

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu u
Ips typographus?**

Bakalářská práce

Autor: Veronika Hammerová

Vedoucí práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Veronika Hammerová

Lesnictví

Lesnictví

Název práce

Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu u *Ips typographus*?

Název anglicky

Do antennae play a role in regulation of pheromone production in *Ips typographus*?

Cíle práce

Samci kůrovců *Ips pini*, kterým byla odstraněna tykadla, produkují více feromonu než brouci intaktní (Ginzl et al., 2007). Tento negativně zpětnovazebný mechanismus, který byl poprvé demonstrován u mandelinky bramborové (Dickens et al., 2002), údajně brání nadměrné akumulaci brouků na hostiteli. Není známo, zda podobná regulace existuje u *Ips typographus*.

Cílem práce bude vypracování rešerše o regulaci feromonové produkce a provedení pilotních experimentů na *I. typographus* s cílem zjistit, zda tento mechanismus u tohoto druhu existuje.

Metodika

Metodicky je práce zaměřena na srovnání hladiny feromonu u brouků s tykadly a bez nich, případně před a po aplikaci juvenilního hormonu, který u kůrovců aktivuje feromonovou produkci. Hladina feromonu bude stanovována v extraktech střev brouků (případně v jejich emanacích) pomocí plynové chromatografie.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

Ips typographus, feromonová produkce, antennektomie, negativní zpětná vazba

Doporučené zdroje informací

- o Dickens et al., 2002 Dickens, J.C., Oliver, J.E., Hollister, B., Davis, J.C., Klun, J.A., 2002. Breaking a paradigm: male-produced aggregation pheromone for the Colorado potato beetle. *J. Exp. Biol.* 205, 1925e1933
- o Ginzl, M.D., Bearfield, J.C., Keeling, C.I., McCormack, C.C., Blomquist, G.J., Tittiger, C., 2007. Antennally-mediated negative-feedback regulation of pheromone production in the pine engraver beetle, *Ips pini*. *Naturwissenschaften* 94, 61-64.
- o Ivarsson P. and Birgersson G. Regulation and Biosynthesis of Pheromone Components in the Double Spined Bark Beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae) 1995. *J. Insect Physiol.* 41 (10) 843-849
- o J. C. Dickens, W. L. McGovern, and G. Wiygul (1988) EFFECTS OF ANTENNECTOMY AND A JUVENILE HORMONE ANALOG ON PHEROMONE PRODUCTION IN THE BOLL WEEVIL (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). *Journal of Entomological Science: January 1988, Vol. 23, No. 1, pp. 52-58.* <https://doi.org/10.18474/0749-8004-23.1.52>

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FLD

Vedoucí práce

RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Jaromír Hradecký, Anna Jirošová

Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2020**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 3. 3. 2020**prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.**

Děkan

V Praze dne 07. 03. 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu u *Ips typographus* vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Blanky Kalinové, CSc. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 15.6. 2020

Podpis autora

Poděkování

Chtěla bych velice poděkovat RNDr. Blance Kalinové, CSc. za trpělivé vedení bakalářské práce a odbornou i manuální pomoc, Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za analyzování vzorků a odbornou pomoc při analytické části bakalářské práce, Ing. Jiřímu Synkovi za odbornou i manuální pomoc při chovu *Ips typographus* a Ing. Anně Jirošové, Ph.D. za odbornou pomoc při metodické části bakalářské práce. Bez těchto lidí by tato bakalářská práce nemohla vzniknout. Dále děkuji mé rodině, přátelům a spolužákům za veškerou podporu a trpělivost.

Abstrakt

Ips typographus je jedním z nejvýznamnějších kalamitních škůdců našich smrkových porostů. Při kolonizaci hostitele samci vylučují agregační feromon, který láká další kůrovce z okolí. Úspěšná kolonizace hostitele závisí na obranyschopnosti stromu, populační hustotě brouků a množství jimi tvořeného feromonu. Rešeršní část této práce se zabývá základními informacemi o čeledi kůrovců (Scolytidae), se zaměřením na konkrétní druh *I. typographus* (Linnaeus, 1758). Dále se zabývá složením a tvorbou jeho agregačního feromonu a popisuje faktory, které ji regulují. Cílem této práce bylo zjistit, zda je produkce feromonu *I. typographus* regulována smyslovými informacemi z tykadel podobně jako to bylo pozorováno u příbuzného druhu *I. pini*. Konkrétně bylo pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC–MS) stanoveno množství feromonových komponent 2–methyl–3–buten–2–olu (MEBU) a cis–verbenolu (cV) v extraktech střev samců s tykadly a bez nich. Byly provedeny dva základní typy experimentů. První typ porovnával obsah feromonu ve střevech samců přirozeně zavrtaných ve smrkových polenech ve fázi tvorby snubních komůrek. V druhém experimentu došlo k porovnávání brouků s tykadly a bez nich po aplikaci juvenilního hormonu, který je zodpovědný za regulaci syntézy feromonu.

Bylo zjištěno, že odstranění tykadel a aplikace juvenilního hormonu ovlivňují především produkci hlavní feromonové komponenty, MEBU. Brouci s tykadly produkují méně MEBU než brouci bez tykadel nebo po aplikaci juvenilního hormonu. Výsledky jsou diskutovány s ohledem na možný význam regulace feromonové produkce na základě smyslových podnětů tykadel.

Abstract

I. typographus is one of the most important pests of spruce stands. During colonization of the host, males release an aggregation pheromone that attracts other bark beetles. Successful host colonization depends on the tree defense, the population density of the beetles, and the amount of pheromone they produce. The review part of my work deals with basic information about the family of bark beetles (Scolytidae), focusing on *I. typographus* (Linnaeus, 1758) and its pheromone composition and its regulation. The aim of this work was to find out whether the production of the pheromone in *I. typographus* is regulated by sensory information from antennae similarly as observed in the related bark beetle species *I. pini*. Specifically, the amount of pheromone components 2-methyl-3-buten-2-ol (MEBU) and cis-verbenol (cV) in gut extracts of males with and without antennae has been determined by using gas chromatography with mass detection (GC-MS). Two basic types of experiments were performed. The first one compared the content of pheromones in the gut extracts of males naturally boring in spruce logs during the phase of formation of wedding chambers. In the second experimental type, the beetles were compared with and without antennae after application of juvenile hormone, which is responsible for regulating pheromone synthesis.

It was found out that the antennal removal and the application of juvenile hormone mainly affect the production of the main pheromone component, MEBU. Beetles with antennae produce less MEBU than beetles without antennae or after application of juvenile hormone. The results are discussed with respect to the possible adaptive role of the antennal inputs in the regulation of pheromone production.

Klíčová slova

Kůrovec, *Ips typographus*, biosyntéza feromonu, feromonová produkce, agregační feromon, antennektomie, negativní zpětná vazba

Key words

Bark beetle, *Ips typographus*, biosynthesis of pheromone, pheromone production, aggregation pheromone, antennectomy, negative feed-back

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Cíl práce.....	13
3. Literární rešerše	13
3.1. Kůrovci (<i>Scolytidae</i>).....	13
3.2. Bionomie kůrovců	14
3.3. Lýkožrout smrkový (<i>Ips typographus</i>).....	15
3.4. Hostitelské dřeviny <i>Ips typographus</i>	15
3.5. Bionomie lýkožrouta smrkového (<i>Ips typographus</i>).....	16
3.6. Primární atrakce	17
3.7. Agregiční feromon a regulace jeho syntézy	18
3.8. Mevalonátová dráha	20
3.9. Vliv čichových informací na produkci feromonu	21
4. Materiál a metodika	23
4.1. Chov <i>I. typographus</i>	23
4.2. Rozlišování pohlaví.....	24
4.3. Aplikace JH, izolace střev, jejich extrakce rozpouštědlem a příprava vzorků pro chromatografickou analýzu.....	24
4.4. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	26
4.5. Ms detektor.....	27
4.6. Chromatografická analýza obsahu střev.....	28
4.7. Kvantifikace	29
5. Výsledky	29
5.1. Feromonová produkce u brouků po 3–denním žíru	30
5.1.2. První pokus	30
5.1.3. Druhý pokus.....	31

5.2. Kvantifikace feromonových komponent v experimentech s JH.....	33
6. Diskuze	38
7. Závěr	40
8. Seznam literatury	41

Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Ips typographus</i>	17
Obrázek 2: Znázornění mozku hmyzu a jeho neurosekrečních oblastí.....	20
Obrázek 3: Diagram mevalonátové dráhy and biosyntézy JH III u hmyzu	21
Obrázek 4: Čichové sensily na ventrální straně paličky tykadla.....	22
Obrázek 5: Dvojměrný plynový chromatograf	28
Obrázek 6: Chromatogramy znázorňující množství MEBU po 3-denním žíru.. ..	30
Obrázek 7: Chromatogramy znázorňující množství cV po 3-denním žíru	31
Obrázek 8: Chromatogramy znázorňující množství MEBU po 3-denním žíru. ...	32
Obrázek 9: Chromatogramy znázorňující množství cV po 3-denním žíru	32
Obrázek 10: Chromatogramy znázorňující množství MEBU u brouků ošetřených acetonem.. ..	34
Obrázek 11: Chromatogramy znázorňující množství MEBU u brouků ošetřených JH.	35
Obrázek 12: Chromatogramy znázorňující porovnání obsahu MEBU u brouků ošetřených JH a u brouků kontrolních	35
Obrázek 13: Chromatogramy znázorňující porovnání obsahu cV u brouků ošetřených JH a u brouků kontrolních	36
Obrázek 14-15: Chromatogramy znázorňující shodu retenčního chování syntetického standardu cV s cV nalezeným ve střevch brouků	36
Obrázek 16-17: Chromatogramy znázorňujících shodu retenčního chování syntetického standardu MEBU s MEBU nalezeným ve střevch brouků.....	37
Obrázek 18: Hmotnostní spektrum MEBU	37
Obrázek 19: Hmotnostní spektrum cV.....	38

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam vzorků a počty brouků před a po inkubaci	26
Tabulka 2: Kvantifikace MEBU, cV	33

1. Úvod

Jedním z nejzávažnějších škodlivých činitelů je v poslední době lýkožrout smrkový (*Ips typographus*). Tento kůrovec se stal hlavní příčinou těžeb, kterých bylo v roce 2018 evidováno 23,01 mil. m³. I přestože se lýkožrout momentálně vyskytuje na celém území Česka, největší postižení převažuje ve smrkových porostech na Moravě, Slezsku a Vysočině. Jeho výskyt vede ke vzniku rozsáhlých holin. Za klíčové faktory, které tuto kalamitu způsobily se považují prohlubující se vysychání krajiny, stejnověké monokultury a pěstování smrku mimo jeho areál přirozeného výskytu. (Zelená zpráva 2018).

I. typographus (L.) napadá hostitelské stromy kolektivně. V nižších populačních hustotách vyhledává oslabené nebo mrtvé stromy (Ginzel et al., 2007). Při přemnožení napadá i stromy zdravé (Kalinová et al. 2014). V obou případech vybírají hostitele samci „pionýři“ a zahajují kolonizaci zavrtáním pod kůru, kde vytváří snubní komůrku a zároveň uvolňují agregační feromon. Ten láká další brouky obojího pohlaví, kteří se ke kolonizaci pionýrů připojují (Toffin, 2017). Úspěšnost kolonizace závisí na populační hustotě brouků, obranyschopnosti hostitele a na množství agregačního feromonu, který brouci vytvářejí. (Ginzel et al., 2007).

U *I. typographus* je feromon syntetizován ve střevech samečků. Feromon tvoří dvě hlavní složky, 2-methyl-3-buten-2-ol (MEBU) a cis-verbenol (cV). Zatímco MEBU je vytvářen *de novo* v mevalonátové syntetické dráze, cV je syntetizován z alfa-pinenu hostitele (Bearfield et al. 2009, Dvořáková et al. 2011). Produkci MEBU ovlivňuje juvenilní hormon (JH), jehož syntéza v *Corpora allata* (CA) mozku je iniciována žírem. Bylo zjištěno, že JH reguluje expresi genů mevalonátové dráhy a tím se zahajuje feromonová produkce. Klíčovými enzymy isoprenoidů jsou HMGR (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktáza), HMGS (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA syntáza) a GPPS (geranyl diphosphate syntáza). Tyto enzymy syntetizují agregační feromony klasickou mevalonátovou cestou. Jedná se o metabolickou cestu, která je založená na reduktivní polymeraci acetyl-CoA. (Bearfield et al. 2009).

2. Cíl práce

Pro kůrovce přilákané agregačním feromonem může být důležité vědět, kolik jedinců vybraný strom již kolonizuje. Větší množství brouků, a tedy vyšší množství feromonu, mohou nově přilítli brouci zjistit pomocí čichu na tykadlech. Cílem této práce bylo zjistit, zda čichové vjemy mají u *I. typographus* schopnost ovlivňovat produkci feromonu. Proto byly pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí sledovány hladiny dvou hlavních feromonových komponent, MEBU a cV, v extraktech střev samců s tykadly a bez nich ve dvou typech experimentů. 1) u brouků přirozeně kolonizujících smrk a 2) u brouků po aplikaci juvenilního hormonu.

3. Literární rešerše

3.1. Kůrovci (*Scolytidae*)

Početnou čeledí brouků jsou kůrovci. Kůrovci žijí téměř celý život pod kůrou dřevin, kde si vytvářejí pozerky určitého obrazce. Každý druh kůrovce obsazuje určitou část stromu a určitý druh dřeviny (Voroncov, Červinková 1986). Některé druhy kůrovců jsou významnými škůdci lesních i ovocných dřevin (Pfeffer 1989). Velikost druhů vyskytujících se na našem území se pohybuje od 1-9 mm (Voroncov, Červinková 1986). Tělo mají obvykle krátké, oválné nebo válcovité. Zbarvení je zpravidla tmavě hnědé, černohnědé, případně černošedé. Povrch těla obvykle matný, lesklý, lysý nebo s mírným ochlupením. Hlava je malá a kulovitá. Na ní se nachází pár krátkých kusadel a pár krátkých makadel. Tykadla jsou tvořena pouze jedním krátkým článkem. Pomocí tvaru a struktury krovek dokážeme určit rod a druh (Pfeffer 1989). Pohlavní znaky nejsou často příliš patrné, u mnohých druhů je třeba provést taxonomické zařazení na základě morfologických znaků na pohlavních orgánech (Vega & Hofstetter 2015). Pod krovkami nalezneme dobře vyvinutá blanitá křídla, které kůrovcům slouží k letu. Nohy jsou krátké s pětičlennými chodidly. Podle různých morfologických a bionomických charakteristik můžeme kůrovce dělit na tři skupiny: lýkohuby, bělokaze a lýkožrouty (Voroncov, Červinková 1986).

3.2. Bionomie kůrovců

Rojení kůrovců probíhá obvykle na začátku jara až do poloviny léta. Některé druhy tvoří monogamní rodiny s jednou samičkou a jedním samečkem (lýkohubi, bělokazi), jiné vytváří polygamní rodiny s jedním samečkem a více samičkami (lýkožrouti). U monogamních druhů samička vykusuje závrtný otvor. Jakmile se dostane pod kůru, vyhlodá podélnou chodbičku paralelní k lýkovým vláknům, a vylučováním feromonu přiláká samečka. Dochází k páření, po kterém samička pokračuje ve vykusování chodby, kde poté naklade a zalepí vajíčka do speciálních komůrek. Po několika dnech se z vajíček vylíhnou larvy. Každá z nich si pak vytváří svoji chodbičku, která se postupně rozšiřuje v závislosti na růstu larvy a nakonec vytváří komůrku, kde se zakuklí. Z kukly se posléze líhne dospělý brouk. U polygamních druhů kůrovců je závrtný otvor vykusován samečkem. Pod kůrou vytvoří nepravidelnou snubní komůrku, do které poté přilétají samičky, které jsou přilákány vylučovaným agregačním feromonem. Po spáření samičky začínají hloubit každá svoji matečnou chodbu. Pokud chodbička vede směrem nahoru po kmenu stromu, piliny, které se při vykusování vytváří, padají dolů do snubní komůrky. Pokud samičky vytvářejí chodby směrem dolů, nebo do stran, využijí samečka, který za pomoci „kárky“ vysypává piliny závrtným otvorem ven a poté se znovu vrací k opuštěné samičce. Rojení spolu s kladením vajíček trvá přibližně měsíc. Celý vývoj i se stádiem larev trvá 1,5-2 měsíce. Po vylíhnutí dospělci prodělávají úživný žír, který je nezbytný pro rozvoj a zrání pohlavní soustavy (Voroncov, Červinková 1986).

Většina kůrovců v průběhu kolonizace hostitele vylučuje agregační feromon, který láká obě pohlaví téhož druhu a který reguluje nálet mnoha jedinců na hostitelskou dřevinu (Pfeffer 1989). Kromě agregačních feromonů některé druhy využívají i feromony anti-agregační, které regulují optimální hustotu brouků při kolonizaci a při obsazeném hostiteli směřují nálet nových jedinců na okolní stromy. (Schlyter et al. 1987).

Mnohé druhy kůrovců preferují oslabené nebo pokácené stromy. Některé druhy však jsou schopni napadat i stromy zdravé. Mnohé druhy kůrovců využívají ve svůj prospěch symbiózu s některými houbami. Houby vytvářejí v chodbách

podhoubí a slouží jako potrava pro larvy. Houba rozkládá dřevní buničinu pomocí speciálních látek a tím pomáhá k uvolňování sacharidů a bílkovin. Mnohé druhy kůrovců symbiotické houby přenášejí. Některé druhy mají na svých površích jakési kapsičky „mykangia“, která jsou také zásobárnou symbiotických hub. Kůrovci se pak o houbové „výsevy“ starají (prostřednictvím regulace vlhkosti, větrání, čištění chodbiček aj.) (Voroncov, Červinková 1986). Mnohé druhy hub přenášených kůrovci jsou pro hostitele patogenní (Caudullo et al. 2016).

3.3. Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*)

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je v našem lesním hospodářství nejobávanějším a nejnebezpečnějším hmyzím škůdcem smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.). Za příznivých podmínek se rychle přemnožuje. V malých populačních hustotách si vybírá dřeviny oslabené a poškozené (např. stromy poškozené větrem, mrazem, suchem). Vzhledem ke své velikosti preferuje stromy staré většinou 60-100 let. Při přemnožení napadá lýkožrout smrkový i zcela zdravé a mladší jedince. Velikost brouků se pohybuje od 4,0 až 5,5 mm, samičky bývají poněkud zavalitější. Zbarvení je tmavohnědé až černohnědé, lesklé, po stranách dosti ochlupení. Krovky jsou v zadní části vyhloubené, matné a jemně tečkované. Na okrajích krovek je vroubkování (4 páry zubů) (Křístek 2004).

3.4. Hostitelské dřeviny *Ips typographus*

Hlavní hostitelskou dřevinou kůrovců je smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.). Jeho rozšíření je téměř ve všech nižších a vyšších polohách (300-1350 m n. m.) severní a severovýchodní Evropy a v horách střední a jižní Evropy. Smrk je světlomilná dřevina, která v mládí snáší zástín a díky tomu se snadno dostává do starších porostů a zaujímá místo jiných dřevin. Z důvodu mělké kořenové soustavy, která není schopná dosáhnout do podzemních vod, je smrk náročný na půdní vlhkost. Dokáže však snést nadbytek vody a vydrží i stagnující vodu bažin a rašelinišť. Nedostatek vláhy může bránit dobrému růstu smrku. Smrk není příliš náročný na klima, ale je citlivý vůči vysokým teplotám a nízké vlhkosti. Kvůli

povrchovým kořenům má také malou odolnost vůči působení větru, jehož následkem bývají vývraty. Smrk je také citlivý na znečištění ovzduší a imise, zejména pak SO₂. Sníh a námraza pak poškozují smrk v podobě vrcholových zlomů (Maděra & Úradníček, 2001). Na nevhodných stanovištích může docházet k poškození nebo úhynu smrku v důsledku škodlivých faktorů, jako jsou například požáry, sucho, bouře apod. (Caudullo et. al, 2016). Poškození může dále vést k velkému rozvoji chorob a rozšíření škůdců (Maděra & Úradníček 2001). *I. typographus* je jedním z nejničivějších lesních škůdců, kteří poškozují ekosystémy smrkových lesů v Evropě (Caudullo et. al, 2016).

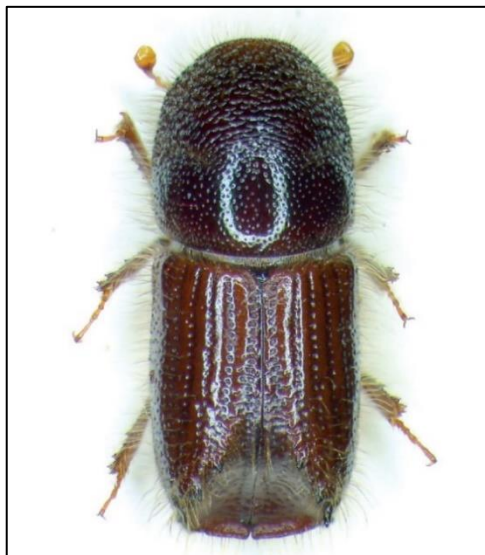
3.5. Bionomie lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)

I. typographus je původem eurosibiřský druh, který sice preferuje smrk, ale může se vyvíjet v ojedinělých případech i pod kůrou borovic a modřínů. Ve střední Evropě jsou jeho domovem horské smrčiny (do 2000 m n.m.), ale díky umělému zavádění smrku se rozšířil i do nižších poloh. Čas rojení a počet populací za rok závisí na nadmořské výšce. V nižších polohách (300–400 m n. m.) se lýkožrout poprvé rojí ke konci dubna a má obvykle tři generace. V chlumech (400–600 m n. m.) bývá první rojení v polovině května, obvykle má dvě generace. V horách (nad 600 m n. m.) rojení probíhá až ve druhé polovině května nebo začátkem června a generace bývá pouze jedna. Rojení trvá v závislosti na průběhu počasí 10–20 dnů (Křístek 2004).

Lýkožrout smrkový je polygamní druh (obvykle se páří s 1-3 samičkami). Jeho požerek je podélně hvězdicovitý a může mít až 6 ramen. Matečné chodby jsou vždy rovné, postupující směrem nahoru i dolů a mají několik větracích otvorů. Dosahují délky až 10 cm, šířky 3-3,5 cm. Snubní komůrky nalezneme v kůře (Křístek 2004).

Samičky po pár dnech hloubení matečných chodeb začnou klást vajíčka. Za jeden den vykladou v průměru 1 až 2 vajíčka. Za svůj celý život mohou průměrně naklást 60 vajíček. Za jeden až dva týdny se z vajíček začnou líhnout larvy, které pak začnou vykusovat chodbičky různými směry z matečné chodby. *I. typographus*

je často přenašečem houby *Ophiostomata polonicum*., která je pro smrk silně patogenní. Larvy se 4krát až 5krát svlékají a svůj vývoj zakončují jako kukla, ze které se přibližně po dvou týdnech líhne mladý brouk (Křístek 2004).



Obrázek 1: *Ips typographus* (Kurovcoveinfo.cz)

Ips typographus je v přírodě přirozeně loven a požírán některými predátory. Mezi nejhojnější hmyzí dravce, které se živí *I. typographus* jsou například draví brouci (*Cleridae*), mouchy (*Dolichopodidae*) a také parazitární vosy. Druhovú sestava predátorů závisí na druhu hostitelského stromu (Wermelinger 2004).

3.6. Primární atrakce

Látky, které přitahují kůrovce k hostitelskému stromu se nazývají primární atraktanty. Jsou to látky, které jsou vylučovány stromy a které kůrovci vnímají prostřednictvím čichových receptorů na tykadlech. Avšak primární atrakce stromů nebyla pro *Ips typographus* dosud jednoznačně prokázána. Existují dvě teorie o tom, jak *Ips typographus* vyhledává hostitele. První z nich soudí, že se pionýrští brouci orientují na dlouhé vzdálenosti a nalézají vhodné stromy pomocí volatilních látek, které stromy vylučují a které kůrovci vnímají čichem. Druhou teorií je, že brouci se čichově orientují pouze na krátké vzdálenosti, a tak nálet na vybraného

hostitele je spíše náhodný (Kalinová a kol. 2014, Andersson 2012). Obecně víme, že samci *Ips typographus* vhodného hostitele ke kolonizaci vybírají podle jeho zdravotního stavu. Většinou se jedná o oslabené, méně odolné stromy nebo stromy vyvrácené. Zdravé stromy *Ips typographus* napadá pouze v případě přemnožení, kdy je velké množství jedinců schopno překonat obranyschopnost stromu. Podle jednoho z předchozího výzkumu bylo zjištěno, že samci vnímají široké spektrum volatilních látek lapáků. Tykadla *Ips typographus* reagovala nejméně na 18 sloučenin včetně tří hlavních smrkových monoterpenových uhlovodíků (D-3-karen, α -pinen a β -pinen) a méně hojných sloučenin, jako jsou například kafr, myrcen, D-3-karen, p-cymen, limonen, verbenon a další (Kalinová et al. 2014). Je nám také známo, že pomocí přeměny hostitelského monoterpenu α -pinen si kůrovec vytváří jednu ze složek agregačního feromonu a tím je cV (Dvořáková et al. 2011). Na rozdíl od MEBU, který si kůrovec vytváří z vlastních zdrojů (*de novo*) (Lanne et al., 1989).

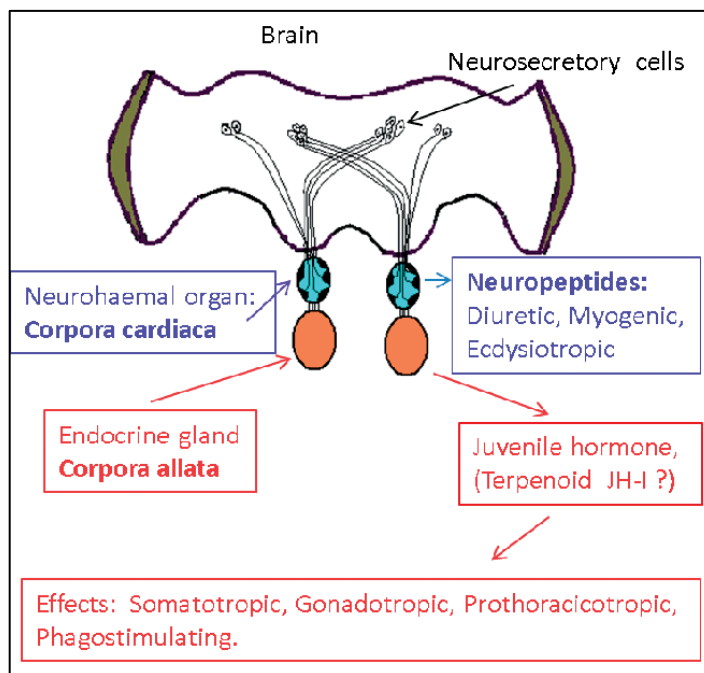
3.7. Agregační feromon a regulace jeho syntézy

Lýkožrout smrkový používá při kolonizaci hostitele dva typy feromonových signálů (agregační feromonový systém). Prvním z nich je signál, kterým samci po napadení hostitele lákají další jedince stejného druhu a který pomáhá synchronizovat útok mnoha jedinců na jednom hostiteli. Agregační feromon je vylučován v nejvyšším množství hned po napadení hostitele. Po přiletu samiček následuje jeho pozvolný pokles (Schlyter et al. 1987). Druhý typ signálu regulující kolonizaci hostitele je anti-agregační feromon, který anti-agregačně přesměrovává další jedince na okolní stromy. Zajišťuje tak dostatek potravy pro již nalétlé brouky. (Dvořáková et al. 2011) Jakým způsobem brouci poznají optimální hustotu není zatím zcela známo. Soudí se, že využívají různých smyslových signálů (zvuk, chemické signály působící nablízko). (Schlyter et al. 1987)

Za hlavní agregační feromony lze považovat 2-methyl-3-buten-2-ol a cis-verbenol, které se jsou tvořeny v zadní části střeva samečků lýkožrouta smrkového. Spolu s MEBU a cV byly ve střevě identifikovány i další sloučeniny, jako např. trans-verbenol, myrtenol, trans-myrtanol, 2-fenylethanol, ipsenol a ipsdienol.

Všechny ve střevě nalezené sloučeniny byly testovány pro jejich atraktivitu a zjistilo se, že směs se stala neatraktivní pro ostatní jedince pouze při odstranění 2-methyl-3-buten-2-olu nebo cis-verbenolu. Odstranění jiných látek ze směsi nemělo na účinnost feromonu žádný vliv (Schlyter et al. 1987). V pozdějších fázích kolonizace je z požerků uvolňován verbenon, který slouží jako anti-agregační feromon. Další látky jako ipsdienol a ipsenol, kteří jsou spolu s verbenonem uvolňovány, mají také mírné anti-agregační účinky. (Dvořáková et al. 2011)

Jak již bylo řečeno, feromon je směs a všechny látky této směsi jsou tvořeny ve střevě samců. Biosyntetické cesty pro jednotlivé látky jsou různé. *Ips typographus* využívá hostitelský isoprenoid z pryskyřice, konkrétně α -pinen a hydroxyluje ho na cV. (Dvořáková et al. 2011) Naproti tomu MEBU je tvořen *de novo*. V obou případech je syntéza regulována různými vnitřními a vnějšími faktory. Například bylo zjištěno že feromonovou produkci ovlivňuje pohlaví, vývojové stádium, stáří brouků, jejich letová aktivita a žír v průběhu kolonizace hostitele (Jaromír Bláha, 2018). Mezi nejvýznamnější stimuly, které výrazně stimulují feromonovou biosyntézu je žír. Ten poskytuje jak metabolické prekurzory, tak i energetické zdroje pro syntézu feromonů. Žír je také významným signálem pro endokrinní regulaci syntézy (Seybold et al. 2000) Příkladem je *Ips pini*, u kterého žír stimuluje produkci juvenilního hormonu (JH III), který následně ovlivňuje hlavní regulační enzymy syntézy feromonu (mevalonátová dráha). Produkce juvenilního hormonu je kontrolována z mozku hmyzu a to prostřednictvím neurohemálního orgánu *Corpora cardiaca* (CC) a endokrinní žlázou *Corpora allata* (CA) (Bearfield et al. 2009).

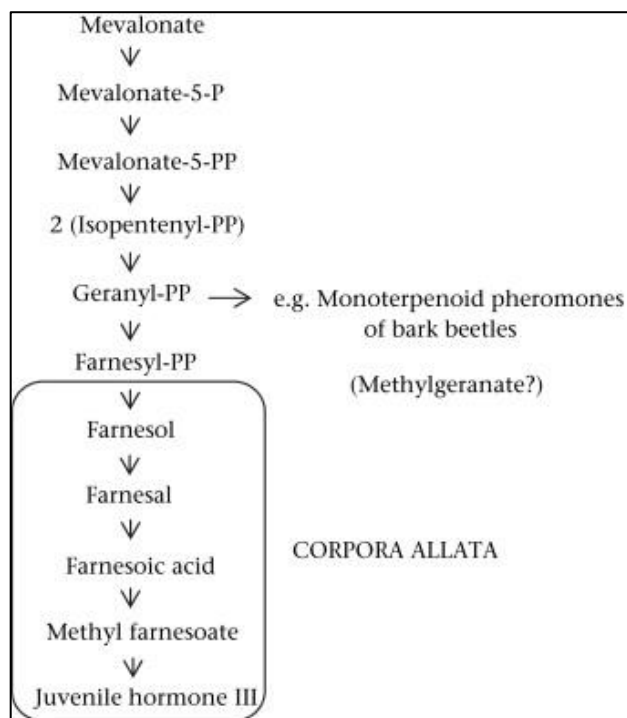


Obrázek 2: Schématické znázornění mozku hmyzu a jeho neurosekrečních oblastí (Sláma 2015)

3.8. Mevalonátová dráha

Mevalonátová cesta je rozvětvená metabolická cesta založená na reduktivní polymeraci acetyl-CoA, což vede k velké rozmanitosti isoprenoidních sloučenin. Pomocí mevalonátové dráhy je hmyz schopný syntetizovat JH. V krocích pro vytvoření farnesyl difosfátu jsou zahrnuty speciální homoisoprenoidové meziproducty a enzymy (Bellés et al. 2005). Je zřejmé, že u druhu *I. pini* a dalších druhů *Ips* ovlivňuje JH III klíčové regulační enzymy podél mevalonátové dráhy, která vede k produkci feromonu. U samců *I. pini*, JH III reguluje hladiny mRNA 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG) reduktázy (HMGR), první a vysoce regulovaný krok v mevalonové cestě (Přestože JH III silně reguluje aktivitu HMGR v *I. pini*, nemá žádný vliv na enzymatickou aktivitu u jiných druhů *Ips*). Žír a ošetření JH III silně zvyšuje hladiny transkriptu HMGR ve střevech *I. pini*. Z těchto studií vyplývá, že u *I. pini* žír stimuluje syntézu JH III pomocí CA, což zvyšuje hladinu exprese a enzymatickou aktivitu HMGR v mevalonátové cestě, a to vede k vysoké úrovni produkce feromonu. Kromě toho JH III také reguluje transkripci

dalších genů mevalonátové dráhy, včetně HMG-CoA syntázy (HMGS) a geranyl difosfát syntázy (GPPS) (Bearfield et al. 2009).

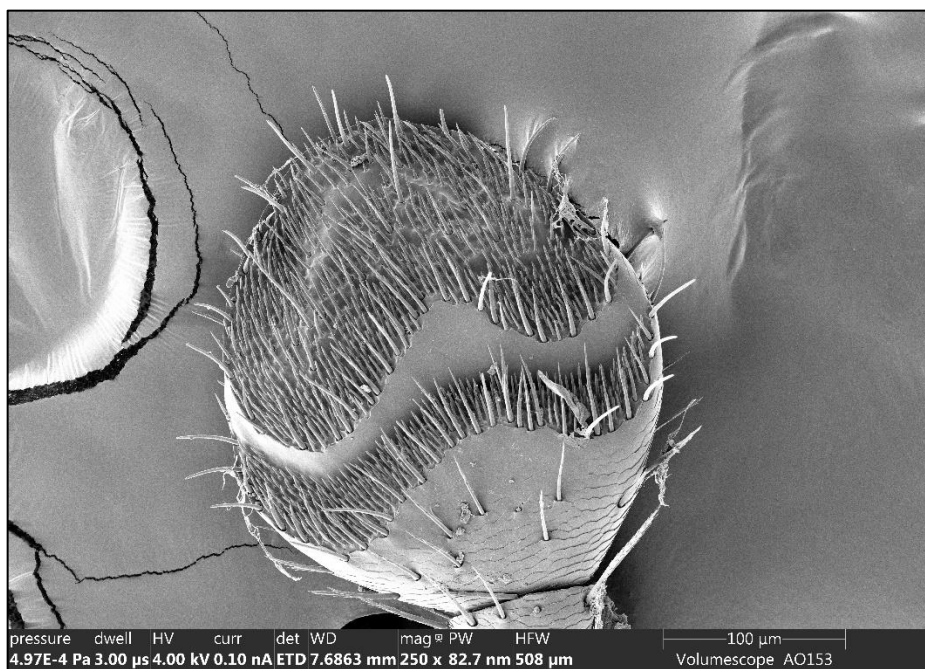


Obrázek 3: Diagram mevalonátové dráhy and biosyntézy JH III u hmyzu (Bellés et al., 2005)

3.9. Vliv čichových informací na produkci feromonu

Populační hustota ovlivňuje úspěšnost kolonizace a založení nové generace. Větší množství brouků produkuje vyšší koncentrace feromonu a zvyšuje šanci na přilákání dostatečného počtu samic. Je-li na hostiteli přítomno již dostatečné množství samců a produkce feromonu je dostatečná, nemusí nově příchozí k tvorbě feromonu příliš přispívat. Na druhé straně příliš vysoká produkce feromonu může nalákat více brouků, než může hostitel uživit a to se projeví na kvalitě nové generace. Regulace feromonové produkce v závislosti na populační hustotě na hostiteli se tedy jeví jako nezbytné. Kůrovci mohou míru feromonové produkce regulovat prostřednictvím negativní zpětné vazby, která je zprostředkována smyslovými informacemi z čichových receptorů na tykadlech (Ginzel et al. 2007)

Tykadla jsou smyslovým orgánem, který vnímá především čichové podněty. Čichové smyslové neurony (smyslové receptory) jsou umístěny v tzv. sensilách. Jedná se o drobné duté kutikulární útvary podobné chloupkům, které se liší délkou a šířkou. Uvnitř chloupků nacházíme různé počty čichových neuronů. Čichové sensily jsou u *Ips typographus* uspořádány na ventrální straně tykadla do oddělených smyslových oblastí, kterými jsou špička tykadla a dvě charakteristicky zprohýbané pruhy. Podle morfologického typu jsou sensily citlivé k různým látkám, takže vnímání feromonů a kairomonů se obvykle děje v odlišných sensilách. Z čichových neuronů jsou čichové informace vedeny do mozku, kde se přepojují v antenálním laloku a jsou dále vedeny houbovitých těles a laterálních rohů mozku (Andersson 2012).



Obrázek 4: Čichové sensily na ventrální straně paličky tykadla *I. typographus*. Patrné jsou 2 charakteristicky zprohýbané proužky, které jsou taxonomickým znakem tohoto druhu. (Zdroj: Kalinová B.).

U kůrovce *I. pini* (Ginzl et al., 2007) a u několika dalších druhů brouků bylo zjištěno, že tykadla jsou důležitým orgánem, který může ovlivňovat produkci feromonu. Tento regulační systém byl poprvé popsán u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a později u nosatce bavlníkového (*Anthonomus grandis*) (Dickens et al., 1988, 2002). V obou případech jedinci bez tykadel

produkovali vyšší množství feromonu v porovnání s jedinci s tykadly. U mandelinky bramborové JH III zvýšil feromonovou produkci v kombinaci s odstraněním tykadel až 200x. (Dickens et al., 2002) Také u nostace došlo po aplikaci JH nebo po odstranění tykadel (antenektomii) ke zvýšení feromonové produkci (Dickens et al., 1988). U kůrovců *Ips pini* bylo zjištěno, že samci bez tykadel produkují nejen výrazně větší množství feromonu než samci s tykadly, ale také hladiny mRNA genů mevalonátové dráhy, která je důležitá pro syntézu feromonu. Tyto geny byly při odstranění tykadel indukovány ve velké míře, což naznačuje transkripční regulaci produkce feromonu. Přesný mechanismus této regulace není znám. Bylo však prokázáno, že oválné struktury přítomné v antenálním laloku (tzv. glomeruly) jsou prostřednictvím svých interneuronů propojeny i s oblastmi mozku, které regulují produkci juvenilního hormonu (*Corpora cardiaca a Corpora allata*) (obrázek 2) (Ginzel et al. 2007).

4. Materiál a metodika

4.1. Chov *I. typographus*

Brouci (*I. typographus*) byli získáni z napadených stromů smrku ztepilého (*Picea abies*) na školních lesních pozemcích v Kostelci nad Černými lesy. Napadené stromy byly rozřezány a špalky byly přepraveny do chladové místnosti FLD České zemědělské univerzity v Praze. Jednotlivá polena byla umístěna do klecí v chovné místnosti (světelný režim L:D, 25°C, vlhkost 60 %). Poté co brouci začali vylétávat z polen, byli sesbírání, druhově určeni a 100 jedinců nové generace bylo vypuštěno na nové, nenapadené poleno smrku umístěného v plastovém boxu v místnosti s klimatizovanými podmínkami při 25°C s kontrolou vlhkosti 60 %. Boxy byly vybaveny větrací mřížkou a ventilací. Zde brouci zakládali novou generaci. Po výletu prvních brouků byla polena odkorněna, brouci vybráni a rozdělení podle pohlaví. Pro pokusy, které porovnávaly obsah feromonu ve střevech samců přirozeně zavrtaných ve smrkových polenech ve fázi tvorby snubních komůrek, jsme připravili dvě skupiny samců F1 generace pro zavrtání do smrkových polen – intaktní a bez tykadel. Brouci byli přeneseni na smrková polena a po 3 dnech žíru byli z polen vyloupaní. Střeva brouků bez tykadel a s tykadly byla extrahována odděleně.

Ve druhém experimentu byly porovnávány extrakty střev brouků s tykadly a bez nich po aplikaci JH. Současně byly vytvořeny další kategorie brouků, který měly pomoci určit, zda poranění spojené s odstraněním části těla nevede k nespécifickým změnám fyziologie, které by mohly mít vliv na regulaci syntézy feromonu. V experimentech byli použiti pouze samci.

4.2. Rozlišování pohlaví

Rozlišení pohlaví *Ips typographus* bylo prováděno u živých brouků pod binokulární lupou při 30x zvětšení. Zkoumaný brouk byl uchopen mezi prsty, natočen bokem a pozorován ze strany. K určení pohlaví byly kombinovány dvě pozorovací metody. První metoda využívala zjištění, že samci a samice mají rozdílnou hustotu chloupků na pronotu. Samička má na pronotu výrazně větší množství chloupků (v průměru 301 na 1 mm²), než samečci (pouze 186 chloupků na 1 mm²). Touto metodou lze rozlišovat pohlaví žijících brouků s přesností 98,5 %. (Schlyter & Cederholm 1981). Doplňující metoda rozlišování pohlaví zaměřená na rozdílnou velikost čelního hrbolku u rozdílných pohlaví. U samců je hrbol větší, zatímco u samic je hrbol podstatně menší. Tato metoda není tak spolehlivá, jako metoda hustoty chloupků, ale při kombinaci obou metod je dosaženo téměř stoprocentních výsledků. Kontrola přesnosti určení pohlaví proběhla při extrahování střev, kdy byl vypreparován sklerotizovaný penis samečka (Bláha 2019).

4.3. Aplikace JH, izolace střev, jejich extrakce rozpouštědlem a příprava vzorků pro chromatografickou analýzu

V pokusech, které porovnávaly obsah feromonu ve střevech samců přirozeně zavrtaných ve smrkových polenech jsme porovnávali dvě skupiny samců F1 generace – intaktní a bez tykadel.

V pokusech, ve kterých byl aplikován JH, byly porovnávány samci s tykadly, bez tykadel, bez tykadel a tarzů po aplikaci JH rozpuštěného v acetonu (0,5 μ l roztoku JH v acetonu – koncentrace 10mg/0,5ml). Kontrolní brouci byli ošetřeni pouze rozpouštědlem (0,5 μ l acetonu). Celkem tedy bylo vytvořeno 6 skupin po 10 broucích (tabulka 1).

Při aplikaci JH byly použity následující chemikálie a pomůcky: Binokulární lupa (OLYMPUS SZ61), pinzeta, filtrační papír, injekční stříkačka, stojan, Petriho misky, skelná vata, aceton (PESTINORM SUPRA TRACE, VWR CHEMICALS), juvenilní hormon III. (JH III SIGMA 10mg/0,5ml). Aceton a JH rozpuštěný v acetonu byly aplikovány pod binokulární lupou se 30x zvětšením za pomoci injekční stříkačky (Hamilton o celkovém objemu 1 μ l). Bylo vytvořeno 6 skupin po 10 broucích (Přehled vzorků – tabulka 1).

1. intaktní brouci, kterým byl aplikován JH
2. intaktní brouci, ošetření pouze rozpouštědlem
3. brouci bez tykadel, kterým byl aplikován JH
4. brouci bez tykadel, ošetření pouze rozpouštědlem
5. brouci bez tykadel a tarzů, kterým byl aplikován JH
6. brouci bez tykadel a tarzů, ošetření pouze rozpouštědlem

Po ošetření byly jednotlivé skupiny kůrovců uzavřeny do Petriho misek se zvlhčenou buničitou vatou a byli ponecháni 20 hodin v uzavřených polystyrenových boxech v laboratorní teplotě (brouci s JH byli odděleni od brouků, u kterých JH nebyl aplikován). Po 20 hodinách inkubace byli živí kůrovci z jednotlivých skupin vybráni a uloženi v izolovaných plastových vialkách do mrazícího boxu (-80°C) do doby extrakce střev. Počet živých brouků před a po inkubaci a jednotlivé kategorie ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Seznam vzorků a počty brouků před a po inkubaci

Počet brouků před a po inkubaci											
Intaktní				Bez tykadel				Bez tykadel + bez noh			
Aceton		JH		Aceton		JH		Aceton		JH	
Před (ks)	Po (ks)	Před (ks)	Po (ks)	Před (ks)	Po (ks)	Před (ks)	Po (ks)	Před (ks)	Po (ks)	Před (ks)	Po (ks)
10	9	10	8	10	9	10	9	10	8	10	8

Při extrakci střev tu byly použity následující chemikálie a pomůcky: Binokulární lupa (OLYMPUS SZ61), pinzety, filtrační papír, vialka s vnitřním insertem, vialka, pipeta (90 mikrolitrů), suchý led, pentan (ACROS ORGANICS 99+%, extra pure) – jako rozpouštědlo (90 mikrolitrů), bromododekan – jako interní standard. Jednotliví kůrovci byli narkotizováni chladem. Pod binokulární lupou se 30x zvětšením jim byly pomocí špendlíku rozevřena křídla a pomocí pinzety byla uchopena špička zadečku a vytaženo střevo. Při této proceduře došlo na kontrolu pohlaví inspekci přítomnosti penisu. Střevo, byla vkládána do předem připravených skleněných 2 ml chromatografických vialek s vnitřním skleněným insertem (200 mikrolitrů). Inert obsahoval 90 mikrolitrů pentanu. Z důvodu vysoké těkavosti pentanu a hlavního feromonového komponentu MEBU, byly vialky s inserty po celou dobu skladovány na suchém ledě. Poté byly vialky se střevy a rozpouštědlem uloženy přes noc do mrazicího boxu (-20°C). Další den bylo rozpouštědlo s rozpuštěnými feromony odsáto od zbytků střev a k extraktům bylo přidáno 10 mikrolitru interního standardu (undekan), jehož koncentrace byla 20 mikrogramů na mililitr. Vzorky byly týž den analyzovány pomocí plynové chromatografie.

4.4. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Jedná se o metodu určenou k dělení a stanovení plynů, kapalin a pevných látek s bodem varu do cca 400 °C. Metoda rozděluje složky mezi dvě fáze, fázi mobilní a fázi stacionární. Stacionární fáze je u plynové chromatografie nanášena na vnitřní stěny chromatografické kapilární kolony. Tou pak prochází nosný plyn

(např. helium, vodík), který slouží jako mobilní fáze. Vzorek je vstříkovan do vyhřívaného injektoru, zde se odpaří a ve formě par je nosním plynem unášen do kolony. Složky ze vzorku se nejprve sorbují na stacionální fázi na začátku kolony a poté se nosným plynem desorbují. Tento dělicí proces se neustále opakuje do doby, kdy složky ze vzorku jsou doneseny nosným plynem ke konci kolony. Každá složka vzorku postupuje kolonou rychlostí závislou distribučních konstantách ve stacionární a mobilní fázi. Kolonu rozdělené látky opouští v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant. V MS detektoru, který dokáže reagovat na okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu jsou látky detekovány a identifikovány. Signál detektoru je od nástřiku vzorku nepřetržitě registrován a vzniká grafický záznam v podobě chromatogramu, který je závislý na signálu detektoru a na čase. Na ose y je zaznamenána odezva detektoru (intenzita) a na ose x je zaznamenán čas. Každá látka je charakterizována chromatografickým píkem, který má tvar Gaussovy distribuce. Identifikace látky je provedena podle polohy píku. Jeho plocha a výška je úměrná množství látky ve vzorku. Pík je popsán třemi parametry: retenčním časem t_R , výškou píku h a šířkou píku, která je měřená buď na základní linii w_d nebo v polovině výšky píku w_h (Podehradská & Vozňáková 1997).

4.5. Ms detektor

Detektor hmotnostní spektrometrie je iontově optické zařízení, ve kterém dochází k oddělení nabitých částic ze směsi plynných molekul (iontů).

Látky vstupující do detektoru jsou nejprve ionizovány a pak jsou nabitě částice jsou odděleny podle jejich efektivních hmot (m/z). Na základě hmotnosti iontů a vztahu mezi molekulárním a fragmentačními ionty můžeme předpokládat identity analyzovaných látek. Charakter hmotového spektra závisí na způsobu zavedení vzorku do detektoru, podmínkách a způsobu ionizace, uspořádání analyzátorů iontů a způsobu registrace iontů. MS je často využíván spolu s plynovou chromatografií. (Podehradská & Vozňáková 1997).

4.6. Chromatografická analýza obsahu střev

Analýza byla provedena jednorozměrnou plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (GC-TOF-MS) dvourozměrným plynovým chromatografem Agilent 7890 B, který byl vybaven kapilárními kolonami (Rxi-5: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m a HP-5 MS-UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) a hmotnostním spektrometrickým detektorem s rychlým sběrem dat a s analyzátozem doby letu TOF Pegasus 4 D (Leco Coporation, USA). Nástřik byl proveden při 20°C se splitovacím poměrem 1:3 do injektoru při teplotě 275 °C (vyhřáto rychlostí 8°C/s). Teplotní program 1 D pece byl na začátku 40 °C, poté se pec postupně zahřívala každou minutu o 10 °C, dokud nedosáhla teploty 210 °C. Od této hodnoty se poté opět postupně ohřívala o 20 °C každou minutu, dokud nedosáhla konečné hodnoty 320 °C. Tato hodnota byla nastavena po dobu 6 minut. Nosným plynem bylo helium, jehož průtok byl 1 ml/min. Teplota při přenosné linky plynu byla 280°C. Energie ionizace u detektoru hmotnostní spektrometrie byla nastavena na 70 eV. Hmotnostní rozsah byl 35-500 m/z. Celková doba analýzy byla 30 minut a aktivizační rychlostí 10 spekter/s. Doba zpoždění rozpouštědla byla 480 s. Celková teplota iontového zdroje byla 250 °C.



Obrázek 5: Dvourozměrný plynový chromatograf Agilent 7890 B s hmotnostním spektrometrickým detektorem TOF Pegasus 4D (Leco Coporation, USA) s automatickým ramenem pro nástřik vzorků

4.7. Kvantifikace

U kvantifikace byla nejdříve provedena identifikace látky (MEBU, cV). Poté u identifikované látky byla nařaděna série koncentrací (například 1pg – 1ug/ul), které byly za pomoci GC-MS změřeny. Softwarem, jenž je k dispozici na vyhodnocování, byly změřeny plochy píků jednotlivých koncentrací. Následně z nich byl utvořen graf závislosti plochy píku na koncentraci. Poté byla změřena plocha píku námi zjištěné látky a odečetla se koncentrace z kalibrační křivky za pomoci softwaru. V tomto případě se kvantifikoval MEBU, protože reagoval na antennektomii. Vliv na produkci cV nebyl jednoznačný, a proto kvantifikace nebyla provedena. Stejný postup kvantifikace byl proveden i pro cV.

5. Výsledky

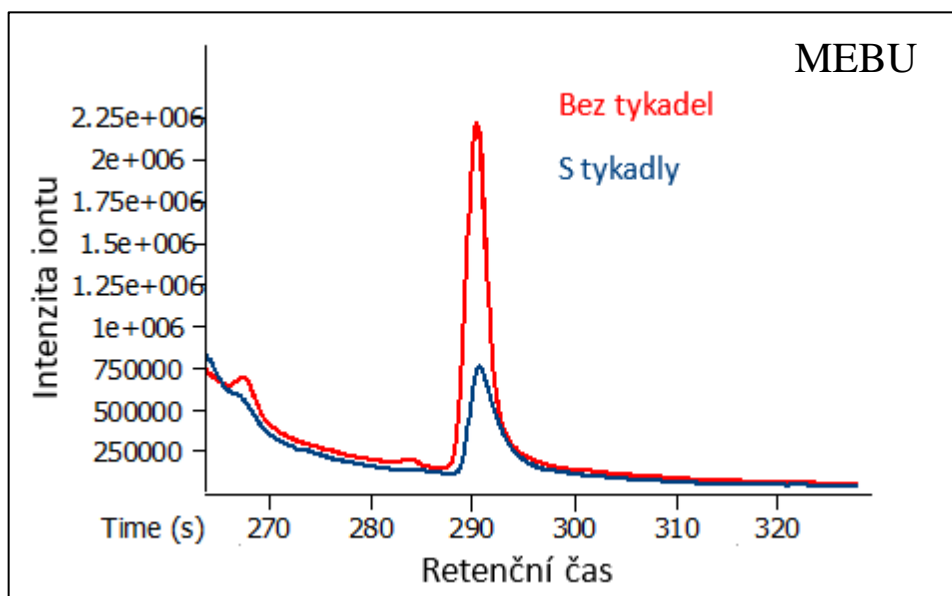
GC-TOF-MS analýza prokázala, že brouci s tykadly produkují méně feromonu v porovnání s brouky bez tykadel. Tato skutečnost byla patrná v obou typech experimentů, tj. u brouků po zažrání, i u brouků po aplikaci JH. Následující obrázky (6-11) a tabulka 2 ukazují srovnání obsahu 2-methyl-3-butenolu (MEBU) a cis-verbenolu (cV) u brouků s tykadly a bez tykadel. Identifikace sloučenin byla provedena na základě shody retenčních časů a hmotnostních spekter (obrázek 18-19) látek ve vzorku, s retenčním časem se syntetickými standardy, které také byly použity pro kvantitativní analýzu.

Všechny následující obrázky chromatogramů jsou zobrazeny v modu Extracted-ion chromatogram (XIC). Je to chromatogram, který zobrazuje vlastnosti dané hmotnosti (m/z) a její rozsah hmotnosti jako funkci času.

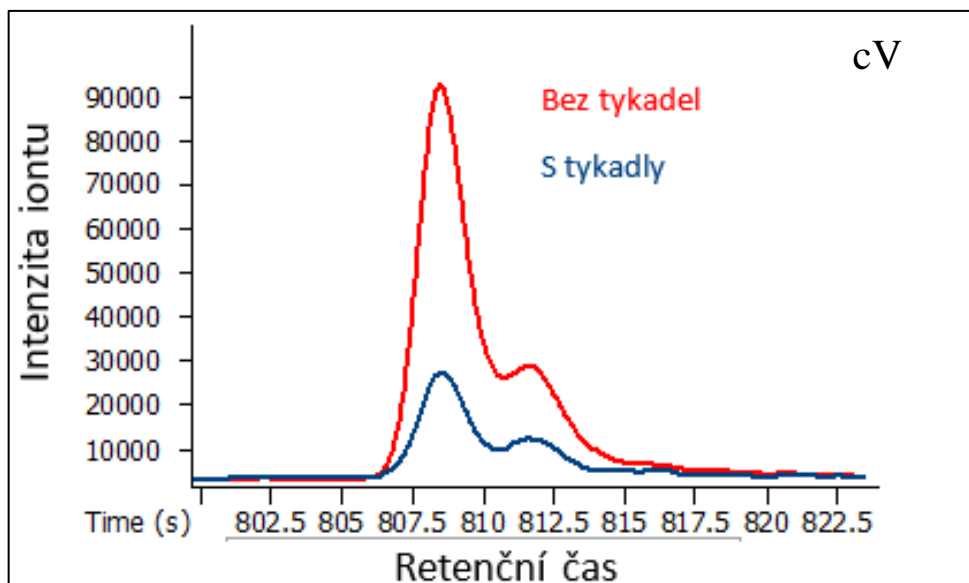
5.1. Feromonová produkce u brouků po 3–denním žíru

5.1.2. První pokus

V pokusech, kdy byl analyzován obsah střev u intaktních brouků a brouků bez tykadel po 3–denním žíru ve smrkovém polenu (žír přirozeně indukuje produkci feromonu), byl obsah hodnoty MEBU i cV vyšší u brouků s odstraněnými tykadly v porovnání s brouky intaktními (obr. 6 a 7). Na obrázku 6 vidíme hodnoty intenzity iontů charakteristických pro MEBU (hmota 71). Na obrázku 7 jsou znázorněny hodnoty XIC pro cV (hmota 94). Na tomto obrázku jsou vidět dva vrcholy, první je vyšší a představuje cV, druhý je nižší a znázorňuje trans izomer verbenolu, který je ve střevě také produkován, avšak nemá vliv na atraktivitu feromonu. Je zřejmé, že antenektomie ovlivňuje produkci obou izomerů.



Obrázek 6: Překryv dvou XIC (m/z 71) chromatogramů znázorňujících množství MEBU v extraktech brouků bez tykadel (červený záznam) a s tykadly (modrý záznam) po 3–denním žíru. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 71. Obrázek jasně znázorňuje, že po 3–denním žíru je tvorba MEBU vyšší ve střevech brouků bez tykadel než u brouků s tykadly.

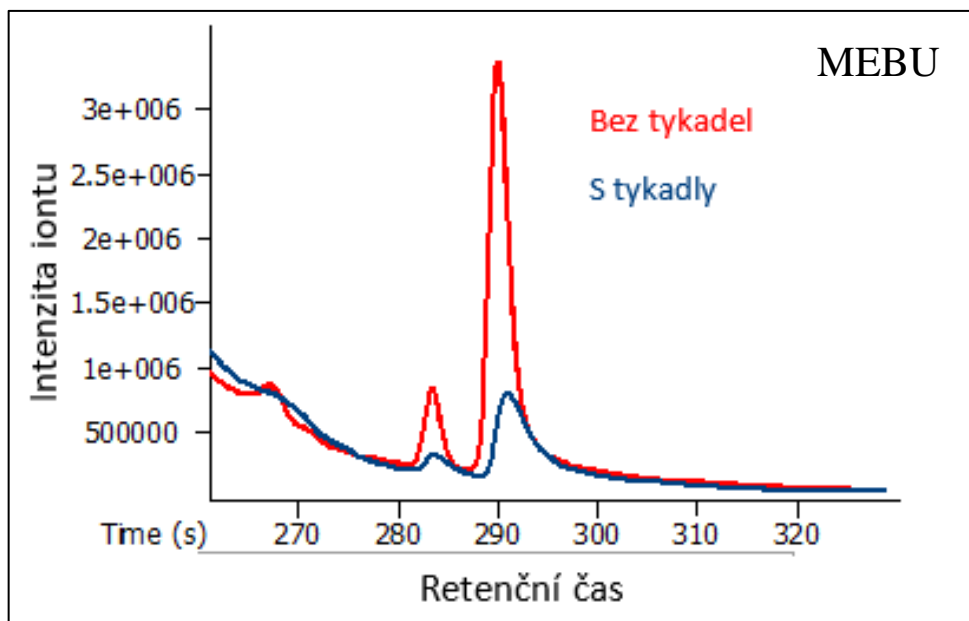


Obrázek 7: Překryv dvou XIC (m/z 94) chromatogramů znázorňujících množství cV v extraktech brouků bez tykadel (červený záznam) a s tykadly (modrý záznam) po 3–denním žíru. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 94 (charakteristický ion pro cV). Obrázek jasně znázorňuje, že po 3–denním žíru je tvorba cV vyšší ve střevech brouků bez tykadel než u brouků s tykadly.

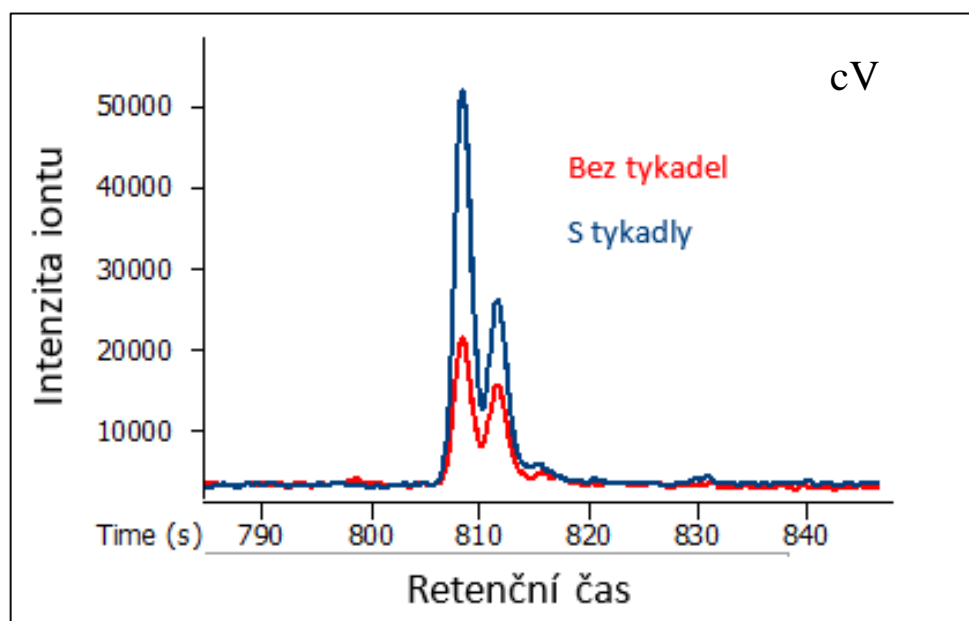
5.1.3. Druhý pokus

Obrázky 8 a 9 ukazují srovnání produkce MEBU (vyšší pík na obr. 8) a cV (první a druhý znázorněný pík na obrázku 9) u brouků po 3–denním žíru ve smrkovém polenu.

V pokusech, kdy byl také analyzován obsah střev u intaktních brouků a brouků bez tykadel po 3–denním žíru ve smrkovém polenu, byl obsah hodnoty MEBU vyšší u brouků s odstraněnými tykadly. Naproti tomu cV byl vyšší u brouků s intaktními (obr. 8 a 9). Na obrázku 8 vidíme hodnoty intenzity iontů charakteristických pro MEBU (hmota 71). Na obrázku 9 jsou znázorněny hodnoty XIC pro cV (hmota 94). Z důvodu odlišné hodnoty cV není zřejmé, zda antenektomie ovlivňuje produkci tohoto izomeru.



Obrázek 8: Překryv dvou XIC chromatogramů znázorňujících množství MEBU v extraktech brouků bez tykadel (červený záznam) a s tykadly (modrý záznam) po 3-denním žíru. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 71 (charakteristický ion pro MEBU). Obrázek jasně znázorňuje, že po 3-denním žíru je tvorba MEBU vyšší ve střevech brouků bez tykadel než u brouků s tykadly.



Obrázek 9: Překryv dvou XIC chromatogramů znázorňujících množství cV v extraktech brouků bez tykadel (červený záznam) a s tykadly (modrý záznam) po 3-denním žíru. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 94 (charakteristický ion pro cV). Obrázek znázorňuje, že po 3-denním žíru tvorba cV je v daném případě vyšší ve střevech brouků s tykadly než u brouků bez tykadel.

5.2. Kvantifikace feromonových komponent v experimentech s JH

V pokusech, kdy byl analyzován obsah střev u brouků s tykadly a bez nich a po ošetření juvenilním hormonem, jsme se pokusili přesně určit množství MEBU a cV na brouka pomocí syntetických standardů MEBU a cV (tabulka 2). Ukázalo se, že množství cV tvořeného brouky bez podaného JH a bez žíru je pod limitem kvantifikace, a proto jeho hodnoty nejsou v tabulce 2 uvedeny. Množství MEBU u všech skupin brouků bylo poměrně vyšší a jejich kvantifikace v ng/brouka je v tabulce 2 znázorněna.

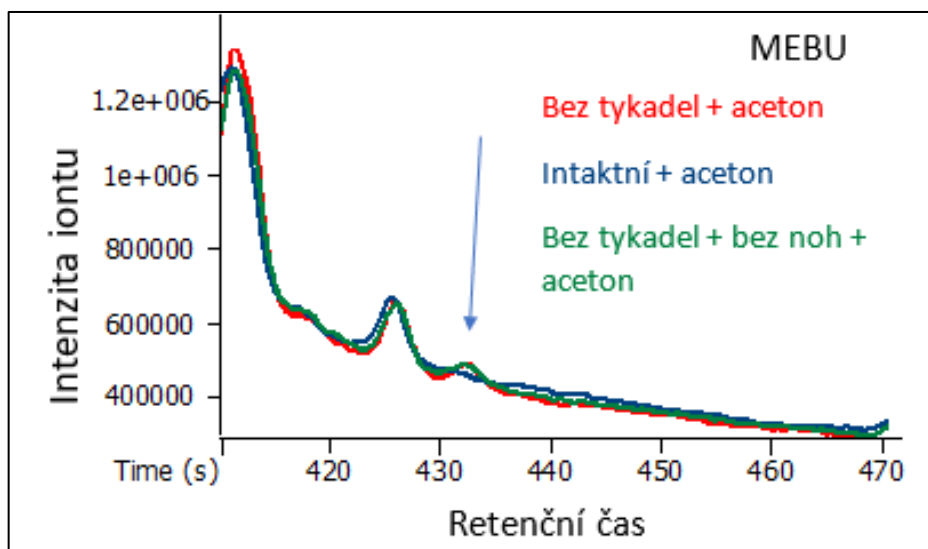
Tabulka 2: Kvantifikace MEBU, cV s uvedeným odhadem LCQ (Lowest calibration level), ve střevech jednotlivých brouků všech srovnávaných kategorií.

Vzorek	počet brouků/vz	Koncentrace v ng/brouka			
		2-methyl-3-butenol		cis verbenol	
		koncentrace v ng/brouka	nejistota stanovení	koncentrace v ng/brouka	nejistota stanovení
bez tykadel + JH:1	9	138	34	5,0	1,3
intaktní + JH:1	8	6,5	1,6	8,4	2,1
bez tykadel + bez noh + JH:1	8	19,5	4,9	4,4	1,1
bez tykadel + aceton:1	9	0,7	0,2	pod LCQ	-
intaktní + aceton:1	9	pod LCQ	-	pod LCQ	-
bez tykadel + bez noh + aceton:1	8	0,6	0,1	pod LCQ	-
odhad LCQ (ng/brouka)		0,55		2	

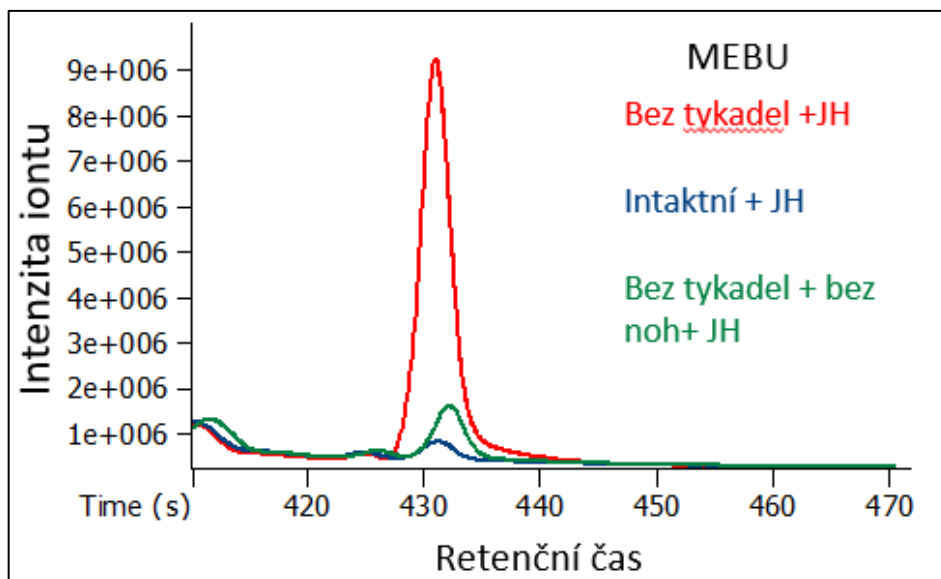
V tabulce 2 (kvantifikace feromonů) jsou uvedeny hodnoty odečtené z kalibračních křivek látek (MEBU, cV). Plochy píků byly odečteny z chromatogramů zobrazených pomocí charakteristických iontů pro jednotlivé látky (74 pro MEBU, 94 pro cV). Hladiny detekce pro různé látky jsou rozdílné, protože detektor je detekuje s rozdílnou citlivostí. Hodnoty v tabulce pod LCQ, znamenají v případě MEBU, že je obsah menší než 0.55 ng, v případě verbenolu je obsah menší než 2 ng.

Z tabulky 2 je zřejmé, že všechny kategorie brouků tvoří více MEBU než cV. Antenektomie a aplikace JH jeho produkci výrazně zvyšuje. Koncentrace u vzorku bez tykadel s aplikací JH byla 138 ng na brouka, zatímco intaktní vzorek měl koncentraci výrazně nižší, 6,5 ng na brouka. Hodnoty cV byly u brouků neošetřených JH pod limitem kvantifikace, a proto nejsou v tabulce 2 uvedeny.

Také obrázky 10 a 11 ukazují, že množství feromonu je vyšší u brouků bez tykadel v porovnání s brouky intaktními i po aplikaci JH (podobně jako je to uvedeno v tabulce 2). Chromatogram na obrázku 10 znázorňuje, že obsah MEBU ve střevech kontrolních brouků (ošetřených acetonem bez JH), nabývá relativně malých hodnot. Antenektomie a aplikace JH (obrázek 11) jeho produkci výrazně zvyšuje.

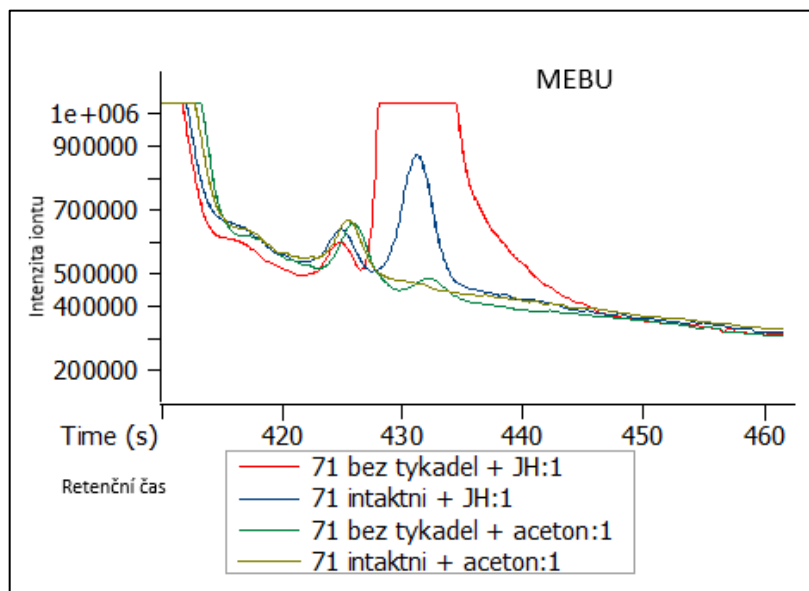


Obrázek 10: Překryv dvou XIC (m/z 71) chromatogramů znázorňujících množství MEBU v extraktech **brouků ošetřených acetonem**. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 71 (charakteristický ion pro MEBU). Chromatogram znázorňuje, že obsah MEBU ve střevech brouků, kteří byli ošetřeni acetonem, je vyšší u brouků bez tykadel, ale celkově nabývá relativně malých hodnot.

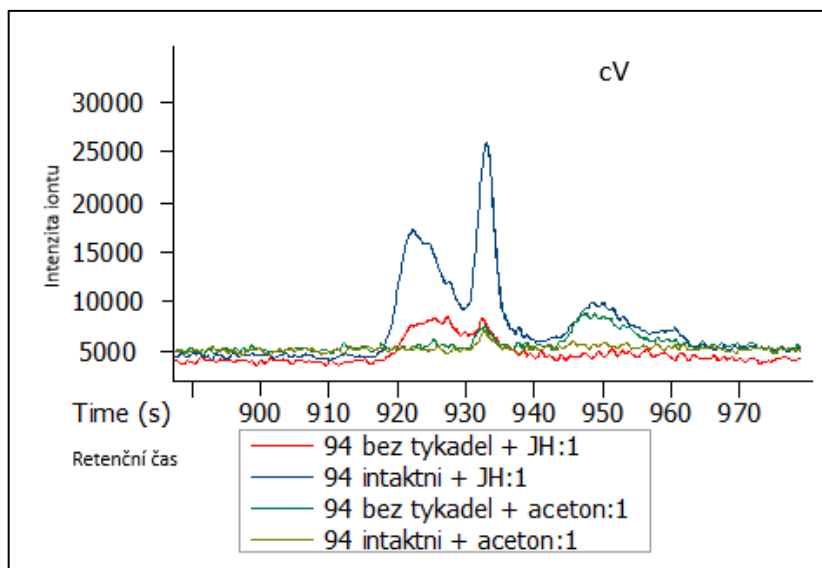


Obrázek 11: Překryv dvou XIC (m/z 71) chromatogramů znázorňujících množství MEBU v extraktech **brouků ošetřených JH**. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 71 (charakteristický ion pro MEBU). Chromatogram znázorňuje, že obsah MEBU ve střevech brouků, kteří byli ošetřeni JH, je vyšší u brouků bez tykadel, než u brouků s tykadly nebo u brouků bez tykadel a bez noh.

Na obrázcích 12 a 13 je srovnání obsahu MEBU a cV u brouků kontrolních (khaki a zelený záznam) a ošetřených JH (bez tykadel - červený záznam, s tykadly - modrý záznam). Aplikace JH ovlivnila produkci MEBU i cV (modrý a červený záznam). Antenektomie ovlivnila produkci MEBU, ale ne cV.

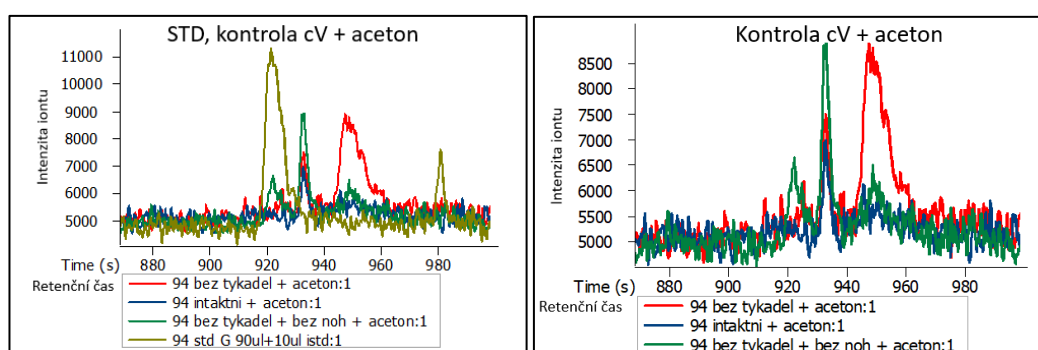


Obrázek 12: Překryv dvou XIC (m/z 71) chromatogramů znázorňujících porovnání obsahu MEBU v extraktech brouků ošetřených JH a u brouků kontrolních. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 71 (charakteristický ion pro MEBU). Chromatogram znázorňuje, že aplikace JH i antenektomie ovlivnila produkci MEBU ve střevech brouků.

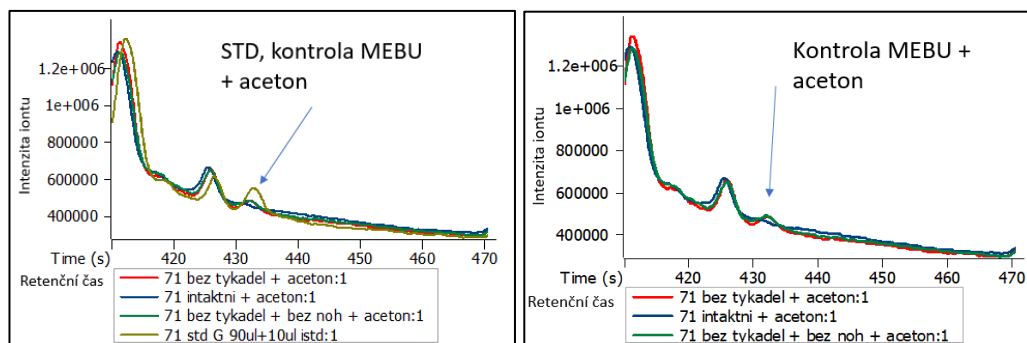


Obrázek 13: Překryv dvou XIC (m/z 94) chromatogramů znázorňujících porovnání obsahu cV v extraktech brouků ošetřených JH a u brouků kontrolních. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu 94 (charakteristický ion pro cV). Chromatogram znázorňuje, že aplikace JH ovlivnila produkci cV ve střevcích brouků. Antenektomie produkci cV neovlivnila.

Na obrázcích 14 a 15 je uveden příklad identifikace cV na základě shody retenčního chování syntetického standardu cV . Na obrázcích 16 a 17 je uveden příklad identifikace MEBU na základě shody retenčního chování syntetického standardu MEBU (syntetický standard cV i MEBU je znázorněn khaki zelenou v levých obrázcích). cV a MEBU ze střev dalších 3 zkoumaných kategorií brouků ošetřených acetonem (levý i pravý obrázek).

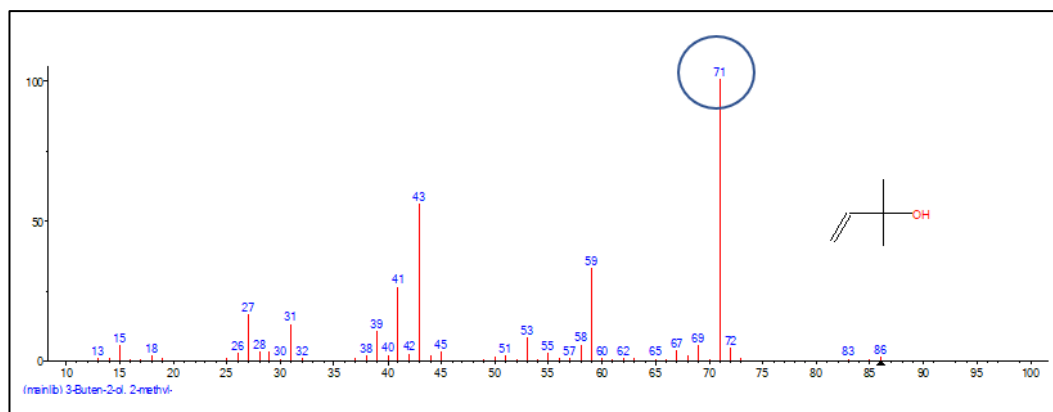


Obrázek 14-15: Překryv dvou XIC (m/z 94) chromatogramů znázorňujících shodu retenčního chování syntetického standardu cV (khaki zelený záznam na pravém obrázku) s cV nalezeným ve střevcích brouků. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu

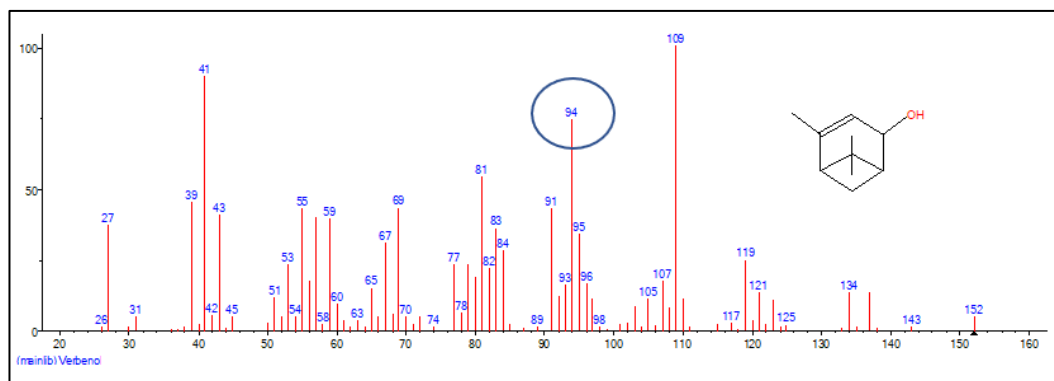


Obrázek 16-17: Překryv dvou XIC (m/z 71) chromatogramů znázorňujících shodu retenčního chování syntetického standardu MEBU (khaki zelený záznam na pravém obrázku) s MEBU nalezeným ve střevěch brouků. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu.

Hmotnostní spektra MEBU a cV jsou uvedena na obrázcích 18 a 19. Charakteristický iont (m/z) pro MEBU je 71, zatímco pro cV 94. Tyto charakteristické fragmenty jsou na obrázcích označeny kruhem.



Obrázek 18: Hmotnostní spektrum MEBU s vyznačeným základním pikem (fragment označený kruhem). Struktura MEBU je uvedena v pravé části obrázku. Na ose x je znázorněna hmotnost fragmentů, na ose y jejich intenzita.



Obrázek 19: Hmotnostní spektrum cV s vyznačeným základním píkem (fragment označen kruhem). Struktura cV je uvedena v pravé části obrázku. Na ose x je znázorněna hmotnost fragmentů, na ose y jejich intenzita.

6. Diskuze

V této práci bylo zjištěno:

1. Intaktní brouci *I. typographus* produkují méně feromonu než brouci bez tykadel.
2. Stimulační efekt byl pozorován jak u brouků po 3–denním žíru ve smrkovém polenu, tak po aplikaci JH.
3. U brouků po 3–denním žíru byl efekt pozorován pro obě hlavní feromonové komponenty.
4. U brouků bez možnosti žíru a u brouků ošetřených JH byl efekt výrazný pro MEBU. V případě cV vliv antennektomie nebyl jednoznačný.

V této práci bylo zjištěno, že intaktní brouci produkují mnohem méně feromonu než brouci bez tykadel ošetření JH III. Tento efekt byl výrazný pro MEBU, u kterého došlo po antennektomii k výraznému navýšení. Získané údaje nám potvrzují výsledky pokusu po žíru, výsledky po aplikaci JH i odborná literatura. V případě cV je efekt antennektomie nejednoznačný. U pokusu s 3–denním žírem byla dvě opakování. Výsledky u cV byly pokaždé rozdílné. Příčinou může být přirozená variabilita vzorků, ale nebyla provedena statistika, která by tohle tvrzení potvrdila. U pokusu s aplikovaným JH III, byla naměřená hodnota cV pod limitem kvantifikace a nedošlo tak k jeho záznamu. Hladiny detekce pro obě látky jsou rozdílné, protože je detektor detekuje s rozdílnou citlivostí.

V této práci bylo také provedeno měření u brouků bez tykadel a bez noh. Výsledky nelze porovnat. Pro porovnání je potřeba dalšího vzorku s brouky bez noh.

Skutečnost, že antennektomie stimuluje produkci feromonu byla pozorována u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a u nosatce bavlníkového (*Anthonomus grandis*) (Dickens et al., 1988, 2002). V obou případech došlo ke zvýšení produkce feromonu u jedinců bez tykadel v porovnání s jedinci s tykadly. U nosatce antennektomie zvýšila feromonovou produkci více než aplikace analogu JH hormonu (Dickens et al., 1988) Také u kůrovců *I. pini* bylo zjištěno, že samci bez tykadel produkují výrazně větší množství feromonu než samci s tykadly (Ginzel et al.). Kromě zvýšené produkce feromonu měla antennektomie v experimentech na *I. pini* vliv na hladinu mRNA tří genů zapojených do produkce feromonu v mevalonátové dráze. Konkrétní studie uvádí, že žír samců stimuluje *corpora allata* k syntéze JH III, který stimuluje feromonovou produkci (v případě *I. pini* je to terpenická látka ipsdienol) ve střevech. Klíčovými enzymy nejen pro tvorbu ipsdienolu, ale i pro tvorbu dalších isoprenoidů jsou enzymy HMGR (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktáza), HMGS (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA syntáza) a GPPS (geranyl diphosphate syntáza), jejichž hladiny byly po antennektomii zvýšeny (Bearfield et al. 2009).

Negativní zpětná vazba mezi smyslovými vstupy a produkcí feromonu může být adaptivní. (Ginzel et al. 2007). Může umožňovat nově příchozím kůrovcům regulovat produkci feromonu a šetřit energii při kolonizaci hostitele. Čím větší množství feromonu kolonizující brouci uvolňují, tím je přilákáno více brouků. To znamená více potenciálních sexuálních partnerů a více brouků schopných překonat obranyschopnost stromu, ale také vysoké množství brouků na daném hostiteli představuje riziko, že nově založené pokolení nebude mít dostatek kvalitní potravy. Je známo, že kůrovci regulují svou hustotu kolonizace prostřednictvím anti-agregačního feromonu verbenonu (Schlyter et al. 1987). Regulace produkce agregačního feromonu prostřednictvím tykadel, která umožňují vnímat koncentraci feromonu může být další mechanismus, který na jedné straně ovlivňuje míru napadení hostitele, ale na druhé straně umožňuje nově příchozím broukům snížit

feromonovou produkci v případě, že je signál dostatečně silný a šetřit tak energii, protože tvorba agregačního feromonu je energeticky náročná (Ginzel et al. 2007).

Mechanismus této regulace není znám. Soudí se, že je zprostředkovan chemoreceptory na tykadlech a centrálními čichovými oblastmi v mozku. Bylo prokázáno, že glomeruly v antenálním laloku (primární analyzační čichové centrum mozku hmyzu), jsou prostřednictvím svých interneuronů propojeny nejenom s vyššími čichovými centry, ale i s oblastmi mozku, které regulují endokrinní pochody hmyzu. Konkrétně s oblastmi, které regulují produkci JH v *Corpora allata* (Ginzel et al. 2007).

Jakkoliv jsou výsledky přesvědčivé, nejsou data statisticky zpracována, protože experimenty byly provedeny pouze v jednom opakování. Výsledky této práce tak mohou být považovány za předběžné, vyžadující opakování a statistické zpracování.

Studie feromonové produkce feromonu u *I. typographus* prokázaly, že u *Ips typographus* je MEBU syntetizován de novo (Lanne et al., 1989), zatímco cV vzniká detoxifikací alfa-pinenu během žíru brouků při kolonizaci hostitele. Kromě toho se na regulaci tvorby feromonů podílí vliv pohlaví, maturace, aktivity a žíru (Bláha, BP, 2019).

7. Závěr

Naše pokusy jednoznačně ukazují, že antenektomie a aplikace JH stimuluje produkci MEBU. Vliv antenektomie a JH na tvorbu cV byl pozorován, ale získané výsledky nejsou jednoznačné a vyžadují opakování a následné statistické zpracování.

8. Seznam literatury

ANDERSSON, M. N. Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche: A Journal of Entomology* [online]. 2012, **2012**, 1-14 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1155/2012/149572. ISSN 0033-2615. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/psyche/2012/149572>

BEARFIELD, J. C., A. G. HENRY, C. TITTIGER, G. J. BLOMQUIST a M. D. GINZEL. Two Regulatory Mechanisms of Monoterpenoid Pheromone Production in Ips spp. Of Bark Beetles. *Journal of Chemical Ecology*. 2009, **35**(6), 689-697. DOI: 10.1007/s10886-009-9652-2. ISSN 0098-0331. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-009-9652-2>

BELLÉS, X., D. MARTÍN a M. D. PIULACHS The Mevalonate Pathway and the Synthesis of Juvenile Hormone in Insects. *Annual Review of Entomology* [online]. 2005, **50**(1), 181-199 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130356. ISSN 0066-4170. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>

BLÁHA, J.; Produkují samci Ips typographus feromon před kolonizací hostitelského stromu?. Praha, 2019. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

BLOMQUIST, G. J., R. FIGUEROA-TERAN, M. AW, M. SONG, A. GORZALSKI, N. L. ABBOTT, E. CHANG a C. TITTIGER. Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2010, **40**(10), 699-712. DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.07.013. ISSN 09651748. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174810001682>

CAUDULLO, G., W. TINNER a D. DE RIGO. *Picea abies in Europe: distribution, habitat, usage and threats* [online]. 2016 [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/318462839_Picea_abies_in_Europe_distribution_habitat_usage_and_threats

DICKENS, J. C., J. E. OLIVER, B. HOLLISTER, J. C. DAVIS aj. A. KLUN. Breaking a paradigm: male-produced aggregation pheromone for the Colorado

potato beetle. *Journal of Experimental Biology* [online]. 2002, **2002**(205) [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <https://jeb.biologists.org/content/205/13/1925.short>

DICKENS, J. C., W. L. MCGOVERN a G. WIYGUL. Effects of Antennectomy and a Juvenile Hormone Analog on Pheromone Production in the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science* [online]. 1988, **23**(1), 52-58 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.18474/0749-8004-23.1.52. ISSN 0749-8004. Dostupné z: [https://meridian.allenpress.com/jes/article/23/1/52/75211/EFFE](https://meridian.allenpress.com/jes/article/23/1/52/75211/EFFECTS-OF-ANTENNECTOMY-AND-A-JUVENILE-HORMONE)
CTS-OF-ANTENNECTOMY-AND-A-JUVENILE-HORMONE

DVOŘÁKOVÁ, M., I. VALTEROVÁ a T. VANĚK. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy*. 2011, **105**(11).

GINZEL, M. D., J. C. BEARFIELD, C. I. KEELING, C. C. MCCORMACK, G. J. BLOMQUIST a C. TITTIGER. Antennally mediated negative feedback regulation of pheromone production in the pine engraver beetle, *Ips pini*. *Naturwissenschaften*. 2007, **94**(1), 61-64. DOI: 10.1007/s00114-006-0158-2. ISSN 0028-1042. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-006-0158-2>

J. Podehradská, Z. Vozňáková: Návodů pro laboratorní cvičení z Analytické chemie II. Plynová chromatografie. VŠCHT, Praha 1997. Obecné základy

KALINOVÁ, B., R. BŘÍZOVÁ, M. KNÍŽEK, M. TURČÁNI a M. HOSKOVEC. Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions* [online]. 2014, **8**(4), 305-316 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1007/s11829-014-9310-7. ISSN 1872-8855. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11829-014-9310-7>

KŘÍSTEK, J. a J. URBAN. *Lesnická entomologie*. Praha: Academia, 2004. ISBN 80-200-1052-1.

LANNE, B.S., P. IVARSSON, P. JOHNSON, G. BERGSTRÖM a A.B. WASSGREN. *BIOSYNTHESIS OF 2-METHYL-3-BUTEN-2-OL, A PHEROMONE COMPONENT OF IPS TYPOGRAPHUS (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)* [online]. 1988 [cit. 2020-06-15].

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*). Kurovcoveinfo.cz [online]. Kostelec nad Černými lesy, ©2019 [cit.2019-11]. Dostupné z:

<http://www.kurovcoveinfo.cz/lykozrout>

MADĚRA, P. a L. ÚRADNÍČEK. *Dřeviny České republiky*. Písek: Matice lesnická, c2001. ISBN 80-86271-09-9.

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Zpráva o stavu lesů a lesního hospodářství České republiky v roce 2018 (Zelená zpráva). Praha: [s.n.]: 2019. ISBN 978-80-7434-530-2

PFEFFER, A. *Kůrovcovití (Scolytidae) a jádrohlodovití (Platypodidae)*. Praha: Academia, 1989. Zoologické klíče. ISBN 80-200-0089-5.

SEYBOLD, S. J., J. BOHLMANN a K. F. RAFFA. Biosynthesis of Coniferophagous Bark Beetle Pheromones and Conifer Isoprenoids: Evolutionary Perspective and Synthesis. *The Canadian Entomologist*. 2000, **132**(6), 697-753. DOI: 10.4039/Ent132697-6. ISSN 0008-347X. Dostupné z:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0008347X0000688X/type/journal_article

SCHLYTER, F., G. BIRGERSSON, J. A. BYERS, J. LÖFQVIST, G. BERGSTRÖM Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates: EVOLUTIONARY PERSPECTIVE AND SYNTHESIS. *Journal of Chemical Ecology*. 1987, **13**(4), 701-716. DOI: 10.1007/BF01020153. ISSN 0098-0331. Dostupné také z:

<http://link.springer.com/10.1007/BF01020153>

SCHLYTER, F.; CEDERHOLM, I., Separation of the sexes of living spruce bark beetles, *Ips typographus* (L.), (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of applied Entomology*. 1981, vol. 92, s. 42-47. ISSN 0044-2240

SCHLYTER, F., J. A. BYERS a J. LÖFQVIST. *Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: Density-Regulation Mechanism in Bark Beetle Ips typographus* [online]. 1987 [cit. 2020-06-15].

SLÁMA, K. A new look at the nature of insect juvenile hormone with particular reference to studies carried out in the Czech Republic. *European Journal of Entomology* [online]. 2015, **112**(4), 567-590 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.14411/eje.2015.073. ISSN 12105759. Dostupné z: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2015.073.html>

TOFFIN, E., E. GABRIEL, M. LOUIS, J. L. DENEUBOURG a J. C. GRÉGOIRE. Colonization of weakened trees by mass-attacking bark beetles: no penalty for pioneers, scattered initial distributions and final regular patterns. *Royal society open science* [online]. 2017, **5**(2018) [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170454>

VEGA, F. a R. HOFSTETTER *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. London: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-417156-5.

VORONCOV, A. I. a H. ČERVINKOVÁ *Škůdci dřeva*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1986.

WERMELINGER, B. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*—a review of recent research. *Forest Ecology and Management* [online]. 2004, **202**(13), 67-82 [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1016/j.foreco.2004.07.018. ISSN 03781127. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378112704005353>