

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Produkují samci *Ips typographus* feromon před
kolonizací hostitelského stromu?**

Bakalářská práce

Autor: Jaromír Bláha

Vedoucí práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

2019

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jaromír Bláha

Lesnictví

Název práce

Produkují samci *Ips typographus* feromon před kolonizací hostitelského stromu?

Název anglicky

Do males of *Ips typographus* produce pheromone before host colonization?

Cíle práce

Samčí agregační feromon Lýkožrouta smrkového, *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) je syntetizován v zadní části střeva. Hlavními složkami feromonu je synergistická směs dvou látek -2-methyl-3-buten-2-olu (MB) a cis-verbenolu (cV). Soudí se, že MB je nově syntetizován ve střevě brouků, zatímco cV vzniká přeměnou hostitelského terpenu, (-)-alfa pinenu. Ačkoliv je masivní uvolňování těchto komponent spojeno se začátkem kolonizace hostitelského stromu, existují nepřímé evidence, že brouci mohou feromon, nebo alespoň MB, v malém množství vytvářet již před kolonizací (Birgersson et al., 1984, J.P. Vité, osobní sdělení). Navrhovaný výzkum bude zaměřen na studium faktorů ovlivňující feromonovou produkci samců *I. typographus* před kolonizací. Integrální součástí bakalářské práce je vypracování přehledu publikovaných údajů k dané problematice.

Metodika

Metodicky bude práce zaměřena na vypracování literární rešerše zaměřené na chromatografickou a elektroantennografickou analýzu těkavých látek ve střevech samců v různých fázích zralosti a s rozdílnou fyziologickou historií v období před kolonizací (nezralí brouci před úživným žírem, po úživném žíru, brouci před disperzním letem, po disperzním letu).

Doporučený rozsah práce

30

Klíčová slova

Ips typographus, produkce feromonu

Doporučené zdroje informací

Birgersson et al., 1984: Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *J. Chem. Ecol.* 10: 1029-1055

Byers and Birgersson, 2012: Host-tree monoterpenes and biosynthesis of aggregation pheromones in the bark beetle *Ips paracofusus*. *Psyche* 2012, Article ID 539624, 10 pages

Kenneth Raffa 2000 Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective 2000 *The Canadian Entomologist* 132:697-753, DOI: 10.4039/Ent132697-6

Schlyter F. and Cederholm I. (1981) Separation of the sexes of living spruce bark beetles *Ips typographus* (L) (Coleoptera: Scolytinae). *Z Angew Entomol* 92: 42-47, Bernin/Deutschland

Předběžný termín obhajoby

2018/19 LS – FLD

Vedoucí práce

RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Elektronicky schváleno dne 8. 3. 2019

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 8. 3. 2019

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 22. 03. 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Produkuje samci *Ips typographus* feromon před kolonizací hostitelského stromu?“ vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Blanky Kalinové, CSc. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Děkuji RNDr. Blance Kalinové, CSc. za trpělivé vedení bakalářské práce a odbornou i manuální pomoc, Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za analyzování vzorků a odbornou pomoc při analytické části bakalářské práce, Ing. Jiřímu Synkovi za odbornou i manuální pomoc při chovu a sběru jednotlivých stádií *Ips typographus* a Ing. Anně Jirošové, Ph.D. za objasnění klíčových principů chemické ekologie. Bez těchto lidí by tato bakalářská práce nemohla vzniknout.

Dále děkuji mé rodině a Bc. Kláře Bohuslávkové za trpělivost a podporu.

Abstrakt

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je nejvýznamnější škůdce smrkových (*Picea abies*) porostů. Při kolonizaci hostitelského stromu samci produkují agregační feromon, který láká další brouky obou pohlaví. Feromon je tvořen ve střevech samců a faktory, které tvorbu ovlivňují, nejsou zcela objasněny. Tato práce je zaměřena na objasnění otázky, ve kterém vývojovém stádiu je produkce feromonu zahájena a které faktory ji ovlivňují.

V této práci byl studován obsah feromonu ve střevech samců šesti vývojových stádií (zlatí samci před úživným žírem, sklerotizovaní samci v průběhu úživného žíru, samci čerstvě vyrojení z matečního stromu, samci po disperzním letu, nespáření samci s hotovou snubní komůrkou a spáření samci). Experimenty byly provedeny ve třech nezávislých opakováních. Střeva jednotlivých kategorií brouků byla pitvána a extrahována v pentanu. Vzniklé vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Ve vzorcích bylo kvantifikováno šest látek. Kromě hlavních feromonových komponentů 2-metyl-3-buten-2-olu a *cis*-verbenolu to byly látky *trans*-verbenol, 2-fenylethanol, verbenon a ipsdienol.

Bylo zjištěno, že se obsah sledovaných látek během ontogeneze mění. 2-metyl-3-buten-2-ol se vyskytoval v malých množstvích u vylétnutých a prolétaných brouků. Svého maxima dosahoval u samců s hotovou snubní komůrkou. Po spáření jeho koncentrace výrazně poklesla. Látky *cis*-verbenol, *trans*-verbenol a verbenon byly ve významném množství přítomny u zlatých brouků, pak jejich množství ve střevech poklesla k nulovým hodnotám. Letová aktivita zvýšila hodnoty *cis*-verbenolu a verbenonu, ale ne *trans*-verbenolu. Zvýšení množství *trans*-verbenolu se objevilo až v průběhu kolonizace hostitelského stromu. Páření neovlivnilo produkci *cis* a *trans*-verbenolu ani verbenonu. Ipsdienol byl pozorován v malých množstvích u spářených samců. Fenylethanol se začal tvořit u brouků vylétnutých z matečního stromu a jeho množství se zvyšovalo až do stádia zavrtných samců s hotovou snubní komůrkou. Po spáření se obsah fenylethanolu mírně snížil.

Data ukazují, že oba hlavní komponenty agregačního feromonu *Ips typographus* jsou přítomny ve střevech samců již před kolonizací hostitele. Kolonizace zvyšuje produkci 2-metyl-3-buten-2-olu, ale ne *cis*-verbenolu. Výsledky jsou diskutovány s ohledem na možnou agregaci brouků před vlastním napadením hostitelského stromu.

Abstrakt

European spruce bark beetle (*Ips typographus*) is the most important pest of spruce (*Picea abies*) forests. When colonizing the host tree, males produce an aggregation pheromone that attracts other conspecifics to join the attack. The factors that affect production are not fully understood. This thesis aims to clarify the question, in which developmental stage beetles start to produce the pheromone.

Therefore, we studied the content of pheromone in the guts in males of the six developmental stages (golden beetles before maturation feeding, sclerotized males after maturation feeding, males freshly emerged from breeding logs, males after flying experience, males with finished nuptial chambers and mated males). The male guts of each category were excised and extracted in pentane. The resulting samples were analyzed by gas chromatography with mass detection. Three replicates were prepared for each category. Six substances were quantified in the samples. In addition to two major pheromone components, 2-methyl-3-buten-2-ol and *cis*-verbenol, others were *trans*-verbenol, 2-phenylethanol, verbenone and ipsdienol.

We found that the content of investigated compounds changes during ontogenesis. 2-methyl-3-buten-2-ol was present in small amounts in males freshly emerged from breeding logs and in males colonizing the host. The 2-methyl-3-buten-2-ol content reached its maximum in males with finished nuptial chamber. After mating, its concentration decreased significantly. Compounds *cis*-verbenol, *trans*-verbenol and verbenone were present in significant amounts already in the golden beetles. Their content in the gut decreased to zero in dark sclerotized beetles. Flight activity increased *cis*-verbenol and verbenone, but not *trans*-verbenol. The *trans*-verbenol increase was observed only after colonization of the host tree. Mating did not affect the production of *cis*- and *trans*-verbenol or verbenone. Ipsdienol was observed in small amounts only in mated males. Phenylethanol began to form in beetles emerged from breeding logs. Its amount increased in male with the finished nuptial chamber. After mating, the phenylethanol content decreased.

The data show that both major components of *Ips typographus* aggregation pheromone are present in the male guts before the host colonization. The colonization of the host increases the production of 2-methyl-3-buten-2-ol but not *cis*-verbenol. The results are discussed with regard to possible aggregation behavior of beetles prior host colonization.

Klíčová slova

Ips typographus, produkce feromonu, vývojová stádia, GCxGC-TOFMS

Key words

Ips typographus, pheromone production, development phases, GCxGC-TOFMS

Obsah

1	Úvod	11
2	Cíle práce	11
3	Literární řešerše	12
3.1	Hostitelské dřeviny <i>Ips typographus</i>	12
3.2	<i>Ips typographus</i>	12
3.3	Bionomie <i>Ips typographus</i>	13
3.3.1	Kolonizace hostitelského stromu.....	14
3.4	Komunikace <i>Ips typographus</i>	16
3.4.1	Akustická komunikace	16
3.4.2	Zrak.....	16
3.4.3	Chemická komunikace	16
4	Metodika	21
4.1	Chov <i>Ips typographus</i> a shromažďování vzorků	21
4.2	Rozlišování pohlaví <i>Ips typographus</i>	23
4.3	Pitva <i>Ips typographus</i> a extrakce střev.....	24
4.4	Chemická analýza	25
5	Výsledky	26
6	Diskuze	34
7	Závěr	38
8	Seznam literatury	39

Seznam obrázků

Obrázek 1: Množství jednotlivých feromonových složek u <i>Ips typographus</i> v různých fázích útoku na strom.	20
Obrázek 2: Samec a samice <i>Ips typographus</i> z mediálního pohledu.	23
Obrázek 3: Graf průběhu průměrného množství MB	29
Obrázek 4: Graf průběhu průměrného množství cV	29
Obrázek 5: Graf průběhu průměrného množství tV	30
Obrázek 6: Graf průběhu průměrného množství fenylethanolu.....	30
Obrázek 7: Graf průběhu průměrného množství ipsdienolu	31
Obrázek 8: Graf průběhu průměrného množství verbenonu	32
Obrázek 9: Graf průběhu průměrného součtu množství cV a tV.....	32
Obrázek 10: Souhrnný graf průběhu průměrných množství všech zkoumaných látek.....	33
Obrázek 11: Souborný graf průběhu průměrných množství zkoumaných látek bez MB	34

Seznam tabulek

Tabulka 1: Absolutní hodnoty množství feromonových komponentů naměřené z jednotlivých vzorků v prvním opakování pokusu.....	27
Tabulka 2: Absolutní hodnoty množství feromonových komponentů naměřené z jednotlivých vzorků v druhém opakování pokusu.....	27
Tabulka 3: Absolutní hodnoty množství feromonových komponentů naměřené z jednotlivých vzorků ve třetím opakování pokusu.....	27
Tabulka 4: Průměrné hodnoty množství feromonových komponentů počítané z hodnot všech opakování.	28

1 Úvod

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L., *Coleoptera*, *Scolytinae*) je nejvážnější škůdce současných lesních porostů. Složení dnešních lesů na území České republiky je tvořeno hlavně smrkem ztepilým (*Picea abies* L.), hlavním hostitelem lýkožrouta smrkového (50,3 % dřevinné skladby) (Zelená zpráva 2017). Díky měnícím se klimatickým podmínkám, s periodickými déletrvajícími obdobími sucha, dochází k oslabení smrkových porostů, převážně na nepůvodních stanovištích (pouze 11,2 porostní půdy ČR je přirozeným stanovištěm smrku, Zelená zpráva 2017). Tyto skutečnosti vedly ke vzniku masivní kůrovcové kalamity s ohniskem v severních Čechách (Bruntálsko), šířící se do zbytku České republiky. V roce 2017 bylo evidováno 5,34 mil. m³ kůrovcového dříví (Zelená zpráva 2017). Tento problém se netýká jen České republiky, ale celé střední Evropy.

Bionomii a fyziologii lýkožrouta smrkového se vědci snaží lépe pochopit již mnoho let. Rozsah současné kalamity k tomuto tématu navíc přitáhl značnou pozornost veřejnosti, politiků a vědců. Během posledních let vzniklo mnoho projektů zaměřených na výzkum lýkožrouta smrkového s cílem lépe popsat jeho biologii a rozšířit možnosti ochrany proti němu. Jednou z možností je výzkum chemické ekologie se zacílením na studium feromonů a jiných komunikačních látek (semiochemikálií), do něhož se řadí i tato práce.

2 Cíle práce

Mezi nejvýznamnější semiochemikálie *Ips typographus* patří agregační feromon, který synchronizuje nálet brouků na hostitelský strom. Je produkován v zadním střevě samců, kteří pod kůrou hloubí snubní komůrku, a uvolňuje se z drtinek sypajících se ze závrtového otvoru do okolí napadeného stromu. Jeho nejdůležitější součásti jsou dvě těkavé látky 2-metyl-3-buten-2-ol (MB) a *cis*-verbenol (cV). cV vzniká přeměnou hostitelských monoterpenů (hlavně α -pinenu) a jeho množství přímo souvisí s obsahem α -pinenu v hostitelském stromě (Birgersson a kol. 1989). Naproti tomu MB si kůrovci vytváří z vlastních zdrojů (*de novo*). K masivní tvorbě a uvolňování obou látek dochází na začátku kolonizace hostitele. Některé literární údaje se zabývají možností, že samci *Ips typographus* mohou vylučovat malá množství agregačního feromonu již před kolonizací stromu.

Cílem této práce bylo stanovit obsah hlavních feromonových komponentů 2-metyl-3-buten-2-ol (MB) a *cis*-verbenolu (cV) ve střevech brouků *Ips typographus* v různých vývojových stádiích před a v raných fázích kolonizace.

Tento výzkum by mohl pomoci k lepšímu pochopení fyziologie lýkožrouta smrkového a jeho chemických procesů spojených s tvorbou feromonu. Dále by se dalo navázat výzkumem potencionálních inhibitorů tvorby komunikačních alkoholů *Ips* spp. Výzkum dané problematiky by mohl výrazně přispět k tvorbě nových metod ochrany hospodářských lesů v budoucnosti. Součástí předkládané práce je literární rešerše dané problematiky.

3 Literární rešerše

3.1 Hostitelské dřeviny *Ips typographus*

Hlavní hostitelskou dřevinou v evropských podmínkách je smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.). Smrk je, stejně jako lýkožrout smrkový, u nás původně montánní druh (rekonstruované přirozené zastoupení je 11,2 %), ale pro jeho rychlý růst a rovné a lehké dřevo bez velkých suků byl lidmi introdukován na 50,3 % lesních porostů v České republice. Je nenáročný na teplotu, dobře snáší zimní mrazy i vysoké letní teploty, pokud má dostatečný přísun vody. Vysoké nároky na přísun vody se projevují zvláště v nižších polohách s teplejším podnebím. V oblastech s nedostatkem srážek je stresován a oslaben vůči útoku biotických škodlivých vlivů, například podkorního hmyzu, hub a jiných patogenů. Pro svůj růst nepotřebuje půdu bohatou na živiny, ale vyžaduje značné okyselení půdy (pH 4-5). Zvládne dokonce růst spolu s borovicí blatkou a klečí i v extrémních podmínkách rašelinišť (Jakuš, Holuša, Blaženec 2015; Zelená zpráva 2017).

Na západě Sibíře je hostitelská dřevina lýkožrouta smrkového *Picea obovata*, na východě potom *Picea jezoensis*. V celém areálu se může vyskytnout i na různých druzích introdukovaných smrků, výjimečně i na borovici a modřínu (rod *Pinus* a *Larix*) (shrnuto v Skuhravý 2002).

3.2 *Ips typographus*

Ips typographus je velmi rozšířený euroasijský druh. Jeho areál se táhne od Pyrenejí přes střední a severní Evropu, téměř celou Sibíř až k Japonsku. Na severu je jeho výskyt ohraničen tundrou, na jihu areál výskytu zasahuje do hor balkánského

poloostrova, severního Kazachstánu a Číny (Skuhravý 2002). Ve střední Evropě patří lýkožrout smrkový mezi druhy montánní (do 2000 m.n.m.), avšak s umělými výsadbami smrku do nižších poloh se rozšířil v podstatě po celém území (Křístek, Urban 2013).

Ips typographus (L.) je malý, v průměru 4,2 – 5,5 mm dlouhý a 1,9 mm široký brouk z čeledi kůrovcovití (*Scolytinae*, *Coleoptera*). Lýkožrout smrkový byl určen a zařazen do systému Linéem v roce 1758. Liné ho však zařadil do rodu *Dermestes*, z nějž byl roku 1984 přearažen Reitterem do rodu *Ips* (Zumr 1995).

Dospělý brouk je černohnědý s výrazným zlatavým ochlupením. Krovky má lesklé bez teček v mezirýží. V zadní části krovek má matnou prohlubeň lemovanou čtyřmi zuby na každé straně. Třetí pár zubů je nejvyšší, na konci šípovitě rozšířený. Tykadla má zakončená paličkou, na které jsou specificky zprohýbané oblasti pokryté čichovými senzily (v taxonomické literatuře zvané švy) (Pfeffer 1989).

Údaje o možnostech disperze u lýkožrouta smrkového jsou velmi nejednoznačné. Skuhravý (2002) uvádí, že *Ips typographus* je mobilní druh, jehož značná část jedinců migruje. Délka letu se liší v lesních porostech a na otevřených prostranstvích, kde dosahuje až 8 km. To znesnadňuje možnost redukovat jeho populační hustotu (shrnutí v Skuhravý 2002).

3.3 Bionomie *Ips typographus*

Lýkožrout smrkový přezimuje většinou jako dospělý brouk v hrabance, nebo pod kůrou stromů. Pokud se na podzim nestihl dovyvinout, může zimu trávit i jako larva, kukla, nebo zlatý brouk v mateřském stromě (shrnutí v Kindlmann, Matějka, Doležal 2012). Pokud teplota vzduchu na jaře dosáhne 18-20 °C po několik dní, dospělci se hromadně rojí a napadají stromy v okolí. Rojení trvá 10-20 dnů a v nížinách nastává koncem dubna až začátkem května, na horách pak koncem května. Lýkožrout smrkový preferuje stromy starší šedesáti let se silnější vrstvou lýka. Nejprve napadá zlomy, vývraty a oslabené stromy, avšak při silnějším přemnožení i zdravé stromy. Na hostitelské stromy nalétají nejprve samci, kteří vytváří snubní komůrku, kde se spáří s 1-3 samicemi. Po spáření samice vrtá 6-10 cm dlouhé matečné chodby rovnoběžné s osou kmene, do kterých klade okolo 60 vajíček. Za 1-2 týdny se vylíhnou larvy, které mají 3 instary. Vývoj larvy trvá průměrně 2 týdny, ale značně závisí na počasí. Larvální chodby jsou kolmé na osu

kmene, zvlněné a zakončené kukelnou komůrkou. Stádium kukly trvá přibližně týden až dva, po něm se rodí bílí brouci, kteří prodělávají 2-3 týdenní úživný žír, při němž sklerotizují své tělo, které postupně tmavne od zlaté až po černohnědou barvu pohlavně zralého dospělce. Dospělí brouci opouští matečný strom výletovým otvorem.

Na horách tvoří lýkožrout smrkový jednu generaci, v nížinách dvě až tři. Počet generací závisí na počasí daného roku, přičemž poslední generace je zimující. Tito brouci vydrží nižší teploty a od nezimujících generací se také liší obsahem lipidů a glykogenu v jejich organismu (Křístek, Urban 2013; shrnuto v Skuhřavý 2002).

3.3.1 Kolonizace hostitelského stromu

Princip výběru hostitelského stromu nebyl doposud plně objasněn. Jedna z teorií předpokládá náhodný výběr hostitelského stromu, zatímco další říká, že samci *Ips typographus* si vhodného hostitele vybírají podle těkavých látek uvolňovaných hostitelskými stromy. Primární atraktivita stromů však zatím nebyla prokázána. Kalinová a kol. (2014) objevila na lapácích těkavé látky vyskytující se jen v malých množstvích (1,8-cineole, camphor, *trans*-pinocamphone, terpinen-4-ol, *cis*-pinocamphone a verbenon), na které výrazně reaguje tykadlo lýkožrouta smrkového. Reakce tykadla na tyto látky je významnější než u běžných hostitelských monoterpenů jako je α -pinen a β -pinen. Jejich behaviorální význam však zatím zůstává nevysvětlen (Kalinová a kol. 2014).

Na lokalizaci vhodného hostitele mají význam i těkavé látky produkované nehostitelskými druhy, jako jsou těkavé látky vylučované z listů krytosemenných rostlin, nebo kůrou listnatých stromů (C8-alkoholy, *trans*-conophthorin). Tyto látky působí na lýkožrouta smrkového repelentně. Se vzrůstající koncentrací těchto inhibitorů ve vzduchu se snižuje pravděpodobnost náletu kůrovců na smrky v tomto porostu. (Jakuš, Holuša, Blaženec 2015). Na orientaci v ekosystému podle chemických látek mají také vliv další vnější faktory jako struktura porostu a počasí (shrnuto v Aukema a kol. 2010).

Hostitelský strom vybírají pionýřští samci, kteří ve vyváženém ekosystému preferují stromy fyziologicky oslabené (vývraty, zlomy). Častým cílem náletu lýkožroutů jsou stromy vyskytující se na osluněných porostních stěnách. Silné sluneční záření vysouší půdu, zahříváním kmenů zvyšuje transpiraci, a tím

způsobuje stromům nedostatek vody, což je pro smrk ztepilý silný stresový faktor. Vyšší teplota kmene navíc urychluje vývoj lýkožroutů. Při nižších populačních hustotách se pionýrští samci vyhýbají zdravým stromům, kde je malá šance na překonání obranyschopnosti stromu a vyhledávají spíše stromy oslabené. Pokud však populační hustota stoupne, napadají samci nejbližší stromy v okolí a usmrcují i zdravé jedince. Vzniká tak ohnisko kůrovcového náletu.

Po zavrtání samce do kůry dochází ke spuštění obrany stromu. Napadený jedinec začne ronit pryskyřici, kterou se snaží lýkožrouta zalít. Pryskyřice navíc obsahuje toxické terpeny, enzymatické bílkoviny a fenolické sloučeniny. Některé toxické monoterpeny kůrovci dokážou hydroxylovat na alkoholy a používají je jako složky agregačního feromonu. Po výronu pryskyřice se její struktura mění v závislosti na změnách složení. Lehké monoterpeny a seskviterpeny postupně vytékají a těžké diterpeny vykrystalizují a vytvoří tak pevnou mechanickou zábranu proti invazi dalších patogenů. Zároveň buňky okolo napadeného místa odumřou a jsou zapouzdřeny kalusem, který vytváří další fyzickou zábranu infekci. V okolí napadení se také mohou začít tvořit nové struktury, které indukují tvorbu nových toxických látek a tím zvyšují obranyschopnost stromu vůči budoucím útokům. Lehké napadení lýkožroutem, které strom přežije, dlouhodobě zvyšuje imunitu daného jedince (Jakuš, Holuša, Blaženec 2015).

Mnoho druhů kůrovců si s sebou pod kůru stromu přináší symbiotické houby. Některé z nich (např. rod *Ceratocystis*) mohou napadat vodivá pletiva stromu a tím snižovat metabolismus stromu, jiné druhy hub slouží jako součást potravy larev (shrnuto v Byers 2004).

V překonání obraných bariér hostitele lýkožroutovi velmi pomáhá agregační feromon, který je produkován samci hloubícími snubní komůrky a který láká další brouky obou pohlaví na vybraného hostitele. Pokud se v okolí nachází dostatek lýkožroutů, dochází k hromadnému náletu na tento strom, popř. stromy okolní. Se zpožděním po zavrtání samci začínají produkovat ipsdienol a verbenon, což jsou anti-agregační feromony. Tyto látky nejprve na začátku hromadného náletu regulují rozložení jednotlivých brouků ve kmenech a při velké koncentraci lýkožroutů a plné obsazenosti kmene zajišťují jejich přesun na sousední stromy.

Pokud se samcům podaří překonat konstitutivní obranu stromu, tvoří snubní komůrky, kde se páří se samicemi přilákanými agregačním feromonem a zakládají

potomstvo. Část dospělých brouků může ještě po naklazení vajec znovu vylézt a založit sesterskou generaci na stejném stromě, nebo v nejbližším okolí. Po kolonizování stromu ztrácí brouci schopnost létat, degradují jim letové svaly a u samic se na jejich místo přesouvají vaječníky. Proto musí brouci zakládající sesterskou generaci ještě před výletem prodělat úživný žír, vytvořit si tukové těleso a letové svaly. Tito brouci jsou také větší, než brouci zůstávající uvnitř stromu (shrnutí v Skuhrový 2002).

3.4 Komunikace *Ips typographus*

3.4.1 Akustická komunikace

Jedním z determinačních znaků samice je gula – hřebínkovité útvary na hrudi pod ústním ústrojím táhnoucí se ke spodní části očí (stridulační ústrojí). Samice tímto orgánem tvoří akustické signály, kterými se „domlouvá“ se samcem uvnitř vlastního požerku a ostatními samicemi již zavrtanými ve stromě i dalšími, které přilétávají. Samec má na místě guly jen drobné prohlubně. Ačkoli je stridulační ústrojí u lýkožrouta smrkového velmi jemné, dokáže generovat signál, který umožňuje komunikaci brouků nejen ve vlastním požerku, ale i s brouky s okolních požerků. Stridulace tak ovlivňuje rozložení a počet chodeb v kmeni, nebo rozložení vajíček v mateřské chodbě. Lýkožrout smrkový využívá různé typy akustických signálů, které slouží k rozličným účelům (Rudinsky 1979).

3.4.2 Zrak

Zrak lýkožroutů hraje důležitou roli při orientaci a spolu s čichovými vjemy pocházejícími z tykadla se podílí na hledání hostitelského stromu. Oči rodu *Ips* mají pouze 100 – 240 omatid, což je méně než u mnoho dalších druhů hmyzu. Lýkožrouti smrkoví mají dva typy barevných receptorů s maximální absorpcí frekvence světla 450 nm (modrá) a 520 nm (zelená). Kvůli malému počtu omatid mají lýkožrouti zrak relativně slabý, ale navzdory tomu slouží k orientaci hlavně při přistávání na kmenu stromu. Při realizovaných pokusech se chytilo více brouků do pastí s feromonem, umístěných vedle siluety stromu, než do pastí umístěných do volného prostoru (shrnutí v Byers 2004).

3.4.3 Chemická komunikace

Hlavním orientačním a komunikačním smyslem lýkožroutů je čich, umístěný na tykadlech, kde se nachází čichové senzily. Čichové senzily jsou perforované duté

kutikulární útvary, které obsahují čichové receptorové neurony. Tyto čichové neurony mají schopnost interagovat s těkavými látkami. Existuje velké množství morfologických typů čichových senzil. Vedle morfologie se jednotlivé typy liší počtem a typy čichových receptorových neuronů, které obsahují. Mezi nejčastěji zastoupené patří senzily trichoidní (většinou vnímají látky feromonové povahy) a senzily basikonické (vnímají většinou látky neferomonové povahy jako například rostlinné vůně). U lýkožrouta smrkového jsou čichové senzily na tykadle specificky uspořádány do 2 zprohýbaných pruhů a do oblasti na špičce tykadla. Rozložení senzil na tykadle není náhodné, ale logiku zatím neznáme. Čichové receptorové neurony exprimují jenom jeden typ bílkovinných receptorů, které specificky interagují s molekulami vůně. Doposud bylo u *Ips typographus* identifikováno 70 typů receptorových bílkovin. Látky, které různé receptory vnímají, jsou odlišné. Receptory pro vnímání feromonů jsou vysoce selektivní, receptory pro neferomonové vůně jsou selektivní méně. Látky, které tykadlo vnímá, lze zkoumat elektrofyzilogickými metodami, které měří změny elektrických potenciálů vznikajících v receptorových neuronech po podráždění. Existují dvě základní elektrofyzilogické metody využívané při studiu látek, které ovlivňují chování hmyzu: elektroantenografie, která umožňuje zaznamenávat souhrnný potenciál všech, na daný podnět reagujících čichových receptorových buněk, a elektrosensillografie, kdy se studuje aktivita neuronů v jedné jediné senzile (Kalinová, osobní sdělení).

Chemická komunikace probíhá směsí těkavých látek a hostitelských monoterpenů. K produkci svých těkavých látek lýkožrouti používají hostitelské monoterpeny jako prekurzory. Některé ze složek feromonu si dokážou také sami syntetizovat metodou *de novo*. Důležitý je poměr jednotlivých složek ve feromonu. Odchyly poměru mohou zapříčiňovat jiné chování brouků (shrnuto v Aukema a kol. 2010).

Agregační feromon kůrovců je tvořen ve střevech. Primární složky agregačního feromonu jsou 2-metyl-3-buten-2-ol (MB) a *cis*-verbenol (cV). *Cis*-verbenol je pro brouky atraktivní na velké vzdálenosti, zatímco 2-metyl-3-buten-2-ol působí pouze v nejbližším okolí a zajišťuje tak lokalizaci správného stromu. Obě složky spolu působí synergicky, s tím že cV je společný pro několik druhů rodu *Ips* a MB je atraktivní pouze pro jedince *Ips typographus* (Jakuš, Holuša, Blaženec

2015). Ve střevech kůrovců byly nalezeny také další látky jako např. *trans*-verbenol (tV), verbenon, myrtenol, *trans*-myrtanol, ipsenol, ipsdienol a 2-fenylethanol (Birgersson a kol. 1984). Ne všechny však ovlivňují agregační chování kůrovců. Mezi ty, u kterých byla behaviorální aktivita doposud prokázána, patří vedle MB a cV ipsdienol a verbenon (Schlyter a kol. 1987). Samice produkují stejné látky jako samci, ale ve stopovém množství. Po spáření vytváří specifickou samičí složku feromonu β -isophoron (Birgersson a kol. 1984).

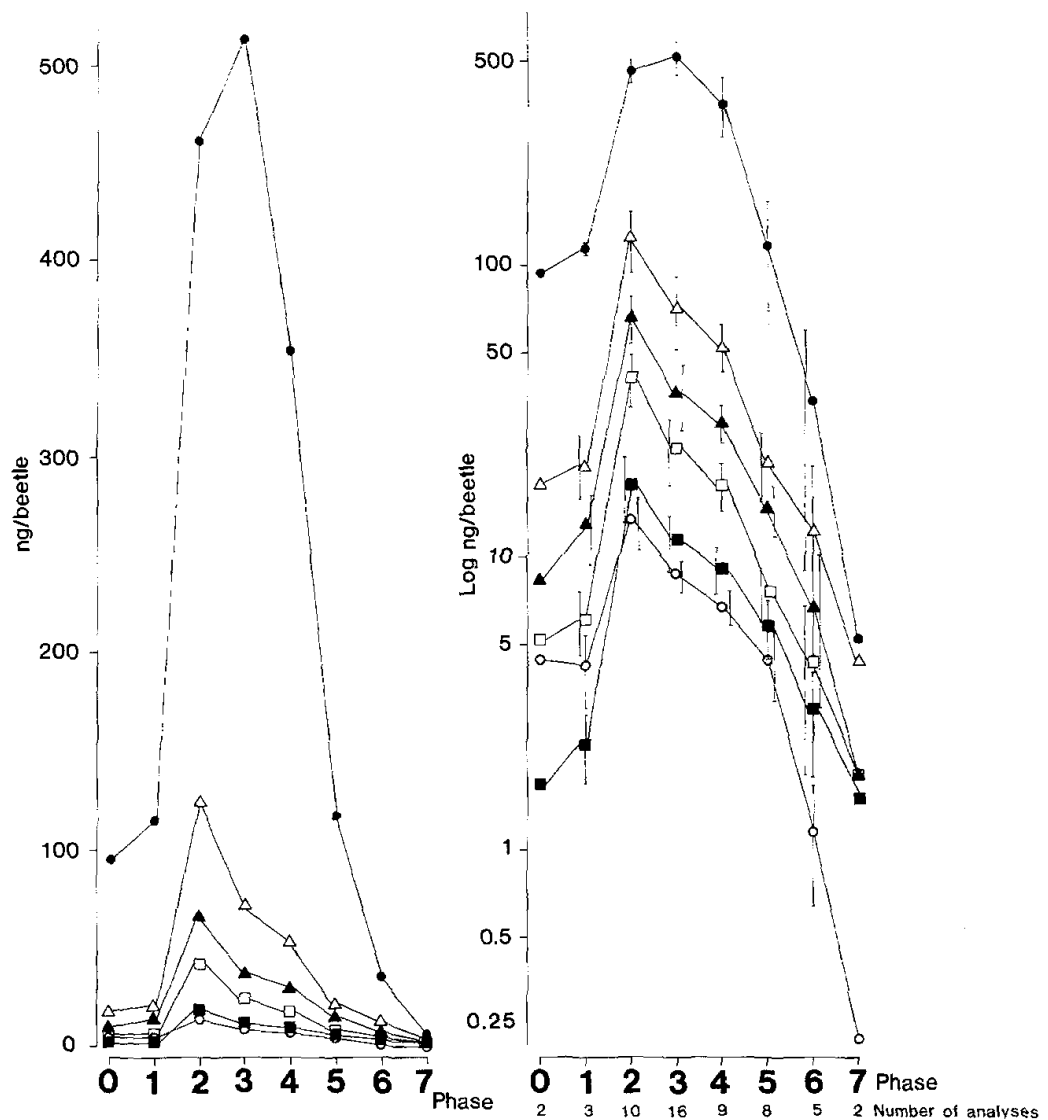
Syntéza feromonů u *Ips typographus* není zcela objasněna. Jedny z prvních teorií produkce feromonů kůrovců předpokládaly, že některé jeho složky jsou syntetizovány symbiotickými bakteriemi ve střevech lýkožroutů. Výzkum byl prováděn především na příbuzném druhu *Ips paraconfusus*, ze kterého se podařilo izolovat bakterii *Bacillus cereus*, která může přeměňovat α -pinen na cV a tV. Aplikace antibiotik na druh *Ips paraconfusus* ovlivnila produkci těchto složek feromonu, čímž bylo dokázáno, že lýkožrouti bakterie k produkci pinenových alkoholů používají. Později bylo prokázáno, že produkce cV a tV může probíhat také autooxidací hostitelských prekurzorů (pokud jsou v potravě lýkožrouta různé izomery, pak se tyto izomery vyskytují i v oxidované formě ve feromonu (shrnutí v Seybold, Bohlmann, Raffa 2000).

V osmdesátých a devadesátých letech se přišlo také na to, že kůrovci mohou syntetizovat některé složky feromonu *de novo*. Studie zkoumající biosyntézu *de novo* byla provedena také na druhu *Ips paraconfusus*, kde předpokládala, že všechny ipsenol a ipsdienol se nevytváří jen z hostitelského myrcenu (samci vystavení výparům myrcenu produkovali více těchto feromonových složek), ale musí existovat i další cesta tvorby ipsdienolu a ipsenolu. Nepřímý důkaz byl poskytnut použitím inhibitoru (kompaktin) klíčového enzymu 3-hydroxy-3-methylglutarin koenzym A reduktázy (HMG-CoA reduktáza) izoprenové biosyntetické cesty. Přímý důkaz *de novo* syntézy poskytlo použití metody radioaktivně označených chemických látek, kdy samci druhu *Ips paraconfusus* vytvořili z označeného [1-¹⁴C]acetátu a [2-¹⁴C]mevalonolaktonu ipsenol a ipsdienol. Přítomnost syntézy *de novo* byla dokázána také na druzích *Ips pini* a *Ips duplicatus* (shrnutí v Seybold, Bohlmann, Raffa 2000). U *Ips typographus* byla pomocí radioaktivně značených prekurzorů dokázána *de novo* syntéza hemiterpenového MB. (shrnutí v Blomquist a kol. 2010).

Objevením *de novo* biosyntézy se *Ips* spp. zařadil mezi několik málo hmyzích druhů, kteří si dokážou vytvářet feromony dvěma cestami (*de novo* a oxidací hostitelských prekurzorů). Poměr mezi jednotlivými cestami není znám (shrnuto v Seybold, Bohlmann, Raffa 2000). O některých složkách feromonu (verbenoly, verbenon) se soudí, že pochází pouze z hostitelských prekurzorů (u *Ips* spp.). Důkaz byl poskytnut na druzích *Ips duplicatus* a *Ips paraconfusus* aplikací inhibitoru *de novo* syntézy kompaktinu, který omezil produkci ipsenolu, ale ne cV a tV (shrnuto v Blomquist a kol. 2010).

Lýkožrouti nevytváří po celý svůj vývoj stejné množství feromonů. Také kvalita feromonu se v průběhu vývoje mění. U *Ips typographus* se největší množství vyprodukovaného feromonu objevuje u samců s hotovou snubní komůrkou, kteří ale ještě nejsou spáření se samicí. Obsah feromonu po přiletu samce na strom je malý. S tím jak se brouk zavrtává, se zvyšuje i množství těchto feromonových komponentů až do vyhloubení snubní komůrky, kdy je nejvyšší. Po spáření se začíná množství těchto složek zase snižovat až téměř na počáteční úroveň. Pinenové alkoholy vykazují stejný vzorec s výrazným maximem ve fázi hotových snubních komůrek, 2-fenylethanol má maximum při začátku vrtání a verbenon má podobný průběh, ale nemá výrazné maximum. MB se chová podobně jako pinenové alkoholy, jen je jeho množství oproti nim čtyřnásobné a teprve dlouho po spáření samců (když jsou matečné chodby jeho samic delší než 4 cm) klesne na úroveň ostatních složek feromonu. Birgersson a kol. (1984) našel u *Ips typographus* ve fázi snubních komůrek množství 500 ng MB, 40 ng cV a 10 ng 2-pentylethanolu na jednoho samce. Ipsenol a Ipsdienol se ve feromonu objevují až po spáření samců se samicemi a jejich obsah s časem od spáření dále narůstá (Birgersson a kol. 1984). Verbenon a ipsdienol se objevuje až v pozdní fázi kolonizace. Soudí se, že to jsou složky anti-agregačního feromonu, který snižuje atraktivitu kolonizovaného stromu a brání přílišné akumulaci velkého počtu kůrovců na daném hostiteli (Birgersson a kol. 1988). Samci spáření s jednou samicí produkují v průměru stejné množství feromonu jako samci spáření s více samicemi (Birgersson a kol. 1984).

Brouci nemají stejnou individuální produkci feromonových látek. Mnoho z nich produkuje jen velmi malá množství a pár jedinců velká množství. To může být dané jednak geneticky, nebo to může souviset s úlohou brouka v populaci. Velká množství mohou produkovat pionýrští samci (jak bylo uvedeno výše), kteří mají za



Obrázek 1: Množství jednotlivých feromonových složek u *Ips typographus* v různých fázích útoku na strom. Fáze 0 – samci běžící po kůře, 1 – samci zavrtávající se do kůry, 2 – samci vrtající floémem stromu, 3 – samci s hotovými snubními komůrkami, 4 – samci spáření se samicemi, samice nekladou vajíčka, 5 – samci se samicema, které již kladou vajíčka, 6 – samci se samicemi, které mají již matečné chodby nepřesahující 4 cm, 7 – samci se samicemi, které mají matečné chodby delší než 4 cm; plný kruh – MB, prázdný trojúhelník – tV, plný trojúhelník – cV, prázdný čtverec – mytenol, plný čtverec – *trans*-myrtanol, prázdný kruh – 2-pentylethanol. Zdroj: Birgersson a kol. 1984

cíl najít vhodný strom a označit ho pro ostatní jedince. Nově přilákaní samci pak mohou feromonu produkovat méně. Obsah složek feromonu, které jsou sequestrovány, závisí na obsahu jejich prekurzorů v hostiteli (Birgersson a kol. 1988). Průběh produkce jednotlivých feromonových látek ve střevě je sumarizován na obrázku 1 (Birgersson a kol. 1984).

Lýkožrouti z jednotlivých stromů se liší množstvím produkováného feromonu. Pinenové alkoholy (cV, tV, myrtenol a *trans*-myrtanol) vykazují silnou korelaci

s množstvím hostitelského α -pinenu ve floému, proto brouci ze silných rezistentních stromů, které obsahují více mízy a větší množství α -pinenu, produkují větší množství pinenových složek feromonu. MB a 2-fenylethanol se netvoří z hostitelských prekurzorů. I když se absolutní množství těchto látek produkovaných brouky z jednotlivých stromů liší, tak to nijak nekoreluje s množstvím monoterpenů ve floému hostitele. Ipsenol a Ipsdienol také nevykazuje žádnou podobnost s hostitelským prekurzorním myrcenem. To se shoduje s faktem, že *Ips typographus* na rozdíl od jiných druhů *Ips* spp. neprodukuje tyto látky po vystavení myrcenu v laboratoři (Birgersson a kol. 1988).

cV se tvoří z (-) α -pinenu a tV z (+) α -pinenu, zatímco myrtenol se tvoří z obou izomerů. Poměr cV a tV produkovaných brouky tedy závisí na poměru těchto izomerů v hostitelském stromě, který obývají. Bylo zjištěno, že u brouků v oslabených stromech se vyskytuje méně cV a více tV než u brouků v rezistentních stromech (Birgersson a kol. 1984).

Populační hustota *Ips typographus* v jednom stromě je regulována pomocí feromonů kvantitativně a kvalitativně. Atrakci ovlivňuje hlavně množství cV a MB. Největší množství láká největší počet brouků, ale jen 30% z toho jsou samci. Snížením produkce cV a MB se sníží atraktivita stromu a počty lákaných brouků klesnou. Při nízkých koncentracích cV a MB jsou lákáni samci a samice v poměru 1:1. Kvalitativně je atrakce regulována produkcí ipsenolu a ipsdienolu, které ve větších množstvích snižují počet brouků, kteří na strom nalétávají (Schlyter a kol. 1987).

4 Metodika

4.1 Chov *Ips typographus* a shromažďování vzorků

Používání brouci byli z druhé generace vypěstované v laboratorních podmínkách. První generace byli brouci z napadeného stromu dovezeného z Kostelce nad Černými lesy (střední Čechy). Strom byl rozřezán na kusy o délce přibližně 50 cm pro lepší manipulaci a tato polena byla umístěna do síťek. Brouci, kteří z nich vylétávali, byli jednou za dva dny sebráni, druhově určeni a poté nasypáni do boxů s čerstvým polenem (také o délce cca 50 cm). Po 10 dnech od vylétnutí prvního brouka bylo matečné poleno oloupáno, zbytek brouků posbíráno a

také nasypán na čerstvé poleno. Čerstvá polena byla získána z nenapadeného stromu *Picea abies* vyrostlého v Kostelci nad Černými lesy. Na jedno poleno o délce 50 cm a průměru 25 cm bylo nasypáno 80-100 dospělých brouků rodičovské generace. Úspěšnost zažrání se pohybovala okolo 80-90%.

Polena s druhou generací lýkožrouta smrkového byla uchovávána v plastových boxech s větrací dírou na vrchu v přední části boxu, překrytou jemnou sítí pro zabránění úniků brouků. Box byl napojen na řízenou ventilaci. Vzduch byl z boxu nasáván dírou v zadní stěně (zakrytou sítí) s našroubovaným kohoutem a propojený hadicí se zdrojem odtahu. Boxy byly uchovávány v klimatizované místnosti se stálou teplotou 25 °C a vlhkostí vzduchu 60%.

Brouci druhé generace využití v experimentu byli rozdělení podle stáří po vylíhnutí na 6 cílových vývojových kategorií: 1. čerstvě vylíhnutí brouci se zlatou kutikulou, 2. brouci ve fázi úživného žíru s hnědou již sklerotizovanou kutikulou, 3. čerstvě vylétnutí brouci, 4. brouci 24 hodin prolétání, 5. samci zavrtání do hostitele s hotovou snubní komůrkou a 6. spáření samci.

Stádia 1 a 2 byla získána oloupaním kusu polena, posouzením vývojového stádia a sebráním přibližně padesát kusů jedinců každé kategorie. Když začali brouci vylétávat, byly boxy každý den kontrolovány a všichni lýkožrouti lezoucí v boxu mimo poleno byli sebráni a zařazeni jako stádium 3. Ve stádiu 4 byli použiti brouci sebráni stejně jako ve stádiu 3, kteří byli na dalších 24 hodin zavřeni do proletové klece (box 50 x 30 x 30 cm z jemné sítí) s vlhkým filtračním papírem, aby se prolétali. Stádium 5 tvořili samci, kteří byli sebráni stejně jako ve stádiu 3, poté bylo určeno jejich pohlaví (metoda popsána níže) a samci byli nasypáni na čerstvé poleno, ze kterého byli po 24 hodinách vyloupani. K broukům stádia 6 byly po zavrtání přidány samice.

Celý postup byl proveden ve třech opakováních. Aby nedocházelo k výskytu sesterských brouků jednoho stádia v různých opakováních, byli lýkožrouti pro každé opakování shromažďováni z různých boxů.

Brouci jednotlivých kategorií byli roztrženi podle pohlaví. Samci byli přeneseni do PE eppendorfových zkumavek (10 ml), a ihned zmrazeni v tekutém dusíku (-196 °C). Následně byli uskladněni v mrazícím boxu (-80 °C) až do pitvy a následné extrakci střev.

4.2 Rozlišování pohlaví *Ips typographus*

K určení pohlaví živých brouků *Ips typographus* byla použita metoda Fredrika Schlytera a Ingrid Cederholm (1981), založená na určení hustoty chloupků na pronotum a frons. Schlyter a Cederholm ve své studii uvádí, že průměrný počet chloupků ($> 0,042$ mm) na 1 mm^2 je u samců 186 a u samic 301 a pohlaví lze určit s přesností až na 98,5 % (záleží na zkušenostech pozorovatele) (Schlyter, Cederholm 1981).

Tato metoda byla kombinována s metodou určování pohlaví podle velikosti čelního hrboleku (Koizumi, Yamaguchi, 1967 in Schlyter, Cederholm, 1981), která ale není tak spolehlivá. Při kombinaci obou těchto metod však bylo dosahováno lepších výsledků, než pouze samotnou metodou určování pohlaví podle hustoty chloupků.

Pohlaví bylo rozlišováno pod binokulární lupou při zvětšení 20-30x. Zkoumaný jedinec byl vzat entomologickou pinzetou položen do roviny mediální a z mediálního pohledu byla zhodnocena hustota chloupků na pronotum a frons a velikost čelního hrboleku. Brouci byli rozřídzeni na samce (řidké chloupky, velký hrbolek), samice (husté chloupky, malý hrbolek) a nerozlišitelné, kterých bylo přibližně 5%. Čas potřebný k určení pohlaví jednoho brouka se pohyboval okolo 10 sekund.

Následnou pitvou byla zjištěna přesnost určení samců, podle přítomnosti sklerotizovaného penisu, která byla 99%.



Obrázek 2: Samec (1) a samice (2) *Ips typographus* z mediálního pohledu. (1a) řidší chloupky na frons a pronotu samce; (1b) větší čelní hrbolek; (2a) hustší chloupky na frons a pronotu samice; (2b) menší, skoro neznatelný čelní hrbolek. Zvětšeno 30x.

4.3 Pitva *Ips typographus* a extrakce střev

Před vlastní pitvou bylo nutné připravit extrakční nádoby (vialky). Byly použity vialky se zataveným insertem o objemu insertu 300 μ l. Během extrakce byly vialky umístěny na suchém ledu. Podchlazení bránilo odpařování rozpouštědla a extrahovaného feromonu. Jako rozpouštědlo byl použit pentan (Acros Organics extra pure, $\geq 99,0$ %) s 2 interními standardy (hexan v koncentraci 5 μ l/ml a bromdekan v koncentraci 5 μ l/ml. 150 μ l podchlazeného rozpouštědla bylo přeneseno do vialek podchlazenou skleněnou odměrnou mikrostríkačkou (10 μ l rozpouštědla na střevo jednoho samce). Po vnesení rozpouštědla byla vialka okamžitě uzavřena plastovým víčkem se septem potaženým inertní vrstvou teflonu. Před naplněním vialky byla mikrostríkačka 5x promyta čistým pentanem.

Pitva samců byla provedena pod binokulární lupou se zvětšením 20-30x. Samec byl položen do roviny frontální a z anteriorálního směru byl přitlačen prstem na podklad binokulární lupy tak, aby mu prst zakrýval hlavu a hrud', ale nikoli zadeček s krovkami. Následně mu byly ostrou pinzetou rozevřeny a odstraněny krovky a křídla. Pod posledním tergitem směrem ke konci zadečku byl vytvořen otvor, kterým bylo vytaženo střevo a sklerotizovaný penis. Střevo s penisem bylo přeneseno na entomologický špendlík a tím pak dáno do vialky umístěné na suchém ledu. Pro velké podchlazení rozpouštědla střevo ihned zmrzlo a pak se snadno oddělilo od špendlíku a spadlo na dno insertu vialky. Vialka byla otevřena jen na nezbytně dlouhou dobu k umístění střeva do insertu, aby docházelo k co nejmenším únikům těkavých látek. Jeden vzorek byl vytvořen z 15 střev samců i se sklerotizovanými penisy a 150 μ l rozpouštědla s interními standardy. Vytvoření jednoho vzorku trvalo přibližně jednu hodinu. I přes chlazení vzorků na suchém ledu a opatrnou a rychlou manipulaci vždy během tvoření vzorku přibližně 10% rozpouštědla a již rozpuštěných látek vytékalo. Tato ztráta nebyla doplňována a vzhledem k podobné těkavosti pentanu, hexanu a MB a tím pádem jen málo se měnícím poměrem těchto látek, bylo při tvoření výsledků počítáno s množstvím daným do insertu vialky na začátku. Mezi tvořením vzorků různých vývojových stádií byly všechny použité nástroje důkladně umyty čistým pentanem.

Hotové vzorky byly přes uzávěry obaleny Parafilmem a extrahovány 12 hodin v mrazícím boxu (-20 °C). Poté byla kapalná část vzorku přetažena podchlazenou mikrostríkačkou do vialky s čistým insertem a následně analyzována

na dvou dimenzionálním chromatografu s hmotnostním detektorem (GCxGC-TOFMS). Přetahování vzorků probíhalo v pořadí od zlatých brouků po spárené. Před přetahováním každého stádia byla mikrostríkačka 10x promyta čistým pentanem a poté i s hotovým vzorkem a čistou vialkou podchlazena na suchém ledu. Při pokusech předcházejících toto měření, bylo zkoušeno vzorky extrahovat 12 hodin v -20 °C a poté 3 hodiny při pokojové teplotě (+20 °C). Ve výsledném množství MB však nebyl nalezen rozdíl a proto byly vzorky louhovány pouze 12 hodin při -20 °C.

4.4 Chemická analýza

Vzorky byly analyzovány jednorozměrnou chromatografií (GC) na dvou dimenzionálním chromatografu s hmotnostním detektorem (GCxGC-TOFMS) Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA). Chromatograf byl vybaven autosamplrem, umožňujícím nástřik kapalnou fází MPS (Gerstel, Germany) a dvěma křemíkovými kapilárními kolonami: Rxi-5MS 29,8 metrů s průměrem 0,25 milimetrů a sílou vnitřního filmu 0,25 mikrometru (Agilent Technologies, USA) a BPX-50 1,29 metrů s průměrem 0,1 milimetru a sílou vnitřního filmu 0,1 mikrometru (SGE, Australia). Sekundární kolona však nebyla pro analýzu použita. Nástřik vzorku do plynového chromatografu byl uskutečněn autosamplrem při teplotě 265 °C se splitovacím poměrem 1:3. Teplotní program první pece začínal na 40 °C po 1 minutu a poté se zvyšoval o 10 °C za minutu až do teploty 210 °C, od které se zvyšoval o 20 °C za minutu na konečnou hodnotu 320 °C, při níž vydržel 7 minut. Teplotní program druhé pece byl vždy o 40 °C vyšší. Jako nosný plyn se používalo helium s konstantní rychlostí průtoku 1 mililitr za minutu. Hmotnostní spektrometrický detektor s rychlým sběrem dat a s analyzátozem měření doby letu TOF Pegasus 4D (Leco Corporation, USA) byl nastaven na elektronovou ionizaci s energií -70 eV a teplotou 250 °C. Hmotnostní rozsah byl 35 – 500 m/z a akviziční rychlost 10 spekter/s. Celá analýza jednoho vzorku trvala 30,5 minuty. Sběr a zpracování dat probíhalo přístrojovým softwarem LECO ChromaTOF verze 4.71 (Leco Corporation, USA).

Mezi prvním, druhým a před třetím měřením vzorků byly nastříknuty a změřeny roztoky syntetických standardů cílových látek (MB, cV, tV, fenylethanol, ipsdienol a verbenon) v pentanu o známých koncentracích (standard G – 125 ng/ml, H – 250 ng/ml, I – 500 ng/ml, J – 1000 ng/ml, K – 5500 ng/ml, L – 11000 ng/ml, M

– 53750 ng/ml). Podle velikosti odezev detektoru hmotnostního spektrografu, které jsou specifické pro každou látku, na známé koncentrace byly vytvořeny funkce pro cílové látky v mezích odezev látek ve vzorku. Bylo zjištěno, že na krátké úseky jsou tyto funkce téměř lineární a bylo jimi počítáno množství látek ve vzorku a následně získané údaje byly použity pro přepočítání průměrných množství jednotlivých látek v jednom broučím ekvivalentu vzorku. U výjimečně se vyskytujících malých hodnot, pro které již neplatila lineárnost funkce, byly tyto hodnoty počítány poměrem k nejbližšímu měřenému standardu. Hodnoty prvního a druhého měření byly počítány podle standardů změřených mezi těmito analýzami a třetí měření bylo počítáno podle standardu měřeného předním.

5 Výsledky

Brouci v různých fázích se lišili obsahem potravy ve střevech. Ve stádiu zlatých brouků byla střeva prázdná, zatímco ostatní fáze je měli z většiny plná. U hnědých a spářených samců tvořila větší část obsahu střev světlá lýková část kůry. Ve stádiích vylétnutých, prolétaných a zavrtaných brouků byla nalezena i významná část tmavé borkové části kůry. Prolétaní brouci měli střeva naplněná jen z jedné poloviny a oproti ostatním stádiím obsahovali méně vody.

Ve vzorcích extrahovaných ze střev lýkožrouta smrkového bylo sledováno a kvantifikováno šest složek (MB, cV, tV, ipsdienol, fenylethanol a verbenon) pro každé vývojové stádium. Mimo tyto semiochemikálie byly ve vzorcích přítomny další látky včetně hostitelských monoterpenů, jako jsou α -pinen a myrcen, které nebyly kvantifikovány.

Obsah jednotlivých látek v různých fázích vývoje kůrovců pro jednotlivá měření jsou uvedena v tabulce 1,2 a 3. Z tabulek je zřejmé, že největší změny byly pozorovány pro MB, jehož množství ve fázích maximální produkce dosahovala 224, 229 a 366 ng na brouka. Obsah druhé složky feromonu byl mnohonásobně menší a dosahoval několika desítek ng (viz tabulky).

Ve všech opakováních obsahovali zlatí brouci velké množství obou izomerů verbenolů, v prvních dvou opakování to byly maximální naměřené hodnoty těchto látek. Několikanásobně vyšší hodnoty naměřené u zlatých brouků vykazoval také verbenon, na rozdíl od ostatních fází. Jiné přítomné feromonové komponenty nebyly

Tabulka 1: Absolutní hodnoty množství feromonových komponentů naměřené z jednotlivých vzorků v prvním opakování pokusu. Hodnoty jsou uvedené v ng na jednoho samce.

Opakování 1	2-metyl-3-buten-2-ol	Fenylethanol	Ipsdienol	<i>cis</i> -verbenol	<i>trans</i> -verbenol	Verbenon
Zlatí	0,0	0,0	0,0	33,2	50,0	6,3
Sklerotizovaní	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vylítlí	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6
Prolítaní	5,5	2,4	0,0	7,4	0,0	1,9
Zavrtaní samci	244,2	8,2	0,0	9,4	18,7	2,5
Spáření	5,8	1,7	0,0	1,5	8,7	0,8

Tabulka 2: Absolutní hodnoty množství feromonových komponentů naměřené z jednotlivých vzorků v druhém opakování pokusu. Hodnoty jsou uvedené v ng na jednoho samce.

Opakování 2	2-metyl-3-buten-2-ol	Fenylethanol	Ipsdienol	<i>cis</i> -verbenol	<i>trans</i> -verbenol	Verbenon
Zlatí	0,0	0,0	0,0	30,3	50,1	5,8
Sklerotizovaní	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vylítlí	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Prolítaní	3,2	0,0	0,0	10,5	0,0	2,8
Zavrtaní samci	229,6	9,6	0,0	8,8	10,4	1,7
Spáření	37,0	10,3	3,6	13,2	28,4	3,2

Tabulka 3: Absolutní hodnoty množství feromonových komponentů naměřené z jednotlivých vzorků ve třetím opakování pokusu. Hodnoty jsou uvedené v ng na jednoho samce.

Opakování 3	2-metyl-3-buten-2-ol	Fenylethanol	Ipsdienol	<i>cis</i> -verbenol	<i>trans</i> -verbenol	Verbenon
Zlatí	0,0	0,0	0,0	28,8	9,5	4,8
Sklerotizovaní	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vylítlí	10,2	2,9	0,0	1,6	0,0	0,0
Prolítaní	11,1	6,9	0,0	14,6	0,0	1,0
Zavrtaní samci	365,7	6,7	0,0	10,2	9,3	1,2
Spáření	36,7	6,0	0,3	13,5	35,2	1,9

u zlatých brouků nalezeny. Ve vzorcích sklerotizovaných brouků během úživného žíru před vylétnutím se nepodařilo najít žádné z cílových látek. Brouci, kteří opustili matečný strom, začali produkovat malé množství MB. V jednom případě u nich bylo nalezené stopové množství cV, verbenonu a fenylethanolu. Brouci vystavení disperznímu letu produkovali v průměru o trochu více MB a začali ve významném množství vytvářet cV a fenylethanol, zatímco množství tV zůstávalo ve všech třech opakováních nulové. Zavrtaní samci s hotovou snubní komůrkou se vyznačovali

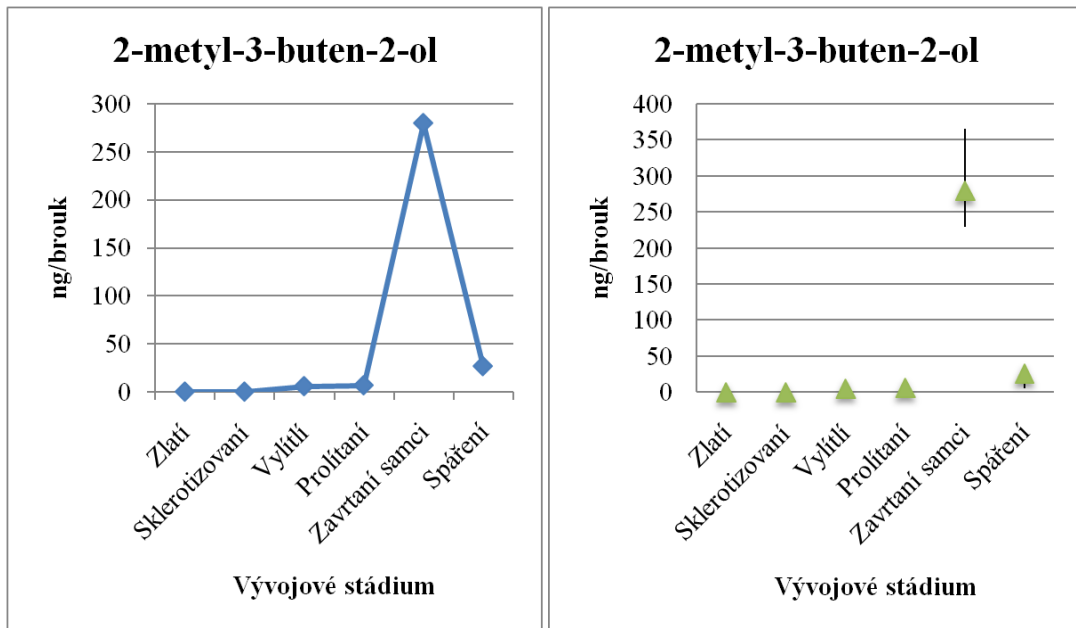
mimořádně velkou produkcí MB, jehož množství v této fázi dosahovalo v průměru čtyřicetkrát vyšších hodnot, než v předchozí fázi. Zavrtaní samci také začali produkovat tV, který ve dvou opakováních předstihl produkci cV, zatímco množství zmíněného cV ve dvou případech lehce pokleslo. Vyšší množství bylo zaznamenáno i u fenylethanolu. Spářeným broukům se hodnoty MB vrátili zpátky na původní úroveň, nebo ve dvou opakováních na hodnoty okolo 37 ng na brouka oproti 224 – 365 ng na brouka z předchozí fáze. Poprvé se zde ve dvou případech objevilo malé množství ipsdienolu v řádu jednotek ng na brouka, což odpovídá vývojovému významu tohoto feromonového komponentu. Obsah cV a tV se měnil v každém opakování jinak, v průměru však množství cV zůstávalo stejné, zatímco množství tV se dále zvyšovalo. Verbenon se od fáze prolítaných brouků držel na stejné úrovni okolo dvou ng na brouka ve všech opakováních.

Tabulka 4: Průměrné hodnoty množství feromonových komponentů počítané z hodnot všech opakování. Hodnoty jsou počítané aritmetickým průměrem a jsou uvedené v ng na jednoho samce.

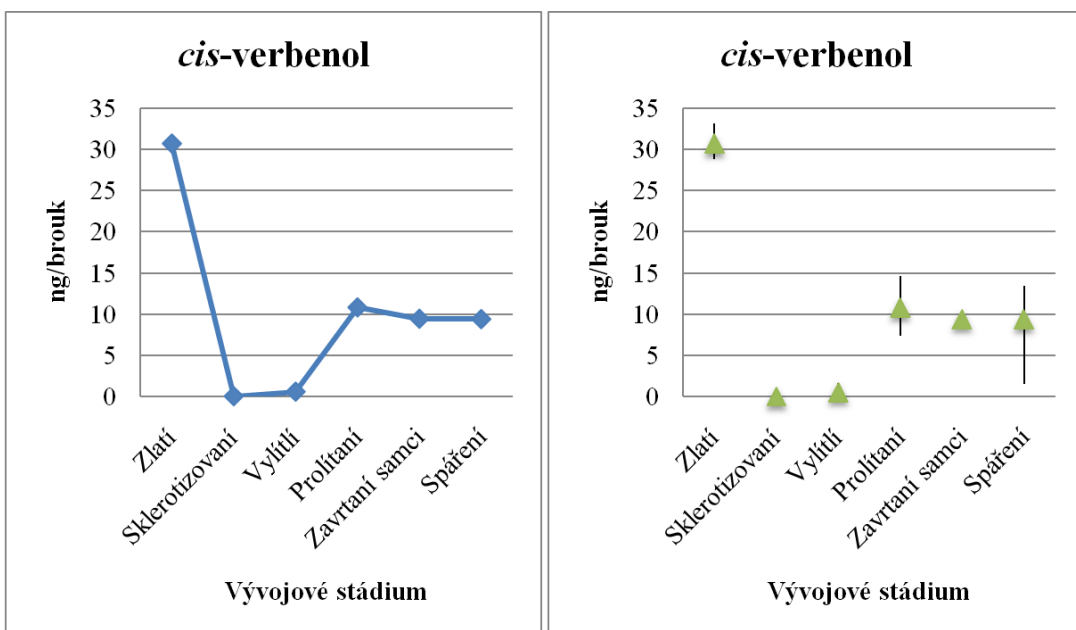
Průměr	2-metyl-3-buten-2-ol	Fenylethanol	Ipsdienol	cis-verbenol	trans-verbenol	Verbenon
Zlatí	0,0	0,0	0,0	30,8	36,5	5,6
Sklerotizovaní	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vylítlí	5,7	1,0	0,0	0,5	0,0	0,5
Prolítaní	6,6	3,1	0,0	10,8	0,0	1,9
Zavrtaní samci	279,8	8,2	0,0	9,4	12,8	1,8
Spáření	26,5	6,0	1,3	9,4	24,1	2,0

Obsah MB (obr. 3) ve střevech samců lýkožrouta smrkového vykazoval ve všech opakováních podobný průběh. Jeho přítomnost se začínala objevovat ve stádiu vylétnutých brouků a prudce stoupala do svého maxima ve stádiu zažraných samců s hotovou snubní komůrkou. V této fázi množství MB dosahovalo řádu stovek nanogramů na jednoho brouka. Po spáření se samicemi se jeho hodnoty rychle snižovali na původní úroveň.

Velké množství cV (obr. 4), objevující se u zlatých brouků bylo nalezeno ve všech opakováních. V dalším stádiu sklerotizovaných brouků nebyla zaznamenána žádná hodnota, nebo byla v neměřitelném množství. Malá hodnota cV byla zjištěna u vylétnutých brouků, a jeho obsah se výrazně zvýšil vlivem disperzního letu. Po zavrtání do hostitelského stromu se obsah cV ve střevech samců kůrovců mírně

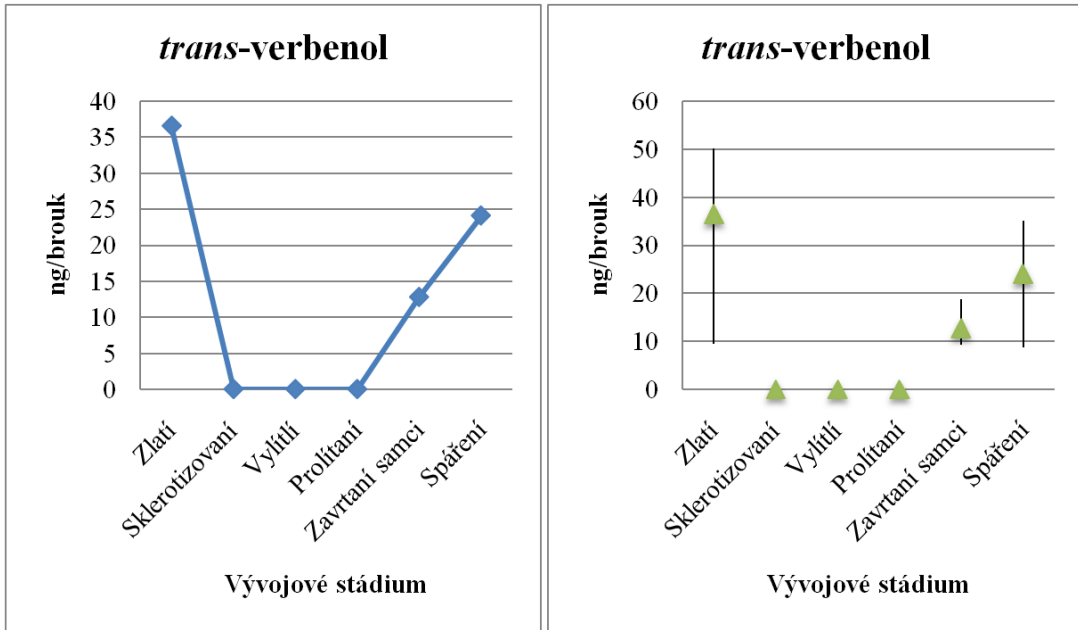


Obrázek 3: Vlevo je graf průběhu průměrného množství MB ve střevech *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl hodnot jednotlivých měření, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.

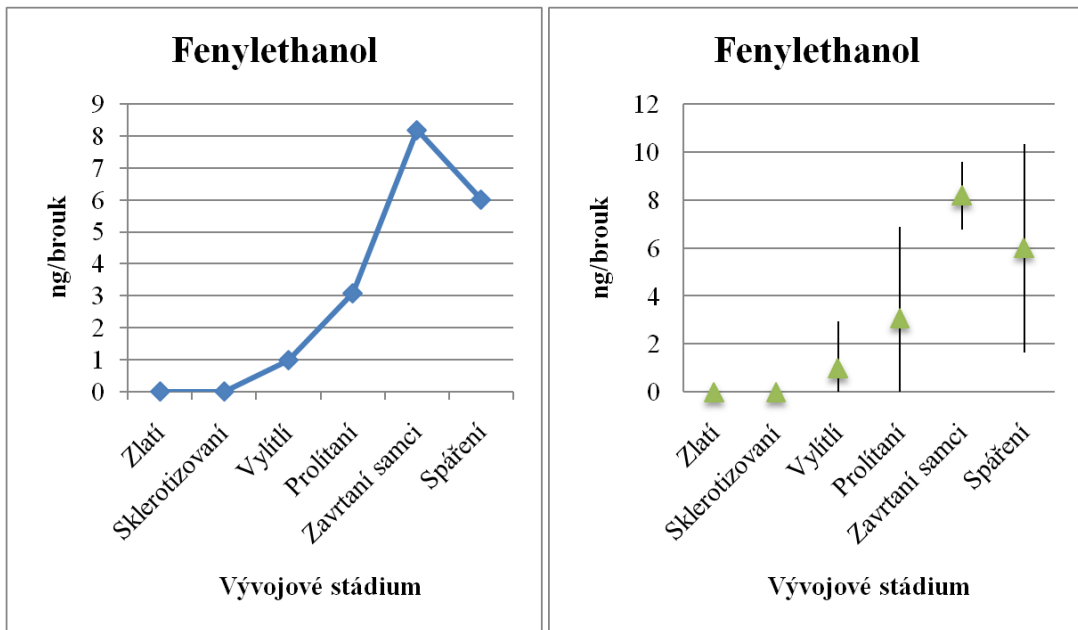


Obrázek 4: Vlevo je graf průběhu průměrného množství cV ve střevech *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl hodnot jednotlivých měření, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.

snížil a po spáření se samicemi v průměru zůstával na stejných hodnotách. U tohoto stádia však byl velký rozptyl hodnot v jednotlivých měřeních.



Obrázek 5: Vlevo je graf průběhu průměrného množství tV ve střevech *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl hodnot jednotlivých měření, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.

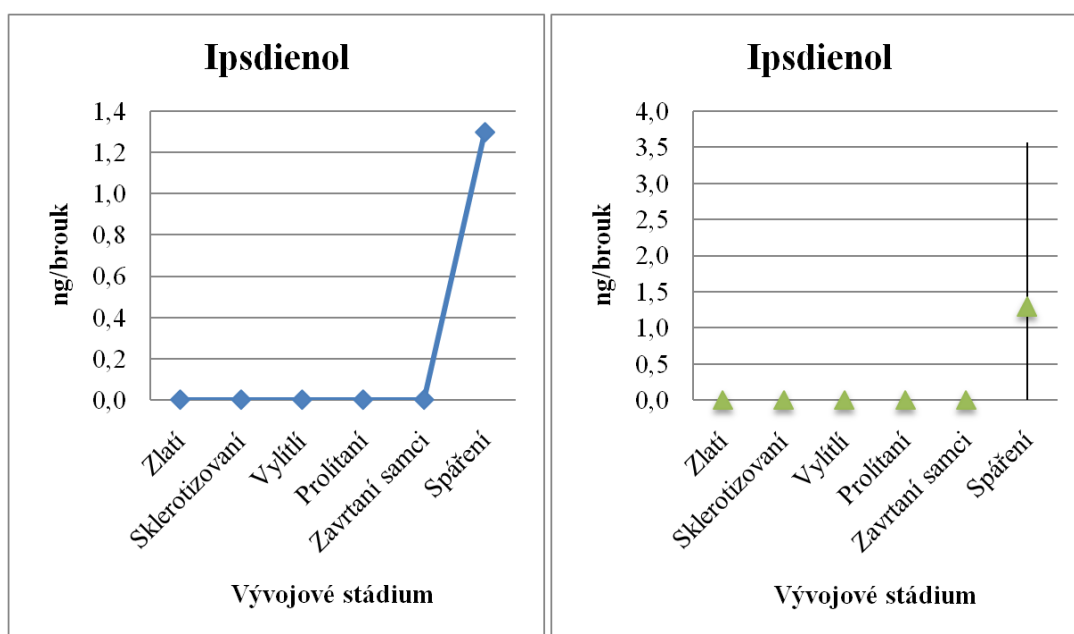


Obrázek 6: Vlevo je graf průběhu průměrného množství fenylethanolu ve střevech *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl hodnot jednotlivých měření, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.

U zlatých brouků se vyskytovalo také velké množství tV (obr. 5), ale zde byl na rozdíl od cV velký rozptyl hodnot od 10 nanogramů na brouka do 50

nanogramů na brouka naměřených v jednotlivých opakováních. Množství tV nebylo ovlivněno disperzním letem, a jeho další přítomnost se objevila až po zažrání brouků do hostitelského stromu, po kterém se množství tV ve střevech samců lýkožrouta smrkového zvýšilo.

Fenylethanol (obr. 6) se ve střevech *Ips typographus* začal objevovat až ve stádiu vylétnutých brouků a postupně se jeho množství zvyšovalo až ke svému maximu ve fázi zažraných samců s hotovou snubní komůrkou. Po spáření jeho obsah ve střevech samců mírně klesal. Hodnoty množství fenylethanolu se pohybovaly do 10 nanogramů na brouka a měly ve všech stádiích, kde byla zaznamenána jeho přítomnost, značný rozptyl.

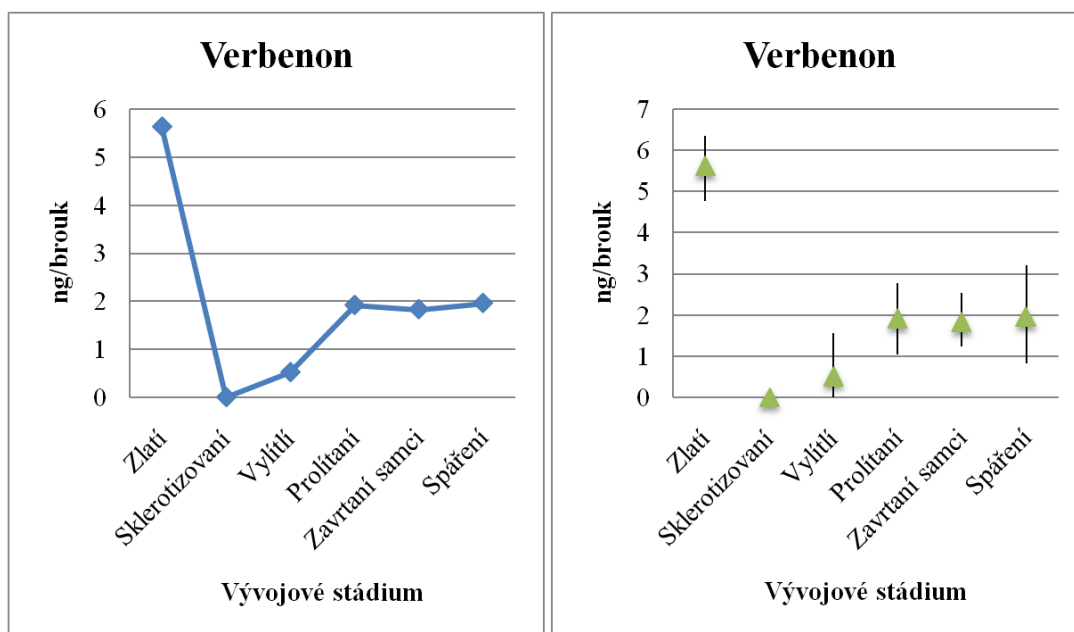


Obrázek 7: Vlevo je graf průběhu průměrného množství ipsdienolu ve střevech *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl hodnot jednotlivých měření, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.

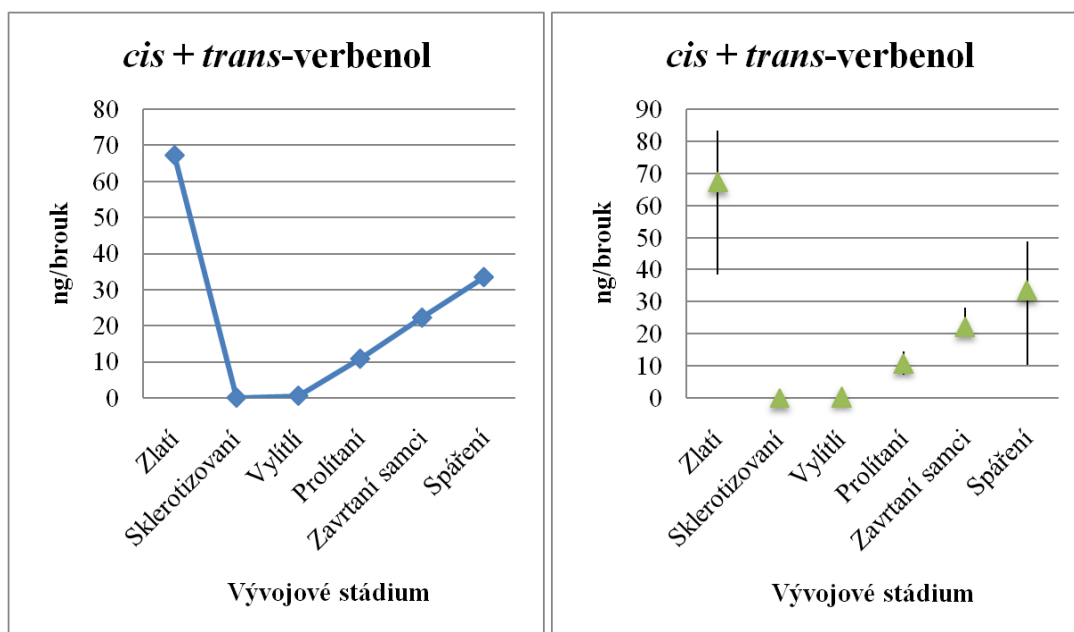
Ipsdienol (obr. 7) byl zaznamenán až po spáření samců se samicemi a jeho množství se pohybovalo u do 3 nanogramů na brouka. U jednoho opakování nebyl nalezen vůbec.

Největší množství verbenonu (obr. 8) bylo přítomno u zlatých brouků. V dalším stádiu sklerotizovaných brouků však nebyl verbenon nalezen vůbec. Od stádia vylétnutých samců se množství zvyšovalo až ke stádiu prolétaných brouků na

hodnotu 2 nanogramy na brouka a poté v dalších fázích zůstávalo množství konstantní.

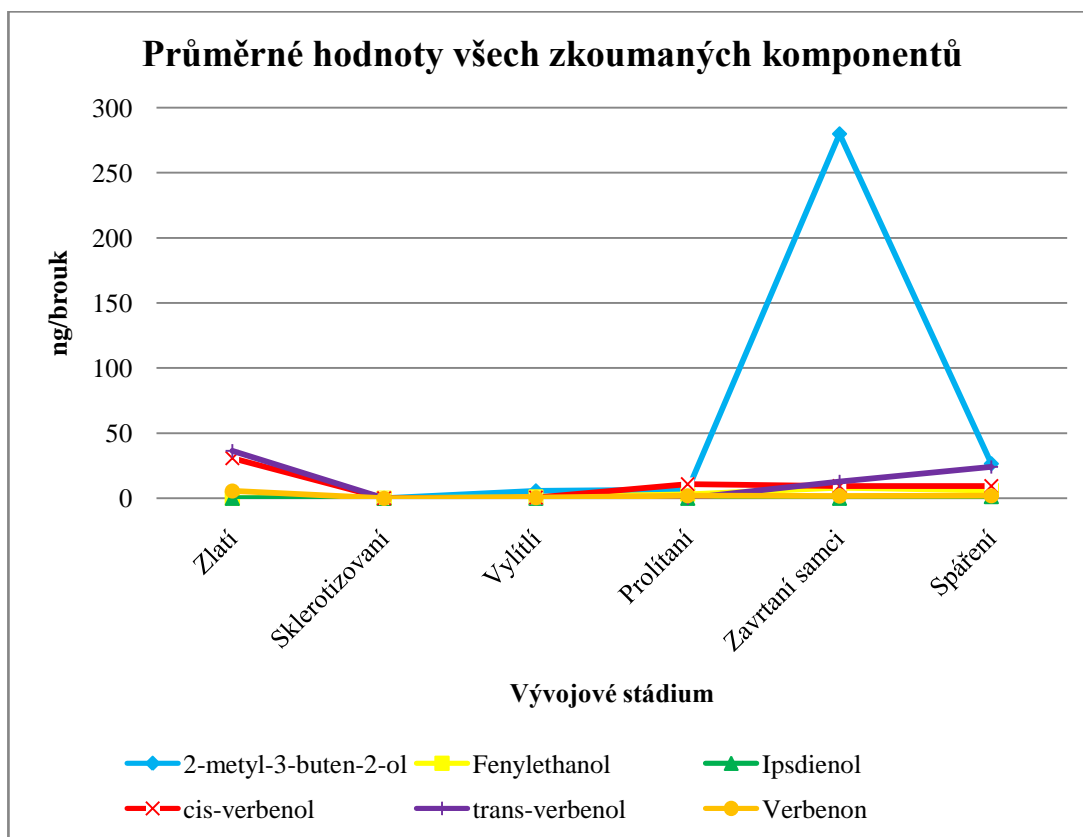


Obrázek 8: Vlevo je graf průběhu průměrného množství verbenonu ve střevěch *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl hodnot jednotlivých měření, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.



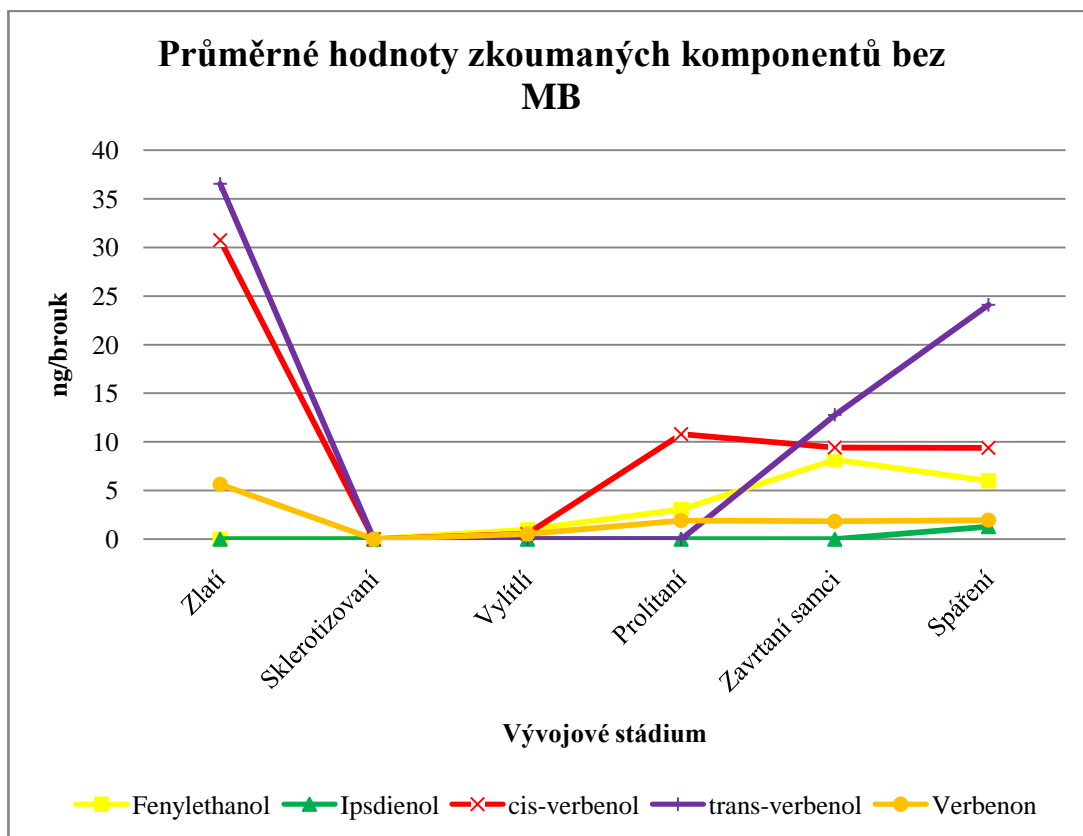
Obrázek 9: Vlevo je graf průběhu průměrného součtu množství cV a tV ve střevěch *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky ze sečtených hodnot cV a tV v samostatných opakováních. Graf vpravo ukazuje rozptyl úhrnu hodnot cV a tV v jednotlivých měřeních, kdy úsečka probíhá od minimální hodnoty k maximální a trojúhelník ukazuje aritmetický průměr všech hodnot.

Součet obou izomerů verbenolů (cV a tV) (obr. 9) tvořících se z hostitelského α -pinenu ukazovalo nejvyšší hodnotu ve stádiu zlatých brouků, po níž klesalo na nulu. Od stádia prolétaných brouků se jejich množství začínalo zvyšovat. V tomto stádiu byl součet tvořen výhradně cV, na jehož tvorbu má vliv disperzní let. Od stádia zavrtaných samců se do součtu přidával i tV. Ve stádiu spářených brouků měl průměr vyšší hodnotu, než u předchozího stádia, ale byl zde velký rozptyl hodnot naměřených v jednotlivých opakováních.



Obrázek 10: Souhrnný graf průběhu průměrných množství všech zkoumaných látek ve střevech *Ips typographus* během jednotlivých vývojových stádií. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot naměřených v jednotlivých opakováních.

Celkově se naměřená množství zkoumaných látek pohybovala do 30 nanogramů na brouka. Výjimku tvořil MB, jehož množství dosahovalo ve fázi zavrtaných samců s hotovou snubní komůrkou téměř 300 nanogramů na brouka a deformovalo touto hodnotou graf všech zkoumaných látek (obr. 10). Proto byl u obr. 11 MB odstraněn pro lepší názornost průběhu množství ostatních zkoumaných semiochemikálií. Tento graf ukazuje, že v největších hodnotách byly produkovány verbenoly. Ostatní látky byly produkovány řádově v jednotkách nanogramů na brouka. Průběh jednotlivých křivek byl popsán výše.



Obrázek 11: Souborný graf průběhu průměrných množství zkoumaných látek bez MB během jednotlivých vývojových stádií. MB zde není zobrazován pro lepší přehled ostatních semiochemikálií, které jsou produkovány *Ips typographus* v řádově menších množstvích než MB. Průměr byl počítán aritmeticky z hodnot naměřených v jednotlivých opakováních.

6 Diskuze

V této práci bylo prokázáno, že obsah sledovaných látek je během ontogeneze proměnný. 2-metyl-3-buten-2-ol se vyskytoval v malých množstvích u čerstvě vylétnutých a prolétaných brouků. Svého maxima dosahoval u samců s hotovou snubní komůrkou. Po spáření jeho koncentrace výrazně poklesla. Látky cV, tV a verbenon byly ve významném množství přítomny u zlatých brouků, pak jejich množství ve střevě poklesla k nulovým hodnotám. Stopová množství byla opět přítomna u čerstvě vylétnutých brouků. Letová aktivita zvýšila hodnoty cV a verbenonu, ale ne tV. Zvýšení tV se objevilo až v průběhu kolonizace hostitelského stromu. Páření neovlivnilo produkci cV, tV ani verbenonu. Ipsdienol byl přítomen v malých množstvích u spářených samců. Fenylethanol se začal tvořit u brouků vylétnutých z matečného stromu a jeho množství se zvyšovalo až do stádia zavrtaných samců s hotovou snubní komůrkou. Po spáření se obsah fenylethanolu

mírně snížil. Získané výsledky ukazují, že oba hlavní komponenty agregačního feromonu *Ips typographus* jsou přítomny ve střevech samců již před kolonizací hostitele. Kolonizace zvyšuje produkci 2-metyl-3-buten-2-olu, ale ne cV. Náš výzkum také ukázal přítomnost velkých množství cV, tV a verbenonu u zlatých brouků, která ale již nebyla přítomna u sklerotizovaných brouků v průběhu úživného žíru.

Poměry mezi cV a tV se v jednotlivých opakováních velmi lišily. Zatímco u stádia zlatých brouků v opakování 1 a 2 byl poměr cV:tV přibližně 3:5, ve třetím opakování byl tento poměr přibližně 3:1. U dalších stádií, kde byli tyto semiochemikálie přítomny (zavrtání samci, spáření brouci), měly poměry také velmi rozdílné hodnoty, které se pohybovaly v rozmezí od 1:1 do 1:6. Brouci v jednotlivých opakováních byli sbíráni z různých polen, které pocházely z různých stromů a jejich částí. Birgersson a kol. (1988) dokazuje, že brouci z různých stromů produkují cV a tV v rozdílných poměrech. Je možné, že variabilita hostitelských stromů ovlivnila pozorovanou variabilitu poměru cV a tV.

Dostupná literatura předpokládá, že MB a ipsdienol se syntetizuje *de novo*, zatímco cV a tV vzniká autooxidací hostitelského prekurzoru α -pinenu. Důkaz syntézy MB *de novo* byl poskytnut na druhu *Ips typographus* metodou radioaktivně označeného mevalonátu, ze kterého brouci vytvořili MB. Stejnou metodou byla na druhu *Ips paraconfusus* dokázána biosyntéza ipsdienolu. Důkaz autooxidace prekurzorů na cV a tV byl podán u druhu *Ips duplicatus* aplikací inhibitoru *de novo* syntézy kompaktinu, který omezil produkci ipsenolu, ale ne cV a tV (shrnuto v Blomquist a kol. 2010).

Produkce feromonu u samců *Ips typographus* byla dříve zkoumána Birgerssonem a kol. (1984), který studoval obsah feromonu po kolonizaci hostitele a závislost složení feromonu na kvalitě hostitelského stromu. Ve své práci uvádí stejný průběh množství MB, cV, tV a fenylethanolu, jejichž hodnoty jsou na začátku kolonizace malé a postupně se zvyšují až do jejich maxima ve fázi samců před spářením. Po spáření jejich množství rychle klesá. Birgersson a kol. (1984) zkoumal také jednu vývojovou fázi před kolonizací hostitele (brouci lezoucí po kmeni před zavrtáním), ve které kvantifikoval malá množství zmíněných feromonových komponentů. Brouky pro výzkum však sbíral v lese a proto není jisté, odkud tyto brouci pocházeli a zda předtím nezkoušeli kolonizaci na jiných hostitelských

stromech. Objevil také ipsdienol až u samců spářených se samicemi. Birgersson a kol. (1984) zkoumal také vztah mezi feromonovými komponenty a monoterpenovými prekurzory hostitele. U MB a ipsdienolu neprokázal žádnou závislost. Zjistil však, že 80% množství cV a tV souvisí s množstvím α -pinenu v hostitelském stromě.

Obsah feromonu před kolonizací kromě této práce zkoumal pouze Lehmborg (2012), který objevil významná množství cV a verbenonu v larválním vývojovém stádiu jako důsledek detoxikace floému. Ve své práci popisuje také vliv délky dne na produkci cV, kdy u brouků první generace připravených na výlet ze stromu se produkce cV během larválního stádia zvyšovala, zatímco u brouků druhé generace připravených na přezimování se produkce cV snižovala. Lehmborg (2012) také zjistil, že množství verbenonu se v průběhu celého vývoje příliš nemění a nemají na něj vliv vnější faktory jako hustota osídlení hostitele, množství jeho prekurzoru, koncentrace (-)- α -pinenu ve floému ani teplota kambia. Jeho množství je tedy pravděpodobně řízeno pouze broukem samotným.

Naše práce zjistila vysoké hodnoty cV, tV a verbenonu u zlatých brouků. To se shoduje s výsledky Lehmborga (2012), který tyto látky našel u larválních vývojových stádií. Jedna z hypotéz proč se tyto látky objevily v raném stádiu vývoje, může být detoxikace α -pinenu při přijímání potravy během larválního a úživného žíru. Tato hypotéza však neumí vysvětlit nulové nebo neměřitelné hodnoty těchto látek u stádia sklerotizovaných brouků během úživného žíru, kteří také přijímají potravu. Za předpokladu platné hypotézy o nutnosti detoxikovat α -pinen na cV a tV by tyto látky měly být přítomny u brouků všech vývojových stádií přijímajících potravu a nejmenší množství by měla být naměřena u brouků vystavených disperznímu letu, kteří byli dlouho bez potravy.

Další průběh množství cV se výrazně zvýšil vlivem disperzního letu a v následujících vývojových fázích kolonizace hostitele zůstal konstantní. Tento výsledek se neshoduje s předchozím výzkumem, který provedl Birgersson a kol. (1984). Při Birgerssonově pokusu samci, kteří přilétli k hostiteli, obsahovali malá množství cV, jehož hodnoty se zvyšovaly až po zavrtání samců do hostitele.

Ve shodě s publikovanými údaji (Birgersson a kol. 1984) je naproti tomu produkce MB. MB produkují hlavně samci s hotovou snubní komůrkou a to v extrémně velkých množstvích oproti ostatním zkoumaným semiochemikáliím. Po

spáření množství MB ve střevech samců opět rychle klesá. Birgersson a kol. (1984) naměřili téměř dvojnásobná množství všech zkoumaných semiochemikálií. To je pravděpodobně způsobeno rozdílným původem brouků v těchto výzkumech. Zatímco tato práce je založená na vzorcích z první laboratorní generace, Birgersson a kol. (1984) shromažďoval vzorky z divokých brouků sebraných přímo v lese. U jedenácté laboratorní generace byla pozorována významně nižší produkce feromonových komponentů, než u brouků z přírody (Birgersson a kol. 1988).

Fenylethanol se začínal objevovat u vylétnutých brouků a jeho obsah se zvyšoval až do maxima ve fázi zavrtaných samců s hotovou snubní komůrkou. Spáření brouci fenylethanolu produkovali méně než zavrtaní samci. Tento průběh se shoduje s výzkumem Birgerssona a kol. (1984). Ipsdienol byl nalezen v malém množství u samců spářených se samicemi jen ve dvou měřeních. Ve třetím opakování bylo jeho množství pod hranicí měřitelnosti. Tento výsledek je srovnatelný s prací Birgerssona a kol. (1988), který nacházel ipsdienol jen u 40% spářených samců a to většinou v množstvích pod jeden nanogram na brouka. Absence ipsdienolu ve fázích před spářením a jeho tvorba po přijetí samic je pravděpodobně zapříčiněna jeho jiným behaviorálním významem, než má agreganční feromon. Jeho účel je pravděpodobně odradit další samice od vstupu do již plného požerku. Na druhou stranu Schlyter a kol. (1987) uvádí, že malé množství ipsdienolu v kombinaci s agregančním feromonem mírně zvyšovalo odchyt ve feromonově lákaných pastech.

Překvapivým výsledkem této práce byla velká množství cV, tV a verbenolu u zlatých samců. Dalším nepředpokládaným objevem bylo náhlé a prudké zvýšení produkce cV u brouků po disperzním letu. To odporuje teorii o vytváření cV z α -pinenu po zažráním brouků do hostitelského stromu (Birgersson a kol. 1984). Tuto teorii však podporuje průběh množství tV, který nebyl u prolétaných brouků nalezen a objevoval se až po zavrtání samců a přijetí prekurzorového α -pinenu v potravě. Je tedy možné, že si pionýrští samci *Ips typographus* v sobě uchovávají zásoby prekurzorů cV a v případě absence zdrojů z nich cV vytváří jako komunikačně aktivní látku. Mohou tak lákat ostatní brouky již před kolonizací hostitelského stromu, zvyšovat kolonizační potenciál a snižovat riziko izolovaných samců, kteří by sami neměli šanci překonat obranyschopnost hostitelského stromu.

Kvůli velké těkavosti pentanu a MB byla veškerá manipulace s těmito látkami a mrtvými brouky prováděna za co nejnižších teplot. Před kontaktem s pentanem a MB byly vždy podchlazeny i manipulační prostředky. Tím se podařilo snížit únik pentanu a MB při pitvě samců *Ips typographus* a výrobě extraktů do 10%. Otázkou však zůstává, zda dlouhodobé skladování (3 měsíce) brouků v mrazicím boxu (-80 °C) bylo dostatečné a nedocházelo zde k drobným únikům MB. Birgersson a kol. (1984) skladoval mrtvé brouky v tekutém dusíku (-196 °C). Výsledky jsou však podobné a nezdá se, že by skladování při nižších teplotách mělo na výpar MB vliv. Oproti metodice Birgerssona a kol. (1984) byla použita jiná délka a teplota louhování extraktů. Před započítáním této práce byly testovány různé doby a teploty louhování extraktů střev. Nebyl však zjištěn rozdíl v množství naměřených semiochemikálií z těchto vzorků.

Rozdíl v množství semiochemikálií tvořících se z α -pinenu (hlavně cV a tV) mohl být způsoben kombinací brouků z různých hostitelských polen. Bylo striktně dohlíženo na to, aby se v různých opakováních nevyskytla možnost příbuzných brouků. Byl však opominut význam obsahu hostitelských monoterpenů v chovných polenech a proto mohlo docházet ke kombinaci brouků z různých hostitelských stromů nejen mezi jednotlivými opakováními, ale i v rámci vývojových stádií jednoho opakování. Pro lepší názornost průběhu množství cV a tV by bylo vhodné použít jeden hostitelský strom pro všechny brouky.

7 Závěr

Data ukazují, že oba hlavní komponenty agregačního feromonu kůrovců *Ips typographus* jsou přítomny ve střevech samců již před kolonizací hostitele. Kromě stáří ovlivňuje produkci feromonu také letová aktivita kůrovců a kolonizace hostitele. Výsledky práce doplňují poznatky o bionomii *Ips typographus*. Jsou základem pro další výzkum biosyntézy feromonů a její regulace.

8 Seznam literatury

AUKEMA, B.; POWELL, J.; CLAYTON, M.; RAFFA, K. Variation in Complex Semiochemical Signals Arising From Insects and Host Plants. *Environ. Entomol.* 2010, vol. 39, no. 3, s. 874-882.

BIRGERSSON, G. Host tree resistance influencing pheromone production in *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Holarctic Ecology.* 1989, vol. 12, no. 4, s. 451-456.

BIRGERSSON, G.; SCHLYTER, F.; BERGSTRÖM, G.; LÖFQVIST, J. Individual variation in aggregation pheromone content of bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology.* 1988, vol. 14, no. 9, s. 1737-1761.

BIRGERSSON, G.; SCHLYTER, F.; LÖFQVIST, J.; BERGSTRÖM, G. Quantitative variation of pheromone in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology.* 1984, vol. 10, no. 7, s. 1029-1055.

BLOMQUIST, G.; FIGUEROA-TORAN, 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. Chemical Ecology of Bark Beetles in a Complex Olfactory Landscape. In LIEUTIER, F.; DAY, K.; BATTISTI, A.; GRÉGOIRE, J.; EVANS H. (eds.). *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis.* Kluwer Academic Publishers, 2004. s. 89-134. ISBN 978-1-4020-2240-1.

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.

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.

KINDLMANN, P.; MATĚJKA, K.; DOLEŽAL P. *Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody.* 1. vyd. Praha: Karolinum, 2012. 326 s. ISBN 978-80-246-2155-5.

- KŘÍSTEK, J.; URBAN, J. *Lesnická entomologie*. 2. vyd. upravené. Praha: Academia, 2013. 445 s. ISBN 978-80-200-2237-2.
- LEHMBERG, L. Emission von Kommunikationsstoffen des Buchdruckers: Effekt auf Artgenossen und zeitlicher Verlauf. *dizertační práce*, Technische Universität München, 2012
- MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. *Zpráva o stavu lesů a lesního hospodářství České republiky v roce 2017 (Zelená zpráva)*. Praha: [s.n.]: 2018. 117 s. ISBN 978-80-7434-477-0.
- PFEFER, A. *Kůrovcovití Scolytidae a jádrohlodovití Platypodidae*. 1. vyd. Praha: Academia, 1989. 140 s. ISBN 80-200-0089-5.
- RUDINSKY, J. A., Chemoacoustically induced behavior of *Ips typographus* (Col.: Scolytidae). *Journal of applied Entomology*. 1979, 537-541. 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.
- SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G.; BYERS, J.; LÖFQVIST, J.; BERGSTRÖM, G. Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates. *Journal of Chemical Ecology*. 1987, vol. 13, no. 4.
- SCHLYTER, F.; BYERS, J.; LÖFQVIST, J. Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: Density-Regulation Mechanisms in Bark Beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology*. 1987, vol. 13, no. 6.
- 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
- SKUHRAVÝ, V. *Lýkožrout smrkový a jeho kalamity*. Praha: Agrospoj, 2002. 196 s. ISBN 80-7084-238-5.
- ZUMR, V. *Lýkožrout smrkový – biologie, prevence a metody boje*. 1.vyd. Písek: Matices Lesnická, 1995. 132 s. ISBN 80-900043-2-9.