

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



## **Srovnání atraktivity různých směsí feromonových komponent pro lýkožrouta severského *Ips duplicatus***

Diplomová práce

Vypracovala: Bc. Kateřina Beránková

Vedoucí práce: Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

2018

# CZECH UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES PRAGUE

Faculty of Forestry and Wood Sciences

Excellent team for mitigation



## **Comparison of attractiveness of various pheromone component blends for spruce bark beetle *Ips duplicatus***

Thesis

Author: Bc. Kateřina Beránková

Supervisor: Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

2018

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Kateřina Beránková

Lesní inženýrství

Název práce

**Srovnání atraktivity různých směsí feromonových komponent pro lýkožrouta severského *Ips duplicatus*.**

Název anglicky

**Comparison of attractiveness of various pheromone component blends for spruce bark beetle *Ips duplicatus*.**

---

### Cíle práce

Cílem diplomové práce je zjistit, jak různé směsi feromonových komponent lákají lýkožrouta severského a porovnat komerčně dostupné feromonové směsi s nově vyvinutými. Práce je součástí vývoje účinného feromonového odpárníku pro tento druh kůrovce.

### Metodika

Na vybrané lokalitě s vysokou populační hustotou *Ips duplicatus* ve VLS Libavá budou instalovány lapače vnařené komerčně dostupnými nebo nově vyvinutými feromonovými odpárníky pro tohoto kůrovce. Odpárníky budou obsahovat různý poměr E-myrcenolu a ipsdienolu, případně i další feromonové složky. V průběhu pokusu budou pravidelně kontrolovány odchyty brouků v jednotlivých lapačích. Úlovky budou archivovány a jednotlivé feromonové odpárníky budou rotovány v lapačích podle předem připraveného randomizačního schématu pro vyloučení vlivu umístění na velikost odchytů. V laboratoři bude následně zjišťován počet a poměr pohlaví u lýkožrouta severského a lýkožrouta smrkového. Celková data pro jednotlivé typy odpárníků budou statisticky vyhodnoceny.

**Doporučený rozsah práce**

40-60

**Klíčová slova**

*Ips duplicatus*, ipsdienol, E-myrcenol, lýkožrout severský, feromonová směs

---

**Doporučené zdroje informací**

- BYERS, J.A.; F. SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G.; FRANCKE, W. E-myrcenol in *Ips duplicatus* – an aggregation pheromone component new for bark beetles. *Experientia*, 1990, vol. 46 no.11-12, s.1209-1211. ISSN 0014-4754
- HOLUSA, J.; GRODZKI, W.; LUKASOVA, K.. Comparison of the pheromone dispensers ID Ecolure, Pheagr IDU and Duplodor for the double spined bark beetle (*Ips duplicatus*). *Sylwan*, 2010, vol. 154, no. 6, s. 363-370. ISSN 0039-7660
- HOLUSA, J.; ZAHRADNIK, P.; KNIZEK, M.; DRAPELA, K. Seasonal flight activity of the double-spined spruce bark-beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) in Silesia (Czech Republic). *Biologia*, 2003, vol. 58, no. 5, s. 935-941. ISSN 0006-3088
- JAKUS, R.; BLAZENEC, M. Princípy ochrany dospělých smrekových porastov pred podkôrnym hmyzom. *Zvolen: Ústav ekológie lesa SAV*, 2015. 232 s.
- SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G.; BYERS, J.A.; BAKKE A. The aggregation pheromone of *Ips duplicatus* and its role in competitive interactions with *I. typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Chemoecology*, 1992, vol. 3, no. 3-4, s. 103–112. ISSN 0937-7409
- ZHANG, Q.H., SCHLYTER, F.; LIU, G.T.; SHENG, M.L. Electrophysiological and behavioral responses of *Ips duplicatus* to aggregation pheromone in inner mongolia, China: Amitinol as a potential pheromone component. *Journal of Chemical Ecology*, 2007, vol. 33, no. 5, s. 1303-1315. ISSN.0098-0331
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2017/18 LS – FLD

**Vedoucí práce**

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Excelentní tým pro mitigaci

**Konzultant**

Ing. Rastislav Jakuš, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2018

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2018

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Děkan

V Praze dne 14. 03. 2018

---

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Srovnání atraktivity různých směsí feromonových komponent pro lýkožrouta severského *Ips duplicatus*** vypracovala samostatně pod vedením paní Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové 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 20. 4. 2018

Podpis autora .....

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce paní Ing. A. Jirošové, Ph.D. za vedení, připomínky, cenné rady a celkovou podporu při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. R. Modlingerovi, Ph.D. za konzultaci a pomoc při statistickém zpracování dat. A také bych ráda poděkovala panu Ing. J. Synkovi, panu M. Leinerovi a panu J. Hradeckému za pomoc v laboratoři.

Srovnání atraktivity různých směsí feromonových komponent pro lýkožrouta severského *Ips duplicatus*.

Kateřina Beránková

**Abstrakt:** Ve střední Evropě v posledních 30 letech výrazně vzrůstá význam lýkožrouta severského jako škůdce na smrku zepilém, a proto je v ohnisku zájmu vývoj účinnějších metod managementu včetně kontroly populace pomocí feromonových odparníků.

V této diplomové práci byla srovnávána atraktivita různých směsí feromonových komponent pro lýkožrouta severského a porovnány komerčně dostupné feromonové směsi s nově vyvinutými. Rovněž byla vyvinuta metodika pro určení pohlaví lýkožrouta severského dle vnějších morfologických znaků.

Práce shrnuje aktuální informace z odborné literatury o lýkožroutovi severském, o jeho lesnickém významu, výskytu, bionomii, preventivních a obranných opatřeních, a také o metodice rozlišování pohlaví u tohoto kůrovce. Další část rešerše se zabývá chemickou ekologií tohoto druhu. Především popisem hlavních složek agregačního feromonu lýkožrouta severského, účinností feromonových směsí nebo principy, podle kterých je vyhledáván hostitelský strom. V poslední části literární rešerše je popsán princip chemické analýzy těkavých feromonových složek, a to odběr vzorků ze vzduchu metodou mikroextrakce pomocí pevné fáze SPME (Solid Phase Microextraction) a dělení těchto látek ve složitých směsích a jejich identifikace technikou plynové chromatografie (GC) s hmotnostní spektrometrií (MS) a 2D plynovou chromatografií.

Na základě shrnutých informací jsme navrhli polní pokus pro porovnání komerčních feromonových směsí pro lýkožrouta severského a směsí aktivních látek nově namíchaných v laboratoři. Pokus jsme instalovali v pokročilé sezóně při předpokládaném druhém náletu lýkožrouta severského v oblasti s kalamitním výskytem kůrovce. Po zhodnocení počtu odchycených brouků na různé návnady jsme konstatovali, že komerční odparníky mají v pokročilé sezóně vyšší účinnost než směsi připravené na základě průzkumu literatury.

Statistickou analýzou bylo zjištěno, že největší podíl lýkožrouta severského byl odchycen na komerční odparník Pheagr-IDU, pak následovala varianta bez návnady, a dále odparník ID-Rumunia. Celkem bylo odchyceno 1 086 brouků lýkožrouta severského a 2 008 brouků lýkožrouta smrkového. Pitvou byl u lýkožrouta severského určen větší odchyt samic než samců, konkrétně 52 %.

Různou účinnost komerčních feromonových odparníků vysvětlujeme rozdílem jejich chemického složení, zjištěného chemickou analýzou. V průběhu evaluace pokusu byla

vyvinuta metodika na určování pohlaví lýkožrouta severského dle vnějších morfologických znaků, která umožňuje tříditi dle pohlaví živé jedince.

**Klíčová slova:** *Ips duplicatus*, ipsdienol, E-myrcenol, lýkožrout severský, feromonová směs



Comparison of attractiveness of various pheromone component blends for spruce bark beetle *Ips duplicatus*.

Kateřina Beránková

**Abstract:** In Central Europe, the importance of the double-spined bark beetle, *Ips duplicatus*, as a pest of the Norway spruce (*Picea abies*) has grown considerably over the last 30 years, and therefore it is in the focus of interest to develop more efficient management methods including population control using pheromone evaporators.

In this diploma thesis the attractiveness of various mixtures of pheromone components for spruce bark beetle *Ips duplicatus* was compared and commercially available pheromone mixtures and newly developed were compared. The methodology for determining the sex of *Ips duplicatus* according to the external morphological signs was also developed.

In this work there is summarized actual information from professional literature about *Ips duplicatus*, about its forestry significance, occurrence, bionomics, preventive and defensive measures, and also about methodology to determinate the sex of this bark beetle. Another part of the literary research deals with chemical ecology of this species. Primarily with describe the main components of the aggregation pheromone of *Ips duplicatus*, efficiency of the pheromone mixtures or the principles by which the host tree is searched for. In the last part of the literary research is described the principle of the chemical analysis of the volatile pheromone components, specifically subscription of samples from the air by method of micro-extraction using a solid phase SPME (Solid Phase Microextraction) and the separation of these substances in complex mixtures and their identification by the technique of gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) and 2D gas chromatography.

On the basis of the summarized information, we have designed a field test to compare commercial pheromone mixtures for *Ips duplicatus* and mixtures of active substances newly mixed in the laboratory. The experiment was installed in the advanced season with the expected second raid of *Ips duplicatus* in an area with a calamitous occurrence of bark beetle. After evaluating the number of beetles caught on various baits, we decided that commercial evaporators have in the advanced season higher efficiency than mixtures prepared on the basis of literary research.

The statistical analysis showed that the biggest rate of *Ips duplicatus* was captured by a commercial evaporator Pheagr-IDU, followed by a variant with a blank evaporator, and a farther evaporator from Romania ID-Romania. Altogether 1 086 bark beetle of *Ips*

*duplicatus* and 2 008 bark beetle of *Ips typographus* were captured. More female than male of *Ips duplicatus* was determined by dissection, namely 52%.

The different efficiency of commercial pheromone evaporators is explained by the difference in their chemical composition as determined by chemical analysis. During the evaluation of the experiment, the methodology for determining the sex of *Ips duplicatus* was developed according to the external morphological signs, which allows to sort by the sex of a living individual.

**Keywords:** *Ips duplicatus*, ipsdienol, E-myrcenol, pheromone mixture

## Obsah

1.	ÚVOD .....	15
2.	CÍL PRÁCE .....	17
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE .....	18
3.1	Popis škůdce.....	18
3.2	Současný výskyt.....	19
3.3	Historie .....	21
3.4	Popis vývojových stádií.....	21
3.5	Rozlišení pohlaví.....	23
3.6	Způsob života .....	24
3.7	Přirození nepřátelé .....	25
3.8	Kontrola.....	26
3.9	Obranná opatření .....	27
3.9.1	Lapáky .....	27
3.9.2	Lapače .....	27
3.10	Feromonové směsi.....	29
3.11	GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) .....	33
3.11.1	Plynová chromatografie (GC).....	33
3.11.2	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	33
3.11.3	Dvoudimenzionální plynová chromatografie (GCxGC) .....	34
3.11.4	Mikroextrakce na pevnou fázi (SPME).....	35
4.	METODIKA .....	37
4.1	Metodika práce v laboratoři .....	37
4.1.1	SPME extrakce chemických látek z odparníků.....	37
4.1.2	GC-MS analýza chemických látek z odparníků.....	37
4.2	Metodika práce v terénu .....	38
4.3	Metodika určování pohlaví z vnějších morfologických znaků.....	40
4.4	Metodika statistické analýzy.....	43
5.	VÝSLEDKY.....	44
5.1	Vyhodnocení odchytů <i>Ips duplicatus</i> na různé směsi aktivních látek.....	44
5.2	Vývoj metody určení pohlaví u <i>Ips duplicatus</i> z vnějších morfologických znaků .....	48

5.3	Analýza chemického složení komerčních odparníků se zaměřením na aktivní látky .....	48
6.	DISKUSE.....	53
7.	ZÁVĚR.....	57
8.	SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	58
9.	SEZNAM PŘÍLOH.....	62
10.	PŘÍLOHY.....	63

## SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1.	Tabulka pozic jednotlivých pastí pro <i>Ips duplicatus</i> . .....	38
Tab. č. 2.	Experimentální odparníky pro <i>Ips duplicatus</i> . .....	39
Tab. č. 3.	Komerční odparníky a prázdný odparník jako kontrola. ....	39
Tab. č. 4.	Tabulka rotací odparníků (design Latinského čtverce). .....	40
Tab. č. 5.	Označení testovaných látek, jejich průměrné hodnoty relativního odchyty a směrodatné odchytky. Relativní odchyt byl vztažen k celkovému odchyty. ....	44
Tab. č. 6.	Odlišnost relativního odchyty lýkožrouta severského pro jednotlivé testované látky od nuly, tj. textbook parametrizace negativně binomického modelu. ....	45
Tab. č. 7.	Odlišnost relativního odchyty lýkožrouta severského pro jednotlivé testované látky od blank varianty, tj. treatment kontrasty k negativně binomickému modelu. ....	45
Tab. č. 8.	Průměrný podíl samců lýkožrouta severského odchycený na jednotlivé testované látky a směrodatná odchytky. ....	46
Tab. č. 9.	Odlišnost podílu samců v odchycích lýkožrouta severského pro jednotlivé testované látky vůči blank variantě, tj. treatment kontrasty ke quasipoisonovskému modelu. ....	47
Tab. č. 10.	Úspěšnost determinace pohlaví u samců a samic. ....	48
Tab. č. 11.	Tabulka 3. komerčních odparníků a jejich závislosti na chemickém složení. ...	50
Tab. č. 12.	Porovnání relativních odchyty a směrodatných odchytek u komerčních odparníků. ....	51

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1.	Lýkožrout severský. ....	18
Obr. č. 2.	Mapa rozšíření <i>Ips duplicatus</i> .....	20
Obr. č. 3.	Výskyt lýkožrouta severského dle monitoringu feromonovými lapači .....	20
Obr. č. 4.	Rozmístění kambioxylofágních kůrovců na kmeni smrku .....	23

Obr. č. 5. Typický dvojzub na zadní části krovek <i>Ips duplicatus</i> .....	24
Obr. č. 6. Tykadlová palička <i>Ips duplicatus</i> . .....	24
Obr. č. 7. Chemický vzorec E-myrcenolu a ipsdienolu. ....	29
Obr. č. 8. Plynový chromatogram s hmotnostním detektorem .....	34
Obr. č. 9. Schéma plynového chromatografu.....	35
Obr. č. 10. Princip extrakce analytu na vlákno .....	36
Obr. č. 11. Proces extrakce pomocí HS-SPME. ....	37
Obr. č. 12. Třídění brouků.....	42
Obr. č. 13. Pitvání brouků a lepení na entomologické štítky. ....	42
Obr. č. 14. Vypitvání a nalepení brouci .....	43
Obr. č. 15. Relativní počet (%) odchycených jedinců lýkožrouta severského podle jednotlivých testovaných látek. Bod ve středu svislé úsečky představuje průměr, délka úsečky střední chybu průměru. ....	46
Obr. č. 16. Podíl (%) odchycených samců lýkožrouta severského podle jednotlivých testovaných látek. Bod ve středu svislé úsečky představuje průměr, délka úsečky střední chybu průměru. ....	47
Obr. č. 18. Chromatogram z pohledu první dimenze: Headspace SPME analýzy komerčních feromonových odparníků. ....	49
Obr. č. 19. Dvoudimenzionální chromatogram Headspace SPME analýzy komerčních feromonových odparníků. ....	50

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2D GC (GCxGC) – dvoudimenzionální plynový chromatograf

AP –  $\alpha$ -pinen

At – amitinol

BHT – 2,6. butyl-4-metylfenol

cV – cis-verbenol

DI-SPME – Direct Immersing SPME

EAD – elektroanteno grafická detekce

EM – E-myrcenol

EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organisation

F – feromon

GC – plynový chromatograf

GC×GC-TOFMS – dvoudimenzionální plynový chromatograf a hmotnostní spektrometr s průletovým analyzátozem iontů

GC-MS – plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

GLM – generalized linear model

GLVs – green leaf volatiles

He – helium

HS-SPME – Headspace SPME

Id – ipsdienol

L – limonen

MB – methylbutenol

MS – hmotnostní spektrometr

MSDS – bezpečnostní list

NHV – non-host volatiles

NIST – National institute of standarts and technology library

PDMS – polydimethylsiloxan

RT – retenční čas

SPME – Solid phase microextraction

VLS – vojenské lesy a statky ČR

VVP – vojenský výcvikový prostor

## 1. ÚVOD

Lýkožrouti jsou většinou specializováni jen na jednu dřevinu, která však musí dosahovat určitého věku a dimenzí. Touto dřevinou bývá často smrk. Rostoucí podíl smrku tedy zvyšuje pravděpodobnost napadení lýkožroutem (Jakuš, Blaženec 2015).

Další aspekt, který zvyšuje pravděpodobnost napadení smrkových porostů lýkožrouty je pěstování smrkových lesů v nepřírodných podmínkách, tedy mimo areál jejich přirozeného výskytu, nebo klimatické změny. Častým výskytem sucha totiž dochází ke zhoršení zdravotního stavu lesa, který se poté stává vhodným potravním zdrojem nejen pro kůrovce, ale pro celou řadu dalších fytofágů a mikroorganismů (Mrkva, Kuchařík 2006).

Na našem území ohrožuje smrkové porosty především lýkožrout smrkový (*Ips typographus*), který je pokládán za typického nepřítele smrkového lesa. Tento kůrovec je v místě svého výskytu často doprovázen dalšími druhy jako lýkožroutem menším (*Ips amitinus*) nebo lýkožroutem lesklým (*Pityogenes chalcographus*). V posledních letech je ale věnována velká pozornost ještě jednomu nebezpečnému druhu kůrovce, lýkožroutovi severskému (*Ips duplicatus*) (Mrkva 2016), který je též hlavním tématem této diplomové práce.

Lýkožrout severský je druh kůrovce vyskytující se od střední Skandinávie, přes východní Evropu až po Sibiř. Jeho hostitelskou dřevinou je především smrk ztepilý (*Picea abies*), který napadá nejčastěji ve stáří 40-80 let (Schlyter et al. 1992).

Nejčastěji se vyskytuje v nížinách a pahorkatinách do 600 m.n.m., ale výjimečně se může vyskytovat v horských oblastech nad 1 000 m.n.m. (Grodzki 2003; Holuša, Knížek 2007), kde se přemnožuje především ve smrkových porostech, které jsou pěstovány mimo areál jejich přirozeného výskytu (Grodzki 2003; Duduman 2014).

Obrana proti tomuto kůrovci je značně ztížena, protože stromy v porostu napadá roztroušeně, nevytváří typická kůrovcová ohniska, neosidluje ležící lapáky a během jedné vegetační sezóny je schopen založit až tři generace (Holuša, Knížek 2007).

Lýkožrout severský se většinou objevuje v porostech, které jsou už napadeny lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*). Lýkožrout smrkový obsazuje především spodní až střední část kmene a lýkožrout severský nalétává do koruny stromu, čímž dochází k překrývání těchto druhů (Schlyter et al. 1992).

V případě konkurenčního boje o místo na kmene můžeme lýkožrouta severského nalézt i ve střední části kmene nebo na bazální části kmene (Grodzki 2012).

V situaci, kdy se oba kůrovci vyskytují na jedné dřevině, není lýkožrout severský v porovnání s lýkožroutem smrkovým považován za hlavního škůdce. Přestože se tyto dva druhy vyskytují na hostitelské dřevině zároveň, lapače je potřeba vnadit odparníky s konkrétním složením pro každého lýkožrouta zvlášť, protože agregačním feromonem pro *Ips typographus* je 2-methyl-3-buten-2-ol (MB) a S-cis-verbenol (cV) a pro *Ips duplicatus* ipsdienol (Id) a E-myrcenol (EM) (Bakke 1975; Byers et al. 1990; Schlyter et al. 1992).

Nejhorší situace na našem území, z hlediska výskytu lýkožrouta severského, panuje v oblastech severní Moravy a Slezska, kde dochází dlouhodobě k chřadnutí a odumírání nepůvodních smrkových porostů pěstovaných na nevhodných stanovištích. Rozsáhlé oslabení smrku opakovaným suchem (jako bylo zaznamenáno v letech 2003 a 2015), výskyt václavky smrkové (*Armillaria ostoyae*) nebo nedostatky ve výživě jsou vhodnými podmínkami pro výskyt a gradaci lýkožrouta severského (Holuša et al. 2010; Lubojacký et al. 2017).

To, že se lýkožrout severský intenzivně šíří na území České republiky a stává se častým druhem u nás je způsobeno tím, že je schopen pozitivně reagovat na mírné klima ve střední Evropě. V severním Polsku má například pouze jednu generaci za rok, zatímco v podmínkách střední Evropy má dvě až tři generace za rok (Mrkva 1995; Holuša et al. 2010).

Lýkožrout severský se tedy postupně stává ekonomicky závažným škůdcem, jehož kontrola zůstává nadále velmi komplikovaná (Holuša et al. 2010).



## 2. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce vznikla z podnětu vyvinout účinný feromonový odparník, který by mohl být využit k odchytu a monitoringu lýkožrouta severského ve VVP Libavá. Na tomto území mají dlouhodobý problém s chřadnoucími porosty a výskytem lýkožrouta severského s lýkožroutem smrkovým. Na celém území Moravy je dle Mrkvy (Mrkva 2016) zastoupení lýkožrouta severského vůči lýkožroutu smrkovému vyšší než 50 %, obvykle až 70 %.

Cílem této práce bylo zjistit, jak různé směsi feromonových komponent lákají lýkožrouta severského a také porovnání komerčně dostupných feromonových směsí s nově vyvinutými. Součástí této práce byl také vývoj účinného feromonového odparníku pro lýkožrouta severského.

Po prostudování dostupné literatury se při vývoji účinného feromonového odparníku vycházelo především z výzkumu Byerse, Schlytera, Zhanga a Dudumana (Byers et al. 1990; Schlyter et al. 1992; Zhang et al. 2007; Duduman 2014), jejichž výzkum fungoval. Jako kontrola byly použity tři komerčně dostupné feromonové odparníky běžně používané ve střední Evropě. Použit byl Pheagr-IDU používaný v České republice, ID-Ecolure používaný na Slovensku a odparník používaný v Rumunsku.

Součástí cílů bylo zjistit, jaký počet brouků lýkožrouta severského a lýkožrouta smrkového se do instalovaných lapačů odchytil a také určení pohlaví brouků lýkožrouta severského dle vnějších morfologických znaků.

### 3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

#### 3.1 Popis škůdce

Lýkožrout severský – *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836)



Obr. č. 1. Lýkožrout severský (Beránková 2018).

Taxonomické zařazení

- Třída: hmyz (Insecta)
- Řád: brouci (Coleoptera)
- Čeleď: nosatcovití (Curculionidae)
- Podčeleď: kůrovcovití (Scolytidae)
- Rod: lýkožrout – *Ips* (De Geer, 1775)

Lýkožrout severský je jedním ze šesti zástupců rodu *Ips* u nás a v místě jeho výskytu bývá často doprovázen druhem *Ips amitinus* (Eichhoff, 1871), *Ips typographus* (Linnaeus, 1758) nebo *Pityogenes chalcographus* (Holuša, Knížek 2007).

Jedná se o kambiofága euroasijské smrkové tajgy, ve které je vázán na tamní smrk *Picea obovata*, kde se podílí na generační obměně biomu. Pozvolným napadáním chřadnoucího lesa startuje přirozenou regeneraci stanoviště a další vývoj lesního společenstva (Mrkva 2016).

V Evropě se stal jeho dominantní hostitelskou dřevinou smrk ztepilý (*Picea abies*) a na Sachalinu smrk ajanský (*Picea jezoensis*). Kromě smrků se vyskytuje také na borovicích např. na borovici lesní (*Pinus sylvestris*) nebo borovici sibiřské (*Pinus sibirica*). Vzácně může napadat modřiny rodu *Larix*, jedle rodu *Abies* a jalovce rodu *Juniperus* spp. (Holuša, Knížek 2007).

Nejčastěji napadá 40-80leté smrky, u kterých nalétává buď do koruny stromu, nebo u oslabených stromů na silnější větve (Holuša, Knížek 2007).

Lýkožrout severský se vyvíjí pod kůrou střední a horní části kmene (Pfeffer, Knížek 1995), nicméně pokud se jeho výskyt na hostitelské dřevině překrývá s výskytem jeho konkurenta, lýkožrouta smrkového, obsazuje především horní část kmene (Schlyter et al. 1992), a je považován za druhotného škůdce (Holuša, Knížek 2007).

V případě silného napadení hostitelského stromu oběma druhy lýkožrouta, můžeme v některých případech, z důvodu konkurence o místo na kmeni, nalézt lýkožrouta severského ve střední části nebo dokonce na bazální části kmene (Grodzki 2012).

Ideální příležitostí pro napadení jsou pro něj hynoucí stromy napadené václavkou smrkovou (*Armillaria ostoyae*) nebo oslabené stromy častým suchem (Mrkva, Kuchařík 2006).

Při přemnožení napadá i zdravé stromy. Za příznivého počasí je tento druh schopen během jedné vegetační sezóny založit až tři generace. Obrana a ochrana proti tomuto škůdci je ztížena, protože neosidluje klasické ležící lapáky ani lapáky stojící (Holuša, Knížek 2007), takže pokud by byla zjištěna přítomnost jakýchkoli vývojových stádií na ležících kmenech, pravděpodobně jde o stromy, které musely být napadeny nastojato (Mrkva 1995).

### 3.2 Současný výskyt

Lýkožrout severský se vyskytuje na Sibiři, v Japonsku, v severní Číně, z Evropy pak v Norsku, Švédsku, Finsku, Estonsku a v severním Polsku (Mrkva 1994; Grodzki 2013).

V Evropě je přítomen ve střední a severovýchodní oblasti, kde způsobuje lokální přemnožení především ve smrkových porostech založených na stanovištích mimo jejich původní stanoviště (Duduman 2014).

V naší republice je výskyt lýkožrouta severského zaznamenán téměř na celém území, především v nížinných oblastech a pahorkatinách s nadmořskou výškou do 600 m.n.m. (Holuša, Knížek 2007).

Jeho přítomnost však byla nalezena i v nadmořské výšce nad 1 000 m.n.m., což představuje nové riziko pro smrkové porosty v horách (Holuša et al. 2010).

Přestože je na našem území těžištěm jeho výskytu především Morava, od roku 2005 se lýkožrout severský vyskytuje i na Českomoravské vrchovině a šíří se do severní, jižní i východní části středních Čech (Holuša 2013).

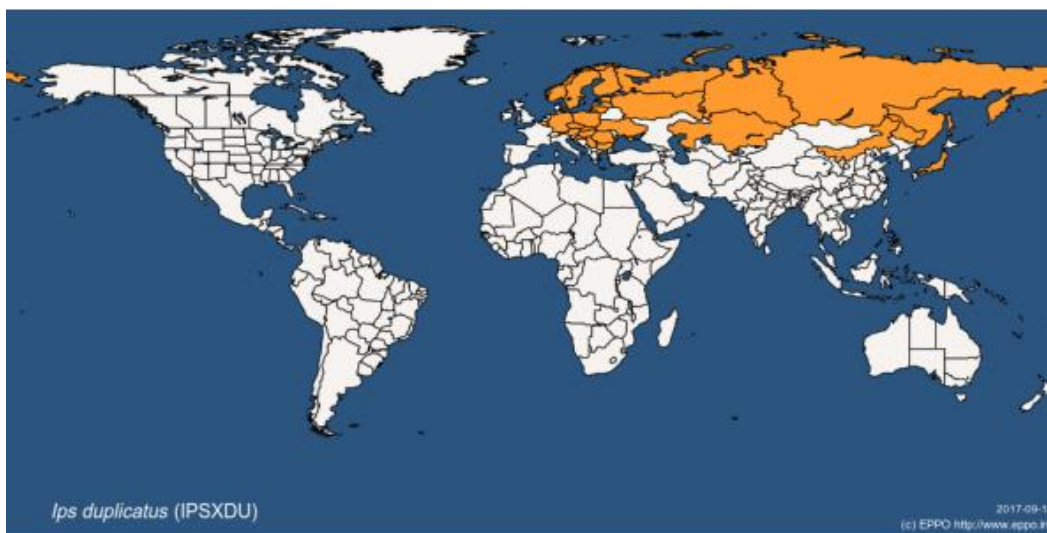
Nicméně podle posledního celostátního monitoringu výskytu lýkožrouta severského, provedeného v roce 2014, zůstává hlavní oblastí jeho výskytu území Moravy a Slezska (Holuša et al. 2016).

Lýkožrout severský je u nás považován za běžného zástupce kůrovců (Mrkva, Kuchařík 2006), a kvůli významnému podílu nahodilých těžeb za jednoho z nejnebezpečnějších druhů kambiofágů (Holuša 2013).

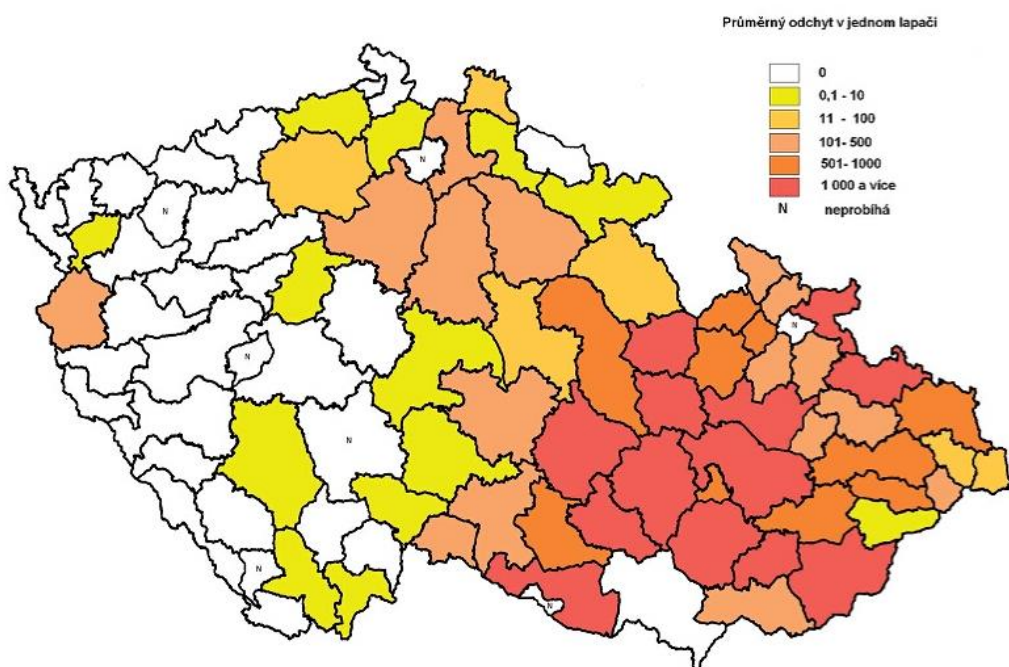
V důsledku nárůstu výskytu tohoto škůdce se podíl úhynu smrků v oblasti severní a střední Moravy odhaduje na 50-60 % (Holuša et al. 2010).

V seznamu EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) je lýkožrout severský uveden a označován za karanténní druh, nicméně také ještě existuje na některých seznamech jako chráněný druh (Holuša et al. 2013).

*Ips duplicatus* se v současnosti nachází na dvou kontinentech, v Evropě a Asii.



Obr. č. 2. Mapa rozšíření *Ips duplicatus* (získané z EPPO Global Database 2018).



Obr. č. 3. Výskyt lýkožrouta severského dle monitoringu feromonovými lapači v roce 2014 (Zpravodaj ochrany lesa, supplementum 2015).

### 3.3 Historie

Když se tento hmyzí škůdce v 70. letech podílel na generační obměně přirozených smrkových společenstev ve Skandinávii, Polsku nebo u nás, nebyl označován za škodlivého kůrovce, protože tyto lesy neměly hospodářský význam (Mrkva 2016).

Hospodářsky významného škůdce z něj vytvořily teprve smrkové porosty, které vznikly ve střední Evropě a v oblasti Slezské uhelné pánve. Těmto smrkovým porostům se na živných stanovištích zprvu dařilo a *Ips duplicatus* zde přežíval téměř nepozorován (Mrkva 1994; Pfeiffer, Knížek 1995).

Problémy nastaly ve třetí generaci těchto smrkových porostů v důsledku klimatických změn a degenerace stanoviště. Pro lýkožrouta severského byly vytvořeny vhodné podmínky pro přemnožení, které následně spustily počátkem 90. let 20. století chronickou gradaci tohoto druhu v celé východní oblasti republiky, resp. na severní Moravě a ve Slezsku (Mrkva 2016).

První údaje o výskytu lýkožrouta severského ve střední Evropě pocházejí ze Slezska. První údaj o jeho přítomnosti na území České republiky pochází z první poloviny 20. stol., konkrétně z Českého Těšína (Holuša et al. 2006; Holuša et al. 2010).

Na Slovensko a do Německa se rozšířil na konci 90. let (Holuša et al. 2010).

V Polsku se lýkožrout severský původně vyskytoval ve smrkových porostech v severovýchodní části, v Bělověžském pralese, a na ostatním území se vyskytoval sporadicky. Z oblasti severovýchodního Polska existují zmínky o lýkožroutovy severském už z padesátých let, kde ale nebyl hlavní příčinou úhynu stromů, protože se zde vyskytoval současně s lýkožroutem smrkovým (Grodzki 2013).

Postupně se z této oblasti začal přesouvat do jižní části smrkových porostů, které byly založeny uměle, což vysvětluje rozšíření tohoto škůdce v České republice právě na severovýchodě území (Holuša 2013).

Další zemí, ve které je lýkožrout severský hlavní příčinou poškození smrkových porostů je Vnitřní Mongolsko v Číně, kde se tento kůrovec pravidelně přemnožuje od roku 1950 (Zhang et al. 2007).

### 3.4 Popis vývojových stádií

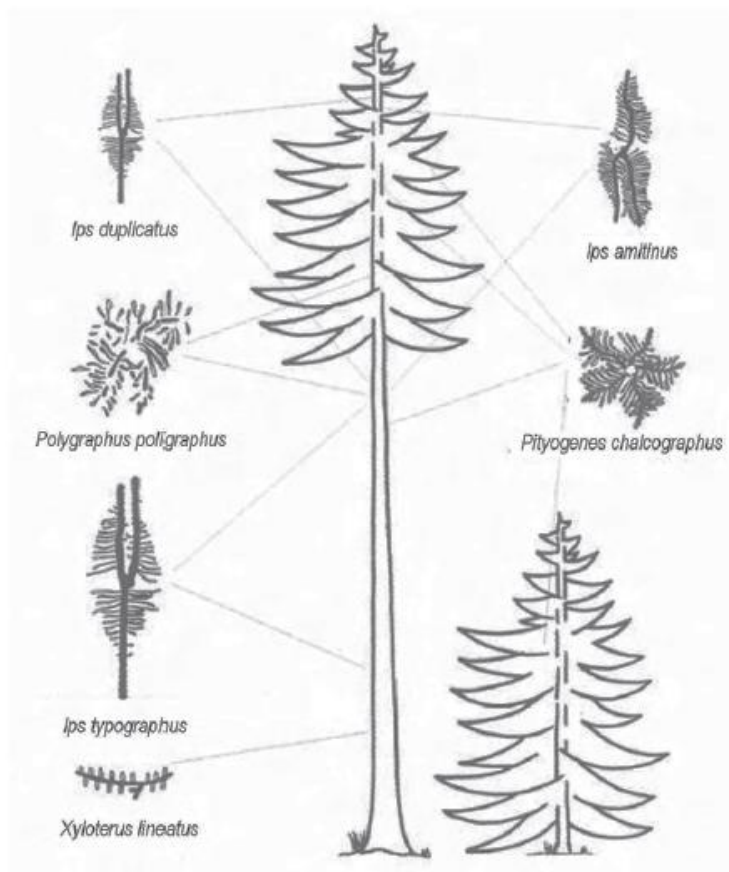
Dospělí brouci jsou hnědočerně až černě zbarvení, lesklí a jejich tělo je pokryto jemnými, dlouhými chloupky. Tvar těla je válcovitý a brouci dosahují velikosti 2,8-4,5 mm. Přední okraj štítu a zadní část krovek je zkosená s lesklou prohlubní. Mezirýží krovek je tečkované a krovky jsou v zadní části opatřeny zoubky. A právě postavení zoubků je,

mimo jiné, jedním z nejspolehlivějších znaků, podle něhož lze lýkožrouta severského odlišit od jiných lýkožroutů rodu *Ips*, kterými jsou především lýkožrout smrkový a lýkožrout menší, s nimiž vytváří synuzii kambiofágů smrku (Obr. č. 4). Dalšími rozpoznávacími znaky jsou velikost těla, zbarvení, lesk/matnost, zprohýbané švy na tykadlové paličce či zkosené části krovek. U lýkožrouta severského vyčnívají po okraji krovek čtyři páry zoubků. První je označován jako saturální pár a je od ostatních vzdálenější. Typický dvojzub je utvořen z 2. a 3. zubu a vzdálenost mezi nimi je vždy menší, než vzdálenost mezi saturálním a druhým zubem. U samečka je třetí pár zubů na tzv. dvojzubu největší a před vrcholem rozšířený, čtvrtý pár opět malý. U samičky nejsou zuby třetího páru rozšířené, ale kuželovitě se zužují (Mrkva 1994; Holuša, Knížek 2007).

Vajíčka jsou bílá, lesklá, oválná a cca 0,7 mm dlouhá. Larvy jsou též bílé, rohlíčkovitě zahnuté s hnědou, silně chitizovanou hlavou a v posledním instaru měří 4,5-5,5 mm. Kukly jsou volné, bílé, na konci zadečku jsou patrné dva krátké trny a měří 5 mm (Mrkva 1994).

Požerak tohoto kůrovce bývá hvězdicovitý, většinou dvou až tříramenný. Uprostřed požerku se nachází závrtový otvor a snubní komůrka, ze které vybíhají matečné chodby. Jejich délka je kolem 4-6 cm, maximálně 10 cm, s několika nepravidelně rozmístěnými větracími otvory vedoucími až na povrch borky. (Holuša, Knížek 2007).

Od požerku lýkožrouta smrkového se liší menší velikostí (Nunberg 1981).



**Obr. č. 4.** Rozmístění kambioxylofágních kůrovců na kmeni smrku (Knížek, Zahradník 2004).

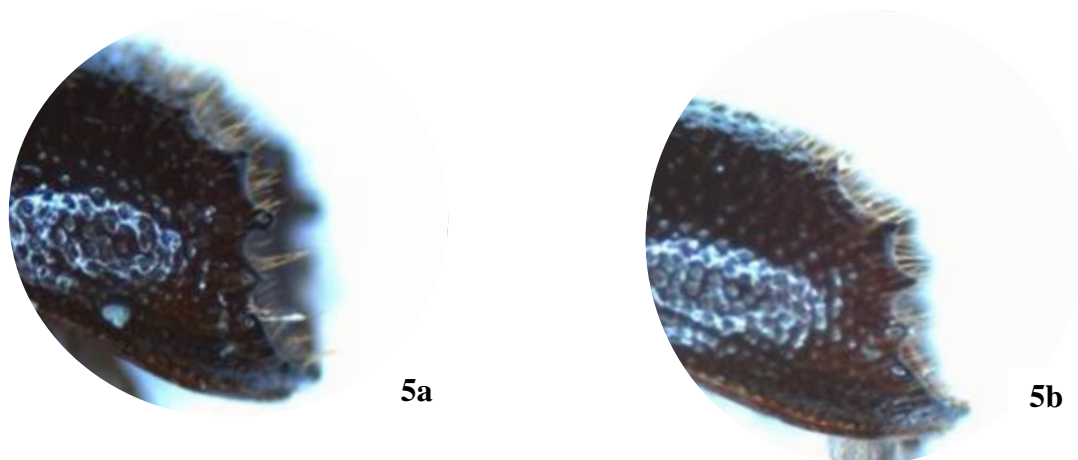
### 3.5 Rozlišení pohlaví

Prvním charakteristickým sexuálním znakem při rozlišování pohlaví u lýkožrouta je velikost a tvar zubů na krovkách, především pak třetího elytrálního zubu. Dalším znakem mohou být velikost těla, tvar čela, které může být s hrbolkem, ochlupení, barva, tvar tykadél atd.

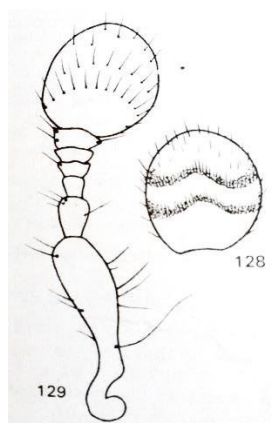
V méj díplomové práci bylo využito poznatků pana profesora Nunberga (Nunberg 1981), který se jako jediný zatím věnoval rozlišovacím znakům u lýkožrouta severského. Zaznamenal, že vzdálenost mezi prvním a druhým zoubkem na krovkách je větší než vzdálenost mezi druhým a třetím zoubkem. U samečka se třetí zoubek zvětšuje, zesiluje (Obr. č. 5a). U samičky je třetí zoubek kuželovitý (Obr. č. 5b). Přední okraj štítu a zadní část krovek je zkosená s lesklou prohlubní a mezirýží krovek je tečkované. Na vnitřní straně tykadlové paličky se uprostřed nachází dva zprohýbané švy (Obr. č. 6-129). Na vnější straně jsou patrné dvě řady štětín (Obr. č. 6-128).

Při laboratorním chovu těchto brouků pro účely chemicko-ekologického výzkumu, jako je např. geneze feromonu, elektroantenografická recepce na tykadle, či eseje

s výzkumem chování v laboratorních podmínkách, je velice důležité umět rozlišit pohlaví u živých jedinců, aby bylo možné zjistit, jak které pohlaví reaguje.



**Obr. č. 5.** Typický dvojzub na zadní části krovek *Ips duplicatus* (vlevo samec, vpravo samice).



**Obr. č. 6.** Tykadlová palička *Ips duplicatus*.

### **3.6 Způsob života**

Jarní rojení začíná většinou na začátku května, ale za příznivého počasí, kdy je sucho a teplo, začíná i dříve (Holuša et al. 2003), a je mnohem rychlejší než u lýkožrouta smrkového (Holuša et al. 2013).

Z výzkumu Holuši (Holuša et al. 2013) bylo zjištěno, že počet brouků odchycených do feromonových lapačů na jaře (duben až červen) byl výrazně vyšší než počet brouků odchycených v létě (červenec až srpen).



Jako první nalétává na strom sameček, který vyhlodá závrtový otvor a snubní komůrku a láká samičky a další samce, kteří spolu s ním strom obsadí, pomocí agregačního feromonu. Agregační feromon je tvořen oxidovanými monoterpeny ipsdienolem a E-myrcenolem (Bakke 1975; Byers et al. 1990).

Ve snubní komůrce se samec spáří se 2-3 samicemi. Oplodněné samičky poté vyhlodávají matečné chodby, do kterých kladou svá vajíčka, cca 40-50 ks. Po jednom až dvou týdnech se z vajíček vylíhnou larvy. Jejich vývoj trvá zhruba 2-4 týdny a po dokončení vývoje se kuklí na konci svých chodeb. Vylíhlí mladí brouci prodělávají ještě dvoutýdenní zralostní žír, během kterého pohlavně dozrávají (Holuša, Knížek 2007).

Celý vývoj od založení požerku po ukončení vývoje trvá 4-8 týdnů (Mrkva 1995).

Letní rojení brouků 2. generace probíhá od poloviny července, a za velmi příznivého počasí zakládají brouci třetí generaci s dobou rojení v srpnu-září. Z Holuši výzkumu (Holuša et al. 2003) z roku 2000 se zjistilo, že při srovnání průběhu letových aktivit lýkožrouta smrkového a lýkožrouta severského nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v celkových odchycích, což znamená, že vývoj obou druhů je shodný.

Z výzkumu Chena (Chen et al. 2010) vyplývá, že letovou aktivitu lýkožrouta severského můžeme rozdělit do tří hlavních „píků“, které jsou na začátku června, na přelomu června a července a na konci července.

Tento druh kůrovce zakládá i tzv. „sesterskou“ generaci. U lýkožrouta severského přezimují všechna vývojová stadia kromě vajíčka. Dospělci zimují nejčastěji v hrabance (Holuša, Knížek 2007).

Lýkožrout severský je druhem výrazně ekologicky adaptovaným na severské poměry. Už při teplotě kolem 10 °C dochází k tvorbě vajíček (Mrkva 1995).

Při vyšších teplotách je dokonce schopen ještě více urychlit vývoj než lýkožrout smrkový, ale při poklesu teploty na 10-15 °C je další generační vývoj zabrzděn. Díky tomuto chování je jeho výskyt v evropské části areálu limitován (Mrkva 2016).

Podle většiny autorů má lýkožrout severský pouze 1 generaci v tajze a v severním Polsku, zatímco v našich podmínkách má zpravidla 2-3 generace do roka, ale za velmi suchého a teplého počasí může mít až 4 generace (Mrkva 1994).

### **3.7 Přirození nepřátelé**

Obecně se uvádí, že na populace kůrovců mají nejvýznamnější vliv hmyzí predátoři a parazitoidi v porostech s absencí lesnického managementu. Po odkornění napadeného stromu jsou larvy a kukly kůrovce potravou pro mravence, vosy, dravé brouky nebo ptáky, zejména datlovitě. Mezi skupiny, které jsou na kůrovce přímo potravně specializované,

řadíme brouky čeledi pestrokrovečnickovité (*Cleridae*), drabčíkovité (*Staphylinidae*) nebo dvoukřídly hmyz (*Dolichopodidae* a *Lonchaeidae*). Predátoři svou kořist vyhledávají pomocí kairomonů, což je látka, kterou produkují kůrovci jako svůj feromon, nebo pomocí těkavých látek vylučovaných napadenými dřevinami. Významnými predátory kůrovců na smrku jsou pestrokrovečník mravenčí (*Thanasimus formicarius*) a pestrokrovečník (*Thanasimus femoralis*), jejichž čichové receptory na tykadlech silně reagují na ipsdienol, ipsenol a na agregační feromony kůrovců. Obecně se odhaduje, že jedna larva pestrokrovečníka zkonzumuje 44-57 larev kůrovců (Jakuš, Blaženec 2015).

Z parazitoidů jsou to blanokřídly, jako např. lumčici (*Braconidae*), chalcidky (*Chalcidoidea*) a lumkovité (*Ichneumonidae*). Z cizopasníků jsou to roztoči a hlístice. V neposlední řadě jsou lýkožrouti ovlivňováni entomopatogenními houbami a jinými organismy (Holuša, Knížek 2007).

Zvláštním případem houbových entomopatogenů je druhově specifická mikrosporidie (*Larssoniella duplicati*) u druhu *Ips duplicatus*. Tento patogen je unikátní svou vysokou infekční hladinou ve všech zkoumaných populacích, protože na některých lokalitách dosahuje až 80 % (Jakuš, Blaženec 2015).

### 3.8 Kontrola

Kontrolu porostů je nutné provádět ve všech smrkových porostech starších 40 let se zastoupením smrku nad 20 %. Provádí se buď okulárně nebo pomocí lapačů. Okulární kontrola se provádí přímo uvnitř porostu, ale je velice obtížná, protože brouci lýkožrouta severského napadají horní část koruny stromu, což znemožňuje zjištění závrťových otvorů a drtinek na kořenových náběžích. Napadení můžeme zjistit i podle barevných změn koruny stromu, jenomže při napadení zdravých stromů se barevné změny projevují většinou pozdě, tedy v době, kdy jsou brouci před vylétnutím anebo už vylétli. Velice často se ale stává, že barevné změny se neprojeví vůbec, a tak zbývá kontrola kůry, která při napadení stromu opadá (Knížek, Zahradník 2004).

Vhodným nástrojem pro monitoring lýkožrouta severského jsou feromonové lapače s použitím feromonových odparníků obsahující účinné látky E-myrcenol a ipsdienol. Doporučuje se umístit alespoň 1 lapač na 5 ha ohrožených porostů a to alespoň 14 dní před předpokládaným rojením (Jakuš, Blaženec 2015).

Důležité je také po celý rok vyhledávat, evidovat, a především včas odstraňovat kůrovcové stromy, odumírající stojící dříví, těžební odpad, polomy a zlomy ještě před začátkem rojení lýkožrouta severského, nejlépe tedy do 31. března (Holuša, Knížek 2007).

### 3.9 Obranná opatření

Nejúčinnější obranou proti lýkožroutovi severskému je včasná asanace veškerého napadeného dříví před výletem brouků nové generace. Bohužel lýkožrout severský napadá většinou stromy uvnitř porostu, takže jejich nalezení a následné vyznačení je mnohem obtížnější. Asanaci můžeme provádět buď mechanicky, nebo chemicky. Mechanická asanace se provádí po celý rok odkorňováním a štěpkováním. Pro chemickou asanaci mohou být používány pouze schválené přípravky uvedené v Seznamu povolených přípravků na ochranu rostlin nebo uvedené v Seznamu povolených přípravků na ochranu lesa (Holuša, Knížek 2007).

Další obranou proti lýkožroutovi severskému je používání otrávených lapáků a feromonových lapačů. Přestože lýkožrout severský ležící lapáky neosidluje, v kombinaci s feromonovým odparníkem je lze využít jako jedno z obranných opatření (Knížek, Zahradník 2004).

#### 3.9.1 Lapáky

Klasický lapák, tedy pokácený, odvětvový zdravý strom, nejčastěji smrk, zakrytý po celé délce větvemi je bohužel pro *Ips duplicatus* neatraktivní a nepoužitelný (Jakuš, Blaženec 2015).

Další možností kontroly lýkožrouta severského jsou otrávené lapáky opatřené feromonovými návnadami a ošetřené insekticidními postřiky, takzvané trojnožky. Ty jsou sestaveny z čerstvých kmenů a jsou ošetřeny po celém povrchu insekticidem. Pod vrcholem trojnožky je zavěšena feromonová návnada. Nicméně z výzkumu Holuši (Holuša 2013), ve kterém byl porovnán odchyt brouků v trojnožkách a ve feromonových lapačích typu Theysohn vyplývá, že pomocí lapačů byl odchycen dvojnásobek až trojnásobek počtu brouků oproti trojnožkám.

#### 3.9.2 Lapače

Feromonové lapače jsou syntetickou napodobeninou oslabených stromů napadnutých lýkožrouty a slouží k odchytu podkorního hmyzu nalákaného feromonem z feromonových odparníků. Nevýhodou při odchytu brouků je, že dochází k rychlému naplnění sběrných nádob, čímž se vytváří odpudivý efekt a populace se přesouvá na okolní stromy (Jakuš, Blaženec 2015).

Pro odchyt *Ips duplicatus* se v současnosti používají pouze dva druhy feromonových odparníků, Pheagr-IDU (SciTech Česko) a ID-Ecolure (Fytofarm Slovensko) (Holuša et al. 2010a).

Výše zmíněné feromonové odparníky použil ve svém pokusu porovnávání množství odchytů *Ips duplicatus* v České republice a v Polsku i Holuša (Holuša et al. 2010). Složení těchto odparníků bylo následující: ID-Ecolure - ipsdienol (Id) 1,6%, tj. (4S)-2-methyl-6-methylen-2,7-oktadien-4-ol, synergickou složkou byl E-myrcenol (EM), smrková pryskyřice a etanol. Složení Pheagr-IDU bylo: syntetická směs 2-methyl-3-buten-2-ol (MB), 31,30 g/kg ipsdienolu (Id) a 3,13 g/kg E-myrcenolu (EM) stabilizovaného 2,6-diterc.butyl-4-methylfenolu. Výsledky ukázaly, že ID-Ecolure byl při odchytu brouků lýkožrouta severského účinnější než odparník Pheagr-IDU nebo odparník Duplodor používaný v Polsku, což svědčí o vhodnějším složení a poměru jednotlivých složek.

Chen provedl v Číně experiment (Chen et al. 2010), jehož cílem bylo zjistit, které lapače jsou efektivní pro maximální odchyt lýkožrouta severského. Ukázalo se, že na odchyt brouků lýkožrouta severského měla výrazný vliv barva lapačů. Tmavá barva lapačů (černá a červená) byla účinnější než světlá barva lapačů (žlutá a bílá). Dále se zjistilo, že lapače, které byly instalovány do výšky 1,5-2 m nachytaly mnohem více brouků lýkožrouta severského než lapače instalované do výšky 0-0,5 m a 3,5-4 m.

Lapáky a feromonové lapače proti lýkožroutovi severskému instalujeme na nejvíce ohrožená místa alespoň 14 dní před předpokládaným rojením, tedy v březnu až dubnu, a to minimálně 1 lapák nebo feromonový lapač na 5 ha ohrožených porostů. Počet lapačů stanovujeme pro jarní období podle kalamitního základu, který se rovná 1/8 objemu včas zpracovaného kůrovcového dříví, a k tomu se na každý opuštěný nebo částečně opuštěný strom přidá 1-2 odchytové zařízení. Počet lapačů pro letní rojení vychází ze stupně odchytu v jarním rojení. Při slabém stupni odchytu mohou být lapače přesunuty na vhodnější lokalitu nebo zrušeny. Při středním stupni odchytu zůstává počet lapačů stejný a při silném stupni odchytu zvyšujeme počet lapačů. Provádění kontroly se doporučuje v intervalu 7-10 dnů, popř. častěji (Knížek, Zahradník 2004).

Stupeň odchytu dle (Knížek, Zahradník 2004):

v lapačích

- slabý (do 300 ks)                      základní stav
- střední (300-1 000 ks)                zvýšený stav
- silný (nad 1 000 ks)                  kalamitní stav

napadení lapáků

- < 0,5 závrtu na 1dm<sup>2</sup>              základní stav

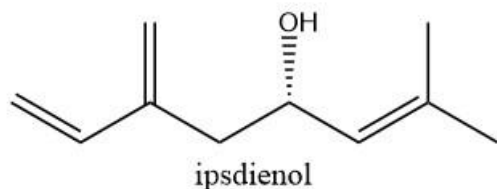
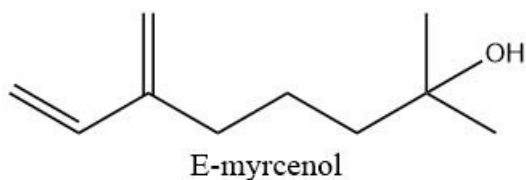
- 0,5-1 závrt na 1dm<sup>2</sup>                      zvýšený stav
- > 1 závrt na 1dm<sup>2</sup>                      kalamitní stav

Při vysokých odchycích platí, za použití kalibrované nádoby, že 1 ml odpovídá 88 lýkožroutům severským (Jakuš, Blaženec 2015).

### 3.10 Feromonové směsi

První účinná látka lýkožrouta severského byla objevena v roce 1975 v Norsku a identifikována jako ipsdienol (Id) (2-methyl-6-methylen-2,7-oktadien-4-ol). Tato látka patří i do feromonového komplexu látek produkovaných lýkožroutem smrkovým (Bakke 1975).

Druhá látka lýkožrouta severského byla objevena v roce 1990 ve Švédsku a byla identifikována jako E-myrcenol (EM) (2-methyl-6-methylen-2,7-oktadien-1-ol) (Byers et al. 1990).



**Obr. č. 7.** Chemický vzorec E-myrcenolu a ipsdienolu.

Přírodní agregační feromon lýkožrouta severského se tedy skládá ze dvou složek, ipsdienolu a E-myrcenolu (Bakke 1975; Byers et al. 1990; Schlyter et al. 1992).

Ipsdienol je hlavní složkou, která láká dospělé a E-myrcenol přispívá k atraktivitě Id (Byers et al. 1990).

Tento druh, stejně jako ostatní zástupci rodu *Ips*, uvolňuje při nálezů vhodného stromu feromon (Byers et al. 1990).

Feromon je produkován pionýrskými samci a přitahuje samice a další samce na hostitelský strom (Ivarsson et al. 1993).

Lýkožrout severský se často vyskytuje na stromech současně s lýkožroutem smrkovým, a protože bylo zjištěno, že komerční pasti pro lýkožrouta smrkového, které obsahují ipsdienol, cis-verbenol (cV) a methylbutenol (MB), jsou zajímavé i pro

lýkožrouta severského, Byers testoval (Byers et al. 1990), zda poslední dvě složky jsou nějak podstatné i pro *Ips duplicatus*, a zda je ipsdienol samotný odpovědný za agregaci. Laboratorní testy však ukázaly, že cV ani MB nemají podstatný význam. Bylo však zjištěno, že základní složkou feromonu pro *Ips duplicatus* jsou ipsdienol a E-myrcenol, a E-myrcenol byl dokonce pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) identifikován jako hlavní nepostradatelná složka.

Předchozí výsledky podpořil Schlyter (Schlyter et al. 1992), když při svých testech zjistil, že hlavní feromonová složka pro *Ips duplicatus* je ipsdienol a E-myrcenol, a podle něj tvoří kombinace Id+EM úplnou feromonovou směs *Ips duplicatus*. Poměr se ovšem liší mezi lýkožrouty severskými odchycenými v Evropě a v Asii.

Při chemicko-ekologickém výzkumu spolužití lýkožrouta severského a smrkového byla vyslovena teorie, proč je lýkožrout severský přitahován do pastí pro lýkožrouta smrkového. Lýkožrout smrkový při napadení stromu vypouští agregační feromon skládající se z MB+cV, kterým láká samičku. Po náletu samičky začne produkovat malé množství ipsdienolu, což může přitahovat lýkožrouta severského na už obsazený strom (Schlyter et al. 1992). Dále Schlyter (Schlyter et al. 1992) poukázal na to, že pokud je *Ips duplicatus* vystaven výparům myrcenu, že tento hostitelský monoterpenový uhlovodík může sloužit jako prekurzor jeho feromonové složky ipsdienolu.

V oblasti Vnitřního Mongolska byly Zhangem (Zhang et al. 2007) analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), plynové chromatografie a elektroantenografické detekce (GC-EAD) a biologickými zkouškami těkavé látky ze střev samců *Ips duplicatus* a aerační vzorky ze smrkového dřeva. Výsledky GC-MS analýzy ukázaly, že samci, kteří se nacházejí ve snubní komůrce, produkují ve střevech za účelem reprodukce těkavé látky, které jsou podobné těm, které jsou vylučovány samci při úživném žíru. Hlavními složkami této směsi jsou známé agregační feromonové složky, Id a EM, doprovázené několika menšími složkami, kterými jsou MB, cV, verbenon, myrtenol, atd.

Další experimenty, které provedl Zhang (Zhang et al. 2007) pomocí elektroantenografické detekce (EAD) ukázaly, že tykadla obou pohlaví silně reagovala jak na známé agregační feromonové složky, Id a EM, tak i na další, minoritně zastoupené složky. Nejsilnější odpověď tykadla byla vyvolána hlavní feromonovou složkou Id, která byla dokonce 2-3krát větší než hodnota vyvolaná druhou složkou, EM. Dále byla pomocí EAD nalezena silná a opakovaná reakce na stopovou sloučeninu, která byla identifikována jako amitinol (At), což je feromonová složka, která byla poprvé objevena u *Ips amitinus* (Eichhoff). Amitinol byl tedy testován s Id a EM v různých kombinacích, které ukázaly, že

samotný Id, EM, At a dvě směsi Id+At a EM+At byly neúčinné nebo odchytily malé množství brouků, ale přidáním At k základní směsi agregačního feromonu lýkožrouta severského Id+EM (1:1), která sama o sobě je atraktivní, se výrazně zvýšil odchyt v pastích až o 47 %. Ke zvýšení ale došlo pouze při nízké rychlosti uvolňování amitinolu Id:EM:At (1:1:0,1). Při vysoké rychlosti uvolňování amitinolu Id:EM:At (1:1:1) neměl At žádný vliv na odchyt. Vědci se tedy domnívají, že At může být součástí komponent agregačního feromonového systému u čínského lýkožrouta severského. Poměr hlavních složek agregačního feromonu EM:Id byl stanoven jako 1:4. Analýzou GC a EAD byla také zjištěna slabá odezva na několik monoterpenů, např.  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene, atd. Při porovnání poměru EM:Id evropské populace lýkožrouta severského (1:9) s populací ve Vnitřním Mongolsku (1:4), poměr EM:Id ve Vnitřním Mongolsku je dvakrát vyšší (Schlyter et al. 1992), což dobře koresponduje s tím, že čínská populace nejen že produkuje, ale také preferuje vyšší poměr EM v binární směsi než evropská populace (Zhang et al. 2007).

*Ips duplicatus* spoléhá při prostorové orientaci na speciální čichové signály, které mu pomáhají identifikovat vhodný strom ke kolonizaci a také ty stromy, které už kolonizované jsou. Těmito signály mohou být feromony a kairomony (Duduman 2014).

Spektrum a množství těkavých látek uvolňovaných hostiteli (terpeny a alkoholy) mají zvláštní význam pro brouky při hledání nových hostitelských stromů. Toto bylo již prokázáno u *Ips typographus*, kde monoterpeny uvolňované ze smrku byly významným signálem pro brouky před kolonizací nových stromů (Duduman et al. 2012), zatímco agregační feromony hrají významnou roli při vábení hmyzu na hostitelský strom (Duduman 2014).

Podle Dudumana (Duduman 2014) volatilní látky, které uvolňují pokácené stromy uložené do hromad, stimulují čichové signály *Ips duplicatus* k orientaci brouků na lokalitu s velkým množstvím čerstvě uloženého klestu. Z dosud provedených pokusů u lýkožrouta smrkového vyplývá, že do feromonových pastí, které jsou umístěny blízko hromad s čerstvým klestem, se nachytá větší množství brouků než na místech, kde hromady nejsou, protože reakce dospělců tohoto lýkožrouta na agregační feromon je silně ovlivněna přítomností  $\alpha$ -pinenu (AP) a limonenu (L). Tyto monoterpeny mohou mít dokonce synergický efekt na atraktivitu feromonu. Na základě toho provedl Duduman (Duduman 2014) terénní experimenty za účelem vyhodnocení odpovědi *Ips duplicatus* k rozdílné kombinaci syntetického feromonu s monoterpeny AP a L. Přidáním AP k feromonu (F) v poměru F:AP 1:40 zaznamenal výrazné zvýšení odchyty brouků *Ips duplicatus* (z 36,3 na 47,8 %). Zvýšení poměru na 1:200 pak vedlo ke snížení intenzity odpovědi. Přidání L

k feromonu v různých poměrech nezměnilo reakci brouků na feromon. Přidání AP a L k feromonové směsi v poměru F:AP:L 1:40:40, 1:200:200 a 1:1000:1000 mělo za následek výrazné zvýšení odchytu (z 61,6 na 254,1 %). Vycházelo se z toho, že základ byl stanoven jako 100 %. Výsledky tedy ukázaly, že při kombinaci F+AP+L se odchytilo výrazně větší množství brouků, než když byla použita každá složka jednotlivě, přičemž záleží na kombinaci monoterpenů s feromonem.

### **Teorie vyhledávání hostitelského stromu**

Vědci zastávají dvě teorie, podle kterých pionýrstí samci lýkožrouta severského vyhledávají vhodný hostitelský strom.

1. teorie (aktivní teorie) říká, že oslabené, poškozené a nemocné stromy vylučují tzv. primární atraktanty, především etanol a monoterpeny, které lákají lýkožrouta severského. Ten je schopen tyto stromy vyhledat na vzdálenost několika metrů.
2. teorie (teorie náhodného přistání) říká, že brouci letí v roji a náhodně narazí na vhodný hostitelský strom (jehličnan), na kterém následně přistanou a otestují ho, zda je pro ně vhodný. Pouze ty stromy, které jsou zdravé a vyživené se dokáží svými obrannými mechanismy ubránit útokům brouků (Byers 1995).

Odolnost stromu vůči náletu podkorního hmyzu mohou omezit tyto faktory: sucho, silný vítr, požár, patogenní organismy, čerstvé porostní stěny, náhlé oslňení stromů po těžebním zásahu nebo věk. Při poruchách metabolismu stromu jsou vylučovány látky, které působí na lýkožrouty, dle jedné z teorií, jako primární atraktant. Takto působí i zlomy, vývraty, lapáky a čerstvě pokácené stromy (Jakuš, Blaženec 2015).

Dle první teorie, vhodného hostitele pro rozmnožování, vyhledává lýkožrout severský strom pomocí stromem uvolňovaných primárních atraktantů, především monoterpenů. Monoterpeny neslouží jen k vystopování vhodné hostitelské dřeviny a k jejímu prvotnímu obsazení, ale jsou zároveň prekurzory v syntéze sekundárních atraktantů – pohlavních agregačních feromonů. Pro *Ips duplicatus* je podstatný myrcene, který je prekurzorem ipsdienolu a ipsenolu (Jakuš, Blaženec 2015).

Ve chvíli, kdy je strom obsazený, začne lýkožrout nebo symbiotické organismy produkovat jinou látku, tzv. stop feromon. U *Ips typographus* je tímto stop feromonem verbenone, a je možné, že ho využívá i *Ips duplicatus* (Jirošová, ústní sdělení).

Při výběru hostitele se uplatňují pro lýkožrouta i repelentní (odpužující) těkavé látky uvolňované stromy, které jsou ve větším množství přítomné v ne-hostitelských krytosemenných rostlinách (non-host volatiles NHV), jako jsou těkavé látky z listů (green



leaf volatiles GLVs). Také kůra obsahuje inhibitory feromonů. Závrtem brouka se spustí obranné mechanismy smrku, který začne uvolňovat a produkovat pryskyřici. Monoterpeny obsažené v pryskyřici jsou lýkožroutem severským hydroxylované na alkoholy a tvoří agregační feromon, směs Id a EM, který způsobuje agregaci obou pohlaví. Zároveň se ale jedná také o sexuální feromon (Jakuš, Blaženec 2015).

### **3.11 GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry)**

#### **3.11.1 Plynová chromatografie (GC)**

Plynová chromatografie (GC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) je v současnosti běžnou analytickou metodou. Výhodami této techniky jsou jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebného k analýze (Sýkora 2011).

GC je fyzikálně chemická separační metoda, která slouží k separaci a stanovení plynů, kapalin a pevných látek s bodem varu do 400 °C (Poole 2012).

Plynový chromatograf se skládá z regulátoru tlaku a průtoku, injektoru, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Metoda je založena na rozdělování složek do dvou fází, fáze pohyblivé – mobilní a fáze nepohyblivé – stacionární. Mobilní fází je plyn nazývaný nosný plyn, který zajišťuje transport analytu kolonou až k detektoru. Nejčastěji používanými plyny jsou dusík, vodík, helium a argon. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. U kapilární kolony je stacionární fáze nesena v tenké vrstvě přímo na vnitřní stěnu křemenné kapiláry (Sýkora 2011).

Princip separace látek GC: Kolonou se stacionární fází prochází neustále nosný plyn. Vzorek se nastříkne do nástřikové komory (injektoru), kde se odpaří, a ve formě par je poté unášen nosným plynem do kolony. V koloně probíhá separace složek. Složky ze vzorku se na začátku kolony sorbují ve stacionární fází, a poté se desorbují nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony, dělicí proces se neustále opakuje. Každá složka ze vzorku postupuje kolonou svou vlastní rychlostí. Látky se separují a postupně vycházejí z kolony a vstupují do detektoru, který indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Výsledným záznamem závislosti signálu detektoru a času je chromatogram. Chromatogram obsahuje křivky – píky, kde plocha píku je úměrná množství látky ve vzorku (Zachář, Sýkora 2008).

#### **3.11.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)**

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Je to velmi účinná

identifikační technika používaná k identifikaci látek v organické chemii, biochemii, při analýze anorganických materiálů a povrchů tuhých látek. Hmotnostní spektrometr se skládá ze vstupu, iontového zdroje, analyzátoru, detektoru a z vakuového systému (Sýkora 2011).

Do hmotnostního spektrometru se zavádí vzorek vstupem, při spojení s GC se používá tzv. chromatografický vstup. V iontovém zdroji dojde k nevratnému odštěpení valenčních elektronů a za vysoce energetické ionizace se molekuly rozpadají na fragmenty. V analyzátoru se poté ionty dělí na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). K časovému rozdělení iontů podle  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Těžší ionty se pohybují pomaleji než lehčí ionty, a proto doráží do detektoru později (Sýkora 2011).

Výstupem z hmotnostního spektrometru, připojenému jako detektor za separační krom plynové chromatografie, je hmotnostní spektrum, které je pro jednotlivé látky charakteristické. Identita látek se pak zjišťuje srovnáním spekter s knihovnami nebo jejich evaluací.

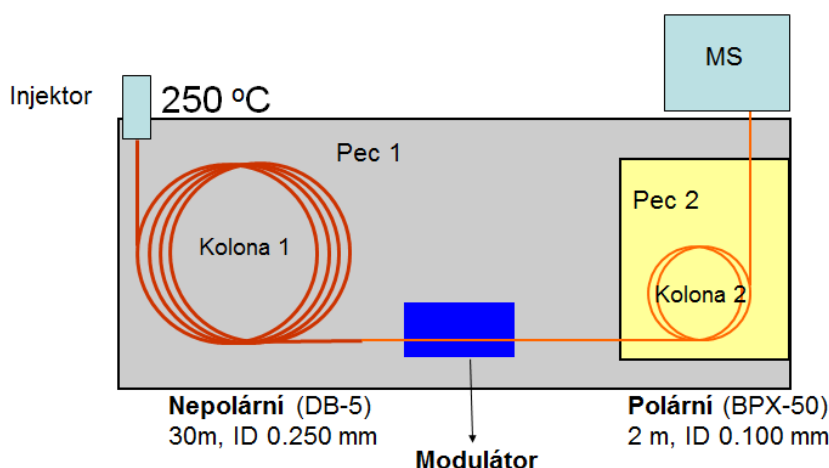


**Obr. č. 8.** Plynový chromatogram s hmotnostním detektorem (Beránková 2018).

### **3.11.3 Dvoudimenzionální plynová chromatografie (GCxGC)**

Tato metoda na rozdíl od 1D plynového chromatografu (GC) obsahuje dvě kolony, které jsou spojeny modulátorem. Po nastříknutí vzorku do nástříkové komory, injektoru, jsou těkavé látky ve formě par unášeny horkým vzduchem do první kolony. Pomocí

modulátoru, který funguje na principu periodického zamrazování a ohřívání, jsou látky z první kolony znovu dávkovány v pravidelném intervalu na druhou krátkou kolonu, ve které dochází k separaci látek na jiném separačním principu. Látky dále postupují do detektoru. Výsledkem je 2D chromatogram, na jehož ose x je zaznamenán retenční čas (RT) pro kolonu v první dimenzi (30 m), a na ose y je RT látek na koloně ve druhé dimenzi (2 m). Jeli-li systém spojen s hmotnostním spektrometrem, mohou být jednotlivé látky v 2D záznamu identifikovány dle hmotnostního spektra. Na rozdíl od 1D GC jsme schopni dosáhnout lepší separace jednotlivých látek, které by se na 1D systému neseperoaly, a tyto látky identifikovat a určit jejich množství (Leco.com 2014).



**Obr. č. 9.** Schéma plynového chromatografu (Leco 2012).

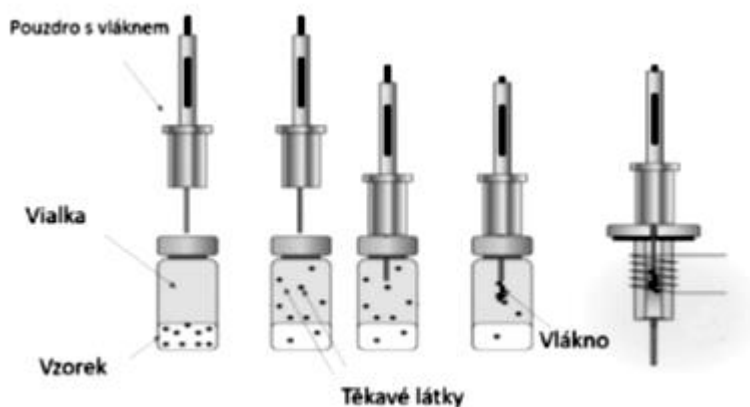
### 3.11.4 Mikroextrakce na pevnou fázi (SPME)

Solid Phase Microextraction (SPME) je metoda, která se používá k přípravě vzorků pro analýzu plynovou chromatografií. Tato metoda výrazně zkracuje čas, který je potřeba pro přípravu vzorků, protože vlákna jsou ekonomická, můžeme je opakovaně použít (průměrně až 50 extrakcí jedním vláknem) a univerzální pro jakýkoliv typ plynového či kapalinového chromatografu. Výhodou této metody je, že při odebrání vzorku není třeba přidávat rozpouštědla. Hlavní součástí SPME je vlákno, které je potaženo polymerním materiálem, na které se adsorbují sledované analyty (Krykorková, Čapoun 2008).

Toto křemenné vlákno je 1 cm dlouhé, nachází se uvnitř kovové jehly a je pokryté stacionární fází. Jehla vlákno chrání před mechanickým poškozením a také slouží k propíchnutí septa v zátce vialky, ve které se nachází matrice (Charvátová 2011).

Složky vzorku jsou na vlákno buď absorbovány (polymerní vrstva) nebo adsorbovány (vrstva pevné fáze). Vložení vlákna do plynového chromatografu jsou tyto složky následně desorbovány (Krykorková, Čapoun 2008).

Extrakce metodou SPME může být provedena dvěma způsoby. Prvním způsobem je přímá extrakce SPME označovaná zkratkou DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které je vlákno přímo ponořováno do vzorku. Druhým způsobem je Headspace SPME, označovaná zkratkou HS-SPME (Headspace SPME), který se používá pro extrakci těkavých látek z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě. Pro vzorkování pomocí HS-SPME stačí většinou 5-15 minut (Charvátová 2011).



**Obr. č. 10.** Princip extrakce analytu na vlákno (Journal of analytical methods in chemistry 2018).

## 4. METODIKA

### 4.1 Metodika práce v laboratoři

#### 4.1.1 SPME extrakce chemických látek z odparníků

Pro extrakci byl zvolen způsob Headspace analýzy pomocí SPME s 100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxan (PDMS), červeným vláknem. Do skleněné nádoby byl vložen odparník. Nádoba byla vložena do vodní lázně o teplotě 50  $^{\circ}\text{C}$  a zde byla ponechána 15 minut. Ústí lahvičky bylo zašpuntováno. Ze vzorku se zatím uvolňovaly těkavé látky (analyty). Po 15 minutách, což je optimální čas pro uvolnění látek, byl do septa vytvořen malý otvor, do něhož byla zasunuta jehla obsahující vlákno. Vlákno bylo z jehly vysunuto pomocí pístu, načež se analyty začaly vázat na vlákno. Vysunuté vlákno bylo ponecháno v nádobě po dobu 15 minut. Po dosažení sorpční rovnováhy bylo vlákno zasunuto do jehly, jehla byla vytažena ze vzorkové nádoby a vložena do nástřikového prostoru chromatografu. Nakonec bylo vlákno opět vysunuto, aby mohlo dojít k analýze. Po skončení analýzy byly výsledky vyhodnoceny (Obr. č. 11).



**Obr. č. 11.** Proces extrakce pomocí HS-SPME (Beránková 2018).

#### 4.1.2 GC-MS analýza chemických látek z odparníků

K analýze vzorků byl použit dvoudimenzionální plynový chromatograf (GC) s hmotnostním spektrometrem (MS) s průletovým analyzátozem iontů (GC $\times$ GC-TOFMS; Pegasus 3D, Leco). GC byl vybavený kombinací nepolární kolony (délka 30 m, vnitřní průměr 0.25 mm, tloušťka filmu 0.25  $\mu\text{m}$ ) a středně polární kolony RTX-50 (délka 1.5 m,

vnitřní průměr 0.1 mm, tloušťka filmu 0.1  $\mu\text{m}$ ). Teplota pro primární kolonu byla naprogramována na 50 °C (1 min), s postupným zvyšováním o 8 °C/min. až do teploty 250 °C (5 min). Teplotní program pro sekundární kolonu kopíroval průběh teplotního programu v 1 dimenzi, ale byl o 10 °C vyšší. Jako nosný plyn bylo použito heliu (He) s konstantním průtokem 1 ml/min. Teplota transferliny byla nastavena na 260 °C. Rychlost sběru dat u hmotnostního spektrometru s průletovým analyzátozem iontů byla nastavena na 100 spekter/s v rozpětí hmot 29-400  $m/z$ , za použití elektronové ionizace při 70 ev. Identifikace látek byla provedena srovnáním spekter s knihovnou NIST 2.3 (2017) a srovnáním s měřenými standardy látek. Látky byly kvantifikovány na specifických kvantifikačních hmotách.

## 4.2 Metodika práce v terénu

Na vybrané lokalitě, ve VVP Libavá, na které byla zjištěna vysoká populační hustota *Ips duplicatus*, byly v létě roku 2017 pro tohoto kůrovce instalovány lapače navnaděné komerčně dostupnými a nově vyvinutými feromonovými odparníky (Tab. č. 2 a 3). Nové experimentální odparníky byly vytvořeny tak, aby obsahovaly různý poměr E-myrcenolu a ipsdienolu. Tato směs byla dále obohacena amitinolem dle práce Zhanga (Zhang et al. 2007) a dvěma složkami hostitelských monoterpenů dle práce Dudumana (Duduman 2014). Před samotným odchycem brouků bylo nutné zjistit, která lokalita bude k odchytu brouků nejvhodnější. Za tímto účelem byl proveden tzv. předvýběr lokality. Na 10 lokalit byl 30. 6. a následně 10. 7. 2017 umístěn lapač navnaděný komerčním odparníkem Pheagr-IDU. Z těchto deseti lokalit jsme k provedení experimentu vybrali tu s největším odchycem [49,618767N, 17,562933E] (Příloha č. 2).

K samotnému pokusu bylo použito 10 křížových feromonových lapačů typu Ecotrap, které byly umístěny do linie ve vzdálenosti asi 50 m od čerstvého okraje smrkového porostu (Tab. č. 1 a Příloha č. 1). V každém lapači byl umístěn odlišný odparník a těmito návnadami bylo pravidelně rotováno podle schématu vytvářejícího úplný latinský čtverec (Tab. č. 4). Odchycení brouci byli pravidelně z pastí vybírání a uchováni v plastových lahvičkách naplněných 95 % etanolem k pozdějšímu laboratornímu zpracování. Celkem bylo během 10 replikací odchyceno 1 086 brouků lýkožrouta severského a 2 008 brouků lýkožrouta smrkového.

**Tab. č. 1.** Tabulka pozic jednotlivých pastí pro *Ips duplicatus*.

Pozice pastí ve VLS Lipník n. Bečvou			
	souřadnice		
past	zeměpisná délka (x)	zeměpisná šířka (y)	porost
Trap 1	17,599518	49,62941	372A10
Trap 2	17,575994	49,617897	320B9/1
Trap 3	17,594128	49,639709	309A7
Trap 4	17,581089	49,612461	362B5
Trap 5	17,559937	49,639969	347B8
Trap 6	17,562933	49,618767	343A7
Trap 7	17,573414	49,630413	348A7
Trap 8	17,568527	49,640659	365A7/5
Trap 9	17,588543	49,635929	368A7b
Trap 10	17,588167	49,624584	354A9b

**Tab. č. 2.** Experimentální odparníky pro *Ips duplicatus*.

látky	miligramy (mg)
E-myrcenol, ipsdienol	(20+20)
E-myrcenol, ipsdienol, Amitinol	(20+(20+2))
E-myrcenol, ipsdienol, MB	(20+20+800)
E-myrcenol, ipsdienol, $\alpha$ -pinene, limonene	(20+20+10000+10000)
E-myrcenol, ipsdienol, $\alpha$ -pinene, limonene, MB	(20+20+10000+10000+800)
E-myrcenol, ipsdienol, Amitinol, $\alpha$ -pinene, limonene, MB	(20+(20+2)+10000+10000+800)

**Tab. č. 3.** Komerční odparníky a prázdný odparník jako kontrola.

ID-Ecolure
Pheagr-IDU
ID-Rumunia
prázdný odparník

Pro samotné atraktanty (Id a EM) byla použita Kartelova vialka 730 s 2 mm dírkou ve víčku. Pro metyl butenol byla použita Kartelova vialka 731 s 2 mm dírkou ve víčku, dle Zhanga (Zhang et al. 2007). Pro monoterpeny pinen a limonen byla použita 10 ml otevřená skleněná vialka.

Replikací bylo celkem 10 a použitých odparníků také 10, čímž bylo možné získat 10x10 různých pozic bez nežádoucího opakování se.

**Tab. č. 4.** Tabulka rotací odparníků (design Latinského čtverce).

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	E	A	B	C	G	J	D	F	H	I
2	I	D	J	A	B	C	G	H	E	F
3	D	J	H	G	A	E	I	B	F	C
4	C	E	A	H	D	G	F	J	I	B
5	F	B	G	E	H	D	C	I	J	A
6	B	I	D	J	E	F	A	G	C	H
7	G	F	C	D	I	B	H	E	A	J
8	H	C	F	I	J	A	B	D	G	E
9	J	G	I	F	C	H	E	A	B	D
10	A	H	E	B	F	I	J	C	D	G

### 4.3 Metodika určování pohlaví z vnějších morfologických znaků

Brouci chycení do feromonových pastí byli následně převezeni do laboratoře. Prvním úkolem bylo třídění, protože do feromonových lapačů se kromě *Ips duplicatus* nachytl také *Ips typographus*, mistry *Pityogenes chalcographus* a další drobný hmyz či pavouci. Prioritou bylo roztrždit *Ips duplicatus* od všeho ostatního a zároveň zjistit počet nachytených *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Po získání výsledného počtu *Ips typographus* se s tímto kůrovcem dále nepracovalo. Následně byl pomocí binokulárního mikroskopu roztržzen obsah u každé lahvičky obsahující brouky druhu *Ips duplicatus*. Z každého odchyty se náhodně vybralo 50 jedinců, u kterých byla následně provedena preparace. Pokud se v lahvičce nacházelo méně než 50 brouků, použil se celý obsah lahvičky. Tímto rozdělením bylo ušetřeno spoustu času pro další práci. Samci a samičky *Ips duplicatus* byli dle pohlaví odděleně vloženi do nové, menší lahvičky, na kterou bylo zaznamenáno pohlaví a lokalita, ze které byli získáni. Samice a samci byli rozlišeni podle tzv. dvojzubu. Samice má třetí pár zubů na dvojzubu kuželovitě se zužující, zatímco samci mají třetí pár zubů na dvojzubu největší a před vrcholem rozšířený, čtvrtý pár je opět malý. Když byly všechny lahvičky přebrány a jejich obsah roztržzen, následovalo preparování. Preparací genitálií bylo stanoveno pohlaví odchytených jedinců. Nejprve bylo nutné



nachystat si potřebné pomůcky jako Eppendorfovy zkumavky (malé, uzavíratelné lahvičky), štítky s nadepsanými čísly, izolepu, binokulární mikroskop, preparační jehlu, Petriho misku, pinzetu, lepidlo, špendlíky, čisté entomologické štítky atd. Cílem bylo ověřit, zda když budeme konstatovat, že dle vnějších znaků, tedy dle zubů na krovkách brouka, se jedná o samce, jestli to platí i při prozkoumání vnitřních znaků. Aby byl tento test proveden důsledně, zvolili jsme „slepý test“, to znamená, že broukovi byl oddělen abdomen od těla a vložen do náhodně vybrané Eppendorfovi zkumavky s přiděleným číslem. Číslo této zkumavky bylo zaznamenáno na štítek, který byl přiložen k nalepenému broukovi, takže bylo možné dohledat, který abdomen patří kterému broukovi. Na štítek u brouka bylo také kromě čísla abdomenu zaznamenáno místo a rok odchyty, druh brouka, replikace a značka označující, zda šlo o samce nebo o samici. Po oddělení všech abdomenů se přešlo k již zmíněnému „slepému testu“, kdy zkoumající si vyjmul ze zkumavky abdomen na Petriho misku, zakápl vodou a pod binokulárním mikroskopem se snažil najít samčí nebo samičí pohlavní orgány. Výsledky byly zaznamenány na papír a následně porovnány se značkami u konkrétních brouků. Pokud bylo po vypreparování abdomenu zjištěno, že se jedná například o samce, ale u nalepeného brouka byla nakreslena značka pro samici, správnost pohlaví si bylo možné ověřit vložením nalepeného brouka pod binokulár. V případě, že se dle zubů na krovkách brouka jednalo o samici, ale po vypreparování byl nalezen edegus, tento pohlavní orgán byl nalepen na štítek k broukovi. Brouci nalepení na štítcích byli následně přemístěni do entomologické krabice, tzv. „muzejky“. Všechna získaná data byla přepsána do tabulky v programu Microsoft Excel. K porovnání úspěšnosti determinace pohlaví *Ips duplicatus* bylo použito jednak procento úspěšných a neúspěšných případů a také byl použit test rovnosti proporcí založený na  $\chi^2$  rozdělení. Využity byly znalosti Crawleyho (Crawley 2007). Získaný poměr pohlaví vzorku byl poté vztažen k celkovému počtu jedinců v odchyty.



**Obr. č. 12.** Třídění brouků (Beránková 2018).



**Obr. č. 13.** Pitvání brouků a lepení na entomologické štítky (Beránková 2018).



**Obr. č. 14.** Vypitvaní a nalepení brouci (Beránková 2018).

#### **4.4 Metodika statistické analýzy**

Pro statistické vyhodnocení relativního odchytu lýkožrouta severského byl použit negativně binomický model, pro poměr pohlaví pak quasipoisonovský model. Vhodnost použitého modelu byla verifikována pomocí diagnostických grafů, zejména kvantil-kvantilový graf. Významnost rozdílů mezi typy látek byla testována pomocí matice kontrastů (jak treatment, tak textbook). Statistické analýzy se uskutečnily v prostředí R 3.3.2. (R Core Team 2016), s využitím postupů dle Crawleyho (Crawley 2007) a (Pekár, Brabec 2009).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Vyhodnocení odchyťů *Ips duplicatus* na různé směsi aktivních látek

Výsledná lokalita k provedení samotného pokusu s různými feromonovými odparníky byla vybrána dle největšího průměrného odchyťu *Ips duplicatus* mezi 10 pokusnými lokalitami (Tab. č. 1). Největší průměrný odchyť (42,5) jsme zaznamenali na lokalitě 6, porost 343A7 (Příloha č. 2).

Po proběhnutí pokusu v průběhu května a června 2017, spočítání odchyťů ve všech replikacích a určení pohlaví odchyćených brouků, jsme výsledky statisticky vyhodnotili. Výsledek byl takový, že největší podíl lýkožrouta severského byl odchyćen na komerční odparník Pheagr-IDU, následovala varianta s blank návnadou a dále odparník ID-Rumunia (Tab. č. 5). Nenulový odchyť byl zjištěn u variant obsahujících  $\beta$ -pinen a limonen (D, E, F), avšak odchyťy na variantu E se statisticky významně nelišily od nuly (Tab. č. 6).

Mezi testovanými látkami byl zjištěn statisticky významný rozdíl v relativním odchyťu lýkožrouta severského (GLM negative binomial:  $n=90$ ;  $df=9$ ;  $p < 0,001$ ). Bylo tedy prokázáno, že u lýkožrouta severského existuje odlišná reakce na tyto různé kombinace látek. Při porovnání relativního odchyťu vzhledem k prázdné pasti (varianta blank) byly statisticky významně odlišné varianty (A, B, D, E, F, G) obsahující feromon, At, MB,  $\alpha$ -pinen a limonen. Což vzhledem k záporné hodnotě odhadu hodnoty parametru příslušných variant značí, že odchyť na tyto kombinace látek byl významně nižší než náhodný odchyť. Naopak kombinace (C – kombinace EM, Id, MB; H – ID-Rumunia, I – Pheagr-IDU) se od náhodného odchyťu nelišily (Tab. č. 7). Průměrné hodnoty relativního odchyťu lýkožrouta severského pro testované varianty jsou přehledně znázorněny na (Obr. č. 15).

Z hlediska podílu odchyćených samců se jednotlivé látky rovněž lišily (GLM quasipoisson:  $n=90$ ;  $df=9$ ;  $p < 0,001$ ). Poměr pohlaví zjištěný na blank variantě – prázdný lapač byl vyrovnaný 50 % ♂: 50 % ♀ (Tab. č. 8 a Obr. č. 16). Vyšší podíl samců byl zjištěn pouze na variantách (F – kombinace EM, Id, At, MB,  $\alpha$ -pinenu, limonenu a H – Pheagr-IDU), ovšem tento rozdíl byl statisticky nevýznamný (Tab. č. 9). Ostatní látky vykazovaly nižší podíl odchyćených samců, z toho u třech testovaných látek (A – EM, Id; B – EM, Id, At; G – ID-Ecolure) byly rozdíly od vyrovnaného poměru pohlaví, resp. blank varianty, statisticky významné (Tab. č. 9).

**Tab. č. 5.** Označení testovaných látek, jejich průměrné hodnoty relativního odchyťu a směrodatné odchyľky. Relativní odchyť byl vztážen k celkovému odchyťu.

označení	látka	průměr	směrodatná odchylka
A	EM + Id	0,6	1,130388
B	EM + Id + At	0,4	1,013794
C	EM + Id + MB	0,0	0
D	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim	4,0	6,383573
E	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB	2,0	4,444097
F	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB + At	2,6	3,244654
G	ID-Ecolure	0,4	1,013794
H	Pheagr-IDU	39,3	16,340135
I	ID-Rumunia	18,0	12,639225
J	Blank	24,8	23,852556

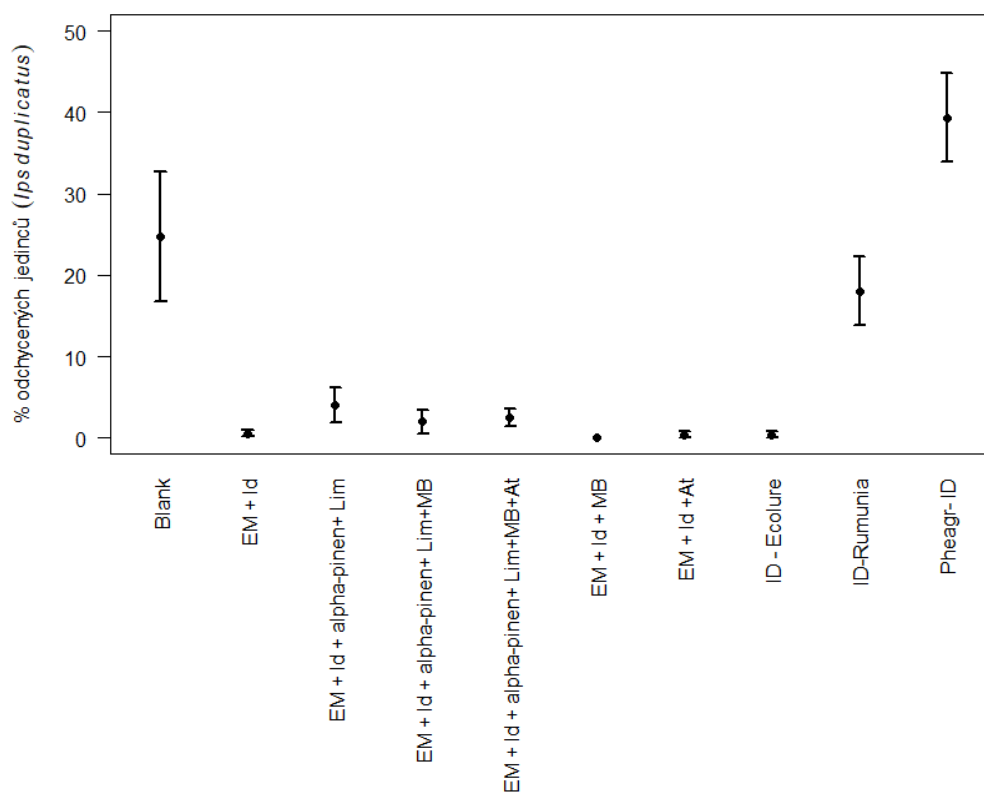
**Tab. č. 6.** Odlišnost relativního odchyty lýkožrouta severského pro jednotlivé testované látky od nuly, tj. textbook parametrizace negativně binomického modelu.

označení	látka	Estimate	Std, Error	z value	Pr(> z )
A	EM + Id	- 0,5878	0,6195	- 0,949	0,342750
B	EM + Id + At	- 0,8109	0,6587	- 1,231	0,218250
C	EM + Id + MB	- 18,7918	2433,942	- 0,008	0,993840
D	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim	1,3863	0,460	3,014	0,00258
E	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB	0,6931	0,4893	1,417	0,156570
F	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB + At	0,9383	0,4768	1,968	0,04907
G	ID-Ecolure	- 0,8109	0,6587	- 1,231	0,218250
H	Pheagr-IDU	3,6721	0,432	8,500	< 2e-16
I	ID-Rumunia	2,8904	0,4359	6,631	3,33e-11
J	Blank	3,2099	0,4339	7,397	1,39e-13

**Tab. č. 7.** Odlišnost relativního odchyty lýkožrouta severského pro jednotlivé testované látky od blank varianty, tj. treatment kontrasty k negativně binomickému modelu.

označení	látka	Estimate	Std, Error	z value	Pr(> z )
A	EM + Id	- 3,7977	0,7564	- 5,021	5,15e-07
B	EM + Id + At	- 4,0209	0,7888	- 5,098	3,44e-07
C	EM + Id + MB	- 22,5125	3142,2057	- 0,007	0,994284
D	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim	- 1,8237	0,6324	- 2,884	0,003930
E	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB	- 2,5168	0,6540	- 3,848	0,000119
F	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB + At	- 2,2717	0,6447	- 3,524	0,000426

G	ID-Ecolure	- 4,0209	0,7888	- 5,098	3,44e-07
H	Pheagr-IDU	0,4621	0,6123	0,755	0,450439
I	ID-Rumunia	- 0,3196	0,6151	- 0,520	0,603360
J	Blank	3,2099	0,4339	7,397	1,39e-13

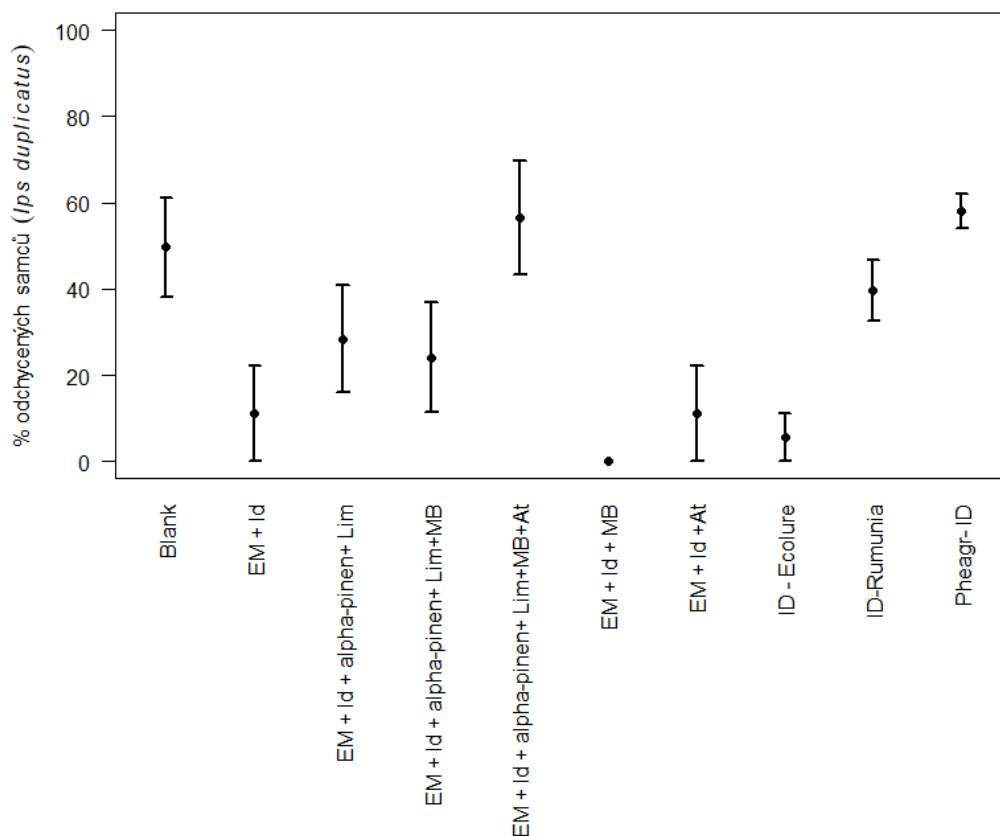


**Obr. č. 15.** Relativní počet (%) odchycených jedinců lýkožrouta severského podle jednotlivých testovaných látek. Bod ve středu svislé úsečky představuje průměr, délka úsečky střední chybu průměru.

**Tab. č. 8.** Průměrný podíl samců lýkožrouta severského odchycený na jednotlivé testované látky a směrodatná odchylka.

označení	látka	průměr	směrodatná odchylka
A	EM + Id	11,111111	33,33333
B	EM + Id + At	11,111111	33,33333
C	EM + Id + MB	0	0
D	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim	28,444444	37,44032
E	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB	24,111111	38,33551
F	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB + At	56,444444	39,74327

G	ID-Ecolure	5,555556	16,66667
H	Pheagr-IDU	58,111111	11,90005
I	ID-Rumunia	39,666667	21,26029
J	Blank	49,666667	34,27463



**Obr. č. 16.** Podíl (%) odchycených samců lýkožrouta severského podle jednotlivých testovaných látek. Bod ve středu svislé úsečky představuje průměr, délka úsečky střední chybu průměru.

**Tab. č. 9.** Odlíšnost podílu samců v odchycích lýkožrouta severského pro jednotlivé testované látky vůči blank variantě, tj. treatment kontrasty ke quasipoisonovskému modelu.

označení	látka	Estimate	Std, Error	z value	Pr(> z )
A	EM + Id	- 1,4974	0,7218	- 2,075	0,0412
B	EM + Id + At	- 1,4974	0,7218	- 2,075	0,0412
C	EM + Id + MB	- 18,2079	1682,8710	- 0,011	0,9914
D	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim	- 0,5574	0,5114	- 1,090	0,2790
E	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB	- 0,7227	0,5398	- 1,339	0,1845

F	EM + Id + $\alpha$ -pinen + Lim + MB + At	0,1279	0,4231	0,302	0,7632
G	ID-Ecolure	- 2,1905	0,9730	- 2,251	0,0271
H	Pheagr-IDU	0,1570	0,4203	0,374	0,7097
I	ID-Rumunia	- 0,2248	0,4631	- 0,485	0,6287
J	Blank	3,9053	0,3086	12,655	<2e-16

## 5.2 Vývoj metody určení pohlaví u *Ips duplicatus* z vnějších morfologických znaků

Determinace pohlaví byla provedena na 900 jedincích *Ips duplicatus*. Na základě morfologických znaků bylo stanoveno 416 jedinců jako samců a 484 jedinců jako samic (Tab. č. 10). Pitvou bylo určeno 428 jedinců jako samců (48 %) a 472 jedinců jako samice (52 %). Úspěšnost determinace pomocí morfologického znaku byla v případě samců vyšší (99 %) než u samic (96 %). Odlíšná úspěšnost determinace pohlaví u samců a samic byla prokázána i statisticky ( $\chi^2=4,086$ ;  $df=1$ ;  $p < 0,05$ ).

**Tab. č. 10.** Úspěšnost determinace pohlaví u samců a samic.

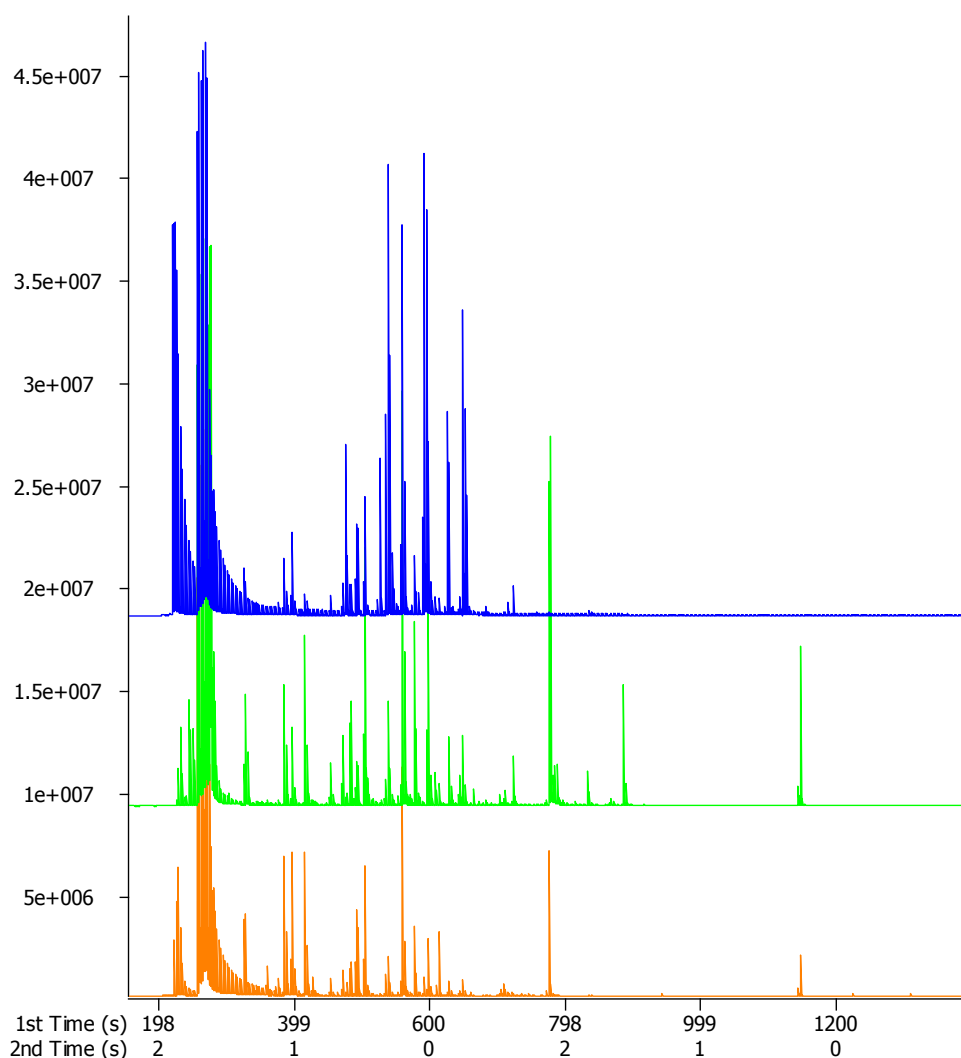
	počet	pitva ♂	pitva ♀
morfologie ♂	416	411	5
	%	99	1
morfologie ♀	484	17	467
	%	4	96

## 5.3 Analýza chemického složení komerčních odparníků se zaměřením na aktivní látky

Vzorky odparníků byly testovány na přítomnost účinných látek pomocí techniky mikroextrakce na pevné vlákno a dvoudimenzionálního plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátozem iontů (SPME-GC $\times$ GC-TOF-MS). Bylo zjištěno, že vedle deklarovaných účinných látek se ve vzorcích vyskytuje řada dalších látek, zejména terpenů a alkoholů. V záznamech (Obr. č. 18) jsou uvedeny identifikace nejvíce zastoupených sloučenin (parametr signálu k šumu-S/N větší 2500). Retenční časy těchto látek jsou spolu s plochami jejich píků uvedeny v (Tab. č. 11). Vzhledem ke

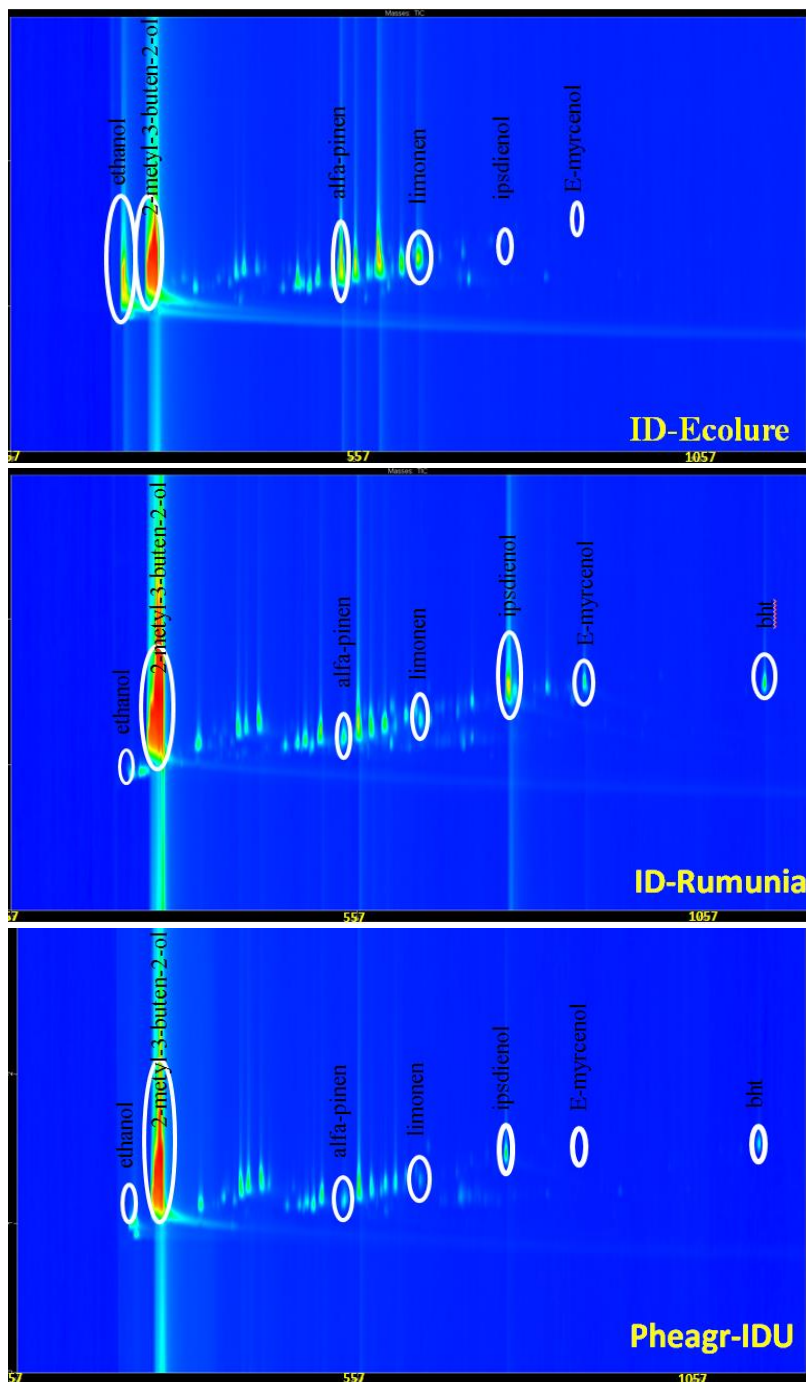


komplexnosti vzorků nebyla provedena kvantifikace těchto látek. Intenzity signálů, vzhledem k poměrně velmi odlišnému složení vzorků, nelze považovat za přesný parametr rozdílu v jejich koncentraci.



**Obr. č. 17.** Chromatogram z pohledu první dimenze: Headspace SPME analýzy komerčních feromonových odparníků.

Legenda: modrá – ID-Ecolure, zelená – ID-Rumunia, oranžová – Pheagr-IDU



Obr. č. 18. Dvoudimenzionální chromatogram Headspace SPME analýzy komerčních feromonových odparníků.

Tab. č. 11. Tabulka 3. komerčních odparníků a jejich závislosti na chemickém složení.

R.T. 1D (s)	R.T. 2D (s)	sloučenina	Pheagr-IDU	ID-Rumunia	ID-Ecolure
225	1,01	etanol	3,82E+07	1,03E+06	4,78E+08
261	1,19	2-metyl-3-buten-2-ol	*	*	*
537	1,17	α-pinen	9,98E+05	7,57E+06	16011028=

591	1,22	$\beta$ -pinen	1,31E+06	-	7,92E+06
648	1,29	limonen	1,01E+06	3,71E+06	2,43E+07
774	1,47	ipsdienol	1,06E+07	6,61E+07	2,62E+05
885	1,57	E-myrcenol	9,83E+03	9,20E+06	2,03E+04
1146	1,54	butylatedhydroxytoluene	2,41E+06	8,61E+06	-

\*Odezvy (MB) nejsou v tabulce uvedeny, jelikož řádově převyšují ostatní sloučeniny.

Dle bezpečnostních listů MSDS měl přípravek Pheagr-IDU obsahovat 2-metyl-3-buten-2-ol (MB), ipsdienol, E-myrcenol a 2,6-diterc.butyl-4-metylfenol (BHT). Přípravek ID-Ecolure měl obsahovat ipsdienol, alkoholy-rozpouštědla a synergické komponenty. U přípravku ID-Rumunia nebylo složení známé, ale předpokládá se, že obsahuje kromě aktivních feromonových látek také hostitelské terpeny.

Látky deklarované v bezpečnostních listech byly u výše zmíněných odparníků identifikovány pomocí Headspace analýzy (Tab. č. 11 a Obr. č. 18).

V přípravku ID-Ecolure nebylo nalezeno BHT, které je přidáváno jako antioxidant pro větší stabilitu směsi. V porovnání se zbylými dvěma přípravky, zde byl v největším zastoupení zjištěn etanol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen a limonen. Naopak zde bylo zjištěno nejméně ipsdienolu.

V přípravku Pheagr-IDU byly nalezeny všechny sloučeniny. Nejméně byl zastoupen E-myrcenol, a v porovnání s ID-Rumunia, zde bylo méně stabilizátoru BHT, který nepočítáme k aktivním látkám.

V přípravku ID-Rumunia byly nalezeny všechny sloučeniny kromě  $\beta$ -pinenu a ze všech tří přípravků zde bylo určeno největší množství složek agregačního feromonu *Ips duplicatus*, ipsdienolu a E-myrcenolu. MB byl nalezen ve všech třech přípravcích, nicméně protože byl použit jako rozpouštědlo a ve všech vzorcích byl nalezen ve velkém množství, nakonec nebyl kvantifikován.

E-myrcenol a ipsdienol byly nalezeny ve všech odparnících, ale nejvíce Id a EM bylo nalezeno v odparníku ID-Rumunia. Nejméně ipsdienolu bylo nalezeno v odparníku ID-Ecolure a nejméně E-myrcenolu v odparníku Pheagr-IDU. Nejvíce etanolu bylo nalezeno v odparníku ID-Ecolure. Dalšími látkami, které se vyskytují ve všech odparnících, i když v různých poměrech a intenzitách, jsou hostitelské monoterpeny  $\alpha$ -pinen a limonen. Dále všechny odparníky obsahovaly > 20 dalších, nedeklarovaných látek, které jsou převážně terpenického charakteru.

**Tab. č. 12.** Porovnání relativních odchytů a směrodatných odchylek u komerčních odparníků.

látka	komerční odparník	průměr	směrodatná odchylka
G	ID-Ecolure	6	17
H	Pheagr-IDU	58	12
I	ID-Rumunia	40	21

Z porovnání tří komerčně dostupných odparníků vyplývá, že nejvíce odchytů bylo zaznamenáno u odparníku Pheagr-IDU a nejméně u odparníku ID-Ecolure.

## 6. DISKUSE

Přestože byly splněny podmínky pro lýkožrouta severského (nadmořská výška do 600 m.n.m, chřadnouce smrkové porosty pěstované na nepůvodních stanovištích napadené václavkou, teplé počasí), odchvy lýkožrouta severského byly obecně malé.

Podle Holuši (Holuša et al. 2013) to může být způsobeno tím, že množství brouků odchycených v jarním období (duben až červen) je výrazně vyšší, než množství brouků odchycených v letním období (červenec až srpen).

Další možností, proč v našich feromonových lapačích bylo odchyceno menší množství brouků *Ips duplicatus*, mohlo být způsobeno tím, že feromonový lapač je atraktivní především ve dnech prvního rojení *Ips duplicatus*, kdy přezimující generace vylétává z hrabanky (Holuša et al. 2013).

V letním období poletují dospělí brouci *Ips duplicatus* především v korunách stromů, kde se odbývá rojení, takže nejsou přitahováni umělými návnadami z pastí, které se vyskytují v nižších polohách, téměř u země (Mrkva 2016).

Wermelinger (Wermelinger 2004) si menší počet odchycených brouků v pokročilé sezóně vysvětluje tím, že úmrtnost brouků v druhé (letní) generaci může být vyšší v důsledku usmrcení hostitelským stromem.

S ohledem na potíže spojené s kontrolou tohoto škůdce mohou být dle Holuši (Holuša et al. 2013) aktuální informace o jeho letové aktivitě velmi užitečné pro definování jeho vrcholů v odchycích, a proto je nutné instalovat feromonové lapače i v létě, kdy odchyt může popisovat hrozbu podobně jako na jaře.

Při odchytu lýkožrouta severského se do pastí navnaděných pro tohoto kůrovce nachytalo i velké množství lýkožrouta smrkového, což může být způsobeno dle Schlytera tím (Schlyter et al. 1992), že feromon pro lýkožrouta severského obsahoval vyšší dávku ipsdienolu, a v komerčních feromonových odparnicích a odparnicích (C, E, F) také MB, který je jednou ze složek agregačního feromonu *Ips typographus*.

Vzhledem k tomu, že hlavními složkami agregačního feromonu jsou Id a EM, odchyt brouků lýkožrouta severského byl konkrétně na samotnou kombinaci těchto dvou látek nejnižší, což se rozchází s tvrzením Zhanga (Zhang et al. 2007), při jehož pokusu byla kombinace Id a EM atraktivní s celkovým odchycem 1 100 brouků, a stejně tak se rozchází s tvrzením Schlytera (Schlyter et al. 1992), při jehož výzkumu byl u kombinace Id a EM zaznamenán dramatiky větší odchyt brouků lýkožrouta severského v porovnání s použitím Id samotného.

I přesto, že v některých pokusech byl ID-Ecolure potvrzen jako účinnější než odparník Pheagr-IDU, např. dle práce Holuši (Holuša et al. 2010a; Holuša 2013), v našem pokusu byl největší podíl brouků lýkožrouta severského odchycen na komerční odparník Pheagr-IDU, následně na prázdnou návnadu a jako třetí s největším odchylem byl vyhodnocen odparník ID-Rumunia. Dalším důvodem k nižším odchytům na laboratorně připravené odparníky může být fakt, že i když jsme převzali design odparníků používaných při pokusu popsáném v článcích Zhanga a Dudumana (Zhang et al. 2007; Duduman 2014), u námi vyrobených odparníků nebyly stanoveny koeficienty odparu, takže nebylo exaktně zjištěno, jaké množství feromonu se uvolňovalo do okolí lapačů.

U varianty B skládající se z EM, Id a přídavku At byl zaznamenán druhý nejmenší počet odchycených brouků, což se také liší od výzkumu Zhanga (Zhang et al. 2007), který zjistil, že přidáním At k binární směsi Id+EM se výrazně zvýšil počet odchycených brouků lýkožrouta severského o 47 %. Nízké odchvy na tuto variantu mohou být způsobené tím, že At je možná součástí komponent agregačního feromonového systému čínského *Ips duplicatus*, na rozdíl od evropského. Navíc jeho výzkum sledoval cílovou populaci ve smrkové přírodní rezervaci, která je izolovaná od jiných populací, proto vývoj populace *Ips duplicatus* ve Vnitřním Mongolsku, v oblasti, kde je jeho hostitelskou dřevinou *Picea mongolica*, se mohl radikálně lišit od populace v Evropě.

Nenulový odchyt byl zjištěn u variant obsahujících kombinaci feromonu,  $\alpha$ -pinenu a limonenu (D, E, F), avšak odchvy na variantu E se statisticky významně nelišily od nuly. U těchto variant byl odchyt vyšší než u samotné binární směsi Id+EM. Podobné výsledky potvrdil i výzkum Dudumana (Duduman 2014) při odchycích *Ips duplicatus* v Rumunsku, což by mohlo ukazovat na význam hostitelských terpenů při hledání hostitelského stromu pro lýkožrouta severského.

Při porovnání relativního odchytu vzhledem k prázdné pasti (varianta blank) byly statisticky významně odlišné varianty obsahující feromon, At,  $\alpha$ -pinen, limonen, MB a odparník ID-Ecolure, nicméně odchyt na tyto látky byl významně nižší než náhodný odchyt. Naopak kombinace feromonu s MB, odparník Pheagr-IDU a ID-Rumunia se od náhodného odchytu nelišily.

U *Ips duplicatus* vyhledávají hostitelský strom pionýrství samci. Porovnáváme-li počet samců chycených do lapačů, největší počet samců byl odchycen na komerční odparník Pheagr-IDU 58 % a směs (Id, EM, At, MB,  $\alpha$ -pinen, limonen) 56 %, ale rozdíl mezi těmito dvěma odparníky byl statisticky nevýznamný. Ovšem vysoký podíl samců na směsnou variantu může znamenat význam těchto látek právě v této synergistické směsi pro pionýrské pohlaví lýkožrouta severského.

Vyrovnaný poměr pohlaví byl pak zaznamenán u blank návnady 50 %, a téměř vyrovnaný poměr pohlaví byl zaznamenán u odparníku ID-Rumunia 40 %. U zbylých variant byl počet odchycených samců výrazně nižší než počet samic (feromon, kombinace feromonu s At 11 %, feromon s terpeny 28 %, feromon s terpeny a MB 24 %, ID-Ecolure 5 %), což by znovu mohlo být vysvětleno druhým rojením v sezóně, kdy se pionýrští samci pohybují ve vyšších výškách.

Pohlaví bylo určeno u 900 brouků *Ips duplicatus*. Dle morfologických znaků bylo stanoveno 416 samců a 484 samic, ale pitvou bylo určeno 428 jedinců jako samců (48 %) a 472 jedinců jako samice (52 %). Tato rozdílnost byla způsobena tím, že u některých brouků nebylo možné s jistotou určit, zda se jedná o samce či samici, protože zoubky na krovkách byly deformované nebo chyběly úplně. Tito brouci byli pak označeni za samice. Úspěšnost determinace pomocí morfologického znaku byla v případě samců vyšší (99 %) než u samic (96 %). Můžeme tedy definovat velmi spolehlivou metodu pro určení pohlaví lýkožrouta severského dle vnějších morfologických znaků, která bude použita v chemicko – ekologických pokusech, kdy je třeba brouky dle pohlaví třídít při zachování jejich plné fyziologické kondice.

Celkově nízké odchyty a odlišnost poměru odchyceného pohlaví vzhledem k publikovaným datům mohla být způsobena pokročilou dobou v sezóně, kdy se jednalo o druhé rojení. V letním období se behaviorální děje u *Ips duplicatus* odehrávají především v korunách stromů a nikoli na úrovni 1,5 m, ve které byly lapače instalovány, na rozdíl od prvního rojení, kdy přezimující dospělci vylétávají z hrabanky a mají proto k nízko umístěným lapačům blíž.

Chemickou analýzou komerčních odparníků pomocí Headspace vzorkování byly identifikovány látky deklarované v bezpečnostních listech MSDS. U všech komerčních odparníků dominoval 2-methyl-3-buten-2-ol (MB), který byl použit jako rozpouštědlo. U něj je prokázána atraktivita pro *Ips typographus*, a proto se do lapačů chytilo i významné množství tohoto škůdce. Z pomocných látek byly identifikovány zejména etanol, další alkoholy a butylatedhydroxytoluene (BHT), který byl použit jako stabilizátor.

Látky E-myrcenol a ipsdienol, které jsou agregačním feromonem lýkožrouta severského, byly identifikovány ve všech komerčních odparnicích, ale největší zastoupení těchto látek bylo nalezeno u odparníku ID-Rumunia. Nejméně ipsdienolu bylo identifikováno u ID-Ecolure a nejméně E-myrcenolu u Pheagr-IDU. Dalšími látkami, které se vyskytují ve všech odparnicích, i když v různých poměrech a intenzitách, jsou hostitelské monoterpeny  $\alpha$ -pinen a limonen, kterých bylo nalezeno nejvíce v odparníku ID-Ecolure. Řada dalších identifikovaných látek především terpenické povahy nebyla uvedena

ve složení nebo upřesněna jako účinné látky v dostupných dokumentech k odparníkům. Vzhledem k identifikaci dalších nedeklarovaných látek (především monoterpeny) a jejich výskytu v produktech všech tří výrobců se lze domnívat, že jejich přidavkem do směsi je buď sledováno zvýšení atraktivity pro lýkožrouta smrkového, nebo je to náhodná kontaminace z nečistých výchozích látek. Rozdíly u odchytů do komerčních feromonových odparníků (Tab. č. 12) mohly být způsobeny rozdílným složením chemických látek, které odparníky obsahovaly.

Ačkoli byla identifikována řada dalších látek, které by mohly být atraktivní pro *Ips duplicatus*, použitou technikou toto nelze prokázat. Aktivita receptorů tohoto brouka by se pro jednotlivé látky musela ověřit pomocí EAD analýzy.

Z výsledků polních pokusů s komerčními odparníky v pokročilé sezóně vyplývá, že v našem uspořádání byl z komerčních odparníků nejúspěšnější Pheagr-IDU. Staticky významné odchvy byly zaznamenány i na rumunský odparník ID-Rumunia a na rozdíl od publikovaných dat Holuši (Holuša et al. 2010) jsme zaznamenali nejmenší odchvy na odparník ID-Ecolure. Z chemického složení nelze usuzovat na jednotlivou chemikálii, která by byla klíčovou pro atrakci lýkožrouta severského, ale kombinace ipsdienolu a E-myrcenolu se zdá být klíčová, stejně jako přídavek hostitelských monoterpenů. V odparníku Pheagr-IDU byl poměr EM:Id 1:1000, u odparníku ID-Ecolure byl poměr EM:Id 1:10 a u odparníku ID-Rumunia byl poměr těchto dvou klíčových komunikačních látek lýkožrouta severského také EM:Id 1:10. Dle práce Zhanga (Zhang et al. 2007) je poměr látek agregačního feromonu evropské populace 1:9, což odpovídá poměru těchto látek v odparnicích ID-Ecolure a ID-Rumunia, které v našem pokusu odchytily méně brouků. Naopak ve Pheagr-IDU, na který jsme odchytily nejvíce brouků lýkožrouta severského, je tisícinásobný nadbytek ipsdienolu oproti E-myrcenolu. Ze závěrů můžeme spekulovat, zda v pokročilé sezóně má pro lýkožrouta severského větší význam pouze Id. Dále je zřejmé, že hraje roli i poměr látek, které potom fungují synergisticky pro atrakci lýkožrouta smrkového.



## 7. ZÁVĚR

Výstupem této diplomové práce bylo zpracování literární rešerše u lýkožrouta severského, dále zjištění, jak různé směsi feromonových komponent lákají lýkožrouta severského a porovnání komerčně dostupných feromonových směsí s nově vyvinutými. V polním pokusu v průběhu srpna 2017 s 10 různými feromonovými návnadami v lapačích bylo zjištěno, jaký počet brouků lýkožrouta severského a lýkožrouta smrkového se do instalovaných lapačů odchytil, a následně byl zjištěn poměr pohlaví u brouků lýkožrouta severského. K tomuto účelu byla vyvinuta metoda třídění pohlaví lýkožrouta severského v laboratoři dle identifikačního vnějšího morfologického znaku, podle kterého lze ověřit pohlaví lýkožrouta severského bez nutnosti pitvy. Tato metoda bude využita při chemicko – ekologických pokusech s živými jedinci.

V polním pokusu byl největší podíl lýkožrouta severského odchycen na komerční odparník Pheagr-IDU, variantu s blank návnadou a odparník ID-Rumunia.

Mezi testovanými kombinacemi látek a komerčními odparníky byl zjištěn statisticky významný rozdíl v relativním odchytu lýkožrouta severského, a bylo tedy prokázáno, že u lýkožrouta severského existuje odlišná behaviorální reakce na tyto látky.

Z hlediska podílu odchycených samců se jednotlivé látky rovněž lišily. Nejvyšší podíl samců byl zjištěn u varianty u komerčního odparníku Pheagr-IDU 58 % a směsi (Id, EM, At, MB,  $\alpha$ -pinen, limonen) 56 %, ale rozdíl mezi těmito dvěma odparníky byl statisticky nevýznamný. Vyrovnaný poměr pohlaví byl pak zaznamenán u varianty s blank návnadou 50 %.

Celkem bylo odchyceno 2 008 brouků lýkožrouta smrkového a 1 086 brouků lýkožrouta severského. Determinace pohlaví byla určena u 900 jedinců *Ips duplicatus* na základě morfologických znaků a pitvou. Úspěšnost determinace pomocí morfologického znaku byla v případě samců vyšší (99 %) než u samic (96 %). Pitvou byl určen větší odchyt samic než samců, konkrétně 52 %.

Z porovnání tří komerčně dostupných odparníků vyplývá, že nejvíce odchytů bylo zaznamenáno u odparníku Pheagr-IDU a nejméně u odparníku ID-Ecolure, což je spojeno s jejich chemickým složením a obsahem aktivních látek.

## 8. SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

BAKKE, A. *Aggregation pheromone in the bark beetle, Ips duplicatus (Sahlberg)*. Norw. J. Entomol. 1975, vol. 22, no. 1, s. 67-69.

BYERS, J. A. *Host-tree chemistry affecting colonization in bark beetles*. Chemical ecology of insects 2. 1995, s. 154-213.

BYERS, J. A., SCHLYTER, F., BIRGERSSON, G., FRANCKE, W. *E-myrcenol in Ips duplicatus - an aggregation pheromone component new for bark beetles*. Experientia. 1990, vol. 46, no. 11-12, s. 1209-1211. ISSN 0014-4754.

CRAWLEY, M. *The R Book*. New York, John Wiley & Sons. 2007, s. 950.

DUDUMAN, M. L. *Field response of the northern spruce bark beetle Ips duplicatus (Sahlberg) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) to different combinations of synthetic pheromone with (-)-  $\alpha$ -pinene and (+)-limonene*. Agric. and Forest Entomology. 2014, vol. 16, s. 102-109.

DUDUMAN, M. L., VASIAN, I. *Effects of volatile emissions of Picea abies fresh debris on Ips duplicatus response to characteristic synthetic pheromone*. Notulae Botan. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 2012, vol. 40, no. 1, s. 308-313.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). [online] EPPO Global Database. 2018 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z WWW: <<https://gd.eppo.int>>.

GRODZKI, W. *Two types of Norway spruce Picea abies (L.) H. Karst. infestation by the double spined bark beetle Ips duplicatus C.R. Sahlb. (Coleoptera: Scolytinae) in southern and north-eastern Poland*. Folia Forestalia Polonica, Series A Forestry. 2012, vol. 54, no. 3, s. 169-174.

GRODZKI, W. *Zhodnocení působení lýkožrouta severského v Polsku*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2013, č. 6, s. 24-25. ISSN 0322-9254.

HOLUŠA, J. *Lýkožrout severský (Ips duplicatus): význam a možnosti obrany*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2013, č. 6, s. 17. ISSN 0322-9254.

HOLUŠA, J., GRODZKI, W., LUKÁŠOVÁ, K. *Comparison of the pheromone dispensers ID Ecolure, Pheagr IDU and Duplodor for the double spined bark beetle (Ips duplicatus)*. Sylwan. 2010a, vol. 154, no. 6, s. 363-370. ISSN 0039-7660.

HOLUŠA, J., GRODZKI, W., LUKÁŠOVÁ, K., LUBOJACKÝ, J. *Pheromone trapping of the double-spined bark beetle Ips duplicatus (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae): seasonal variation in abundance*. Folia Forestalia Polonica. 2013, vol. 55, no. 1, s. 3-9.

HOLUŠA, J., KNÍŽEK, M. *Lýkožrout severský Ips duplicatus (Sahlberg)*[online]. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2007 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z WWW: <[http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2007/2007\\_lykozrout\\_seversky.pdf](http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2007/2007_lykozrout_seversky.pdf)>.

HOLUŠA, J., LUBOJACKÝ, J., LUKÁŠOVÁ, K. *Využití otrávených lapáků ve formě trojnožek proti lýkožroutu smrkovému (Ips typographus L.) a lýkožroutu severskému (Ips duplicatus Sahlberg) (Coleoptera: Curculionidae)*. Lesnický průvodce, VÚLHM. 2/2016, s. 8-30. ISSN 0862-7657.

HOLUŠA, J., VOIGTOVÁ, P., KULA, E., KŘÍSTEK, Š. *Výskyt lýkožrouta severského (Ips duplicatus Sahlberg, 1836) (Coleoptera: Scolytidae) na LS Bruntál LČR, s. p., v roce 2004 – 2005*. Zpravodaj ochrany lesa. 2006, svazek 13, s. 46. ISSN 1211-9342.

HOLUŠA, J., ZAHRADNÍK, P., KNÍŽEK, M., DRAPELA, K. *Seasonal flight activity of the double-spined spruce bark-beetle Ips duplicatus (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) in Silesia (Czech Republic)*. Biologia. 2003, vol. 58, no. 5, s. 935-941. ISSN 0006-3088.

CHARVÁTOVÁ, M. *Využití metody spme při analýze látek pocházejících z polymerů kontaminujících potravní řetězce (sop)* [online]. 2011 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z WWW: <<https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/metoda-spme/index.html>>.

CHEN, G. F., ZHANG, Q. H., WANG, Y. J., LIU, G. T., ZHOU, X. M., NIU, J. F., SCHLYTER, F. *Catching Ips duplicatus (Sahlberg) (Coleoptera: Scolytidae) with pheromone-baited traps: optimal trap type, colour, height and distance to infestation*. Pest management science. 2010, vol. 66, no. 2, s. 213-219.

IVARSSON, P., SCHLYTER, F., BIRGERSSON, G. *Demonstration of de novo pheromone biosynthesis in Ips duplicatus (Coleoptera: Scolytidae): Inhibition of Ipsdienol and E-myrcenol production by compactin*. Insect Biochem. Molec. Biol. 1993, vol. 23, no. 6, s. 655-662.

JAKUŠ, R., BLAŽENEC, M. *Princípy ochrany dospělých smrekových porastov pred podkôrnym hmyzom*. Zvolen: Ústav ekológie lesa SAV. 2015, s. 232.

JIROŠOVÁ, A. Ústní sdělení [cit. 2018-03-01]. Nepublikováno.

KNÍŽEK, M., ZAHRADNÍK, P. *Kůrovci na jehličnanech*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2004, č. 3, s. 1-8. ISSN 0322-9254.

KRYKORKOVÁ, J., ČAPOUN, T. *Příspěvek k využití techniky spme při analýze těkavých organických látek metodou gc/ms*. The science for population protection. 2008, vol. 0, s. 2.

LECO. *Product data sheet "PEGASUS HT High Throughput TOFMS"* [online]. 2014 [cit. 2018-03-28]. Dostupné z WWW: [http://es.leco-europe.com/wp-content/uploads/leco\\_docs/product-files/PEGASUS-HT-TOFMS-209-182.pdf](http://es.leco-europe.com/wp-content/uploads/leco_docs/product-files/PEGASUS-HT-TOFMS-209-182.pdf).

LUBOJACKÝ, J., KNÍŽEK, M., LIŠKA, J., MODLINGER, R., LORENC, F., SOUKUP, F., NOVOTNÝ, R. *Výskyt lesních škodlivých faktorů v Česku v roce 2016*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2017, č. 6, s. 35-39. ISSN 0322-9254.

MRKVA, R. *Je současný způsob tlumení početnosti kůrovců účinný? Nebo je třeba obranu diverzifikovat podle dominance vedoucích druhů?* Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2016, č. 4, s. 45-49. ISSN 0322-9254.

MRKVA, R. *Lýkožrout severský (Ips duplicatus Sahlberg), nový významný škůdce smrku*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 1994, č. 73, s. 35-37. ISSN 0322-9254.

MRKVA, R. *Nové poznatky o bionomii, ekologii a hubení lýkožrouta severského*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 1995, č. 74, s. 5-7. ISSN 0322-9254.

MRKVA, R., KUCHARÍK, J. *Obrana proti kůrovcům*. Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o. 2006, č. 10, s. 20-22. ISSN 0322-9254.

NUMBERG, M. *Klucze do oznaczania owadów polski*. Polskie towarzystwo entomologiczne, państwowe wydawnictwo naukowe. 1981, č. 19, s. 114. ISBN 83-01-03419-X

PEKÁR, S., BRABEC, M. *Moderní analýza biologických dat 1*. Praha, Scientia. 2009, s. 225.

PFEFFER, A., KNÍŽEK, M. *Expanze lýkožrouta Ips duplicatus (Sahlb.) ze severské tajgy*. Zpravodaj ochrany lesa. 1995, č. 2, s. 8-11.

POOLE, C. *Gas Chromatography*. Elsevier Science. 2012, s. 753.

R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing* [online]. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. 2016 [cit. 2018-03-31]. Dostupné z WWW: <<https://www.R-project.org/>>.

SCHLYTER, F., BIRGERSSON, G., BYERS, J. A., BAKKE, A. *The aggregation pheromone of Ips duplicatus and its role in competitive interactions with I. typographus (Coleoptera: Scolytidae)*. Chemoecology. 1992, vol. 3, no. 3-4, s. 103-112. ISSN 0937-7409.

SÝKORA, R. *Využití GC/MS při analýze léčiv*. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně. 2011, s. 69.

WERMELINGER, B. *Ecology and management of the spruce bark beetle Ips typographus – a review of recent research*. Forest Ecology and Management. 2004, vol. 202, s. 67-82.

ZACHAŘ, P., SÝKORA, D. *Plynová chromatografie*. Vysoká škola chemicko-technická v Praze. 2011, s. 16.

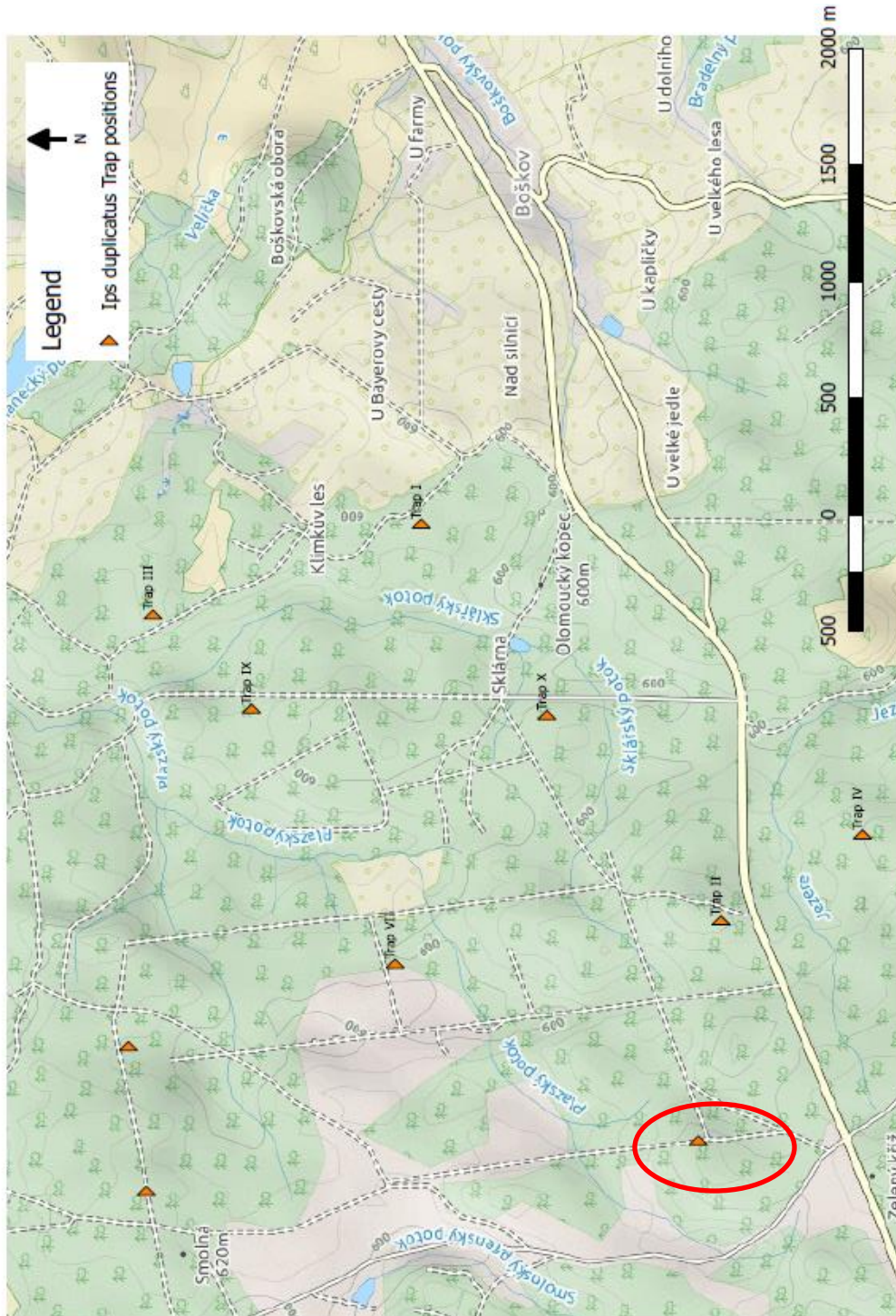
ZHANG, Q. H., SCHLYTER, F., LIU, G. T., SHENG, M. L. *Electrophysiological and behavioral responses of Ips duplicatus to aggregation pheromone in inner mongolia, China: Amitinol as a potential pheromone component*. Journal of Chemical Ecology. 2007, vol. 33, no. 5, s. 1303-1315. ISSN.0098-0331.

## 9. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1. Mapa se zákresem různých lokalit odchytu.. .....	63
Příloha č. 2. Tabulka předvýběru lokality s průměrným odchylem.....	64
Příloha č. 3. Porovnání zoubků u obou pohlaví lýkožrouta severského.....	65

## 10. PŘÍLOHY

Příloha č. 1. Mapa se zákresem různých lokalit odchytu. Lokalita označená červeným kroužkem je lokalita s největším odchtem lýkožrouta severského.



**Příloha č. 2.** Tabulka předvýběru lokality s průměrným odchylem.

Datum	Lapač č.	Porost	<i>I. duplicatus</i>	<i>I. typographus</i>
30.6.	1	372A10	22	397
10.7.			7	136
	<b>1 Průměr</b>		<b>14,5</b>	<b>266,5</b>
30.6.	2	320B9/1	40	230
10.7.			4	186
	<b>2 Průměr</b>		<b>22</b>	<b>208</b>
30.6.	3	309A7	2	5
10.7.			1	42
	<b>3 Průměr</b>		<b>1,5</b>	<b>23,5</b>
30.6.	4	362B5	4	27
10.7.			5	70
	<b>4 Průměr</b>		<b>4,5</b>	<b>48,5</b>
30.6.	5	347B8	8	7
10.7.			21	70
	<b>5 Průměr</b>		<b>14,5</b>	<b>38,5</b>
30.6.	6	343A7	45	190
10.7.			40	
	<b>6 Průměr</b>		<b>42,5</b>	<b>190</b>
30.6.	7	348A7	5	41
10.7.			2	65
	<b>7 Průměr</b>		<b>3,5</b>	<b>53</b>
30.6.	8	365A7/5	2	8
10.7.			0	9
	<b>8 Průměr</b>		<b>1</b>	<b>8,5</b>
30.6.	9	368A7b	3	7
10.7.			34	117
	<b>9 Průměr</b>		<b>18,5</b>	<b>62</b>
30.6.	10	354A9b	2	15
10.7.			2	27
	<b>10 Průměr</b>		<b>2</b>	<b>21</b>
	<b>Celkový průměr</b>		12,45	86,78947368



**Příloha č. 3.** Porovnání zoubků u obou pohlaví lýkožrouta severského (vlevo 5 samců, vpravo 5 samic).

