a průběh stresové reakce

V obraně rostlin proti patogenům jsou nepostradatelné receptory integrované v cytoplazmatické membráně, které rozpoznávají malé molekuly, jež se nacházejí na povrchu patogenních organismů, takzvané PAMPs (patogen - associated molecular patterns). Jakmile buňka na svém povrchu identifikuje patogena díky interakci transmembránových receptorů s těmito malými molekulami, rostlina

přijme signál, který vede ke změně hladiny transkripce některých genů a k produkci obranných látek. Transkripce je vyvolána signálními molekulami, jako jsou deriváty polyakrylové a benzoové kyseliny, stresové hormony např. methyljasmonát aj. Díky této transkripci dochází k produkci látek, kterými jsou proteinkiny, reaktivní formy kyslíku (ROS - reactive oxygen species), či inhibitory proteáz (Salačová et al., 2015), které se podílejí na obraně rostlin tím, že zabraňují degradaci toxických proteinů a umožňují jim vykonávat jejich obrannou funkci (War et al., 2012).

Tato stresová reakce byla dobře popsána např. u poškozených listů rajčete. Zraněné listy po útoku syntetizují prekursorový protein tzv. prosystemin, který je proteolyticky zpracován v tzv. systemin, což je první polypeptidový hormon objevený v rostlinách. Systemin je uvolňován z poškozených buněk do apoplastu. Poté je transportován floémem ze zraněných buněk k cílovým buňkám, ve kterých se naváže na plazmatickou membránu. Nakonec aktivuje biosyntézu kyseliny jasmonové, která aktivuje expresi genů, které kódují inhibitory proteáz. Kromě kyseliny jasmonové se na tomto komplexu reakcí podílí také kyselina abscisová a salicylová (Taiz et Zeiger, 2010).

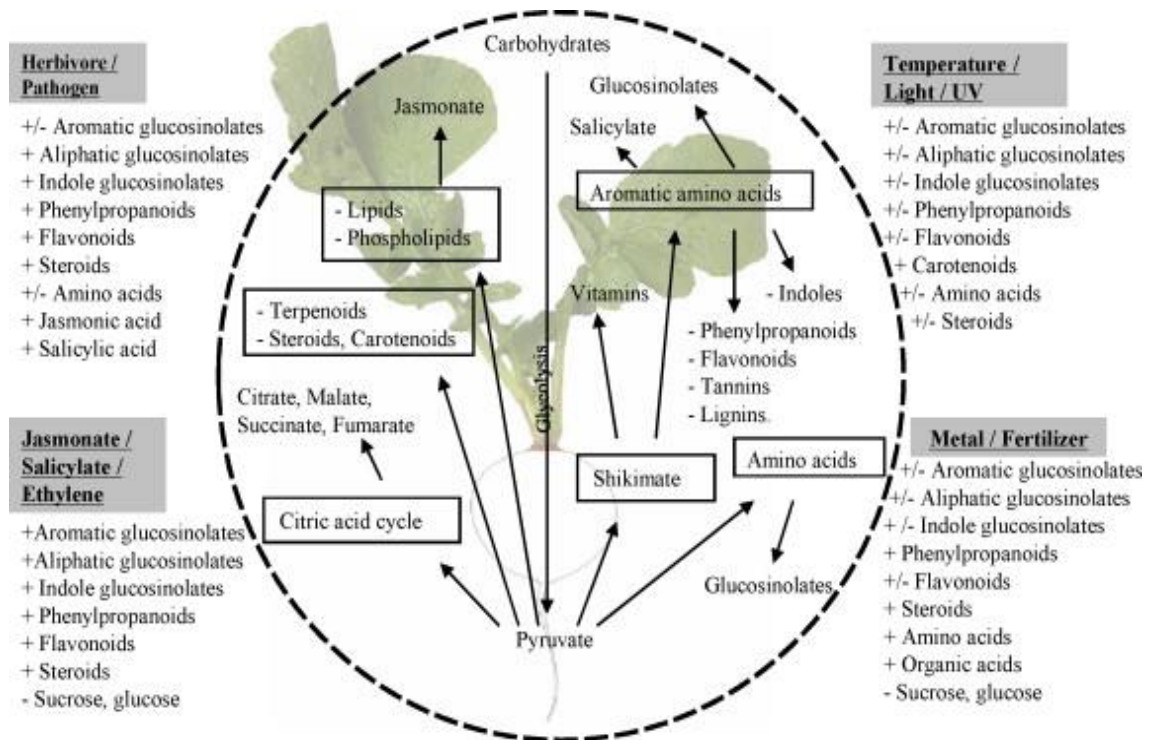
Působením stresového faktoru dochází u rostlin k mobilizaci obranných či obnovovacích procesů, tedy ke stresové reakci, která probíhá ve čtyřech fázích, a to ve fázi poplachové - fázi restituční - fázi rezistence - fázi vyčerpání. Poplachová fáze je zahájena bezprostředně po účinku jednoho či více stresorů, kdy jsou jejich působením narušeny buněčné struktury a životní funkce rostliny. V restituční fázi (nedojde-li k úhynu rostliny) začnou pracovat kompenzační mechanismy, které mají za cíl zvýšení odolnosti rostliny ve fázi rezistence vůči působícím stresorům. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresorů nemusí být zvýšená odolnost rostliny trvalá a může dojít opět k jejímu poklesu ve fázi vyčerpání (Bláha et al. 2003).

Výsledkem stresové reakce je určitá úroveň adaptační schopnosti. Přechodně se může zvýšit i úroveň odolnosti vůči biotickým stresorům - tento jev se nazývá aklimace. Řada rostlinných druhů se dokáže vyhnout působení stresorů, většinou se však rostlina pokouší o nastolení tolerance vůči stresu (Bláha et al. 2003).

2.7 Účinky stresu na primární metabolismus rostlin z čeledi Brassicaceae

Rostliny z čeledi Brassicaceae jsou vystaveny různým abiotickým a biotickým faktorům (Zhao et al., 2007), na které reagují aktivací svého obranného systému (Hayat et al., 2007), přičemž však dochází ke změně primárního a sekundárního metabolismu rostlin (Jahangir et al., 2008; Singh et al., 2007; Schonhof et al., 2007; Eason et al., 2007).

To má za následek zvýšenou produkci některých metabolitů (viz obr. č. 2) (Moreno et al., 2006; Gols et al., 2007; Bellostas et al., 2007; Petersen et al., 2007).



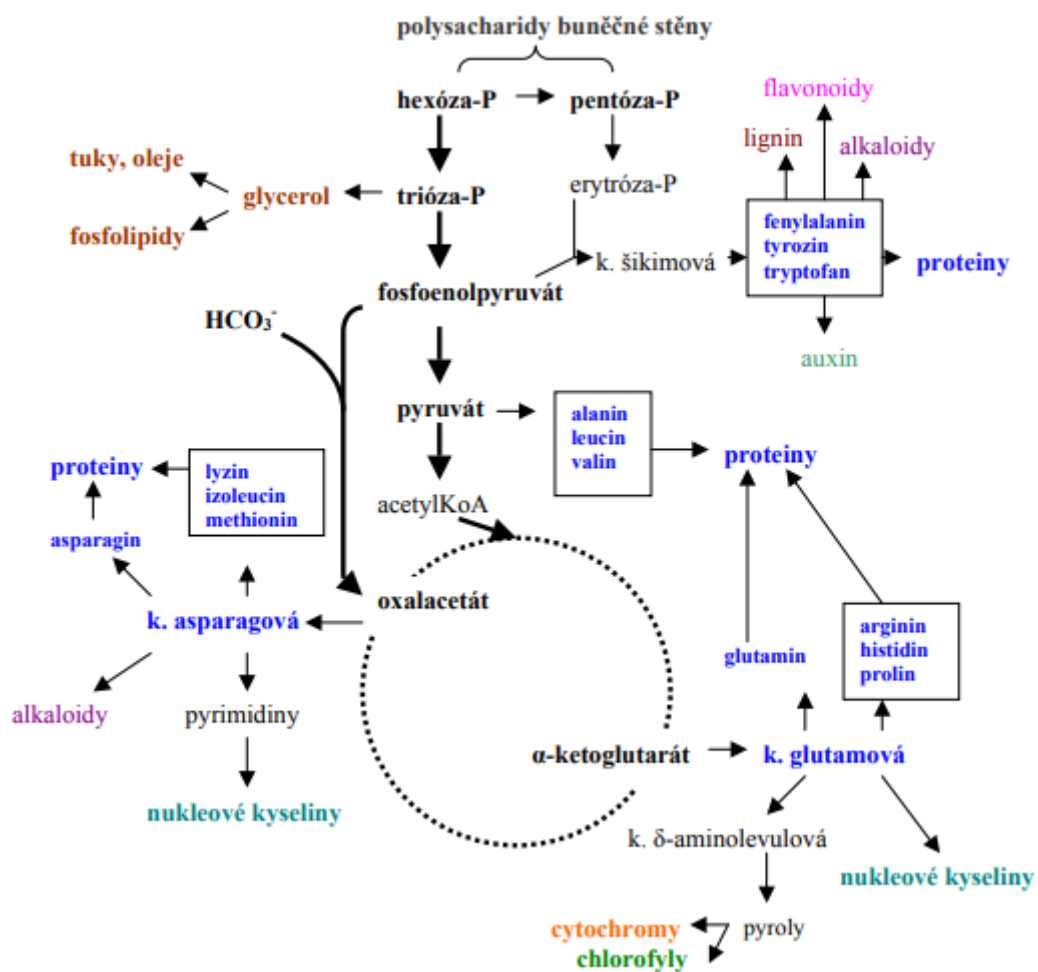
Obr. č. 2: Shrnutí biosyntetické dráhy a stresem podmíněná produkce metabolitů. Základní metabolická dráha je nakreslena ve vyznačeném kruhu. + značí zvýšení produkce, - značí naopak snížení produkce (Jahangir et al., 2009)

2.8 Primární metabolismus

V posledních letech je velmi studován mechanismus obranných reakcí rostlin ve stresových situacích a to hlavně v souvislosti s produkcí druhově specifických sekundárních metabolitů (Major et Constabel, 2006). Zajímavé výsledky však přináší i oblast studia vlivu stresových faktorů na primární metabolismus rostlin (Ryšlavá et Doubnerová, 2010). Nicméně změny v primárním metabolismu při napadení rostliny herbivorem jsou velmi málo prozkoumané. Hmyz může do jisté míry s primárním metabolismem rostlin manipulovat ve svůj vlastní prospěch, takže je náročné určit, zda jsou pozorované změny skutečně obrannou reakcí rostlin (Zhou et al., 2015).

Primární metabolismus je definován jako biochemické pochody, při kterých vznikají základní látky, jako jsou sacharidy a z nich vznikající mastné kyseliny a tuky, jednoduché karboxylové kyseliny, 20 základních aminokyselin, které jsou základem proteinů a některé deriváty těchto látek (Neuhaus, 2007).

Zásadní úloha primárního metabolismu je poskytnutí potřebné energie, která je při stresu využita k obraně. Rostlina se snaží šetřit energii, a tak je při stresu snížena fotosyntéza a syntéza chlorofylu (Rojas et al., 2014), k čemuž dochází především v místě poranění nebo jeho blízkém okolí (Somssich et Hahlbrock, 1998). Naopak aktivita některých procesů k získání energie a jiných důležitých látek je při stresu zvýšená - respirace a s ní související glykolýza a Krebsův cyklus. Cesty propojující glykolýzu a Krebsův cyklus (viz obr. č. 3) umožňují vznik důležitých (mezi)produktů - metabolitů, které mohou být využity jako substráty pro syntézu dalších látek a dále tyto cesty umožňují získání redukovaných koenzymů NADH a FADH₂ a v konečné fázi i energii ze sacharidů ve formě ATP (Rojas et al., 2014).



Obr. č. 3: Glykolýza, Krebsův cyklus a pentózový cyklus jako zdroj substrátů pro další důležité metabolické cesty (Pavlová, 2006)

2.8.1 Vliv abiotického stresu

Abiotické faktory velmi ovlivňují produkci metabolitů. Při narušení vodní rovnováhy rostlin chladem, suchem či zasolením půdy bylo sledováno zvýšení aktivity enzymu fosfoenolpyruvátcarboxylasy (PEPC) (Gonzalez et al. 2003, Sanchez et al. 2006). Enzym PEPC umožňuje rostlině využívat nižší koncentrace

CO₂ (Ryšlavá et Doubnerová, 2010). Při suchu byl pozorován lineární nárůst aminokyselin, produkovaných listy rostlin z čeledi Brassicaceae a následná snížená koncentrace těchto aminokyselin při rehydrataci rostliny (Good et Zaplachinski, 1994). Stresové podmínky při suchu zvyšují obsah cukru v rostlinách. Za podmínek zvýšené koncentrace solí může dokonce docházet k přechodu metabolismu C3 rostlin na CAM (Crassulacean Acid Metabolism), spojeného se syntézou a zvýšení aktivity PEPC, což bylo pozorováno například u kosmatce křišťálového (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Höfner et al. 1987). PEPC spojuje metabolismus sacharidů s metabolismem aminokyselin a proteinů, tato skutečnost může být pro rostlinu za stresu, kdy je nárok na syntézu proteinů vyšší, důležitá (Ryšlavá et Doubnerová, 2010). Zvýšení aktivity enzymu NADP - dependentní malátdehydrogenasa, který v rostlinách za stresových podmínek katalyzuje produkci redukčních ekvivalentů NADPH nutných pro biosyntézu fytoalexinů a dalších obranných látek (Piterková et al. 2005), bylo sledováno u rostlin tabáku při působení abiotického stresu (Ryšlavá et al. 2003) v C3 i CAM rostlinách v souvislosti se solným stresem (Valderrama et al. 2006). NADP katalyzuje také vznik pyruvátu z L-malátu, který může být navíc využit pro biosyntézu lipidů na opravy poškozených membrán. NADPH také slouží jako koenzym antioxidačních enzymů (Piterková et al. 2005). V souvislosti se stresem bylo také prokázáno zvýšení aktivity enzymu pyruvát fosfátdikinyasy (PPDK) (Ryšlavá et Doubnerová, 2010).

Pod vlivem dalšího abiotického faktoru – expozice kovu – dochází u rostlin k přechodnému zvýšení fotosyntetických pigmentů, bílkovin, aminokyselin a obsahu cukru (Singh et Sinha, 2005). Například u rostlin z čeledi Brassicaceae, jejichž stresorem byla měď, často dochází k oxidačnímu poškození, které vede ke ztrátě obsahu chlorofylu (Zawoznik et al., 2007). Dále u nich dochází také ke zvýšení koncentrací organických kyselin (Seth et al., 2008).

Vliv teploty na obsah metabolitů v rostlinách je značný. Působením tepla u rostlin z čeledi Brassicaceae došlo k výraznému snížení množství karotenoidů (Gebczynski et Lisiewska, 2006), obsahu aminokyselin (Lisiewska et al., 2008) a také ke snížení obsahu kyseliny askorbové (Gebczynski et Lisiewska, 2006).

2.8.2 Vliv biotického stresu

Pokud je rostlina napadena herbivorem, obrana je velmi náročná a často dochází ke snížení růstu i reprodukci rostlin a k metabolickým změnám (Smith et Stitt, 2007). Druhy rostlin z čeledi Brassicaceae obecně obsahují nižší obsah aminokyselin, než kultivované odrůdy, a to v důsledku působení nejrůznějších faktorů v přírodě, čímž jsou vystaveny různým stresovým podmínkám. Reakce na stres je koordinována signálními systémy, které jsou indukované při napadení rostliny herbivorem či patogenem (Mewis et al., 2005). Je zajímavé, že při elicitaci listů methyljasmonátem (MeJA) dochází k poklesu hladiny glukózy, sacharózy

a aminokyselin (Liang et al., 2006), naopak při napadení rostliny mšicemi dochází ke značnému zvýšení produkce primárních metabolitů včetně aminokyselin i některých sekundárních metabolitů (Cole, 1997).

Jak již bylo uvedeno v úvodu kapitoly 2.8, v reakci na herbivorii dochází u rostlin ke snížení fotosyntézy, a to kvůli vzniklým změnám v primárním metabolismu. Existují však výjimky, kdy ke snížení fotosyntetické aktivity nedošlo, například při pokusu, kdy došlo k napadení pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmene (*Hordeum vulgare*) mšicí zhoubnou (*Diuraphis noxia*) (Botha et al., 2006; Gutsche et al., 2009). Při snížení fotosyntetické aktivity má rostlina nižší přísun sacharidů a potřebuje tak zvýšit příjem uhlíku a získat dostatek energie, aby se mohla proti stresu bránit. energii mohou rostliny získat podporou lokálního katabolismu sloučenin, kdy dochází k uvolňování energie, anebo v procesu degradace bílkovin pro uvolnění volných aminokyselin (Caldana et al., 2011).

2.9 Základní charakteristika vybraných primárních metabolitů

Primární metabolity jsou v rostlinném těle nepostradatelné a při jejich nedostatku dochází k úhynu rostliny. Rostlinné aminokyseliny mají důležitou roli při interakci rostlin s herbivorem. Jsou to hlavní živiny, které ovlivňují růst rostlin a slouží jako prekurzory pro výrobu mnoha sloučenin pro jejich ochranu. Vzhledem k těmto důležitým funkcím aminokyselin bylo dokázáno, že napadené rostliny zvyšují produkci aminokyselin pro syntézu obranných metabolitů. Například bylo zjištěno, že geny podílející se jak na biosyntéze aminokyselin, tak na asimilaci síry, která je důležitá pro biosyntézu aminokyselin cysteinu a methioninu, jsou nadměrně přítomny u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) při napadení housenkami (Appel et al., 2014). Stejně tak je pro rostliny důležitá syntéza organických kyselin. Ty působí nejen jako meziprodukty v metabolismu uhlíku, ale také jako klíčové součásti mechanismů, které rostliny využívají při působení nejrůznějších stresorů (López-Bucio et al., 2000). Jsou však potřebné další studie, které by vysvětlily přesné chování těchto kyselin v rostlinách, na které působí jeden či více stresorů (Hilker et Fatouros, 2015).

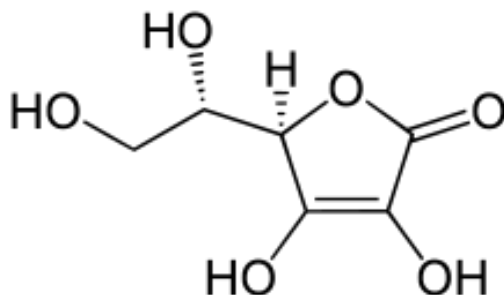
Primární metabolity jsou v rostlině transportovány přes semipermeabilní membránu zvanou tonoplast do centrálních vakuol buněk. Ty mohou zaujímat až 80% celkového objemu buňky, a tak dokážou uskladnit obrovské množství anorganických i organických látek. Vakuoly také udržují rovnoměrné pH v buňce, zadržují odpadní produkty a vodu. Nejen dusičnany, které slouží jako předchůdci syntézy aminokyselin, ale také meziproductová a toxická molekula amoniaku a samotné finální aminokyseliny jsou uloženy v centrálních vakuolách (Dietz et al., 1990; Winter et al., 1994). Ve vakuolách se dále pak hromadí organické kyseliny, antokyany, flavonoidy a mnoho dalších látek. Malát, citrát a fumarát vstupují do vakuoly přes specifické transportní proteiny a představují hlavní karboxylové kyseliny v rostlinách (Neuhaus, 2007).

2.10 Organické kyseliny

2.10.1 Kyselina askorbová

Sumární vzorec: C₆H₈O₆

Synonymum: vitamín C



Obr. č. 4: Chemický vzorec vitamínu C, L – askorbová kyselina

Kyselina askorbová (vzorec viz obr. č. 4) je jedním z hlavních metabolitů v rostlinách. Je důležitou živinou především v zelenině a ovoci (Wang et al., 2015). Vyskytuje se v cytoplazmě, chloroplastech, vakuolách, mitochondriích i v buněčné stěně. Je to důležitý antioxidant, který chrání rostliny před poškozením reaktivními formami kyslíku, jejichž tvorba je důsledkem aerobního metabolismu rostlin, fotosyntézy a působení sucha, patogenů, extrémních teplot nebo dalších fyzikálních i chemických jevů. Kromě antioxidantní funkce a funkce enzymového kofaktoru se kyselina askorbová podílí na buněčném dělení, redukci iontů některých přechodných kovů, na kontrole roztahování buněčné stěny, regeneraci α -tokoferolu a také významně ovlivňuje absorpci NO₂ (Shao et al., 2008).

Biosyntéza kyseliny askorbové v rostlinách ještě nebyla zcela objasněna, existují pouze poznatky týkající se pravděpodobné biosyntetické cesty kyseliny askorbové (Smirnov, 1996). Biosyntéza kyseliny askorbové probíhá v mitochondriích. Odtud se většinou usnadněnou difúzí dostává do ostatních buněčných komponent (Shao et al., 2008). Je pravděpodobné, že průlom v řešení nedostatku informací o biosyntéze kyseliny askorbové a její regulaci poskytnou další molekulárně-genetické výzkumy společně s výzkumy biochemickými. K těmto výzkumům se v poslední době používají mutanti s abnormálním množstvím kyseliny askorbové (a s tím související hypersenzitivitou nebo rezistencí vůči ozónu), jako například vtc-1 mutant *Arabidopsis thaliana*. Existují dvě pravděpodobné cesty biosyntézy kyseliny:

- 1) Biosyntetická cesta s využitím L-galaktono-1,4-laktonu

- 2) Biosyntetická cesta přes D-glukoson a L-sorboson. Neexistuje však žádný nezvratný důkaz, že biosyntéza probíhá jednou z výše zmíněných cest (Smirnoff, 1996).

Nicméně pozdější studie prokázaly, že nejpravděpodobnější cesta syntéza kyseliny askorbové je prostřednictvím HDP – galaktózy fosforylázy a GDP – manózy (Linster et Clarke, 2008; Bulley et Laing, 2016).

Kyselina askorbová chrání rostliny při napadení rostliny patogenem. Borbala et al. (2008) zkoumali vliv patogenu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* race A6 na různé genotypy ječmene (*Hordeum vulgare*). Celkové množství kyseliny askorbové nebylo u žádného genotypu naočkováním tohoto patogenu nijak ovlivněno. Nicméně je však dokázáno, že methyljasmonát (ester kyseliny jasmonové) vyvolává zvýšení syntézy kyseliny askorbové v rostlině (Wolucka et al., 2005). Důkazy byly provedeny na *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana tabacum* Bright Yellow-2. Jde o první případ hormonální regulace syntézy kyseliny askorbové v rostlinách. Pokusy regulovat syntézu kyseliny askorbové za použití některých jednoduchých enzymů (zejména enzymů hrajících roli při biosyntéze) byly zatím neúspěšné (Ishikawa et al., 2006). Infekce listů *Arabidopsis thaliana* spórami patogenu *Botrytis cinerea* má za následek snížení množství kyseliny askorbové a tím i oxidativní poškození (Muckenschnabel et al., 2002). Tyto výsledky se shodují s výsledky Kuzniak et Sklodowské (2005), kteří studovali odezvu oxidativního stresu vzniklého infekcí *Botrytis cinerea* na *Lycopersicon esculentum* Mill. Vlivem tohoto patogenu došlo opět ke snížení množství kyseliny askorbové.

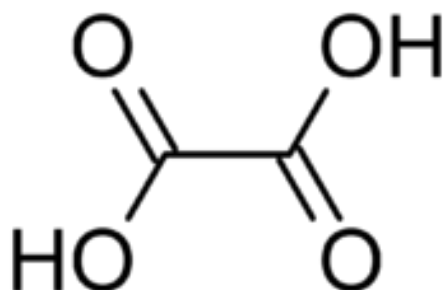
Zajímavostí je, že člověk a několik druhů ptáků jsou závislí na příjmu kyseliny askorbové v potravě, jelikož si tuto kyselinu nedokážou sami syntetizovat (Figueroa-Méndez et Rivas-Arancibia, 2015).

2.10.2 Kyselina šťavelová

Sumární vzorec: $C_2H_2O_4$

Systematický název: kyselina ethandiová

Synonymum: kyselina oxalová



Obr. č. 5: Chemický vzorec kyseliny šťavelové

Kyselina šťavelová – oxalic acid (OA, viz obr. č. 5), je dvouuhlíkatá organická kyselina, která se vyskytuje u mnoha druhů rostlin. V rostlinách tato kyselina reguluje hladinu vápníku, iontovou rovnováhu (Na a K) a detoxikuje a chrání rostlinu před patogeny a herbivory (Franceschi et Nakata, 2005). Bylo zjištěno, že je tato kyselina schopna v nízkých koncentracích vyvolat rezistenci rostlin vůči patogenům, kdežto ve vysokých koncentracích indukuje zvýšené množství reaktivních forem kyslíku, čímž je způsobena programovaná buněčná smrt (PCD - Programmed Cell Death) (Lehner et al., 2008), na kterou má vliv také ethylen (Errakhi et al., 2008).

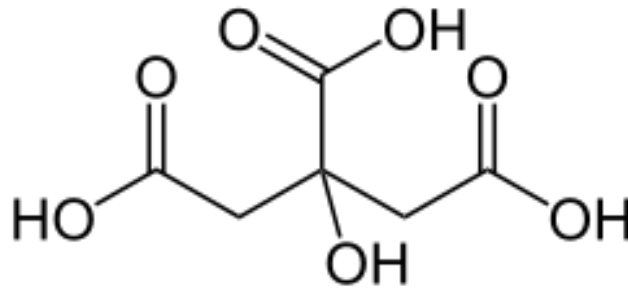
V rostlinách se kyselina šťavelová vyskytuje ojediněle, v těle rostlin se nachází převážně ve formě nerozpustných vápenatých solí, tzv. šťavelany či oxaláty, které se vyskytují ve většině orgánů a pletiv a ukládají se do rostlinných vakuol (Franceschi et Nakata, 2005).

Syntéza této organické kyseliny probíhá 3 cestami a to prostřednictvím oxidace glyoxylátu, štěpením askorbátu a hydrolýzou oxalacetátu (Horner et Wagner, 1995; Nakata, 2003; Franceschi et Nakata, 2005). Biosyntézy se účastní také enzymy laktátdehydrogenáza a glykolát oxidázy (Franceschi et Nakata, 2005).

Nicméně v nynější době zůstává otázka biosyntetické dráhy kyseliny šťavelové stále otevřená, neboť neexistují jasné důkazy o vzniku a o místech ukládání této kyseliny. Existují názory, že biosyntetická dráha této kyseliny se liší u jednotlivých druhů rostlin (Rahman et Kawamura, 2011).

2.10.3 Kyselina citrónová

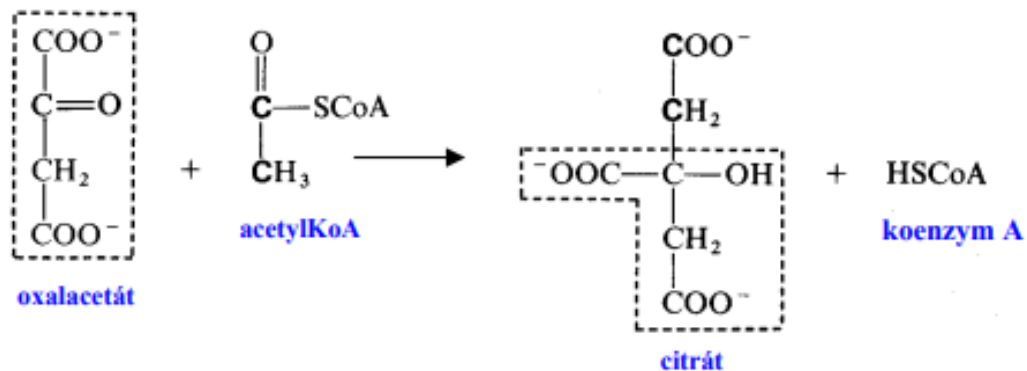
Sumární vzorec: $C_6H_8O_7$



Obr. č. 6: Chemický vzorec kyseliny citrónové

I přesto, že se tato trikarboxylová kyselina vyskytuje především v citrusech, nachází se také u mnoha druhů zeleniny. Pokud je rostlina pod náporom biotického stresu, projeví se hlavní funkce kyseliny citrónové (CA, viz obr. č. 6) v podobě zmírnění oxidačního poškození. Bylo zjištěno, že CA u rostlin čeledi Brassicaceae podporuje růst, fotosyntézu, obsah chlorofylu a karotenoidů, a že reguluje koncentraci rozpustných proteinů. CA rovněž zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů v rostlinách (Afshan et al., 2015) a zvyšuje rozpustnost a absorpci kovů rostlinami (Yeh et Pan 2012; Freitas et al., 2013), často se tak využívá k fytoremediaci (Raziuddin et al., 2011).

Jak je vyobrazeno na obrázku č. 7, kyselina citrónová vzniká v citrátovém cyklu (Krebsově cyklu), kterého se účastní. Postupnou dekarboxylací a oxidací šestiuhlíkaté kyseliny citrónové jsou uvolněny redukční ekvivalenty, které jsou použity při oxidativní fosforylaci k syntéze ATP – zdroj energie pro buňky (Raziuddin et al., 2011).

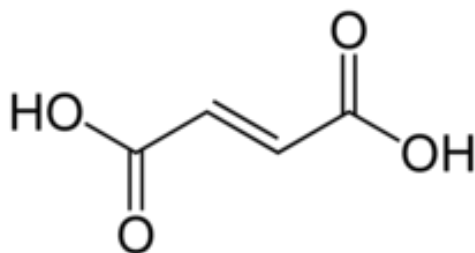


Obr. č. 7: Schéma vzniku kyseliny citrónové v Krebsově cyklu (Pavlová, 2006)

2.10.4 Kyselina fumarová

Sumární vzorec: $C_4H_4O_4$

Synonymum: kyselina trans-butendiová



Obr. č. 8: Chemický vzorec kyseliny fumarové

Kyselina fumarová (FA, viz obr. č. 8) je organická kyselina, která se účastní citrátového cyklu. Je známo, že značné množství této kyseliny je obsaženo v rostlinách, jako je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) a sója luštinatá (*Glycine max (L.)*). Koncentrace této kyseliny v rostlině závisí na stáří rostliny a na intenzitě světla, které na ni dopadá. Zatímco malát a fumarát se účastní mnoha cest v metabolismu rostlin, funkce těchto organických kyselin jako zásoby uhlíku v rostlinách C₃ nebyla hluboce řešena (Chia et al., 2000).

2.11 Aminokyseliny

Při stresu dochází v rostlinném těle ke kumulaci specifických aminokyselin (AMK), které se účastní obrany rostlin proti působení daného stresoru. Aminokyseliny tedy mají důležitou úlohu při signalizaci především biotického stresu rostlin (Rai, 2002).

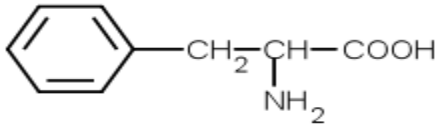
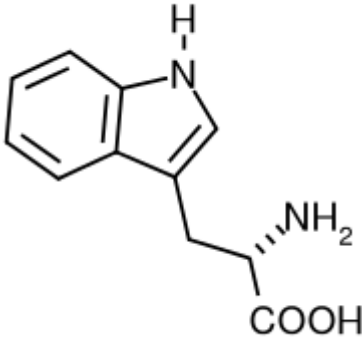
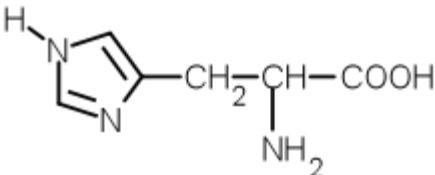
Aminokyseliny jsou substituční deriváty karboxylových kyselin a jsou základní stavební jednotky proteinů, které jsou pro rostlinné tělo nepostradatelné. V rostlinách se vyskytuje více než 100 AMK. Ty AMK, které dávají vznik bílkovinám, se nazývají proteinogenní aminokyseliny. Těch je dvacet a mají několik společných vlastností. Jednou z nich je jejich strukturní uspořádání, kdy se jedná o L a zároveň o α formy. Proteiny jsou důležité pro jejich strukturní, katalytickou, transportní, obrannou, regulační a zásobní funkci (Velíšek, 2002).

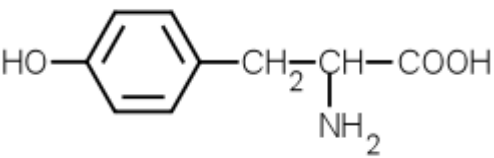
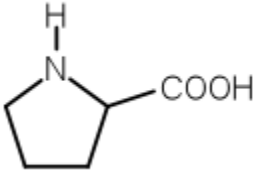
Hlavní úlohou aminokyselin v rostlinách je osmolytická funkce, regulace iontového transportu a detoxikace těžkých kovů. Dále také ovlivňují syntézu a aktivitu některých enzymů, genovou expresi (Rai, 2002) a mohou sloužit jako prekurzory široké škály sekundárních metabolitů (Tzin et Galili, 2010). Je známo, že AMK jsou součástí peptidů. Například kyselina glutamová, cystein a glycin vytváří velmi důležitý peptid Glutathion, který se podílí na širokém spektru metabolických procesů. V rostlinách glutathion transportuje a uskladňuje síru, působí jako redukční činidlo, odstraňuje H₂O₂ z chloroplastů a umožňuje detoxikaci xenobiotik včetně herbicidů a pesticidů. Obecně chrání rostlinu před působením stresorů, jako jsou vysoká teplota, nadměrné záření, těžké kovy a další (Noctor et al., 2011).

Syntéza mnoha aminokyselin probíhá pouze v rostlinách a mikroorganismech. Tyto aminokyseliny se nazývají esenciální (nezbytné), ty si savci nedokážou sami vytvořit na rozdíl od rostlin, a tak je musí získávat potravou. Ostatní aminokyseliny si mohou savci syntetizovat z běžných metabolitů, a nazývají se neesenciální (Planchet et Limami, 2015). U rostlin se syntéza AMK uskutečňuje v chloroplastech, u většiny v místě zvané stroma. U AMK Asparaginu (Asp) syntéza probíhá pravděpodobně v cytosolu buněk (Plaxton et McManus, 2006). AMK jsou syntetizovány různými odlišnými metabolickými cestami (aromatické aminokyseliny např. tzv. šikimátovou cestou), přičemž syntéza některých AMK není dosud zcela objasněná (Planchet et Limami, 2015). Výchozí látkou pro jejich syntézu je amoniak, který se napojuje do molekuly organické kyseliny ve formě –NH₂ skupiny. Obecně biosyntéza neesenciálních aminokyselin (s výjimkou tyrosinu) probíhá poměrně jednoduše ze 4 metabolitů: z pyruvátu, oxalacetátu, 2-oxoglutarátu a 3-fosfoglycerátu, kdy pyruvát a 3-fosfoglycerát jsou metabolity degradace glukosy – glykolýzy. Oxalacetát a 2-oxoglutarát jsou metabolity citrátového cyklu. Biosyntéza esenciálních aminokyselin, která probíhá pouze v rostlinách a mikroorganismech, je podstatně složitější a unikátní pro každou AMK. Zdrojem dusíku pro esenciální aminokyseliny je vzdušný dusík. Fixovat vzdušný dusík na jinou sloučeninu není jednoduché, protože molekula N₂ je značně stabilní a její přeměna žádá velkou energii. Dokážou to jen některé druhy bakterií a sinic, které obsahují enzymový komplex nitrogenasu (Rai, 2002; Zhao et al., 2007). Tyto bakterie žijí v symbióze s rostlinami čeledi Fabaceae. Vzniklý amoniak se pak může zabudovat do aminokyselin glutamátu nebo glutaminu. Nadbytečný amoniak, který luštěniny nespotřebují, se uvolňuje do půdy a mohou ho využívat i jiné rostliny. Dalším zdrojem dusíku jsou výměšky a rozkladné produkty mrtvých organismů (Planchet et Limami, 2015).

Tab. č. 1: Přehled aminokyselin

Název	Vzorec	Zkratka
Esenciální AMK		
Valin	$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3 & -\text{CH} & -\text{CH} & -\text{COOH} \\ & & & \\ & \text{CH}_3 & \text{NH}_2 & \end{array}$	Val
Leucin	$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3 & -\text{CH} & -\text{CH}_2 & -\text{CH} & -\text{COOH} \\ & & & & \\ & \text{CH}_3 & & \text{NH}_2 & \end{array}$	Leu
Isoleucin	$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3 & -\text{CH}_2 & -\text{CH} & -\text{CH} & -\text{COOH} \\ & & & & \\ & & \text{CH}_3 & \text{NH}_2 & \end{array}$	Ile

Fenylalanin		Phe
Lysin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Lys
Methionin	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Met
Tryptofan		Trp
Threonin	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Thr
Podmíněně esenciální AMK*		
Arginin	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\text{C}}=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Arg
Histidin		His
Neesenciální AMK		
Glycin	$\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2}-\text{COOH}$	Gly
Alanin	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Ala

Serin	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Ser
Cystein	$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Cys
Kyselina asparagová	$\text{HO}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Asp
Asparagin	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Asn
Kyselina glutamová	$\text{HO}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Glu
Glutamin	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Gln
Tyrosin		Tyr
Prolin		Pro

*Poznámka: Podmíněně esenciální AMK – esenciální při nepřítomnosti prekurzorů či nezralosti enzymatických procesů (pouze u dětí)(Rassin, 1994)

2.12 Proteiny

Proteiny související s patogenezí (PR – pathogenesis related proteins) jsou proteiny s malou molekulovou hmotností. Zvýšená produkce těchto proteinů nastává díky zvýšení transkripce PR genů (Řepková, 2013), která je vyvolána signálními molekulami (kyselina salicylová, abscisová, jasmonová, ethylen) (Jain et Kumar, 2015) během hypersenzitivní reakce, nejčastěji v závislosti na indukcii nekrózy rostlinného pletiva. Při stresu jsou tyto proteiny v rostlinných buňkách

exprimovány krátce po napadení a poté jsou transportovány do mezibuněčných prostor (Řepková, 2013).

PR - proteiny jsou tedy další, zvláště významnou a univerzálně v rostlinách přítomnou skupinou, která se účastní obranných reakcí rostliny (Řepková, 2013). Byly popsány u mnoha rostlinných druhů po infekci oomycetami, houbami, bakteriemi, viry nebo po napadení hmyzem (Jain et Kumar, 2015).

Ve velmi nízkých koncentracích jsou přítomny i v neinfikovaných pletivech (Jain et Khurana, 2018). Po napadení rostliny se ale jejich hladina zvýší. Syntézu PR - proteinů zvyšují také některé chemické látky, jako je kyselina polyakrylová, kyselina salicylová, acetosalicylová, benzoová, dále AgNO_3 , MgCl_2 a další látky. Některé látky a faktory naopak syntézu PR - proteinů inhibují. Jsou to například aminokyseliny arginin, lysin, ornitin, dále spermidin, hydrochinon, EDTA a aktinomycin D (Řepková, 2013).

Mají typické fyzikálně - chemické vlastnosti, které jim umožňují odolávat kyselému pH a proteolytickému štěpení a díky tomu dokážou přežít v drsném prostředí, kde se vyskytují: vakuoly, buněčné stěny nebo mezibuněčné prostory (Stintzi et al., 1993). Velké množství se jich hromadí v xylemu. Obranné vlastnosti PR - proteinů spočívají především v jejich enzymových aktivitách (chitinázy, glukánázy, ale i alkalické deproteázy) (Řepková, 2013). Některé PR - proteiny vykazují antibakteriální a antivirové účinky, jejich antivirová aktivita však není v dnešní době zatím vysvětlena (Jain et Kumar, 2015).

Rozdělují se do skupin, které se liší v mnoha oblastech a to svojí primární strukturou, sérologickou příbuzností, enzymatickou a biologickou aktivitou (Jain et Kumar, 2015).

Rozdělení PR proteinů

Tyto obranné proteiny tvoří rozsáhlou a různorodou skupinu a do současné doby jich bylo izolováno několik stovek. Lze říci, že nové jsou objevovány téměř denně. Jejich vysoký počet a různorodost jejich klasifikaci ztěžuje. Mohou být klasifikovány podle jejich struktury, enzymových vlastností, molekulové hmotnosti, podobnosti s jinou dříve popsanou skupinou proteinů, sérologických vlastností nebo mechanismu účinku. Většina autorů rozděluje nejvýznamnější PR - proteiny rostlin do pěti skupin. Jsou to skupiny: PR - 1, PR - 2, PR - 3, PR - 4, PR - 5. Každá z těchto pěti skupin se dělí ještě na další dvě podskupiny na základě odlišného isoelektrického bodu na kyselé a bazické (Carr et al., 2010). Kyselé proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru a ty bazické jsou přítomny v buněčných vakuolách. K těmto základním pěti skupinám jsou dnes řazeny další skupiny - defensiny, thioniny, proteiny podobné cyklofilinu, proteiny inaktivující ribosomy, proteiny přenosu lipidů a inhibitory (Heřmanová, 2006).

Vlastnosti a funkce vybraných PR proteinů

- PR - 1 skupina

Tato skupina proteinů byla objevena jako první v roce 1970 (Van Loon et Van Strien, 1999). Poprvé byly tyto proteiny izolovány z tabáku. Později byly nalezeny u mnoha dalších rostlin (Ebrahim et al., 2011). Mnoho vědců se snažilo zjistit, jaká je jejich funkce, mechanismus účinku a vztah k ostatním proteinům, ale zatím bez úspěchu a o biologické aktivitě toho víme velmi málo (Van Loon et Van Strien, 1999).

- PR - 2 skupina (β - glukanasy)

Společným znakem proteinů této skupiny je jejich endoglukanázová aktivita. Podle sekvence aminokyselin se rozdělují ještě do tří tříd. Hlavní strukturální rozdíl mezi proteiny třídy I a dalšími dvěma třídami spočívá v tom, že proteiny třídy I jsou syntetizovány jako preproteiny, které jsou zpracovány předtím, než jsou enzymaticky aktivní. Proteiny PR - 2 byly nalezeny v široké škále rostlin, včetně tabáku, hrachu, obilí a ovoci (Selitrennikoff, 2001).

Jejich mechanismus účinku spočívá v hydrolýze struktury β -1,3-glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Tím postupně oslabují buněčné stěny, což vede následně k lyzi buněk (Heřmanová, 2006).

- PR - 3 skupina (chitinasy)

Proteiny skupiny PR - 3 byly izolovány z celé řady rostlin – tabáku, okurky, fazolu, hrachu, obilovin, ale i z mnoha dalších rostlin. Mechanismus účinku této skupiny je dán jejich enzymovou aktivitou. Jedná se o endochitinasy, které narušují chitin přítomný v buněčné stěně hub (Heřmanová, 2006). Geny kódující chitinasu jsou úspěšně využívány jako kandidátní geny pro transformaci rostlin. Jejich cílem je zvýšení odolnosti rostlin vůči napadení patogeny (Salačová et al., 2015).

- PR - 4 skupina (proteiny vázající se na chitin)

Proteiny skupiny označené PR - 4 jsou klasifikovány jako chitin vázající proteiny. Atakují buněčnou stěnu hub současně s proteiny ze skupiny PR - 3, jenž se vyznačují chitinasovou aktivitou (Salačová et al., 2015).

- PR - 5 skupina (proteiny podobné thaumatinu)

Tyto proteiny jsou další významnou skupinou, která souvisí s patogenezí. V odborné literatuře se tato skupina označuje různě. Patří sem proteiny s vysokou homologií s thaumatinem rostliny *Thaumatococcus daniellii*, proto se tyto proteiny označují jako thaumatin - like proteiny. Struktura některých proteinů z této skupiny se podobá struktuře osmotinu, což je stresový protein izolovaný z tabáku, odtud pak pochází označení osmotin - like protein. Proteiny PR - 5 zabraňují růstu houbových patogenů tím, že inhibují jejich enzymy, které štěpí polysacharidy

buněčných stěn rostlinných buněk (např. xylanasy). Díky tomu je znemožněn jejich vstup do hostitelské rostliny (Salačová et al., 2015).

Významnou funkci mají také inhibitory proteáz (IP), které inhibují různé typy enzymů a tím přispívají k obraně rostlin proti hmyzu. Vyšší koncentrace byla zaznamenána v úložných orgánech, jako jsou semena a hlízy. IP se váží na trávicí enzymy ve střevech hmyzu a inhibují jejich aktivitu, čímž snižují trávení bílkovin, což vede k nedostatku aminokyselin a pomalému vývoji hmyzu (War et al., 2012).

3 Metodika

3.1 Vybrané rostliny vystavené stresu

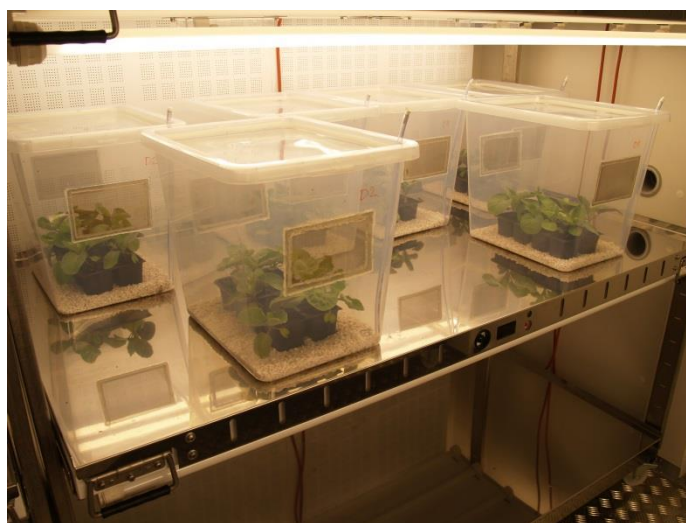
V tomto výzkumu byla zvolenou stresovanou rostlinou brukev zelná (*Brassica oleracea*). Ta byla v příznivých podmínkách předem předpěstována. Část rostlinek byla 10. června 2017 zaseta do mini sadbovačů a část naširoko. Použitým půdním substrátem byla směs běžné zahradní zeminy, univerzálního substrátu a agroperlit. Poměr jednotlivých složek byl 2:2:1. Kultivace rostlin probíhala při 15 hodinové fotoperiodě v pěstební komoře Fytotron, ve které denní teplota činila 22 °C a noční 15 °C. Po zhruba 2 týdnech byly rostliny přesazeny do větších sadbovačů o rozměrech 5x5x5 cm a pravidelně zalévány roztokem kohoutkové a destilované vody v poměru 1:1.

3.2 Odchyt škůdce běláška zelného

V našem experimentu byl použit hojně rozšířený škůdce bělásek zelný. Jeho odchyt proběhl na poli ve vesnici Bolehošť a byl umožněn družstvem Agrospol. Posbírány byly jak housenky, tak i dospělí jedinci. Poté byli všichni umístěni do předem připravených plastových boxů s předpěstovanými rostlinami.

3.3 Pěstební boxy

Tyto pěstební boxy o objemu 29 l byly vybaveny větracími síťkami a zálivkovou hadičkou. Aby nedošlo k úhynu odchycených škůdců, na každé dno boxů byla nasypána vrstva agroperlitu (viz obr. č. 9)



Obr. č. 9: Pěstební boxy s vypěstovanými rostlinami (foto Semerák)

Celkem bylo pro tento pokus použito 9 boxů, do každého byly vloženy sadbovače s vypěstovanou brukví zelnou. Do 3 boxů byly umístěny nasbírané housenky (6 - 7 housenek na box), do dalších 3 byli umístěny dospělci běláška zelného (5 jedinců na box). Oplodněné samice nakladly na listy vajíčka, která jsou vyobrazena na obr. č. 10, tudíž v boxech byly dospělci a vajíčka. Zbylé 3 boxy sloužily jako kontrola. Všechny pěstební boxy byly důkladně označeny.



Obr. č. 10: Detail spodní strany listu s nakladenými vajíčky běláška zelného (*Pieris brassicae*) (foto Daňková)

3.4 Očištění a kultivace rostlin před analýzou

Housenky byly na rostlinách ponechány 3 dny. Za tuto dobu byly listy rostlinek poškozeny okusem (viz obr. č. 11 a 12) a silně znečištěny trusem a bylo potřeba je před analýzou očistit, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Listy tedy byly velice opatrně očištěny pomocí tenkého štětečku. Poté byl až odebrán rostlinný materiál na analýzu.



Obr. č. 11: Poškozené listy brukve zelné (*Brassica oleracea*) okusem – 2. den (foto Semerák)



Obr. č. 12: Poškozené listy brukve zelné (*Brassica oleracea*) okusem – 3. den (foto Semerák)

Kultivace rostlin s dospělci běláška zelného a jejich vajíčky probíhala déle a to celkem 8 dní. V době, kdy se z vajíček začaly líhnout housenky, byly rostliny poškozeny okusem a tím mohlo dojít k ovlivnění výsledků.

3.5 Příprava vzorků pro analýzu

Všechny níže zmíněné postupy byly použity pro analýzu rostlinného materiálu všech 9 boxů (3 kontrolní boxy, 3 boxy s housenkami, 3 s nakladenými vajíčky a malými housenkami v první fázi vývoje). Z každého boxu byly odebrány vždy 2 vzorky (u AMK byl z každého boxu odebrán jeden vzorek).

Rozpustné proteiny

Pro analýzu rozpustných proteinů byl nejprve připraven supernatant. Jeho příprava probíhala tak, že ve třecí misce bylo rozetřeno 0,1 g rostlinného materiálu, ke kterému bylo přidáno pár zrněk písku, ve 2 ml fosfátového pufru (PB), který byl připraven smícháním hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a dihydrogenfosforečnanu draseleného (KH_2PO_4) v poměru 1 : 1. Poté byl vzniklý supernatant převeden do mikrozkušavek. Následně byla provedena centrifugace (viz obr. č. 13) po dobu 15 minut při 4 °C a o zrychlení 15 000 g_n.

Pro analýzu rozpustných proteinů bylo smícháno 970 μl Bradfordova činidla s 30 μl námi připraveného supernatantu. Po 10 minutách byla ve spektrofotometru měřena absorbance při vlnové délce 595 nm v plastových kyvetách semi-mikro (Dučaiová et al., 2016).



Obr. č. 13: Pro práci použitá centrifuga Universal 320 R (foto Daňková)

Aminokyseliny

Nejprve bylo naváženo přibližně 5 g poškozených listů napadené rostliny. Tento navážený rostlinný materiál byl v papírových sáčcích sušen při 80 °C po dobu 24h. Pro analýzu aminokyselin byl opět nejdříve vytvořen supernatant. Následně bylo naváženo a rozemleto 0,1 g sušiny a nasypáno do 15 ml zkumavek. K rozemleté sušině bylo přidáno 10 μl 10 milimolárního norvalinu (neproteinová AMK) a 1,5 ml nedenaturovaného 70% ethanolu. Vzniklá směs byla 15 minut ve třepačce třepána. Následně byla s pootevřeným víčkem vařena při 120 °C v termobločku po dobu 10 minut. Po vychladnutí byla po dobu 5 minut provedena centrifugace při 4000 otáčkách za minutu.

Takto vzniklý supernatant byl pomocí pipety odebrán do mikrozkušavky, vzorek byl opět centrifugován při zrychlení 13 000 g_n po dobu 3 minut. Následně byl převeden do 1,8 ml vialek a byl odpařen při 60 °C v dusíkové atmosféře, což je zobrazeno na obr. č. 14. Tyto odpařované vialky byly pravidelně kontrolovány. Mezitím co probíhalo odpařování supernatantu, bylo do původní mikrozkušavky se zbylými usazeninami rostlinného materiálu přidán 1 ml ethanolu a celý postup kromě vaření byl dvakrát po sobě opakován, používány byly tytéž 15 ml zkumavky a výsledný supernatant byl přidán do tentýž vialek. Odpařené vialky byly uzavřeny a uchovány v chladu. Před samotnou analýzou byl získaný materiál rozpuštěn v 0,5 ml mobilní fáze a pomocí metody HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) byl na katedře chemie vyhodnocen. Byla zvolena tato metoda, jelikož vyniká vysokou účinností. Při této metodě byly nejprve vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unášela jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde docházelo k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně - chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou byly analyty v mobilní fázi detekovány. Výstupem z detektoru byl grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se prováděla na principu odečtení výsledků z kalibrační křivky (Dučaiová et al., 2016).



Obr. č. 14: Odpařované vialky se supernatantem v dusíkové atmosféře (foto Daňková)

Organické kyseliny

Pro analýzu organických kyselin bylo nejdříve rozetřeno 0,5 g zmrazeného rostlinného materiálu a poté přidáno 10 ml fosfátového pufru, který byl připraven tak, že do 1 litru bylo přidáno 8,7 g chloridu sodného (NaCl), 1,82 g trihydrátu

hydrogfosforečnanu draselného ($K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$) a 0,23 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Následně byla směs ve vodní lázni po dobu 45 minut a teplotě 75 °C zahřívána a odstředěna při 3000 otáčkách za minutu. Následovala analýza opět pomocí HPLC na katedře chemie (Šimek, 2016).

Statistická analýza

Aby se zjistilo, zda jsou mezi jednotlivými variantami ($k = 3$; kontrola, housenky, vajíčka + housenky) statisticky významné rozdíly, byla použita pro naměřená data analýza rozptylu, neboli ANOVA, protože je potřeba porovnat střední hodnoty u více než 2 souborů. Pro tento výpočet byla použita hladina významnosti 5%. Pokud je hodnota $P < 0,05$, pak to znamená, že mezi naměřenými hodnotami jsou signifikantní rozdíly a můžeme tak použít tzv. Tukeyho test, který patří mezi tzv. Post-hoc testy. Tento test nám zjistí, zda jsou tyto rozdíly pouze uvnitř konkrétní skupiny nebo mezi skupinami navzájem. Tukeyho test se využívá, pokud porovnáme stejně početné výběry, byl tedy použit u těch AMK, jejichž naměřené hodnoty byly kompletní. Tzv. Scheffého test lépe pracuje v obecných případech, kdy porovnáme nesterjné početné výběry. P hodnota je nejmenší hladina, na které zamítáme a určuje nám, zda je výsledek významný či nikoliv.

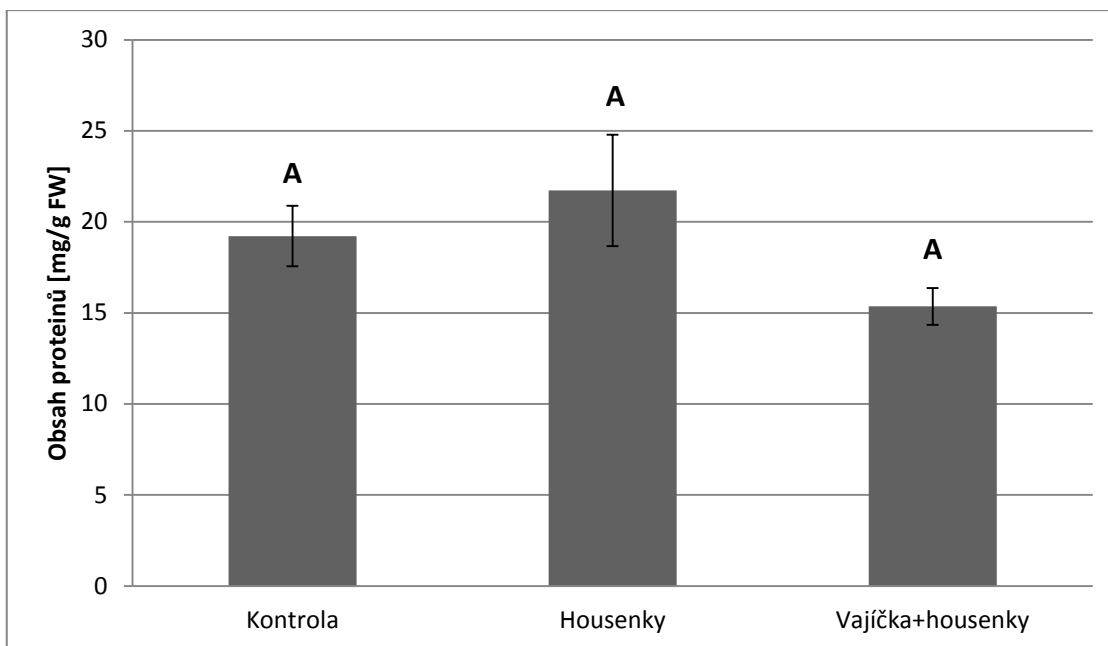
4 Výsledky a diskuze

Hlavním účelem diplomové práce bylo zjistit vztah mezi napadením běláška zelného a reakcí vybrané rostliny na toto napadení. Bělásek zelný, jakožto častý škůdce brukvovitých rostlin, má negativní vliv na růst a vývoj rostlin. Jak uvádí Pashalidou et al. (2015), tento vliv může být způsoben jak přímým okusem housenek, které listy velmi rychle požírají, tak i expozicí samotných vajíček. Bělásci zelní brukvovitým rostlinám také škodí jejich trusem, který je znehodnocuje (Čechmánek et Hrabák, 2006).

V našem pokusu byly zaznamenány rozdíly v koncentracích vybraných primárních metabolitů mezi nepoškozenými listy, listy, které byly napadeny dospělými housenkami a listy, které byly vystaveny přítomnosti vajíček běláška. Tato vajíčka se však vylíhla dříve (již po 8 dnech), než je uvedeno v literatuře. Lohmann (2006) uvádí, že se vajíčka líhnou po 10 – 14 dnech. Tím byla rostlina pod náporu nejen vajíček, ale i malých housenek, nacházející se v 1. fázi vylíhnutí, které listy začaly rychle okusovat, což mohlo zkreslit naše výsledky. Tato skutečnost by mohla vysvětlovat pokles koncentrací některých primárních metabolitů v napadené rostlině, jelikož okus listů housenkami v 1. fázi vylíhnutí by mohl být intenzivnější, než u dospělých housenek. Tím mohla být zkoumaná rostlina vyčerpaná a její produkce obranných látek snížena. Proto pro další pokusy doporučuji častěji kontrolovat vajíčka a nejlépe v období prvních známek líhnutí vajíček ihned analyzovat rostlinný materiál, nehledě na dobu líhnutí vajíček, která je uvedena v literatuře.

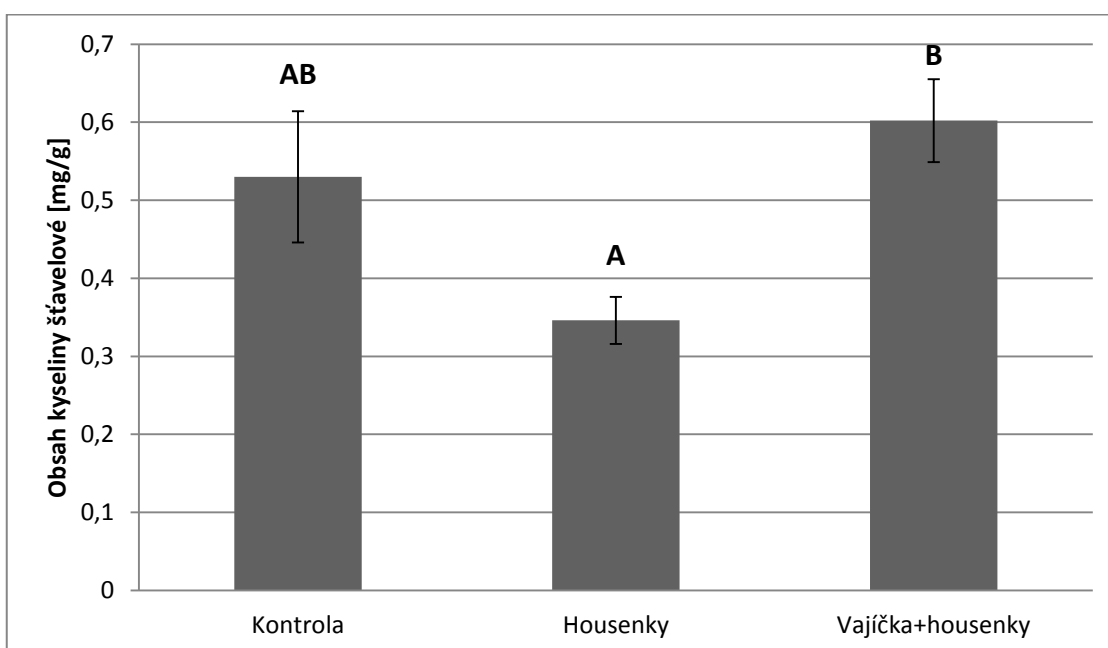
V tomto pokusu byly provedeny analýzy moderními metodami, kterými jsme mohli zjistit změny v koncentracích rozpustných proteinů, vybraných organických kyselin a volných aminokyselin.

V grafech č. 1 - 6 jsou vždy znázorněny průměrné hodnoty každé varianty společně s chybovými úsečkami. Změny v koncentracích rozpustných proteinů v napadených listech oproti listům nepoškozeným, jsou jen nepatrné. Došlo k mírnému zvýšení rozpustných proteinů při stresu housenkami. Při stresu způsobeném vajíčky s housenkami byly zaznamenány nižší hodnoty (viz. graf č. 1). Nicméně změny mezi napadením rostlin housenkami a vajíčky s housenkami nejsou tak velké, jak se očekávalo. Tyto grafy vychází z naměřených hodnot, které byly zpracovány do tabulek přiložených v přílohách č. 1 -3.



Graf č. 1: Obsah celkových rozpustných proteinů v brukvi zelné. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší ($P < 0,05$)

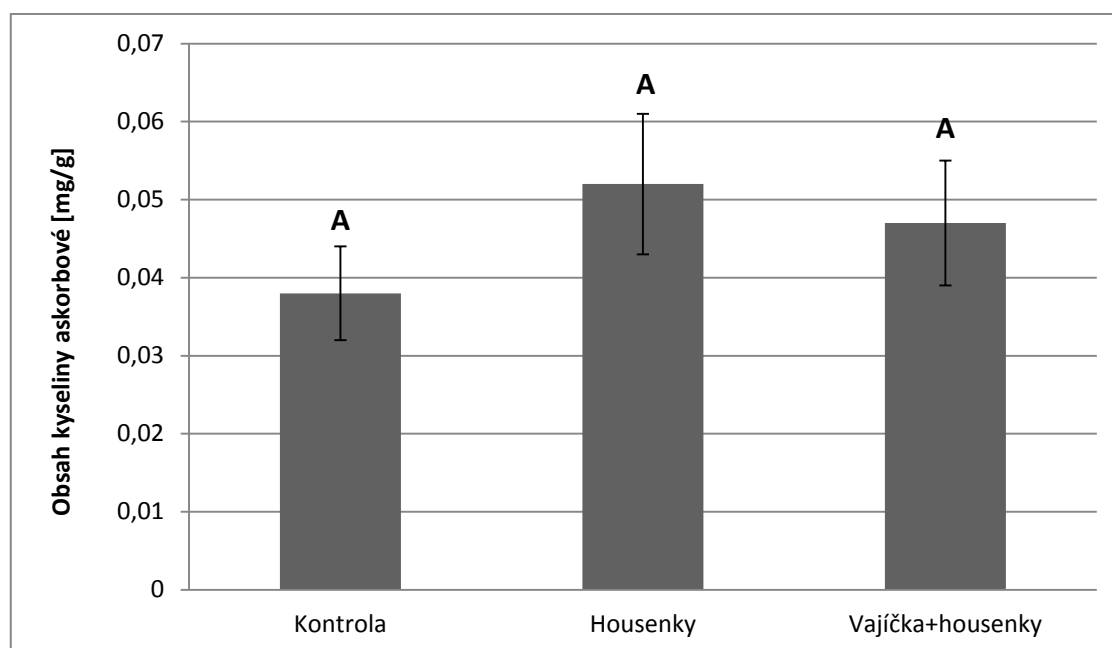
Z grafů č. 2 - 5 je patrné, že nastaly změny v koncentracích jednotlivých organických kyselin v napadených listech ve srovnání s listy nepoškozenými. Došlo jak ke snížení, tak i ke zvýšení jejich obsahu. U kyseliny šťavelové byly dle Tukeyho testu zjištěny statisticky významné rozdíly (viz. graf č. 2), u ostatních organických kyselin nebyly statisticky významné rozdíly prokázány.



Graf č. 2: Obsah kyseliny šťavelové v brukvi zelné. Chybové úsečky vyjadřují

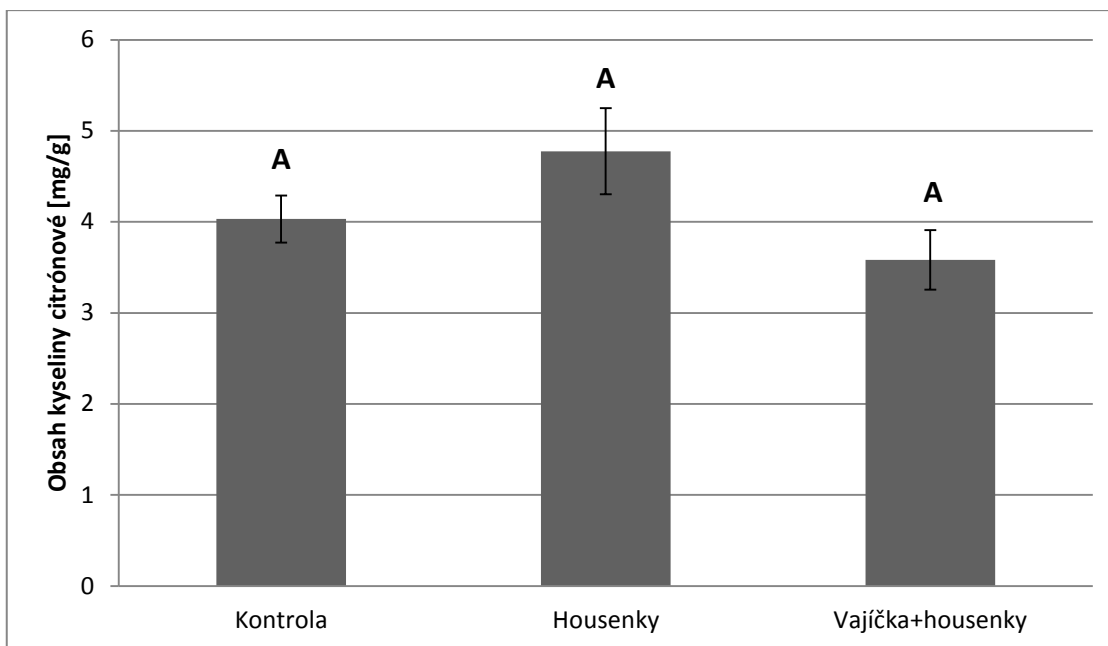
standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší (A,B - $P < 0,05$)

Z grafu č. 3 je patrné, že došlo k mírnému zvýšení koncentrací kyseliny askorbové, a to jak u rostlin, které byly napadeny housenkami, tak u rostlin, které byly vystaveny expozici vajíček s housenkami v první fázi vývoje. Vyšší nárůst koncentrace kyseliny askorbové oproti kontrole byl prokázán při napadení samotnými housenkami.



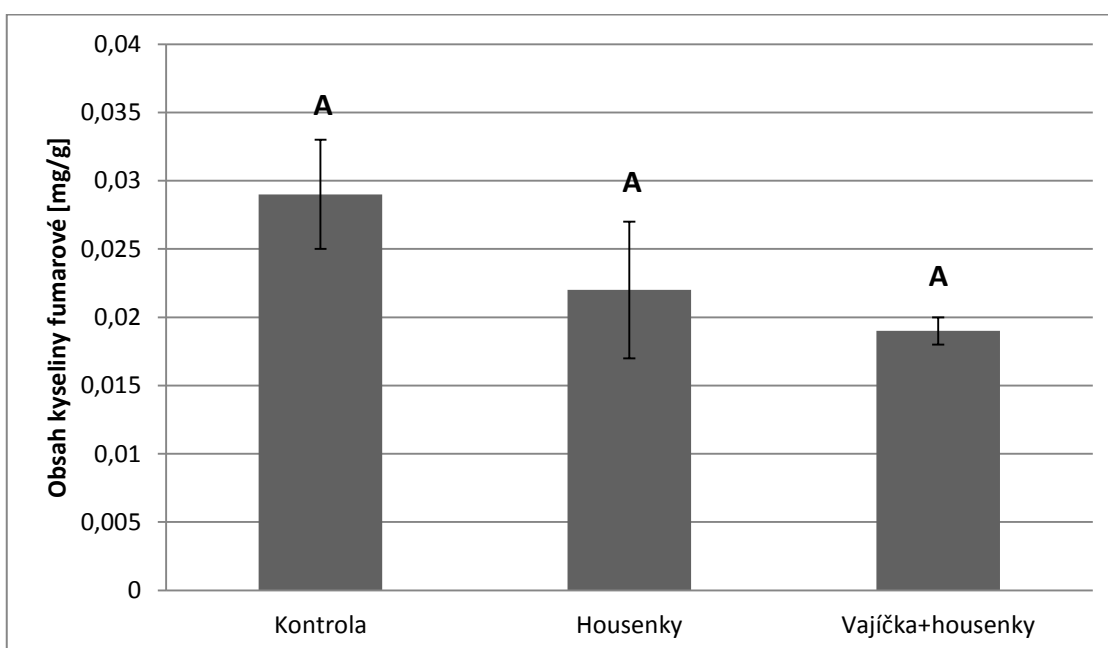
Graf č. 3: Obsah kyseliny askorbové v brukvi zelné. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší ($P < 0,05$)

Na změně obsahu kyseliny citrónové měly opět vliv jak housenky, tak vajíčka s housenkami. Oproti kontrole došlo při napadení rostlin housenkami ke zvýšení koncentrace, kdežto při napadení vajíčky s housenkami ke snížení koncentrace zkoumané organické kyseliny.



Graf č. 4: Obsah kyseliny citrónové v brukvi zelné. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší ($P < 0,05$)

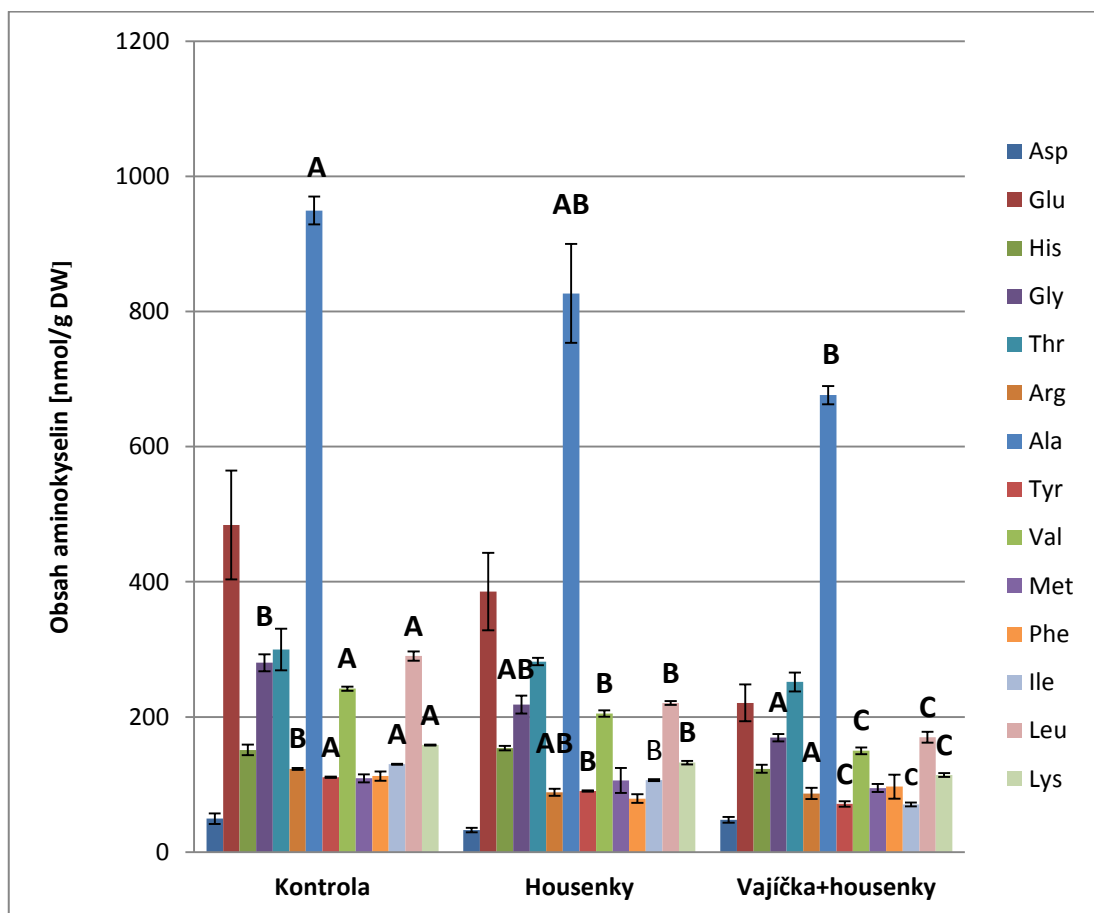
Při napadení rostlin housenkami a vajíčky s housenkami byl také pozorován obsah kyseliny fumarové. Koncentrace této kyseliny se jako jediná ze všech zkoumaných organických kyselin u obou variant oproti kontrole snížila. Výraznější snížení koncentrace kyseliny fumarové bylo zaznamenáno u varianty, kdy byla rostlina napadena vajíčky s housenkami.



Graf č. 5: Obsah kyseliny fumarové v brukvi zelné. Chybové úsečky vyjadřují

standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší ($P < 0,05$)

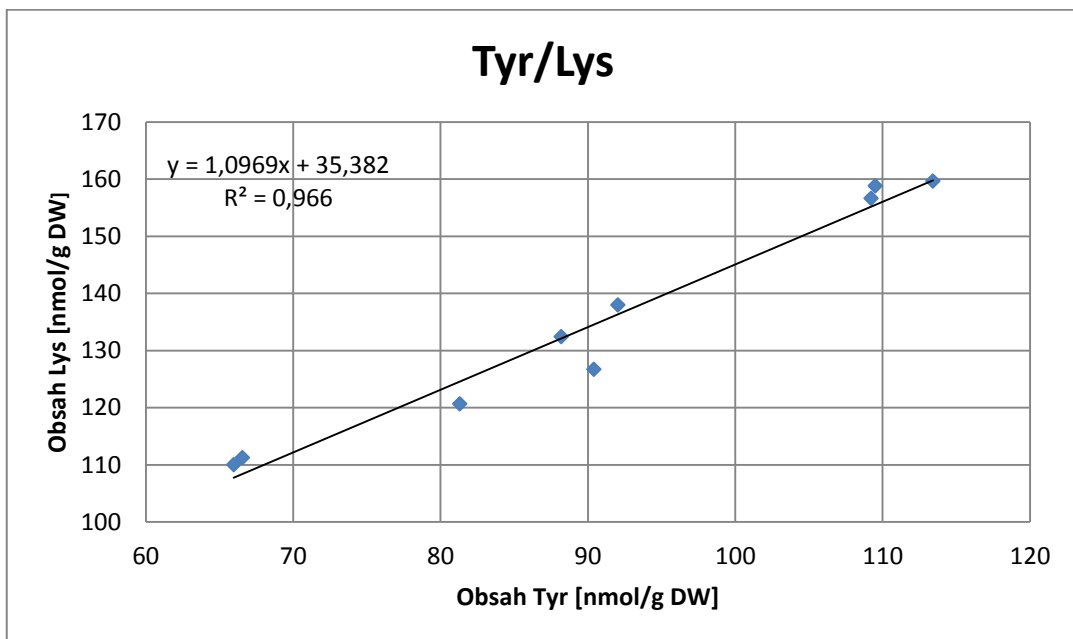
Během našeho experimentu došlo ke snížení koncentrací aktuálně translatovaných volných aminokyselin (viz. graf č. 6), a to jak při působení jak housenek, tak i vajíček běláška na rostlinný materiál. Celkové snížení mohlo být způsobeno intenzivním působením biotického stresu na rostlinu, čímž se rostlina postupně vyčerpávala. Naměřené koncentrace se snížily u 86% vybraných aminokyselin, tedy u všech kromě histidinu a fenylalaninu. Nabízela se tak možnost korelace mezi jednotlivými aminokyselinami. U aminokyselin byly zjištěny významné i velmi významné rozdíly. Jak je uvedeno v grafu č. 6, změny v produkci většiny aminokyselin mezi jednotlivými variantami se velmi významně liší, a to dokonce na 1% hladině významnosti.



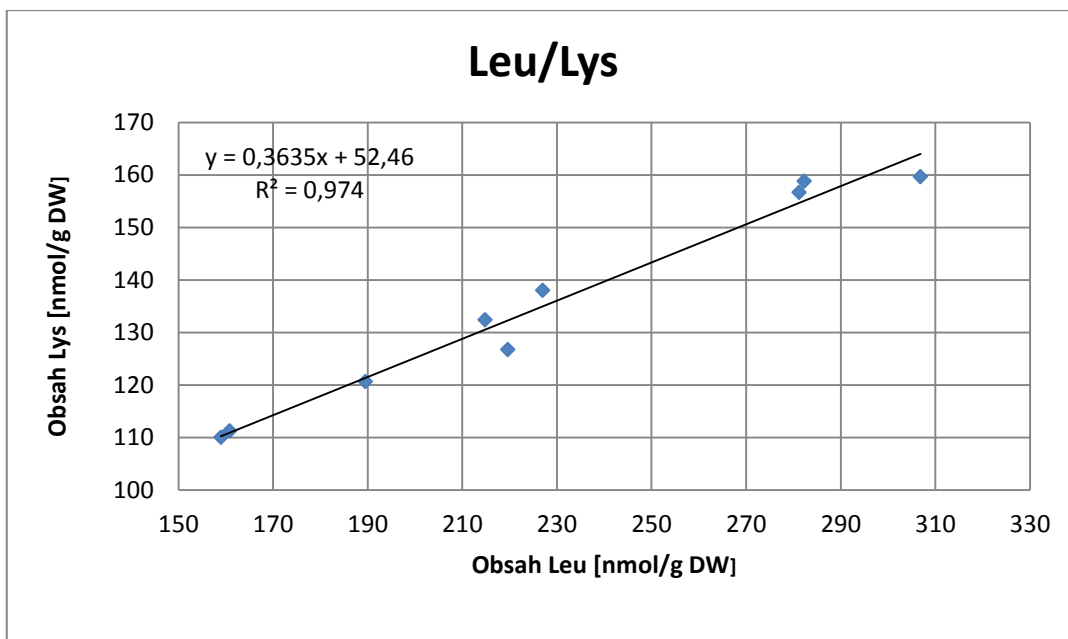
*DW hmotnost sušiny

Graf č. 6: Obsah aminokyselin v brukvi zelné. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru, která udává, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Hodnoty sloupců, po nichž následují stejná písmena, se podle Tukeyho testu výrazně neliší (A,B,C - $P < 0,05$)

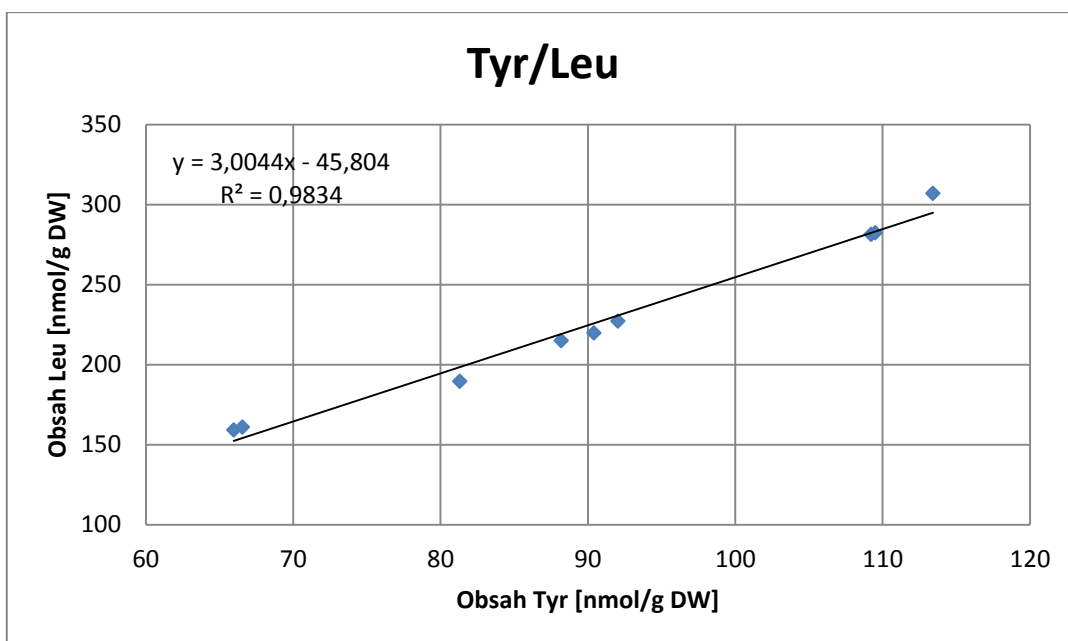
Mezi některými aminokyselinami byla zjištěna regresní závislost, která byla ve všech případech popsána pomocí lineární regresní funkce a korelačního koeficientu. Významné korelace byly zaznamenány u Ile/Lys, Tyr/Ile, Lys/Val, Val/Leu, Glu/His. Nejvýznamnější korelace byly zjištěny u Tyr/Lys, Leu/lys, Tyr/Leu a Val/Ile. U těchto aminokyselin byl výsledný korelační koeficient vyšší než 0,96, což značí silnou kladnou korelaci, kdy při snížení koncentrace určité sledované aminokyseliny došlo ke snížení koncentrace i druhé sledované aminokyseliny. Z uvedených nejvýznamnějších korelací jsou vyobrazeny v grafech č. 7 - 10 závislosti mezi jednotlivými aminokyselinami (pro vytvoření grafů byly vždy použity průměry naměřených hodnot jednotlivých boxů). Biotický stres způsobený běláskem zelným na rostliny může mít tedy inhibiční vliv na transkripci a translaci aminokyselin.



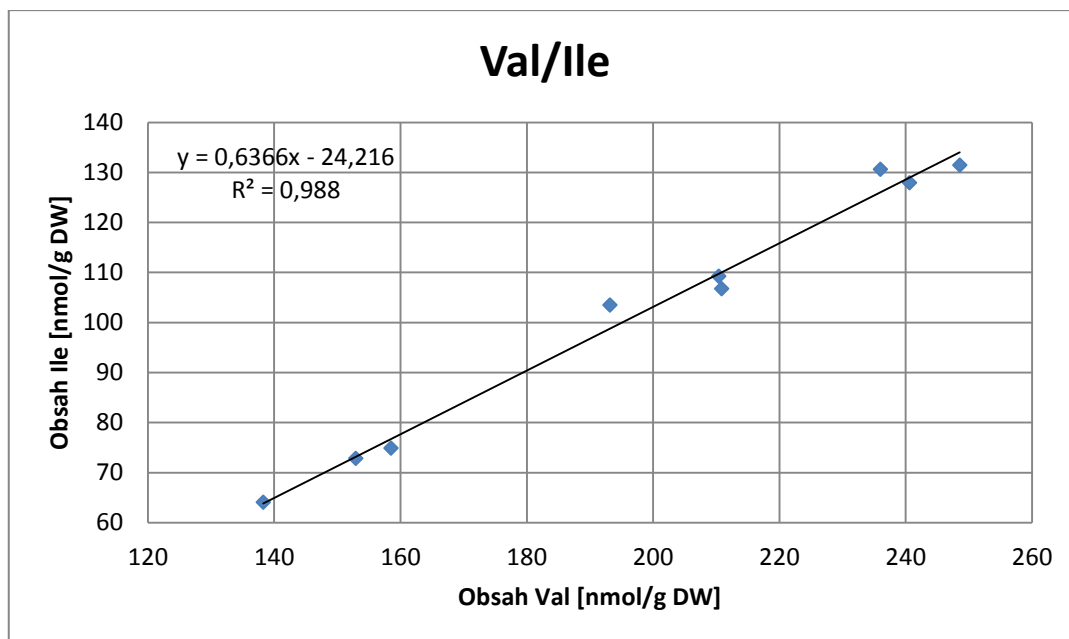
Graf č. 7: Regresní závislost v obsahu Tyrosinu a Lysinu



Graf č. 8: Regresní závislost v obsahu Leucinu a Lysinu



Graf č. 9: Regresní závislost v obsahu Tyrosinu a Leucinu



Graf č. 10: Regresní závislost v obsahu Valinu a Isoleucinu

Tématu vlivu běláška zelného na brukvovité rostliny byla v minulosti a je i v dnešní době věnována jen velmi malá pozornost. V již dříve provedeném pokusu (Khattab, 2007), ve kterém byl studován vliv mšic zelných (*Brevicoryne brassicae*) na brukvovitou rostlinu brukvi zelnou (*Brassica oleracea*), bylo zjištěno, že v napadených listech mšicemi byla nižší koncentrace aminokyselin a vyšší koncentrace kyseliny askorbové, což se shoduje i s našimi výsledky. Nicméně i celkový obsah rozpustných proteinů byl pod náporu mšic snížen, což se v pokusu s bělásky potvrdilo pouze při napadení rostliny vajíčky společně s housenkami. Toto snížení proteinů může být příčinou toho, že vlivem extrémních stresových podmínek došlo k poklesu biosyntézy. Ta mohla být snížena odtokem asimilátů, jako jsou aminokyseliny, k místu poškození způsobené herbivorem. Kromě toho, snížení koncentrace rozpustných proteinů může také souviset se současným snížením hladiny fosforu v rostlinách, který, jak je známo, má vliv na syntézu bílkovin. Podobné výsledky již dříve zaznamenali Singla a Grover (1994), kteří zjistili, že rychlost syntézy proteinů během stresových podmínek klesá.

Společně s tímto výzkumem probíhal výzkum na stejném principu, jen místo běláška zelného byl použit jako škůdce dřepčík rodu *Phyllotreta*. V pokusu s dřepčíky byly naměřeny větší rozdíly v koncentracích u kyseliny askorbové a citrónové (Čechová, 2018). Domníváme se, že by to mohlo být vysvětleno tím, že dřepčíci mají jiný způsob a rychlost okusu, než bělásek zelný. Bělásek zelný se totiž vyznačuje okusem velké rychlosti, kdy list okusuje až ke střední žilce, kdežto okus dřepčíků je pomalejší, nemá takový rozsah a v listové čepeli vytvářejí jen otvory o průměru 2-3 mm (Rotrekl, 2002). Stejně jako u pokusu s bělásky bylo zaznamenáno snížení téměř všech aminokyselin (Čechová, 2018). Pro další pokusy by bylo zajímavé a vhodné pracovat s větším množstvím vzorků, rozšířit stávající

skupinu zkoumaných primárních metabolitů o další obranné látky a zkusit testovat i jiné druhy brukvovitých rostlin a porovnat tak hodnoty naměřených koncentrací látek mezi různými rostlinami v rámci stejné čeledi.

Rostliny na biotický stres způsobený hmyzem reagují změnami v poměru obsahu primárních metabolitů, částečně se to projevilo i u nakladených vajíček. Některé výsledky bude nutné ještě výzkumně ověřit a dořešit.

5 Závěr

Z výzkumu zaměřeného na zjištění změn koncentrací vybraných primárních metabolitů po napadení rostlin zelí běláskem, lze učinit následující závěry:

- Bylo prokázáno, že rostliny na biotický stres způsobený běláskem zelným, ať už na vajíčka či housenky, reagují změnou koncentrace všech sledovaných látek. U většiny látek nebyly však zjištěny tak výrazné změny v koncentracích jednotlivých primárních metabolitů, aby se prokázala signifikantní závislost.
- Významný rozdíl byl zjištěn v obsahu kyseliny šťavelové a to mezi působením housenek a vajíček s housenkami. U ostatních sledovaných organických kyselin tj. kyseliny askorbové, citronové, fumarové byly změny koncentrací nevýznamné.
- Statisticky neprůkazné rozdíly byly prokázány u rozpustných proteinů.
- Téměř u všech zkoumaných volných aminokyselin, byly naměřeny signifikantně snížené koncentrace v porovnání s kontrolou, a to jak při působení housenek, tak i vajíček běláška na rostlinný materiál.
- Mezi Tyr/Lys, Leu/Lys, Tyr/Leu a Val/Ile byla prokázána těsná regresní závislost.

V daném výzkumu by bylo vhodné pokračovat a některé výsledky ještě ověřit dalšími pokusy.

Problematika biotického stresu je vysoce důležitá z hlediska zemědělství, neboť ročně dochází k obrovským ztrátám na výnosech zemědělských plodin v důsledku útoku hmyzu. Práce slouží k pochopení strategie rostlin a k lepšímu porozumění obranným mechanismům. Znalost možností využití produkovaných metabolitů rostlin by mohla vést k vyvinutí insekticidů založené na přírodní bázi, které by sloužily ke snížení ztrát způsobených hmyzem. Tím by mohl být snížen podíl využívání chemických přípravků v ochraně rostlin.

6 Seznam použité literatury

1. Afshan S., Ali S., Bharwana S.A., Rizwan M., Farid M., Abbas F., Ibrahim M., Mehmood M.A., Abbasi G.H. (2015): Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Environmental. Science and pollution Research*. **22**: 11679-11689.
2. Agrawal A. A. (1999): Induced responses to herbivory in wild radish: Effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology*. **80**: 1713-1723.
3. Appel H.M., Fescemyer H., Ehling J., Weston D., Rehrig E., Joshi T., Xu D., Bohlmann J., Schultz J. (2014): Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores. *Front Plant Science*. **5**: 565.
4. Atkinson N.J., Urwin P.E. (2012): The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Experimental Botany*. **63**: 3523-3543.
5. Bellostas N., Sorensen A.D., Sorensen J.C., Sorensen H. (2007): Genetic variation and metabolism of glucosinolates. *Adv Bot Res*. **45**: 369 - 415.
6. Bláha, L., Bocková, R., Hnilička, F., Hniličková, H., Holubec, V., Millerová, J., Štolcová, J. a Zieglerová, J. (2003): Rostlina a stres. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. 156.
7. Borbala D., Harrach B.D., Fodor J., Pogany M., Preuss J., Barna B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology*. **121**: 21-33.
8. Botha A.M., Lacock L., vanNiekerk C., Matsioloko M.T., duPreez F.B., Loots S., Venter E., Kunert K.J., Cullis C.A. (2006): Is photosynthetic transcriptional regulation in *Triticum aestivum* L. cv. 'TugelaDN' a contributing factor for tolerance to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Plant Cell Rep*. **25**: 41-54.
9. Bruce T. J. A., Pickett J.A. (2007): Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Plant Biology*. **10**: 387-392.
10. Bulley S., Laing W. (2016): The regulation of ascorbate biosynthesis. *Plant Biology*. **33**: 15-22.
11. Caldana C., Degenkolbe T., Cuadros-Inostroza A., Klie S., Sulpice R., Leisse A.,
12. Steinhauser D., Fernie A.R., Willmitzer L., Hannah M.A. (2011): High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of *Arabidopsis* to eight environmental conditions. *Plant J*. **67**: 869-884.
13. Carr J.P., Lewsey M.G., Palukaitis P. (2010): Signaling in Induced Resistance. *Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses*. **76**: 57-121.
14. Čechmánek Z., Hrabák R. (2006): Život motýlů střední Evropy. Granit, Praha. 7
15. Dietz K.J., Jager R., Kaiser G., Martinoia E, (1990): Amino acid transport across the tonoplast of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts: uptake of alanine, leucine, and glutamine. *Plant Physiol*. **92**: 123-129.

16. Dučaiová Z., Sajko M., Mihaličová S., Repčák M. (2016): Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regul.* **79**:81–94.
17. Eason J.R., Ryan D., Page B., Watson L., Coupe S.A. (2007): Harvested broccoli (*Brassica oleracea*) responds to high carbon dioxide and low oxygen atmosphere by inducing stress-response genes. *Postharvest Biol Technol.* **43**: 358-65.
18. Ebrahim S., Usha K., Singh B. (2011): Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* 1043-1049.
19. Ehrling J., Chowrira S.G., Mattheus N., Aeschliman D.S., Arimura G., Bohlmann J. (2008): Comparative transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* infested by diamond back moth (*Plutella xylostella*) larvae reveals signatures of stress response, secondary metabolism, and signalling. *BMC Genomics.* **9**: 154.
20. Errakhi R., Meimoun P., Lehner A., Vidal G., Briand J., Corbineau F., et al. (2008): Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J Exp Bot.* **59**: 3121 – 3129.
21. Figueroa-Méndez R., Rivas-Arancibia S. (2015): Vitamin c in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Front. Physiol.* **23**.
22. Franceschi V.R., Nakata P.A. (2005): Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology.* **56**: 41–71.
23. Freitas E.V.S., Nascimento C.W.A., Silva S. A., Silva F.B. (2013): Citric acid-assisted phytoextraction of lead: a field experiment. *Chemosphere* **92**: 213-217.
24. Frost, C. J., M. C. Mescher, J. E. Carlson, and C. M. De Moraes (2008): Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle: *Plant Physiology.* **146**: 818-824.
25. Gols R., Raaijmakers C.E., van Dam N.M., Dicke M., Bukovinszky T., Harvey J.A. (2007): Temporal changes affect plant chemistry and tritrophic interactions. *Basic Appl Ecol.* **8**: 421-33.
26. Gebczynski P., Lisiewska Z. (2006): Comparison of the level of selected antioxidative compounds in frozen broccoli produced using traditional and modified methods. *Inn Food Sci Emerg Technol.* **7**: 239-45.
27. Gonzalez M. C., Sanchez R., Cejudo F. J. (2003): Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta.* **216**: 985-992.
28. Good A.G., Zaplachinski S.T. (1994): The effects of drought stress on free amino-acid accumulation and protein-synthesis in *Brassica napus*. *Physiol Plant.* **90**: 9-14.
29. Goussain, M. M., E. Prado, and J. C. Moraes (2005): Effect of silicon applied to wheat plants on the biology and probing behaviour of the greenbug *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera : Aphididae): *Neotropical Entomology.* **34**: 807-813.

30. Gutsche A., Heng-Moss T., Sarath G., Twingg P., Xia Y., Lu G., Mornhinweg D. (2009): Gene expression profilinf og tolerant barely in response to *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) feeding. *Bull Entomol Res.* **99**:163-173.
31. Habib S.H.M., Makpol S., Hamid N.A.A., Das S., Ngah W.Z.W., Yusof Y.A.M. (2008): Ginger extract (*Zingiber officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats. *Clinics.* **63**: 807-13.
32. Halkier B.A., Gershenzon J. (2006): Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol.* **57**: 303.
33. Hamilton E.W., Coleman J.S.(2001): Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana Attenuata* when distant leaves are stressed. *American Journal od Botany.* **88**.
34. Hanley M. E., Lamont B.B., Fairbanks M.M., Rafferty C.M. (2007): Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence: *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics.* **8**: 157-178.
35. Hartmann, T. (2004): Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta.* **219**: 1-4.
36. Hayat S., Ali B., Hasan S.A., Ahmad A. (2007): Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environ Exp Bot.* **60**: 33-41.
37. Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2006): Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chemické listy.* **100**: 495-500.
38. Hildman T., Ebneith M., Peña-Cortés H., Sanchez-Serrano J., Willmitzer I., Prat S. (1992): General roles of abscisic and jasmonic acid in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell.* **4**: 1157-1170.
39. Hilker M., Fatouros N. (2015): Plant Responses to Insect Egg Deposition. *The Annual Review of Entomology.* **60**: 493-515.
40. Hnilička, F., Hniličková, H., Bláha, L., Möllerová, J. a Zieglerová, J. (2003): Ekologické a fyziologické odezvy rostlin na biotické stresory. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin. In: Sborník příspěvků.
41. Höfner, R., Vazquez-Moreno, L., Winter, K., Bohnert, H. J. a Schmitt, J. M. (1987): Induction of Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* by High Salinity: Mass Increase and de Novo Synthesis of PEP-Carboxylase. *Plant Physiology.* **83**: 915–919.
42. Horner H.T., Wagner B.L. (1995): Calcium oxalate formation in higher plants. In: SR Khan, ed. Calcium oxalate in biological systems. *Boca Raton, FL: CRC Press.* 53–72.
43. Chen, M.S. (2008): Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review: *Insect Science.* **15**. 101-114.
44. Chia D.W., Yoder TJ., Reiter W.D., Gibson S.I. (2000): Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. **211**: 743-751.

45. Ishikawa T., Dowdle J., Smirnoff N. (2006): Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants, *Physiologia Plantarum*. **126**: 343-355.
46. Jahangir M., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2008): Metabolomic response of *Brassica rapa* submitted to pre-harvest bacterial contamination. *Food Chem*.
47. Jahangir M., Abdel-Farid I.B., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2009): Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environmental and Experimental Botany*. **67**: 23-33.
48. Jain D., Khurana J.P. (2018): Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. 265-281.
49. Jain S., Kumar A. (2015): The Pathogenesis Related Class 10 proteins in Plant Defense against Biotic and Abiotic Stresses. *Advances in Plants and Agriculture Research*. **2**.
50. Kessler, A., Baldwin I.T. (2002): Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis: *Annual Review of Plant Biology*. **53**: 299-328.
51. Khattab H. (2007): The Defense Mechanism of Cabbage Plant Against Phloem-Sucking Aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **1**: 56-62.
52. Kristal A.R., Lampe J.W. (2002): Brassica vegetables and prostate cancer risk: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*. **42**: 1-9.
53. Kuzniak E., Sklodowska M. (2005): Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**: 192-200.
54. Lehner A., Meimoun P., Errakhi R., Madiona K., Barakate M., Bouteau F. (2008): Toxic and signalling effects of oxalic acid. *Plant signaling and behavior*. **3**: 146-148.
55. Lev-Yadun, S., Inbar M. (2002): Defensive ant, aphid and caterpillar mimicry in plants. *Biological Journal of the Linnean Society*. **77**: 393-398.
56. Liang Y.S., Choi Y.H., Kim H.K., Linthorst H.J.M., Verpoorte R. (2006): Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. **67**: 2503-11.
57. Linster C.L., Clarke S.G. (2008): L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Plant Science*. **13**: 567-573.
58. Lisiewska Z., Kmiecik W., Korus A. (2008): The amino acid composition of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), fresh and after culinary and technological processing. *Food Chem*. **108**: 642-48.
59. Lohmann M. (2006): Motýli, Průvodce naší přírodou. Pavel Dobrovský – BETA, Praha.
60. López-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramírez-Rodríguez V., Herrera-Estrella L. (2000): Organic metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*. **160**: 1-13.

61. Mewis I., Appel H.M., Hom A., Raina R., Schultz J.C. (2005): Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiol.* **138**: 1149-62.
62. Mihai A., Hamilton J.G., Resti J.P., Zangerl A.R., Berenbaum M.R., De Lucia E.H. (2005): Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. *Plant, Cell and Environment.* **28**: 402-411.
63. Major I.T., Constabel C.P. (2006): Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *New Phytol.* **172**.
64. Moreno D. A., Carvajal M., Lopez-Berenguer C., Garcia-Viguera C. (2006): Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal.* **41**: 1508-22.
65. Muckenschnabel I., Goodman B.A., Williamson B., Lyon G.D., Deighton N. (2002): Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products, *Journal of Experimental Botany* **53**. 207-214.
66. Nakata P.A.(2003): Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science.* **164**: 901-909.
67. Neuhaus H.E. (2007): Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane . *FEBS letters.* **581**: 2223-2226.
68. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer CH. H. (2011): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment.* **35**: 454-484.
69. Pashalidou F. G., Fatouros N. E., Van Loon J. J, A., Dicke M., Gols R. (2015): Plant-mediated effects of butterfly egg deposition on subsequent caterpillar and pupal development, across different species of wild Brassicaceae. *Ecological Entomology.* **40**. 444-450.
70. Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan CA (1991): A polypeptide from tomato leaves induces the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science.* **253**: 895-898.
71. Petersen I.L., Hansen H.C.B., Ravn H.W., Sorensen J.C., Sorensen H. (2007): Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. *Pestic Biochem Physiol.*
72. Piterková, J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M. a Peč P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy.* 99: 455 - 466. ISSN 1213-7103.
73. Planchet E., Limami A.M. (2015): Amino Acids in Higher Plants. 262.
74. Plaxton W.C., McManus M.T. (2006): Control of primary metabolism in plants. *Annual Plant Reviews.* **22**: 1331-1332.
75. Procházka, S. et al.(1998): Fyziologie rostlin, Academia, Praha
76. Rahman M.M., Kawamura O. (2006): Oxalate Accumulation in Forage Plants: Some Agronomic, Climatic and Genetic Aspects. **24**: 439-448.

77. Rai V.K. (2002): Role of Amino Acids in Plant Response to Stress. *Biologia Plantarum*. **45**: 481-487.
78. Rassin D.K. (1994): Essential and Non-essential Amino Acids in Neonatal Nutrition. *Protein Metabolism During Infancy*. **33**.
79. Raziuddin F., Hassan G., Akmal M., Shah S.S., Mohammad F., Shafi M., Bakht J., Zhou W. (2011): Effects of cadmium and salinity on growth and photosynthesis parameters of Brassica species. *Pak J Bot*. **43**: 333-340.
80. Reinholf J. (2004): *Motýli: klíč ke spolehlivému určování - 3 znaky*. Čestlice: Rebo. Průvodce přírodou (Rebo). ISBN 80-7234-310-6.
81. Rickman J.C., Barrett D.M., Bruhn C.M. (2007): Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J Sci Food Agric*. **87**: 930-44.
82. Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Tzin V., Mysore K. (2014): Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front Plant Sci*. **5**: 17.
83. Rotrekl L. (2002): Nejdůležitější hmyzí škůdci zeleniny, ovocných plodin a vinné révy. *Zemědělská entomologie II*. 96.
84. Ryšlavá, H. a Doubnerová, V. (2010): Enzymy Hatch-Slackova cyklu v C3 rostlinách. *Chemické Listy*. **104**: 1175 - 1180.
85. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. (2002): Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. **177**: 67-80.
86. Salačová L., Faltusová Z., Ovesná J. (2015): Jaké mechanismy využívají rostliny pro obranu proti houbovým patogenům. *Chem. Listy*. **109**: 613-618.
87. Sanchez, R., Flores, A. a Cejudo, F. J. (2006): Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*. **223**, 901- 909.
88. Selitrennikoff C.P. (2001): Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. **67** (7): 2883-2894.
89. Seth C.S., Chaturvedi P.K., Misra V. (2008): The role of phytochelatin and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicol Environ Saf*. **71**: 76-85.
90. Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.H. (2008): Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells, *International Journals of Biological Sciences*. **4**: 8-14.
91. Sharma S.S., Dietz K-J.(2006): The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot*. **57**: 711-26.
92. Schonhof I., Klaring H.P., Krumbein A., Claussen W., Schreiner M. (2007): Effect of temperature increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli. *Agric Ecosyst Environ*. **119**: 103-111.

93. Schoonhoven L. M., Van Loon J. J., Dicke M. (2005) Insect-plant biology. *Oxford University Press*. **2**.
94. Schützendübel A., Polle A. (2002): Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. **53**: 1351-65.
95. Singh J., Upadhyay A.K., Prasad K., Bahadur A., Rai M. (2007): Variability of carotenoids, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *J Food Compos Anal*.
96. Singh S., Sinha S. (2005): Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. *Ecotoxicol Environ Saf*. **62**: 118-27.
97. Singla, S.L., A. Grover (1994): Detection and quantitation of a rapidly accumulating and predominant 104 kDa heat shock polypeptide in rice Plant. *Sci*. **97**: 23-30.
98. Smirnoff N. (1996): The function and metabolism of ascorbic acid in plants, *Annals of Botany*. **78**: 661-669.
99. Smith A.M., Stitt M. (2007): Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ*. **30**: 1126-1149.
100. Somssich, I. E., Hahlbrock, K. (1998): Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*. **3**: 86-90.
101. Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann - Merdinoglu S., Kaufmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. (1993): Plant „pathogenesis-related“ proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*. **75** (8): 687-706.
102. Stoewsand G.S. (1995): Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables - a review. *Food Chem Toxicol*. **33**: 537-43.
103. Sudha G., Ravishankar G.A. (2002): Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **71**: 181-212.
104. Sun J., Liu R.H. (2008): Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. *J Agric Food Chem*. **56**: 11661-67.
105. Šimek J. (2016): Toxicita těžkých kovů, jejich příjem, translokace a vliv na produkci ochranných a signálních látek u rostlin. *Disertační práce*. PŘF UHK, 108 s.
106. Taiz L., Zeiger E. (2010): Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant physiology*. **5**: 301-302.
107. Tomas-Barberan F., Espin J.C. (2001): Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric*. **81**: 853-76.
108. Tzin V., Galili G. (2010): New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Cell Press*. **3**: 956-972.

109. Tung Y.T., Wu J.H., Huang C.Y., Kuo Y.H., Chang S.T. (2009): Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresour Technol.* **100**: 509-14.
110. Turley N., Godfrey R., Johnson M. (2013): Evolution of mixed strategies of plant defense against herbivores. *New phytologist.* **197**: 359 – 361.
111. Turlings, T. C. J., Tumlinson J.H., Lewis W. J. (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science.* **250**: 1251-1253.
112. Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Gomez-Rodriguez M. V., Chaki M., Pedrajas J. R., Fernandez-Ocana A., Del Rio L. A. a Barroso J. B. (2006): The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment.* **29**: 1449–1459.
113. Van Dam, N. M., K. Hadwich, I. T. Baldwin (2000): Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*: *Ecologia.* **122**: 371-379.
114. Van Loon L.C., Van Strein E.A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **55**: 85-97.
115. Velíšek, J., (2002): *Chemie potravin* 1. 2. vyd. upravené. OSSIS Tábor. 344.
116. Verkerk R., van der Gaag M.S., Dekker M., Jongen W.M.F. (1997): Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Lett.* **114**: 193-194.
117. Walter, D. E., Odowd D.J. (1992): Leaves with domatia have more mites. *Ecology.* **73**: 1514-1518.
118. Wang L., Wang H., Lai Q., Li T., Fu X., Guo X., Liu R.H. (2015): The dynamic changes of ascorbic acid, tocopherols and antioxidant activity during germination of soya bean (*Glycine max*). *International Journal of Food Science & Technology.* **50**: 2367-2374.
119. Wang L.I., Giovannucci E.L., Hunter D., Neuberg D., Su L., Christiani D.C. (2004): Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transfrase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control.* **15**: 977-85.
120. War A.R., Sharma H.CH., Paulraj M.G., War M.Y. (2011): Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. *Plant signaling and Behavior.* **6**: 1973-1978.
121. War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu A., Sharma H.Ch. (2012): Mechanism od plant defense against insect herbivores. *Plant signaling and Behavior.* **7** (10): 1306-1320.
122. Winter H., Robinson D.G., Heldt H.W. (1994): Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta.* **193**: 530– 535.
123. Wolucka B.A., Goossens A., Inze D. (2005): Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany.* **56**: 2527-2538.

124. Wyllie S.G., Fellman J.K. (2000): Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum L.*). *J Agric Food Chem.* **48**: 3.
125. Yeh T.Y., Pan C.T. (2012): Effect of chelating agents on copper, zinc, and lead uptake by sunflower, Chinese cabbage, cattail, and reed for different organic contents of soils. *J Environ Anal Toxicol.* **2**: 2161– 2525.
126. Zawoznik M.S., Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P. (2007): Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **173**: 190-97.
127. Zhao J., Davis C. L., Verpoorte R. (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* **23**: 283-333.
128. Zhao T.J., Liu Y., Yan Y.B., Feng F., Liu W.Q., Zhou H.M. (2007): Identification of the amino acids crucial for the activities of drought responsive element binding factors (DREBs) of *Brassica napus*. *FEBS Lett.* **581**: 3044-50.
129. Zhou S., Lou Y. R., Tzin V., Jander G. (2015): Alternation of Plant Primary Metabolism in Response to Insect Herbivory. *Plant Physiology.* **169**.

Internetové zdroje:

1. Řepková J. (2013): Odolnost rostlin k patogenům. *Genetika rostlin*. [online]. [cit. 27.1.2018]. Dostupné z WWW:<https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/07-rezistence-k-patogenum.html>.
2. Pavlová L. (2006): Fyzilogie rostlin. [online]. [cit. 22.1.2018]. Dostupné z WWW:http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyzrost/4_Respirace.pdf

Ústní sdělení:

1. Čechová R. (2018): Změny v produkci vybraných primárních metabolitů v závislosti na napadení zelí hmyzími herbivory rodu *Phyllotreta* – diplomová práce PŘF UHK – ústní sdělení

7 Seznam příloh

Příloha č. 1: Tabulka naměřených hodnot rozpustných proteinů a organických kyselin v kontrolních boxech

Příloha č. 2: Tabulka naměřených hodnot rozpustných proteinů a organických kyselin v boxu s housenkami

Příloha č. 3: Tabulka naměřených hodnot rozpustných proteinů a organických kyselin v boxu s housenkami a vajíčky

Příloha č. 4: Celková tabulka naměřených hodnot aminokyselin

Příloha č. 5: Jednotlivé tabulky naměřených hodnot aminokyselin

Příloha č. 6: Jednosměrné ANOVY a Tukeyho testy

Přílohy

Příloha č. 1: Naměřené hodnoty rozpustných proteinů a organických kyselin v kontrolních boxech

	Rozp. proteiny	Průměr	Kys. šťavelová	Průměr	Kys. askorbová	Průměr	Kys. citrónová	Průměr	Kys. fumarová	Průměr
	koncentrace [mg/g FW]		koncentrace [mg/g]							
K1	14,809	16,936	0,503	0,476	0,039	0,036	4,133	4,136	0,034	0,030
	19,062		0,449		0,033		4,139		0,026	
K2	16,071	16,057	0,342	0,659	0,021	0,024	4,295	3,491	0,018	0,019
	16,043		0,977		0,027		2,686		0,021	
K3	23,935	24,673	0,464	0,453	0,037	0,053	4,233	4,465	0,046	0,036
	25,411		0,443		0,069		4,697		0,027	

Průměr		19,222		0,530		0,038		4,031		0,029
Stand. chyba		1,667		0,084		0,006		0,257		0,004

Příloha č. 2: Naměřené hodnoty rozpustných proteinů a organických kyselin v boxech s housenkami

	Rozp. proteiny	Průměr	Kys. šťavelová	Průměr	Kys. askorbová	Průměr	Kys. citrónová	Průměr	Kys. fumarová	Průměr
	koncentrace [mg/g FW]		koncentrace [mg/g]							
H1	36,586	26,988	0,236	0,257	0,055	0,073	3,475	4,164	0,008	0,010
	17,389		0,279		0,090		4,853		0,011	
H2	12,680	16,234	0,364	0,360	0,030	0,035	5,268	4,899	0,017	0,024
	19,789		0,355		0,040		4,529		0,031	
H3	24,413	21,952	0,371	0,420	0,032	0,049	3,603	5,265	0,022	0,031
	19,490		0,469		0,066		6,927		0,041	

Průměr		21,725		0,346		0,052		4,776		0,022
Stand. chyba		3,062		0,030		0,009		0,472		0,005

Příloha č. 3: Naměřené hodnoty rozpustných proteinů a organických kyselin v boxech s vajíčky a housenkami

	Rozp. proteiny	Průměr	Kys. šťavelová	Průměr	Kys. askorbová	Průměr	Kys. citrónová	Průměr	Kys. fumarová	Průměr
	koncentrace [mg/g FW]		koncentrace [mg/g]							

V1+	19,817	17,944	0,435	0,519	0,050	0,029	3,129	3,500	0,018	0,018
H	16,071		0,604		0,008		3,871		0,019	
V2+	16,544	14,826	0,579	0,569	0,043	0,055	3,241	2,868	0,023	0,021
H	13,108		0,558		0,066		2,496		0,020	
V3+	12,438	13,300	0,868	0,719	0,053	0,058	3,687	4,384	0,020	0,018
H	14,161		0,570		0,062		5,081		0,015	

Průměr		15,356		0,602		0,047		3,584		0,019
Stand. chyba		1,011		0,053		0,008		0,327		0,001

*Stand.chyba – standardní chyba

*FW – hmotnost čerstvého rostlinného materiálu

Příloha č. 4: Celková tabulka naměřených hodnot aminokyselin

Vzorek	Asp	Glu	Asn	Gln	His	Gly	Thr	Arg
Koncentrace [nmol/g DW]								
K1	32,87	352,13			141,28	288,21	269,93	119,73
K2	65,62	423,03			141,8	302,1	254,56	125,83
K3	49,92	677,17		179,95	170,39	250,28	374,52	124,13
H1	24,8	274	282,03	130,18	149,47	188,83	252,23	84,87
H2	33,47	367,18	329,52	118,18	161,65	245,51	270,15	101
H3	39,37	514,83	361,97		150,48	220,52	293,05	79,43
V1+H	54,87	219,22	373,2		136,94	180,47	229,74	105,67
V2+H	51,03	279,3	420,85		120,75	158,29	240,34	83,51
V3+H	37,72	164,06	316,52		111,87	169,06	285,33	71,13

Vzorek	Ala	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys
Koncentrace [nmol/g DW]								
K1	973,10	109,22	236,01	108,05	124,65	130,63	281,21	156,63
K2	898,84	113,42	240,65	97,43	116,59	127,92	306,87	159,65
K3	976,29	109,51	248,57	121,94	96,08	131,43	282,28	158,82
H1	658,71	88,2	193,19	85,44	90,8	103,44	214,82	132,42
H2	855,86	92,03	210,41	81,72	83,17	109,24	227,02	137,99
H3	945,54	90,4	210,88	151,36	63,68	106,73	219,65	126,72
V1+H	700,21	65,96	152,91	97,42	122,07	72,81	158,96	110,04
V2+H	644,68	81,3	158,52	80,97	71,63	74,84	189,5	120,64
V3+H	683,49	66,56	138,27	106,1	96,85	64,07	160,85	111,27

*U AMK jsem graf č.1 a jednotlivé tabulky vypracovávala pouze z těch AMK, u nichž byla naměřená data kompletní.

*U AMK hodnoty zaokrouhleny na dvě desetinná místa

Příloha č. 5: Jednotlivé tabulky naměřených hodnot aminokyselin

Asp

Box	Asp c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	32,87	49,47	7,72
K2	65,62		
K3	49,92		
H1	24,8	32,55	3,45
H2	33,47		
H3	39,37		
H+V1	54,87	47,87	4,24
H+V2	51,03		
H+V3	37,72		

Glu

Box	Glu c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	352,13	484,11	80,57
K2	423,03		
K3	677,17		
H1	274	385,34	57,25
H2	367,18		
H3	514,83		
V1+H	219,22	220,86	27,17
V2+H	279,3		
V3+H	164,06		

His

Box	His c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	141,28	151,16	7,85
K2	141,8		
K3	170,39		
H1	149,47	153,87	3,19
H2	161,65		
H3	150,48		
V1+H	136,94	123,19	5,99
V2+H	120,75		
V3+H	111,87		

Gly

Box	Gly c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	288,21	280,20	12,64
K2	302,1		
K3	250,28		
H1	188,83	218,29	13,39
H2	245,51		
H3	220,52		
V1+H	180,47	169,27	5,23
V2+H	158,29		
V3+H	169,06		

Thr

Box	Thr c [nmol/g DW]	Průměr	Stand,chyba
K1	269,93	299,67	30,77
K2	254,56		
K3	374,52		
H1	252,23	281,81	5,40
H2	270,15		
H3	293,05		

V1+H	229,74	251,80	13,91
V2+H	240,34		
V3+H	285,33		

Arg

Box	Arg c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	119,73	123,23	1,48
K2	125,83		
K3	124,13		
H1	84,87	88,43	5,29
H2	101		
H3	79,43		
V1+H	105,67	86,77	8,25
V2+H	83,51		
V3+H	71,13		

Ala

Box	Ala c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	973,10	949,41	20,66
K2	898,84		
K3	976,29		
H1	658,71	826,70	73,29
H2	855,86		
H3	945,54		
V1+H	700,21	676,13	13,43
V2+H	644,68		
V3+H	683,49		

Tyr

Box	Tyr c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	109,22	110,72	1,11
K2	113,42		
K3	109,51		
H1	88,2	90,21	0,91
H2	92,03		
H3	90,4		
V1+H	65,96	71,27	4,10
V2+H	81,3		
V3+H	66,56		

Val

Box	Val c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	236,01	241,74	2,99
K2	240,65		
K3	248,57		
H1	193,19	204,83	4,75
H2	210,41		
H3	210,88		
V1+H	152,91	149,90	4,93
V2+H	158,52		
V3+H	138,27		

Met

Box	Met c [nmol/g DW]	Průměr	Směrod. Odchylka
K1	108,05	109,14	5,79
K2	97,43		
K3	121,94		
H1	85,44	106,17	18,47
H2	81,72		
H3	151,36		
V1+H	97,42	94,83	6,02
V2+H	80,97		
V3+H	106,1		

Phe

Box	Phe c [nmol/g DW]	Průměr	Stand,chyba
K1	124,65	112,44	6,94
K2	116,59		
K3	96,08		
H1	90,8	79,22	6,59
H2	83,17		
H3	63,68		
V1+H	122,07	96,85	17,83
V2+H	71,63		
V3+H	*96,85		

*za tuto hodnotu byla dosazena průměrná hodnota zbylých dvou měření, z důvodu chyby v měření

Ile

Box	Ile c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	130,63	129,99	0,87
K2	127,92		
K3	131,43		
H1	103,44	106,47	1,37
H2	109,24		
H3	106,73		
V1+H	72,81	70,57	2,70
V2+H	74,84		
V3+H	64,07		

Leu

Box	Leu c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	281,21	290,12	6,84
K2	306,87		
K3	282,28		
H1	214,82	220,50	2,90
H2	227,02		
H3	219,65		
V1+H	158,96	169,77	8,07
V2+H	189,5		
V3+H	160,85		

Lys

Box	Lys c [nmol/g DW]	Průměr	Stand.chyba
K1	156,63	158,37	0,74
K2	159,65		
K3	158,82		
H1	132,42	132,38	2,66
H2	137,99		
H3	126,72		
V1+H	110,04	113,98	2,73
V2+H	120,64		
V3+H	111,27		

* K1 – kontrola box 1, K2 – kontrola box 2, K3 – kontrola box 3

H1 – housenky box 1, H2 – housenky box 2, H3 – housenky box 3

H+V1 – vajíčka s housenkami box 1, H+V2 vajíčka s housenkami box 2, H+V3 – vajíčka s housenkami box 3

Příloha č. 6: Jednosměrné ANOVY a Tukeyho testy

Prim. metabolity	Rozp. proteiny	Kys. šťavelová	Kys. askorbová	Kys. citrónová	Kys. fumarová
p hodnota	0,176	0,039	0,477	0,135	0,227
Test/-	-	T	-	-	-

Tukeyho test pro kyselinu šťavelovou

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,152	nevýznamné
A vs C	0,708	nevýznamné
B vs C	0,037	*p<0,05

* rozdíly významné

** rozdíly vysoce významné

-HSD - honestly significant difference

A – kontrola

B – housenky

C – vajíčka + housenky

Jednosměrná ANOVA (analýza rozptylu) pro aminokyseliny

Prim. metabolity	Asp	Glu	Asn	Gln	His	Gly	Thr	Arg
p hodnota	0,227	0,105	-	-	0,046	0,003	0,422	0,017
Test/-	-	-			-	T	-	T
Prim. metabolity	Ala	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys
p hodnota	0,034	3x10 ⁻⁴	5,3x10 ⁻⁵	0,767	0,241	4,4x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁴	8,2x10 ⁻⁵
Test/-	T	T	T	-	-	T	T	T

Tukeyho test pro GLY

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,041	*p<0,05
A vs C	0,003	**p<0,01
B vs C	0,094	nevýznamné

Tukeyho test pro Arg

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,029	*p<0,05
A vs C	0,024	*p<0,05
B vs C	0,9	nevýznamné

Tukeyho test pro Ala

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,32	nevýznamné
A vs C	0,028	*p<0,05
B vs C	0,206	nevýznamné

Tukeyho test pro Tyr

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,008	**p<0,01
A vs C	0,001	**p<0,01
B vs C	0,011	*p<0,05

Tukeyho test pro Val

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,006	**p<0,01
A vs C	0,001	**p<0,01
B vs C	0,001	**p<0,01

Tukeyho test pro Ile

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,001	**p<0,01
A vs C	0,001	**p<0,01
B vs C	0,001	**p<0,01

Tukeyho test pro Leu

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,002	**p<0,01
A vs C	0,001	**p<0,01
B vs C	0,009	**p<0,01

Tukeyho test pro Lys

Porovnávané skupiny	Tukeyho HSD hodnota	Vyhodnocení
A vs B	0,001	**p<0,01
A vs C	0,001	**p<0,01
B vs C	0,008	**p<0,01