

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Oddělení výzkumu rizik pro lesy



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

**Identifikace biologicky aktivních hostitelských látek pro
kůrovce *Taphrorychus bicolor***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michal Neugebauer

Vedoucí práce: Ing. Roman Modlinger, Ph.D.

2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Michal Neugebauer

Lesní inženýrství

Název práce

Identifikace biologicky aktivních hostitelských látek pro kůrovce *Taphrorychus bicolor*

Název anglicky

The identification of biologically active hosts volatiles for bark beetle *Taphorychus bicolor*

Cíle práce

Cílem diplomové práce je identifikovat a popsat těkavé látky z buku lesního (*Fagus sylvatica* L.), které kůrovce *Taphrorychus bicolor* (Herbst, 1973) pomocí tykadel cítí, a které tak mohou ovlivňovat jeho chování při výběru vhodného hostitele.

Metodika

Rostlinné vůně budou získávány v laboratoři z přírodních zdrojů (větve a listy) metodou zachytávání na absorbent a následným vymytím rozpouštědlem (metoda dynamického headspace). Čichová aktivita rostlinných vůní bude studována pomocí plynové chromatografie s elektroantenografickou detekcí (GC-EAD). Biologicky aktivní látky na tykadle budou identifikovány prostřednictvím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), a následně bude jejich aktivita ověřena syntetickými standardy pomocí elektroantenografické detekce (EAD). Pro elektrofyziologické experimenty budou používáni brouci *T. bicolor* z jejich přirozeného prostředí – z infestovaného materiálu buku lesního. Pro stanovení aktivních látek je postačující několik elektrogramů s kvalitní odpovědí testovaných jedinců *T. bicolor*.

Harmonogram:

červenec – srpen 2023: jímání látek listů metodou dynamické headspace

září – prosinec 2023: kapitola literární rešerše

září – listopad 2023: rozpoznávání čichově aktivních látek na EAD

prosinec 2023: identifikace aktivních látek na GC-MS

prosinec 2023: kapitola metodika

leden 2024: ověření identifikovaných látek pomocí chemických standardů na EAD

únor 2024: kapitola výsledky

březen 2024: kapitola diskuse, odevzdání práce

Doporučený rozsah práce

40-60 stran

Klíčová slova

kůrovci, smrk, buk, volatilní látky, GC-MS, EAD

Doporučené zdroje informací

- Dindorf, T., Kuhn, U., Ganzeveld, L., Schebeske, G., Ciccioli, P., Holzke, C., Köble, R., Seufert, G., Kesselmeier, J., 2006. Significant light and temperature dependent monoterpene emissions from European beech (*Fagus sylvatica* L.) and their potential impact on the European volatile organic compound budget. *Journal of Geophysical Research Atmospheres* 111.
- Holzke, C., Dindorf, T., Kesselmeier, J., Kuhn, U., Koppmann, R., 2006. Terpene emissions from European beech (*Fagus sylvatica* L.): Pattern and emission behaviour over two vegetation periods. *J Atmos Chem* 55, 81–102.
- Kohnle, U., Mussong, M., Dubbel, V., Francke, W., 1987. Acetophenone in the aggregation of the beech bark beetle, *Taphrorychus bicolor* (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 103, 249–252.
- Lakatos, F., Molnár, M., 2009. Mass Mortality of Beech (*Fagus sylvatica* L.) in South-West Hungary. *Acta Silv. Lign. Hung* 5, 75–82.
- Pfeffer, A., 1955. Kůrovci-Scolytoidea. *Fauna ČSR, svazek 6*. Praha, ČSAV, 324 s.
- Raffa, K.F., Andersson, M.N., Schlyter, F., 2016. Host Selection by Bark Beetles: Playing the Odds in a High-Stakes Game. In: *Advances in Insect Physiology*. Academic Press Inc., pp. 1–74.
- Schuh, G., Heiden, C., Hoffmann, T., Kahl, J., Rockel, P., Rudolph, J., Wildt, J., 1997. Emissions of Volatile Organic Compounds from Sunflower and Beech: Dependence on Temperature and Light Intensity. *J Atmos Chem* 27, 291–318.
- Tollsten, L., Müller, P.M., 1996. Volatile organic compounds emitted from beech leaves. *Phytochemistry* 43, 759–762.
-

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Roman Modlinger, Ph.D.

Garantující pracoviště

Oddělení výzkumu rizik pro lesy

Elektronicky schváleno dne 29. 2. 2024

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 29. 2. 2024

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci: „Identifikace biologicky aktivních hostitelských látek pro kůrovce *Taphrorychus bicolor*“ vypracoval samostatně a citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil, a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědom, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědom, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne _____

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Romanovi Modlingerovi, Ph.D. za trpělivost a ochotnou spolupráci po čas kompletace této publikace. Panu Ing. Jaromírovi Hradeckému, Ph.D. bych rád poděkoval za pomoc při identifikaci látek prostřednictvím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Ing. Jaromíru Bláhovi bych rád poděkoval za množství času a technické podpory, kterou mi poskytl stejně tak jako za prohloubení teoretických znalostí v oblasti chemické ekologie. RNDr. Blance Kalinové, CSc. bych rád poděkoval za uvedení do problematiky chemické komunikace hmyzu a zájem, který u mě vzbudila v této oblasti. A v neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za neochvějnou podporu po čas mých studií na České zemědělské univerzitě, fakultě lesnické a dřevařské.

Abstrakt

Vzhledem k měnícím se klimatickým podmínkám může na území České republiky dojít ke zvýšení stresu buku lesního – *Fagus sylvatica* (Linnaeus, 1758), což může přilákat pozornost biotických činitelů jako například kůrovce bukového – *Taphrorychus bicolor* (Herbst, 1973), který se stal předmětem tohoto výzkumu. Stejným cílem bylo identifikovat látky emitované do ovzduší *F. sylvatica*, které ovlivňují chování *T. bicolor*. Nejdříve byly extrahovány volatilní látky, které *F. sylvatica* vylučuje do ovzduší, metodou dynamického headspace. Získaná směs látek byla elektroantenografickým měřením párovaným s plynovým chromatografem testována na tykadle *T. bicolor* (byla měřena změna receptorového potenciálu po podráždění tykadla chemickou látkou). Na základě použité měřicí metody bylo identifikováno 5 látek, které způsobovaly změnu receptorového potenciálu. Směs látek byla následně prostřednictvím dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem analyzována s cílem přesné determinace biologicky aktivních látek. Jednalo se o 4 látky rostlinného původu (trans-2-hexenal, eukalyptol, γ -terpinene, terpinolen) a 1 látku, kterou produkuje přímo lýkožrout (bicolorin – agregační feromon). Ke znečištění headspace *F. sylvatica* došlo pravděpodobně již při jímání látek, z důvodu použití infestovaného biologického materiálu. Abychom látky mohli opravdu prohlásit za správně určené, byly testovány v podobě syntetických standardů opět na tykadle s využitím elektroantenografie. Kompletní identifikace (zaznamenána odpověď tykadla na syntetický standard) se podařilo dosáhnout pouze v případě aldehydu (trans-2-hexenalu) a monoterpenu eukalyptolu. Terpinolen a γ -terpinene se podařilo identifikovat na základě shody retenčních časů a kompletní separací původního vzorku podrobnější chromatografií. Po zjištění behaviorální aktivity určených látek bude možné jejich nasazení v provozních podmínkách v případě, že by se *T. bicolor* stal výrazným faktorem ovlivňujícím bukové porosty.

Klíčová slova: elektroantenografie (EAD), plynová chromatografie (GC), hmotnostní spektrometrie (MS), dynamický headspace (HS), *Taphrorychus bicolor*, chemická ekologie

Summary

Lately there was a trend observed in climatology, that average temperatures are raising, and precipitation dispersion is more sudden and not well distributed during the year in the Czech Republic. It can set *Fagus sylvatica* (Linnaeus, 1758) in the uncomfortable position outside its optimum. This may cause that some of the pathogens like insect f.e. *Taphrorychus bicolor* (Herbst, 1973) might be attracted to those trees which can ultimately cause forests outbreaks. Because of these circumstances we've decided to identify volatile compounds affecting *T. bicolor* behavioural responses (whether he colonize or avoid the host plant). In this work the volatile compounds emitted by European beech were collected by dynamic headspace method. These were lately tested on the bark beetles antenna using electroantennography paired with gas chromatography. There were 5 compounds that elicited reaction via depolarization of the cell membrane which causes change in the receptor potential on the antenna. These were tested via double dimension gas chromatography with mass spectrometer as a detector. One aldehyde – trans-2-hexenal, 3 monoterpenes – eucalyptol, γ -terpinene and terpinolene and aggregation pheromone of *T. bicolor* – bicolorin were identified. Assuming, that the presence of the bicolorin was there because the organic material, we used, was already infested by the beetle. Identified compounds were in the end tested in the synthetic form to confirm their biological activity. Only trans-2-hexenal and eucalyptol were causing change in the receptor potential on the antenna of *T. bicolor*. The other 2 monoterpenes (γ -terpinene and terpinolene) in the synthetic form were not perceived by antenna. But with help of other methods, that were used like the same retention times of compounds in the original mixture as the retention times of chemical standards and complete separation of the mixture via double dimension gas chromatography, we estimated that those compounds were determined correctly. With the potential follow up behavioural studies, there will be a possibility of utilizing these identified active compounds in the forests to protect these ecosystems.

Keywords: electroantennography (EAD), gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS), dynamic headspace (HS), *Taphrorychus bicolor*, chemical ecology

Obsah

1	Úvod	12
2	Cíl práce	13
3	Literární rešerše	14
3.1	Kůrovci	14
3.2	Taphrorychus bicolor (Herbst, 1793)	15
3.2.1	Systematika	15
3.2.2	Morfologie a bionomie <i>T. bicolor</i>	15
3.3	Chemosemanty	16
3.3.1	Feromony	17
3.3.1.1	Sexuální feromony	17
3.3.1.2	Poplašné feromony	18
3.3.1.3	Trasovací feromony	18
3.3.1.4	Kutikulární úhlovodíky	18
3.3.1.5	Agregační feromony	18
3.3.2	Allomony	19
3.3.3	Kairomony	19
3.3.4	Synomony	19
3.4	Buk lesní	20
3.5	Vybrané biologicky aktivní látky na tykadle <i>T. bicolor</i>	21
3.5.1	Bicolorin	21
3.5.2	<i>Trans</i> -2-hexenal	22
3.5.3	Eucalyptol	23
3.5.4	Γ -terpinene	24
3.5.5	Terpinolene	25
3.6	Orientace kůrovců v prostředí	26
3.7	Chemická komunikace u kůrovců	27
3.8	Standardní schéma chemické ekologie	30
3.8.1	Pozorování chování zkoumaného jedince	30
3.8.2	Extrakce látek	30
3.8.3	Identifikace látek	31
3.8.4	Testování biologické aktivity látek na tykadlech	32
3.8.5	Behaviorální pokusy	33
3.8.6	Genetická měření	34

3.8.7	Praktické využití	35
4	Metodika	36
4.1	Brouci <i>T. bicolor</i>	36
4.2	Jímání látek	36
4.3	Příprava měřicí aparatury EAG	38
4.4	Příprava plynového chromatografu	38
4.5	Fixace <i>Taphrorychus bicolor</i>	39
4.6	Měřicí protokol	41
4.7	Počítačové rozhraní	41
4.8	Determinace látek	43
4.9	Potvrzení látek	44
5	Výsledky	44
5.1	Vyhodnocení dynamického headspace prostřednictvím GC-FID	44
5.2	Kontrolní strana headspace	47
5.3	Zakoncentrování původního headspace <i>F. sylvatica</i>	48
5.4	Výpočet zpoždění FID vůči EAG	50
5.4.1	Identifikace biologicky aktivních látek na tykadle <i>T. bicolor</i>	52
5.4.2	Separace látek	54
5.5	Identifikace látek	55
5.6	Identifikace agregačního feromonu	56
5.7	Potvrzení látek standardy	60
5.8	Ověření čistoty standardů	62
5.9	Diskuse	66
6	Závěr	71
7	Literatura	72
7.1	Tištěné zdroje	72
7.2	Webové zdroje	87
7.3	Knihy	90
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	91
9	Samostatné přílohy	92

Seznam tabulek

Tabulka 1. Podobnost hmotnostních spekter s knihovnou NIST

Tabulka 2. Vyhodnocení čistoty syntetických standardů

Seznam obrázků

Obrázek 1. Strukturní vzorec bicolorinu

Obrázek 2. Strukturní vzorec *trans*-2-hexenal

Obrázek 3. Strukturní vzorec eucalyptolu

Obrázek 4. Strukturní vzorec γ -terpinenu

Obrázek 5. Strukturní vzorec terpinolenu

Obrázek 6. Detailní snímek tykadlové paličky *I. typographus*

Obrázek 7. Plynová chromatografie

Obrázek 8. Fixace hlavy *T. bicolor*

Obrázek 9. Fixace živého brouka *T. bicolor*

Obrázek 10. Ukázka počítačového rozhraní software EAG

Obrázek 11. Chromatogramy dynamických headspace *F. sylvatica*, *P. abies* a *T. baccata*

Obrázek 12. Kontrolní strana dynamického headspace pro *F. sylvatica*

Obrázek 13. Chronologicky řazené chromatogramy dynamického headspace *F. sylvatica* podle koncentrovanosti směsi

Obrázek 14. Výpočet zpoždění odpovědi na biologickém detektoru

Obrázek 15. Chromatogramy párované s elektroantenogramy *T. bicolor* s headspace *F. sylvatica*

Obrázek 16. Profil těkavých látek při využití pomalejšího teplotního programu

Obrázek 17. Grafické znázornění hmotnostních spekter identifikovaných látek z mezinárodní knihovny NIST

Obrázek 18. Výstup dvoudimenzionálního plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem při využití pomalejšího teplotního programu

Obrázek 19. Grafické znázornění detailního pohledu na retenční čas, ve kterém bicolorin opouštěl kolonu za užití pomalejšího teplotního programu

Obrázek 20. Porovnání specifických hmotnostních spekter bicolorinu

Obrázek 21. Porovnání hmotnostních spekter bicolorinu z různých zdrojů

Obrázek 22. Identifikace bicolorinu na základě retenčního času

Obrázek 23. Potvrzení látek na základě shodných retenčních časů syntetických standardů s retenčními časy látek v původní směsi

Obrázek 24. Potvrzení látek syntetickými standardy

Obrázek 25. Grafické vyhodnocení čistoty *trans*-2-hexenalů

Obrázek 26. Grafické vyhodnocení čistoty eukalyptolu

Obrázek 27. Grafické vyhodnocení čistoty γ -terpinenu

Obrázek 28. Grafické vyhodnocení čistoty terpinolenu

1 Úvod

Buk lesní – *Fagus sylvatica* (Linnaeus, 1758) byl nejvýznamnější složkou přirozené druhové skladby lesů ve střední Evropě a v současnosti představuje jednu z hlavních alternativ druhového složení lesů v souvislosti s mitigací změn klimatu. Doposud se jednalo o druh stromu, který netrpí závažnými škůdci a patogeny. *F. sylvatica* se v současných podmínkách sice nachází v oblasti svého ekologického optima na většině území, ale při uvážení klimatologických prognóz do budoucích let (z hlediska teploty a distribuce srážek), bude možná na některých stanovištích mimo tyto hranice vytlačen. Pakliže by se tak stalo, dostal by se do nekomfortní pozice a mohl by se stát náchylným na biotické patogeny stejně tak, jako tomu bylo po teplých letech 2015-2018 (ČHMÚ, 2024) u smrku ztepilého – *Picea abies* (L.) H. Karst. U *F. sylvatica* tento jev nastal již dříve na území Maďarska, kde byl kůrovec bukový *Taphrorychus bicolor* (Herbst, 1793) společně s polníkem zelenavým *Agrilus viridis* (Linnaeus, 1758) významným faktorem spojeným s rozpadem tavných porostů (Lakatos a Molnár, 2007). To by s sebou mohlo přinést značná ekonomická a ekologická rizika a mohlo by opět dojít k velkoplošným rozvratům lesních stanovišť na území České republiky. Díky jeho vlivu na společenstva *F. sylvatica* narůstá v poslední době zájem na biologickém i ekologickém bádání ohledně tohoto, doposud neprobádaného, kůrovce.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bude izolovat těžké látky z organického materiálu *F. sylvatica* prostřednictvím metody dynamického headspace. Směs látek následně otestovat na kůrovci žijícím na této dřevině – *T. bicolor* s využitím elektroantenografie spojené s plynovým chromatografem. Z elektroantogramů budou vybrány hostitelské látky, které se budou jevit jako biologicky aktivní a vyvolají odpověď na tykadle (podráždí čichové receptorové neurony). Tyto látky budou podrobně identifikovány na základě dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a metodou porovnání retenčních indexů. Syntetické standardy identifikovaných látek budou znovu zpětně analyzovány elektroantografickou detekcí párované s plynovou chromatografií se snahou o potvrzení správnosti jejich prvotního určení. Výsledkem práce bude tedy identifikace biologicky aktivních látek hostitelské dřeviny – *F. sylvatica* na tykadle kůrovce – *T. bicolor*.

Identifikací látek, které jsou důležité pro *T. bicolor* můžeme učinit preventivní opatření a v případě jeho budoucích gradací budeme vědět více o jeho orientaci v prostředí. Především se jedná o potenciální zvýšení atraktivity agregačního feromonu – bicolorinu, který je již teď synteticky vyráběn a distribuován. Toto lze implementovat v zásadách integrované ochrany lesních stanovišť, mezi které patří významný prvek – kontrola. Tu lze vykonávat lákáním kůrovce do pastí (lapačů), na jejichž základě je možné odvodit hustoty jeho populací. Díky tomu můžeme vyhodnotit možnosti, jak jeho gradaci zastavit nebo alespoň zpomalit.

3 Literární rešerše

3.1 Kůrovci

Kůrovci jsou živočichové z řádu brouků, čeledi nosatcovitých (Biolib, 2024). Na celém světě se vyskytuje více než 4000 druhů těchto živočichů. Velikost jejich těla je velice variabilní. V České republice se pohybuje v rozmezí od 1 mm až po 9 mm (Pfeffer, 1965). Mezi základní metody determinace patří posouzení morfologie jednotlivých druhů nebo případně identifikace požerku, což je kresba, která vzniká pod kůrou v důsledku jejich aktivity. Nejčastěji kůrovce rozdělujeme na 2 skupiny dle jejich životní strategie. Kambio-xylofágní druhy, kteří konzumují lýko a často působí nemalé ekonomické škody (viz. v Evropě podčeleď *Ipinae*, v Americe potom převážně rod *Dendroctonus*) a ambrosioví kůrovci (rod *Xylosandrus*), kteří žijí ve dřevě, kde pěstují symbiotické houby, které i konzumují. Hostiteli kůrovců jsou v majoritním zastoupení stromy, které slouží jako zdroj potravy, úkryt před nebezpečím i jako substrát pro založení nové generace. Kůrovci mají různě širokou potravní vazbu. Někteří patří mezi monofágní strategy a soustředí se pouze na jednu dřevinu. Například lýkohub jasanový – *Hylesinus varius* (Fabricius, 1775), bělokaz dubový – *Scolytus intricatus* (Ratzenburg, 1837), bělokaz jilmový – *Scolytus scolytus* (Fabricius, 1775) nebo oligofágní strategy, kteří se mohou vyvíjet na širokém spektru druhů rostlin. V podmínkách České republiky představují největší riziko druhy, které se specializují na smrk ztepilý. Mezi tyto patří například lýkožrout smrkový – *Ips typographus* (Linnaeus, 1758), lýkožrout menší – *Ips amitinus* (Eichhoff, 1871), lýkožrout severský – *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836), lýkohub matný – *Polygraphus poligraphus* (Linnaeus, 1758), lýkožrout lesklý – *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus, 1758) a další (Jankowiak a kol., 2009). *I. typographus*, *I. duplicatus* a *P. chalcographus* zároveň patří dle vyhlášky č. 101/1996 Sb., v platném znění, mezi kalamitní škůdce, což znamená, že mají potenciál způsobit kompletní rozvrat lesních společenstev. To z nich činí důležité činitele, kteří působí značné ekonomické a ekologické ztráty. Jedním z hlavních důvodů jejich relevantnosti je dominantní zastoupení smrku ztepilého v naší krajině (46, 8 % z celkové rozlohy lesů na území ČR – MZe, 2022). Nahodilá těžba podle MZe (2022), představovala 19,8 milionů m³ z čehož bylo 11,54 milionů m³ vykázáno jako těžba z důvodu biotického poškození. Fatálními však nejsou pouze kůrovci na jehličnatých dřevinách. Například druhy jako *S. scolytus* napadající jilmy (rod *Ulmus*) jsou také extrémně letální (Dvořák a kol., 2006). Důvodem jejich závažnosti je přenos houbových spor, které následně způsobují odumírání hostitelských dřevin.

Jako základní ochranný mechanismus podle vyhlášky 101/1996, který je v českém lesnictví využíván, je kontrola populací škůdců. Pakliže je prováděna důsledně a počty kůrovců jsou udrženy v únosných mírách, nemusí dojít k prudké expanzi populace s mnohdy velikými ztrátami. K monitoringu jsou dle vyhlášky povolena například následující opatření: kladení lapáků, využití lapačů nebo otrávených lapáků. Počty pro jejich nasazení jsou vyvozeny na základě výpočtu kalamitního základu, což je množství m³ napadených stromů za předchozí období (1.8. – 31.3.). Dalším důležitým předpokladem pro udržení populace kůrovců v únosné míře je pochůzková metoda s cílem odhalení napadených stromů a jejich včasná asanace (zpracování kmenů dřívě, nežli kůrovec dokončí životní cyklus a dřevinu opustí).

3.2 Taphrorychus bicolor (Herbst, 1793)

3.2.1 Systematika

Taphrorychus bicolor patří do říše *Animalia*, kmenu *Arthropoda*, třídy *Insecta*, řádu *Coleoptera*, čeledi *Curculionidae*, podčeledi *Scolytinae*, tribus *Dryocoetini* rodu *Taphrorychus*. Poprvé byl tento druh kůrovce popsán Herbstem roku 1793 (Biolib, 2024).

3.2.2 Morfologie a bionomie *T. bicolor*

Velikost těla se pohybuje od 1,6-2,5 mm (Pfeffer, 1955). *T. bicolor* je tmavě černé až hnědočerné lesklé barvy. Celé tělo je poseto chloupky. Pronotum je delší než širší s opticky spatřitelnými hrbolky. Krovky jsou tečkované s jemně patrným mezirýžím (Pfeffer, 1955; Pfeffer, 1989). *T. bicolor* disponuje křídly, která mu slouží jako hlavní prostředek disperze v prostředí. Diference mezi samečkem a samičkou je patrná. Podobně jako u lýkožrouta smrkového spočívá hlavní determinační rozdíl v intenzitě ochlupení. U *I. typographus* se jedná o husté ochlupení hlavového štítu (pronotum) v případě samice (Schlyter a Cederholm, 1981). Samičky *T. bicolor* mají, na rozdíl od *I. typographus*, hustě ochlupenou hlavu (chomáč žlutých chloupků). Druhým determinačním znakem je zkosení krovek na zadečku. Samečci mají tuto oblast ostře uťatou, zatímco samičky ji mají vypouklou. Hostitelskou dřevinou, kterou využívá pro svůj vývoj je *F. sylvatica*, ojediněle byl druh zaznamenán i na rodech dubů (*Quercus*), lísek (*Corylus*), habrů (*Carpinus*), ořešácích (*Juglans*), vrby jívy (*Salix caprea*) (L.) a bříz (*Betula*) (Pfeffer, 1955). Dalším známým druhem, který se na *F. sylvatica* vyskytuje je *Ernoporicus fagi* (Fabricius, 1798) se kterým ho lze zaměnit (ÚKZÚZ, Foit, 2024). Na rozdíl od více

zprofanovaného druhu v našich zeměpisných podmínkách – *I. typographus* však *T. bicolor* zatím nepředstavuje vysoké riziko pro lesní porosty. Jedná se především o sekundárního škůdce, který se živí převážně na větvích, případně na odumírajících částech hostitelské dřeviny. Pro tohoto živočicha již byl objeven agregační feromon, což nám umožňuje potenciální nasazení látky pro kontrolu a monitoring. Jedná se o bicolorin ((1S,2R,5R)-2-ethyl-1,5-dimethyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane) (Francke a kol., 1996). Z hlediska životní strategie se jedná o klasického polygamního kůrovce. *F. sylvatica* kolonizují nejdříve samečci, kteří vyhloubí snubní komůrku a začnou lákat další jedince. Samice z důvodu páření a samce z důvodu úspěšné kolonizace. První rojení probíhá na jaře – v dubnu, druhé potom na přelomu června a července (Pfeffer, 1955). Tento kůrovec se zaměřuje především na vrchní partie *F. sylvatica* a v optimálním případě mu nejvíce vyhovují spadlé nebo pokácené stromy, u kterých se nejdříve zaměřuje na větve nebo materiál o parametrech nehroubí. Sameček se podle Pfeffera (1955) nejčastěji ve snubní komůrce páří se dvěma až třemi samicemi. Požerek je hvězdicovitého tvaru, který se táhne ve svislém směru a nezasahuje do běli. *T. bicolor* klade v matečních chodbičkách 6-10 vajíček (maximálně 20). Po zakuklení kůrovci prodělávají přeměnu dokonalou. Vývoj trvá přibližně 2 až 3 měsíce v závislosti na počasí a okolních podmínkách. Zimu tento druh přečkává ve stádiu larvy, kukly nebo dospělého jedince, a to nejčastěji v hrabance. Část populace ale zimu překonává zavrtaná v lýku *F. sylvatica*. Toho bylo využito pro získávání jedinců pro experimentální pokusy v této práci viz metodika 4.1. Tento druh kůrovce se vyskytuje v lesích mírného pásu celé střední Evropy, Anglie, Skotska, severní části Afriky, Skandinávie, Dánska, Kavkazu, Krymu, Balkánského poloostrova, Itálie, Rumunska, Sicílie a Korsiky (Pfeffer, 1955). Abundance tohoto hmyzího organismu má ale v současné době spíše klesající trend. Ke svému vývoji potřebuje staré a dobře vyvinuté bukové porosty se zachovanou kontinuitou jejich vývoje. Podle Lakatose a Molnára (2009), může pomoci jeho populační hustotě nárůst teplot v budoucnu, čímž dojde k oslabení buků.

3.3 Chemosemanty

Podstata těchto látek spočívá v jejich těkavosti, což znamená, že jsou schopny dispergovat do prostředí, kde mohou být přijímány jiným organismem. Tyto skupiny látek jsou využívány především ze 2 důvodů. Jedním z nich je ochrana. U rostlin v podobě alkaloidů, tříslovin, u hub především jako toxiny a u živočichů ve formě obranných sekretů. Druhým, pro tuto práci

důležitějším důvodem, je komunikace. Látky, které nesou určitou informaci a jsou využívány pro dorozumívání se označují jako infochemikálie nebo také semiochemikálie. Ty se nadále dělí na 2 marginální skupiny. Na feromony, které zprostředkovávají komunikaci v rámci jednoho druhu a allelochemikálie, které slouží k mezidruhovému způsobu přenosu informace. Feromony se skládají z působků, které přímo ovlivňují fyziologické procesy a spouštěčů, které vyvolávají behaviorální změnu chování (Regnier a Law., 1968). Allelochemikálie se rozdělují na allomony, které přináší užitek producentovi této informace, kairomony, které zvýhodňují příjemce a synomony, ze kterých prosperují veškeré zainteresované organismy (Kost, 2008).

3.3.1 Feromony

Feromony jsou látky, které vyvolávají standardní odpověď po percepci organismem stejného druhu. Reakce na tyto látky je vrozená, živočich ji nemusí získat v průběhu svého vývoje. Tyto látky rozlišujeme do několika skupin. Patří sem feromony poplašné, sexuální, agregační, značkovací, identifikační, ovipoziční, královské, atd (El-Ghany, 2019). Většina feromonů je lipidové povahy, což umožňuje dobrou možnost interakce s chemoreceptory (Regnier a Law., 1968). Velikost molekuly, se kterou souvisí její těkavost hraje důležitou roli. Například stopovací feromony jsou tvořeny velkými molekulami, protože musí v prostředí vydržet dlouhou dobu. Naopak poplašné signály jsou tvořeny malými molekulami, protože je potřeba bezprostřední reakce a molekuly o menší velikosti se pohybují rychleji (Fadl Ali a Morgan, 1990). Rovněž specifická látek, které jsou využívány jako feromony, je u různých funkčních zaměření různá. Sexuální feromony jsou vysoce specifické pro daný organismus, zatímco poplašné feromony takovou míru unikátnosti nepotřebují. Geografické bariéry hrají významnou roli v evolučních procesech, při kterých byly formovány receptory u živočichů na konkrétní látky. Například látka frontalin funguje jako agregační feromon pro řadu kůrovců (především rod *Dendroctonus*) a zároveň jako samčí sexuální feromon slona asijského – *Elephas maximus* (Linnaeus, 1758.) (Keeling a kol., 2013; Rasmussen Greenwood, 2003). Hmyz produkuje feromony většinou v corematech (v případě motýlů) nebo specializovaných štětičkách, které se nacházejí na zadečku, končetinách nebo křídlech.

3.3.1.1 Sexuální feromony

Tato skupina látek slouží k signalizaci pro partnera o připravenosti k páření. Některé struktury působí na partnera jako afrodisiakum. Tyto chemické signály mohou být do prostředí

uvolňovány jak samicemi (například bekyně, monogamní druhy kůrovců), tak i samci (polygamní kůrovci). Druhem, na kterém byla podstata sexuálních feromonů objasněna, byl bourec morušový – *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) s feromonem bombykol (Matsumoto a kol., 2007), který v roce 1959 objevil Butenandt.

3.3.1.2 Poplašné feromony

Tato skupina látek nabývají podstatného významu především u sociálních druhů hmyzu. Známé případy využití poplašného mechanismu jsou potvrzeny u širokého spektra mravenců. Jako příklad: mravenec *Lasius claviger* (Roger, 1862) využívá látky ze skupiny terpenoidů (citrál), aldehydů (citronellal) a uhlovodíků (undekan) (Regnier a Law., 1968). Látky signalizují blížícího se predátora a indukují pocit nebezpečí.

3.3.1.3 Trasovací feromony

Jsou známy rovněž u sociálních druhů hmyzu, jako mravenci, včely a termiti. Zde jsou využívány málo těkavé molekuly, které udrží signál stopy po dlouhou dobu. Využití je především pro orientaci v prostředí. A to jak jedním živočichem pro návrat z určitého místa zpět domů, tak pro navedení zbylé části kolonie na lokalitu, kde se nachází vhodné zdroje (potravy, materiálu). U včel byly identifikovány látky geraniol, citrál, kyselina nerolová (Regnier a Law., 1968) plnící tyto funkce.

3.3.1.4 Kutikulární uhlovodíky

Tato skupina látek slouží u sociálních druhů hmyzu k rozřazování do příslušných kast. Nachází se na celém povrchu těla a podávají informaci o funkčním zařazení jednotlivce v kolonii (Holze a kol., 2021).

3.3.1.5 Agregáčnící feromony

Tato skupina látek slouží k masové mobilizaci jedinců konkrétního druhu. To je užitečné za účelem překonání hostitelovy obranyschopnosti, kdy není schopen čelit náporu velkého množství predátorů (Bakke, 1970). Tento vztah je dobře popsán u většiny druhů kůrovců. *I. typographus* používá *cis*-verbenol, 2-methyl-3-buten-2-ol a ipsdienol (Vité, 1972) za účelem mobilizace samců i samic, aby se přidali při kolonizaci konkrétního stromu. Díky jejich vysoké převaze strom není schopen odolávat ani v optimálních podmínkách a podkorní hmyz si díky tomu zajistí zdroj obživy a vhodný substrát pro vyvedení následné generace. *I. duplicatus*

využívá látky ipsdienol a e-myrcenol (Duduman, 2022), *P. chalcographus* zase využívá chalcogran a methyl 2,4-decadienate (Byers, 1990).

3.3.2 Allomony

Jsou skupinou látek spadajících do allelochemikálií. Jejich primární rolí v ekosystému je přinést výhodu organismu, který je emituje do ovzduší. Sbarbati a kol. (2006), rozšiřuje tuto problematiku zjištěním, že samotnou látku nemusí produkovat přímo zainteresovaný organismus, ale mikroorganismy, se kterými žije. Příkladem využití allomonů v přírodě je křížák bola – *Mastophora cornigera* (Hentz, 1850) (Uhl, 2012). Ten se dokázal naučit replikovat struktury samičích sexuálních feromonů nočních motýlů z čeledi *Noctidae* (například tetradec-9Z-enal, hexadec-11Z-en-1-yl acetát). Díky tomu je schopný nalákat kořist do pasti a zajistit si potravu. Dalším příkladem jsou hrobařici. Ti se naučili vnímat sirné vůně, které uvolňuje rozkládající se tkáň (methathiol, dimethylsulfid) (Podskalková, 2009). Tyto látky se naučila emitovat do ovzduší i rostlina z rodu arónií a tím si zajistila přísun opylovačů, díky čemuž získává kompetiční výhodu oproti konkurentům.

3.3.3 Kairomony

Patří do skupiny látek, u kterých z jejich vypouštění do prostředí benefituje příjemce. Lesnický významnou interakcí je například vztah *I. typographus* a pestrokrevečníků z rodu *Thanasimus* (Bakke, 1981). *Thanasimus* se naučil rozpoznávat agregační feromon, kterým kůrovec láká ostatní jedince téhož druhu a využívá to pro svou navigaci na napadený strom. Podkorní hmyz pro něj slouží jako zdroj potravy, tudíž jde o typický kairomon. Dalším příkladem je slunéčko sedmitečné – *Coccinella septempunctata* (Linnaeus, 1758), které se naučilo reagovat na látku beta-farnesen (Minorreti a Weisser, 2014). Ten je produkován mšicemi z rodu *Acyrtosiphon*. Slunéčka se jimi živí a z percepce látky tedy benefitují.

3.3.4 Synomony

Slouží v chemické komunikaci k prosperitě, jak emitenta, tak příjemce chemického signálu. Do této skupiny látek patří například alarmující látky, které rostlina vypouští po napadení predátorem. Ten následně přiláká predátory, parazity nebo parazitoidy, kteří se agresorem živí.

Rostlině to tedy pomůže z hlediska ochrany před nepřítelem a přilákaný druh najde užitek v podobě potravy. Nejčastěji je tento vztah demonstrován na housenkách a parazitických vosičkách. Například ploskohřbetky (rod *Cephalcia*) a parazitická vosička z rodu *Trichogramma* (Kot, 1964). Nebo v zemědělském sektoru, kde se tato parazitická vosička používá pro potlačení zavíječů kukuřičných – *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796), černopásce bavlníkové – *Heliothis armigera* (Hübner, 1808) (Mendelu, 2010) či zavíječů moučných – *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Ferracini a kol., 2006).

3.4 Buk lesní

Rod buk (*Fagus*) patří mezi dřeviny, které se vyskytují téměř na všech kontinentech. Pro střední Evropu je typický druh buk lesní (*F. sylvatica*). Areál jeho výskytu na jižní straně začíná na Sicílii a končí v norském Bergenu. Na východě se začíná vyskytovat v Rumunsku a táhne se až po Turecko. Západní hranice výskytu začíná ve východním Španělsku (Durrant a kol., 2016). S přihlédnutím na plošné zastoupení dřevin na zemském povrchu lze usoudit, že dřeviny vypouštěním těkavých látek do určité míry ovlivňují složení atmosféry. Z pohledu chemické ekologie je buk považován za silného emitera těkavých látek (Holzke a kol., 2006; Tollsten a Müller, 1996). To platí zejména v porovnání s dalšími listnatými stromy. Jehličnany jsou obecně mnohem bohatší na vypouštěné látky do ovzduší. Nejvýznamnější zdroj volatilních látek u buku lesního je asimilační aparát (Leuschner, 2020). Zde skrz průduchy dochází k intenzivní výměně plynů s okolním prostředím, a tudíž jsou odsud uvolňovány i chemické látky. V kůře je lze rovněž nalézt, ale pokud není kmen stromu porušený, tak zde probíhá odpar pouze v malém množství. Při řadě výzkumů bylo odhaleno, že emise těkavých látek z *F. sylvatica* závisí především na 2 faktorech. Intenzita slunečního záření a teplota se jeví jako hlavní vysvětlující proměnné (Dindorf a kol., 2006; Leuschner, 2020; Šimpraga a kol., 2011; Tollsten a Müller, 1996). S tím souvisí variabilita v emisi látek z pohledu diurnálních změn. Přes noc, případně při nízké intenzitě fotosynteticky aktivního záření dochází k útlumu výparu. Z toho vyplývá, že nejvyšších hodnot emise je dosahováno v době kolem poledne. Ráno a přes noc je naopak téměř nulová. Se závislostí na teplotě souvisí roční období (Holzke a kol., 2006). Zahrnuto je pouze aktivní vegetační období, tedy doba, kdy má strom vyvinutý asimilační aparát. Nejnižších koncentrací u těkavých látek dosahuje buk v podzimním období (v září). Nejvyšší emise naopak probíhá v létě (přelom června/července) (Dindorf a kol., 2006; Holzke a kol., 2006). V případě, že se jedná o genetické klony příslušného jedince, tak nebyl

zpozorován rozdíl v profilu těkavých látek. Naopak rozdíly mezi jednotlivci příslušného druhu jsou předpokládány (Meeningen a kol., 2016). Vývojové stádium, ve kterém se buk nachází rovněž ovlivňuje profil VOC (volatile organic compounds – těkavé organické látky). Buk lesní a obecně dřeviny jsou schopny upravit poměry látek ve svém profilu v závislosti na stresové události (Hagiwara a kol., 2021; Pawlowski a kol., 2020). Například, je-li strom defoliován nebo napaden herbivorním organismem, dochází k utilizaci chemikálií, které varují okolní dřeviny, aby se mohly na tuto událost připravit. Zároveň dochází k indukované ochraně stromu, při které se začínají syntetizovat látky, které jsou toxické pro predátora. Řada z nich v tomto vztahu plní roli kairomonů, kterými jsou lákání predátoři/parazitě agresora, který napadl danou rostlinu.

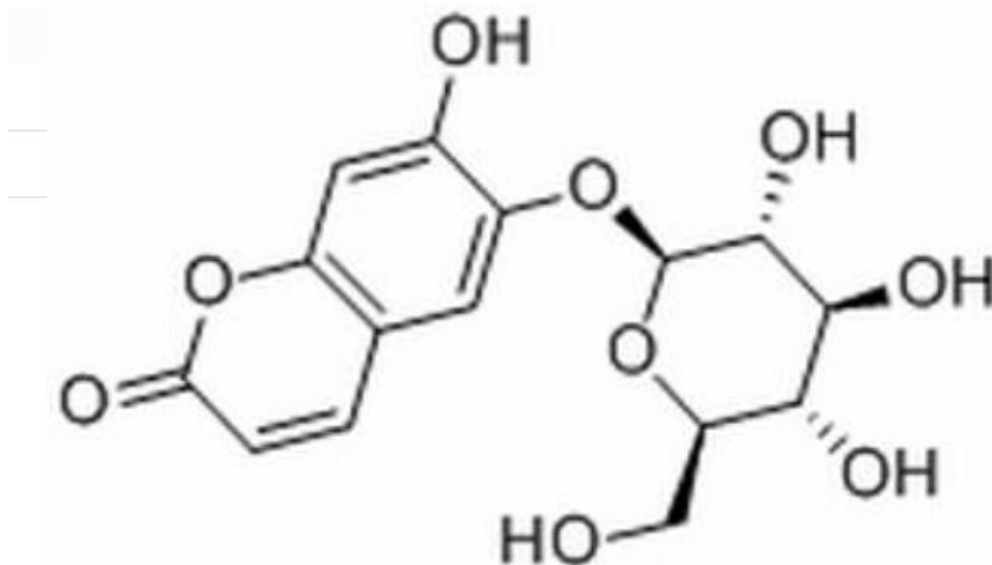
Buk lesní je poměrně bohatý na množství látek, které jsou u něj přítomny. Nejvíce jsou zastoupeny terpeny a alkoholy. V odborné literatuře se alkoholy označují jako green leaf volatiles – těkavé látky z asimilačního aparátu se zkratkou GLV. Tyto látky jsou specifické pro listnaté dřeviny, jelikož se u jehličnanů téměř nevyskytují. Zatímco u *P. abies* dominují pineny (α -pinene, β -pinene), 3-carene a limonen (Tollsten a Müller, 1996) u buku je nejvíce dominantním prvkem sabinene (Dindorf a kol., 2006; Meeningen a kol., 2016; Tolsten, 1996). Dalšími látkami, které jsou ale přítomny již o řád níže, jsou myrcene, limonene, phellandrene a p-cymene. Ve stopovém množství jsou ve směsi zastoupeny ještě α -pinene, thujene, β -pinene, α -terpinene, (E)-ocimene, (Z)-3-hexenyl-acetate, (Z)-3-hexenole, linalool, (Z)(E)-aflafarnesene a (E)(E)- α -farnesene (Gabriel a kol., 2013; Meeningen a kol., 2016; Tollsten a Müller, 1996).

3.5 Vybrané biologicky aktivní látky na tykadle *T. bicolor*

3.5.1 Bicolorin

Bicolorin je chemická látka, která slouží jako agregační feromon pro kůrovce *T. bicolor*, který láká samice i samce téhož druhu. Objeven byl v roce 1995, Franckem a kol. Celý chemický název je 2-ethyl-1,5-dimethyl-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octane. Konkrétně se jedná o enantiomer specifickou variantu (1S, 2R, 5R) (Takikawa, 1997; Astashko, 2013). Látka byla izolována z drtinek, které vznikají požerovou aktivitou brouka. Analyzována byla prostřednictvím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Francke, 1996). Bicolorin je chemickou stavbou velice podobný frontalínu, liší se pouze rozšířením o ethylovou skupinu (Francke, 1995). Prekurzorem pro jeho syntézu v laboratorních podmínkách slouží limonen (Takikawa,

1997). Francke, 1996 navíc zmiňuje další látku, která je produkována samci při tom, jak se prokousávají lýkem. Její název je acetophenon. Její potenciální atraktivita pro *T. bicolor* zatím nebyla prokázána.

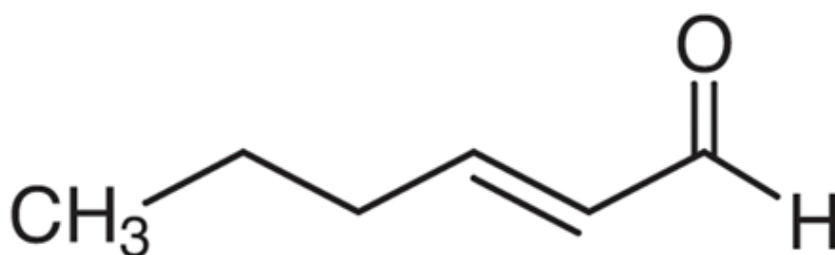


Obrázek 1. Strukturální vzorec bicolorinu ((1S, 2R, 5R)-2-ethyl-1,5-dimethyl-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octane) (ChemBK, 2023)

3.5.2 *Trans*-2-hexenal

Tato poměrně malá molekula patří do skupiny aldehydů. Její struktura je tvořena 6 uhlíkovými atomy, takže spadá do kategorie středně dlouhých uhlíkatých řetězců. Na tyto je navázán kyslík a vodík. V přirozeném prostředí se vyskytuje v mnohých druzích ovoce, plodech, a hlavně také v asimilačním aparátu rostlin (Chebi, 2022). Přirozeně látka vzniká izomerizací *cis*-3-hexenalů z asimilačního aparátu (listů), což Hatanaka a Harada (1973), dokázali při pozorování emise volatilních látek z čajovníku čínského – *Thea sinensis* (Linnaeus, 1758). Rostliny tuto látku používají ke svému prospěchu díky antibakteriálním a antifungicidním vlastnostem. To bylo demonstrováno Gardinim a kol (2001) na potlačení rozvoje aspergilózy (*Aspergillus flavus*), případně Nerim a kol. (2006) na potlačení růstu plísně (*Penicillium expansum*). Jedná se o látku spadající do kategorie uremických toxinů, které se ukládají v ledvinách živočichů, čímž mohou být nebezpečné, jedná-li se o vysoké dávky (T3DB, 2014). Hatanaka a Harada (1973), uvádí, že v surovém stavu asimilačního aparátu se této látky nachází poměrně malé množství, ale s procesem macerace, za přístupu kyslíku (po

utržení), se koncentrace výrazně zvyšuje. Rovněž poukazuje na to, že se tato chemická látka může jevit jako repelent nebo případně atraktant pro celou řadu druhů členovců. Například u hlístic – *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner a Buhner, 1934) se jedná o silný antiatraktant, který snižuje reprodukci, a dokonce vyvolává fyziologické změny v podobě sníženého růstu. Larvy tohoto druhu (převážně v druhém instaru) vykazují vysokou mortalitu při kontaktu s *trans*-2-hexenalem (Cheng a kol., 2016). Jelikož se jedná o látku z kategorie GLV (green leaf volatiles), tak spadá do kategorie repelenetů pro *I. typographus*, který snižuje atraktivitu agregačního feromonu (Zhang a kol., 1999).

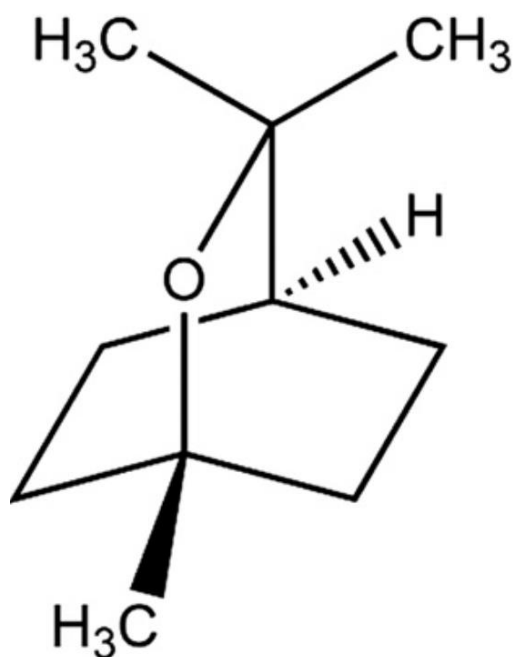


Obrázek 2. Strukturální vzorec *trans*-2-hexenal. Zdroj Tcichemicals (2024)

3.5.3 Eucalyptol

Jedná se o bezbarvou látku spadající do kategorie monoterpenických bicyklických etherů. Synonymem pro jeho název je 1,8-cineole. Tvoří podstatnou složku eukalyptových esenciálních olejů a je znám pod výraznou eukalyptovou vůní. Přirozeně se vyskytuje v široké škále rostlin i v jejich plodech (*Citrus*, *Thymus*, *Picea*, *Salvia*). Látka je vysoce hořlavá (Cameo Chemicals, 2024). Pro člověka nemá letální následky, ale může způsobit podráždění (PubChem, 2024; Chebi, 2022). V souvislosti s *I. typographus* spadá tato látka do skupiny silných repelentů (Jirošová a kol., 2022). Jeho působením je utlumena odpověď receptorů na *cis*-verbenol, jednu ze složek agregačního feromonu (Andersson, 2012). To potvrzuje i Schiebe a kol (2019), který prokázal, že se u tohoto kůrovce nacházejí čichové receptorové neurony, laděné specificky pro tuto chemickou látku. Zajímavostí je, že pokud je *P. abies* vystaven nějakému stresu, tak

dochází ke zvýšené produkci eukalyptolu (Schiebe a kol., 2019). To naznačuje, že se jedná o látku, kterou stromy používají ke své obraně. Z hlediska lidského užitku je tato chemická látka používána ve zdravotnictví. Benefitem, který přináší je převážně pomoc při chronických onemocněních, jako například: aspirační problémy, astma nebo kardiovaskulární problémy (Seol a kol., 2016; Juergens a kol., 2003).

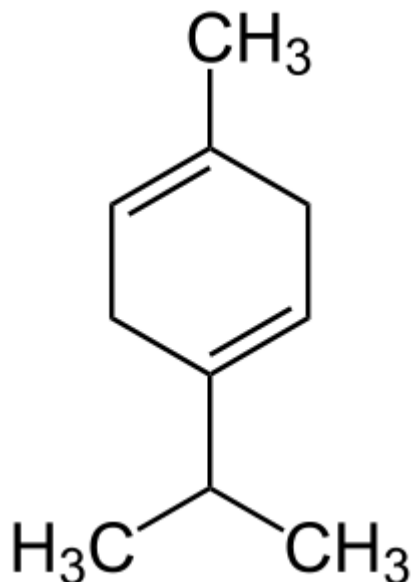


Obrázek 3. Strukturní vzorec eukalyptolu (1,8-cineolu), zdroj Naudé (2016).

3.5.4 Γ -terpinene

Γ -terpinene patří do kategorie monoterpenů a je tvořen šesti uhlíky v cyklickém řetězci. Jedná se o těkavou látku, která je emitována do ovzduší rostlinami. V majoritním zastoupení se nachází v esenciálním oleji citrusových plodů, po kterých i voní. Tato chemikálie slouží jako prekurzor pro vznik celé řady monoterpenů, jako například p-cymenu, a thymolu (Poulouse a Croteau, 1978). Jedná se o vysoce hořlavou látku, která představuje výrazné riziko i pro člověka v případě jejího požití. Významný je pro své antioxidační a protizánětlivé účinky (T3DB, 2014; Chebi, 2019). Protizánětlivé účinky této látky dokázal Ramalho a kol. (2015), který testoval tuto látku na myších a zjistil, že po podání dochází ke snížení migrace buněk do zánětlivé lokality stejně tak jako zmenšení otoku. Jeho kurativní účinky demonstroval i Baldissera a kol.

(2016), který zjistil, že použití terpenů (včetně γ -terpinenu) snižuje fatální účinky *Trypanosoma evansi* (Steel, 1855; Balbiani, 1888) a dokáže prodloužit život léčeného organismu.

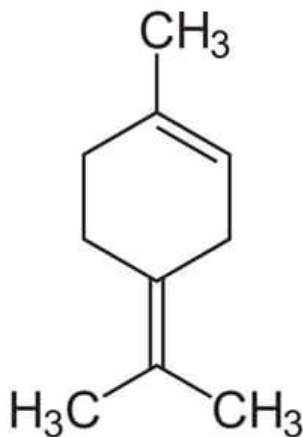


Obrázek 4. Strukturní vzorec γ -terpinenu (Wikidata, 2024)

3.5.5 Terpinolene

Jedná se o monoterpen, který je hojně zastoupen u široké řady rostlin. Převážně se nachází v esenciálních olejích jednoděložných a jehličnatých rostlin. Tato látka je vysoce vznětlivá a ve vysokých koncentracích představuje riziko jak pro člověka, tak i pro životní prostředí. Stejně jako většina terpenických látek má i tato protizánětlivé, antioxidační a terapeutické účinky. Vyznačuje se výraznou borovicovou vůní (PubChem, 2024; CameoChemicals, 2024; Chebi, 2015). V lidmi využívaném průmyslu je jeho role zajímavá v potravinářství, kde se nasazuje jako dochucovadlo (Menezes a kol., 2021). De Christo Sherer a kol (2019) poukazují na jeho významný potenciál z hlediska zdravotního průmyslu pro jeho protizánětlivé a blahodárné účinky. Aydin a kol. (2013), odhalili potenciální možnosti utilizace této látky v boji proti rakovině. Podařilo se mu odhalit, že po nasazení terpinolenu dochází k utlumení bujení

mozkového tumoru. Dále je možno tuto látku využít pro její sedativní účinky, které způsobí jeho inhalace (Ito a Ito, 2013) a pro řadu dalších zdravotních benefitů, které nabízí.



Obrázek 5. Strukturální vzorec terpinolenu (LabEffects, 2024)

3.6 Orientace kůrovců v prostředí

T. bicolor je stejně, jako v České republice velice zprofanovaný *I. typographus*, polygammí druh. To znamená, že lokalizace hostitelského jedince přísluší samečkům, kteří agregují další brouky téhož druhu (Zahradník a Knížek, 2007; Kalinová a kol., 2014). Jelikož je ale lesní ekosystém komplexní celek, je zde řada překážek, které mu tuto činnost komplikují. U kůrovců obecně je hlavním orientačním smyslem čich, na jehož základě se orientují (Xiao-Ling a kol., 2006). Pro tento vjem mají celou řadu specifických adaptačních opatření. Představu o prostředí moduluje především těkavé látky. Ty se z hlediska behaviorálních vlastností (z hlediska účinku na rozhodování kůrovce) dle Anderssona (2011) rozděluje následovně: látky, které do procesu rozhodování nevstupují označujeme jako neutrální. Ty, které zvyšují afinitu brouka k určitému konání, nazýváme atraktanty, které svým působením vzbuzují potřebu u jedince, aby se vydal směrem k místu emise. Z hlediska kůrovcové dynamiky jsou důležitými zdroji těchto signálů hostitelské stromy, jednotliví kůrovci, případně bakterie, které s nimi žijí v těsné symbióze. Poslední skupinou jsou repelenty. Ty mohou mít účinek vyloženě odpuzující nebo pouze inhibiční, při kterém dochází k potlačení percepce jinak lákajících látek. U *I. typographus* může tento vztah být popsán například snížením atraktivity agregačního feromonu v případě výskytu

GLV, 1,8-cineole nebo *trans*-4-thujanole (Jirošová a kol., 2022). V případě *T. bicolor* můžeme za atraktanty označit terpeny a alkoholy emitované *F. sylvatica*. Repelenty potom jsou látky ostatních nehostitelských rostlin. Kombinace těchto chemických molekul v terénních podmínkách následně podmíní jeho rozhodnutí. Volbu, zdali se brouk vydá vstříc emitentovi signálů a případně se pokusit o jeho kolonizaci. Na jeho výběru závisí jeho život i přežití celé populace, která se nachází v příslušném místě. Částečně se orientují také pomocí zraku, na jehož základě jsou schopni rozlišit habitus porostu, případně konkrétního hostitele (Byers, 1996) a chuti. U lýkožrouta smrkového byly definovány 2 základní teorie, na jejichž základě probíhá výběr cílového hostitele (Andersson, 2011). 1. teorie pojednává o tom, že se brouk orientuje v prostředí čistě náhodně a hostitele si vybírá metodou pokus – omyl. Dosedne na kůru, vyhloubí snubní komůrku, a pakliže přežije, naláká ostatní jedince a vyvedou novou generaci. 2. teorie, která si v současné době získává větší náklonnost, hovoří o orientaci na základě čichových signálů, viz princip uvedený výše v této kapitole. Možná je i kombinace obou uvedených způsobů. Tento fenomén popisuje Bayers (1995), nebo Saint – germain a kol. (2007).

3.7 Chemická komunikace u kůrovců

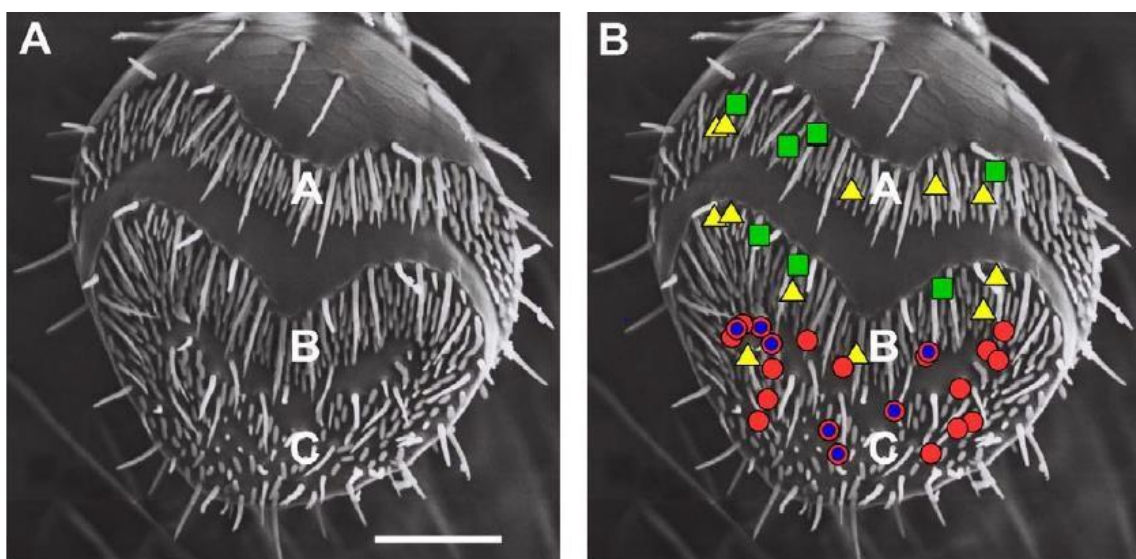
Orgánem, který slouží k prvotnímu příjmu signálu, je tykadlo. To se skládá ze scapu, článku, který je uložený v tykadlové jamce (antennal lobe). Na něj je navázaný pedicelus a následně další články (flagela) zakončeny tykadlovou paličkou (antennal club) (Hulcr a kol., 2015). Právě tykadlová palička je u kůrovců dominantním nositelem senzil, které jsou zodpovědné za příjem okolních podnětů. U některých druhů hmyzu se senzily vyskytují v dominantním zastoupení na palpách, tarzách (Xia Shi a kol., 2021) a v malém množství na zbytku celého těla. Tykadlo je považováno za multimodální orgán. To znamená, že se na něm vyskytují senzily s různým funkčním zaměřením. Nachází se zde senzily zaměřené na chuťové podněty. Do této kategorie patří například senzila chaetica (Nowińska a Brožek, 2017; Xia Shi a kol., 2021). Dále jsou zde receptory pro mechanické podráždění a receptory reagující na oxid uhličitý (CO₂) (Andersson a kol., 2013). Z hlediska chemické komunikace jsou nejdůležitější čichové. Ty totiž přijímají chemické signály, čímž jsou zodpovědné za orientaci v prostoru. Jejich anatomická stavba je diversifikovaná. Mezi základní struktury řadíme sensilu basiconicu, trichodeu a coleonicu (Chao Ma a kol., 2022). Chuťové a čichové senzily se liší stavbou. Zatímco chuťové senzily mají jeden otvor na špičce, skrz kterou přijímají látky z okolního prostředí, čichové mají

perforovanou kutikulární vrstvu po celém povrchu, kterou se chemické molekuly mohou dostat do vnitřního prostředí (Menco a kol., 1982). Disperze senzil není náhodná. Na dorsální straně se nachází v dominantním zastoupení ty, které reagují na mechanické podráždění a na opačné (ventrální straně) jsou marginálně zastoupeny senzily čichové. Čichové senzily jsou na tykadlové paličce uspořádány systematicky v závislosti na druhu kůrovce. Jelikož se většina studií zaměřovala na *I. typographus*, bude princip demonstrován právě na něm. Z optického hlediska si lze na tykadlové paličce povšimnout opticky patrné dvojvlňky (Andersson, 2011). Ta je právě tvořena senzilami, které jsou shlukovány na základě toho, na které látky reagují. Nachází se zde 3 základní oblasti, které reagují na feromony a rostlinné vůně (tato je ještě rozdělena na 2 podoblasti – hostitelské a nehostitelské signály). (viz obrázek 6).

Senzila je biologický útvar nitkovitého tvaru, ve kterém se nachází čichový receptorový neuron (ORN z anglického olfactory receptor neuron). V jednotlivých senzilách se nachází určitý počet těchto neuronů. Nejčastěji se jedná o 2-3 čichové receptorové neurony (Andersson a kol., 2009). Některé konformace těchto neuronů slouží k efektivní odezvě na odpověď. U lýkožrouta smrkového to bylo například zjištěno u senzil, ve kterých se nacházely neurony reagující na *cis-verbenol* (komponenta agregačního feromonu) a 1-8 cineol (antiatraktant), který snižoval účinnost agregačního feromonu) (Andersson a kol., 2012). Funkční zaměření jednotlivých neuronů zatím není kompletně probádáno a je určeno přibližně 70 % z nich (Andersson a kol., 2009; Andersson, 2011). Dominantně zastoupeny jsou ty, které jsou odpovědné za příjem složek agregačního feromonu. Zajímavostí ale je, že 22 neuronů reaguje na *cis-verbenol*, zatímco pouze 3 na 2-methyl-3-buten-2-ol (Andersson a kol., 2009). Přibližně 35 % neuronů reaguje na hostitelské látky, které jsou pro kůrovce existencionálně důležité, protože slouží k lokalizaci hostitele. Tyto jsou převážně odpovědné za příjem látek terpenického původu. U *I. typographus* jde převážně o α -pinen. Zbylé neurony (v počtu přibližně 22 %) reagují na látky nehostitelského původu. Neurony se v obecné rovině rozdělují na generalisty a specialisty (Hallem a kol., 2006). Neurony s úzkou specializací je možné aktivovat pouze pár specifickými látkami, zatímco široce zaměřené reagují na větší spektrum infochemikálií. U kůrovců jsou v marginální míře zastoupeny právě ty specificky zaměřené.

Funkční princip senzily spočívá v perforaci kutikulární stěny, skrz kterou mohou z okolního prostředí prostupovat chemické látky do intracelulárního prostředí. Zde se nachází tělo neuronu s dendrity a axon (Andersson, 2011). Povrch dendritu je pokryt velkým množstvím receptorů, na které se mohou vázat chemické látky (ligand-binded). Receptory jsou struktury bílkovinného původu. Poté, co se na ně naváže molekula konkrétní vůně, pro kterou jsou naladěny, dojde k otevření iontového kanálu. Jelikož je poměr iontů v intracelulárním a

extracelulárním prostředí rozdílný, dojde k jejich výměně skrz buněčnou stěnu, která je tvořena fosfolipidovou dvouvrstvou. To zapříčiní, že se chemický signál začne převádět na elektrický (tento jev se označuje jako transdukce). V této fázi je generován receptorový potenciál (Andersson, 2009). Ten je různě veliký v závislosti na tom, kolik receptorů je zprůchodněných kvůli navázaným ligandům. Pokud je signál dostatečně veliký a naakumuluje se dostatečně veliká suma receptorových potenciálů, dojde k podráždění čichového receptorového neuronu (Andersson a kol., 2013) prostřednictvím synapse. V této fázi dochází ke generování akčního potenciálu. Pakliže je dosaženo prahové hodnoty pro jeho přenos, dochází k odeslání signálu přes axonu (Andersson, 2011; Mentem 2015, citováno dne 29.3.2024). Jeho tělo je tvořeno myelinovou vrstvou, ve které se nachází série Schwanových buněk. Jejich význam spočívá v tom, že elektrický signál nemusí procházet skrz buňky, takže nedochází ke ztrátě energie, což v systému šetří spotřebu adenosintrifosfátu (ATP) (Wikipedia, 2022). Na konci axonu se nachází čichový lalok (antennal lobe) (Andersson, 2011). V tomto centru je integrován signál ze všech čichových receptorových neuronů do jednotlivých glomerulů, redukuje se zde šum a zvyšují se malé odpovědi na hranici prahových hodnot. Opět dochází k hromadění odpovědí, a když je dosažena saturační hodnota, dojde k podráždění synapse mediátorem a dalšímu přenosu informace. Odtud putuje do houbového tělíska (mushroom body). Zde se nachází Kenyonovy buňky, které integrují signály z různých smyslových center (Suenami a kol., 2018). Následuje opětovný přenos informace po neuronálních drahách do centra nejvyšší instance. Tou je postranní roh (laterar horn). V něm dochází k finálnímu složení podnětů ze smyslových center a přenosu informace do motorických center (Carrasco a kol., 2015). To má za následek vykonání určité činnosti v reakci na podnět.



Obrázek 6. Detailní snímek z elektronového mikroskopu tykadlové paličky *I. typographus*. Jedná se o svrchní stranu, která je poseta chemosensory, které jsou rozdělené do následovných oblastí. Část A je funkčně zaměřená na nehostitelské látky (zelené čtverečky). Část B je odpovědná za příjem hostitelských látek (žluté trojúhelníky). Lokalita C je specializovaná na feromony (červená kolečka). Modrá kolečka, která se nacházejí uvnitř červených, jsou odpovědná za příjem 1,8-cineolu a je na tomto demonstrována kolokalizace senzil, což způsobuje efektivní modifikaci celkové behaviorální odpovědi na podnět. Obrázek převzat z publikace Andersson a kol., 2009.

3.8 Standardní schéma chemické ekologie

3.8.1 Pozorování chování zkoumaného jedince

Jako prvním krokem v chemické ekologii je zjištění, jak zkoumaný organismus interaguje s látkami v prostředí. Pro tyto pokusy se nejčastěji používá metoda polních pokusů, při kterých dochází ke sběru empirických dat. V případě lesních ekosystémů tato praktika spočívá v pozorování organismů v interakci s rostlinným materiálem. Ten do ovzduší emituje volatilní látky, které modifikují jeho chování a vyvolávají buď repelentní, nebo pozitivní odpověď. Pakliže je odhalen nějaký trend pouhým pozorováním, je možné pokračovat v biochemické eseji.

3.8.2 Extrakce látek

Pokud je zjištěno, že rostlinné části ovlivňují chování živočichů, je potřeba identifikovat látky/směsi látek, které se v materiálu nacházejí. Proces určení látek v základním pojetí obsahuje 2 kroky. Nejdříve je potřeba provést jejich jímání. To se provádí statickými nebo dynamickými metodami. Mezi ty statické (neprobíhá aktivní výměna plynu) řadíme například statický headspace, metodu extrakce pevné složky (SPME – solid phase method extraction) (Hennion a kol., 1999; Bruno a Ettre 2006). Metodou s aktivním prouděním vzduchu je metoda dynamického headspace (Werkhoff a kol., 1987). Princip spočívá v navázání těkavých látek na sorbent, ze kterého je následně možná jejich eluce prostřednictvím rozpouštědla. Sorbenty se nejčastěji využívají z aktivního uhlí, Tenaxu nebo PorapakuQ. Výhodou metody headspace je především uložení rozpuštěné látky v rozpouštědle, tudíž ji lze využít pro opakované měření.

Při metodě SPME lze látku testovat pouze jednou. Podle Kanavourase (2005), je také metoda dynamického headspace vhodná pro zachycení většího množství chemických prvků než statické metody. Podmíněno to je však delší dobou měření. Metoda statického headspace se v současné době používá méně, jelikož je v porovnání s ostatními ze zmíněných méně přesná (Jeleň a kol., 2017). Podle studie Kresmera a kol. (2016) je důležitým faktorem volba sorbentu, který je použit pro jímání látek.

3.8.3 Identifikace látek

Druhým krokem je samotné určení látek. K tomuto se nejčastěji využívá chromatografie. Dříve byla hojně využívána metoda papírové chromatografie. Při této se využívá celulózový papír, na kterém dochází k separaci látek postupným průchodem rozpouštědla (MzCr, Vávrová, 2024). V současné době se nejčastěji používá chromatografie kapalinová (GL) nebo chromatografie plynová (GC). Ve standardním pojetí je chromatografická technologie schopna dosáhnout vysoké teploty. Uvnitř se nachází kolona, kterou putují látky, které je potřeba separovat. Vnitřní povrch kolony je zhotoven ze stacionární fáze, která interaguje s látkami, které kolonou procházejí. To zajišťuje jejich rozdělení, protože každá látka s povrchem kolony reaguje jinak. Druhou složkou je dynamická fáze. Tu zajišťuje nosný plyn nebo kapalina. Nejčastěji helium, vodík nebo dusík v případě plynové chromatografie, kapalina nebo eluent v případě kapalně chromatografie. První součástka, se kterou směs látek přichází do styku, je inlet. Tam látky mohou být dopraveny ručním nástřikem nebo automatickým injektorem. Zajišťuje nám tedy přesné množství nanášeného vzorku v opakovatelných krocích. (Schimadzu, 2024) Samotná chromatografie ale zajišťuje pouze separaci látek. Jejich identifikace se provádí na základě různých metod. Nejzákladnější je metoda plamenné ionizační detekce (FID – flame ionization detection) (Wikipedia, 2012). Zde je kolektorem detekována energie, kterou látka vyzáří po průchodu ionizačním plamenem (plyny, které zde hoří jsou: vodík, dusík a kyslík). Finální určení látky se počítá na základě retenčních indexů. To je čas, ve kterém látka prochází plamenem vůči známým sloučeninám směsi n-alkanů. V případě snahy o zjištění biologické aktivity látky na zkoumaný živý organismus je využívána metoda elektroantenografické detekce (EAG) (Cork a kol., 1990). Kolona v plynovém chromatografu je v případě této metody rozdělena součástkou zvanou splitter (tvar písmene Y). Polovina směsi procházející kolonou putuje na biologický detektor (tykadlo v EAG) a druhá část na analytický detektor. Další využívanou metodou pro detekci látek je hmotnostní spektrometrie (Broad institute, 2024). Zde

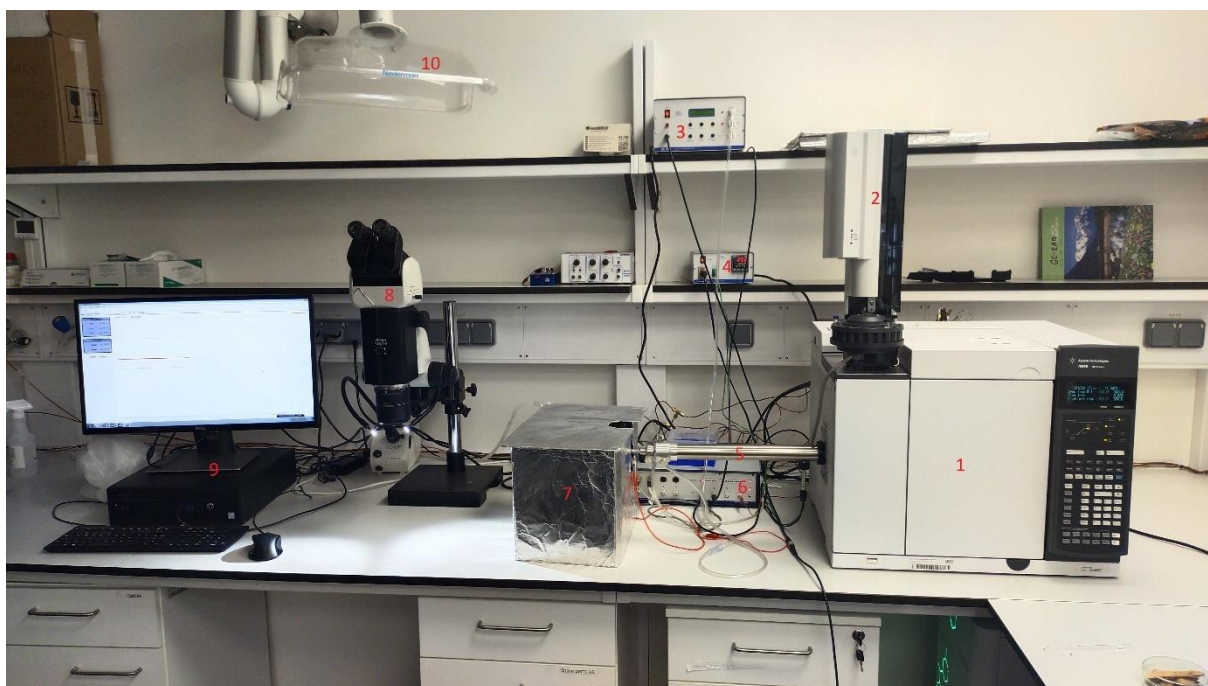
dochází k procesu ionizace látek elektronovým paprskem. Ten způsobí nabití každého iontu určitým nábojem. Ty dostanou energii z iontového akcelérátoru a pohybují se po konkrétní dráze. Když se dostanou do blízkosti magnetického pole, dojde k změně jejich trajektorie na základě poměru jejich hmotnosti a náboje a dopadají na detektor. A jelikož mají látky tendenci konzistentního štěpení v konkrétních vazbách, je následně možné prostřednictvím světové databáze látek (NIST) jejich identifikace na základě relativní abundance m/z frakcí. Hlavními komponenty tedy jsou: zdroj ionizačního paprsku, analyzátor hmotnostních spekter a detekční zařízení pro ionty.

3.8.4 Testování biologické aktivity látek na tykadlech

K ověření biologické aktivity slouží přístroj s názvem elektroantenograf (EAG) (viz. obrázek 28). Tato součástka slouží k měření změny elektrického napětí mezi špičkou a bází tykadla (Syntech, 2004). Tento vztah vychází z Ohmova zákona. Metoda je využívána již od roku 1957 v pokusech Schneidera, který ji ve svých pokusech poprvé realizoval při testování hmyzu (Roelofs a Brožek, 1984). Elektroantenograf se skládá z měřicí elektrody, referenční elektrody (elektrody jsou nejčastěji reprezentovány stříbrným drátkem), zesilovačů a tykadla. Pro měření je důležitý poměr odporu na tykadle a odporu na zesilovači. Aby bylo možné získat reprezentovatelnou odpověď, je nutné, aby odpor na tykadle byl nižší (Syntech, 2004). Samotný záznam z přístroje pak reprezentuje sumu receptorových potenciálů. Ta se generuje v místě, kde dochází k interakci zkoumané látky s čichovými receptorovými neurony. Signál následně vstupuje do převodníku, kde je případně integrován s dalšími součástkami (například s výstupem z plynového chromatografu párovaného s plamennou ionizační detekcí) a odtud putuje v digitální podobě do počítačové jednotky. Jelikož je elektroantenograf extrémně senzitivní součástkou, je využíváno odstínění okolního elektromagnetického ruchu Faradayovou klecí (Faraday, 1836). Výstup z elektroantenografu se označuje jako elektroantennogram a ve standardní konstelaci je na něm vyobrazena změna receptorového potenciálu (amplituda) v milivoltech. Ta nám dává informaci o percepci zkoumané látky živočichem, na kterém je měření realizováno.

Druhou metodou je elektrosensilogram, který se získává z single sensillum recorderu (SSR) (Pellegrino a kol., 2010). Přístroj svou funkční podstatou odpovídá soustavě elektroantenografu. Jedná se ale o více citlivé a mikroskopicky náročné zařízení. Rovněž se pro měření používají elektrody. Tyto jsou většinou realizovány wolframovým drátkem, který je broušen roztokem fosforečnanu draselného na průměry v řádech jednotek mikronů (Shannon a

kol., 2013). Důvodem je vyžadovaná preciznost a ostrost elektrody. Ta se totiž zavádí přímo do báze jednotlivých senzil se snahou o zapojení jednotlivého nervového čichového receptoru. Při této metodě je získáván generovaný potenciál v jednom nervovém čichovém receptoru. Nedochází tedy ke snímání sumy receptorových potenciálů generovaných podrážděním více čichových receptorových neuronů jako u elektroantenografické metody. Tímto měřením je tedy možné definovat funkční zaměření jednotlivých senzil na tykadle.



Obrázek 7. Plynové chromatografie s elektroantenografickým měřícím přístrojem. 1 = plynový chromatograf; 2 = automatický sampler pro nástřik látky; 3 = generátor vzduchových pulsů; 4 = ohřívač trubky ustící z plynového chromatografu; 5 = potrubí vycházející z plynového chromatografu, které unáší chemické látky; 6 = analogické zařízení IDAC4, které integruje signály z GC a EAD; 7 = Faradayova klec, ve které se nachází elektroantenograf; 8 = mikroskop; 9 = počítačová jednotka; 10 = polohovatelná digestoř

3.8.5 Behaviorální pokusy

Poté, co je látka izolována, z chemického hlediska determinována a její biologická aktivita na tykadle identifikována, je nutné zjistit vliv látky na organismus. Tyto observace je možné provádět buď v laboratorních podmínkách, nebo při polních pokusech. Ve sterilních prostorech

se nejčastěji používá olfaktometrie. Ta u hmyzu spočívá ve využití skleněné trubky ve tvaru Y (Das a kol. 2021). Na bázi trubky se umístí zkoumaný organismus, do jednoho z ramen identifikovaná látka, u které je potřeba potvrdit její vliv na odpověď a druhé rameno je využíváno jako kontrola. Rameny je do systému veden vzduch, který proudí směrem k bázi. Hmyz se orientuje proti větru a tímto jsou simulovány přirozené podmínky. Alternativou k této metodě, pro hmyz s vysokou letovou aktivitou, je větrný tunel (Peters a Abraham, 2009). Ten funguje na podobném principu, kdy je pozorováno, jestli se zkoumaný živočich pohybuje směrem ke zdroji, nebo ne. Pro hmyz s omezenou možností letu (například mravenci) jsou využívány trasovací pokusy (Heyman a Vilc, 2019). Zde je na papír nanášena látka a je pozorováno, jestli se organismus drží na dráze nebo má tendenci signály ignorovat. Druhým odvětvím v tomto segmentu jsou polní pokusy (Rudinsky a Feinreman, 2012). V laboratoři otestované látky se nasadí v přirozeném prostředí, kde se zkoumaný organismus vyskytuje. To je možné realizovat prostřednictvím navnaděných lapačů. Abundance při odchycích se následně porovnává s kontrolními prázdnými lapači. Do terénních observací, z důvodu komplexnosti venkovních ekosystémů, vstupuje celá řada proměnných, které do laboratorních měření nezasahují, a tudíž se výsledky ne vždy shodují.

3.8.6 Genetická měření

Finálním krokem chemicko-biologicko-ekologického měření jsou genetické analýzy. Jelikož jsou známy z předchozích kroků chemické látky a jejich vliv na organismus, tak lze identifikovat části zkoumaného živočicha zodpovědné za jejich percepci, případně expresi. Ty lze analyzovat metodou genetické sekvenace genomu a zkoumaný organismus ovlivnit na genetické úrovni. Potenciální využití například u *I. typographus*, jehož genom byl publikován Powellem a kol. (2021); Anderssonem a kol., 2013. Jelikož byl odhalen jeden z komponentů agregačního feromonu *cis-verbenol* (ten vzniká de novo prostřednictvím metabolických drah u kůrovce s využitím prekurzoru α -pinenu), tak je možné vytipovat tu část genomu, která je odpovědná za jeho tvorbu (Ramakrishnan a kol., 2022). To umožní potenciální vypnutí tohoto cyklu a lýkožrout smrkový by ztratil schopnost agregace, což je jeden z hlavních mechanismů, díky kterému je úspěšným kolonizátorem nových hostitelů. Opačně by potenciálně mohlo být možné zasáhnout do části genomu kůrovce, který je odpovědný za tvorbu čichových receptorových neuronů, které jsou odpovědné za vnímání konkrétní látky. Tyto studie ohledně lýkožrouta smrkového teprve probíhají, takže se jedná pouze o teoretické přesahy této části chemické ekologie.

3.8.7 Praktické využití

V prvním stupni této vědní disciplíny došlo k odhalení nějaké závislosti/interakci mezi dvěma organismy (například defoliátor x dřevina). Ve druhé fázi jsou extrahovány hostitelské látky, které u živočišného organismu vyvolávají nějakou behaviorálně podmíněnou akci. Ve 3. stupni jsou z celkového profilu látek vytipovány ty, které u lákaného živočicha vyvolávají odezvu. Konkrétní látky jsou následně testovány, jak na zvíře působí (repellent/atraktant).

Když dojde k odhalení všech výše zmíněných závislostí, tak je možné látku nasadit v terénu. Standardně se vyrábí odparníky látek, které se používají v monitoringu abundance populace zájmového druhu. Toho se využívá například v interakcích: *T. bicolor* a bicolorin (Takikawa a kol., 1997) nebo *I. typographus* a *cis-verbenol*, 2-methyl-3-buten-2-ol (Schlyter a kol., 1987). V některých případech nemusí být použit odparník se synteticky vyrobenými látkami, ale může se použít přímo emitent. Tohoto vztahu se využívá například při vábení sameček bekyně mnišky (*Lymantria dispar*) (L.) živou samicí (Elkinton a kol., 1984), která se umísťuje na lepkových pásech. Efektivní metodou pro velice agilní druhy hmyzu je metoda mating disruption (Cardé a Minks, 1995). Cílem je zapříčinit zmatení jedno z pohlaví, které nedokáže najít partnera, a tudíž se nemůže reprodukovat. Toho se docílí zvýšením chemické heterogenity stanoviště. Například aplikací velkého množství odparníků s feromonem (disparluru pro bekyni velkohlavou (*Lymantria dispar* (L.)) (Skinner, 2018) po porostu, což způsobí, že sameček nedokáže lokalizovat samičky připravené k páření. Další možností využití může být zlepšení účinnosti feromonů v případě užití látky zvyšující jejich atraktivitu. U *I. typographus* agregační feromon v kombinaci s hostitelem emitovanými terpeny (pineny). Další variantou je použití rostlinné látky s cílem potlačit atraktivitu stanoviště nebo s účelem snížení atraktivity samotného feromonu. U *I. typographus* například inhibiční účinek 1,8-cineolu a *trans*-4-thujanolu na *cis-verbenol* a 2-methyl-3-buten-2-ol (Jirošová a kol., 2022). Kombinace atraktivních a repelentních látek lze využít u metody push-pull. Tato metoda se úspěšně využívá na snížení negativních dopadů mouchy tse-tse (*Glossina*) (Robineau-Desvoidy, 1830). Látky produkované antilopou *Kobus defassa* (Rüppell, 1835) (Bett a kol., 2015) jsou využívány jako repelenty, jelikož tse-tse v přirozeném prostředí odpuzují. Bůvolí vůně je pro ni naopak velice lákavou (Owaga, 1985), takže se extrakt z bůvola nasazuje s cílem mouchu nalákat na místo, kde dojde k její eradikaci.

4 Metodika

4.1 Brouci *T. bicolor*

Pro elektroantenografické experimenty byli použiti brouci z různých zdrojů. Nejdříve byli využiti brouci z lapačů značky Ecotrap. Do tohoto zařízení byl umístěn feromon – bicolorin (AlphaScents, Inc.), který láká *T. bicolor*. Ti poté, co narazí do konstrukce lapače, padají do plastové uzavíratelné nádoby, ve které byli převezeni do laboratoří na České zemědělské univerzitě a uchováni za teploty přibližně 4 °C. Sběr v terénu probíhal v období od července do září roku 2023. Druhou alternativou, odkud brouci pocházeli, byly klimatizované místnosti v prostorech ČZU. Zde byly založeny 2 chovy. Kůrovci byli v počtu přibližně 40 živých jedinců nasypáni na polena *F. sylvatica* v září roku 2023. Boxy byly větrané a se zajištěnou cirkulací vzduchu (24 °C; při relativní vlhkosti 45-60 %). Po přibližně 2 měsících byli brouci vyloupani prostřednictvím nože a z kůry extrahováni pinzetou. Jelikož nebyly boxy rosené vodou, extrakce kůrovců probíhala obtížně a z této metody byly získány pouze nízké desítky vitálních jedinců. Z důvodu nedostatečného množství brouků na pokrytí kompletního elektroantenografického měření byli brouci ještě sbíráni v terénu v době prosinec až únor 2023/2024. Tato metoda byla umožněna díky způsobu jejich života, jelikož část populace dospělých jedinců přezimuje v lýku buku lesního. Lýko bylo v pásech odlupováno dlátem. Pásky byly rozlámány a jelikož mají tendenci praskat v místě matečních chodbiček, tak mohli být kůrovci odebráni pinzetou. Brouci byli následně uskladněni v plastových dózách, do kterých bylo přidáno trochu lýka a kůry pro zajištění ideální vlhkosti a skladovacích podmínek (zároveň tím dojde k prodloužení jejich životaschopnosti). Lýkožrouti byli ponecháni 2 hodiny při pokojové teplotě, aby se do organického materiálu mohli zavrtat. V takovémto stavu byli přemístěni opět do lednice, kde se teplota pohybovala kolem 4 °C. Sběr brouků v terénu probíhal nedaleko obce Jevany na souřadnicích 49.9633539N, 14.8018417E.

4.2 Jímání látek

Těkavé látky byly jímány z *F. sylvatica*. Snahou bylo reflektovat kompletní spektrum, takže pro analýzu byl využit asimilační aparát, nehroubí do průměru 7 cm a hroubí v podobě menších polen. Tento materiál byl nasbíráán na stejné lokalitě, jako probíhal sběr brouků. Souřadnice 49.9633539N, 14.8018417E. Před extrahováním látek byl pokrácen na menší části. K samotnému jímání volatilních látek byla využita metoda dynamického headspace (viz.

obrázek 29). Rostlinný materiál byl zabalen do pečicí fólie (Tescoma, Delícia), která byla utěsněna lepící páskou, aby uvnitř vzniklo hermeticky uzavřené prostředí. Pečicí fólie byla zvolena s ohledem na téměř nulové množství uvolňovaných látek, které by mohly zkreslit měření. Do fólie byly nacvaknuty teflonové objímky, kterými následně byla prostrčena kapilární trubička o rozměrech (délka 75 mm, průměr 0.5 mm). V této trubičce se nachází sorbent (PorapaQ), který je schopen navázat těkavé látky. Na kapilární trubičky byly nasazeny gumové hadičky, na jejichž konci se nacházely pumpičky vzduchu (Pocket pump SKC) o průtoku 125-150 ml/min (průtoky pumpiček byly ověřeny kalibračním měření a byl u nich zjištěn rozptyl v průtoku). Na jedné straně fólie bylo nasazeno 5 pumpiček, které nasávaly vzduch z vnitřní strany fólie. Na opačné straně fólie bylo nasazeno 7 pumpiček, kterými proudil vzduch, který je přes sorbent filtrovaný, dovnitř fólie. Zadní sada sloužila jako kontrolní a po analýze látek z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí je jimi korektován headspace látek buku. Od výstupu z plynového chromatografu pumpovaného vzduchu z vnitřní strany pečicí fólie se odečetl výstup z plynového chromatografu z kontrolních filtrů. Dával nám tedy informaci o znečištění z prostředí, ve kterém se jímání provádí. Extrakce látek probíhala po dobu 24 hodin. Po této době byly kapiláry se sorbentem z teflonových objímek vytaženy. Následně proběhla eluce prostřednictvím rozpouštědla (hexanu) do skleněných vialek (Agilent technologies, 2ml). Při tomto procesu docházelo k získání vzorku s těkavými látkami, který bylo možné nastříknout do plynového chromatografu. Výhodou dynamického headspace je, že lze směs látek analyzovat opakovaně (na rozdíl například od metody extrakce na solidní fázi). Po prvním měření profilu těkavých látek na plynovém chromatografu s plamennou ionizační detekcí došlo ke zjištění, že se látky ve vzorku nacházely v nízkých koncentracích (předpokladem bylo, že by se mohly nacházet pod prahovými hodnotami pro *T. bicolor*). Z tohoto důvodu byla ještě provedena redukce směsi na ¼ původního objemu. Zvolenou metodou bylo odpařování, kdy se vialka odvíčkovala a při pokojové teplotě 22 °C a vlhkosti 27 % nechala redukovat. Před samotným procesem byla směs látek převedena do insertu (250 µl) z důvodu dostupnosti pro automatický injektor plynového chromatografu. Tento proces trval 6 hodin. Kapalná složka byla zredukována ze 400 µl na 100 µl. Rozpouštědlo je více těkavé v porovnání s volatilními látkami z buku, tudíž se odpařovalo rychleji. Takto zhotovená směs byla uskladněna v mrazícím zařízení při teplotě -20 °C.

4.3 Příprava měřicí aparatury EAG

Před samotným měřením na elektroantenografické aparatuře bylo potřeba zhotovit elektrody. Ty byly realizovány skleněnými kapilárními trubičkami (msystems catalog 603 000, délka 86 mm, průměr 1,5 mm). Na vertikálním roztahovači značky Narishige byla za působení teploty 65 °C vytvarována špička na každé z elektrod. Špička se odlomila lehkým tlakem kolmo na podložku, aby byla elektroda oboustranně průchodná pro kapalinu. Do takto připravené trubičky byl zaveden Ringerův roztok (NaCl 12,2 g/l, KCl 0,21 g/l, CaCl₂ 0,2 g/l rozpuštěno v destilované vodě) injekční stříkačkou. Takto zhotovené elektrody byly nasazeny na stříbrný drátek měřicí i referenční strany elektroantenografu. Díky Ringerově roztoku bylo následně možné snazší navázání kontaktu s tykadlem měřeného brouka. Pro samotnou analýzu bylo nutné zapnout přívod vlhčeného vzduchu (2 l/min), který unášel zkoumané látky na tykadlo, generátor vzduchových pulsů CS-55 značky Syntech. Převodní zařízení Idac-4, značky Syntech, které sloužilo jako integrační zařízení pro výstupy z EAG a plynového chromatografu a zahřívací zařízení Syntech, které ohřívalo kovovou trubku ústící z plynového chromatografu, kterou byly unášeny těkavé látky.

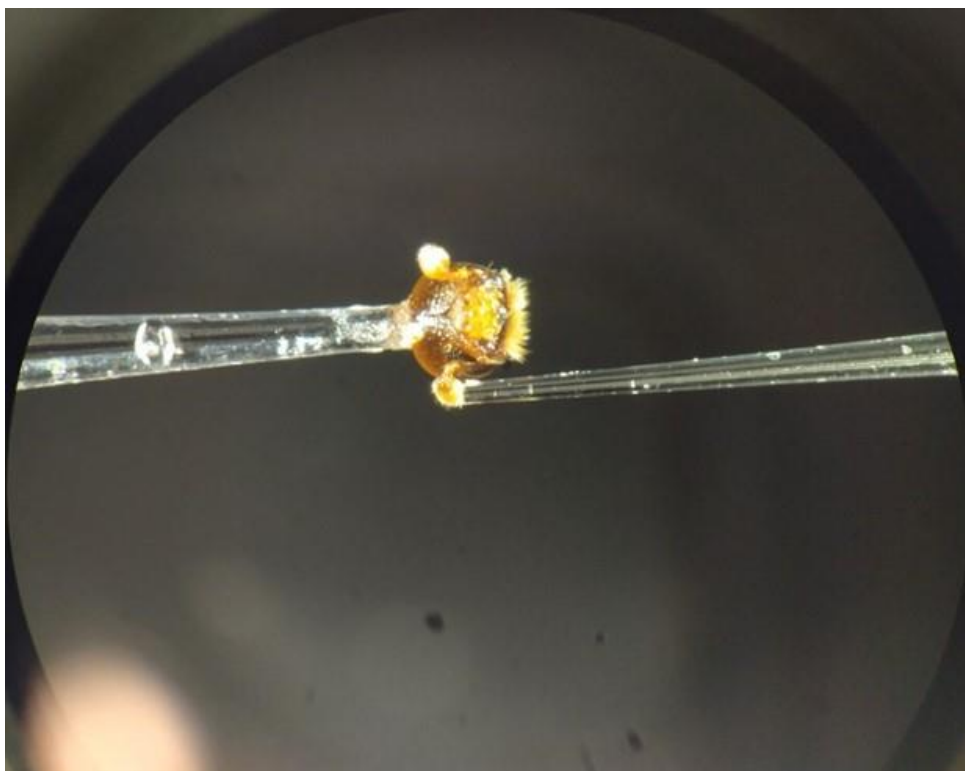
4.4 Příprava plynového chromatografu

Před samotným měřením bylo nutné provést kontrolní měření, pro které byl využit hexan. Toto měření nám umožnilo vypálit z chromatografu případné nečistoty a v počítačovém software jsme se mohli ujistit, že je přístroj čistý a správně nakalibrovaný. Na plynový chromatograf byl připojen automatický sampler, který umožňuje standardizované nastříkování látek v přesném množství (v námi nastaveném programu 1 µl). Dále byly do automatického vstřikovače umístěny 2 vialky pro čištění injektoru (zde byla látka rozpuštěna v hexanu -> tudíž se jako čisticí látka používal čistý hexan) a 1 vialka odpadní, kam byla vypouštěna tekutina, ve které se jehla injektoru čistila. Před použitím plynového chromatografu bylo potřeba otevřít přívody plynného dusíku a helia (Messer Technogas), které sloužily jako nosná fáze uvnitř kolony. Detekční část měření byla realizována prostřednictvím plamenného ionizačního detektoru (FID), pro který bylo zapotřebí zapnout generátor vodíku (Peak scientific). Ten sloužil jako zdroj energie pro hoření v detektoru.

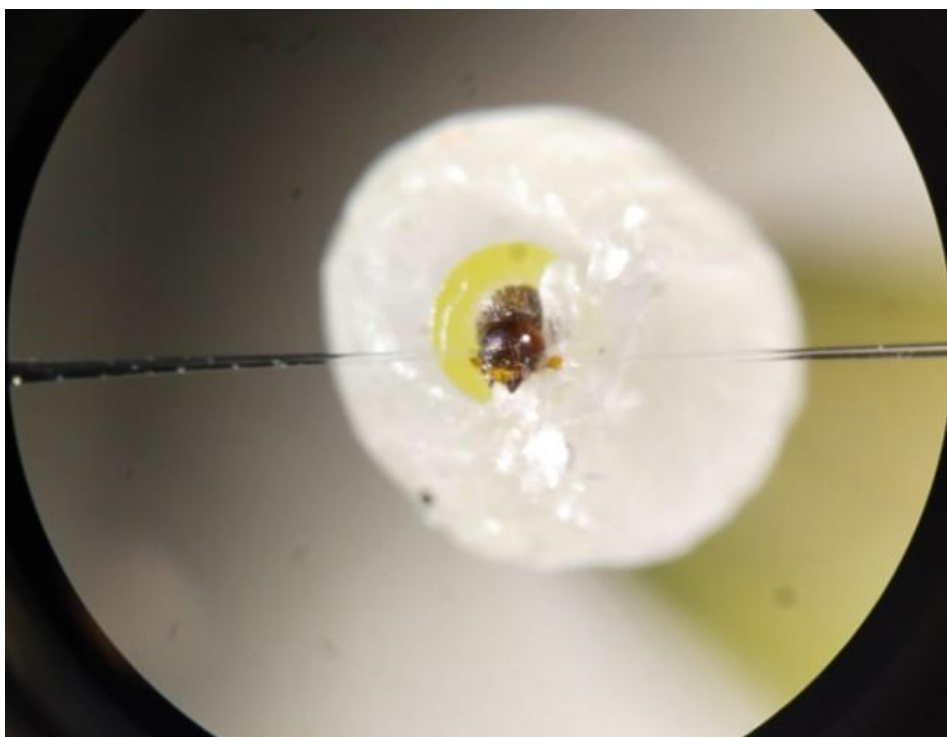
4.5 Fixace *Taphrorychus bicolor*

Pro fixaci brouka byly zvoleny metody upevnění intaktního brouka a fixace pouze hlavy. Každá ze zmíněných metod má klady i zápory. Intaktní brouk vydržel dlouhou dobu fyziologicky aktivní, tudíž je možné delších experimentálních analýz. Na druhou stranu je fixace náročná, jelikož se jedná o živý organismus, který se snažil ze zařízení uniknout. Celý brouk byl fixován do plastového kuželu, kterému byla seříznuta špička žiletkou (viz. obrázek 9). Brouk byl povystrčen tak, aby z kuželu koukala pouze jeho hlava a byl v kompletně statické poloze. Do crania byl udělán otvor špičkou špendlíku, aby mohla být hemolymfa propojena s referenční elektrodou. Jako vstupní místo vpichu sloužilo oko, jelikož se jedná o měkkou tkáň. Zbytek hlavy je silně sklerotizovaný. Vršek fixačního kuželu byl oblepen dentálním voskem a ten byl následně pod mikroskopem (Olympus SZ61) naakumulován na opačné straně hlavy, než na které byl proveden vpich. Vosk byl prostřednictvím špendlíku nasunut pod tykadlo, které se na vosk umístilo tak, aby směrem vzhůru směřovala ta strana paličky, kde se nacházely sensily laděné na chemické signály. To bylo voskem ještě aretováno do polohy, kdy kůrovec nemohl tykadlovou paličku zatáhnout zpět anebo ji jiným způsobem odpojit od měřící elektrody. Takto připravený preparát byl umístěn do elektroantenuografu. Do propíchnutého oka se zavedla referenční elektroda a na tykadlo se umístila měřící elektroda (viz obrázek 7). Manipulace elektrod probíhala mikromanipulátory pod elektronovým mikroskopem značky Nikon SMZ 18. Druhá využitá metoda byla fixace pouze hlavy (viz. obrázek 8). Tato procedura byla méně náročná na samotné provedení, ale preparát vydržel kratší dobu. Z tohoto důvodu se nehodí na dlouhé měřící procedury. Brouk byl nejdříve pod mikroskopem usmrčen příčným řezem žiletkou v místě předělu hrudi a zadečku. Následně se hlava bočním tlakem pinzety povystrčila z předohrudí ven a byla oddělena žiletkou. Hlava se již pouze nasunula na referenční elektrodu za pomoci pinzety a takto zhotovený preparát byl nasazen na referenční stranu elektroantenuografického detektoru. Na tykadlovou paličku se poté pouze přisunula měřící elektroda za využití mikromanipulátorů. Ideálním stavem bylo, když tykadla od hlavy odstávala v pravém úhlu. V této konstelaci jsme byli schopni díky povrchového napětí jednoduše navázat kontakt mezi elektrodou a tykadlovou paličkou.

Elektroantenuografická aparatura s fixovaným broukem se přesunula k ústí trubky vedoucí z plynového chromatografu, kterou byly unášeny těkavé látky. Zařízení bylo nutné překrýt Faradayovou klecí, která nám zajistila odstínění okolních negativních externalit, jako je elektromagnetické vlnění. To bylo nutné eliminovat z důvodu extrémní citlivosti přístroje, což zlepšilo poměr signál/ruch.



Obrázek 8. Fixace hlavy *T. bicolor*. Elektroda, která je propojena s hemolymfou skrz hlavu se nazývá referenční. Elektroda přiložená na tykadlo se označuje jako měřicí.



Obrázek 9. Fixace živého brouka *T. bicolor*.

4.6 Měřicí protokol

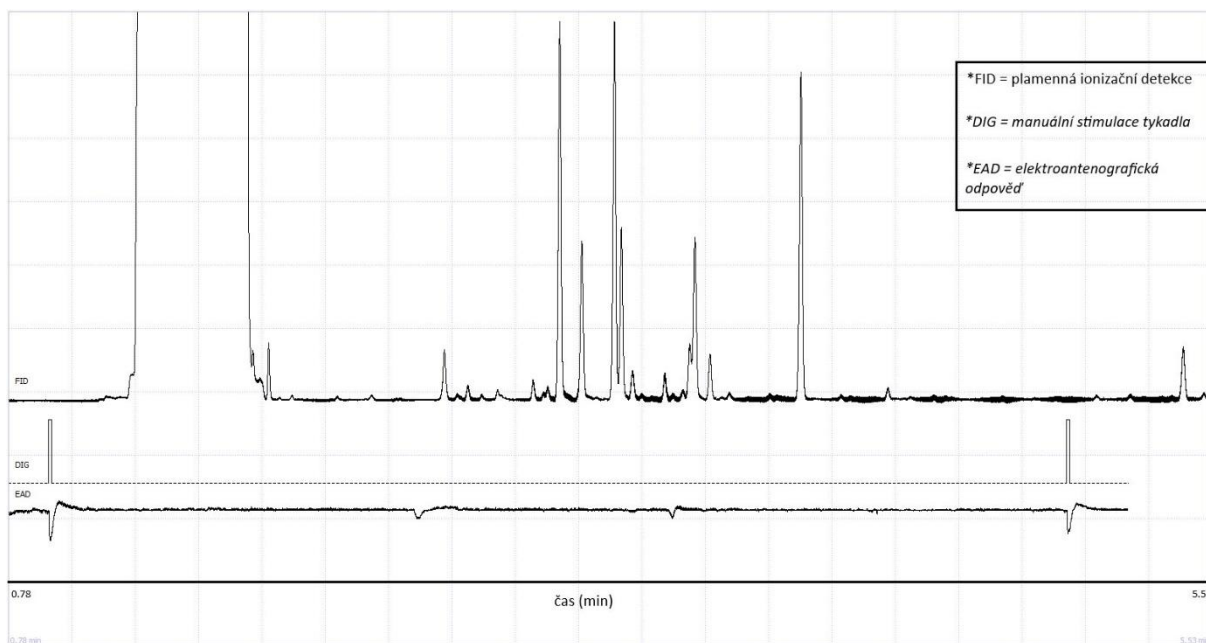
Vitalita tykadla byla testována agregačním feromonem. Tím je pro *T. bicolor* bicolorin. Ten byl nanesen na filtrační papírek (cca 0,5 cm x 0,5 cm) mikropipetami (Thermoscientific, 10 µl – 1000 µl) v množství 10 µl při koncentraci 100 ng/ml. Filtrační papírek saturovaný námi zvolenou látkou byl vložen do skleněné Pasteurovy pipety. Takto zhotovený preparát se v elektroantenografii označuje jako zásobníček. Feromon byl generátorem vzduchových stimulů vyfouknut do proudu vlhčeného vzduchu, který látku donesl na tykadlo. V případě, že byl kůrovec zapojen správně, došlo k depolarizaci neuronové membrány, a tudíž zachycení změny receptorového potenciálu v podobě vychýlení křivky v námi používaném software (Eag, syntech).

Pakliže jsme měli v aparatuře funkční tykadlo, byl zapnut přednastavený program plynového chromatografu (Agilent 7890B, Agilent Technologies, USA s kolonou Agilent 19091J-413: K01 HP-5 o délce 35 m na FID a 31 m na biologický detektor - tykadlo, průměru 320 µm a síle vnitřního filmu 0,25 µm). Klíčovými parametry měřícího programu byly: teplota plamenného ionizačního detektoru 300 °C, výchozí teplota pece chromatografu 40 °C, finální teplota pece chromatografu 300 °C, doba měření 12,167 minut, teplota inletu 250 °C. Látky prošly třicetimetrovou kolonou, a poté byly rozděleny pomocí splitteru ve tvaru Y na 2 části. Odtud putují 4/5 z nastříknuté směsi 1 m dlouhou kolonou přímo na biologický detektor v podobě tykadla v elektroantenografu a zbylá 1/5 směsi 5 m dlouhou kolonou do plamenného ionizačního detektoru. Důvodem rozdílných délek kolon po průchodu rozdělovačem a různého množství transportované látky byla domněnka, že tykadlo a FID jsou schopny detekovat látky s různými prahovými hodnotami. Hypotéza byla taková, že FID je citlivá analytická součástka, takže to nebude mít na detekci vliv, zatímco biologický detektor (tykadlo) je méně citlivé, takže potřebuje co nejkonzentrovější stimuly. Pro lepší separaci látek byl použit druhý teplotní program plynového chromatografu (pomalejší program), který trval 32 minut a jeho účelem bylo rozdělení koelucí a přesnější identifikace aktivních látek z EAG výstupů. Výchozí teplota pece byla 40 °C, do 100 °C byl nastavený ohřev 10 °C/min a od 100 °C do 300 °C byl nárůst teploty 5 °C/min.

4.7 Počítačové rozhraní

Pro zachycení elektroantenografické odpovědi byl využit software EAG (Syntech). V tomto programu jsou vykreslovány 3 křivky. Pod zkratkou DIG se ukrývá manuální stimulace tykadla

prostřednictvím generátoru vzduchových pulzů. To nám sloužilo pouze pro kontrolu, abychom mohli z měření odečíst, kdy bylo tykadlo manuálně stimulováno. Značka FID reflektuje výstup plamenného ionizačního detektoru, který nám dával informaci o spektru látek v měřené směsi. Signál byl zachycen kolektorem poté, co ionizačním plamenem prošla látka z kolony a spálením vytvořila určité množství detekovatelné energie. Poslední křivka s názvem EAG připadá samotnému elektroantenografu, který nám dává informaci o biologické aktivitě tykadla po percepci těkavé látky. V případě, že na tykadlovou paličku dopadla látka, pro kterou má *T. bicolor* naladěny konkrétní čichové receptorové neurony, došlo k depolarizaci membrány, což vytvořilo signál, který jsme byli schopni změřit (v této fázi nazývaný jako změna receptorového potenciálu). Software řídící chromatograf pochází od firmy Agilent technologies.



Obrázek 10. Ukázka počítačového rozhraní software EAG, syntech. Vrchní křivka interpretuje látky po průchodu plamenným ionizačním detektorem. Poté, co látka projde plamenem je detekována energie, kterou vyzáří a v software se vykreslí jako peak v mV. Prostřední křivka s názvem DIG slouží pouze pro kontrolu, kdy dochází k manuální stimulaci tykadla generátorem vzduchových pulzů. Na tomto obrázku jsou vidět 2 stimule v časech 0.94 min a 4.95 min. Poslední křivka s názvem EAD reprezentuje změnu receptorového potenciálu po stimulaci tykadla v milivoltech (mV). V tomto konkrétním případě byl pro stimulaci použit

agregační feromon pro *T. bicolor* (bicolorin) a v obou časech (0.94 min a 4.95 min) vyvolal změnu receptorového potenciálu – vychýlení křivky na ose EAD.

4.8 Determinace látek

Samotné určení látek proběhlo prostřednictvím dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Pomocí plynové chromatografie byly látky separovány. Jejich nanesení do přístroje bylo realizováno automatickým samplerem v objemu 1 μ l. Teplotní program byl nastaven dle následujícího schématu (pomalý teplotní program). První 2 minuty se v přístroji udržovala teplota 40 °C. Následně se zvyšovala o 10 °C za minutu až do teploty 100 °C. Od 100 °C až do 320 °C bylo nastaveno zahřívání na 5 °C za minutu. Teplota inletu se pohybovala na hodnotě 275 °C. Teplotní program plynového chromatografu trval celkem 52 minut. Kolony byly použity 2. První část (před vstupem látek do modulátoru) HP-5MS s délkou 29 m o průměru 250 μ m, tloušťka filmu 0,25 μ m s maximálním zahřátím na 350 °C). Po projití látek touto kolonou se část směsi přes modulátor přesunula do 2. kolony (VF17 MS, délky 1.290 m, o průměru 250 μ m, 0,1 μ m tloušťka filmu; maximální teplota 350 °C). Díky modulátoru (HP-5MS, délky 0,1 m, průměru 205 μ m s tloušťkou filmu 0,25 μ m, maximální teplota 350 °C) byly látky více koncentrovány a v softwarovém rozhraní se jedna látka vykresluje jako větší množství peaků. To je způsobeno modulační periodou (v této studii nastavené na 5 sec), která způsobí, že se původní eluce fragmentuje na více částí, které jsou v určitých intervalech vysílány do detekčního zařízení (hmotnostního spektrometru). Látky jsou v modulátoru nejdříve zamrazeny a následně vstupují do druhé kolony. Hmotnostní spektrometrií byly látky detekovány a na základě hmotnostních spekter určovány. Bylo využito principu, že látky mají po nabití nábojem tendenci praskat ve stejných vazbách (mají tendenci tvořit konkrétní hmotnostní spektrum). Náboj je látkám dodán výbojem elektronového paprsku. Finální určení látek proběhlo na základě dvou principů. Získaná hmotnostní spektra z hmotnostního spektrometru – párovaného s plynovou chromatografií (GC-MS) byla porovnána se světovou knihovnou NIST (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>). Touto metodou byly identifikovány veškeré látky kromě bicolorinu. Záznam o hmotnostním spektru (1S, 2R, 5R) 2-ethyl-1,5-dimethyl-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octane byl získán z publikace od autora Francke (1995). Druhým principem byla determinace na základě retenčních indexů, které se vypočítaly pomocí lineární interpolace vůči retenčním časům směsi alkanů C8-C22. Proměnnou, kterou byly výsledky z hmotnostní spektrometrie korektovány, byl retenční čas.

Východisko je takové, že hmotnostní spektra různých látek mohou být v některých případech stejná nebo velice podobná. Tyto látky ale v závislosti na molekulární konformaci různě reagují s vnitřní částí kolony, a tudíž dojde k rozdílnému zdržení při průchodu. To nám tedy pomůže odlišit stejná hmotová spektra na základě doby zdržení v koloně.

4.9 Potvrzení látek

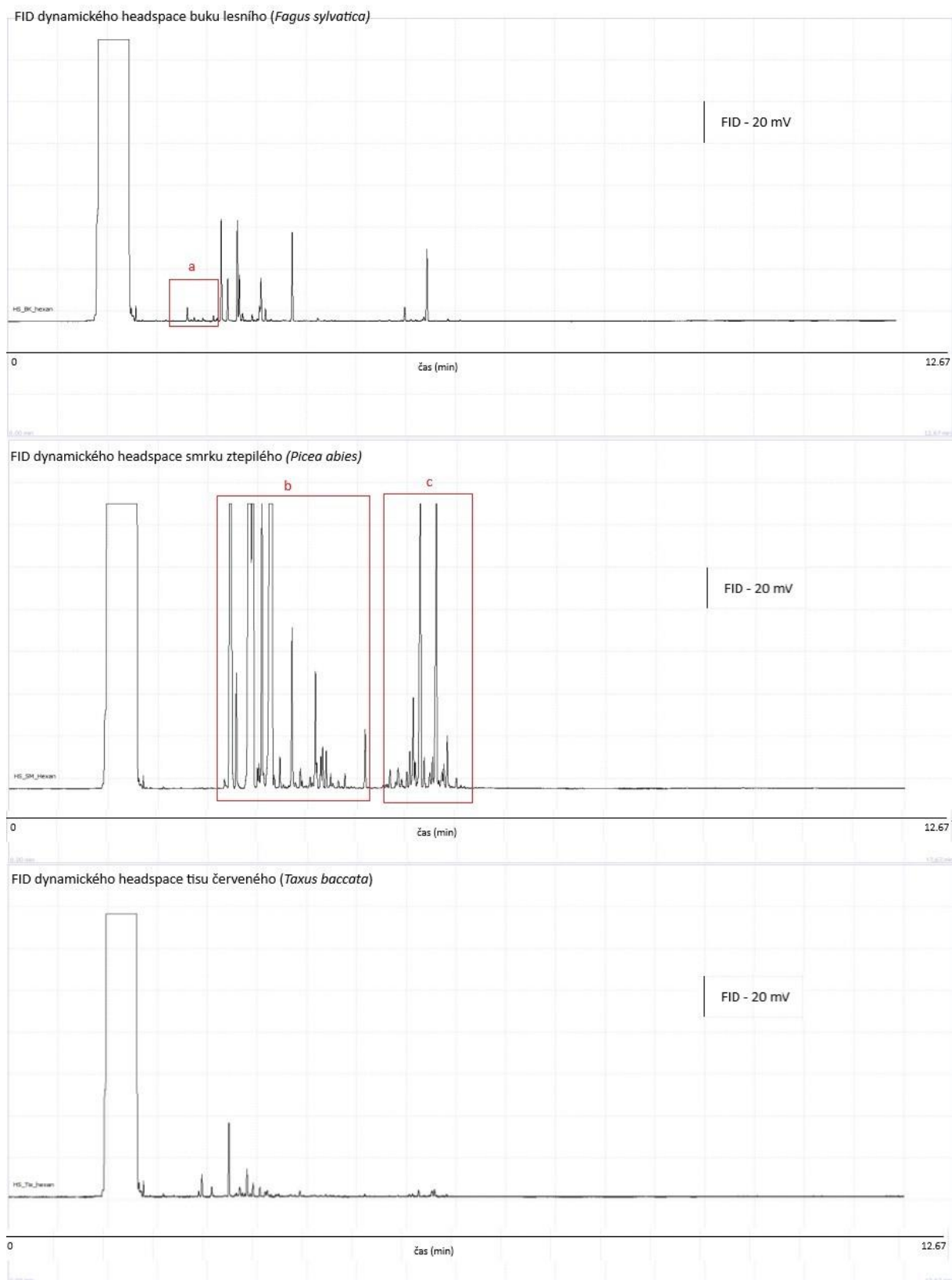
Látky, které jsme v předchozím kroku zjistili, byly ještě testovány na tykadle. Důvodem bylo potvrzení jejich biologické aktivity u *T. bicolor*. Za tímto účelem byly použity syntetické standardy z laboratoře pro látky *trans*-2-hexenal (Acros organics, 99 %), eucalyptol (Acros organics, 99 %), γ -terpinene (Sigma aldrich, 97 %) terpinolen (Sigma aldrich, >85 %), bicolorin (AlphaScents, Inc.). Jejich čistota byla ověřena plynovou chromatografií s plamennou detekcí (GC-FID). Tyto látky byly rozpuštěny v hexanu. Jejich koncentrace byla 100 μ l /ml (100 μ l látky v 900 μ l hexanu). Takovýto postup proběhl u všech zainteresovaných látek. Z nich byla vytvořena směs pro nástřik do plynového chromatografu prostým smícháním (100 μ l každé látky v 600 μ l hexanu). K manipulaci s látkami byly využity mikropipety značky Thermoscientific o objemech 10 μ l – 1000 μ l. K přenosu látek do proudu vlhčeného vzduchu byl použit plynový chromatograf. Analýza biologické aktivity na tykadle brouka byla realizována elektroantenografickým detekčním zařízením (viz kapitola 4.6). Metoda fixace byla zvolena oddělení hlavy od zbytku těla *T. bicolor*. Teplotní program u plynového chromatografu byl nastaven následujícím způsobem. První 2 minuty se v zařízení udržovala teplota 40 °C, následně byla zvyšována až do 300 °C rychlostí 30 °C/minutu. Teplotní program trval celkem 12,2 minut.

5 Výsledky

5.1 Vyhodnocení dynamického headspace prostřednictvím GC-FID

Po provedení jímání látek metodou dynamického headspace byla získána směs látek z dřeviny *F. sylvatica*, *P. abies* a tisů červeného (*Taxus baccata*) (L.). *F. sylvatica* byl analyzován dalšími metodami (GC-EAG, GC-MS). Záznamy zbylých dřevin byly pořízeny pouze pro srovnání profilů látek. Po provedení plynové chromatografie s plamennou ionizační detekcí bylo zjištěno, že se u *F. sylvatica* ve srovnání s *P. abies* nachází poměrně nízké koncentrace látek. Ve srovnání s *T. baccata* je ale větším emitěrem. Jednotlivé dynamické headspace se lišily v zastoupení látek v konkrétních chemických třídách. U *F. sylvatica* oproti ostatním směsím

byla nalezena oblast aldehydů a alkoholů, které se jinde nenacházely. *P. abies* byl výrazně nejsilnějším emitorem látek v oblasti monoterpenů, které jsou pro jehličnaté dřeviny typické a pestře zastoupena byla i oblast seskviterpenů, které zde byly přítomny ve vysokých koncentracích. První veliký peak, který vycházel v čase 1.25 min (při teplotním programu nastaveném dle kapitoly 4.6 – rychlejší teplotní program) byl hexan (rozpouštědlo), proto je vidět ve všech vzorcích.

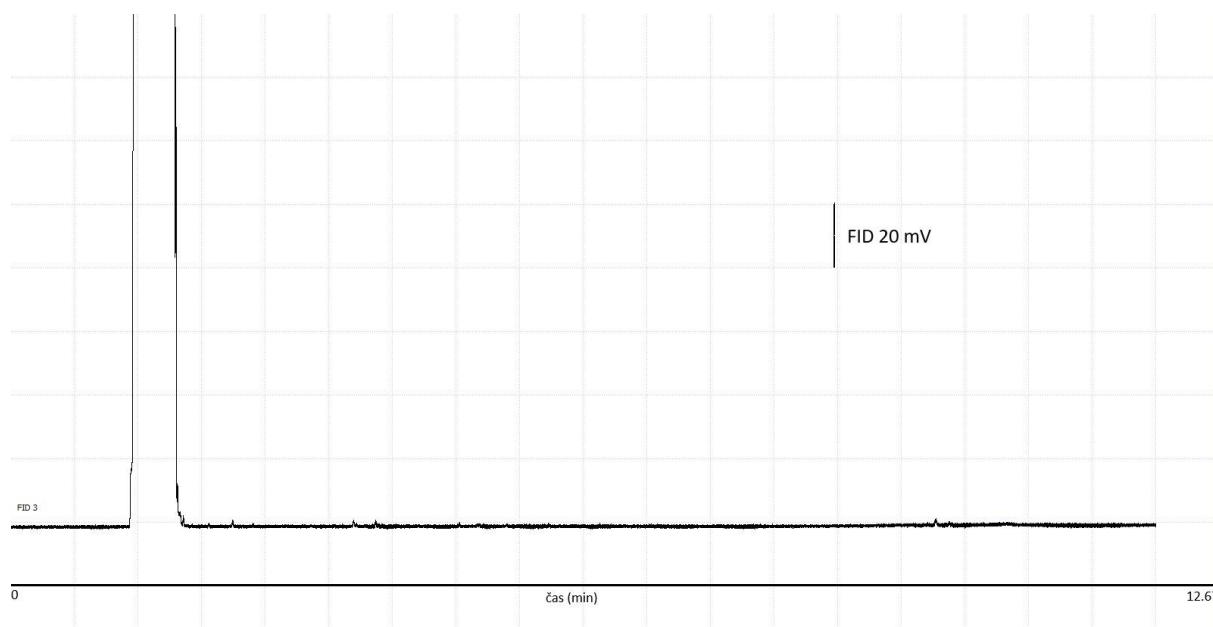


Obrázek 11. Chromatogramy dynamických headspace *F. sylvatica*, *P. abies* a *T. baccata*. Na ose X je uveden čas, ve kterém látky procházejí plamenným ionizačním detektorem. Na ose Y je uvedena velikost uvolněné energie po projití látky plamenem v milivoltech. Oblast „a“, která

je vyznačená, reprezentuje skupiny látek alkoholů a aldehydů. V oblasti „b“ se vyskytují převážně monoterpeny a v oblasti „c“ se nacházejí seskviterpeny. Oblasti jsou vyznačeny u dynamických headspace dřevin, u kterých jsou v nejvíce dominantním zastoupení. Z grafů je patrné, že *P. abies* je největším emitentem látek, *T. baccata* naopak nejmenším z uvedených.

5.2 Kontrolní strana headspace

Aby bylo vyloučeno znečištění z okolního prostředí, byla vyhotovena kontrolní sada měření dynamického headspace. Jelikož byl pumpičkami odsáván vnitřní obsah sáčku, musel být dovnitř přiváděn vzduch z venku. Ten proudil právě skrz kapiláry se sorbentem, na který se navazovaly molekuly těkavých látek. Po analýze prostřednictvím plynového chromatografu s plamenným ionizačním detektorem bylo zjištěno, že vnější vzduch, který byl do fólie nasáván, neměl negativní vliv na čistotu vzorku dynamického headspace směsi látek z *F. sylvatica*. Peak s retenčním časem 1.25 min je signál získaný po projití hexanu plamenným ionizačním detektorem. Použit byl rychlejší teplotní program plynového chromatografu.

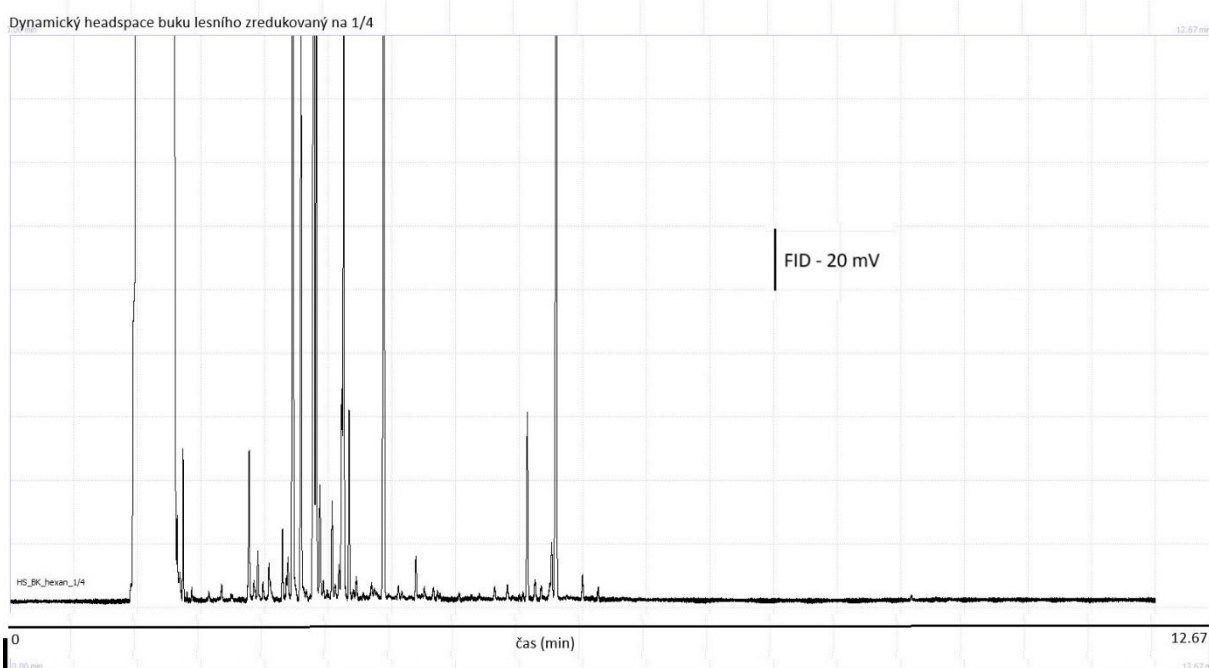
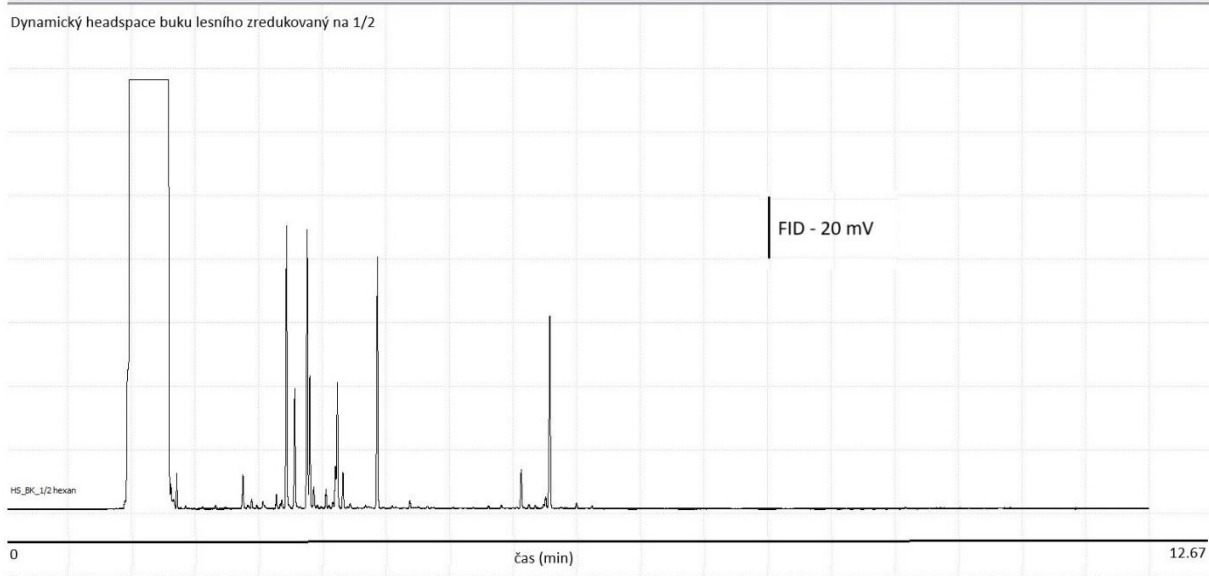
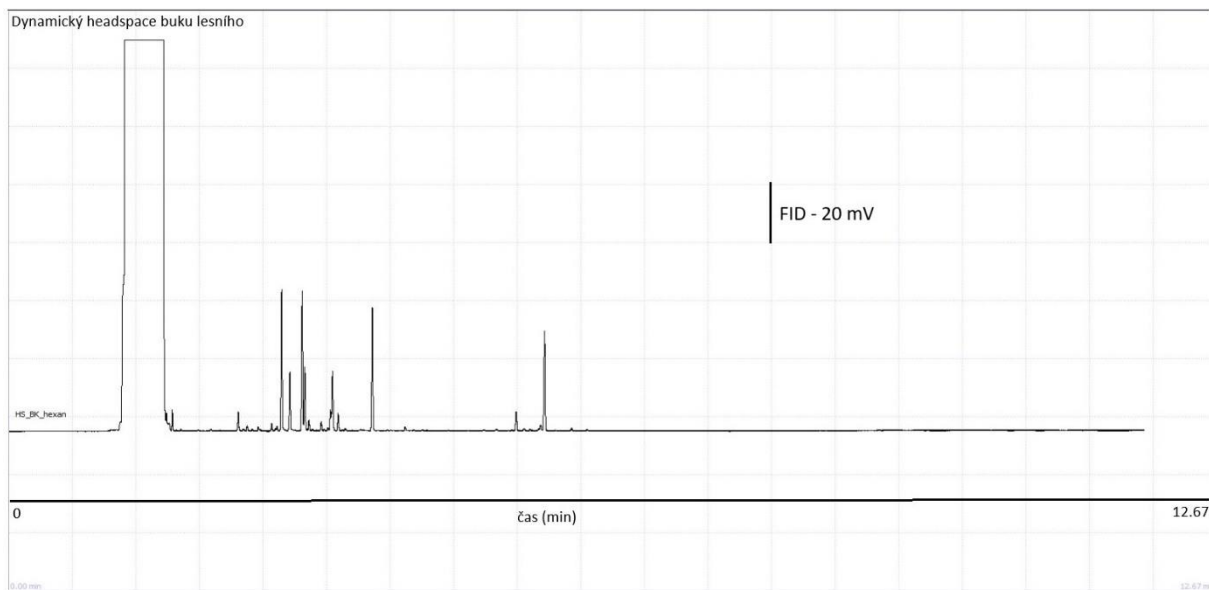


Obrázek 12. Kontrolní strana dynamického headspace pro *F. sylvatica*. Z obrázku je patrné, že se zde nenachází žádné markantní peaky, které by představovaly látky nasávané z vnější strany, a tím pádem by zkreslovaly cílový vzorek. Křivka představuje výstup z FID pro kontrolní stranu

dynamického headspace buku lesního. Na ose X je vyobrazen retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru.

5.3 Zakoncentrování původního headspace *F. sylvatica*

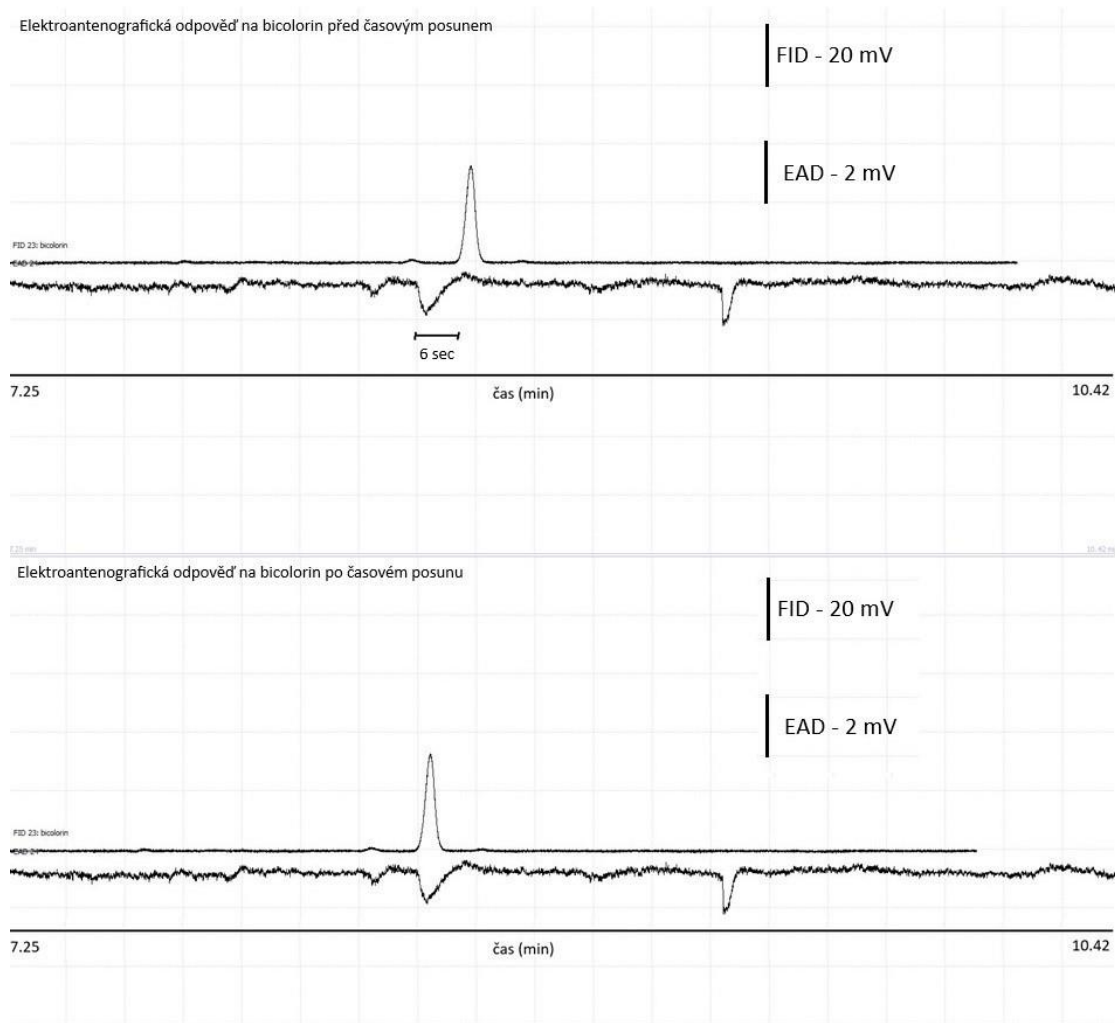
Kvůli nízké koncentraci látek, které byly extrahovány dynamickým headspace asimilačního aparátu a dřevní hmoty *F. sylvatica*, bylo nutné provést redukci směsi. Předpokladem pro tuto proceduru byla větší těkavost hexanu (rozpouštědla), nežli zbylých volatilních látek. Tudíž byla vialka se vzorkem při kondicích v místnosti viz. Kapitola 4.2, odvíčkována a směs byla odpařováním zredukována. Celkem byly vyhotoveny 3 preparáty. Originální směs látek získaná metodou dynamického headspace z *F. sylvatica*. Směs, která byla zredukována na $\frac{1}{2}$, což trvalo 3 hodiny. Směs látek, která byla zredukována na $\frac{1}{4}$ z původního objemu vialky, což trvalo 6 hodin. Nejvíce zakoncentrovaný vzorek (HS_BK_1/4) byl vyhodnocen, jako nejpříjemnější pro následné analýzy. Důvodem bylo, že se zde látky nacházely v takové míře, která by měla přesahovat prahové hodnoty, což jsou hodnoty, při kterých dochází na tykadle brouka k dostatečně velké změně receptorového potenciálu. Ten je možné zaznamenávat elektroantenografickým měřením. Zároveň se řada látek dostala z oblasti šumu FID signálu do hladin detekovatelnosti, takže tím bylo dosaženo získání bohatší směsi, co se týče množství detekovatelných látek. Peak s největší plochou, který procházel FIDem v čase 1.25 min, přísluší hexanu. Při této analýze byl použit rychlejší teplotní program plynového chromatografu.



Obrázek 13. Chronologicky řazené chromatogramy dynamického headspace *F. sylvatica* podle koncentrovanosti směsi. Z obrázku je patrný trend, že čím více jsme směs látek redukovali, tím jsme byli schopni dosáhnout vyšších koncentrací látek, které se v ní nacházely. Rovněž řada látek přešla z oblasti nedetekovatelnosti (při využití kolony a rychlejšího teplotního programu viz. kapitola 4.6) do oblasti, kdy je signál z plamenného ionizačního detektoru možné identifikovat. Na ose X je vyobrazen retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru.

5.4 Výpočet zpoždění FID vůči EAG

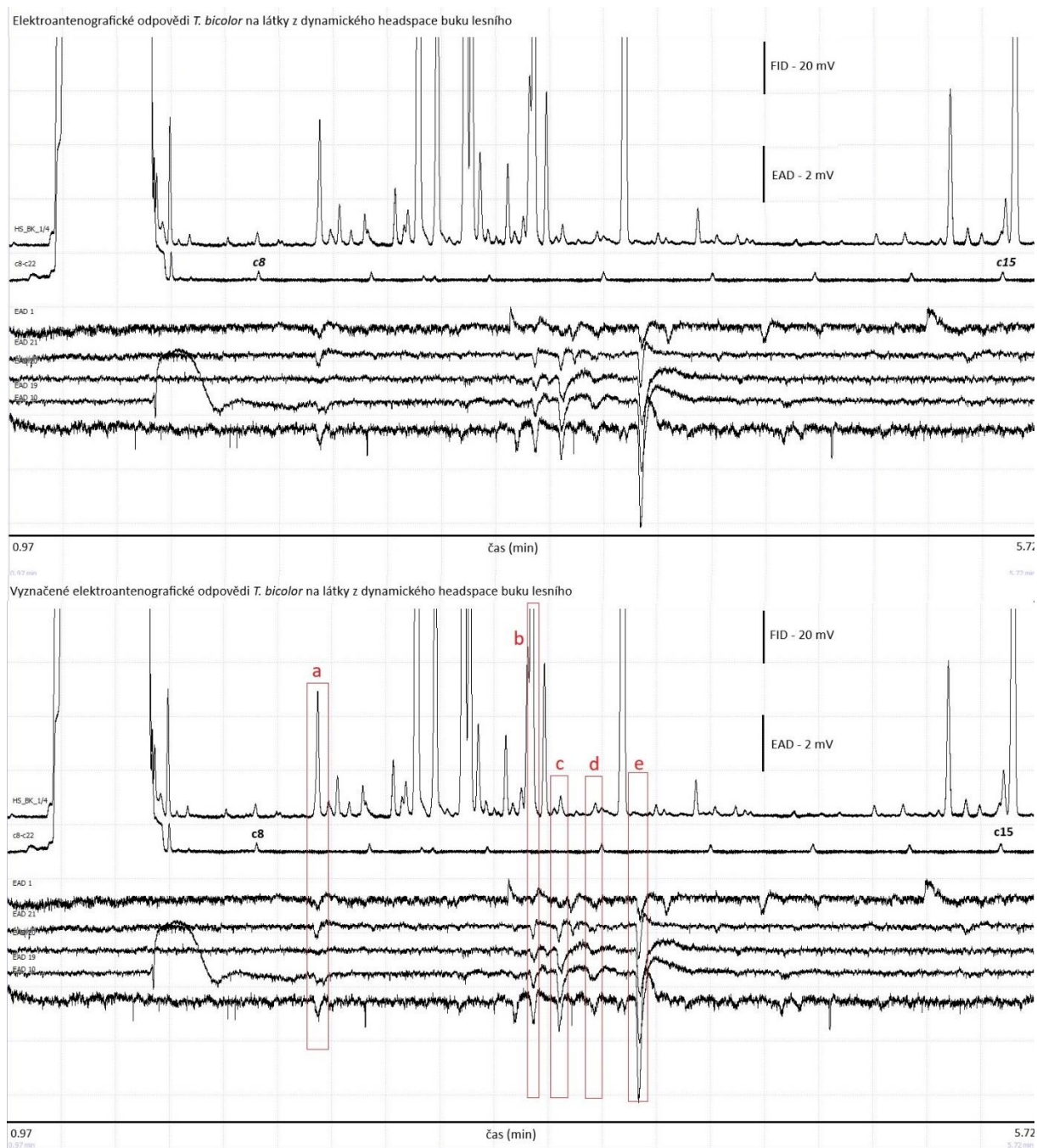
Vzhledem k použití rozdílných délek kolon na biologický detektor (EAG) a analytický detektor (FID) bylo nutno vypočítat zpoždění, které látky procházející kolonou získají. Výpočet proběhl v software EAG. Použito bylo tykadlo *T. bicolor*, které bylo stimulováno synteticky vyrobeným agregačním feromonem (bicolorinem). Ten byl na tykadlo dopraven prostřednictvím plynového chromatografu. Originální retenční čas, před korekcí, pro bicolorin (při nastaveném pomalejším teplotním programu plynového chromatografu viz. kapitola 4.6) byl 8.53 min (FID). Retenční čas, kdy byla zaznamenána odpověď z biologického detektoru (tykadla v elektroantenografu, EAG) byl 8:43 min (nejedná se o šedesátkovou soustavu, ale setinnou, jelikož s tím pracuje software EAG). To znamená, že zpoždění, které látka v koloně chromatografu nabyla, bylo 6 sekund. S touto hodnotou bylo pracováno při následných elektroantenografických měřeních.



Obrázek 14. Výpočet zpoždění odpovědi na biologickém detektoru (spodní křivka) a analytickém detektoru (horní křivka). Na horním grafu je znázorněn čas, o který jsou odpovědi vůči sobě rozdílné. Spodní obrázek je manuálně posunutá křivka plamenného ionizačního detektoru o 6 sekund. Z uvedeného obrázku je patrné, že po korekci došlo k synchronizaci výstupů z obou detektorů, a tudíž byla tato úprava provedena i u zbylých měření (v případě, že byl používán stejný teplotní program v plynovém chromatografu jako u výpočtu zpoždění odpovědi). Horní křivka nese informaci z plamenného ionizačního detektoru, kterým prošel bicolorin. Spodní křivka reprezentuje hodnotu EAD odpovědi na něj. Na ose X je vyobrazen retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru, případně velikost změny receptorového potenciálu z EAD. V obrázku jsou uvedena měřítka pro každou z měřících metod.

5.4.1 Identifikace biologicky aktivních látek na tykadle *T. bicolor*

Identifikace biologicky aktivních látek proběhla prostřednictvím plynové chromatografie párované s elektroantenografickým měřicím přístrojem. Celkově bylo identifikováno 5 látek. 1. spadá do kategorie aldehydů s retenčním časem 2.38 min. Další 3 látky spadají do kategorie monoterpenů a na tykadlo se dostaly v časech: 3.39 min; 3.51 min; 3.66 min. Poslední látka s retenčním časem 3.88 min vyvolávala nejsilnější odpověď na tykadle, ale ve vzorku se nacházela ve stopovém množství, jelikož nebyla detekována plamenným ionizačním detektorem. Terpeny obecně aktivovaly větší množství čichových receptorových neuronů na tykadle, jelikož na ně byla zaznamenána větší odpověď nežli na aldehyd. Odpověď na terpeny se pohybovala v intervalu 0.5 mV – 1 mV. Odpověď na aldehyd byla v intervalu 0.2-0.5 mV. A odpověď na neznámou látku nabývala hodnot až do 3 mV. V této části tedy byly získány retenční časy pro konkrétní látky, které byly využity v následujících měřeních pro jejich identifikaci. Časová linka pro FID byla upravena na základě předchozího výpočtu, a tudíž došlo k posunu o -6 sekund. Identifikace časů, ve kterých látky ze směsi *F. sylvatica* podráždí tykadlo byly měřeny při použití rychlejšího teplotního programu plynového chromatografu.

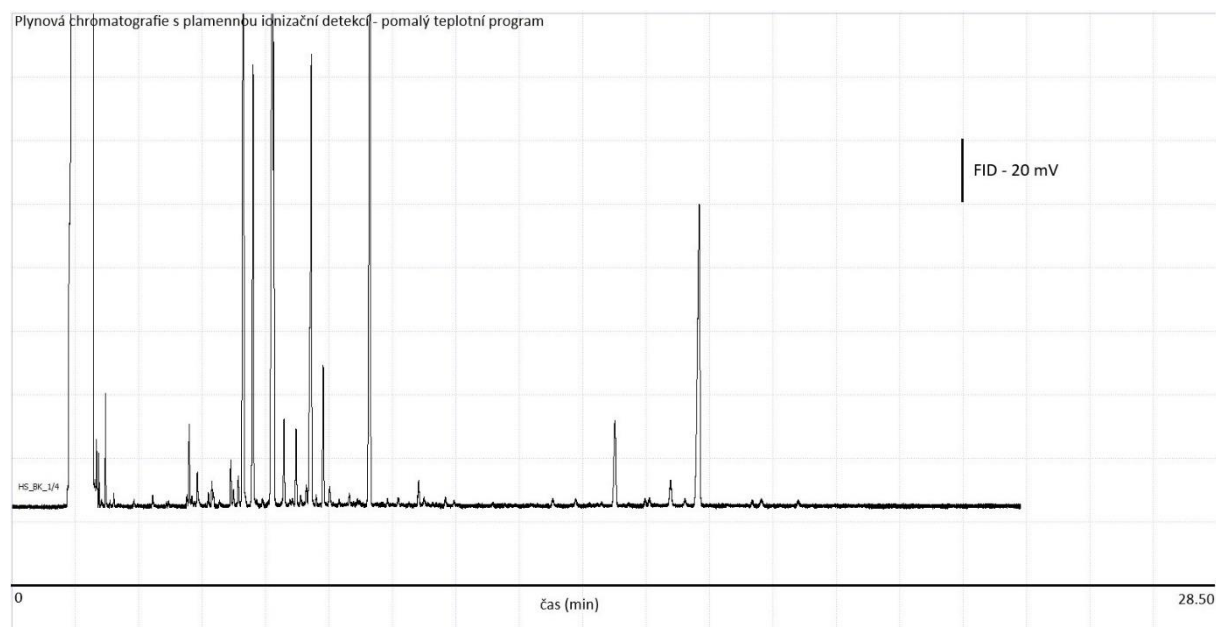


Obrázek 15. Na tomto obrázku lze vidět chromatogramy párované s elektroantogramy. Linie HS_BK_1/4 představuje výstup plamenného ionizačního detektoru (FID), který dává informaci o koncentraci a retenčním čase pro dané látky. Linie c8-c22 je rovněž výstup z plamenného ionizačního detektoru a jedná se o směs uhlovodíků rozpuštěných v hexanu, které nám následně umožní snazší orientaci v grafu a vypočtení retenčních indexů. Retenční indexy se využívají pro identifikaci látek. Linie EAD1 – EAD 22 jsou elektroantogramy, které zaznamenávají změny receptorových potenciálů na tykadle po navázání ligandů jednotlivých látek. Na

spodním obrázku jsou vyznačeny oblasti, kde došlo k synchronizaci odpovědi z EAG a signálu z FID. Tím pádem byly tyto látky hodnoceny jako biologicky aktivní. Celkový počet měření EAG odpovědí bylo 12 záznamů, z čehož bylo vybráno 5 reprezentativních (přehledných pro tento graf). Veškeré ostatní výchylky křivek u EAD jsou artefakty, které nemají žádnou biologickou hodnotu. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru, případně velikost změny receptorového potenciálu z EAD. V obrázku jsou uvedena měřítka pro každou z měřících metod.

5.4.2 Separace látek

Pro samotnou identifikaci látek byl dynamický headspace *F. sylvatica* (zředěný na 1/4) ještě analyzován plynovým chromatografem s plamennou ionizační detekcí za využití pomalejšího teplotního programu. Tím, že byl nastavený na pomalejší ohřev, bylo docíleno větší separace látek a došlo k rozdělení některých koelucí na jednotlivé prvky. Teplotní program byl využit podle schématu viz 4.8.



Obrázek 16. Profil těkavých látek při využití pomalejšího teplotního programu. Při změně měřítka lze snadněji identifikovat konkrétní látky a některé velké peaky, které byly složeny

z více elucí byly separovány. S tímto teplotním programem byla rovněž párována elektroantenografie, při které bylo měřeno 5 exemplářů, aby byla potvrzena aktivita látek na tykadle. Data nezobrazena kvůli vysoké míře šum/signál poměru, ale všech 5 látek při tomto měřicím protokolu vyvolalo odpověď na tykadle (změnu receptorového potenciálu). Křivka znázorňuje FID dynamického headspace buku lesního. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru.

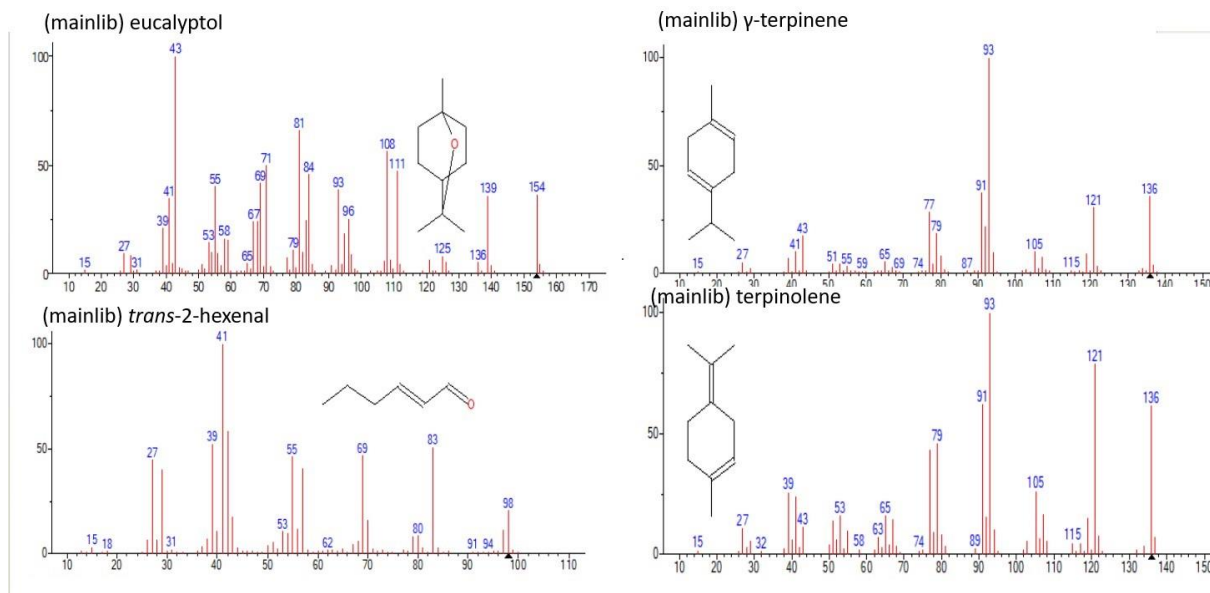
5.5 Identifikace látek

Identifikace látek proběhla plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem. Z elektroantenografického šetření viz 5.4.1 byly zjištěny konkrétní časy, ve kterých látky opouští plynový chromatograf. Analýza proběhla dvoudimenzionální plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem. Touto metodou byla získána jednotlivá hmotnostní spektra, která byla porovnána se světovou knihovnou NIST a na základě podobnosti látek proběhlo určení. Výsledné určení bylo ještě upraveno na základě retenčních indexů. Použit při této metodě byl pomalý teplotní program plynového chromatografu.

Retenční čas (s; 1D, 2D)	Název látky	Spektrální shoda s knihovnou Nist [%] 2019	Retenční index (Nist 2019)	Retenční Index změřený	RI rozdíl
665, 2.050	trans-2-Hexenal	81	854	856	2
760, 2.020	Origanene	91	929	931	2
775, 2.130	alpha-Pinene	90	937	942	5
800, 2.090	Camphene	94	951	962	11
825, 2.120	Sabinen	78	974	981	7
905, 2.170	Limonene	93	1030	1039	9
910, 2.230	Eucalyptol	91	1032	1043	11
945, 2.210	gammaTerpinene	89	1060	1068	8
990, 2.250	*Terpinolen	85	1088	1100	12
1020, 2.230	Perillen	77	1114	1120	6
1045, 2.340	bicolorin			1137	
1505, 2.500	Caryophyllene	93	1434	1443	9
1600, 2.440	alpha-Farnesene	93	1501	1507	6

Tabulka 1. Na základě podobnosti hmotnostních spekter se světovou knihovnou NIST byly určeny látky uvedené v tabulce. V bíle vyplněných políčkách se nacházejí významné látky ve směsi. Potvrzení proběhlo na základě výpočtu retenčních indexů vůči injektovaným uhlovodíkům (ty byly kalkulovány lineární interpolací – v excelu přes funkci lintrend). Ve

finále byly látky korektovány retenčním časem, ve kterém opouštějí kolonu plynového chromatografu, který jsme získali z elektroantenografie. Na základě uvedených metod bylo identifikováno 5 látek (zvýrazněných v tabulce červeně). Jedná se o aldehyd *trans*-2-hexenal; 3 monoterpeny: eucalyptol, γ -terpinene a terpinolene a feromon *T. bicolor*: bicolorin.

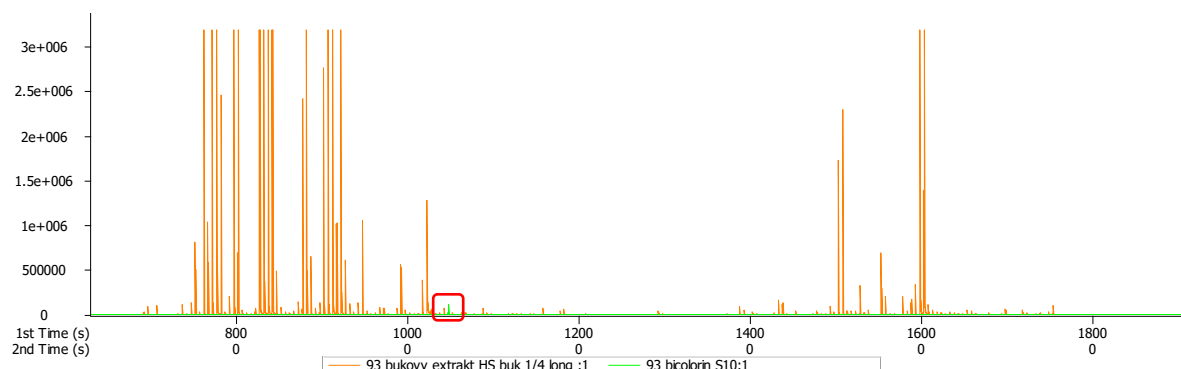


Obrázek 17. Grafické znázornění hmotnostních spekter identifikovaných látek z mezinárodní knihovny NIST. Na ose X jsou vybraná hmotnostní spektra. Na ose Y je vyjádřeno, jak jsou tato hmotnostní spektra v látce zastoupena.

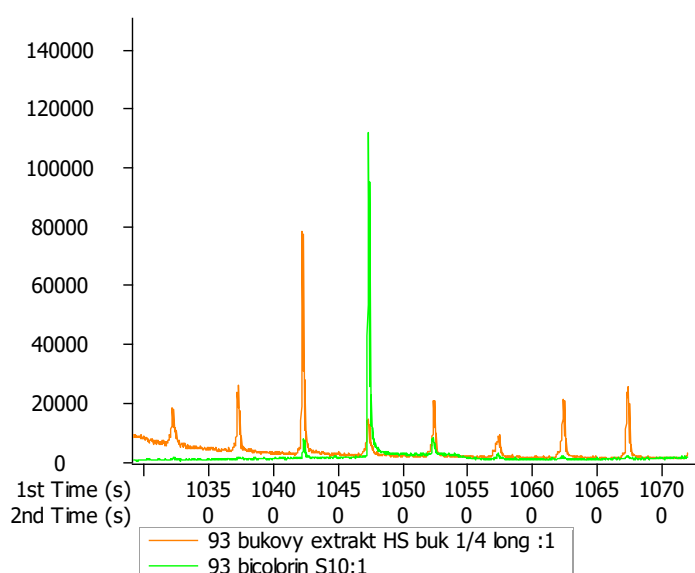
5.6 Identifikace agregačního feromonu

Spektrum látky vycházející v čase 10.47 min (za použití pomalejšího teplotního programu) se nenacházelo v knihovně NIST. Vzhledem k tomu, že neznámá látka vycházela ve stejném retenčním čase jako feromon bicolorin, byl do GC-MS nastříknut syntetický vzorek bicolorinu. Jeho hmotnostní spektrum bylo porovnáno se spektrem neznámé látky z původního vzorku dynamického headspace *F. sylvatica* (obr. 20). Srovnání dokázalo, že hledaná látka vyvolávající velkou odpověď tykala je skutečně agregační feromon bicolorin. Na obrázku 18 je zobrazen grafický výstup měření GC-MS vzorku *F. sylvatica* s vyznačenou oblastí, kde se nachází hledaná látka bicolorin. Akumulované peaky ve stejném čase přísluší všechny jedné látce. Jedná se o modulační periodu, která způsobí, že jsou vycházející látky z kolony rozděleny do částí, které jsou v pravidelném intervalu měřeny hmotnostním detektorem. Může se tak stát,

že látky přítomné ve větších koncentracích jsou změřeny v několika periodách po sobě. Detail modulačních period je vidět na obrázku 19.

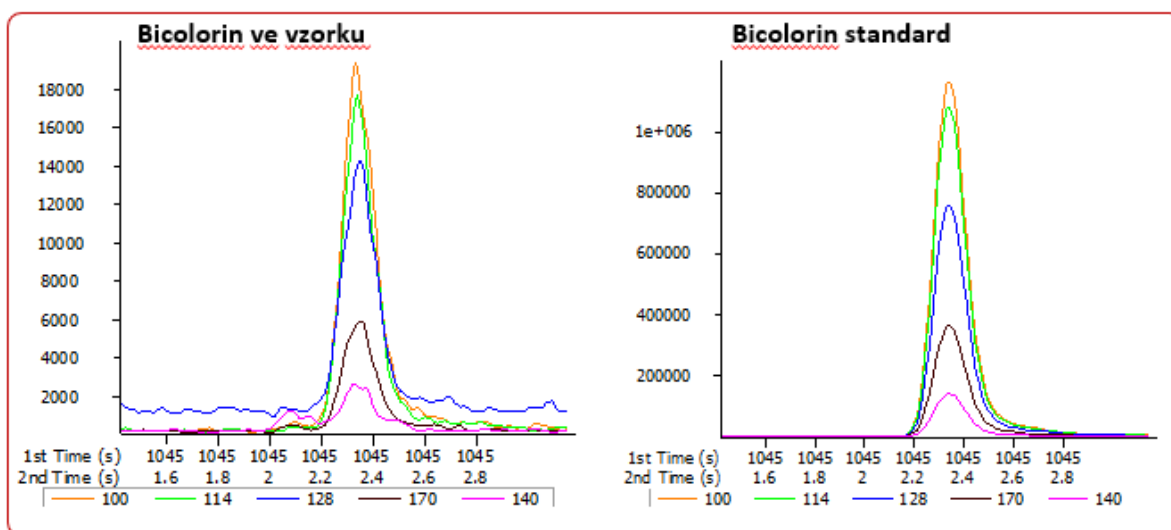


Obrázek 18. Výstup dvoudimenzionálního plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem při využití pomalejšího teplotního programu. Červeným rámečkem je zvýrazněný retenční čas, ve kterém plynový chromatograf opouštěl bicolorin. Oranžové křivky představují látky obsažené v původním headspace *F. sylvatica* (koncentrovaného na 1/4). Zeleně je promítnutý bicolorin v syntetické podobě. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazeno množství energie, která byla hmotnostním spektrometrem identifikována.



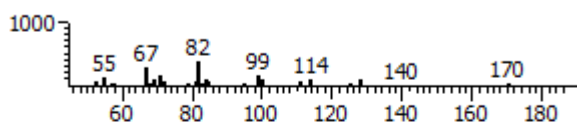
Obrázek 19. Grafické znázornění detailního pohledu na retenční čas, ve kterém bicolorin opouštěl kolonu za užití pomalejšího teplotního programu. Oranžovou barvou je znázorněný

bicolorin, který byl obsažený v původním headspace *F. sylvatica* (koncentrovaného na ¼). Zeleně je vyobrazený bicolorin nastříknutý v podobě syntetického standardu (o koncentraci 100 ng/ml). Na obrázku je vidět, že syntetický standard bicolorinu procházel detektorem ve stejný čas jako látka obsažená v původní směsi dynamického headspace. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazeno množství energie, která byla hmotnostním spektrometrem identifikována.

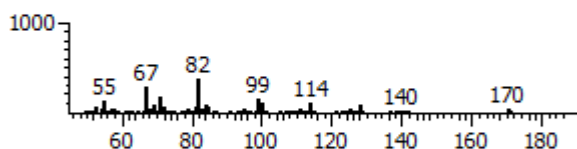


Obrázek 20. Porovnání specifických hmotnostních spekter. Na levé straně se nacházejí vybraná hmotnostní spektra bicolorinu z původní směsi dynamického headspace *F. sylvatica* po detekci hmotnostní spektrometrií. Na pravé straně se nacházejí hmotnostní spektra, která byla získána hmotnostní spektrometrií syntetického standardu. Z obrázku je patrné, že se oba vzorky shodují ve všech specifických hmotách pro tento prvek. Na ose X je zobrazený retenční čas. Na ose Y množství energie získané po hmotnostní spektrometrii. Jednotlivé (barevně odlišené) křivky jsou reprezentace konkrétních vybraných hmot.

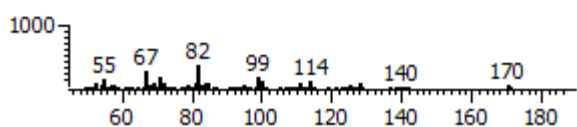
Peak True - sample "bicolorin S10:1", peak 1, at 1045 , 2.340 sec , sec



Library Hit - similarity 999, "Bicolorin"

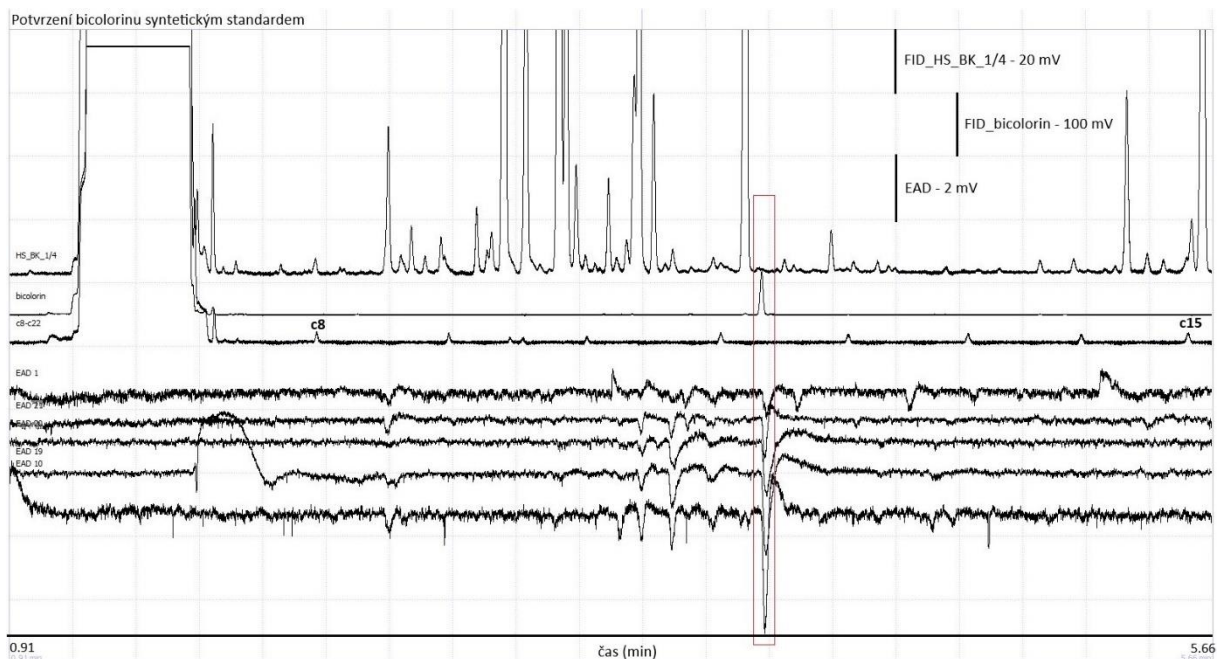


Caliper - sample "bicolorin S10:1", 1045 , 2.340 sec , sec to 1045 , 2.340 sec , sec



Obrázek 21. Porovnání hmotnostních spekter bicolorinu z různých zdrojů. Horní graf je vyobrazení hmotnostních spekter bicolorinu ze směsi látek dynamického headspace *F. sylvatica* (koncentrovaného na ¼). Prostřední graf je vyobrazení hmotnostního spektra ze studie Francke a kol. (1995), jelikož se tento prvek nenacházel v knihovně NIST. Dosažená podobnost hmotnostních spekter se studií je 99,9 %. Spodní graf je vyobrazení hmotnostní spektrum syntetického standardu bicolorinu. Všechny grafy se shodují s 99% přesností, tudíž byla látka identifikována jako bicolorin. Na ose X jsou vyobrazena vybraná hmotnostní spektra. Na ose Y je vyjádřeno jejich zastoupení.

Potvrzení bicolorinu na základě retenčního času jednodimenzionální plynové chromatografie. Bicolorin procházel plamenným ionizačním detektorem v čase 3.88 min (při využití rychlejšího teplotního programu). V tomto retenčním čase byly rovněž zaznamenány změny elektrického napětí na tykadle *T. bicolor* (EAD odpovědi). Na základě použitých metod je tedy látka v původní směsi dynamického headspace *F. sylvatica* indentifikována jako bicolorin i přes to, že v původní směsi po průchodu plamenným ionizačním detektorem nevyzářila téměř žádnou energii.



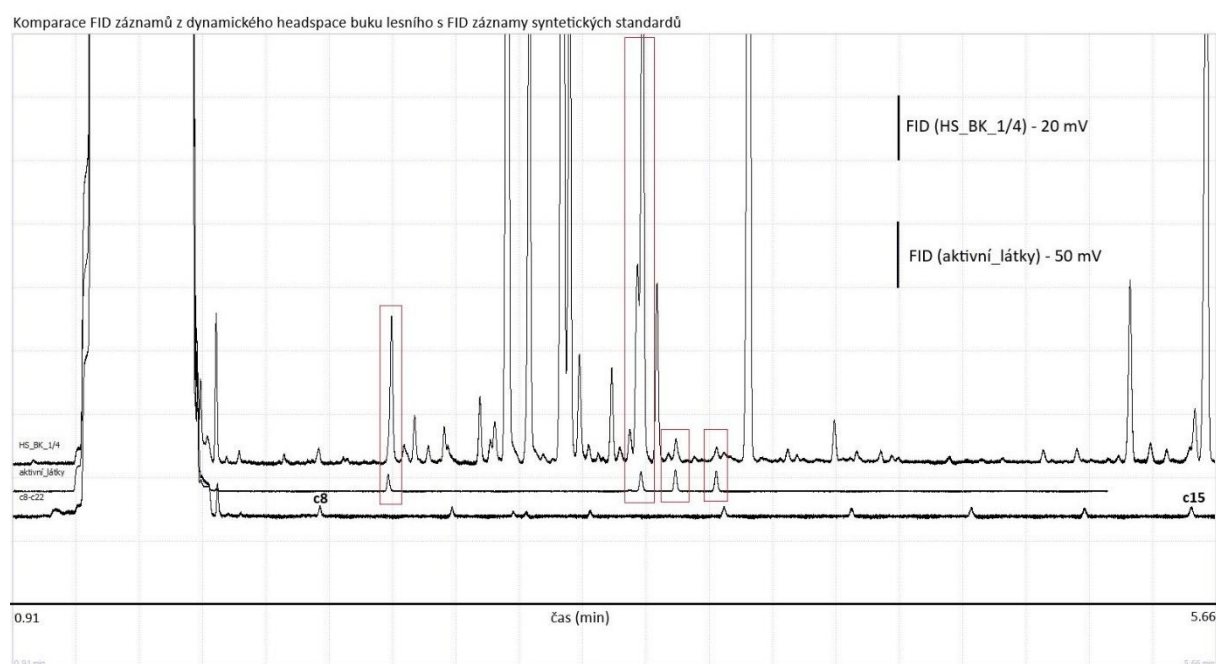
Obrázek 22. Identifikace bicolorinu na základě retenčního času, ve kterém syntetický standard opouští kolonu a prochází plamenným ionizačním detektorem. Pro porovnání jsou uvedeny naměřené elektroantenografické odpovědi z prvotního měření. Z obrázku je patrné, že se jedná o bicolorin, agregační feromon *T. bicolor*. Označení křivek sestupně: Horní křivka náleží plamennému ionizačnímu detektoru – dynamický headspace *F. sylvatica*; dále FID bicolorinu, FID směsi alkanů; spodních 5 křivek přísluší EAD odpovědím *T. bicolor*. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru, případně velikost změny receptorového potenciálu z EAD. V obrázku jsou uvedena měřítka pro každou z měřících metod.

5.7 Potvrzení látek standardy

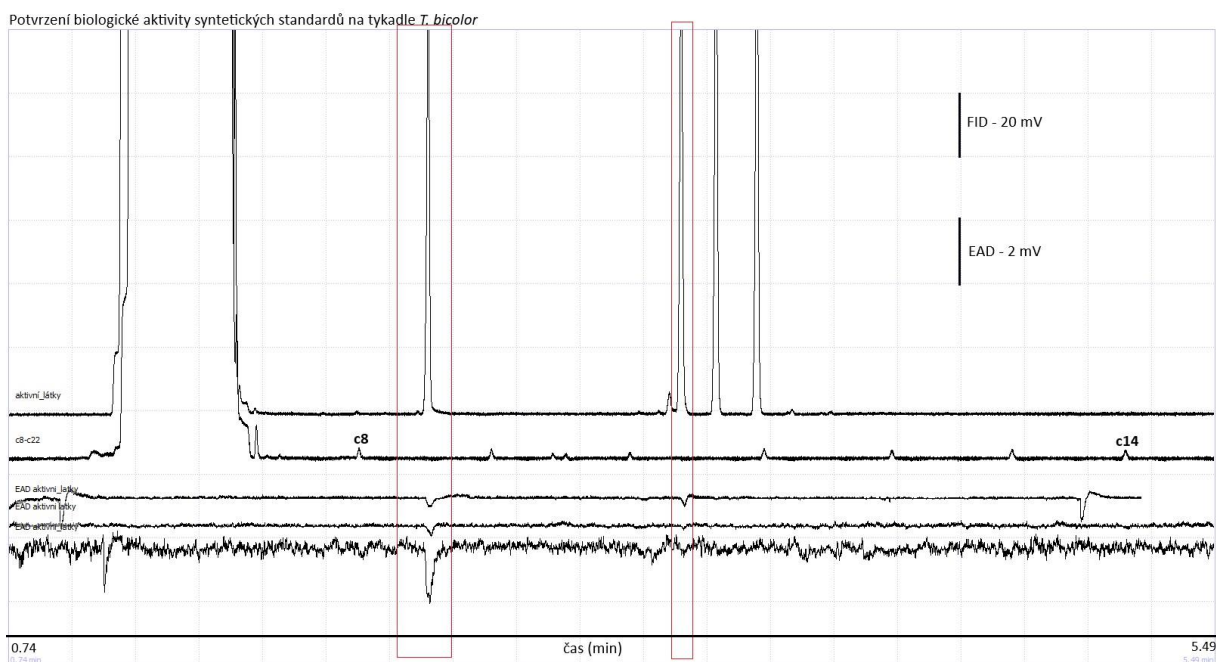
Potvrzení látek syntetickými standardy proběhlo dvěma metodami. Nejdříve bylo potvrzení provedeno na základě retenčních časů. Ty se shodovaly s biologicky aktivními látkami, které se nacházely v původním dynamickém headspace *F. sylvatica* (porovnání retenčních časů FID záznamů původní směsi dynamického headspace *F. sylvatica* s FID časy syntetických standardů aktivních látek). *Trans*-2-hexenal vycházel v původním vzorku v čase 2.48 min, syntetický standard *trans*-2-hexenal vycházel v čase 2.48 min. Eukalyptol vycházel v koeluci s limonenem v původní směsi v čase 3.49 min, syntetický standard z plynového chromatografu

vycházel v 3.49 min. γ -terpinene vycházel v původním dynamickém headspace *F. sylvatica* v čase 3.62 min, syntetický standard byl zaznamenán v čase 3.61 min. Terpinolen v původní směsi látek vycházel v čase 3.77 min, syntetický standard vycházel rovněž v čase 3.77 min.

2. způsobem bylo ověření syntetických standardů na tykadlech nových jedinců *T. bicolor*. Při užití této metody se podařil ověřit pouze *trans*-2-hexenal (aldehyd) a eukalyptol (monoterpen). Na γ -terpinene a terpinolene nebyla zaznamenána reakce tykadla v EAG přístroji. Syntetické standardy byly testovány při koncentraci 100 ng/ml. Použit byl rychlejší teplotní program plynového chromatografu.



Obrázek 23. Potvrzení látek na základě shodných retenčních časů syntetických standardů s retenčními časy látek v původní směsi. Červenými rámečky jsou vyznačeny látky, které se shodují na základě této metody a jsou to *trans*-2-hexenal, eukalyptol, γ -terpinene a terpinolene. Horní křivka náleží FID dynamického headspace *F. sylvatica*, pod ní FID aktivních látek a spodní křivka je FID uhlíků c8-c22. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru, případně velikost změny receptorového potenciálu z EAD. V obrázku jsou uvedena měřítka pro každou z měřících metod.



Obrázek 24. Potvrzení látek syntetickými standardy. Zde byly standardy o koncentraci 100 ng/ml prostřednictvím plynového chromatografu puštěny na tykadlo upnuté v elektroantenografu. Prokazatelná odpověď byla získána pouze pro *trans*-2-hexenal. Velmi slabá odpověď byla získána pro eukalyptol. Pro γ -terpinene a terpinolene se nepodařilo získat odpověď. Celkem bylo měření provedeno na 10 broucích, z důvodu přehlednosti jsou vybrána 3 reprezentativní měření. První 2 křivky náleží FID aktivních látek a FID alkanů c8-c22, spodní 3 křivky jsou EAD odpovědi tykadla na chemické podněty. Na ose X je znázorněn retenční čas. Na ose Y je vyobrazené množství energie vyzářené spálením látky v plamenném ionizačním detektoru, případně velikost změny receptorového potenciálu z EAD. V obrázku jsou uvedena měřítka pro každou z měřících metod.

5.8 Ověření čistoty standardů

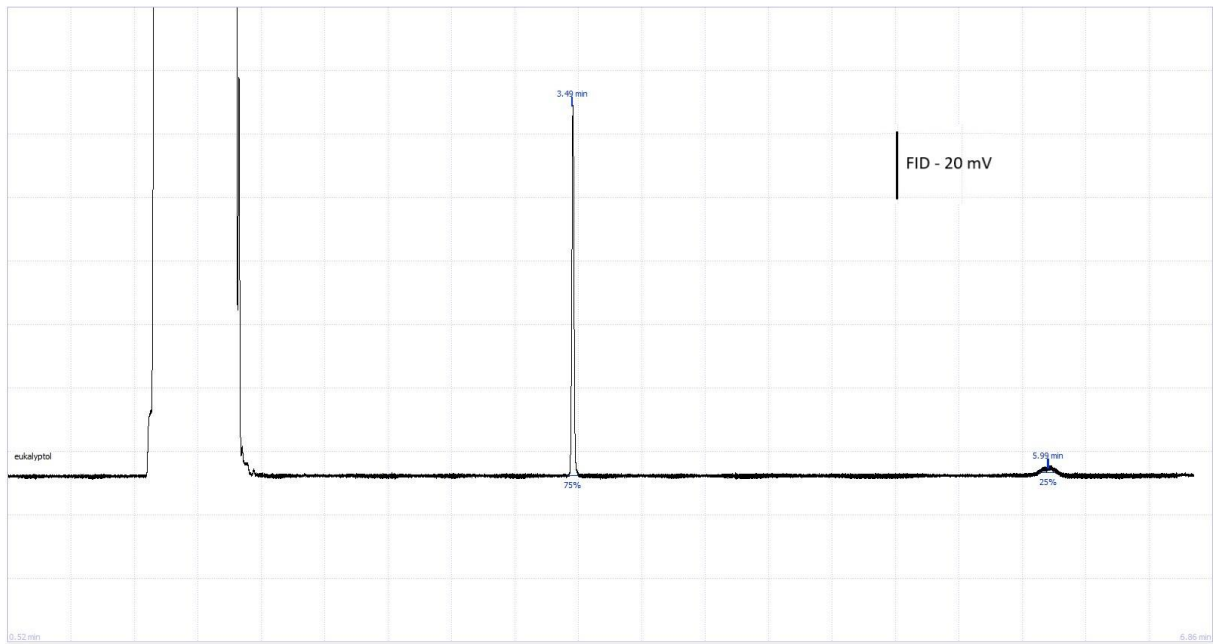
Finálním krokem bylo ověření čistoty syntetických standardů plynovou chromatografií s plamenným ionizačním detektorem. Výsledky byly porovnány s daty uváděnými výrobcí. Měření proběhlo za využití pomalejšího teplotního programu plynového chromatografu.

chemická látka	uváděná čistota výrobcem [%]	změřená čistota [%]	rozdíl
trans-2-hexenal	99	100	1
eukalyptol	99	75	24
γ-terpinene	97	91	6
terpinolene	85<	90	5

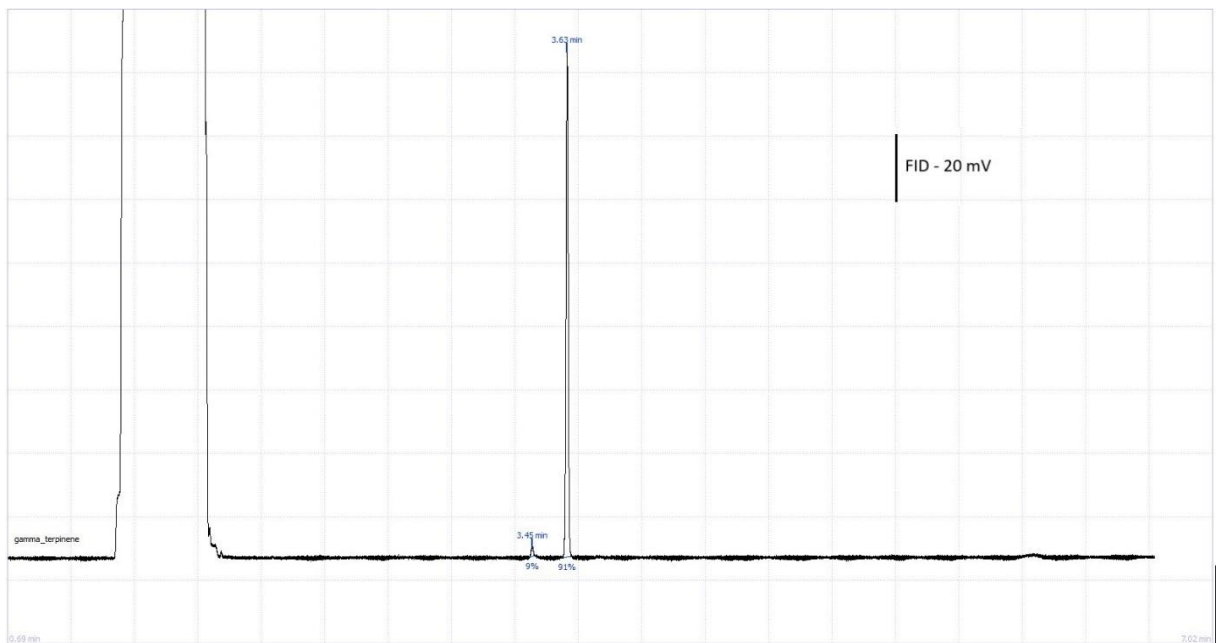
Tabulka 2. Vyhodnocení čistoty biologicky aktivních látek na tykadle *T. bicolor*. Změřená čistota byla získána porovnáním celkové sumy nežádoucích peaků z chromatogramu vůči největšímu peaku (látce uváděné výrobcem)



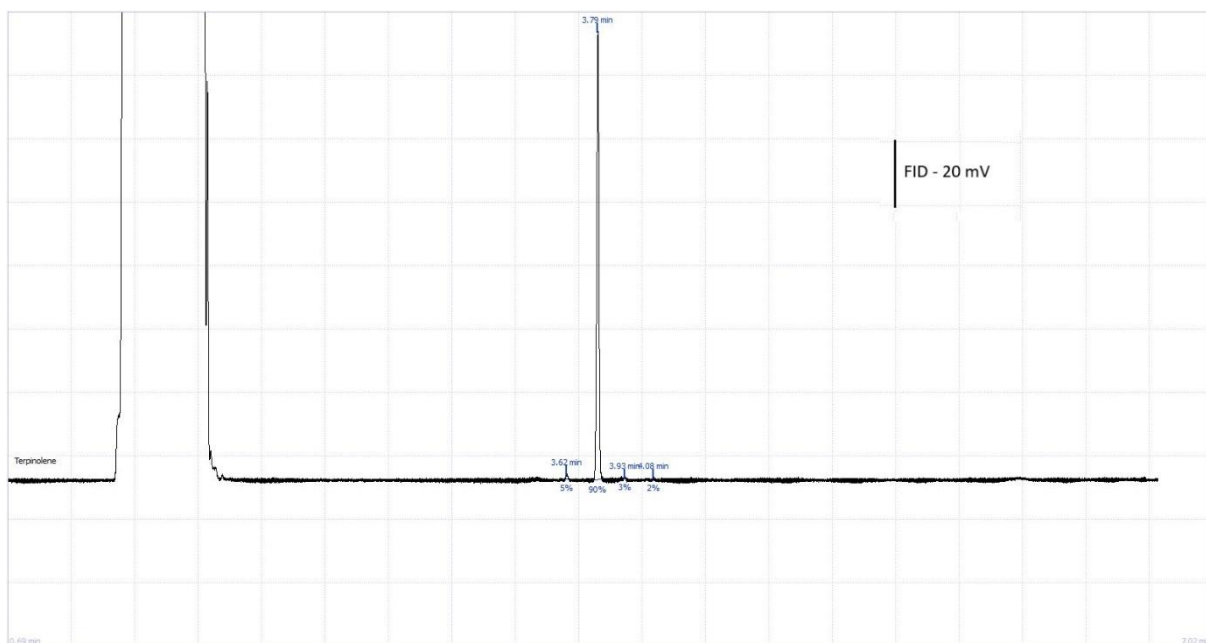
Obrázek 25. Grafické vyhodnocení čistoty *trans*-2-hexenalu z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí. Křivka FID *trans*-2-hexenalu.



Obrázek 26. Grafické vyhodnocení čistoty eukalyptolu z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí. Křivka FID eukalyptolu.



Obrázek 27. Grafické vyhodnocení čistoty γ -terpinenu z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí. Křivka FID γ -terpinenu.



Obrázek 28. Grafické vyhodnocení čistoty terpinolenu z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí. Křivka FID terpinolenu.

5.9 Diskuse

F. sylvatica je podle řady studií (Holzke a kol., 2006; Tollsten a Müller, 1996) silným emitorem těkavých látek. V této práci se ale tento trend zdá slabší. Prostřednictvím plynové chromatografie dynamického headspace *F. sylvatica* bylo zjištěno, že se směs látek nachází ve výrazně menších koncentracích nežli například u porovnávaného smrku ztepilého. Významným faktorem, který jímání mohl ovlivnit, bylo pravděpodobně roční období. Dindorf a kol. (2006); Holzke a kol. (2006) uvádí, že významnou proměnnou, která ovlivňuje složení a množství zastoupených chemických látek u *F. sylvatica* je doba, kdy jímání probíhá. V této studii byl dynamický headspace prováděn v září roku 2024. To se při srovnání s ostatními autory jeví jako měsíc, kdy u *F. sylvatica* výrazně klesá emise látek (Dindorf a kol., 2006; Holzke a kol., 2006), což se pravděpodobně podepsalo i na bohatosti jímané směsi. To se následně mohlo projevit na elektroantenografickém měření, jelikož ve směsi nemusely být zastoupené ty látky, na které by *T. bicolor* reagoval nebo mohly být přítomny pouze v malém, pro něj nepodstatném množství. To může souviset s jeho letovou aktivitou, která probíhá v dubnu a na přelomu června/července (Pfeffer, 1955). V tomto období je pro samečky tohoto druhu nejvíce podstatné, aby dokázali správně identifikovat hostitelskou dřevinu. To znamená, že čichové receptorové neurony na tykadle *T. bicolor* mohou být orientovány na látky, které jsou emitovány *F. sylvatica* do ovzduší v době, kdy probíhá jeho letová aktivita. Další proměnné, které jsou autory uváděny, jako například teplota nebo diurnální doba (Dindorf a kol., 2006; Leuschner, 2020; Šimpraga a kol., 2011; Tollsten a Müller, 1996), byly podchyceny metodikou prováděného dynamického headspace. Jímání probíhalo po dobu 24 hodin v klimatizované místnosti se standardizovanou teplotou (19.5 °C-20.5 °C). Vzorek ale nebyl vystaven přímé sluneční radiaci, která se rovněž uvádí jako podstatný faktor, který podporuje odpařování některých látek. Vyšší podíly alkoholů a aldehydů ve směsi se pravděpodobně vyskytly díky vadnutí asimilačního aparátu, což podporuje jejich uvolňování (Hatanaka a Harada, 1973).

Prvotním elektroantenografickým měřením bylo identifikováno 5 látek. Trans-2-hexenal, eukalyptol, γ -terpinene, terpinolene a bicolorin. Stěžejním tématem této práce byla identifikace hostitelských látek, které by biologicky reagovali na tykadle, ale nějakým způsobem se do směsi látek dostal i agregační feromon, který vycházel v čase 3.88 min (při užití rychlejšího teplotního programu plynového chromatografu). Jeho potvrzení proběhlo metodou dvoudimenzionálního plynového chromatografu s hmotnostní spektrometrií, potvrzeného retenčním časem. V původním, jednodimenzionálním chromatogramu se tato látka nacházela

v extrémně nízkém, až stopovém množství. I přes nízkou koncentraci, ale došlo k vyvolání velké odezvy na tykadle kůrovce. To svědčí o významu agregačního feromonu pro lýkožrouty obecně, jelikož díky tohoto mechanismu jsou schopni překonávat hostitelovu obranu (Vité a kol, 1968). Dickens (1981), porovnával velikosti elektroantenografických odpovědí různých koncentrací feromonu a některých hostitelských látek ze smrku ztepilého a zjistil, že *I. typographus* reaguje na *cis*-verbenol (jednu ze složek agregačního feromonu) při velmi nízkých koncentracích (0,01 µg byla prahová hodnota pro *cis*-verbenol, zatímco na α -pinen reagoval až při koncentraci 10 µg). Bicolorin se pravděpodobně dostal do směsi dynamického headspace *F. sylvatica* společně s infikovaným organickým materiálem *F. sylvatica*. Ačkoliv před jímáním látek nebyly pozorovány žádné závrtky, je jediným vysvětlením, že se brouk, případně organické zbytky po něm – drtinky (ve kterých se nachází agregační feromon) (Miller, 1990) v lýku musely vyskytovat. Znečištění v průběhu měření z okolního prostředí není pravděpodobné, jelikož bylo uskutečněno kontrolní jímání. K tomu sloužilo 7 kapilárních trubiček se sorbentem (PorapakQ), které po analýze plynovým chromatografem s plamennou ionizační detekcí nejevily žádné známky znečištění (na chromatogramu, v retenčním čase, kdy vycházel bicolorin nebyl pozorován žádný peak). Zajímavostí je, že bicolorin, který se nacházel v dynamickém headspace *F. sylvatica*, vyvolával srovnatelně velkou odpověď na tykadle jako syntetický standard o koncentraci 100 ng/ml, což už je poměrně vysoké množství, které plynový chromatograf s plamennou ionizační detekcí dokáže zachytit. Tudíž bude prahová hodnota pro tuto látku pravděpodobně velice nízkou položena, stejně tak jako saturační bod, po jehož přesažení již velikost odpovědi neroste.

Překvapivým zjištěním bylo, že *T. bicolor* nereagoval na významné terpeny, které se ve směsi buku lesního nacházely (α -pinene, β -pinene, sabinene, perillene). Celkové množství látek, na které reagoval, bylo poměrně malé. Pro srovnání uvádím *I. typographus*, který reaguje na velké množství látek z *P. abies*, jako například na 1,8-cineole, *trans*-4-thujanol, p-cymene, α -pinene, S,S-*trans*-conophorin a další (Kandasamy a kol, 2019; Čereškienė a kol., 2016). To může být způsobeno dostatečnou specificitou směsi látek z *F. sylvatica* oproti ostatním listnatým dřevinám na jejímž základě se *T. bicolor* dokáže v přírodě orientovat. Případně mohou být uvolňovány vysoce specifické látky pro buk, díky kterým ho dokáže odlišit od ostatních dřevin. O heterogenitě volatilních látek hovořil ve své publikaci Özgenç a kol. (2017). Zde bylo pomocí plynové chromatografie odhaleno spektrum látek u několika druhů dřevin a je patrné, že se tyto lišily mezi jednotlivými druhy. Částečná diferenciaci je i u dřevin stejného druhu v závislosti na genetické dispozici, což ale ovlivňuje spíše kvantitativní proměnnou –

koncentraci, nežli kvalitativní – konkrétní spektrum látek (Meeningen a kol., 2016). Dalším faktorem je dříve zmíněné roční období, ve kterém jímání proběhlo, což mohlo způsobit absenci některých látek. Tím pádem látky, které jsou významné pro *T. bicolor*, nemusely být podchyceny z důvodu zvolené metodiky – jímání látek v období, kdy je jejich emise utlumena.

Jediná látka, která byla s jistotou identifikována (potvrzena prostřednictvím syntetického standardu plynovou chromatografií s elektroantenální detekcí) je aldehyd – *trans*-2-hexenal, který vycházel v retenčním čase 2.38 min (při užití pomalejšího teplotního programu plynového chromatografu). Důsledky této látky na chování *T. bicolor* by bylo potřeba otestovat behaviorálními pokusy. Bylo ale zjištěno, že tato látka je pro tohoto lýkožrouta důležitá a pravděpodobně se podílí na modulaci rozhodnutí o kolonizaci hostitelského stromu. Jelikož *trans*-2-hexenal spadá do skupiny green leaf volatiles, tak je předpokládáno, že se bude jednat o atraktant, na jehož základě jsou schopni odlišit *F. sylvatica* od jiných jehličnatých dřevin, u kterých se tyto skupiny volatilních látek nevyskytují. Zároveň je to látka spojená s vadnutím asimilačního aparátu (Hatanaka a Harada, 1973). Tím pádem by pro *T. bicolor* mohlo být znamením, že se jedná o vhodného jedince ke kolonizaci, jelikož byla narušena jeho vitalita a dochází ke slábnutí. To především díky jeho životní strategii, jelikož napadá odumírající stromy, případně polámané větve, či jiné části stromů, spadajících do kategorie nehroubí (Pfeffer, 1955).

Druhá látka, na základě chronologického řazení dle retenčních časů z plynové chromatografie byl eukalyptol, který vycházel v čase 3.39 min. Zde byla evidována mírná aktivita na tykadle *T. bicolor*, ale nedostatečně průkazná na to, aby se dalo s jistotou říct, že je biologicky aktivní. Při testování syntetickým standardem o koncentraci 100 ng/ml, která je nižší, než jeho hodnota v původním headspace došlo k vyvolání malé odpovědi. Po následném zvýšení koncentrace na 1 mg/ml, která více refletovala koncentraci z původního headspace, ale nedošlo ke zvýšení odpovědi. Potencionální záměna mohla být s limonenem. Ten vychází v podobném čase jako zmíněný eukalyptol. Při rychlejším teplotním programu plynového chromatografu dokonce tvořily koeluci, což znamená, že není možné látky odlišit při využití jednodimenzionální plynové chromatografie. Z tohoto důvodu byl testován na tykadle rovněž limonen (100 ng/ml) v obou enantiomerických provedeních, ale ani u něj nebyla registrována odpověď na elektroantenografickém záznamu (data neprezentována).

Látky γ -terpinene a terpinolen, které byly identifikovány jako biologicky aktivní, nevyvolaly při ověřování syntetickými standardy žádnou odpověď. Možným problémem mohla být enantiomerická specifita použitých standardů, ale informace o rozdílné stereoisomerii nebyly nalezeny. U jednoho z komponent agregačního feromonu *I. typographus* – verbenolu byl popsán jev, kdy brouk reaguje pouze na *cis* provedení této látky a na *trans* výrazně méně (Dickens, 1981). Druhou možností je chybné určení biologicky aktivních látek na tykadle *T. bicolor*. Tato varianta není předpokládána, jelikož došlo k ověření na základě více faktorů. Dvoudimenzionální plynovou chromatografií došlo k úplné separaci veškerých látek ze směsi dynamického headspace. Po porovnání retenčních časů došlo k identifikaci látek *trans*-2-hexenal, eukalyptol, γ -terpinene a terpinolene. Jediná potenciální nuance mohla nastat u eukalyptolu, který mohl být zaměněn s limonenem, ale potvrzení aktivity synteticky vyrobeného limonenu na tykadle se rovněž nepodařilo. Další metodou, kterou byly látky potvrzeny, bylo porovnání původních elektroantenografických odpovědí s chromatografickými (FID) výstupy syntetických standardů. Zde bylo pozorováno, že látky vychází ve stejné časy, kdy byly původní odpovědi zaznamenány. Dalším porovnáním byla komparace výstupů z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí. U této metody byly porovnány retenční časy peaků z původní směsi dynamického headspace *F. sylvatica* s retenčními časy peaků, získanými analýzou směsi syntetických standardů. V tomto případě bylo opět pozorováno, že se látky v obou směsích shodují. Poslední metodou bylo porovnání látek s dříve vydanými publikacemi. Zdali se těkavé látky shodují s profilem látek, který byl u *F. sylvatica* publikován dříve (Tollsten a Müller, 1996). Bylo zjištěno, že se identifikované volatilní látky u *F. sylvatica* shodují se studií. Na základě těchto metod byly látky identifikovány. Absence odpovědi tykadla na syntetické standardy γ -terpinene a terpinolene byl faktor, který se nepodařilo zcela objasnit.

Výsledky byly získány grafickým vyhodnocením chromatogramů a elektroantogramů. Nemožnost použití statistických metod spočívala v obtížnosti získání numerických dat. Na křivce elektroantografu se výrazným podílem projevuje šum, který nelze zcela eliminovat. Potenciálním upravením srovnávací hladiny (base line) by mohlo dojít k vyfiltrování malých odpovědí na látky, které se nacházejí v nízkých koncentracích. Druhým faktorem je výskyt artefaktů, což jsou zkratky přístroje. Jelikož se jedná o velice senzitivní součástku, která je ovlivněna řadou okolních faktorů, jako například teplotou, prouděním vzduchu, elektromagnetickým vlněním. Tyto by musely být z elektroantogramů ručně odstraněny. Jejich eliminace lze dosáhnout více měřeními. Zde když dojde k opakované odpovědi tykadla

na elektroantenografickém záznamu a synchronizaci se zaznamenáním látky z plynového chromatografu s plamennou ionizační detekcí, tak je látka považována za aktivní (vyvolává odpověď). Jinak, nežli opakovanými pokusy nejdou artefakty od skutečných odpovědí odlišit. Rovněž velikost odpovědi tykadla není standardní a ovlivňuje ji řada faktorů. Mezi ty nejvýznamnější patří vitalita brouka a stres. Další proměnnou je přiložení měřící elektrody na tykadlo. To se v této práci snažilo realizovat vždy stejným způsobem, ale jelikož se jedná o zahrnutí senzil o průměru mikrometrů, není možné zaručit, že se vždy podařilo přiložit elektrodu na kompletně stejnou oblast. A jelikož se na různých místech nachází různě laděné senzily (s různými čichovými receptorovými neurony, jako například oblasti odpovědné za percepci feromonů nebo hostitelských vůní – Andersson a kol., 2009), může dojít k ovlivnění velikosti odpovědi na stimulus.

6 Závěr

Stanovené cíle této práce byly z velké části naplněny. Podařilo se identifikovat látky (trans-2-hexenal, eukalyptol, γ -terpinene a terpinolene), které se přirozeně nacházejí ve směsi těkavých látek buku lesního a jsou biologicky aktivní na tykadle *T. bicolor*. Trans-2-hexenal se podařilo ověřit i při zpětném testování biologické aktivity na tykadle prostřednictvím syntetického standardu. Zbylé látky se syntetickými standardy nepodařilo ověřit. Důvod tohoto fenoménu není objasněn. Pro budoucí bádání v této oblasti by bylo vhodné, zaměřit se na potvrzení ověření standardů látek na tykadle, které byly v této práci identifikovány a následně zjistit, jak jsou kůrovcem vyhodnocovány a co pro něj znamenají. K tomu by vhodně posloužily behaviorální pokusy (olfaktometrie) na jejichž základě by se dalo zjistit, jestli lýkožrouta lákají nebo odpuzují. Případně lze látky testovat přímo v polních podmínkách přidáním k feromonem navnaděným pastem. Dalším možnou návaznou studií by mohlo být testování látek z *F. sylvatica*, které by byly jímány ve vegetačním období (větší emise látek) Mimo hostitelské látky se podařilo na základě hmotnostní spektrometrie a retenčních indexů identifikovat ještě agregační feromon – bicolorin. Ten vyvolával velkou elektroantenografickou odpověď, i když byl ve směsi zastoupen ve velice malém, téměř (FIDem s jednodimenzionální plynovou chromatografií) nevidovatelném množství. Příčina jeho výskytu ve směsi není známa, ale pravděpodobně se jedná o využití infestovaného biologického materiálu *F. sylvatica*, který před provedením dynamického headspace přišel do kontaktu s *T. bicolor*. Identifikované látky by mohly najít praktické využití při integrované ochraně lesa. Například jako amplifikátory působnosti agregačního feromonu (bicolorinu) při vnazení kontrolních zařízení na zjišťování abundance populací. V případě, že by se jednalo o antiatraktanty, by se daly prvky využít ke zvýšení chemické heterogenity stanoviště a tím zmenšit důsledky jeho působení.

7 Literatura

7.1 Tištěné zdroje

ALI, M. F.; MORGAN, E. D. chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. 1990, s. 227-247. ISBN 978-1-78923-827-3. Dostupné

z: https://campus.murraystate.edu/academic/faculty/tderting/bio116/CHEMICAL_COMMUNICATION_IN_INSECT_COMMUNI.pdf.

ANDERSSON, M. N.; LARSSON, M. C.; 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, roč. 55, č. 6, s. 556-567. ISSN 00221910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.01.018>.

ANDERSSON, M. N. Olfaction in the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus*. Doktorská práce. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 2011. Dostupné z: https://pub.epsilon.slu.se/2428/1/andersson_m_110114.pdf

ANDERSSON, M. N. Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche: A Journal of Entomology*. 2012, roč. 2012, s. 1-14. ISSN 0033-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/149572>.

ANDERSSON, M. N.; GROSSE-WILDE, E.; KEELING, CH. I.; BENGTSSON, J. M.; YUEN, M. MS.; LI, M.; BOHLMANN, J.; HANSSON, S. B.; SCHLYTER, F. Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in the tree killing bark beetles, *Ips typographus* and *Dendroctonus ponderosae*(Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *BMC Genomics*. 2013, roč. 14, č. 1. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-198>.

ASTASHKO, D. A.; ULASHCHIK, E. A.; TYVORSKII, V. I. Synthesis of (±)-bicolorin, the aggregation pheromone of beech bark beetle *Taphrorychus bicolor*. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2013, roč. 49, č. 12, s. 1803-1806. ISSN 1070-4280. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S1070428013120154>.

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; TAŞDEMİR, S. Anticancer and Antioxidant Properties of Terpinolene in Rat Brain Cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2013, roč. 64, č. 3, s. 415-424. ISSN 0004-1254. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>.

BAKKE, A. Evidence of a population aggregating pheromone in *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Biology, Environmental Science*. 1970. Dostupné z: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19700606513>

BAKKE, A.; KVAMME, T. Kairomone response in *Thanasimus* predators to pheromone components of *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology*. 1981, roč. 7, č. 2, s. 305-312. ISSN 0098-0331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00995753>.

BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; SOUZA, C. F.; GRESSLER, L. T.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*. 2016, roč. 162, s. 43-48. ISSN 00144894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.004>.

BETT, M. K.; SAINI, R. K. a HASSANALI, A. Repellency of tsetse-refractory waterbuck (*Kobus defassa*) body odour to *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*. 2015, roč. 146, s. 17-24. ISSN 0001706X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.017>.

BLAŽYTĚ-ČEREŠKIENĚ, L.; APŠEGAITĚ, V.; RADŽIUTĚ, S.; MOZŪRAITIS, R.; BŪDA, V.; PEČIULYTĚ, D. Electrophysiological and behavioural responses of *Ips typographus* (L.) to *trans*-4-thujanol—a host tree volatile compound. *Annals of Forest Science*. 2016, roč. 73, č. 2, s. 247-256. ISSN 1286-4560. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0494-5>.

BROWN, W. L.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers. *BioScience*. 1970, roč. 20, č. 1, s. 21-22. ISSN 00063568. Dostupné z: <https://doi.org/10.2307/1294753>.

BYERS, J. A.; BIRGERSSON, G.; LÖFQVIST, J.; APPELGREN, M.; BERGSTRÖM, G. Isolation of pheromone synergists of bark beetle, *Pityogenes chalcographus*, from complex insect-plant odors by fractionation and subtractive-combination bioassay. *Journal of Chemical Ecology*. 1990, roč. 16, č. 3, s. 861-876. ISSN 0098-0331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01016496>.

BYERS, J. A. An encounter rate model of bark beetle populations searching at random for susceptible host trees. *Ecological Modelling*. 1996, roč. 91, č. 1-3, s. 57-66. ISSN 03043800. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(95\)00166-2](https://doi.org/10.1016/0304-3800(95)00166-2).

CARDÉ, R. T.; MINKS, A. K. Control of Moth Pests by Mating Disruption: Successes and Constraints. *Annual Review of Entomology*. 1995, roč. 40, č. 1, s. 559-585. ISSN 0066-4170. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.003015>.

CARRASCO, D.; LARSSON, M. C; ANDERSON, P. Insect host plant selection in complex environments. *Current Opinion in Insect Science*. 2015, roč. 8, s. 1-7. ISSN 22145745. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.014>.

CORK, A.; BEEVOR, P. S.; GOUGH, A. J. E.; HALL, D. R. Gas Chromatography Linked to Electroantennography: A Versatile Technique for Identifying Insect Semiochemicals. *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*. 1990, s. 271-279. ISBN 978-1-4684-8064-1. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8062-7_26.

Česko. Ministerstvo zemědělství. Vyhláška č. 101 ze dne 28. března 1996, kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor služebního odznaku a vzor průkazu lesní strážce. In *Sbírka zákonů České republiky*. 1996, částka 33, s. 1124–1127. ISSN 1211-1244. Dostupné z http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=101/1996&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. [cit. 2024-03-23].

DAS, P. P. Fabrication of a vertical Y-tube olfactometer for the assessment of spatial repellency of essential oils against *Helopeltis theivora* waterhouse: A Versatile Technique for Identifying Insect Semiochemicals. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2022, roč. 42, č. 1, s.

835-844. ISBN 978-1-4684-8064-1. ISSN 1742-7592. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00607-3>.

DE CHRISTO SCHERER, M. M.; MARQUES, F. M.; FIGUEIRA, M. M.; PEISINO, M. C. O.; SCHMITT, E. F. P.; KONDRATYUK, T. P.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. *Journal of Tissue Viability*. 2019, roč. 28, č. 2, s. 94-99. ISSN 0965206X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.02.003>.

DICKENS, J. C. Behavioural and electrophysiological responses of the bark beetle, *Ips typographus*, to potential pheromone components. *Physiological Entomology*. 1981, roč. 6, č. 3, s. 251-261. ISSN 0307-6962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1981.tb00269.x>.

DINDORF, T.; KUHN, U.; GANZVELD, L.; SCHEBESKE, G.; CICCIOLO, P.; HOLZKE, R.; KÖBLE, R.; SEUFERT, G. Significant light and temperature dependent monoterpene emissions from European beech (*Fagus sylvatica* L.) and their potential impact on the European volatile organic compound budget. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 2006, roč. 111, č. D16. ISSN 0148-0227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1029/2005JD006751>.

DUDUMAN, M.-L.; BERÁNKOVÁ, K.; JAKUŠ, R.; HRADECKÝ, J.; JIROŠOVÁ, A. Efficiency and Sustainability of *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae) Pheromone Dispensers with Different Designs. *Forests*. 2022, roč. 13, č. 4. ISSN 1999-4907. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/f13040511>.

DURRANT, T. H.; DE RIGO, D.; CAUDULLO, G. *Fagus sylvatica* and other beeches in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg. 2016. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/299468838_Fagus_sylvatica_in_Europe_distribution_habitat_usage_and_threats

DVOŘÁK, M.; PALOVČÍKOVÁ, D.; JANKOVSKÝ, L. The occurrence of endophytic fungus *Phomopsis oblonga* on elms in the area of southern Bohemia. *Journal of Forest Science*. 2006, roč. 52, č. 11, s. 531-535. ISSN 12124834. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/4533-JFS>.

HALLEM, E. A.; CARLSON, J. R. Coding of Odors by a Receptor Repertoire. *Cell*. 2006, roč. 125, č. 1, s. 143-160. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.050>.

ELKINTON, J. S.; CARDÉ, R. T. Effect of Wild and Laboratory-reared Female Gypsy Moths, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae), on the Capture of Males in Pheromone-baited Traps. *Environmental Entomology*. 1984, roč. 13, č. 5, s. 1377-1385. ISSN 1938-2936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ee/13.5.1377>.

EL-GHANY, N. M. A. Pheromones and Chemical Communication in Insects. *Pests, Weeds and Diseases in Agricultural Crop and Animal Husbandry Production*. 2020. ISBN 978-1-78923-827-3. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.92384>.

FERRACINI, CH.; BOIVIN, G.; ALMA, A. Costs and benefits of host feeding in the parasitoid wasp *Trichogramma turkestanica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2006, roč. 121, č. 3, s. 229-234. ISSN 0013-8703. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00479.x>.

FRANCKE, W.; BARTELS, J.; MEYER, H.; SCHRÖDER, F.; KOHNLE, U.; BAADER, E.; VITÉ, J. P. Semiochemicals from bark beetles: New results, remarks, and reflections. *Journal of Chemical Ecology*. 1995, roč. 21, č. 7, s. 1043-1063. ISSN 0098-0331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02033807>.

FRANCKE, W.; SCHRODER, F.; KOHNLE, U.; SIMON, M. Synthesis of (1S,2R,5R)-2-ethyl-1,5-dimethyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane, the aggregation pheromone of male beech bark beetles, *Taphrorychus bicolor* (Col, Scol). 1996. S. 1523-1527. ISSN 0947-3440. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:A1996VN45500004>.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. Effect of trans-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity. *Letters in*

Applied Microbiology. 2001, roč. 33, č. 1, s. 50-55. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00956.x>.

HENNION, M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 1999, roč. 856, č. 1-2, s. 3-54. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00832-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00832-8).

HEYMAN, Y.; VILK, Y.; FEINERMAN, O. Ants Use Multiple Spatial Memories and Chemical Pointers to Navigate Their Nest. IScience. 2019, roč. 14, s. 264-276. ISSN 25890042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.003>.

CHENG, L.; XU, S.; XU, CH.; LU, H.; ZHANG, Z.; ZHANG, D.; MU, W.; LIU, F. Effects of *trans*-2-hexenal on reproduction, growth and behaviour and efficacy against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Pest Management Science. 2017, roč. 73, č. 5, s. 888-895. ISSN 1526-498X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ps.4360>.

ITO, K.; ITO, M. The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure–activity relationships. Journal of Natural Medicines. 2013, roč. 67, č. 4, s. 833-837. ISSN 1340-3443. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0732-1>.

JANKOWIAK, R.; KACPRZYK, M.; MŁYNARCZYK, M. Diversity of ophiostomatoid fungi associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) colonizing branches of Norway spruce (*Picea abies*) in southern Poland. Biologia. 2009, roč. 64, č. 6, s. 1170-1177. ISSN 0006-3088. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/s11756-009-0188-2>.

JELEŃ, H.; GRACKA, A.; MYŚKÓW, B. Static Headspace Extraction with Compounds Trapping for the Analysis of Volatile Lipid Oxidation Products. Food Analytical Methods. 2017, roč. 10, č. 8, s. 2729-2734. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0838-x>.

JIROŠOVÁ, A.; KALINOVÁ, B.; MODLINGER, R.; JAKUŠ, R.; UNELIUS, C. R.; BLAŽENEC, M.; SCHLYTER, F. Anti-attractant activity of (+)- *trans*-4-thujanol for Eurasian spruce bark beetle *Ips typographus*: Novel potency for females. Pest Management Science.

2022, roč. 78, č. 5, s. 1992-1999. ISSN 1526-498X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ps.6819>.

JOACHIM, CH. Costs and Benefits of Alarm Communication in Aphids. Doktorská práce. Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung. 2014. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/299800611_Costs_and_Benefits_of_Alarm_Communication_in_Aphids.

JUERGENS, U.R; DETHLEFSEN, U; STEINKAMP, G; GILLISSEN, A; REPGES, R; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*. 2003, roč. 97, č. 3, s. 250-256. ISSN 09546111. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/rmed.2003.1432>.

KALINOVÁ, B.; BŘÍZOVÁ, 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, roč. 8, č. 4, s. 305-316. ISSN 1872-8855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9310-7>.

KANAVOURAS, A.; KIRITSAKIS, A.; HERNANDEZ, R. J. Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chemistry*. 2005, roč. 90, č. 1-2, s. 69-79. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.025>.

KANDASAMY, A.; GERSHENZON, J.; ANDERSSON, M. N; HAMMERBACHER, A. Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *The ISME Journal*. 2019, roč. 13, č. 7, s. 1788-1800. ISSN 1751-7362. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0390-3>.

KASANG, G.; SCHNEIDER, D.; SCHÄFER, W. The silkworm moth *Bombyx mori*. *Naturwissenschaften*. 1978, roč. 65, č. 6, s. 337-338. ISSN 0028-1042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00368376>.

KEELING, CH. I.; CHIU, CH. C.; AW, T.; LI, M.; HENDERSON, H.; TITTIGER, C.; WENG, H.-B.; BLOMQUIST, G. J.; BOHLMANN, J. Frontalin pheromone biosynthesis in the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*, and the role of isoprenyl diphosphate synthases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013, roč. 110, č. 47, s. 18838-18843. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1316498110>.

KNÍŽEK, M.; ZAHRADNÍK, P. Kůrovci na jehličnanech. Silvarium Lesní ochranná služba. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jíloviště-Strnady. 2004 Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2004/2004_kurovci.pdf.

KOST, C. Chemical Communication. Encyclopedia of Ecology. 2008, s. 557-575. ISBN 9780080454054. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00036-7>.

KOT, J. Experiments in the biology and ecology of species of the genus *Trichogramma* west W. and their use in plant protection. Warszawa. Komitet ekologiczny-Polska akademia NAUK Ekologia Polska seria A. 1964. Dostupné z: https://rcin.org.pl/Content/69328/PDF/WA058_86071_P2840-T12-Eko-Pol-A-Nr-15.pdf.

KREMSER, A.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. Systematic comparison of static and dynamic headspace sampling techniques for gas chromatography. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2016, roč. 408, č. 24, s. 6567-6579. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9843-y>.

LAKATOS, F.; MOLNÁR, M. Mass Mortality of Beech (*Fagus sylvatica* L.) in South-West Hungary. Acta Silvatica et Lignaria Hungarica. 2009, roč. 5, č. 1, s. 75-82. ISSN 1787-064X. Dostupné z: <https://doi.org/10.37045/aslh-2009-0006>.

LEUSCHNER, CH. Drought response of European beech (*Fagus sylvatica* L.)—A review. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 2020, roč. 47. ISSN 14338319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2020.125576>.

HAGIWARA, T.; SHIOJIRI, K. Within-plant signaling via volatiles in beech (*Fagus crenata* Blume). Journal of Plant Interactions. 2020, roč. 15, č. 1, s. 50-53. ISSN 1742-9145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1742393>.

HAGIWARA, T.; ISHIHARA, M. I.; TAKABAYASHI, J.; HIURA, T.; SHIOJIRI, K. Effective distance of volatile cues for plant–plant communication in beech. *Ecology and Evolution*. 2021, roč. 11, č. 18, s. 12445-12452. ISSN 2045-7758. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ece3.7990>.

HATANAKA, A.; HARADA, T. Formation of cis-3-hexenal, trans-2-hexenal and cis-3-hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves. *Phytochemistry*. 1973, roč. 12, č. 10, s. 2341-2346. ISSN 00319422. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80435-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80435-2).

HOLZE, H.; SCHRADER, L.; BUELLESBACH, J. Advances in deciphering the genetic basis of insect cuticular hydrocarbon biosynthesis and variation. *Heredity*. 2021, roč. 126, č. 2, s. 219-234. ISSN 0018-067X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41437-020-00380-y>.

HOLZKE, C.; DINDORF, T.; KESSELMEIER, J.; KUHN, U.; KOPPMANN, R. Terpene emissions from European beech (shape *Fagus sylvatica*~L.): Pattern and Emission Behaviour Over two Vegetation Periods. *Journal of Atmospheric Chemistry*. 2006, roč. 55, č. 1, s. 81-102. ISSN 0167-7764. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10874-006-9027-9>.

HULCR, J.; ATKINSON, T. H.; COGNATO, A. I.; JORDAL, B. H.; MCKENNA, D. D. Morphology, Taxonomy, and Phylogenetics of Bark Beetles. *Bark Beetles*. 2015, s. 41-84. ISBN 9780124171565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417156-5.00002-2>.

MATSUMOTO, S.; HULL, J. J.; OHNISHI, A.; MOTO, K.; FÓNAGY, A. Molecular mechanisms underlying sex pheromone production in the silkworm, *Bombyx mori*: Characterization of the molecular components involved in bombykol biosynthesis. *Journal of Insect Physiology*. 2007, roč. 53, č. 8, s. 752-759. ISSN 00221910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.02.014>.

MA, CH.; YUE, Y.; ZHANG, Y.; TIAN, Z.-Y.; CHEN, H.-S.; GUO, J.-Y.; ZHOU, Z.-S. Scanning Electron Microscopic Analysis of Antennal Sensilla and Tissue-Expression Profiles of Chemosensory Protein Genes in *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insects*. 2022, roč. 13, č. 2. ISSN 2075-4450. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/insects13020183>.

MENCO, B. PH. M.; VAN DER WOLK, F. M. Freeze-fracture characteristics of insect gustatory and olfactory sensilla. *Cell and Tissue Research*. 1982, roč. 223, č. 1, s. 1-27. ISSN 0302-766X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00221496>.

MENEZES, T. O.; SCHERF, J. R.; MARTINS, A. O. B. P. B.; RAMOS, A. G. B.; QUINTANS, J. D. S. S.; COUTINHO, H. D. M.; RIBEIRO-FILHO, J.; DE MENEZES, I. R. A. Biological properties of terpinolene evidenced by in silico, in vitro and in vivo studies: A systematic review. *Phytomedicine*. 2021, roč. 93. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153768>.

MILLER, D. R. Reproductive and ecological isolation: community structure in the use of semiochemicals by pine bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). Doktorská práce. Kanada: Department of biological sciences, Simon Fraser University, 1990. Dostupné z: https://summit.sfu.ca/flysystem/fedora/sfu_migrate/4709/b14461638.pdf.

MINORETTI, N.; WEISSER, W. W. The impact of individual ladybirds (*Coccinella septempunctata*, Coleoptera: Coccinellidae) on aphid colonies. *European Journal of Entomology*. 2000, roč. 97, č. 4, s. 475-479. ISSN 12105759. Dostupné z: <https://doi.org/10.14411/eje.2000.073>.

MZE. zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2022. 2022. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/portal/-a30268---rWtfkQZD/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho-hospodarstvi-ceske-republiky-v-roce-2022-strucna-verze>.

NAUDÉ, Y.; MAKUWA, R.; MAHARAJ, V. Investigating volatile compounds in the vapour phase of (1) a hot water infusion of rhizomes, and of (2) rhizomes of *Siphonochilus aethiopicus* using head space solid phase microextraction and gas chromatography with time of flight mass spectrometry. *South African Journal of Botany*. 2016, roč. 106, s. 144-148. ISSN 02546299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.006>.

NERI, F.; MARI, M.; MENNITI, A. M.; BRIGATI, S.; BERTOLINI, P. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biology and Technology*. 2006, roč. 41, č. 1, s. 101-108. ISSN 09255214. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.02.005>.

NOWIŃSKA, A.; BROŹEK, J. Morphological study of the antennal sensilla in *Gerromorpha* (Insecta: Hemiptera. Zoomorphology. 2017, roč. 136, č. 3, s. 327-347. ISSN 0720-213X.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00435-017-0354-y>.

OLSSON, S. B.; HANSSON, B. S. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. Pheromone Signaling. Methods in Molecular Biology. 2013, s. 157-177.

ISBN 978-1-62703-618-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-619-1_11.

OWAGA, M. L. A. Observations on the efficacy of buffalo urine as a potent olfactory attractant for *Glossina pallidipes* Austen. *International Journal of Tropical Insect Science*. 1985, roč. 6,

č. 05, s. 561-566. ISSN 1742-7584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S1742758400009097>.

ÖZGENÇ, Ö.; DURMAZ, S.; ÇELİK, G.; KORKMAZ, B. a YAYLI, N. Comparative phytochemical analysis of volatile organic compounds by SPME-GC-FID/MS from six coniferous and nine deciduous tree bark species grown in Turkey. *South African Journal of Botany*. 2017, roč. 113, s. 23-28. ISSN 02546299. Dostupné

z: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.004>.

PAWLOWSKI, S. P.; SWEENEY, J. D.; HILLIER, N. K. Electrophysiological Responses of the Beech Leaf-Mining Weevil, *Orchestes fagi*, to Seasonally-Variant Volatile Organic Compounds Emitted by American Beech, *Fagus grandifolia*. *Journal of Chemical Ecology*.

2020, roč. 46, č. 10, s. 935-946. ISSN 0098-0331. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/s10886-](https://doi.org/10.1007/s10886-020-01216-z)

[020-01216-z](https://doi.org/10.1007/s10886-020-01216-z).

PELLEGRINO, M.; NAKAGAWA, T.; VOSSHALL, L. B. Single Sensillum Recordings in the Insects *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae*. *Journal of Visualized Experiments*. 2010, č. 36. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/1725>.

PETERS, R. S.; ABRAHAM, R. A wind tunnel olfactometer of novel design: Testing the response to substrate volatiles on a vertical gauze screen. *Entomol. Mitt. zool. Mus. Hamburg*.

Roč. 2009. Dostupné z: https://www.zobodat.at/pdf/Ent-Mitt-Zool-Mus-Hamburg_15_0127-0133.pdf.

PODSKALSKÁ, H.; RŮŽIČKA, J.; HOSKOVEC, M.; ŠÁLEK, M. Use of infochemicals to attract carrion beetles into pitfall traps. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2009, roč. 132, č. 1, s. 59-64. ISSN 0013-8703. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00871.x>.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Γ -Terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1978, roč. 191, č. 1, s. 400-411. ISSN 00039861. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90104-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90104-2).

POWELL, D.; GROBE-WILDE, E.; KROKENE, P.; ROY, A.; CHAKRABORTY, A.; LÖFSTEDT, CH.; VOGEL, H.; ANDERSSON, M. N.; SCHLYTER, F. A highly-contiguous genome assembly of the Eurasian spruce bark beetle, *Ips typographus*, provides insight into a major forest pest. *Communications Biology*. 2021, roč. 4, č. 1. ISSN 2399-3642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02602-3>.

DE OLIVIERA RAMALHO, T. R.; DE OLIVIERA, M. T. P.; DE ARAUJO LIMA, A. L.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. Gamma-Terpinene Modulates Acute Inflammatory Response in Mice. *Planta Medica*. 2015, roč. 81, č. 14, s. 1248-1254. ISSN 0032-0943. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546169>.

RAMAKRISHNAN, R.; HRADECKÝ, J.; ROY, A.; KALINOVÁ, B.; MENDEZES, R. C.; SYNEK, J.; BLÁHA, J.; SVATOŠ, A.; JIROŠOVÁ, A. Metabolomics and transcriptomics of pheromone biosynthesis in an aggressive forest pest *Ips typographus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2022, roč. 140. ISSN 09651748. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103680>.

RASMUSSEN, L.E.L.; GREENWOOD, D. R. Frontalin: a Chemical Message of Musth in Asian Elephants (*Elephas maximus*). *Chemical Senses*. 2003, roč. 28, č. 5, s. 433-446. ISSN 1464-3553. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/chemse/28.5.433>.

REGNIER, F. E.; LAW, J. H. Insect pheromones. *Journal of Lipid Research*. 1968, roč. 9, č. 5, s. 541-551. ISSN 00222275. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42699-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42699-9).

ROELOFS, W. L. Electroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures for Pheromones. *Techniques in Pheromone Research. Springer Series in Experimental Entomology.* 1984, s. 131-159. ISBN 978-1-4612-9743-7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7_5.

RUDINSKY, J. A. a DATERMAN, G. E. Field Studies on Flight Patterns and Olfactory Responses of Ambrosia Beetles in Douglas-fir Forests of Western Oregon. *The Canadian Entomologist.* 1964, roč. 96, č. 10, s. 1339-1352. ISSN 0008-347X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4039/Ent961339-10>.

SAINT-GERMAIN, M.; BUDDLE, CH. M.; DRAPEAU, P. Primary attraction and random landing in host-selection by wood-feeding insects: a matter of scale?. *Agricultural and Forest Entomology.* 2007, roč. 9, č. 3, s. 227-235. ISSN 1461-9555. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2007.00337.x>.

SBARBATI, A. a OSCULATI, F. Allelochemical Communication in Vertebrates: Kairomones, Allomones and Synomones. *Cells Tissues Organs.* 2006, roč. 183, č. 4, s. 206-219. ISSN 1422-6405. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000096511>.

SEOL, G. H.; KIM, K. Y. Eucalyptol and Its Role in Chronic Diseases. *Drug Discovery from Mother Nature. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2016, s. 389-398. ISBN 978-3-319-41341-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_18.

SCHADE, G. W.; SOLOMON, S. J.; DELLWIK, E.; PILEGAARD, K.; LADSTÄTTER-WEISSENMAYER, A. Methanol and other VOC fluxes from a Danish beech forest during late springtime. *Biogeochemistry.* 2011, roč. 106, č. 3, s. 337-355. ISSN 0168-2563. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9515-5>.

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, roč. 84, č. 7, s. 1484-1497. ISSN 1059-910X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jemt.23704>.

SCHIEBE, CH.; UNELIUS, C. R.; 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, roč. 45, č. 5-6, s. 474-489. ISSN 0098-0331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01070-8>.

SCHLYTER, F.; CEDERHOLM, I. Separation of the sexes of living spruce bark beetles, *Ips typographus* (L.), (Coleoptera: Scolytidae) 1. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 1981, roč. 92, č. 1-5, s. 42-47. ISSN 0044-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1981.tb01650.x>.

SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G.; BYERS, J. A.; LÖFQVIST, J.; BERGSTRÖM, G. Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates. *Journal of Chemical Ecology*. 1987, roč. 13, č. 4, s. 701-716. ISSN 0098-0331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01020153>.

SCHUH, G.; HEIDEN, A. C.; HOFFMAN, TH.; KAHL, J.; ROCKEL, P.; RUDOLPH, J.; WILDT, J. Emissions of Volatile Organic Compounds from Sunflower and Beech: Dependence on Temperature and Light Intensity. 1997, s. 291-318. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1005850710257>

SUENAMI, S.; OYA, S.; KOHNO, H.; KUBO, T. Kenyon Cell Subtypes/Populations in the Honeybee Mushroom Bodies: Possible Function Based on Their Gene Expression Profiles, Differentiation, Possible Evolution, and Application of Genome Editing. *Frontiers in Psychology*. 2018, roč. 9. ISSN 1664-1078. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.01717>.

SUN, X.-L.; YANG, Q.-Y.; SWEENEY, J. D.; GAO, CH.-Q.. A review: chemical ecology of *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). *Journal of Forestry Research*. 2006, roč. 17, č. 1, s. 65-70. ISSN 1007-662X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11676-006-0016-2>.

ŠIMPRAGA, M.; VERBEECK, H.; DEMARCKE, M.; JOÓ, É.; POKORSKA, O.; AMELYNCK, C.; SCHOON, N.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H.; HEINESCH, B.; AUBINET, M.; LAFFINEUR, Q.; MÜLLER, J.-F.; STEPPE, K. Clear link between drought

stress, photosynthesis and biogenic volatile organic compounds in *Fagus sylvatica* L. Atmospheric Environment. 2011, roč. 45, č. 30. ISSN 13522310. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.06.075>.

TAKIKAWA, H.; SANO, S.; MORI, K. Pheromone Synthesis, CLXXXVI. Synthesis of (1 S ,2 R ,5 R)-Bicolorin, the Aggregation Pheromone of Male Beech Bark Beetles (*Taphrorychus bicolor*), and Its (1 R ,2 R ,5 S) Isomer. Liebigs Annalen. 1997, roč. 1997, č. 12, s. 2495-2498. ISSN 0947-3440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jlac.199719971211>.

TOLLSTEN, L.; MÜLLER, P. M. Volatile organic compounds emitted from beech leaves. Phytochemistry. 1996, roč. 43, č. 4, s. 759-762. ISSN 00319422. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00272-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00272-5).

CHRISTINE, R.; GABRIEL, M.; SCHÜTZ, S. Olfactory response of Pale Tussock *Calliteara pudibunda* to stem volatiles of beech (*Fagus sylvatica*). 2013. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/265206610_Olfactory_response_of_Pale_Tussock_Calliteara_pudibunda_to_stem_volatiles_of_beech_Fagus_sylvatica.

UHL, G. Spider Olfaction: Attracting, Detecting, Luring and Avoiding. Spider Ecophysiology. 2013, s. 141-157. ISBN 978-3-642-33988-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-33989-9_11.

VAN MEENINGEN, Y.; SCHURGERS, G.; RINNAN, R.; HOLST, T. BVOC emissions from English oak (*Quercus robur*) and European beech (*Fagus sylvatica*) along a latitudinal gradient. Biogeosciences. 2016, roč. 13, č. 21, s. 6067-6080. ISSN 1726-4189. Dostupné z: <https://doi.org/10.5194/bg-13-6067-2016>.

VITÉ, J. P.; PITMAN, G. B. Bark Beetle Aggregation: Effects of Feeding on the Release of Pheromones in *Dendroctonus* and *Ips*. Nature. 1968, roč. 218, č. 5137, s. 169-170. ISBN 978-3-642-33988-2. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/218169a0>.

VITÉ, J. P.; BAKKE, A.; RENWICK, J. A. A. Pheromones in *Ips* (Coleoptera: Scolytidae) occurrence and production. The Canadian Entomologist. 1972, roč. 104, č. 12, s. 1967-1975. ISSN 0008-347X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4039/Ent1041967-12>.

WOOD, D. L. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology*. 1982, roč. 27, č. 1, s. 411-446. ISSN 0066-4170. Dostupné

z: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.27.010182.002211>.

WERKHOFF, P.; BRETSCHNEIDER, W. Dynamic headspace gas chromatography: concentration of volatile components after thermal desorption by intermediate cryofocusing in a cold trap. *Journal of Chromatography A*. 1987, roč. 405, s. 87-98. ISSN 00219673. Dostupné

z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81750-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81750-7).

ZHANG, Q.-H.; SCHLYTER, F.; ANDERSON, P. Green Leaf Volatiles Interrupt Pheromone Response of Spruce Bark Beetle, *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology*. 1999, roč. 25, č. 12, s. 2847-2861. ISSN 00980331. Dostupné

z: <https://doi.org/10.1023/A:1020816011131>.

7.2 Webové zdroje

BIOLIB. Podčeleď kůrovci *Scolytinae* (Latreille, 1804). 2024. Online. Biolib.cz. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id13904/>. [cit. 2024-03-09].

BIOLIB. Druh *Taphrorychus bicolor* (Herbst, 1793). 2024. Online. Biolib.cz. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id13950/>. [cit. 2024-03-09].

BROAD INSTITUTE. What is mass spektrometry?. 2024. Online. Broadinstitute.org. Dostupné z: <https://www.broadinstitute.org/technology-areas/what-mass-spectrometry>. [cit. 2024-03-09].

CAMEO CHEMICALS. 1,8-CINEOL. 2024. Online. cameochemicals.noaa.gov. Dostupné z: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20035>. [cit. 2024-03-09].

CAMEO CHEMICALS. Terpinolene. 2024. Online. cameochemicals.noaa.gov. Dostupné z: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/4588>. [cit. 2024-03-09].

ČHMÚ [Český hydrometeorologický ústav]. územní teploty (za období 2015-2023). 2024. Online. [chmi.cz](https://www.chmi.cz). Dostupné z <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty>. [cit. 2024-04-02].

ČHMÚ [Český hydrometeorologický úřad]. územní srážky (za období 2015-2023). 2024. Online. [chmi.cz](https://www.chmi.cz). Dostupné z <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty>. [cit. 2024-04-02].

CHEBI. 28913 - (2E)-hexenal. 2022. Online. [Ebi.ac.uk](https://www.ebi.ac.uk). Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28913>. [cit. 2024-03-29].

CHEBI. 27961 - 1,8-cineole. 2015. Online. [Ebi.ac.uk](https://www.ebi.ac.uk). Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:27961>. [cit. 2024-03-29].

CHEBI. 10577 - γ -terpinene. 2019. Online. [Ebi.ac.uk](https://www.ebi.ac.uk). Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:10577>. [cit. 2024-03-29].

CHEBI. 9457 - terpinolene. 2015. Online. [Ebi.ac.uk](https://www.ebi.ac.uk). Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=9457>. [cit. 2024-03-29].

Chembk. Bicolorin. 2023. Online. [chembk.com](https://www.chembk.com). Dostupné z: <https://www.chembk.com/en/chem/Bicolorin>. [cit. 2024-03-29].

MZCR, VÁVROVÁ. Chromatografie na papíře. 2024. Online. ciselniky.dasta.mzcr.cz. Dostupné z: https://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJAME.htm. [cit. 2024-03-09].

LABEFFECTS. About terpinolene. 2024. Online. [Labeffects.com](https://labeffects.com). Dostupné z: <https://labeffects.com/terpene-glossary-terpinolene/>. [cit. 2024-03-16]

MENDELU. Bioagens: Současné prostředky biologické ochrany. 2010 Online. mendelu.cz. Dostupné z: <https://user.mendelu.cz/xkopta/drobnenka.html>. [cit. 2024-03-09].

PUBCHEM. Terpinolene. 2024. Online. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terpinolene>. [cit. 2024-03-29].

PUBCHEM. Eucalyptol. 2024. Online. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol>. [cit. 2024-03-29].

SCHIMADZU. Manuals. 2024. Online. store.shimadzu.com. Dostupné z: <https://www.shimadzu.com/>. [cit. 2024-03-20].

T3DB. Gamma-terpinene (T3D4890). 2014. Online. t3db.ca. Dostupné z: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D4890>. [cit. 2024-03-29].

T3DB. 2-Hexenal (T3D4189). 2014. Online. t3db.ca. Dostupné z: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D4189>. [cit. 2024-03-29].

Tcichemicals. *Trans*-2-hexenal 2024. Online. tcichemicals.com. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/JP/en/p/H0345>. [cit. 2024-03-29].

ÚKZÚZ. Kolohrod bukový. 2024. Online. eagri.cz. Dostupné z: https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%2287da928fbbf3b9506f7bfd8966a6233e%22#r1p|so|skudci|detail:87da928fbbf3b9506f7bfd8966a6233e|popis. [cit. 2024-03-09].

WIKIPEDIA. Schwannova buňka. 2022. Online. Wikipedia.org. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Schwannova_bu%C5%88ka. [cit. 2024-03-09].

WIKIPEDIA. Flame ionization detector. 2012. Online. Wikipedia.org. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Flame_ionization_detector. [cit. 2024-03-09].

Wikidata. γ -terpinene. 2024. Online. wikidata.org. Dostupné z: <https://www.wikidata.org/wiki/Q423975>. [cit. 2024-04-04]

7.3 Knihy

KOLB, B.; ETTRE, L. S. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice. 2006. New Jersey, Hoboken: Wiley. ISBN 978-0-471-74944-8.

PFEFFER, A. Fauna ČSR Sv. 6. Kůrovci – *Scolytoidea*. 1955. Praha: ČSAV.

PFEFFER, A. Kůrovcovití *Scolytidae* a jádrohlodovití *Platypodidae*. 1989. Praha: Academia.

SKINNER, M. K. Encyclopedia of reproduction. 2018. Academic Press. ISBN 978-0-12-815145-7.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

EAD = elektroantenografie

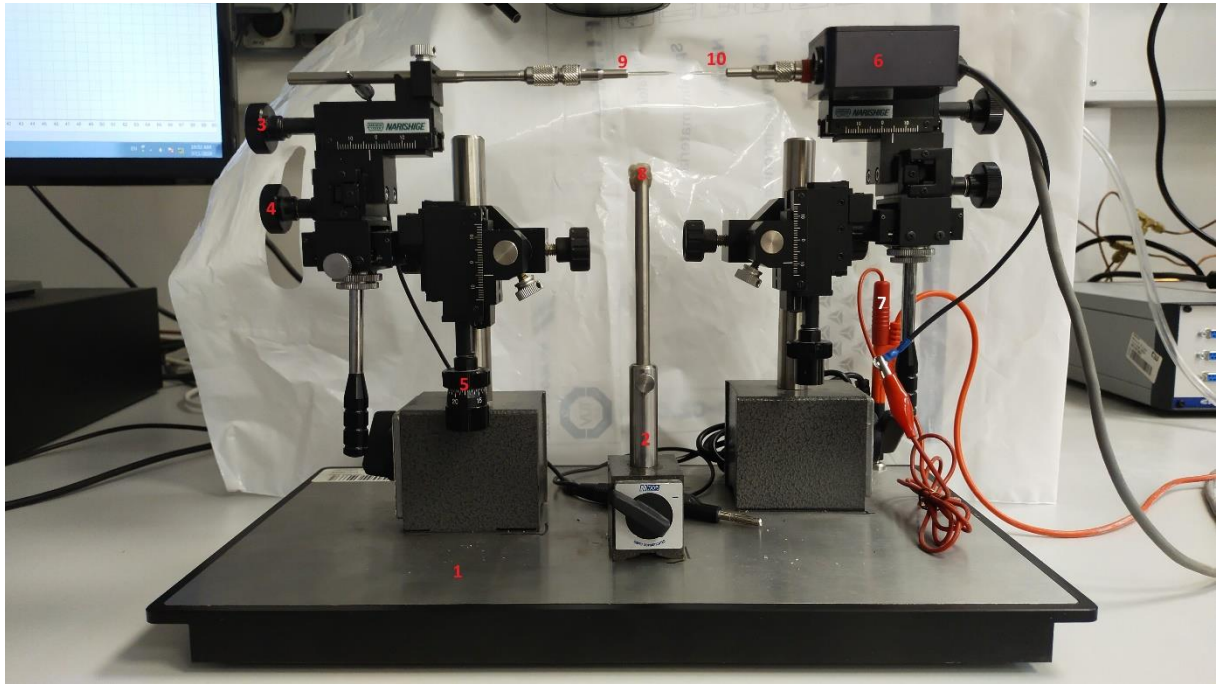
GC = plynová chromatografie

FID = plamenná ionizační detekce

MS = hmotnostní spektrometrie

HS = dynamický headspace

9 Samostatné přílohy



Obrázek 28. Elektroantenografické zařazení, schopné měření změny receptorových potenciálů. 1 – magnetická deska, 2 – stojan s magnetickou bází, 3 – vertikální mikromanipulátor, 4 – vertikální mikromanipulátor, 5 – horizontální mikromanipulátor, 6 – předzesilovač, 7 – zemnicí kabel, 8 – dentální vosk na upevnění preparátu, 9 – referenční elektroda, 10 – měřící elektroda



Obrázek 29. Metoda jímání látek – dynamický headspace. 1 – pumpička vzduchu, 2 – hadička/šlahoun, kterým jsou látky nasávány, 3 – kapilární trubička se sorbentem, na který se vážou těkavé látky, 4 – teflonová objímka, 5 – pečící folie. Na displeji pumpičky je uveden průtok 120 ml/min.