

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



Česká zemědělská  
univerzita v Praze

**Vnímají *I. duplicatus* a *I. typographus* stejné  
hostitelské vůně?**

Diplomová práce

Autor: Bc. Jaromír Bláha

Vedoucí práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

2021

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Jaromír Bláha

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Vnímají *I. duplicatus* a *I. typographus* stejné hostitelské vůně?

Název anglicky

Do *I. duplicatus* and *I. typographus* perceive the same host volatiles?

### Cíle práce

*Ips duplicatus* a *Ips typographus* jsou dobře definované a rozlišitelné druhy rozšířené v mnoha státech Evropy. Napadají především smrky (*Picea* spp.). V endemických fázích preferují oba druhy oslabené stromy. Dospělci obou druhů přezimují v kůře nebo hrabance. Rojí se na jaře. U obou druhů samci hledají nové hostitele a hloubí pod kůrou svatební komůrky. Během tohoto procesu emitují agregační feromony, kterým lákají další jedince svého druhu. Feromon *I. duplicatus* je dvousložková směs sestávající z racemického ipsdienolu a E-myrcenolu. Feromon *I. typographus* obsahuje také dvě hlavní komponenty, 2-methyl-3-butenol a cis-verbenol. Oba druhy jsou polygamní, mají 1–3 generace ročně a tvoří tvarem velmi podobné galerie. *I. typographus* častěji kolonizuje spodní části kmene stromu, zatímco *I. duplicatus* bývá na horní části kmene a na velkých větvích. Při vysoké populační hustotě však může kolonizovat celé stromy. Na rozdíl od *I. typographus*, *I. duplicatus* zřídka napadá padlé stromy nebo stromové lapáky (ležící nebo stojící). Uvedené rozdíly v hostitelských preferencích mohou souviset s rozdílnou citlivostí jejich čichových orgánů. S ohledem na dané skutečnosti budeme testovat hypotézu, že čichové schopnosti *I. typographus* a *I. duplicatus* se liší a tyto rozdíly tvoří základ pro odlišné chování. Plánujeme pomocí elektrofyziologických technik a plynové chromatografie studovat citlivost tykadel *I. typographus*, *I. duplicatus* k jednotlivým identifikovaným těkavým látkám smrkových emanací. Zaměříme se také na charakteristiku případných sex specifických rozdílů v citlivosti obou druhů k hostitelským vůním.

### Metodika

Metodicky bude práce zaměřena na srovnávací GC-EAD analýze vůní smrku za použití tykadel samců a samic obou druhů kůrovců.

Vůně budou zachytávány metodou dynamické head space na adsorbent a následně vymyty rozpouštědly. Použity budou kmeny smrků v různých fyziologických stavech. Výsledky budou využitelné v projektu Extemit K (deorphanizace čichových receptorů *Ips typographus*). Poslouží jako základ pro aplikaci dalších projektů a publikace.

Harmonogram prací:

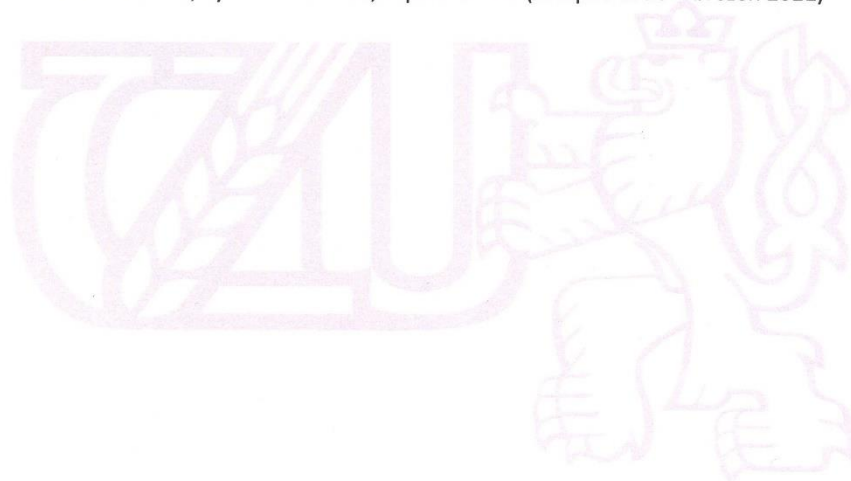
studium odborné literatury (červen 2020 – prosinec 2020)

---

sběr biologického materiálu (červen 2020 – říjen 2020)

GC-EAD a GC-MS analýzy (září 2020 – leden 2021)

Identifikace aktivních látek, vyhodnocení dat, sepisování BP (listopad 2020 – březen 2021)



## Doporučený rozsah práce

60 stran

## Klíčová slova

Ips duplicatus, Ips typographus, GC-EAD, spruce volatiles,

---

## Doporučené zdroje informací

- Byers JA, Schlyter F, Birgersson G, Francke W, 1990. E-Myrcenol in *Ips duplicatus*: an aggregation pheromone component new for bark beetles. *Experientia*, 46(11-12):1209-1211
- Holuša a Grodsky 2008 Occurrence of *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) on pines (*Pinus* sp.) in the Czech Republic. *Journal of Forest Science*, 2008, roč. 54, č. 5, s. 234 – 236. ISSN: 1212-4834.
- Holuša J, Lubojacky J and Knizek M, 2010a. Distribution of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* in the Czech Republic: spreading in 1997-2009. *Phytoparasitica*, 38, 435–443.
- Chen G, Zhang QH, Wang Y, Liu GT, Zhou X, Niu J and Schlyter F, 2010. Catching *Ips duplicatus* (Sahlberg) (Coleoptera: Scolytidae) with Pheromone-Baited Traps. Optimal Trap Type, Colour, Height and Distance to Infestation. *Pest Management Science*, 66, 213–219.
- Ivarsson et al., 1993 Demonstration of de Novo pheromone biosynthesis in *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae): inhibition of Ipsdienol and E-Myrcenol production by compactin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23(6)655-662. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90039-U](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90039-U)
- Ivarsson P. and G. Birgersson, 1995 Regulation and Biosynthesis of Pheromone Components in the Double Spined Bark Beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Insect Physiol.* Vol. 41(10) 843-849.
- Jeger M. et al., Pest categorisation of *Ips duplicatus*. 2017. Scientific opinion EFSA Journal 2017;15(10):5040. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5040
- Lubojacký et al., 2018. Atraktivita stromových lapáků pro lýkožrouta severského Zprávy lesnického výskumu 63, 2018: 48-52.
- Schlyter et al. 1992. Aggregation pheromone of *I. duplicatus* and its role in interaction with *Ips typographus*. *Chemoecology* 3:103-112.
- Zhang, Q.-H., Schlyter, F., Liu, G.-T., Sheng, M.-L., and Birgersson, G. 2007 b. Electrophysiological and behavioral responses of *Ips duplicatus* to aggregation pheromone in Inner Mongolia, China: amitinol as a potential pheromone component. *J. Chem. Ecol.* 33:1303-1315.

---

**Předběžný termín obhajoby**

2020/21 LS – FLD

**Vedoucí práce**

RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

**Garantující pracoviště**

Excelentní tým pro mitigaci

**Konzultant**

Ing. Jaromír Hradecký, PhD

Elektronicky schváleno dne 10. 7. 2020

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 18. 10. 2020

**prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.**

Děkan

V Praze dne 06. 03. 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vnímají *I. duplicatus* a *I. typographus* stejné hostitelské vůně?“ vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Blanky Kalinové, CSc. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, 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 dne .....

Podpis autora

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Blance Kalinové, CSc. za trpělivé vedení diplomové práce a její neustávající odbornou pomoc, Ing. Jaromíru Hradeckému, PhD. za analyzování vzorků, identifikaci jednotlivých chemických látek a odborné konzultace, Ing. Romanu Modlingerovi, Ph.D. a Ing. Zdeňkovi Roučovi za pomoc se sběrem vzorků v terénu. Bez těchto lidí by tato diplomová práce nemohla vzniknout.

Dále děkuji mé rodině za trpělivost a podporu.

## Abstrakt

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) a lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) napadají stejného hostitele – smrk ztepilý (*Picea abies*). Při kolonizaci však tyto druhy vykazují rozdílné preference. *Ips typographus* napadá hlavně kmen stromu od paty po začátek koruny, zatímco *Ips duplicatus* kolonizuje vršek stromu a silnější větve. *Ips duplicatus* také na rozdíl od *Ips typographus* nenapadá lapáky. Úkolem této práce bylo porovnat citlivost tykadel obou druhů a najít případný rozdíl v čichovém vnímání hostitelských vůní, který by mohl odlišné chování při kolonizaci hostitele vysvětlit. Porovnání bylo provedeno metodou GC-EAD, která zaznamenává odpovědi tykadel na jednotlivé látky hostitelské směsi rozdělené pomocí plynové chromatografie (gas chromatography, GC). Tykadla *Ips typographus* a *Ips duplicatus* byla stimulována prostřednictvím plynového chromatografu látkami, které jsou obsaženy v esenciálním oleji jehlic a malých větviček smrku *Picea abies*. V esenciálním oleji smrku bylo nalezeno celkem 16 antenálně aktivních látek a 13 z nich bylo jednoznačně identifikováno. U identifikovaných komponent byla následně porovnána účinnost stejných dávek na tykadlech obou druhů. Tykadla *Ips typographus* i *Ips duplicatus* odpovídala na stejné hostitelské sloučeniny ( $\alpha$ -pinen, camphen,  $\beta$ -pinen, myrcen,  $\alpha$ -phellandren, 3-carene, p-cymen, limonen, 1,8-cineol, linalool, isoborneol, isobornylacetát a  $\gamma$ -bisabolen). Byl však nalezen rozdíl v citlivosti tykadel zkoumaných druhů na některé látky. Při stimulaci 5 ng aktivních sloučenin byly tykadly detekovány pouze některé látky: tykadla *Ips typographus* odpovídala při této koncentraci na  $\alpha$ -pinen, myrcen, p-cymen, 1,8-cineol a linalool, zatímco tykadla *Ips duplicatus* reagovala pouze na p-cymen, 1,8-cineol a linalool. Při stimulaci 50 ng aktivních sloučenin odpovídala tykadla obou druhů na všechny identifikované látky, ale tykadla druhu *Ips typographus* byla výrazně citlivější na p-cymen a 1,8-cineol v porovnání s tykadly *Ips duplicatus*.

Získané výsledky rozšiřují poznání o čichovém vnímání *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Zjištěné rozdíly v citlivosti tykadel mohou přispívat k pozorovaným behaviorálním rozdílům srovnávaných druhů při kolonizaci hostitele.



## Abstrakt

Bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus* attack the same host - Norway spruce (*Picea abies*). However, during colonization these species show different preferences. *Ips typographus* mainly attacks the trunk of the tree from the base to the beginning of the crown, while *Ips duplicatus* colonizes the top of the tree and the thick branches. *Ips duplicatus* also, unlike *Ips typographus*, does not attack trap trees. The aim of this work was to compare the antennal sensitivity of both species and determine possible differences in olfactory perception of host odours, which could provide a basis for the observed differences during host colonization. The comparison was performed using GC-EAD method, which allows to record antennal responses (electroantennographic detection, EAD) to components of the host blend separated by gas chromatography (GC). Antennae of each respective species were stimulated via gas chromatograph by essential oil obtained from needles and twigs of *Picea abies*. In spruce essential oil, 16 EAD active substances were found for both species, 13 of them were unambiguously identified. The effectiveness of identified compounds was compared in both species at two different doses (5 and 50 ng). Both *Ips typographus* and *Ips duplicatus* responded to the same set of host compounds (e.g.  $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\alpha$ -phellandrene, 3-carene, p-cymene, limonene, 1,8-cineole, linalool, isoborneol, isobornyl acetate and *trans*- $\gamma$ -bisabolene). However, a species-specific differences in antennal sensitivity were found for some substances. At 5 ng dose *Ips typographus* antennae responded to  $\alpha$ -pinene, myrcene, p-cymene, 1,8-cineole and linalool, while *Ips duplicatus* antennae responded only to p-cymene, 1,8-cineole and linalool. Upon stimulation with 50 ng of active compounds, the antennae of both species responded to all identified compounds, but *Ips typographus* antennae were significantly more sensitive to p-cymene and 1,8-cineole compared to antennae of *Ips duplicatus*.

The obtained results expand our knowledge about olfactory perception of two important pest species *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. The identified differences in antennal sensitivity may contribute to the observed colonization preferences between the two compared species.

**Klíčová slova**

*Ips typographus*, *Ips duplicatus*, GC-EAD, smrkové těkavé látky

**Key words**

*Ips typographus*, *Ips duplicatus*, GC-EAD, spruce volatiles

## Obsah

1 Úvod.....	15
2 Cíle práce.....	16
3 Rozbor problematiky .....	16
3.1 Popis <i>Ips typographus</i> .....	16
3.2 Popis <i>Ips duplicatus</i> .....	17
3.3 Fylogenetický rozdíl.....	18
3.4 Kolonizace hostitele .....	19
3.5 Čich a chemická komunikace.....	23
3.6 Aktivní látky.....	27
3.7 Plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí .....	29
4 Metodika.....	31
4.1 Brouci .....	31
4.2 Vůně smrku .....	31
4.3 Příprava tykadla pro CG-EAD .....	32
4.4 Elektroantenografická analýza .....	36
4.5 Zpracování výsledků .....	38
4.6 Identifikace aktivních látek .....	39
4.7 Potvrzení identity látek a jejich biologické aktivity pomocí syntetických standardů .....	39
4.8 Identifikační schéma .....	40
5 Výsledky.....	41
5.1 GC-EAD analýzy EO smrku .....	41
5.2 Identifikace antenálně aktivních látek.....	44
5.3 Porovnání citlivosti tykadel <i>Ips typographus</i> a <i>Ips duplicatus</i> na syntetické standardy antenálně aktivních látek .....	45
6 Diskuze.....	47
7 Závěr.....	52
8 Seznam literatury.....	53
Seznam příloh.....	59
Přílohy .....	60

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Fylogenetický strom rodu <i>Ips</i> .....	18
Obrázek 2: Kůrovci živící se na smrku a místa stromu, která běžně napadají .....	20
Obrázek 3: Třídy ORN identifikované pro <i>Ips typographus</i> .....	25
Obrázek 4: Fotografie ventrální strany paličky tykadla <i>Ips typographus</i> se senzily .....	26
Obrázek 5: Tykadlo s hlavou <i>Ips typographus</i> .....	33
Obrázek 6: Izolované tykadlo <i>Ips typographus</i> .....	33
Obrázek 7: Zafixovaný lýkožrout smrkový v pipetovací špičce .....	34
Obrázek 8: Zapojený celý živý brouk <i>Ips typographus</i> .....	35
Obrázek 9: Spojená plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí .....	37
Obrázek 10: Vyhodnocení záznamu GC-EAD .....	38
Obrázek 11: Celkový záznam měření EO smrku v nižší koncentraci 1 mg/ml. ...	41
Obrázek 12: Celkový záznam měření EO smrku ve vyšší koncentraci 10 mg/ml. ...	42
Obrázek 13: První část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml pro oba druhy kůrovců <i>Ips typographus</i> a <i>Ips duplicatus</i> .....	43
Obrázek 14: Druhá část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml pro oba druhy kůrovců <i>Ips typographus</i> a <i>Ips duplicatus</i> .....	43
Obrázek 15: Rozdíl ve složení vzorků EO a dynamické headspace kmene .....	51

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam látek, které byly prokázány jako aktivní pro <i>Ips typographus</i> .....	27
Tabulka 2: Seznam látek, které byly prokázány jako aktivní pro <i>Ips duplicatus</i> .	29
Tabulka 3: Seznam látek obsažených v EO smrku, které byly aktivní pro oba druhy kůrovců <i>Ips typographus</i> a <i>Ips duplicatus</i> .....	44
Tabulka 4: Velikost odpovědí <i>Ips typographus</i> na směs A.....	46
Tabulka 5: Velikost odpovědí <i>Ips duplicatus</i> na směs A.....	46
Tabulka 6: Velikost odpovědí <i>Ips typographus</i> na směs B.....	46
Tabulka 7: Velikost odpovědí <i>Ips duplicatus</i> na směs B.....	46
Tabulka 8: Seznam aktivních látek v EO smrku a jejich porovnání s již publikovanými údaji pro <i>Ips typographus</i> .....	48

## Seznam grafů

Graf 1: Porovnání snížení citlivosti tykadel.....	36
---------------------------------------------------	----

## Seznam zkratk

OR	Čichový receptor (odorant receptor)
ORN	Čichový receptorový neuron (olfactory receptor neuron)
GC	Plynový chromatograf (gas chromatograph)
EAD	Elektroantenografická detekce (electroantennography detection)
GC-EAD	Plynová chromatografie spojená s elektroantenografickou detekcí
FID	Plamenoionizační detektor (flame ionization detector)
MS	Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
SSR	Záznam z jednotlivých čichových senzil (single sensillum recordings)
ČZU	Česká zemědělská univerzita
EO	Esenciální olej
NHV	Nehostitelské těkavé látky (non-host volatiles)

## 1 Úvod

Hlavní hospodářskou dřevinou v České republice je smrk ztepilý (*Picea abies* L., Karst.), který tvoří 49,5 % dřevinné skladby lesů (Ministerstvo zemědělství, 2019). Vzhledem k opakovaným a déletrvajícím obdobím sucha, vyšší průměrné teplotě a dalším faktorům spojeným s probíhající klimatickou změnou dochází k oslabení smrkových porostů a jejich častému napadení hmyzími škůdci, především kůrovci. V roce 2019 dosáhl objem vytěženého kůrovcového dříví 20,7 mil. m<sup>3</sup>, přičemž převážná část byla napadena lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus* L., *Coleoptera*, *Curculionidae*), doprovázeným lýkožroutem lesklým (*Pityogenes chalcographus* L., *Coleoptera*, *Curculionidae*) a lokálně lýkožroutem severským (*Ips duplicatus* Sahlberg, *Coleoptera*, *Curculionidae*). Téměř na celém území České republiky se smrkoví kůrovci vyskytují v kalamitním stavu, nejvíce napadené oblasti jsou však na území severní Moravy, Vysočiny a jižních Čech (Ministerstvo zemědělství, 2019).

Lýkožrout severský je u nás relativně novým druhem, kdy první zmínky o jeho výskytu na území České republiky pochází z první poloviny 20. století, v 70. letech 20. století se rozšířil na severovýchodní Moravě a nyní se již vyskytuje na celém našem území (Holuša et al., 2006). Lýkožrout severský, na rozdíl od lýkožrouta smrkového, nenapadá ležící dříví (lapáky), které se běžně používá jako obranné opatření proti lýkožroutu smrkovému (Lubojacký, Liška, Knížek, 2018). Tento fakt velmi znesnadňuje účinnou obranu proti tomuto škůdci a jeho kontrolu v porostech. Dalším rozdílem v chování mezi lýkožroutem smrkovým a severským je preferovaná část stromu, kterou napadají. Lýkožrout severský napadá vršky stromů, zatímco lýkožrout smrkový preferuje silnější části kmene. Dále lýkožrout severský napadá jednotlivé stromy roztroušeně v porostu na rozdíl od lýkožrouta smrkového, který vytváří větší ohniska (Knížek, Holuša, 2007).

Rozdíly v chování těchto druhů mohou být způsobeny různými faktory, mimo jiné také odlišným vnímáním těkavých látek, které jsou uvolňovány z hostitelských rostlin (semiochemikálií). Tato práce se snaží zjistit, zda existuje rozdíl v čichovém vnímání lýkožrouta smrkového a severského, který by mohl být základem odlišného chování při vyhledávání a kolonizaci smrku.

## 2 Cíle práce

Cílem práce bylo najít rozdíl mezi čichovým vnímáním hostitelských semiochemikálií dvou druhů kůrovců na smrku *Ips duplicatus* a *Ips typographus*. Čichové schopnosti kůrovců byly zkoumány pomocí elektrofyziologického záznamu reakcí tykadel po čichovém podráždění. Tykadla byla stimulována těkavými látkami smrku prostřednictvím plynového chromatografu (technika zvaná plynová chromatografie s elektroantennografickým detektorem, GC-EAD). Vzhledem k tomu, že lýkožrout severský napadá vršky stromů, zatímco lýkožrout smrkový spíše silnější části kmene (Knížek, Holuša, 2007), byl použit vzorek těkavých látek získaných z jehlic a drobných větviček smrku. Látky, které vyvolávaly aktivitu tykadla, byly identifikovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a jejich identita a antenální aktivita byly potvrzeny pomocí syntetických standardů. Odpovědi tykadla na jednotlivé látky byly porovnávány mezi oběma druhy.

Případné rozdíly ve vnímání látek obsažených v jehlicích smrku by mohly pomoci vysvětlit rozdílné chování lýkožrouta severského a smrkového a nově identifikované látky by mohly přispět ke zlepšení kontroly lýkožrouta severského, která je nyní poměrně komplikovaná.

## 3 Rozbor problematiky

### 3.1 Popis *Ips typographus*

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*, Linnaeus, 1758) je rozšířen s výjimkou Velké Británie po celé Evropě, dále na východ přes Sibiř, Čínu, Koreu až po Japonsko, kde tvoří morfologicky odlišnou formu. Ve střední Evropě je jedním z nejvýznamnějších škůdců smrkových porostů. Patří do řádu brouků (Coleoptera) a čeledi nosatcovitých (Curculionidae). Dospělý brouk měří 4-5,5 mm, je černohnědé barvy, válcovitého tvaru s netečkovaným mezirýžím na krovkách a zprohýbanými švy na paličce tykadla (Zahradník, Knížek, 2007). Samice se od samce liší vyšší hustotou chloupků na pronotu a frons a menším čelním hrbolkem (Schlyter, Cederholm, 1981). Hostitelský strom vyhledávají samci, kteří pod kůrou hloubí snubní komůrku, do které pomocí agregačního



feromonu lákají 1-3 samice. Samice po spáření vrtají 6-12 cm dlouhé matečné chodby, do kterých kladou vajíčka. Vylíhnuté larvy hlodají kolmo na matečnou chodbu larvální chodby, na jejichž konci se kuklí. Čerstvě vylíhnutí brouci jsou bílí a v průběhu úživného žíru tmavnou. Celkový vývoj trvá v závislosti na podmínkách průměrně 6-10 týdnů (Zahradník, Knížek, 2007). Část rodičovských brouků může znovu vyletět a na stejném, nebo jiném stromě založit sesterskou generaci. Před výletem z původního požerku musí brouci rodičovské generace znovu prodělat úživný žír pro tvorbu tukového tělesa a obnovu létacích svalů, které jim po zavrtání do hostitele degradovaly a u samic se na jejich místo přesunuly vaječníky (Skuhrový, 2002).

Ve střední Evropě je téměř výhradním hostitelem *Ips typographus* smrk ztepilý (*Picea abies*), výjimečně také modřín opadavý (*Larix decidua*) a v ojedinělých případech i borovice lesní (*Pinus sylvestris*). V jiných oblastech jsou hostitelem další druhy smrků jako *Picea omorica*, *Picea obovata*, *Picea jezoensis* a případně borovice *Pinus cembra sibirica* (Zahradník, Knížek, 2007).

### **3.2 Popis *Ips duplicatus***

Lýkožrout severský (*Ips duplicatus*, Sahlberg 1836) stejně jako jeho příbuzný *Ips typographus* patří do řádu brouků (Coleoptera) a čeledi nosatcovitých (Curculionidae). Původně byl rozšířen v severské tajze od Švédska po Sachalin a v oblastech horského areálu smrku ztepilého v Alpách (Knížek, Holuša, 2007). Na začátku 70. let 20. století se objevují první výskyty tohoto druhu na severovýchodě České republiky a již v roce 1997 byl zaznamenán na celém našem území (Holuša, Lubojacký, Knížek, 2010). Nyní je rozšířen v 15 zemích Evropské unie a místně se v některých z nich dál šíří. Ve Velké Británii, Irsku a Řecku jsou proti tomuto škůdci zavedená ochranná pásma (Jeger et al., 2017).

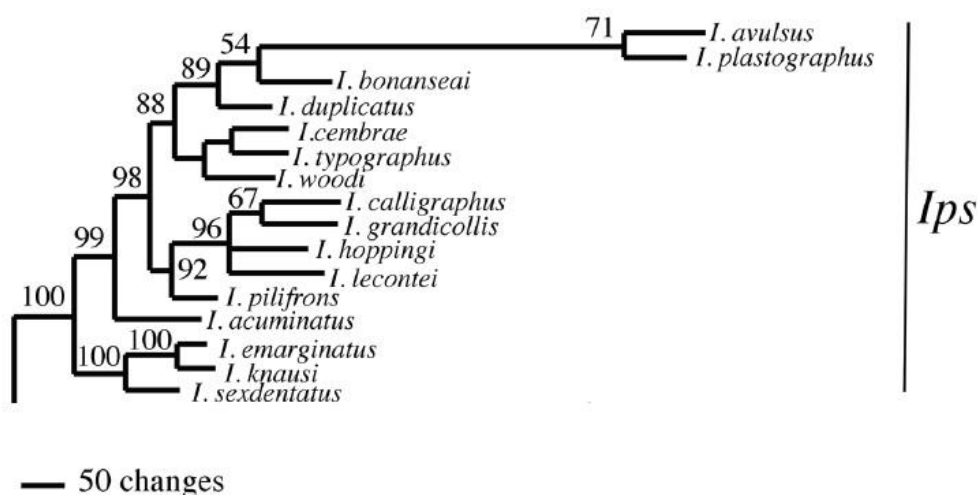
Dospělý brouk je 2,8-4,5 mm dlouhý, lesklý, černohnědé až černé barvy. Krovky mají tečkované mezirýží a na zadní zkosené straně jsou 4 páry zubů, jejichž rozmístění není rovnoměrné jako u *Ips typographus* ale prostřední dva páry zubů jsou v těsnější blízkosti v porovnání s ostatními zuby. U samce je třetí pár zoubků největší a na konci rozšířený, zatímco samice toto rozšíření postrádá. Požerek lýkožrouta severského je podobný jako u lýkožrouta smrkového, jen celkově menší. Celková doba vývoje je v průměru 6-8 týdnů (Knížek, Holuša, 2007). Doba vývoje

velmi závisí na okolní teplotě, kdy se při pokusech v laboratorních podmínkách zkrátila z 39 dnů při 15 °C na 10,3 dne při 30 °C. Celková doba vývoje *Ips duplicatus* je o 4 dny kratší (při 30 °C) než u *Ips typographus* a dokonce o 10 dní kratší při 15 °C (Davídková, Doležal, 2019). I přes kratší dobu vývoje *Ips duplicatus* se zdá, že fenologické modely obou druhů jsou velmi podobné s hlavním vrcholem letové aktivity na začátku května a v půlce července (v roce 2010) (Holuša, Lukášová, Lubojacký, 2012).

Hlavní hostitelskou dřevinou *Ips duplicatus* ve střední Evropě je smrk ztepilý (*Picea abies*), na Sibiři pak *Picea obovata* a *Picea ajanensis*. V severské tajze se vyskytuje i na borovicích *Pinus sylvestris* a *Pinus sibirica* (Knížek, Holuša, 2007). Ve východní části České republiky a jižním Polsku byly zaznamenány ojedinělé výskyty lýkožrouta severského na borovici *Pinus strobus* a *Pinus sylvestris*, ale jednalo se o oblast s dlouhodobě zvýšenou populační hustotou *Ips duplicatus* a o případy jednotlivých stromů ve smrkových porostech (Holuša, Grodzki, 2008).

### 3.3 Fylogenetický rozdíl

*Ips duplicatus* je často zaměňován s *Ips typographus* a pro mnoho fenotypových a bionomických podobností často není rozpoznán. Přesto se nejedná o blízce příbuzné druhy. Při porovnání sekvencí mitochondriálních genů se oba druhy liší o více než 12 % a jsou dobře rozpoznatelné (Lakatos et al., 2007).



Obrázek 1: Fylogenetický strom rodu *Ips* založený na Bayesian analýze nukleotidů z 5 genů, který ukazuje poměrně velkou příbuzenskou vzdálenost *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Zdroj: Cognato, 2013.

V rámci samotného druhu *Ips duplicatus* byly objeveny dva hlavní haplotypy, Evropský a Asijský, které se od sebe liší 0,8 % sekvencí genů. Tímto faktem by mohly být vysvětleny odlišnosti mezi těmito populacemi jako jiné poměry hlavních feromonových komponentů a přítomnost amitinolu jako minoritního feromonového komponentu v asijské populaci (Lakatos et al., 2007).

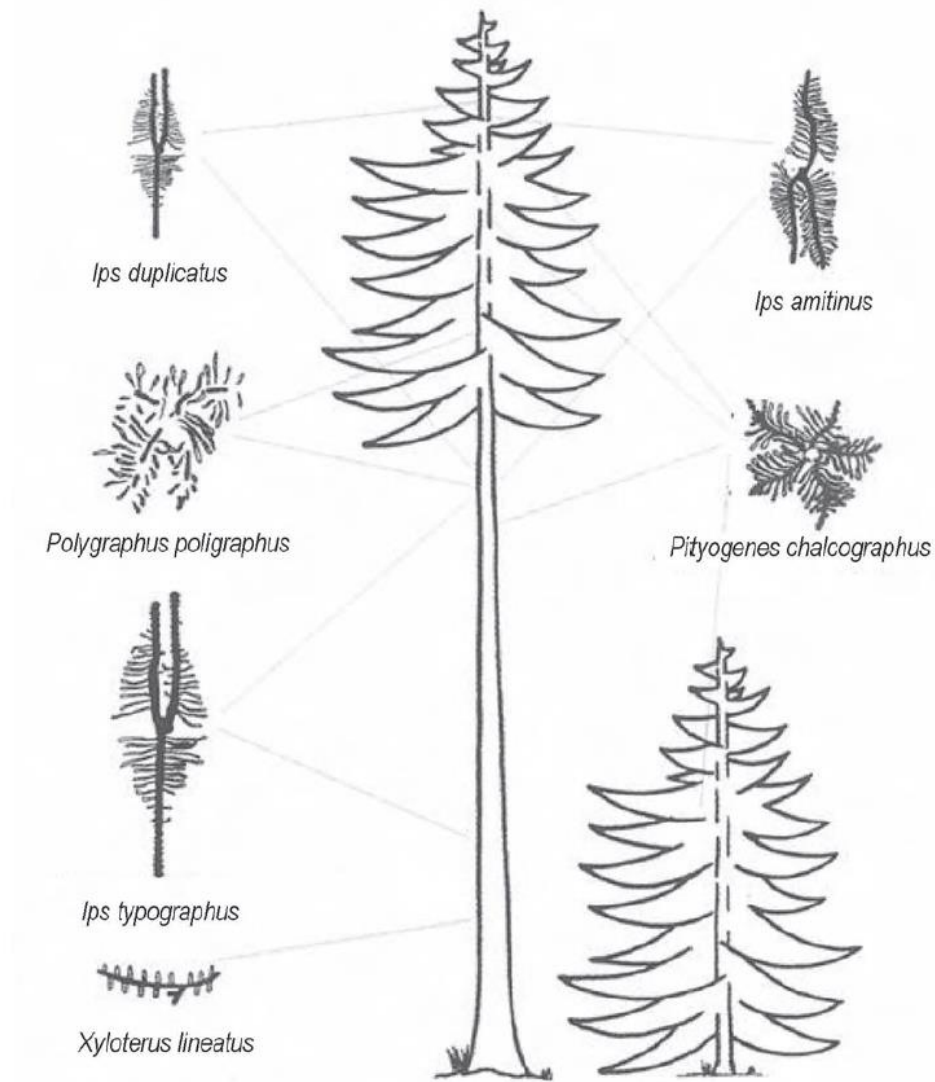
### 3.4 Kolonizace hostitele

*Ips typographus* je hlavně sekundárním škůdcem a napadá nejprve čerstvě pokácené dříví, polomy a fyziologicky oslabené stojící stromy. Při namnožení do vyšších populačních hustot a nedostatku vhodných hostitelů napadá i zdravé stromy. Nejčastěji ho nalézáme ve smrkových porostech nad 60 let na teplých osluněných porostních stěnách, nebo uvnitř porostů s nižším zakmeněním, kde zakládá ohniska žíru. Při náletu napadá spodní část kmene ve vzdálenosti přibližně metr od oddenku až k rozhraní suchých a zelených větví (viz obr. 2). Při napadení ležícího dříví se zavrtává po celé délce kmene vhodné šířky (tedy bez tenké vrcholové části kmene), kde se může rozmnožovat (Zahradník, Knížek, 2007).

Stejně jako *Ips typographus* je *Ips duplicatus* zejména druhotným škůdcem, který napadá oslabené stromy. Na rozdíl od lýkožrouta smrkového však neobsazuje ležící dříví (lapáky a polomy) a napadá stojící stromy roztroušeně v porostu (nezakládá ohniska). Tím se komplikuje jeho kontrola a ochrana lesa. Navíc nebyl prokázán jeho odchyt ani do stojících lapáků (stojících stromů s přerušným lýkem). *Ips duplicatus* preferuje nejčastěji smrkové porosty ve věku 40-80 let a nalétává do vršků stromů a silnějších větví (viz obr. 2). V této části kmene se jeho požerky mohou mísit s kůrovcem *Pityogenes chalcographus*. Další druhy menších kůrovců napadajících smrk jako *Ips amitinus* a *Polygraphus poligraphus* jsou prostoroví konkurenti *Ips duplicatus*, s nimiž se jeho požerky nemísí, ale jednotlivé druhy zpravidla obsazují izolované části stromu (Knížek, Holuša, 2007).

V případě *Ips typographus* vybírají vhodného hostitele pionýrští samci. Ve vyváženém ekosystému preferují fyziologicky oslabené stromy a zdravým se vyhýbají. Po zavrtání do stromu lákají další jedince obou pohlaví pomocí agregačního feromonu, jehož hlavní složky tvoří *cis*-verbenol a 2-metyl-3-buten-2-ol. Přilákání samci tvoří nové závrtky a samice si vybírají partnera k páření (Jakuš, Holuša, Blaženec, 2015). Účinek agregačního feromonu je u mnoha druhů kůrovců

potencován hostitelskými terpenickými látkami, které se uvolňují z rostlinných tkání poškozených při hloubení snubní komůrky (Seybold, Bohlmann, Raffa, 2000).



Obrázek 2: Kůrovci živící se na smrku a místa stromu, která běžně napadají. U každého druhu kůrovce je zobrazen jeho typický požerek. Zdroj: Holuša et al., 2006.

Vliv hostitelských terpenů na agregaci *Ips typographus* není jednoznačně prokázán a je možné, že jejich účinek závisí na koncentraci. V polních experimentech bylo prokázáno, že přidání hlavního smrkového monoterpenu (-)- $\alpha$ -pinenu k agregacnímu feromonu *Ips typographus* ve vysokých poměrech (526:1 –  $\alpha$ -pinen:feromon) zvyšuje jeho odchyty oproti samotnému feromonu. V nižších poměrech však neměl  $\alpha$ -pinen na velikost odchyty vliv (Erbilgin, 2007). Pomocí

elektrofyzilogického záznamu aktivity čichových orgánů (tykadel) a čichových senzil bylo zjištěno, že mnoho hostitelských látek kůrovec prokazatelně vnímá, avšak nebylo doposud dokázáno, zda a případně jak tyto aktivní látky zvyšují atraktivitu hostitele (Shiebe et al., 2015). V pozdější fázi kolonizace hostitele samci přestávají uvolňovat agregační feromon a začínají produkovat anti-agregační feromony ipsdienol a verbenon, které nejprve regulují prostorové rozložení kůrovců na hostiteli a v případě jeho plné obsazenosti zajišťují přesměrování přilétajících brouků na okolní stromy, čímž vzniká ohnisko žíru (Skuhřavý, 2002).

V případě *Ips duplicatus* vybírají hostitelský strom také samci. Jejich agregační feromon tvoří složky E-myrcenol a ipsdienol (Byers et al., 1990). Podobně jako u *Ips typographus* je synergický účinek hostitelských terpenů na atraktivitu agregačního feromonu *Ips duplicatus* závislý na jejich koncentraci. Přidáním  $\alpha$ -pinenu k syntetickému feromonu v nízkém poměru feromonu: $\alpha$ -pinenu (1:40) se zvýšila velikost atrakce jen mírně. Při větším poměru synergický efekt zmizel. Synergický účinek  $\alpha$ -pinenu a feromonu umocněn přidáním dalšího hostitelského terpenu limonenu (až o 250 % v závislosti na poměru feromon:terpeny, větší poměry chytaly více brouků). Samotný limonen však atraktivitu feromonu nezvyšoval (Duduman, 2013). Atraktivitu hostitelských vůní pro *Ips duplicatus* dokazuje jeho vyšší četnost v oblastech po těžbě stromů s ponechanými těžebními zbytky oproti místům s podobnými charakteristikami bez těžebních zbytků (Duduman, 2012).

Při vyhledávání hostitelského stromu hrají významnou roli i nehostitelské látky vylučované z listů nebo kůry listnatých stromů (C6-8-alkoholy, *trans*-conophthorin), které působí repelentně. Se zvyšující se koncentrací těchto látek v prostředí se snižuje pravděpodobnost náletu kůrovců na daný porost (Jakuš, Holuša, Blaženec, 2015). Nehostitelské látky ovlivňují chování kůrovců na určitou vzdálenost. V polních experimentech s lapači navnaděnými feromonem a nehostitelskými těkavými látkami, byla účinnost kombinované návnady závislá na jejich vzdálenosti. Při vzdálenosti feromonu a zdroje nehostitelských látek 1 metr lákal feromon méně kůrovců *Ips typographus* než feromon bez nehostitelských látek v okolí. Pokud bylo umístění zdroje nehostitelských látek a feromonu identické byla atraktivita feromonu velmi výrazně snížena. (Andersson et al., 2011).

Odpudivého účinku nehostitelských vůní je možné využít i v praxi pro ochranu individuálních stromů. Po ošetření okraje porostů odparníky se zdroji nehostitelských látek lze při kalamitních stavech *Ips typographus* snížit napadení stromů až o 76 % v závislosti na množství aplikovaných odparníků s nehostitelskými látkami. Při nižší populační hustotě kůrovci napadají výhradně stromy ve vzdálenosti více než 15 m od skupinek stromů ošetřených nehostitelskými látkami (Schiebe et al., 2011).

Zdá se, že se oba druhy kůrovců navzájem dobře vnímají, neboť vždy kolonizují různé části kmene a jejich agregační feromony zabraňují náletu druhého druhu na stejnou část stromu. Zvláště je pak významná inhibice samců *Ips typographus* E-myrcenolem (Schlyter et al., 1992). Další mezidruhovú interakce byla dokázána mezi *Ips typographus* a kůrovci rodu *Dendroctonus*. Atraktivita feromonu *Ips typographus* se zvyšuje po přidání nízkých dávek exo-brevicominu, což je složka feromonu rodu *Dendroctonus*. Naopak vyšší koncentrace exo-brevicominu atraktivitu feromonu lýkožrouta smrkového snižovaly. Lze tedy naznačit možnost spolupráce mezi těmito druhy, pokud vysoké koncentrace exo-brevicominu nesignalizují velkou obsazenost hostitele kůrovci rodu *Dendroctonus* (Tommeras, Madsen, Mustaparta, 1989).

Kolonizace stromu kůrovci je spojeno se spuštěním obranné reakce stromu. V první fázi se z poškozených pryskyřičných kanálků uvolňuje pryskyřice, která často kůrovce zalije a zabrání tak dalšímu pronikání lýkožroutů do nitra stromu. Pryskyřice je součástí tzv. vrozené neboli konstitutivní obrany stromu. Po výronu pryskyřice se její složení i konzistence mění, lehké monoterpeny a později i seskviterpeny vytékávají, zatímco těžší diterpeny krystalizují a tvoří tak pevnou fyzickou zábranu pro vstup patogenů. Buňky okolo poškozeného místa odumírají a zapouzdřují se kalusem (hojivým pletivem), který představuje další mechanickou bariéru. Další buňky okolo napadeného místa se aktivizují a začínají tvořit nové struktury (tzv. traumatické pryskyřičné kanálky a nové parenchymatické buňky), které indukují další toxické látky a zvyšují následnou obranyschopnost stromu (indukovaná obrana). Terpenické a fenolické látky konstitutivní i indukované pryskyřice jsou pro kůrovce toxické. Část z nich dokáží kůrovci detoxikovat a přeměňovat na látky méně toxické. Některé produkty detoxifikace jsou využívány

jako složky agregačního feromonu (*cis-verbenol*, který je produkován oxidací  $\alpha$ -pinenu ve střevech *Ips typographus*) (Jakuš, Holuša, Blaženec, 2015).

*Ips typographus* i *Ips duplicatus* na svém povrchu přenášejí mnoho druhů hub (např. *Ceratocystis polonica*, která způsobuje modré zabarvení dřeva). Tyto houby napadají vodivá pletiva, blokují transport vody a snižují tak obranyschopnost stromu, což může být jeden z důvodů, proč oba druhy kůrovců mohou při vyšších populačních hustotách úspěšně napadat a usmrtit i zdravé stromy (Krokene a Solheim, 1996).

### 3.5 Čich a chemická komunikace

Významná část smyslových receptorů hmyzu je umístěna ve velkém počtu vysoce specifických orgánů zvaných senzily. Tyto senzorycké orgány jsou rozmístěny po celém těle, s největší koncentrací v oblasti tykadla a ústních přívěsků (labium a palpy). Podle vnímaných podnětů se senzily dělí na čichové, chuťové, mechanické, a ty které vnímají vlhkost a teplotu. Mívají různé tvary, vnitřní i vnější uspořádání. Hlavním čichovým orgánem kůrovců jsou tykadla. Na svém povrchu nesou různé typy senzily (ve tvaru vlásků, kolíků, kuželů a jamek aj.). Podle tvaru a kutikulární substrukury jsou senzily kategorizovány jako mechanoreceptory nebo chemoreceptory (senzily čichové a chuťové). Čichové senzily lze dělit do několika tříd. Senzila trichodea má tvar vlásku a slouží k vnímání feromonů, senzila basiconica se jí podobá, jen je kratší, silnější a podílí se na vnímání hostitelských vůní a senzila coeloconica, která má tvar malých kolíků v jamkách. Pro čichové senzily je charakteristický perforovaný kutikulární povrch. Chuťové senzily mají kutikulární povrch kompaktní a je pro ně charakteristická přítomnost jednoho póru na vrcholu (Nowinska, Brozek, 2017). Mechanoreceptci sloužící tzv. senzila chaetica je dlouhý kutikulární chloupek, s výskytem podélných rýh bez perforací (Wang et al., 2016). Na tykadle *Ips typographus* byly identifikovány 3 typy senzily trichodea, 2 typy senzily chaetica, 3 typy senzily basiconica, jeden typ senzily coeloconica a jeden typ tzv. Böhmových senzily (Shi et al., 2021). Všechny senzily se nachází výhradně na ventrální straně paličky na konci tykadla, uspořádané do dvou zvlněných pásů, a oblasti na špičce paličky (Andersson et al., 2009).

Čichové senzily jsou klíčové pro vnímání a rozlišování těkavých látek, které ovlivňují chování kůrovců (feromonů, hostitelských a nehostitelských rostlinných

látek apod.). Ve svém nitru skrývají 1 a více čichových receptorových neuronů (ORN), které jsou zásadní v procesu vnímání semiochemikálií.

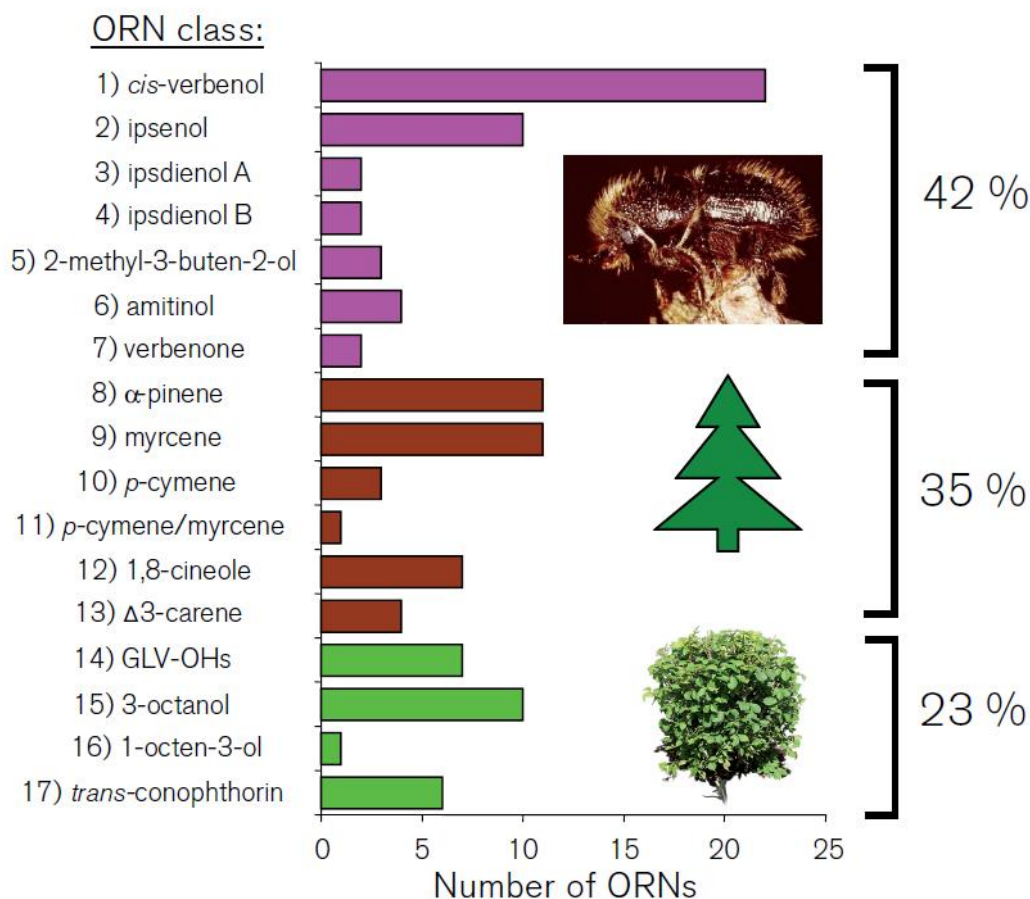
Molekuly semiochemikálií rozptýlené ve vzduchu pronikají kutikulárními póry do nitra senzila, kde reagují s čichovými receptory (OR) čichových receptorových neuronů (ORN). OR jsou bílkovinné molekuly, které jsou součástí buněčné membrány dendritu ORN. Po navázání molekuly vůně na OR, dochází k podráždění ORN (vzniká tzv. receptorový potenciál). Pokud je podráždění dostatečně silné, generují ORN tzv. akční potenciály, které jsou axony ORN vedeny k dalšímu zpracování do mozku (do tzv. antenálního laloku, primárního čichového centra mozku). Typickým signálem generovaným čichovým neuronem po podráždění je přechodné zvýšení frekvence akčních potenciálů. ORN obsahují vždy jen jeden typ OR. Jednotlivé OR jsou klasifikovány podle profilů látek, na které reagují (tzv. odpovědní profily). Často jsou velmi specifické a aktivují se jen jednou, nebo několika málo příbuznými sloučeninami (tzv. specialisté). V případě specialistů je čichový vjem charakterizován aktivitou jen jednoho typu ORN (specializovaná dráha, tzv. labeled line). Mnohé ORN ale reagují na široké spektrum látek (tzv. generalisté). Specializované OR vnímají například jednotlivé komponenty feromonů. Rostlinné vůně (většinou složité směsi různých typů těkavých látek), jsou naproti tomu vnímány ORN s širšími spektry odpovědí. U těchto neferomonových vůní obvykle jeden typ molekuly interaguje s více než jedním ORN a každý určitý ORN může být podrážděn více než jedním typem molekul. Čichový vjem je tak charakterizován kombinací aktivovaných ORN (across fiber pattern, kombinatorický kód).

Čichové receptory jsou kódované velkou a různorodou skupinou OR genů. Obecně se předpokládá, že v každém ORN je exprimován jenom jeden typ OR (Andersson, 2012). U *Ips typographyus* bylo doposud identifikováno více jak 70 typů OR a zdaleka ne pro všechny známe ligandy (Yuvaraj et al., 2020).

Specifická ORN přítomných v senzilech na tykadlech *Ips typographyus* byla opakovaně testována pomocí elektrofyziologických technik, především pomocí snímání aktivity z jednotlivých senzila. Z celkového počtu doposud zkoumaných 150 ORN lze vytvořit 17 skupin (viz obr. 3) s ohledem na jejich citlivost k feromonům kůrovců, hostitelským a nehostitelským látkám. Nejvíce feromonových



ORN reaguje na *cis*-verbenol, jednu ze dvou klíčových feromonových komponent *Ips typographus*. Naopak bylo nalezeno pouze několik ORN odpovídajících na 2-metyl-3-buten-2-ol, druhou klíčovou feromonovou komponentu, která je však produkována lýkožroutem smrkovým v mnohem větším množství. Několik skupin ORN je silně specifických na vnímání jednotlivých typů monoterpenů jehličnanů a přibližně 25 % ORN je přímo naladěno na vnímání nehostitelských rostlinných látek, což indikuje možný vysoký význam, které tyto látky pro brouky představují. Zjistilo se, že rozmístění senzil na tykadle není náhodné, ale jsou specificky rozmístěny na obou zvlněných pásech senzil, nebo na špičce paličky tykadla (viz obr. 4) (Andersson, 2011).

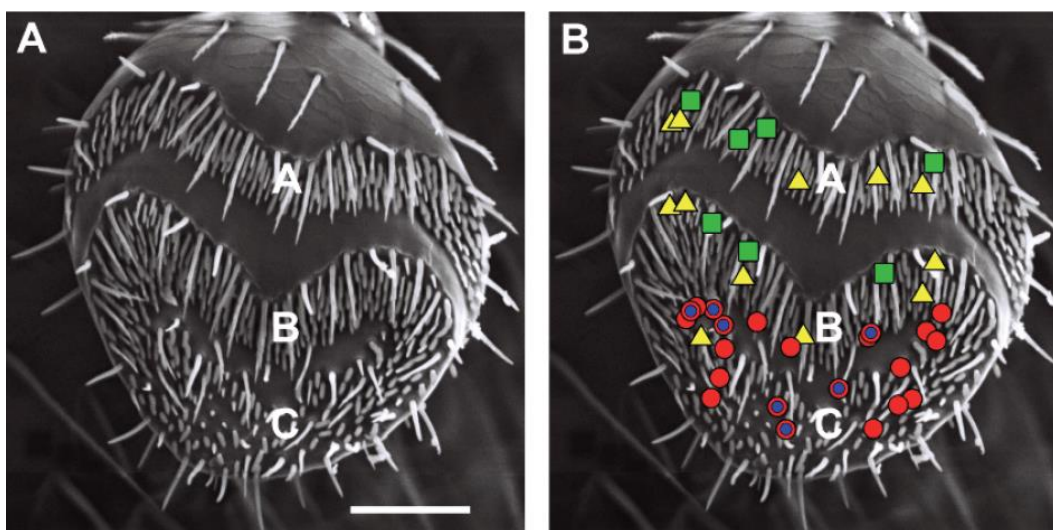


Obrázek 3: Počet nalezených ORN (osa x) rozdělených na 17 tříd (osa y). Třídy ORN jsou označeny komponentou, která vyvolávala nejsilnější odpověď. Třídy ORN jsou rozděleny do kategorií podle původu daných látek. Růžově jsou značeny složky feromonů kůrovců, hnědě hostitelské látky a zeleně nehostitelské látky. Zdroj: Andersson, 2011.

Pro kůrovce bývají mnohdy důležité látky, které se vyskytují v prostředí nebo v hostiteli jen v malých množstvích. Příkladem může být 1,8-cineol, který je

domnělou složkou indukované obrany smrků a bylo zjištěno, že silně redukuje atraktivitu *Ips typographus* k agregačnímu feromonu. Bylo také zjištěno, že skupina ORN odpovídajících na 1,8-cineol se vždy nachází ve stejné senzile jako ORN reagující na feromonovou složku *cis*-verbenol, přičemž ORN vnímajících *cis*-verbenol je více, ale přibližně polovina z nich byla přítomna v senzile spolu s ORN reagujícím na 1,8-cineol (viz obr. 4). Tato společná přítomnost ORN vnímajících feromonové a hostitelské látky v jedné senzile je odlišná od jiných druhů hmyzu, například mūr, které mají tyto druhy ORN častěji rozdělené v odlišných senzilách. Zmíněná elektrofyziologická analýza specifity ORN jednoznačně ukázala, že kůrovci vnímají jak pozitivní (atraktivní signály např. feromon), tak i negativní signály (nehostitelské vůně, specifické vůně hostitele). A vzájemná interakce pozitivních a negativních podnětů pak předurčuje chování.

U hmyzu jsou pro behaviorální rozhodnutí často důležité poměry látek v dané směsi. Předpokládá se, že společná přítomnost ORN v senzilách zlepšuje hodnocení těchto poměrů ve směsích semiochemikálií (Raffa, Andersson, Schlyter, 2016).



Obrázek 4: Fotografie ventrální strany paličky tykadla *Ips typographus* se senzilami. Na obrázku A jsou jednotlivé oblasti výskytu senzil – A a B jsou zvlněné pásy senzil a C je oblast senzil na špičce tykadla. Na obrázku B je zobrazeno rozmístění 4 tříd ORN. Zelené čtverce jsou ORN reagující na nehostitelské látky, žluté trojúhelníky jsou ORN odpovídající na myrcen (hostitelská látka), červené kruhy na feromonový komponent *cis*-verbenol a modrá kolečka jsou ORN vnímající 1,8-cineol vždy kolokalizovaná v senzile s ORN pro *cis*-verbenol. Rozložení ORN není náhodné a zobrazuje umístění ORN vnímajících *cis*-verbenol na špičce tykadla a ORN pro hostitelské a nehostitelské látky rozmístěné ve dvou zprohýbaných pásech. Měřítko na obrázku A je 50  $\mu$ m. Zdroj: Andersson, 2011.

### 3.6 Aktivní látky

Jak vyplývá z výše uvedeného, čichové schopnosti *Ips typographus* již byly v minulosti vícekrát zkoumány pomocí elektrofyziologického záznamu z celých tykadel (elektroantenogram) i z jednotlivých čichových sensil (tzv. elektrosenzilografie, SSR). Pro většinu semiochemikálií, které vyvolávaly odpověď celého tykadla (metoda EAD) byl nalezen i specifický ORN (metoda SSR). Nicméně některé látky zatím nebyly podrobeny oběma způsobům testování a u mnohých neznáme jejich behaviorální účinky (viz tab. 1).

U kůrovce *Ips duplicatus* bylo zkoumáno pouze několik nehostitelských a feromonových látek na úrovni celého tykadla (EAD), analýza pomocí SSR nebyla doposud provedena (viz tab. 2).

Tabulka 1: Seznam látek, které byly prokázány jako aktivní pro *Ips typographus*.

Semiochemikálie	Biologický zdroj	Typ fyziologického testování	Behaviorální odpověď	Zdroj
(-)- <i>cis</i> -Verbenol	Feromon	EAD, SSR	+	1, 4, 5, 8
(+)- <i>trans</i> -Verbenol	Feromon	EAD, SSR		1, 5, 8
(-)- <i>trans</i> -Verbenol	Feromon	EAD, SSR		1, 4
(+)-Verbenone	Feromon	EAD		1, 2, 6
(-)-Verbenone	Feromon	EAD, SSR	-	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9
2-Methyl-3-buten-2-ol	Feromon	EAD, SSR	+	1, 4, 5, 8
(+)-Ipsdienol	Feromon	EAD, SSR		1, 4, 5, 8
(-)-Ipsdienol	Feromon	EAD, SSR		1, 4, 5, 8
(+)-Ipsenol	Feromon	EAD, SSR	-	1, 4
(-)-Ipsenol	Feromon	EAD, SSR	-	1, 4, 5, 8
Amitinol	Feromon	EAD, SSR		1, 4, 5, 8
Phenylethanol	Feromon	EAD, SSR		1, 5, 8
(±)-Chalcogran	Feromon	SSR	-	4, 5, 8
(±)- <i>exo</i> -Brevicomín	Feromon	EAD, SSR	+	1, 4, 5, 8
<i>endo</i> -Brevicomín	Feromon	EAD		1
Frontalin	Feromon	EAD		1
(+)-Lineatin	Feromon	EAD		1
E-myrcenol	Feromon	SSR	-	4
(+)- $\alpha$ -Pinene	Hostitel	EAD, SSR		1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
(-)- $\alpha$ -Pinene	Hostitel	EAD, SSR	+	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
(-)- $\beta$ -Pinene	Hostitel	EAD, SSR		4, 6, 7, 8, 9
Myrcene	Hostitel	EAD, SSR		1, 4, 5, 6, 7, 8, 9

p-Cymene	Hostitel	EAD, SSR		4, 5, 6, 7, 8, 9
1,8-Cineole	Hostitel	EAD, SSR	-	4, 5, 6, 7, 8, 9
3-Carene	Hostitel	EAD, SSR		4, 6, 7, 8, 9
Pinocarvone	Hostitel	EAD, SSR		7, 8, 9
(-)-Camphor	Hostitel	EAD, SSR		1, 5, 6, 7, 8, 9
(+)-Camphor	Hostitel	EAD, SSR		1, 5, 6, 7, 8, 9
<i>trans</i> -Pinocamphone	Hostitel	EAD, SSR		1, 6, 8, 9
<i>cis</i> -Pinocamphone	Hostitel	EAD, SSR		1, 6, 8, 9
Isopinocamphone	Hostitel	EAD, SSR		9
<i>trans</i> -4-Thujanol	Hostitel	EAD, SSR		7, 8
4-Thujanol	Hostitel	EAD		9
Styrene	Hostitel	EAD, SSR		7, 8, 9
Terpinolene	Hostitel	EAD, SSR		4, 6, 7, 8, 9
$\gamma$ -Terpinene	Hostitel	EAD, SSR		6, 7, 8, 9, 10
( $\pm$ )-Limonene	Hostitel	EAD, SSR		4, 6, 7, 8, 9
( $\pm$ )-Carvone	Hostitel	SSR		8, 9
Estragole	Hostitel	EAD, SSR		7, 8, 9, 10
Camphene	Hostitel	EAD		6
Sabinene	Hostitel	EAD		6, 7,
$\beta$ -Phellandrene	Hostitel	EAD		6
Nonanal	Hostitel	EAD		6
Terpinen-4-ol	Hostitel	EAD, SSR		6, 7, 9
( $\pm$ )- $\alpha$ -Terpineol	Hostitel	SSR		9
1-Hexanol	NHV	EAD, SSR	-	2, 3, 4, 5, 8
Z3-Hexenol	NHV	EAD, SSR	-	3, 4, 5, 8
E3-Hexenol	NHV	EAD	-	3
Z2-Hexenol	NHV	EAD		3
E2-Hexenol	NHV	EAD, SSR	-	3, 4, 5, 8
( $\pm$ )-3-Octanol	NHV	EAD, SSR	-	3, 4, 5, 8, 9
(+)-3-Octanol	NHV	EAD, SSR		3, 4,
Hexanal	NHV	SSR		4, 8
( $\pm$ )-1-Octen-3-ol	NHV	EAD, SSR	-	3, 4, 5, 8
(-)-1-Octen-3-ol	NHV	EAD, SSR		3, 4
E2-Hexenal	NHV	SSR		4, 8
(S,S)- <i>trans</i> -Conophthorin	NHV	EAD, SSR	-	3, 4, 5, 8
(R,R)- <i>trans</i> -Conophthorin	NHV	EAD, SSR		3, 4, 8
Dehydro-conophthorin	NHV	SSR		8
( $\pm$ )-Linalool	NHV	EAD, SSR	-	3, 4
(-)-Linalool	NHV	EAD, SSR	-	3, 4
Z3-Hexenyl acetate	NHV	SSR		4
Anethol	NHV	EAD		10

Caryophyllene	NHV	EAD		10
Thymol	NHV	EAD		10
Carvacrol	NHV	EAD		10

Uváděné látky jsou ze 3 zdrojů, látky feromonové povahy, hostitelské látky (Hostitel) a látky produkované nehostitelskými rostlinami (NHV). Látky byly testovány buď jako aktivní pro celé tykadlo (EAD), nebo pro ně byl nalezen specifický ORN (SSR), nebo obojí. Pro některé látky jsou i dostupné informace o behaviorální reakci *Ips typographus*. Semiochemikálie byly buď atraktivní (+) nebo odpuzující (-). Zdroj: 1 – Tommeras, 1985; 2 - Zhang et al., 2003; 3 - Zhang a Schlyter, 2004; 4 - Andersson et al., 2009; 5 – Andersson, 2012; 6 - Kalinová et al., 2014; 7 - Schiebe et al., 2015; 8 - Raffa et al., 2016; 9 - Schiebe et al., 2019; 10 – Prchal, 2020.

Tabulka 2: Seznam látek, které byly prokázány jako aktivní pro *Ips duplicatus*.

Semiochemikálie	Biologický zdroj	Typ fyziologického testování	Behaviorální odpověď	Zdroj
Ipsdienol	Feromon	EAD	+	2
<i>E</i> -myrcenol	Feromon	EAD	+	2
Amitinol	Feromon	EAD	+	2
Ipsenol	Feromon	EAD		2
<i>cis</i> -Verbenol	Feromon	EAD		2
<i>trans</i> -Verbenol	Feromon	EAD		2
Verbenon	Feromon	EAD		2
1-Hexanol	NHV	EAD		1, 2
Z3-Hexenol	NHV	EAD	-	1
E2-Hexenol	NHV	EAD		1
3-Octanol	NHV	EAD	-	1
1-Octen-3-ol	NHV	EAD	-	1
<i>trans</i> -Conophthorin	NHV	EAD	-	1

Všechny testované látky u *Ips duplicatus* byly původem z nehostitelských rostlin (NHV) a testovány pomocí elektroantenografické detekce (EAD). U některých z nich byl prokázán odpuzivý účinek na *Ips duplicatus*. Zdroj: 1 - Zhang a Schlyter, 2004; 2 – Zhang et al., 2007.

### 3.7 Plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí

Semiochemikálie tvoří často složité směsi. Při analýze jednotlivých složek je nezbytné látky nejprve rozdělit pomocí plynové chromatografie a poté studovat jejich aktivitu (Syntech, 2004).

Plynová chromatografie je separační metoda, která umožňuje dělení směsí těkavých látek. Separace začíná nástřikem směsi do nástřikového prostoru chromatografu, který je spojen s kapilární kolonou. Nástřiknutá směs je v nástřikovém prostoru (inletu) zplyněna a následně jsou směsné páry unášeny nosným plynem do kolony. Kolona bývá tenká kapilára s vnitřními stěnami

pokrytými specifickou vrstvou, tzv. stacionární fází. Rozdělení jednotlivých komponentů směsi je určováno interakcí každé složky se stacionární fází (kolonou) a mobilní fází (nosným plynem). Komponenty, které méně interagují se stacionární fází prochází kolonou rychleji ve srovnání s těmi, jejichž interakce je silnější. Po průchodu kolonou jsou jednotlivé složky od sebe odděleny a izolovaně procházejí kolonou dále do detektoru. Detektor zaznamenává čas průchodu látky a její kvantitu. Nejčastějším typem je plamenoionizační detektor (tzv. FID) (Sparkman, Penton, Kitson, 2011).

FID detekuje všechny látky, které jím procházejí. Ne všechny látky analyzované směsi jsou biologicky aktivní. Biologická aktivita dělených látek bývá studována různými behaviorálními či fyziologickými metodami. Nejrozšířenější metodou ke stanovení biologické aktivity čichem vnímaných látek je elektrofyziologický záznam aktivity čichových orgánů na tykadlech. Pokud tykadlo na zkoumanou látku reaguje, je velká pravděpodobnost, že látka bude behaviorálně aktivní. Vzhledem k tomu je výhodné propojit GC-FID s tykadly, které slouží jako biologický detektor (EAD). Spojením GC-FID-EAD můžeme určit biologickou aktivitu látek separovaných plynovou chromatografií a spolu s tím i detekovat jejich retenční chování a jejich kvantitu. Při spojení plynového chromatografu s elektrodantografickou detekcí (GC-EAD) je kolona uvnitř GC před ústím do FID rozdělena na dvě ramena, kdy jedno ústí do detektoru (FID) a druhé je vedeno mimo GC a ústí do proudu vzduchu ofukující tykadlo zapojené pomocí elektrod do měřicí aparatury.

Na tykadle, které je vystaveno čichově aktivní látce, vzniká podráždění – změna napětí mezi špičkou a bází tykadla (0,1-několik mV). Změna napětí, tzv. elektroantenografický potenciál, odráží souhrnnou aktivitu daným podnětem aktivovaných ORN a po zesílení zesilovačem s vysokým vstupním odporem je možné jeho velikost i průběh zaznamenávat. Vzhledem k vysoké citlivosti vnímá zesilovač i mnoho okolního šumu, který může překrýt cílové výkyvy napětí na tykadle. Šum vyvolaný biologickou aktivitou svalů ve struktuře tykadla je poměrně nepravidelný a lze snížit pouze používáním čerstvých a nepoškozených tykadel. Významný je externí šum působený vlivem okolních elektromagnetických a elektrostatických jevů, který může být odstíněn Faradayovou klecí umístěnou okolo

měřící aparatury (Syntech, 2004). Typický záznam GC-EAD je zobrazen a popsán v metodice této práce.

## **4 Metodika**

### **4.1 Brouci**

Oba druhy kůrovců, používaných k experimentům byly vychovány v laboratorních podmínkách. Původní divoká generace *Ips typographus* byla dovezena v polenech nařezaných z infestovaných stromů pocházejících ze Školního lesního podniku ČZU v Kostelci nad Černými lesy ve středních Čechách. *Ips duplicatus* byl dovezen stejným způsobem z vojenského újezdu Libavá na severní Moravě. Následně byla tato polena o délce přibližně 40 cm dána do chovných plastových boxů, s větracím otvorem zakrytým sítkou v horní části a s otvorem napojeným na odsávací hadici s jemným odtahem vzduchu pro zajištění jeho cirkulace ve spodní části. (viz příloha 1). Tento otvor byl též zakrytý sítkou proti úniku brouků. Boxy s napadenými poleny byly uchovávány v klimatizované místnosti se stálou teplotou 25 °C a vlhkostí vzduchu 60 %. Tři dny poté, co byly pozorovány první výletové otvory, došlo k oloupání polen, do nichž se z důvodu absence dalšího potravního zdroje většina brouků po výletu vrátila výletovými otvory zpět, a jejich vybrání entomologickou pinzetou. Pro založení další generace bylo připraveno čerstvé nenapadené smrkové poleno (*Picea abies*) stejných rozměrů dovezené ze Školního lesního podniku ČZU v Kostelci nad Černými lesy (střední Čechy) uložené do chovného plastového boxu. V případě lýkožrouta severského byla kůra polene na několika místech navrtána nebozezem. Na poleno bylo nasypáno 80-100 jedinců kůrovce a dále s ním bylo nakládáno stejným způsobem jako s polenem divoké generace brouků. Za přibližně 5 týdnů došlo k objevení prvních výletových otvorů a následnému oloupání polene. Z 80-100 brouků byla opětovně založena nová generace, zbytek byl uchován v plastové krabici s malými otvory naplněné pláty smrkové kůry v lednici při 5 °C až do provedení experimentů. Takto byli brouci přechováváni maximálně 5 týdnů.

### **4.2 Vůně smrku**

Pro stimulaci tykadel byl použit esenciální olej (EO) smrku (Bewit, 100% pure) vyrobený parní destilací jehlic a malých větviček smrku ztepilého (*Picea*

*abies*). Esenciální olej byl ředěn v hexanu (Pestnorm, purity 99,0%) a pro GC-EAD analýzy byl používán ve dvou koncentracích. Koncentrace 1 mg/ml byla použita pro zjištění aktivity tykadla na hlavní komponenty obsažené v esenciálním oleji. U vyšší koncentrace 10 mg/ml byla zkoumána hlavně reakce tykadla na látky, které se v EO objevují v menším množství.

### 4.3. Příprava tykadla pro CG-EAD

Nejprve byly připraveny elektrody. K experimentům byly použity skleněné elektrody plněné Ringerovým roztokem (NaCl 12,2 g/l, KCl 0,21 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/l v destilované vodě). Elektrody byly vyrobeny ze skleněných trubiček průměru 1,5 mm na vertikálním tahači elektrod PC-100 (NARISHIGE) vytažením této trubičky do špičky. K tomu byl použit jednokrokový program o teplotě zahřívací spirály 65 °C. Poté byla pod stereomikroskopem (zvětšení 25x) ulomena špička elektrody o pinzetu do odpovídajícího průměru (viz obr. 6). Elektroda byla naplněna Ringerovým roztokem tak, aby neobsahovala bubliny vzduchu a poté bylo přiložením papírového kapesníku ke špičce elektrody odsáto dostatečné množství roztoku, aby se při nasunutí na stříbrný drátek roztok nevytlil. Nakonec byla špička elektrody namočená do parafinového oleje pro zabránění vytékání elektrolytu a celá elektroda byla osušena.

Přibližně půl hodiny před experimentem byli brouci vyndáni z lednice a necháni na Petriho misce, aby získali teplotu okolo 20 °C. Do misky byl přidán navlhčený ubrousek k udržení dostatečné vlhkosti prostředí. Celkem byly testovány tři možnosti zapojení tykadla: pouze izolované tykadlo, tykadlo s hlavou a tykadlo s celým živým broukem.

Pro přípravu tykadla s hlavou byl brouk vzat anatomickou pinzetou a pod stereomikroskopem (zvětšení 30x) mu byla žiletkou oddělena hlava. Poté byla hlava nasazena na připravenou elektrodu pomocí ostré pinzety a tato elektroda nastrčena na stříbrný drátek referenční části elektroantografické aparatury. Pod stereomikroskopem (zvětšení 60x) byla pomocí mikromanipulátorů zapojena měřící elektroda na špičku tykadla (viz obr. 5). Bylo vyzkoušeno i zapojení na okraje paličky tykadla, ale nebyl zaznamenán žádný rozdíl ve velikosti odpovědi a zapojení na špičku paličky tykadla poskytovalo stabilnější záznam, než zapojení v jiných částech.





Obrázek 5: Tykadlo s hlavou *Ips typographus* zapojené mezi skleněné elektrody naplněné Ringerovým roztokem. 1 – referenční elektroda, 2 – měřicí elektroda. Zvětšeno 60x. Autor: Jaromír Bláha

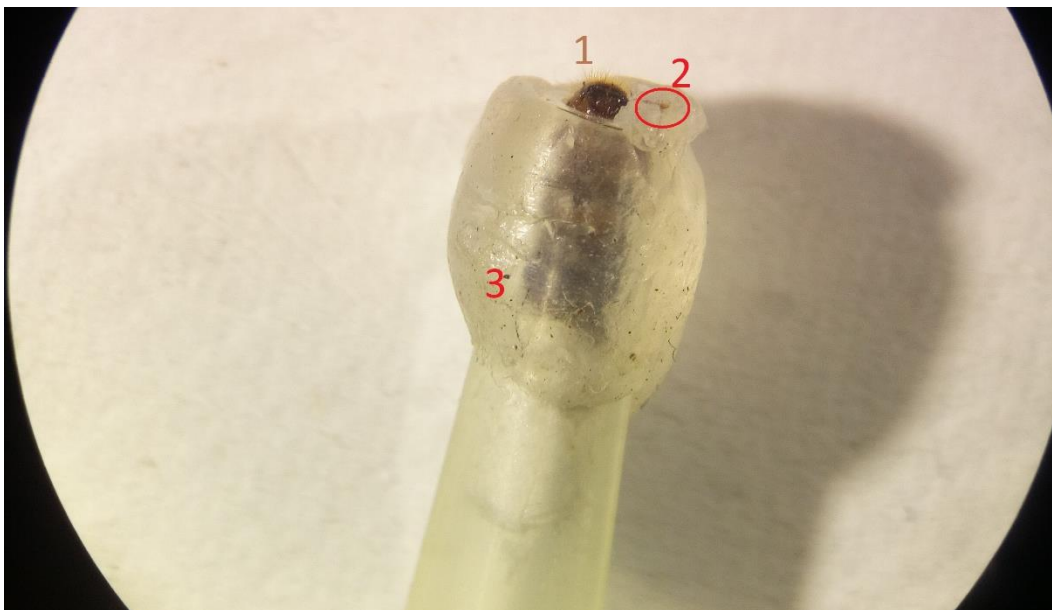
Příprava izolovaného tykadla probíhala stejně, ale hlava byla po oddělení chycena do ostré pinzety a druhou ostrou pinzetou bylo odtrženo tykadlo. Následně bylo tykadlo vsunuto odtrženou částí do elektrody vhodného průměru (viz obr. 6). V případě příliš velkého průměru špičky elektrody bylo tykadlo elektrodou pohlceno a došlo k zalití paličky tykadla se senzily elektrolýtem. Po celou dobu přípravy bylo dbáno na to, aby se nic nedotklo paličky tykadla a nedošlo tím k nechtěnému podráždění. Poté bylo izolované tykadlo zapojeno do měřicího systému stejně jako tykadlo s hlavou.



Obrázek 6: Izolované tykadlo *Ips typographus* zapojené mezi skleněné elektrody naplněné Ringerovým roztokem. 1 – referenční elektroda, 2 – měřicí elektroda. Zvětšeno 80x. Autor: Jaromír Bláha

Při použití celého živého brouka bylo potřeba nejprve znemožnit jeho pohyb. Brouk byl vsunut hlavou napřed do pipetovací špičky o objemu 200  $\mu$ l a utěsněn kouskem papírového kapesníku. Poté byla špička oříznuta žiletkou těsně

před hlavou brouka a za utěsněním. Tupým koncem entomologického špendlíku bylo zatlačeno na papírové utěsnění tak, aby se na druhé straně vysunula hlava kůrovce ven ze špičky a zároveň nedošlo k porušení kutikuly a vylití hemolymfy brouka do pipetovací špičky. Poté bylo pod stereomikroskopem (zvětšení 30x) propíchnuto ostrým entomologickým špendlíkem oko pro následně snažší zavedení referenční elektrody. Vytékající hemolymfa byla osušena papírovým kapesníkem. Následně byl užší konec pipetovací špičky obalen kouskem vosku (Erkogum, Erkodent) (obr. 7). Celý preparát byl umístěn pod stereomikroskop hlavou brouka nahoru a přilepen k podložce kouskem vosku. Nato bylo pomocí entomologického špendlíku zafixováno tykadlo do vosku tak, aby palička tykadla zůstala volná a otočená stranou se senzily nahoru. Tento preparát byl umístěn na stojánek do elektroantenografického měřicího systému. Pod stereomikroskopem (zvětšení 60x) byla pomocí mikromanipulátorů zavedena referenční elektroda do připraveného otvoru v oku kůrovce a měřicí elektroda byla připojena na špičku zafixovaného tykadla. (viz obr. 8).



Obrázek 7: Zafixovaný lýkožrout smrkový v pipetovací špičce. Vrchní část špičky ze které přesahuje hlava (1) je obalena voskem (3), do kterého je upevněno tykadlo (2). Zvětšeno 30x. Autor: Jaromír Bláha

Po oddělení hlavy a tykadla od těla docházelo k postupnému odumírání čichových neuronů a snížení velikosti odpovědi na stejný stimulus (viz graf 1). Pro zjištění míry snížení citlivosti tykadla byla pro každý druh zapojení použita tři tykadla *Ips typographus*, která byla každou minutu stimulována stimulačním

zásobníkem. Tento zásobník byl zhotovený ze skleněné Pasteurovy pipety, do které byl vložen čtverec filtračního papíru, na nějž bylo naneseno 10  $\mu\text{l}$  roztoku cis-verbenolu (jednoho ze dvou hlavních feromonových komponentů pro *Ips typographus*) v hexanu v koncentraci 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Průměr odečtených velikostí odpovědi ze třech měření je vidět v grafu 1.

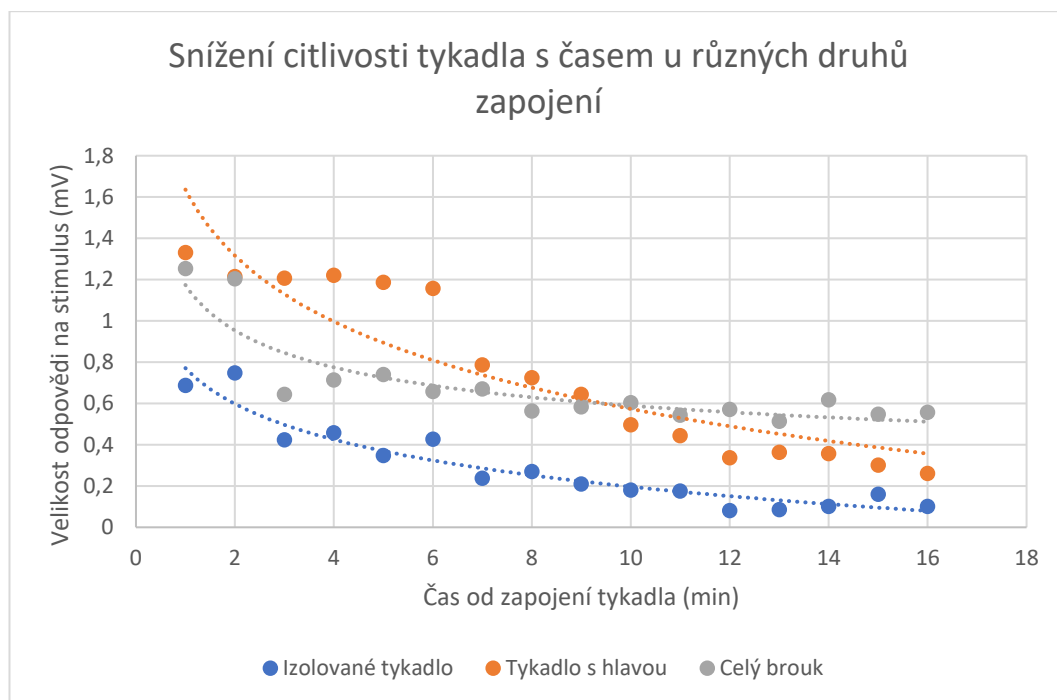


Obrázek 8: Zapojený celý živý brouk *Ips typographus* mezi skleněnými elektrodami naplněnými Ringerovým roztokem. Referenční elektroda (1) je zapíchnuta do oka a měřicí elektroda (2) je zapojena na tykadlo zafixované do vosku (3). Zvětšeno 60x. Autor: Jaromír Bláha

Nejrychleji docházelo ke ztrátě citlivosti u zapojení izolovaného tykadla, o něco méně pak u zapojení tykadla s hlavou. Při zapojení celého brouka docházelo výraznějšímu snížení citlivosti pouze první tři minuty a poté tykadlo odpovídalo na stimulus v přibližně stejné míře po zbytek experimentu. V několika případech byla měřena citlivost tykadla po hodině od zapojení a tykadlo poskytovalo stále stejnou velikost odpovědi jako po počátečním snížení citlivosti. Z tohoto důvodu mohlo být izolované tykadlo a tykadlo s hlavou použito pouze na jednu analýzu, zatímco zapojení celého brouka bylo použito na několik po sobě jdoucích analýz. Izolované tykadlo poskytovalo stabilní záznam, zatímco záznam tykadla s hlavou byl více nestabilní s méně jasnými odpověďmi na stimuly. Zároveň u izolovaného tykadla a tykadla s hlavou došlo k získání odpovědi pouze přibližně u poloviny zapojení. Druhá polovina tykadel již na začátku analýzy nereagovala ani na silné stimuly. Zapojený celý živý brouk poskytoval stabilní záznamy, pokud nedošlo k rozlití hemolymfy či Ringerova roztoku do vnitřního prostoru pipetovací špičky. Pokud

k tomu došlo, fyziologická měřicí aparatura často zaznamenávala činnost srdce kůrovce místo záznamu čichových stimulací. Na rozdíl od izolovaného tykadla a tykadla s hlavou, každý dobře zapojený živý brouk reagoval na počáteční stimulus.

Pro výše zmíněné vlastnosti byla v této práci většina analýz provedena na zapojených celých živých kůrovcích.



Graf 1: Porovnání snížení citlivosti tykadel u zapojení izolovaného tykadla, tykadla s hlavou a celého živého brouka v průběhu času. Tykadla byla stimulována stimulačním zásobníkem s filtračním papírem napuštěným 10  $\mu$ l cis-verbenolu rozpuštěného v hexanu v koncentraci 1 ng/ $\mu$ l po jedné minutě. Graf zobrazuje průměr z velikosti odpovědí naměřených na 3 tykadlech.

#### 4.4 Elektroantenografická analýza

Pro určení aktivních látek z EO smrku byla použita spojená plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí (GC-EAD). Plynový chromatograf Agilent 7890B (Agilent Technologies, USA) byl vybaven autosamplérem a kolonou Agilent 19091J-413: K01 HP-5 o délce 30 m, průměru 320  $\mu$ m a síle vnitřního filmu 0,25  $\mu$ m. Na konci kolony byl instalován splitter, který rozděloval proud plynů na dvě části v poměru 1:1. Jedna část pokračovala do plamenoionizačního detektoru (FID) o teplotě 300  $^{\circ}$ C a druhá proudila na připravené tykadlo. Vzorek analyzovaného roztoku o objemu 1  $\mu$ l byl nastříknut autosamplérem do přehřátého inletu (250  $^{\circ}$ C) splitless metodou. Teplotní

program pece začínal na 40 °C s trváním 0,5 minuty a následně se zvyšoval o 30 °C za minutu až do 300 °C na kterých setrval 5 minut. Celkový čas chromatografické analýzy byl 14,7 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium s celkovým průtokem 45,3 ml/min.



*Obrázek 9:* Spojená plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí. Plynový chromatograf (1) s autosamplerem (2) ústí kolonou (3) do směsné komory (8), kde se látky míchají se vzduchem a výsledná směs je dopravována na tykadlo (4). Tykadlo je stíněno uzemněnou Faradayovou klecí (5). Ústí kolony je vyhříváno na 250 °C elektrickým topením (7). Dalšími částmi elektroantenografického měřicího systému jsou analogo-digitální převodník (IDAC-2, Syntech) a generátor vzduchových pulzů (CS-55, Syntech) (6), přívod vlhčeného vzduchu (10) a odtah vzduchu (9). Autor: Jaromír Bláha

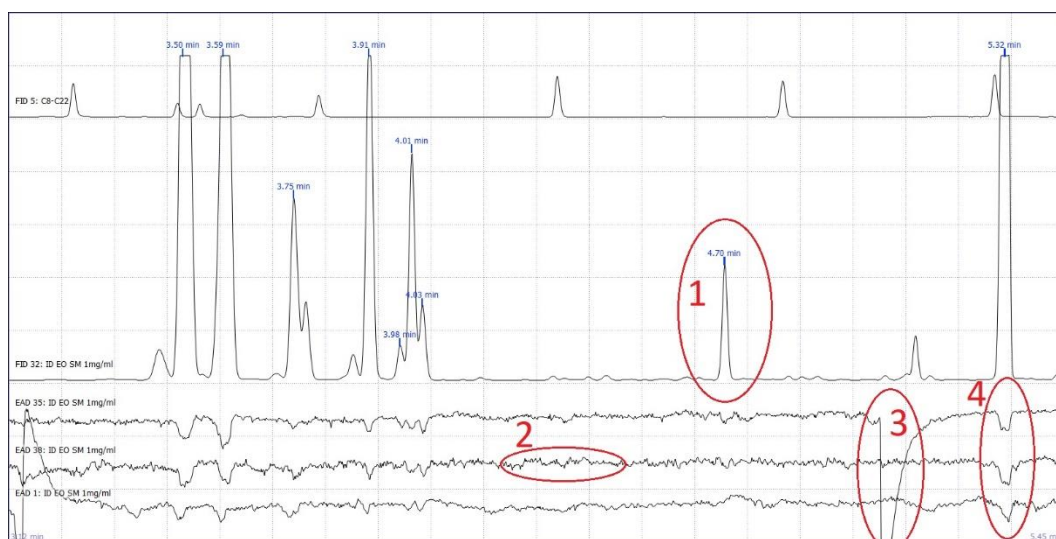
Tykadlo bylo zapojené mezi skleněnými elektrodami naplněnými Ringerovým roztokem. Měřicí elektroda byla napojena na předzesilovač (10x Syntech Universal Probe) a analogo-digitální převodník (IDAC-2, Syntech) (viz příloha 2). Před začátkem analýzy bylo tykadlo přesunuto před proud zvlhčeného vzduchu a testovacím stimulem byla otestována činnost tykadla. Jako zdroj stimulujících látek byl použit kousek kůry smrku ztepilého (0,5×2 cm) ve Pasteurově pipetě (stimulační zásobníček). Konec pipety byl připojen hadicí do generátoru vzduchových pulzů (CS-55, Syntech) a její špička byla vsazena do trubice s proudem vlhčeného vzduchu ústící na zapojené tykadlo. Poté byl pomocí



pedálu aktivován vzduchový pulz (0,5 s). Pokud tykadlo na tento stimulus odpovídalo, bylo přesunuto do uzemněné Faradayovy klece a zpět před proud vlhčeného vzduchu, do kterého ústila kolona plynového chromatografu a byla spuštěna analýza (viz obr. 9). Na konci analýzy byla opět testována činnost tykadla zkusným stimulem pro zjištění snížení citlivosti.

#### 4.5 Zpracování výsledků

Výsledky naměřené na GC-EAD byly zaznamenávány a vyhodnocovány v programu GC/EAD32 (verze 4.6). V každé analýze byly vytvořeny tři záznamy, jeden z plamenoionizačního detektoru (FID), jeden z tykadla (EAD) a jeden digitální (DIG), který zaznamenával čas stimulace vzduchovým pulzem. V záznamu FID se zobrazovaly jednotlivé látky rozdělené plynovým chromatografem v podobě píků. Zápis EAD zaznamenával aktivitu tykadla, kde se zobrazovala základní klidová biologická činnost tykadla a při podráždění senzil docházelo k výkyvu záznamu, jehož velikost byla měřena v mV. V některých případech mohlo dojít k náhodnému vychýlení záznamu (artefaktu), proto byly za aktivní považovány pouze látky, u kterých byla naměřena odpověď na 3 a více tykadlech (viz obr. 10).



Obrázek 10: Vyhodnocení záznamu GC-EAD. FID 32 zobrazuje záznam měřeného vzorku EO smrku v koncentraci 1 mg/ml. FID 5 zobrazuje po sobě jdoucí alkany pro určení Kovatsova indexu jednotlivých látek při jejich identifikaci a pro snadnější orientaci v záznamu. EAD 1, 35 a 38 zobrazují záznamy z tykadla *Ips duplicatus*. 1 – pík zaznamenaný FID, zobrazující jednu látku. 2 – klidový potenciál tykadla, 3 – náhodné vychýlení záznamu EAD (artefakt), 4 – potvrzená čichová aktivita tykadla kůrovce na danou látku. Autor: Jaromír Bláha

#### 4.6 Identifikace aktivních látek

Aktivní látky byly identifikovány pomocí dvoudimenzionálního plynového chromatografu s hmotnostním detektorem částic (GCxGC-TOFMS). Plynový chromatograf Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) byl vybaven autosamplérem a dvěma kolonami. Na první kolonu RXI-5Sil délky 30 m, průměru 0,25 mm a síle vnitřního filmu 0,25  $\mu\text{m}$  navazoval modulátor a poté druhá kolona BPX-50 délky 1,29 m, průměru 0,1 mm a síle vnitřního filmu 0,1  $\mu\text{m}$ , která ústila do hmotnostního detektoru částic. Měřený vzorek byl nastříknut do předehřátého inletu (200 °C) se splitovacím poměrem 1:10. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem v koloně 1 ml/min. Program pece první kolony začínal na 60 °C s trváním po dobu dvou minut, poté se teplota začala zvedat o 10 °C za minutu až do 210 °C. Po dosažení této hodnoty narůstala teplota o 20 °C/min do cílové teploty 330 °C. Teplota pece druhé kolony byla vždy o 30 °C vyšší.

Hmotnostní spekrometrický detektor s analyzátozem měření doby letu částic TOF Pegasus 4D (Leco Corporation, USA) byl nastaven na elektronovou ionizaci s teplotou zdroje 250 °C a energií -70 eV. Rozsah měřených hmot byl 35-500 m/z a akviziční rychlost 10 spekter/s.

Zpracování výsledků proběhlo v programu LECO ChromaTOF (Leco Corporation, USA). Identifikace látek byla uskutečněna na základě porovnání naměřených spekter a retenčních indexů s databází látek. Retenční index vyjadřuje pozici dané látky mezi dvěma sousedními alkany na chromatogramu. Každému alkanu byl přiřazen index  $100 \times$  počet uhlíků. Pomocí retenčního času látky a retenčních časů nejbližších alkanů byl vypočítán retenční index dané sloučeniny.

#### 4.7 Potvrzení identity látek a jejich biologické aktivity pomocí syntetických standardů

Pro potvrzení identity látek a jejich biologické aktivity byl připraven syntetický standard v koncentraci 10 ng/ $\mu\text{l}$  a analyzován pomocí GC. Nejprve byla pomocí retenčního času standardu a dané látky v EO potvrzena správnost identifikace. Poté byly namíchány dvě směsi po pěti aktivních látkách v koncentraci každé sloučeniny 100 ng/ $\mu\text{l}$  a analyzovány pomocí GC-EAD pro 6 jedinců obou druhů. Velikosti odpovědí byly statisticky vyhodnoceny pomocí dvouvýběrového t-testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Stejně směsi byly analyzovány i v nižší

koncentraci 10 ng/μl každé látky a bylo vyhodnoceno na které látky v tomto případě dané druhy reagovaly.

#### 4.8 Identifikační schéma

Každá identifikace čichově aktivních látek (semiochemikálií) se skládá z následujících kroků.

1. GC-EAD analýza zkoumaného vzorku a nalezení oblastí s antenální aktivitou (za aktivitu jsou považovány alespoň 3 odpovědi tykadla na stejném místě).
2. GC-MS analýza vzorku a nalezení pravděpodobné identity antenálně aktivních látek (pomocí porovnání naměřených MS spekter a vypočtených retenčních indexů s databází látek).
3. Potvrzení identity aktivních látek porovnáním retenčního času autentických látek ve zkoumaném vzorku a syntetických standardů.
4. Potvrzení antenální aktivity na syntetické standardy pomocí GC-EAD analýz. Při chromatografii může nastat situace, kdy 1 a více látek vychází ve stejný čas (koeluce). Obvykle pouze jedna z nich bývá antenálně aktivní.
5. Pokud je retenční čas syntetického standardu stejný s antenálně aktivní látkou ve zkoumané vzorku a zároveň syntetický standard vyvolává odpověď tykadla, je identifikace správná.

Po identifikaci antenálně aktivních látek je možné srovnání obou druhů. Porovnáním GC-EAD analýz esenciálního oleje bylo zjištěno, zda *Ips typographus* a *Ips duplicatus* reagují na stejné látky.

Srovnání citlivosti tykadel obou druhů k jednotlivým aktivním sloučeninám bylo provedeno po stimulaci tykadel stejným množstvím látek. Pro porovnání citlivosti tykadel byly použity 2 koncentrace syntetických standardů (100 ng/μl a 10 ng/μl). Látky byly na tykadlo aplikovány pomocí GC. Tato metoda umožňuje přesné srovnání látek s rozdílnou těkavostí.

Naproti tomu množství látek při stimulaci tykadla vzduchovým pulzem je ovlivněno chemickou strukturou sloučeniny, rozpouštědlem, koncentrací látky, podmínkami skladování, intervalem stimulování a počtem provedených



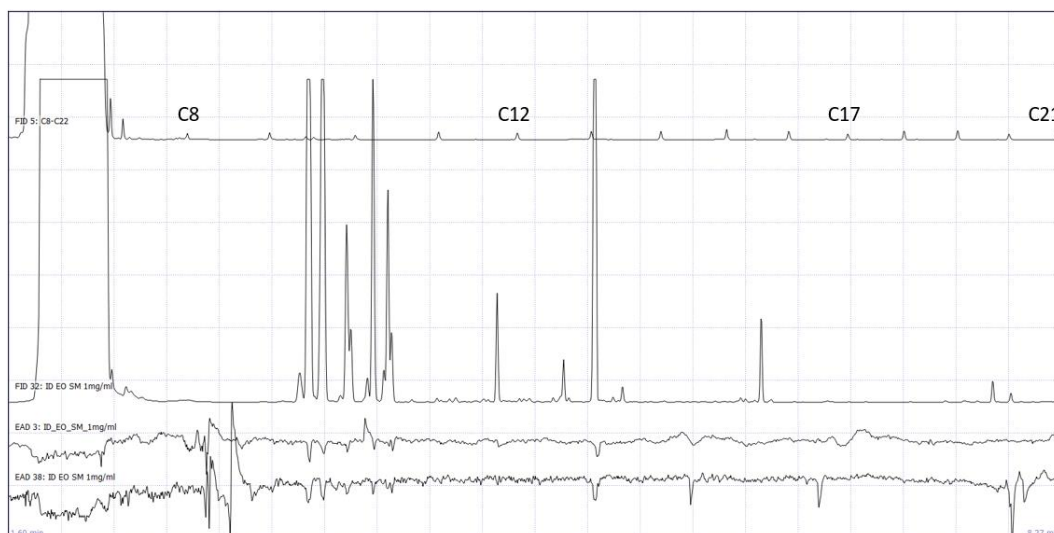
vzduchových pulzů. Proto musí být pro účinné srovnání citlivosti tykadel stimulace vzduchovým pulzem kalibrována (Andersson et al., 2012).

## 5 Výsledky

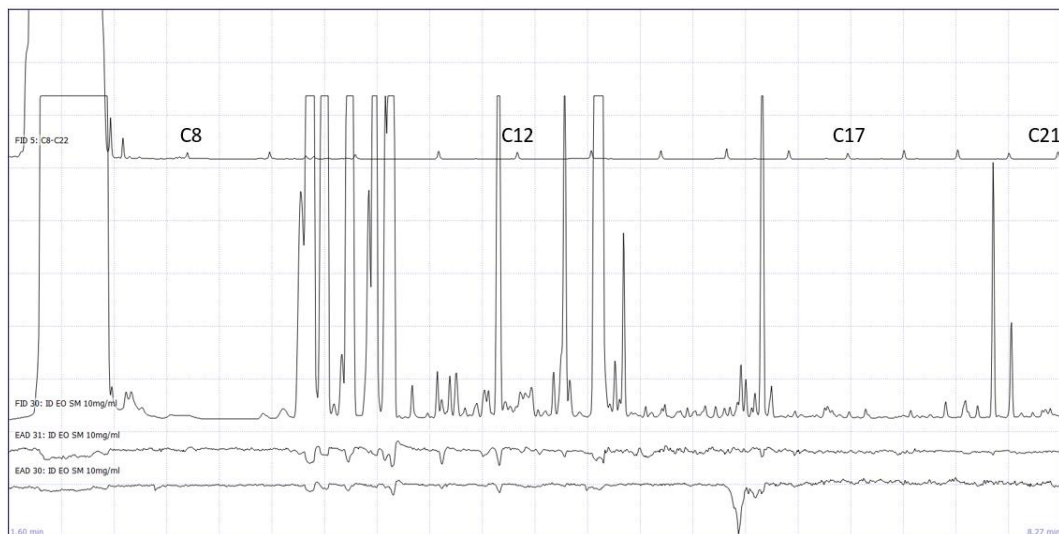
### 5.1 GC-EAD analýzy EO smrku

Pomocí separační metody GC bylo plamenoinoizačním detektorem (FID) zjištěno velké množství látek obsažených ve zkoumaném esenciálním oleji (EO) smrku. Při GC-EAD analýzách na tykadlech *Ips typographus* a *Ips duplicatus* bylo nalezeno celkem 16 aktivních látek z EO smrku. Pouze 13 z těchto látek se však podařilo identifikovat a ověřit pomocí syntetických standardů a 3 aktivní látky tak zůstávají neurčeny (viz tab. 3).

EO byl ředěn v hexanu a testován ve dvou koncentracích. Záznam nižší koncentrace 1 mg/ml ukazoval několik hlavních terpenů a isobornylacetát (viz obr. 11). Naproti tomu záznam vyšší koncentrace zobrazoval mnohem širší spektrum látek. Při této koncentraci byla zkoumána aktivita tykadel hlavně na látky, které se v EO vyskytovaly pouze v nepatrném množství (viz obr. 12).



**Obrázek 11:** Celkový záznam měření EO smrku v nižší koncentraci 1 mg/ml. Nahoře je vidět záznam alkanů s počty uhlíků 8-21 (FID 5). První velký pík je rozpouštědlo (hexan) a poté následují v pravidelných intervalech alkany, některé jsou pro přehlednost označeny. Druhý záznam (FID 32) zobrazuje EO smrku v koncentraci 1 mg/ml. První velký pík je rozpouštědlo a poté jsou vidět hlavní terpeny obsaženy v EO smrku. Spodní dva záznamy (EAD 3 a EAD 38) zobrazují měření biologické aktivity tykadla *Ips duplicatus*. V přední části záznamů se nachází několik artefaktů a poté jsou zobrazeny odpovědi tykadla na hlavní terpeny. Autor: Jaromír Bláha

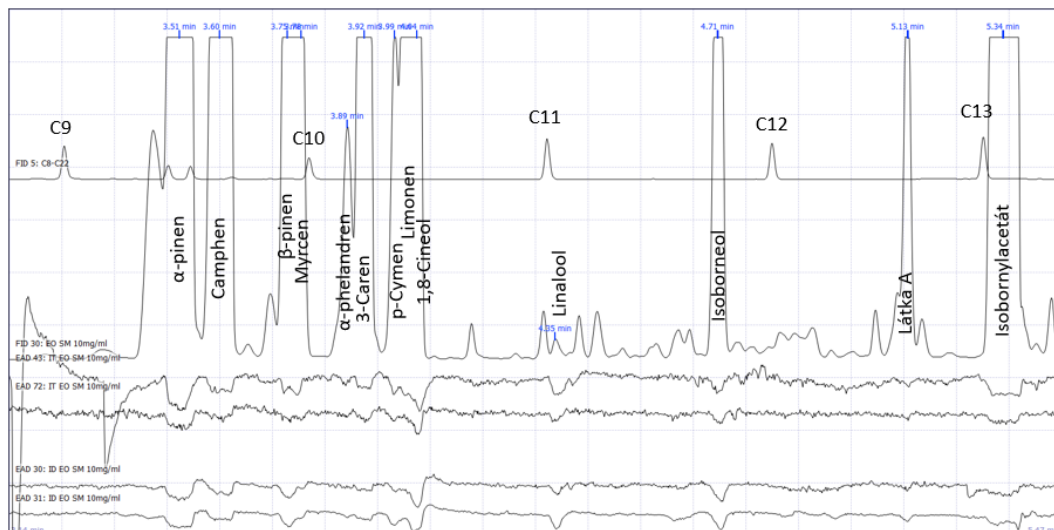


Obrázek 12: Celkový záznam měření EO smrku ve vyšší koncentraci 10 mg/ml. Nahoře je vidět je záznam alkanů s počty uhlíků 8-21 (FID 5). První velký pík je rozpouštědlo (hexan) a poté následují v pravidelných intervalech alkany, některé jsou pro přehlednost označeny. Druhý záznam (FID 30) zobrazuje EO smrku v koncentraci 10 mg/ml. První velký pík je rozpouštědlo a poté jsou vidět jak hlavní terpeny, tak i další látky, které jsou v EO smrku přítomny jen v malém množství. Spodní dva záznamy (EAD 30 a EAD 31) jsou měření zobrazující aktivitu tykadel *Ips duplicatus* na některé látky obsažené v EO smrku. Autor: Jaromír Bláha

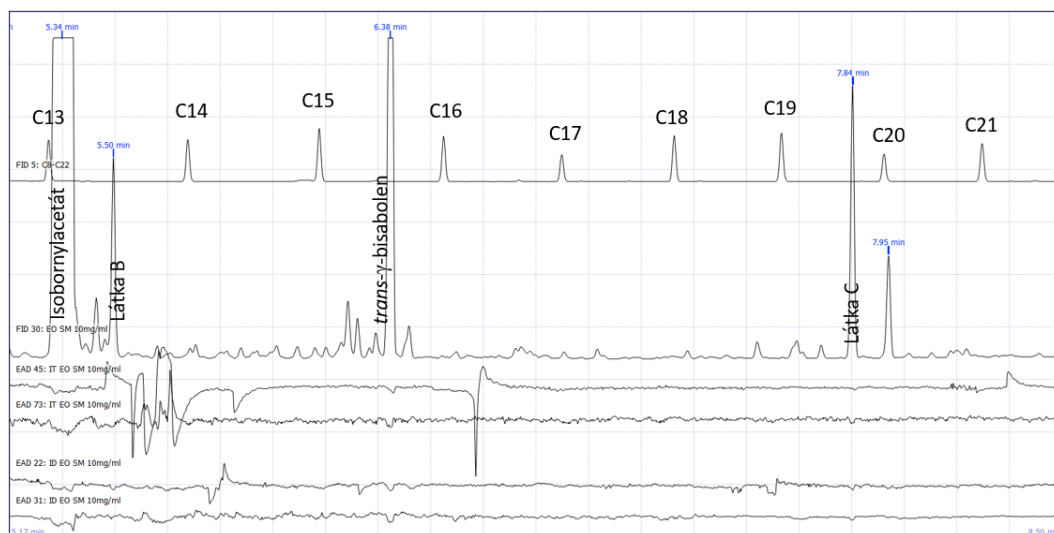
Naměřené záznamy z tykadel obou zkoumaných druhů kůrovců obsahovaly kromě oblastí aktivit často také mnoho artefaktů a náhodných zvlnění záznamu. Proto byla za odpověď tykadla na danou látku považována pouze oblast, kde se aktivita (negativní výchylka polarizace tykadla) v záznamu EAD zobrazovala opakovaně (minimálně 3×).

Při měření EO smrku v koncentraci 1 mg/ml na tykadlech *Ips typographus* bylo nalezeno 7 aktivních látek:  $\alpha$ -pinen, camphen,  $\beta$ -pinen, 3-careen, limonen, 1,8-cineol a isobornylacetát (viz příloha 3). Tykadla *Ips duplicatus* reagovala v této koncentraci na stejné látky (viz příloha 4). Při zvýšení koncentrace EO smrku na 10 mg/ml se prokázala aktivita tykadel obou druhů na další sloučeniny. Kromě výše zmíněných látek, jejichž aktivita byla lépe rozpoznatelná při nižší koncentraci EO, reagovala tykadla na myrcen,  $\alpha$ -phellandren, p-cymen, linalool, isoborneol a *trans*- $\gamma$ -bisabolen. Dále byly nalezeny 3 látky (označeny A, B a C), které se nepodařilo identifikovat (viz přílohy 5, 6, 7 a 8). Tykadla obou druhů zkoumaných kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus* reagovala na stejné sloučeniny a nebyl tak nalezen rozdíl v kvalitativním vnímání látek z EO smrku. Porovnání záznamů z tykadel *Ips typographus* a *Ips duplicatus* na EO smrku v koncentraci 10 mg/ml je vidět na obr. 13 a 14, kdy spodní dvě měření ukazují odpovědi *Ips dulicatus* a dvě měření nad

nimi odpovědi *Ips typographus*. Vrchní dva záznamy ukazují FID EO smrku a alkanů s označenými aktivními látkami. Obr. 13 zobrazuje první část záznamu EO smrku od  $\alpha$ -pinenu po isobornylacetát a obr. 14 druhou část od isobornylacetátu po neznámou látku C. Lepší zobrazení odpovědi tykadel *Ips typographus* a *Ips duplicatus* na aktivní látky je vidět v přílohách 3-8.



**Obrázek 13:** První část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml pro oba druhy kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus* s označenými všemi aktivními látkami. Vrchní záznam zobrazuje alkanů s počty uhlíků 9-13 (FID 5). Pod ním je záznam části EO smrku (FID 30). Prostřední dva záznamy (EAD 43 a EAD 72) ukazují aktivitu tykadel *Ips typographus* na látky z EO smrku. Spodní dva záznamy (EAD 30 a EAD 31) zobrazují odpovědi tykadel *Ips duplicatus* na látky z EO smrku. Ostatní naměřené EAD záznamy ukazují aktivitu tykadel na označené látky. Autor: Jaromír Bláha



**Obrázek 14:** Druhá část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml pro oba druhy kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus* s označenými všemi aktivními látkami. Vrchní záznam zobrazuje alkanů s počty uhlíků 13-21 (FID 5). Pod ním je záznam části EO smrku (FID 30). Prostřední dva záznamy (EAD 45 a EAD 73) ukazují aktivitu tykadel *Ips typographus* na látky z EO smrku. Spodní dva záznamy (EAD 22 a EAD 31) zobrazují odpovědi tykadel *Ips duplicatus* na látky z EO smrku. Ostatní naměřené EAD záznamy ukazují aktivitu tykadel na označené látky. Autor: Jaromír Bláha

## 5.2 Identifikace antenálně aktivních látek

U všech antenálně aktivních (EAD aktivních) látek byl podle retenčních časů daných sloučenin a nejbližších alkanů vypočten retenční index a porovnán s databází látek nacházejících se v esenciálních olejích (Adams, 2007). Vypočtený retenční index v našich experimentech byl průměrně o 21 jednotek vyšší, než retenční index uváděný v literatuře (viz tab. 3).

*Tabulka 3: Seznam látek obsažených v EO smrku, které byly aktivní pro oba druhy kůrovců Ips typographus a Ips duplicatus.*

Látka	RČ (min)	RI	RI lit
$\alpha$ -Pinen	3,51	955	932
Camphen	3,60	971	946
$\beta$ -Pinen	3,75	993	974
Myrcen	3,78	997	988
$\alpha$ -Phellandren	3,89	1020	1002
3-Caren	3,92	1026	1008
p-Cymen	3,99	1041	1020
Limonen	4,02	1047	1024
1,8-Cineol	4,04	1050	1026
Linalool	4,35	1105	1095
Isoborneol	4,71	1178	1155
Látka A	5,12	1265	x
Isobornylacetát	5,34	1312	1283
Látka B	5,50	1349	x
<i>trans</i> - $\gamma$ -Bisabolen	6,38	1559	1529
Látka C	7,84	1970	x

V tabulce je uveden retenční čas (RČ) látek naměřený v analýze provedené v této práci, retenční index (RI) vypočtený podle RČ daných látek a RČ sousedních alkanů a RI pro dané látky uvedené v literatuře (Adams, 2007).

Aktivní látky byly identifikovány pomocí porovnání naměřených spekter na hmotnostním spektrometru (MS spekter) a vypočítaných retenčních indexů s databází látek. Pro potvrzení identifikace byly namíchány syntetické standardy v koncentraci 10 ng/ $\mu$ l a jejich retenční časy byly porovnány s retenčními časy EAD aktivních autentických látek v EO. Pro látky  $\alpha$ -pinen, camphen, 3-caren, limonen a isobornylacetát, které se v EO vyskytují ve velkém množství bylo použito srovnání se záznamem EO v koncentraci 100 ng/ $\mu$ l (příloha 9). Ostatní látky ( $\beta$ -pinen, myrcen,  $\alpha$ -phellandren, p-cymen, 1,8-cineol, linalool, isoborneol a *trans*- $\gamma$ -bisabolen) byly srovnány se záznamem EO v koncentraci 1 mg/ml. Pro potvrzení identifikace *trans*- $\gamma$ -bisabolenu byla použita směs jeho izomerů. Hledaná

látky byla shodná svým MS spektrem a retenčním časem s posledním vycházejícím izomerem bisabolenu a bylo tak ověřeno, že se jedná právě o *trans*- $\gamma$ -bisabolen (příloha 10).

### 5.3 Porovnání citlivosti tykadel *Ips typographus* a *Ips duplicatus* na syntetické standardy antenálně aktivních látek

Pro potvrzení EAD aktivit a porovnání citlivostí tykadel *Ips duplicatus* a *Ips typographus* byly ze syntetických standardů namíchány dvě různé směsi (A a B) tak, aby jednotlivé látky byly přítomny v koncentraci 100 ng na 1  $\mu$ l roztoku. Biologická aktivita směsí byla GC-EAD analyzována na tykadlech *Ips typographus* a *Ips duplicatus* a citlivost tykadel zkoumaných druhů byla porovnána srovnáním amplitud EAD odpovědí. Směs A obsahovala  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, 3-careen, limonen a linalool. Směs B zahrnovala camphen, myrcen, p-cymen, 1,8-cineol a borneol. Pro nedostupnost ostatních syntetických standardů ( $\alpha$ -phellandrenu, isoborneolu, isobornylacetátu a *trans*- $\gamma$ -bisabolenu) při přípravě směsí byla u těchto látek pouze potvrzena správnost identifikace. Tyto sloučeniny však nebyly zahrnuty do porovnání citlivosti tykadel a budou předmětem dalšího zkoumání. Na počátku měření nebyl dostupný také isoborneol, proto bylo porovnání citlivosti tykadel prováděno s jeho izomerem borneolem, který byl zahrnut do směsi B. Pro isoborneol, který se nachází v EO, byla pouze ověřena identifikace.

V provedených měřeních byla prokázána EAD aktivita na všechny syntetické standardy včetně borneolu na tykadlech *Ips typographus* (příloha 11 a 13) a na tykadlech *Ips duplicatus* (příloha 12 a 14). V záznamech jsou vidět různé vysoké píky syntetických standardů. Plocha těchto píků, která indikuje množství dané látky však byla u všech píků stejná ( $\pm 2$  %).

U obou směsí bylo naměřeno 6 dobrých záznamů tykadel pro *Ips typographus* a *Ips duplicatus* a byla změřena velikost píků odpovědí na dané látky (tab. 4-7). Do plynového chromatografu byl nastříknut 1  $\mu$ l dané směsi. Po průchodu kolonou bylo množství látek rozděleno na dvě stejné poloviny, kdy jedna pokračovala do plamenoionizačního detektoru (FID) a druhá na tykadlo. Odpověď tykadla je tak úměrná stimulaci 50 ng dané látky. Pro tyto analýzy byl použit celý živý zafixovaný brouk, u kterého nelze uvažovat o významnějším snížení citlivosti tykadla v průběhu přibližně 2 minut, po které vycházely syntetické standardy

v jedné směsi z GC (na základě pokusů snižování citlivosti jednotlivých druhů zapojení tykadel, viz metodika). Z toho důvodu lze rovnou bez nutnosti další korekce porovnávat velikosti odpovědí jak mezi individuálními tykadly a druhy kůrovců, tak mezi jednotlivými látkami navzájem.

Tabulka 4: Velikost odpovědí *Ips typographus* na směs A.

Tykadlo	$\alpha$ -Pinen (mV)	$\beta$ -Pinen (mV)	3-Caren (mV)	Limonen (mV)	Linalool (mV)
A	0,17	0,12	0,15	0,1	0,12
B	0,08	0,12	0,1	0,1	0,17
C	0,1	0,12	0,27	0,16	0,12
D	0,14	0,21	0,14	0,09	0,18
E	0,22	0,19	0,18	0,13	0,19
F	0,17	0,19	0,18	0,12	0,18
Průměr	0,147	0,158	0,170	0,117	0,160

Velikost odpovědí tykadel A-F odpovídá stimulaci 50 ng dané látky a je uvedena v mV.

Tabulka 5: Velikost odpovědí *Ips duplicatus* na směs A.

Tykadlo	$\alpha$ -Pinen (mV)	$\beta$ -Pinen (mV)	3-Caren (mV)	Limonen (mV)	Linalool (mV)
A	0,14	0,23	0,21	0,14	0,25
B	0,14	0,17	0,17	0,05	0,18
C	0,13	0,13	0,11	0,08	0,13
D	0,14	0,12	0,16	0,13	0,18
E	0,14	0,17	0,13	0,1	0,21
F	0,12	0,13	0,11	0,14	0,22
Průměr	0,135	0,158	0,148	0,107	0,195

Velikost odpovědí tykadel A-F odpovídá stimulaci 50 ng dané látky a je uvedena v mV.

Tabulka 6: Velikost odpovědí *Ips typographus* na směs B.

Tykadlo	Camphen (mV)	Myrcen (mV)	p-Cymen (mV)	1,8-Cineol (mV)	Borneol (mV)
A	0,18	0,17	0,27	0,68	0,23
B	0,1	0,15	0,24	0,3	0,15
C	0,14	0,18	0,19	0,31	0,13
D	0,13	0,19	0,3	0,31	0,17
E	0,13	0,25	0,35	0,38	0,19
F	0,14	0,12	0,18	0,21	0,11
Průměr	0,137	0,177	0,255	0,365	0,163

Velikost odpovědí tykadel A-F odpovídá stimulaci 50 ng dané látky a je uvedena v mV.

Tabulka 7: Velikost odpovědí *Ips duplicatus* na směs B.

Tykadlo	Camphen (mV)	Myrcen (mV)	p-Cymen (mV)	1,8-Cineol (mV)	Borneol (mV)
A	0,1	0,17	0,15	0,19	0,14
B	0,13	0,16	0,21	0,18	0,16

C	0,13	0,19	0,18	0,18	0,18
D	0,12	0,18	0,21	0,18	0,21
E	0,07	0,14	0,12	0,11	0,19
F	0,15	0,11	0,11	0,22	0,14
Průměr	0,117	0,158	0,163	0,177	0,170

Velikost odpovědí tykadel A-F odpovídá stimulaci 50 ng dané látky a je uvedena v mV.

Pro účely posouzení citlivosti tykadel *Ips typographus* a *Ips duplicatus* na  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, 3-careen, limonen, linalool, camphen, myrcen, p-cymen, 1,8-cineol a borneol byly velikosti odpovědí na tyto látky porovnány pomocí dvouvýběrového t-testu. Ukázalo se, že na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  je *Ips typographus* citlivější na látky p-cymen a 1,8-cineol.

Při nižší koncentraci syntetických standardů odpovídala tykadla *Ips typographus* a *Ips duplicatus* pouze na některé látky. Pro tuto analýzu byla použita koncentrace syntetických standardů 10 ng/ $\mu$ l. Tykadlo tak bylo stimulováno 5 ng dané látky (do chromatografu byl nastříknut 1  $\mu$ l dané směsi a na konci kolony rozdělen 1:1 na tykadlo a FID). *Ips typographus* odpovídal na  $\alpha$ -pinen, linalool, myrcen, p-cymen a 1,8-cineol zatímco *Ips duplicatus* pouze na linalool, p-cymen a 1,8-cineol. Byly tak nalezeny odlišnosti mezi zkoumanými druhy kůrovců v citlivosti tykadel při stimulaci nízkými dávkami aktivních látek, kdy *Ips duplicatus* na rozdíl od *Ips typographus* nereagoval na  $\alpha$ -pinen a myrcen.

## 6 Diskuze

V esenciálním oleji (EO) vyrobeném parní destilací jehlic a malých větviček *Picea abies* bylo pomocí plynové chromatografie objeveno velké množství látek. Po GC-EAD analýzách 2 různých koncentrací EO smrku na tykadlech kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus* bylo nalezeno celkem 16 antenálně aktivních látek, z nichž se 13 látek podařilo jednoznačně identifikovat. Zjistili jsme, že oba druhy kůrovců vnímají stejné sloučeniny obsažené v EO smrku, ale byl nalezen rozdíl mezi těmito druhy v citlivosti tykadel pro některé sloučeniny. Při odpovědi tykadel na stimulaci 50 ng látek se ukázal statisticky významný rozdíl v EAD odpovědích na p-cymen a 1,8-cineol. Zjistili jsme, že tykadlo *Ips typographus* bylo k těmto dvěma látkám citlivější než tykadlo *Ips duplicatus*. Rozdílná citlivost porovnávaných druhů kůrovců se projevila také při záznamu EAD odpovědí na stimulaci 5 ng látek. Při této koncentraci reagovala tykadla obou druhů pouze na

některé sloučeniny. Tykadla obou druhů, *Ips typographus* i *Ips duplicatus* odpovídala na linalool, p-cymen a 1,8-cineol. *Ips typographus* navíc vnímal  $\alpha$ -pinen a myrcen, na které u *Ips duplicatus* nebyla nalezena odpověď.

Podobná práce, která by srovnávala antenální vnímání těkavých látek ze smrku pro *Ips typographus* a *Ips duplicatus* doposud nebyla zpracována. Také porovnání citlivosti antenálních odpovědí obou druhů k jednotlivým identifikovaným sloučeninám dosud nebyla provedena. Nicméně *Ips typographus* je jedním z nejprozkoumanějších druhů kůrovců a v předchozích pracích bylo již nalezeno mnoho aktivních látek (viz tab. 1).

Tabulka 8: Seznam aktivních látek v EO smrku a jejich porovnání s již publikovanými údaji pro *Ips typographus*.

Látka	Typ fyziologického testování	Zdroj
$\alpha$ -Pinen	EAD, SSR	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Camphen	EAD	5
$\beta$ -Pinen	EAD, SSR	3, 5, 6, 7, 8
Myrcen	EAD, SSR	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8
$\alpha$ -Phellandren	x	
3-Caren	EAD, SSR	3, 5, 6, 7, 8
p-Cymen	EAD, SSR	3, 4, 5, 6, 7, 8
Limonen	EAD, SSR	3, 5, 6, 7, 8
1,8-Cineol	EAD, SSR	3, 4, 5, 6, 7, 8
Linalool	EAD, SSR	2, 3
Isoborneol	x	
Isobornylacetát	x	
<i>trans</i> - $\gamma$ -Bisabolen	x	

Látky byly v předchozí literatuře testovány buď jako aktivní pro celé tykadlo (EAD), byl pro ně nalezen specifický ORN (SSR), nebo dosud nebyly identifikovány jako aktivní pro *Ips typographus* (x). Zdroj: 1 – Tommeras, 1985; 2 - Zhang a Schlyter, 2004; 3 - Andersson et al., 2009; 4 – Andersson, 2012; 5 - Kalinová et al., 2014; 6 - Schiebe et al., 2015; 7 - Raffa et al., 2016, 8 - Schiebe et al., 2019.

Ve shodě s našimi výsledky byla dříve zjištěna aktivita *Ips typographus* na  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-caren, p-cymen, limonen, 1,8-cineol a linalool, pro které byl zároveň nalezen i specifický ORN vnímající tyto látky. Pro camphen byla pouze potvrzena aktivita celého tykadla (Kalinová et al., 2014), ale nebyl pro něj dosud nalezen ORN (viz tab. 8). Údaje o aktivitě  $\alpha$ -phellandrenu pro *Ips typographus* nebyly dosud publikovány, ale Kalinová et al. (2014) zjistila aktivitu



tykadla na jeho izomer  $\beta$ -phellandren. Antenální aktivity isoborneolu, isobornylacetátu a *trans*- $\gamma$ -bisabolenu nebyly dosud identifikovány a představují tak nové poznatky pro *Ips typographus*.

Druh *Ips duplicatus* není zdaleka tak prozkoumán a bylo publikováno jen několik málo prací popisujících jeho čichové vnímání. Byers et al. (1990) identifikoval feromonové komponenty *Ips duplicatus* a Zhang et al. (2007) potvrdil aktivitu tykadla na další feromony jako amitinol, ipsenol, *cis*-verbenol, *trans*-verbenol a verbenon. Dále bylo nalezeno i několik aktivních nehostitelských látek (Zhang a Schlyter, 2004). Žádná práce však dosud nestudovala aktivitu tykadel *Ips duplicatus* na hostitelské látky smrku, a proto všechny zjištěné aktivní sloučeniny v této práci představují nové poznatky. Zhang et al. (2007) sice našel příležitostně slabé odpovědi *Ips duplicatus* na některé monoterpeny ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, limonen,  $\beta$ -phellandren a p-cymen), ale tyto odpovědi nebyly reprodukovatelné. Nicméně schopnost vnímání hostitelských látek kůrovcem *Ips duplicatus* dokazuje jeho větší výskyt v oblastech s ponechanými těžebními zbytky oproti charakterově podobným místům bez zdrojů hostitelských těkavých látek (Duduman, 2012). Duduman (2013) dokonce prokázal vnímání hostitelských monoterpenů  $\alpha$ -pinenu a limonenu kůrovcem *Ips duplicatus* v polních experimentech, kdy  $\alpha$ -pinen jen mírně zvyšoval atraktivnost feromonu, zatímco  $\alpha$ -pinen s limonem výrazně zvyšovaly atraktivitu feromonu. Přidáním samotného limonenu přitažlivost feromonu pro *Ips duplicatus* zvýšena nebyla. Tyto fakty mohou podporovat teorii, že pro behaviorální rozhodování kůrovců je důležitější poměr látek ve vnímané směsi než koncentrace jednotlivých komponentů (Raffa, Andersson, Schlyter, 2016).

Studie ukazují, že pro rozhodování *Ips typographus* o vhodnosti hostitele může být důležitý 1,8-cineol, který výrazně snižuje atraktivitu feromonu. ORN citlivý na toto sloučeninu se nachází ve stejné senzile jako ORN vnímající feromon (Raffa, Andersson, Schlyter, 2016). Ve shodě s uvedenými poznatky jsou výsledky této práce, které dokazují vysokou citlivost tykadel *Ips typographus* na 1,8-cineol. U tykadel *Ips duplicatus* byla citlivost na 1,8-cineol menší, ale u tohoto druhu dosud nebyly identifikovány žádné ORN, ani jejich případná kolokalizace.

*Cis*-verbenol, jeden ze dvou hlavních feromonových komponentů *Ips typographus* je brouky produkován pomocí autooxidace hostitelského prekurzoru

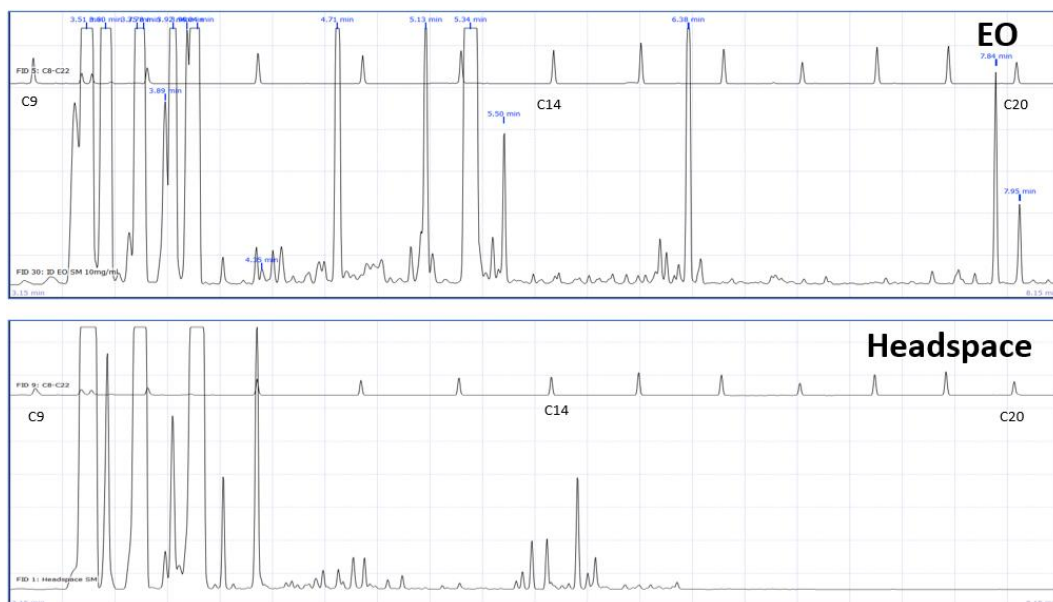
$\alpha$ -pinenu (Blomquist et al., 2010), který byl tykadly *Ips typographus* vnímán i ve velmi malých množstvích (stimulace 5 ng). Naproti tomu feromonové komponenty *Ips duplicatus* ipsdienol a E-myrcenol jsou vytvářeny kůrovci metodou *de novo* (syntetizovány ve střevech těchto brouků) a ne z hostitelského prekursoru myrcenu, jak bylo dříve předpokládáno (Ivarsson a Birgersson, 1995). Tento monoterpen byl tykadly *Ips duplicatus* vnímán až při vyšších koncentracích.

*Ips typographus* a *Ips duplicatus* jsou poměrně příbuzensky vzdálené druhy, přesto však vnímají stejné hostitelské látky. Lze tedy usuzovat, že jejich odlišné chování při kolonizaci hostitele vyplývá z rozdílného zpracování přijatých informací v mozku. Pro vyhodnocení případného odlišného vnímání hostitelských látek by bylo zapotřebí uskutečnit behaviorální testy na zjištěné aktivní látky a jejich různé směsi.

U některých hostitelských sloučenin byla zjištěna rozdílná citlivost tykadel *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. To může být ve shodě s teorií, že pro rozhodování kůrovců jsou důležité poměry jednotlivých komponentů ve směsi semiochemikálií (Raffa, Andersson, Schlyter, 2016). Odlišná citlivost vnímání obou druhů k daným látkám tak může zapříčinit jiné chování kůrovce. Pro lepší zmapování citlivosti tykadel, by bylo zapotřebí udělat dose-respond křivky pro jednotlivé aktivní sloučeniny (křivka zobrazující závislost velikosti odpovědi tykadla na množství stimulační látky).

V této práci byl analyzován vzorek získaný parní destilací jehlic a malých větviček, u kterého nebyl nalezen kvalitativní rozdíl ve vnímání mezi druhy *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Rozdílné chování při kolonizaci hostitele by tak mohlo být zapříčiněno kromě odlišného vyhodnocování přijatých informací i absencí stěžejních látek v analyzovaném vzorku. V pilotních experimentech (které nejsou součástí výsledků této práce) bylo provedeno jímání těkavých látek vypařovaných ze špalku 100letého smrku ztepilého (délky cca 50 cm) metodou dynamické headspace (špalek byl zabalen do pečicí folie, ze které byl pumpičkou odsáván vzduch přes absorbent pro zachytávání látek. Vzduch přicházející dovnitř folie byl filtrován stejným absorbentem. Jímání trvalo 24 hodin za průtoku vzduchu 100 ml/min. Poté byl absorbent promyt 200  $\mu$ l hexanu). V obou vzorcích (EO a headspace) jsou ve vysokých koncentracích obsaženy hlavní monoterpeny ( $\alpha$ -

pinen, camphen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-careen, p-cymen, limonen a 1,8-cineol). Ostatní látky se však liší a ve vzorku najímaném metodou dynamické headspace z kmene smrku je oproti vzorku EO navíc mnoho sloučenin, které by mohly být potencionálně odlišné ve vnímání *Ips typographus* a *Ips duplicatus* (viz obr. 15). Kalinová et al. (2014) zkoumala aktivitu tykadel *Ips typographus* na vzorek najímaný metodou dynamické headspace z 1 m dlouhých špalků smrku ztepilého po dobu 5 hodin. V těchto vzorcích našla stejné monoterpeny, jako byly identifikovány v této práci. Navíc zde však byly přítomny látky sabinen,  $\beta$ -phellandren,  $\gamma$ -terpinen, terpinolen, nonanal, camphor, *trans*-pinocamphon, *cis*-pinocamphon, terpinen-4-ol a verbenon, které se nenacházely v EO smrku a vyvolávaly odpověď tykadla *Ips typographus*. Podobná analýza však nebyla provedena pro *Ips duplicatus*.



Obrázek 15: Rozdíl ve složení vzorků získaných parní destilací jehlic a malých větviček (EO) smrku (FID 30) a metodou dynamické headspace polene z kmene 100letého smrku ztepilého (FID 1) detekovaného plamenoionizačním detektorem. U každého obrázku je záznam alkanů s počty uhlíků 9-20 (FID 5 a 9). Autor: Jaromír Bláha.

Jedním z rozdílů při kolonizaci hostitele mezi kůrovci *Ips typographus* a *Ips duplicatus* je oblast kmene, kterou napadají. *Ips typographus* kolonizuje spodní část kmene od paty po počátek koruny, zatímco *Ips duplicatus* napadá strom hlavně v oblasti koruny a silných větví (Holuša et al., 2006; Zahradník, Knížek, 2007; Knížek, Holuša, 2007). Po najímání vzorků metodou dynamické headspace (24 hodin, 200  $\mu$ l rozpouštědla) spodní části kmene (špalek 50 cm dlouhý, z první

pětiny kmene) a vrchní části kmene (špalek 50 cm dlouhý, z páté pětiny kmene) a jejich analyzování na GC nebyl nalezen kvalitativní rozdíl. V obou vzorcích se nacházely stejné látky, ale je možný rozdíl v kvantitě jednotlivých sloučenin (kvantita nebyla hodnocena). Rozdíly při kolonizování odlišných částí kmene by tak mohla vysvětlit různá citlivost tykadel *Ips typographus* a *Ips duplicatus* na látky obsažené v lýku, nicméně GC-EAD analýzy nebyly provedeny.

## 7 Závěr

Ve vzorku esenciálního oleje získaného parní destilací jehlic a větviček smrku ztepilého bylo nalezeno celkově 16 antenálně aktivních látek pro *Ips typographus* a *Ips duplicatus*, z nichž se u 13 podařilo určit a ověřit jejich identitu. Oba druhy kůrovců vnímají stejné hostitelské vůně, ale byl zjištěn rozdíl v citlivosti na některé z nich. U druhu *Ips typographus* byly určeny 4 nové aktivní látky, o jejichž vnímání lýkožroutem smrkovým doposud nebyly publikovány žádné údaje ( $\alpha$ -phellandren, isoborneol, isobornylacetát a *trans*- $\gamma$ -bisabolen). Druh *Ips duplicatus* není zdaleka tolik prozkoumán, a proto všechny identifikované aktivní látky ( $\alpha$ -pinen, camphen,  $\beta$ -pinen, myrcen,  $\alpha$ -phellandren, 3-carene, p-cymen, limonen a 1,8-cineol, linalool, isoborneol, isobornylacetát a *trans*- $\gamma$ -bisabolen) představují nové poznatky o čichovém vnímání tohoto druhu kůrovce.

Zjištěné poznatky rozšiřují spektrum údajů, které jsou známé pro *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. U všech identifikovaných látek by bylo zapotřebí udělat behaviorální testy s oběma druhy kůrovců. Následně zjištěné údaje o případné atraktivitě či repelenci by bylo možno použít v praxi při ochraně lesa a kontrole obou druhů *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Další případné rozdíly v čichovém vnímání mezi zkoumanými druhy kůrovců by bylo možné zjistit testováním těkavých látek vypařovaných z kmene smrku ztepilého.

## 8 Seznam literatury

ADAMS, R. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4. vydání. Carol Stream, Illinois : Allured Publishing Corporation, 2007. 804 s.

ANDERSSON, M. *Olfaction in the Spruce Bark Beetle, Ips typographus – Receptor, Neuron and Habitat*. Alnarp : SLU Service/Repro, 2011. 51 s. ISBN 978-91-576-7573-6

ANDERSSON, M. Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche*. 2012, s. 1-14.

ANDERSSON, M.; BINYAMEEN, M.; SADEK, M.; SCHLYTER, F. Attraction Modulated by Spacing of Pheromone Components and Anti-attractants in a Bark Beetle and a Moth. *Journal of Chemical Ecology*. 2011, vol. 37, s. 899-911.

ANDERSSON, M.; LARSSON, M.; SCHLYTER, F. Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single-cell responses to ecologically relevant odors. *Journal of Insect Physiology*. 2009, vol. 55, s. 556-567.

ANDERSSON, M.; SCHLYTER, F.; HILL, S.; DEKKER, T. What Reaches the Antenna? How to Calibrate Odor Flux and Ligand–Receptor Affinities. *Chemical Senses*. 2012, vol. 37, s. 403-420.

BLOMQUIST, G.; FIGUEROA-TERAN, R.; AW, M.; SONG, M.; GORZALSKI, A.; ABBOTT, N.; CHANG, E.; TITTIGER, C. Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2010, vol. 40, s. 699-712.

BYERS, J.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G.; FRANCKE, W. E-myrcenol in *Ips duplicatus*: An aggregation pheromone component new for bark beetles. *Experientia*. 1990, vol. 46, s. 1209-1211.

COGNATO, A. Molecular phylogeny and taxonomic review of Premnobiini Browne, 1962 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2013, vol. 1, s. 1-12.

DAVÍDKOVÁ, M.; DOLEŽAL, P. Temperature-dependent development of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836) (Coleoptera; Curculionidae). *Agriculture and Forest Entomology*. 2019, vol. 21, s. 388-395.

DUDUMAN, M. 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. *Agricultural and Forest Entomology*. 2013, vol. 13, s. 102-109.

DUDUMAN, M.; VASIAN, I. Effects of Volatile Emissions of *Picea abies* Fresh Debris on *Ips duplicatus* Response to Characteristic Synthetic Pheromone. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*. 2012, vol. 40, no. 1, s. 308-313. ISSN 0255-965X.

ERBILRIN, N.; KROKENE, P.; KVAMME, T.; CHRISTIANSEN, E. A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) responses to its aggregation pheromone. *Agricultural and Forest Entomology*. 2007, vol. 9, s. 135-140.

HOLUŠA, J.; GRODZKI, W. Occurrence of *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) on pines (*Pinus* sp.) in the Czech Republic and southern Poland – Short Communication. *Journal of forest science*. 2008, vol. 54, no. 5, s. 234-236.

HOLUŠA, J.; LUBOJACKÝ, J.; KNÍŽEK, M. Distribution of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* in the Czech Republic: spreading in 1997–2009. *Phytoparasitica*. 2010, vol. 38, s. 435-443.

HOLUŠA, J.; LUKÁŠOVÁ, K.; LUBOJACKÝ, J. Comparison of seasonal flight activity of *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2012, vol. 43, no. 3, s. 109-115.

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 13*. Brno: Tisk Centrum s.r.o., 2006. 46 s. ISBN 80-86461-64-5.

JAKUŠ, R.; HOLUŠA, J.; BLAŽENEC, M. *Principy ochrany dospělých smrkových porostů před podkorním hmyzem*. 1. vyd. Praha: Carter Reproplus, 2015. 198 s. ISBN 978-80-213-2605-7.

IVARSSON, P.; BIRGERSSON, G. Regulation and Biosynthesis of Pheromone Components in the Double Spined Bark Beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Insect Physiology*. 1995, vol. 41, no. 10, s. 843-849.

JEGER, M.; BRAGARD, C.; CAFFIER, D.; CANDRESSE, T.; CHATZIVASSILIOU, E.; DEHNEN-SCHMUTZ, K.; GILIOLI, G.; MIRET, J.; MACLEOD, A.; NAVARRO, M.; NIERE, B.; PARNELL, S.; POTTING, R.; RAFOSS, T.; ROSSI, V.; UREK, G.; VAN BRUGGEN, A.; VAN DER WERF, W.; WEST, J.; WINTER, S.; KERTÉSZ, V.; AUKHOJEE, M.; GRÉGORIE, J. Pest categorisation of *Ips duplicatus*. *EFSA Journal*. 2017, vol. 15, no. 10, s. 1-25. ISSN: 1831-4732.

KALINOVÁ, B.; BŘÍZKOVÁ, R.; KNÍŽEK, M.; TURČÁNI, M.; HOSKOVEC, M. Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions*. 2014, vol. 8, s. 305-316.

KNÍŽEK, M.; HOLUŠA, J. Lýkožrout severský *Ips duplicatus* (Sahlberg). *Lesnická práce*. 2007, vol. 86, no. 4, s. 1-4 (příloha).

KROKENE, P.; SOLHEIM, H. Fungal associates of five bark beetle species colonizing Norway spruce. *Canadian Journal of Forest Research*. 1996, vol. 26, s. 2115-2122.

LUBOJACKÝ, J.; LIŠKA, J.; KNÍŽEK, M. Atraktivita stromových lapáků pro lýkožrouta severského, *Ips duplicatus* Sahlberg (Coleoptera: Curculionidae). *Zprávy lesnického výzkumu*. 2018, vol. 63, no. 1, s. 48-52.

LAKATOS, F.; GRODZKI, W.; ZHANG, Q.; STAUFFER, CH. Genetic comparison of *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) populations from Europe and Asia. *Journal of Forest Research*. 2007, vol. 12, s. 345-349.

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. *Zpráva o stavu lesů a lesního hospodaření České republiky v roce 2019*. Praha: [s.n.], 2020. 128 s. ISBN 978-80-7434-571-5.

PRCHAL, J. *Identifikace antenálně aktivních látek esenciálních olejů Pimpinella anisum, Origanum vulgare, a Thymus vulgaris u kůrovce Ips typographus: bakalářská práce*. [Praha] : [s.n.], 2020. 51 s.

RAFFA, K.; ANDERSSON, M.; SCHLYTER, F. Host Selection by Bark Beetles: Playing the Odds in a High-Stakes Game. *Advances in Insect Physiology*. 2016, vol. 50, s. 1-74. ISSN 0065-2806

NOWINSKA, A.; BROZEK, J. Morphological study of the antennal sensilla in Gerromorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Zoomorphology*. 2017, vol. 136, s. 327-347.

SCHIEBE, CH.; BIRGERSSON, G.; JANKUVOVA J.; BRODELIUS, P.; SCHLYTER, F.; HANSSON, B. *Strong antennal responses by the bark beetle Ips typographus L. (Scolytidae, Scolytinae) to stress related host compounds*. [s.l.], [s.n.], 2015, 24 s.

SCHIEBE, CH.; BLAŽENEC, M.; JAKUŠ, R.; UNELIUS, C.; SCHLYTER, F. Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges. *Journal of Applied Entomology*. 2011, s. 1-12.

SCHIEBE, CH.; JANKUVOVÁ, J.; BINYAMEEN, M.; BLAŽENEC, M.; JAKUŠ, R.; SCHLYTER, F. *Attraction and feeding behaviours modulated by stress related oxygenated host compounds at natural doses in a bark beetle*. [s.l.], [s.n.], 2015, 15 s.

SCHIEBE, CH.; UNELIUS, C.; GANJI, S.; BINYAMEEN, M.; BIRGERSSON, G.; SCHLYTER, F. Styrene, (+)-trans-(1R,4S,5S)-4-Thujanol and Oxygenated Monoterpenes Related to Host Stress Elicit Strong Electrophysiological Responses in the Bark Beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology*. 2019, s. 1-16.

SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G.; BYERS, J.; BAKKE, A. The aggregation pheromone of *Ips duplicatus* and its role in competitive interactions with *I. typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Chemoecology*. 1992, vol. 3, s. 103-112.



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

SEYBOLD, S.; BOHLMANN, J.; RAFFA, K. Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis. *The Canadian Entomologist*. 2000, vol. 132, s. 697-753.

SHI, X.; ZHANG, S.-F.; LIU, F.; ZHANG, Z.; XU, F.-Y.; YIN, S.-Y.; KONG, X.-B. Sensilla on antennae and mouthparts of adult spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Microscopy Research and Technique*. 2021, s. 1-14.

SKUHRAVÝ, V. *Lýkožrout smrkový a jeho kalamity*. Praha: Agrospoj, 2002. 196 s. ISBN 80-7084-238-5.

SPARKMAN, D.; PENTON, Z.; KITSON, F. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. 2. vydání. Oxford : Elsevier, 2011. 611 s. ISBN 978-0-12-373628-4.

SYNTECH. *Electroantennography: a practical introduction*. Kirchzarten, Germany : [s.n.], 2004. 29 s.

TOMMERAS, B. Specialization of the olfactory receptor cells in the bark beetle *Ips typographus* and its predator *Thanasimus formicarius* to bark beetle pheromones and host tree volatiles. *Journal of Comparative Physiology A*. 1985, vol. 157, s. 335-341.

TOMMERAS, B.; MADSEN, S.; MUSTAPARTA, H. Concentration dependent influence of exo-brevicomin on the pheromone attraction of the bark beetle *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*. 1989, vol. 108, s. 24-26. ISSN 0931-2048

WANG, Y.; LI, D.; LIU, Y.; LI, X.-J.; CHENG, W.-N.; SALZMAN, K. Morphology, Ultrastructure and Possible Functions of Antennal Sensilla of *Sitodiplosis mosellana* Géhin (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Insect Science*. 2016, vol. 16, no. 1, s. 1-12.

YUVARAJ, J.; ROBERTS, R.; SONNTAG, Y.; HOU, X.; GROSSE-WILDE, E.; MACHARA, A.; HANSSON, B.; JOHANSON, U.; LÖFSTEDT, CH.;

ANDERSSON, M. Putative ligand binding sites of two functionally characterized bark beetle odorant receptors. *BMC Biology*. 2020 s. 1-19.

ZAHRADNÍK, P.; KNÍŽEK M. Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.). *Lesnická práce*. 2007, vol. 86, no. 4, s. 1-8 (příloha).

ZHANG, Q.-H.; JAKUŠ, R.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. Can *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae) smell the carrion odours of the dead beetles in pheromone traps? Electrophysiological analysis. *Journal of Applied Entomology*. 2003, vol. 127, s. 185-188. ISSN 0931-2048

ZHANG Q.-H.; SCHLYTER, F. Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agricultural and Forest Entomology*. 2004, vol. 6, s. 1-19.

ZHANG, Q.-H.; SCHLYTER, F.; LIU, G.-T.; SHENG, M.-L.; BIRGERSSON, G. 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, s. 1303-1315.

## Seznam příloh

Příloha 1: Chovný plastový box.....	60
Příloha 2: Zapojení tykadla .....	61
Příloha 3: Záznam EO smrku v koncentraci 1 mg/ml a biologické odpovědi tykadel <i>Ips typographus</i> na aktivní látky .....	62
Příloha 4: Záznam EO smrku v koncentraci 1 mg/ml a biologické odpovědi tykadel <i>Ips duplicatus</i> na aktivní látky .....	62
Příloha 5: První část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel <i>Ips typographus</i> na aktivní látky .....	63
Příloha 6: Druhá část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel <i>Ips typographus</i> na aktivní látky .....	63
Příloha 7: První část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel <i>Ips duplicatus</i> na aktivní látky.....	64
Příloha 8: Druhá část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel <i>Ips duplicatus</i> na aktivní látky.....	64
Příloha 9: Potvrzení identifikace látek syntetickými standardy, část 1.....	65
Příloha 10: Potvrzení identifikace látek syntetickými standardy, část 2.....	65
Příloha 11: Potvrzení aktivity tykadel <i>Ips typographus</i> na syntetické standardy, směs A.....	66
Příloha 12: Potvrzení aktivity tykadel <i>Ips duplicatus</i> na syntetické standardy, směs A.....	66
Příloha 13: Potvrzení aktivity tykadel <i>Ips typographus</i> na syntetické standardy, směs B.....	67
Příloha 14: Potvrzení aktivity tykadel <i>Ips duplicatus</i> na syntetické standardy, směs B.....	67

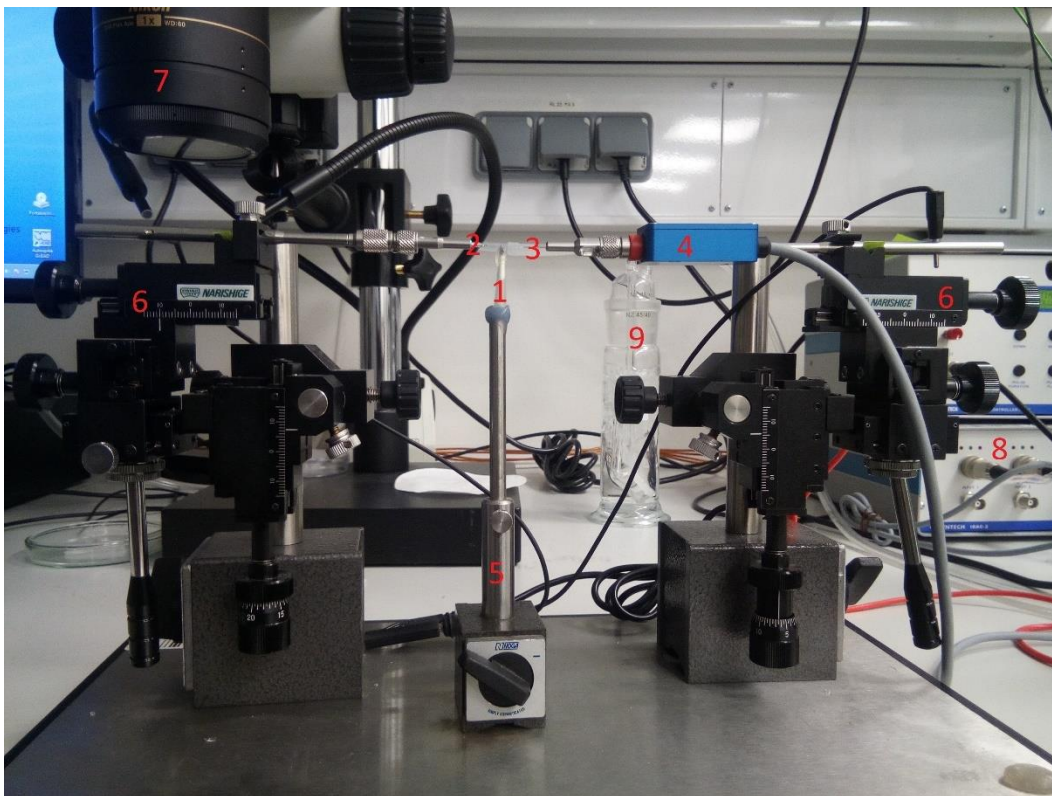
## Přílohy

### 1. Chovný box.



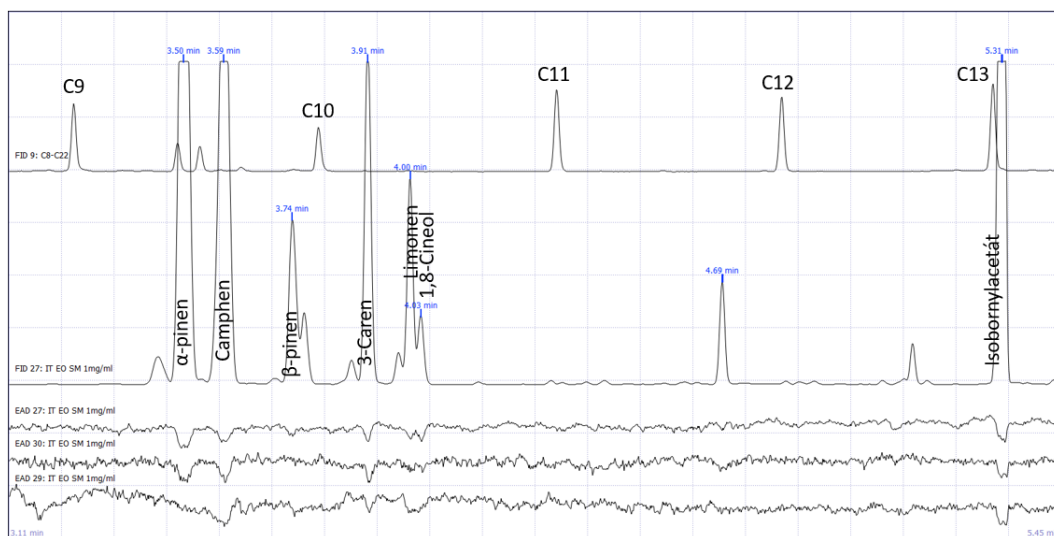
*Příloha 1:* Chovný plastový box s infestovaným polenem podloženým papírovou utěrkou. V zadní části je vidět otvor a hadice pro odtah vzduchu (1), ve víku otvor překrytý sítkou pro vstup čerstvého vzduchu (2). Autor: Jaromír Bláha

## 2. Zapojení tykadla.



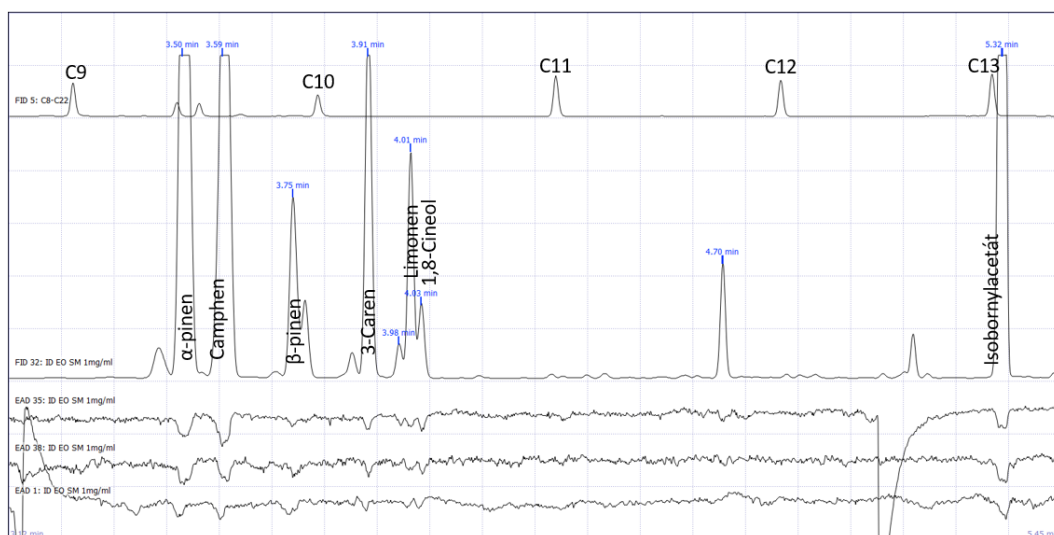
*Příloha 2:* Preparát zafixovaného tykadla s živým broukem (1) na stojánku (5) zapojeným mezi referenční (2) a měřicí (3) elektrodu s před zesilovačem (10x, Syntech Universal Probe) (4) pomocí mikromanipulátorů (Narishige) (6). Měřicí elektroda (3) je zapojena do analogo-digitálního převodníku (8). Zapojení probíhalo pod stereomikroskopem (zvětšení 60x) (7). Pro přenos analyzovaných látek k tykadlu byl použit vzduch vlhčený pomocí promývačky plynů (9). Autor: Jaromír Bláha

3. Záznam EO smrku v koncentraci 1 mg/ml a biologické odpovědi tykadel *Ips typographus* na aktivní látky.



*Příloha 3:* Vrchní záznam zobrazuje alkyany s počty uhlíků 9-13 (FID 9). Pod ním je záznam EO smrku (FID 27) s označenými aktivními látkami. Spodní 3 záznamy (EAD 27, EAD 29 a EAD 30) ukazují odpovědi tykadla *Ips typographus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují aktivitu tykadel na stejné sloučeniny. Autor: Jaromír Bláha.

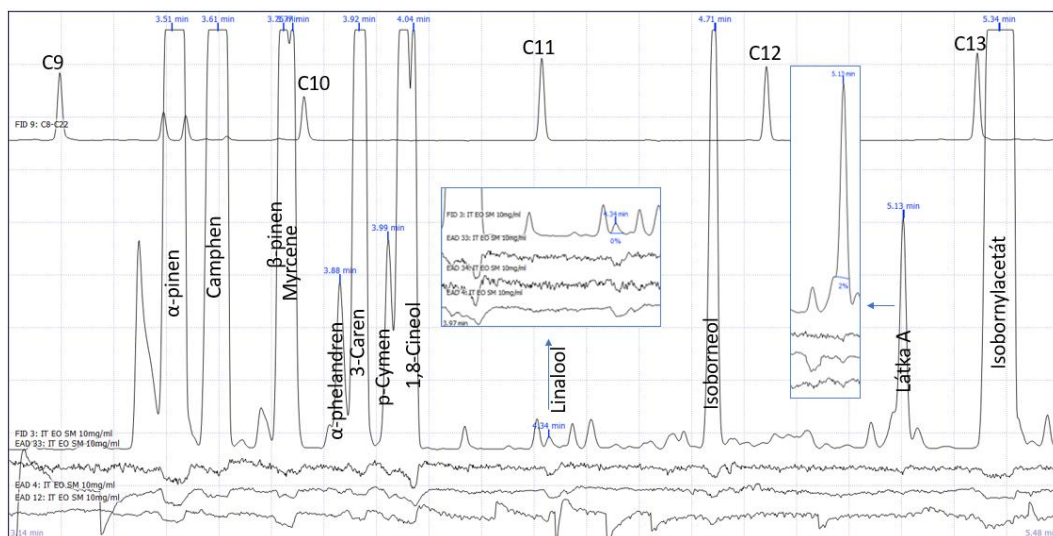
4. Záznam EO smrku v koncentraci 1 mg/ml a biologické odpovědi tykadel *Ips duplicatus* na aktivní látky.



*Příloha 4:* Vrchní záznam zobrazuje alkyany s počty uhlíků 9-13 (FID 5). Pod ním je záznam EO smrku (FID 32) s označenými aktivními látkami. Spodní 3 záznamy (EAD 1, EAD 35 a EAD 38) ukazují odpovědi tykadla *Ips duplicatus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují aktivitu tykadel na stejné sloučeniny. Autor: Jaromír Bláha.

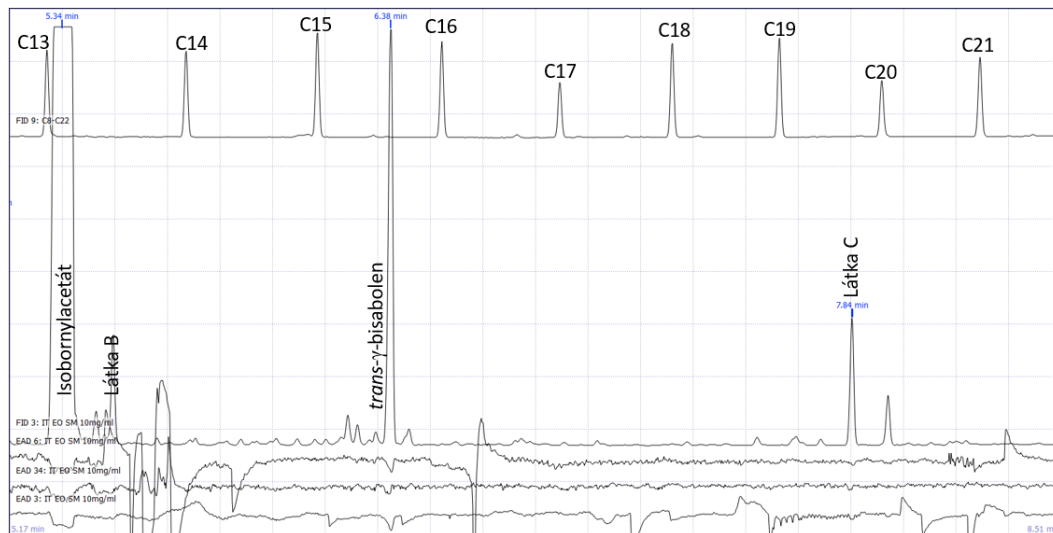


5. První část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel *Ips typographus* na aktivní látky.



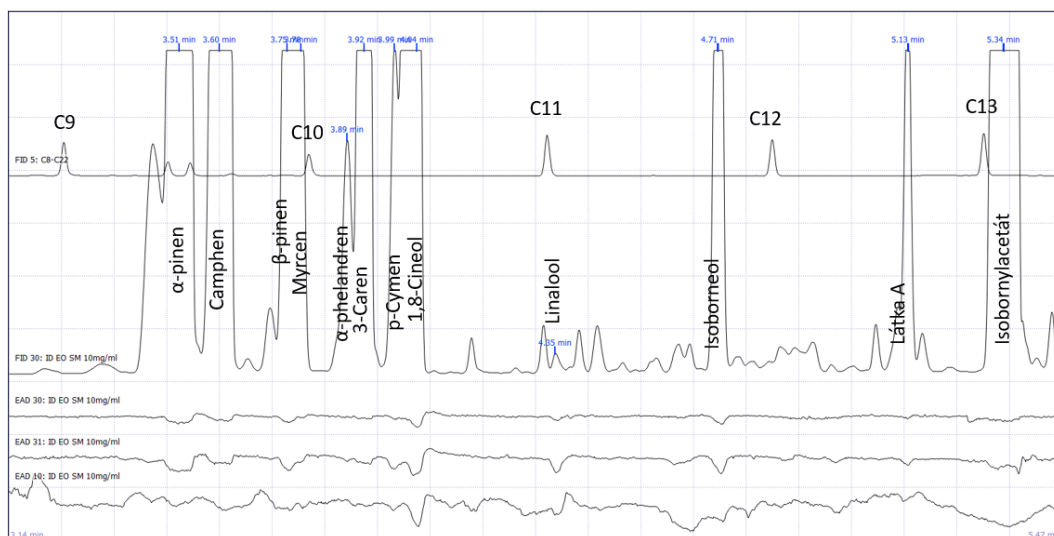
Příloha 5: Vrchní záznam zobrazuje alkyany s počty uhlíků 9-13 (FID 9). Pod ním je záznam EO smrku (FID 3) s označenými aktivními látkami. Spodní 3 záznamy (EAD 4, EAD 12 a EAD 33) ukazují odpovědi tykadla *Ips typographus* na uvedené látky. Vložená okna zobrazují detail aktivitu tykadel na dané látky, které nejsou zřejmé z původního záznamu. Ostatní záznamy ukazují odpovědi tykadel na stejné sloučeniny. Autor: Jaromír Bláha.

6. Druhá část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel *Ips typographus* na aktivní látky.



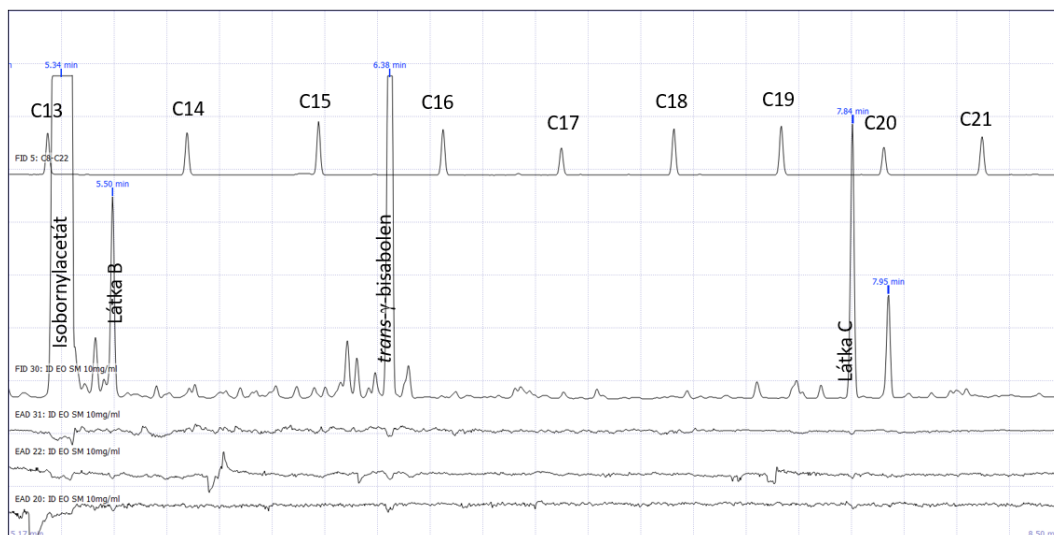
Příloha 6: Vrchní záznam zobrazuje alkyany s počty uhlíků 13-21 (FID 9). Pod ním je záznam EO smrku (FID 3) s označenými aktivními látkami. Spodní 3 záznamy (EAD 3, EAD 6 a EAD 34) ukazují odpovědi tykadla *Ips typographus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují aktivitu tykadel na stejné sloučeniny. Autor: Jaromír Bláha.

7. První část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel *Ips duplicatus* na aktivní látky.



*Příloha 7:* Vrchní záznam zobrazuje alkany s počty uhlíků 9-13 (FID 5). Pod ním je záznam EO smrku (FID 30) s označenými aktivními látkami. Spodní 3 záznamy (EAD 10, EAD 30 a EAD 31) ukazují odpovědi tykadla *Ips duplicatus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují aktivitu tykadel na stejné sloučeniny. Autor: Jaromír Bláha

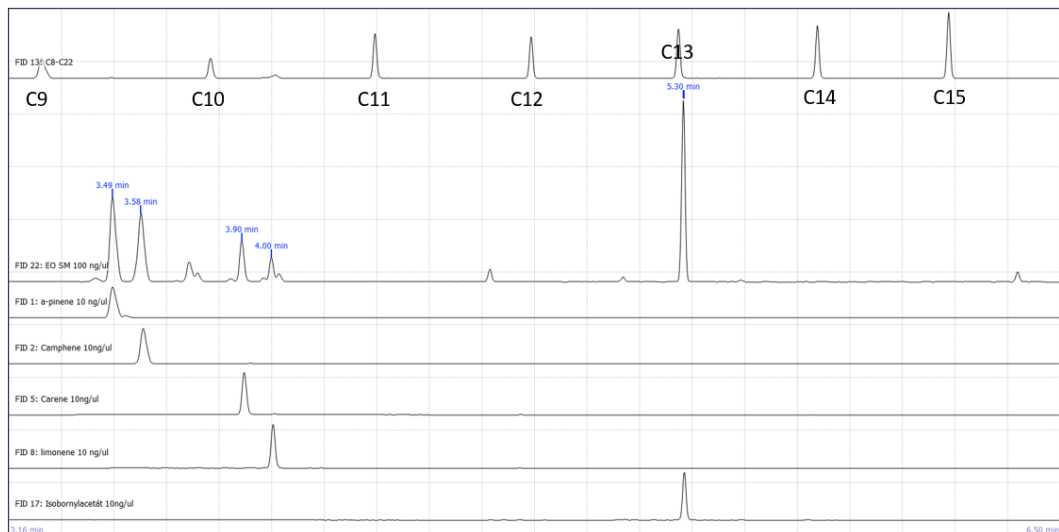
8. Druhá část záznamu EO smrku v koncentraci 10 mg/ml a biologické odpovědi tykadel *Ips duplicatus* na aktivní látky.



*Příloha 8:* Vrchní záznam zobrazuje alkany s počty uhlíků 13-21 (FID 5). Pod ním je záznam EO smrku (FID 30) s označenými aktivními látkami. Spodní 3 záznamy (EAD 20, EAD 22 a EAD 31) ukazují odpovědi tykadla *Ips duplicatus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují aktivitu tykadel na stejné sloučeniny. Autor: Jaromír Bláha

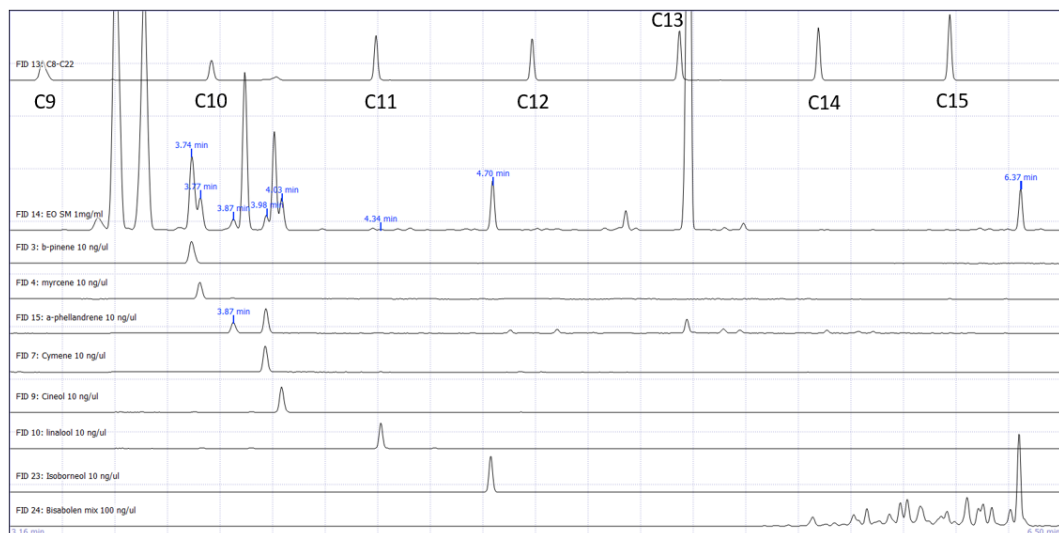


## 9. Potvrzení identifikace látek syntetickými standardy, část 1.



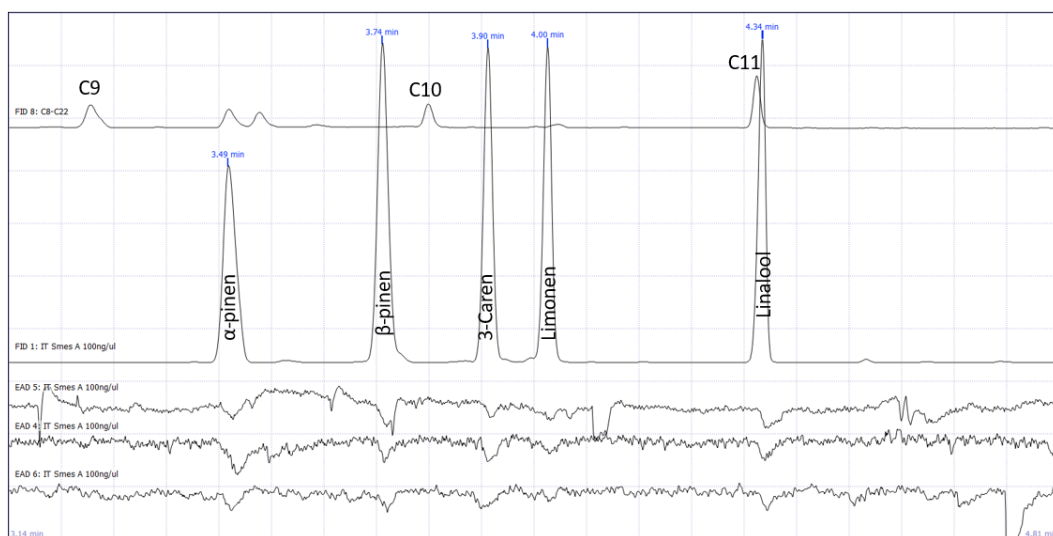
*Příloha 9:* Potvrzení identifikace látek porovnáním retenčních časů syntetických standardů a EO smrku. Porovnání pro látky, které se v EO vyskytují ve velkém množství. Vrchní záznam zobrazuje alkany s počty uhlíků 13-21 (FID 13). Pod ním je záznam EO smrku (FID 22) v koncentraci 100 ng/ $\mu$ l. Následují záznamy syntetických standardů v koncentraci 10 ng/ $\mu$ l  $\alpha$ -pinenu (FID 1), camphenu (FID 2), 3-carenu (FID 5), limonenu (FID 8) a isobornylacetátu (FID 17). Autor: Jaromír Bláha.

## 10. Potvrzení identifikace látek syntetickými standardy, část 2.



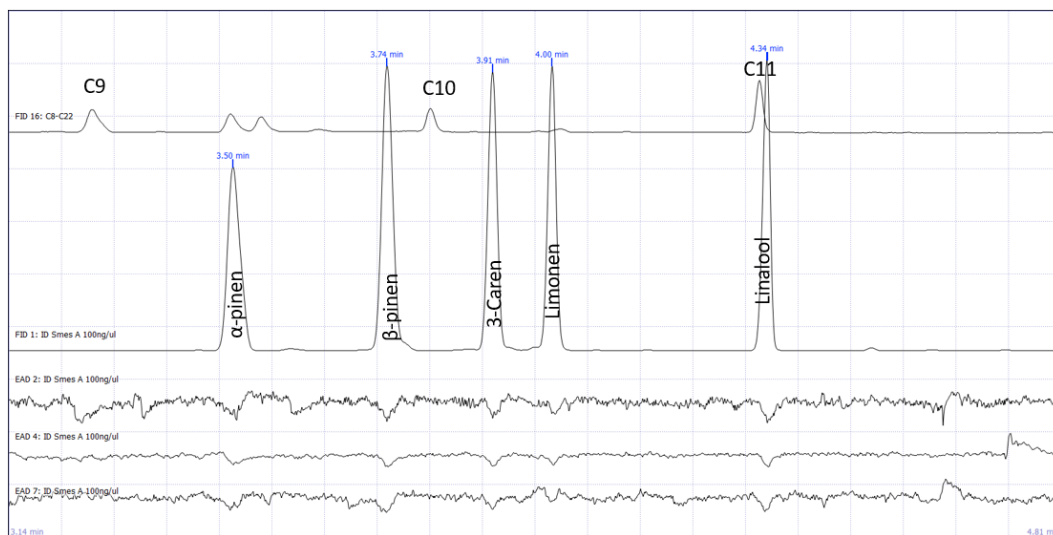
*Příloha 10:* Potvrzení identifikace látek porovnáním retenčních časů syntetických standardů a EO smrku. Porovnání pro látky, které se v EO vyskytují ve menším množství. Vrchní záznam zobrazuje alkany s počty uhlíků 13-21 (FID 13). Pod ním je záznam EO smrku (FID 14) v koncentraci 1 mg/ml. Následují záznamy syntetických standardů v koncentraci 10 ng/ $\mu$ l  $\beta$ -pinenu (FID 3), myrcenu (FID 4),  $\alpha$ -phellandrenu (FID 15), p-cymenu (FID 7), 1,8-cineolu (FID 9), linaloolu (FID 10), isoborneolu (FID 23) a směsi izomerů bisabolenu v koncentraci 100 ng/ $\mu$ l (FID 24). U standardu  $\alpha$ -phellandrenu je cílová látka první pík (ověřeno analýzou na hmotnostním spektrometru) a ostatní látky jsou znečištění. U směsi izomerů bisabolenu je hledaná sloučenina poslední největší pík *trans*- $\gamma$ -bisabolenu. Autor: Jaromír Bláha

## 11. Potvrzení aktivity tykadel *Ips typographus* na syntetické standardy, směs A.



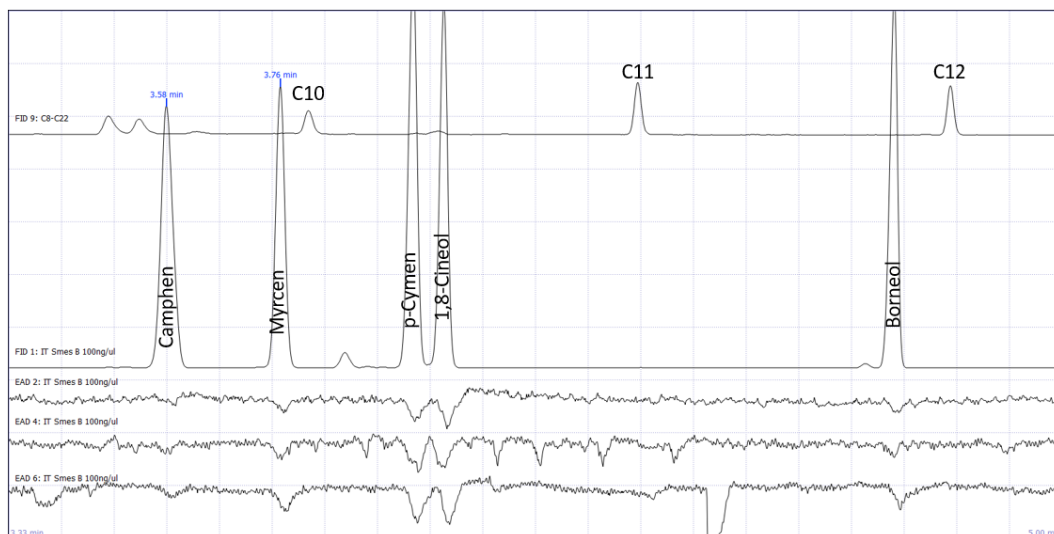
*Příloha 11:* Vrchní záznam zobrazuje alkany s počty uhlíků 9-11 (FID 8). Po něm je směs syntetických standardů  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu, 3-carenu, limonenu a linaloolu (FID 1). Každý standard je v koncentraci 100 ng na 1  $\mu$ l celého roztoku. Spodní 3 záznamy (EAD 4, EAD 5 a EAD 6) ukazují odpovědi tykadla *Ips typographus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují stejnou aktivitu tykadel. Autor: Jaromír Bláha

## 12. Potvrzení aktivity tykadel *Ips duplicatus* na syntetické standardy, směs A.



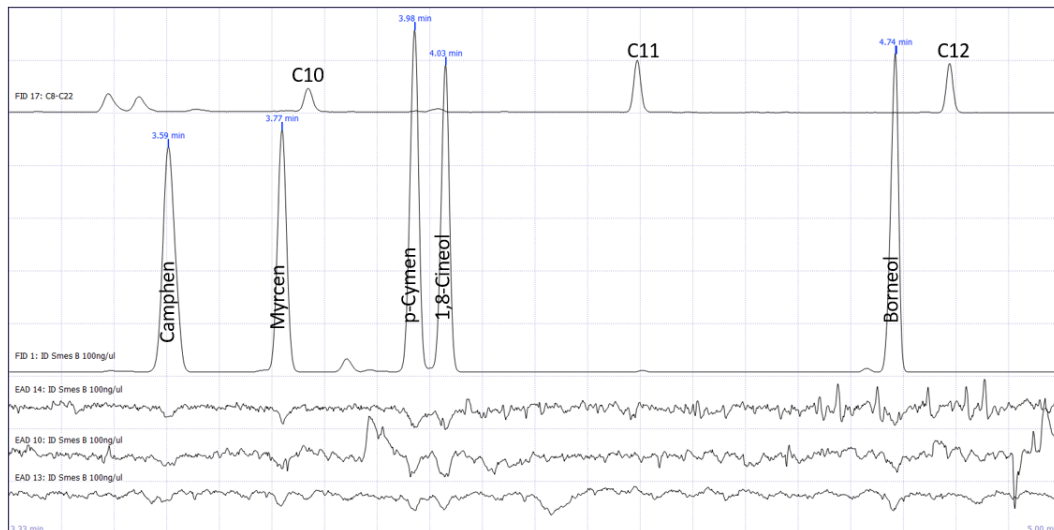
*Příloha 12:* Vrchní záznam zobrazuje alkany s počty uhlíků 9-11 (FID 16). Po něm je směs syntetických standardů  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu, 3-carenu, limonenu a linaloolu (FID 1). Každý standard je v koncentraci 100 ng na 1  $\mu$ l celého roztoku. Spodní 3 záznamy (EAD 2, EAD 4 a EAD 7) ukazují odpovědi tykadla *Ips duplicatus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují stejnou aktivitu tykadel. Autor: Jaromír Bláha

### 13. Potvrzení aktivity tykadel *Ips typographus* na syntetické standardy, směs B.



Příloha 13: Vrchní záznam zobrazuje alkyany s počty uhlíků 10-12 (FID 9). Pod ním je směs syntetických standardů camphenu, myrcenu, p-cymenu, 1,8-cineolu a borneolu (FID 1). Každý standard je v koncentraci 100 ng na 1  $\mu$ l celého roztoku. Spodní 3 záznamy (EAD 2, EAD 4 a EAD 6) ukazují odpovědi tykadla *Ips typographus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují stejnou aktivitu tykadel. Autor: Jaromír Bláha

### 14. Potvrzení aktivity tykadel *Ips duplicatus* na syntetické standardy, směs B.



Příloha 14: Vrchní záznam zobrazuje alkyany s počty uhlíků 10-12 (FID 17). Po ním je směs syntetických standardů camphenu, myrcenu, p-cymenu, 1,8-cineolu a borneolu (FID 1). Každý standard je v koncentraci 100 ng na 1  $\mu$ l celého roztoku. Spodní 3 záznamy (EAD 10, EAD 13 a EAD 14) ukazují odpovědi tykadla *Ips duplicatus* na uvedené látky. Ostatní záznamy zobrazují stejnou aktivitu tykadel. Autor: Jaromír Bláha