

# Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí-

Katedra ekologie



**Identifikace antenálně aktivních látek esenciálních olejů *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, a *Thymus vulgaris* u kůrovce *Ips typographus***

Bakalářská práce

Autor: Jan Prchal

Vedoucí práce: Ing. Hana Šípková, Ph.D.

2020

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jan Prchal

Environmentální vědy  
Aplikovaná ekologie

Název práce

Identifikace antenálně aktivních látek esenciálních olejů *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, and *Thymus vulgaris* u kůrovce *I. typographus*

Název anglicky

Identification of antennally active substances of essential oils *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, and *Thymus vulgaris* in bark beetle *I. typographus*

---

Cíle práce

Cílem práce je definovat antenálně aktivní látky obsažené v EO *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, a *Thymus vulgaris*, aby mohly být dále studovány v behaviorálních a fyziologických experimentech.

Metodika

Metodicky bude práce zaměřena na analýzu čichových schopností *I. typographus*. Pomocí tzv. GC-EAD tj. propojení plynové chromatografie (GC, separační technika, která umožňuje dělení složitých těkavých směsí) a elektrofyziologického snímání aktivity z čichového orgánu (EAD) budeme dělit směsi výše uvedených EO a studovat antenální odpovědi na jednotlivé rozdělené látky. Aktivní látka vyvolává změnu napětí na tykadle a tyto změny budou zaznamenávány pomocí elektrod, zesilovány a analyzovány na PC. Poté budou aktivní látky identifikovány pomocí dvojrozměrné plynové chromatografie s hmotnostním detektorem, GCxGC-MS.

**Doporučený rozsah práce**

cca 30 stran

**Klíčová slova**

*Ips typographus*, essential oil, EAG, Scolytidae

---

**Doporučené zdroje informací**

- Andersson MN (2012) Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche A J Entomol* 2012:1–14. doi: 10.1155/2012/149572
- Byers A. J. (1989) Chemical ecology of bark beetles. *Experientia*. doi: 10.1007/BF01951813
- Hansson BS (2013) *Insect Olfaction*. Springer Science & Business Media, ISBN 3662079119, 9783662079119
- Hummel HE and Miller TA (Eds) (1984) *Techniques in Pheromone Research*, Part of the Springer Series in Experimental Entomology book series (SSEX) <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7>
- Mudrončeková S, Ferencík J, Grušová D, Barta M (2018) Insecticidal and repellent effects of plant essential oils against *Ips typographus*. *J. Pest Sci.*
- Olsson SB, Hansson BS (2013) Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. *Part Methods Mol Biol B Ser* 1068. doi: 10.1007/978-1-62703-619-1
- Pickett JA, Aradottir GI, Birkett MA (2012) Aspects of insect chemical ecology: exploitation of reception and detection as tools for deception of pests and beneficial insects. *Physiol Entomol* 37:2–9. doi:10.1111/j.1365-3032.2011.00828.x
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2019/20 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

Ing. Hana Šípková, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ekologie

**Konzultant**

Ing. Jaromír Hradecký, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 30. 4. 2019

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 24. 6. 2019

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

V Praze dne 16. 03. 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Hany Šípkové, Ph.D. a RNDr. Blanky Kalinové, CSc. Citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použité literatury.

Jsem si vědom, že na moji bakalářskou 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 bakalářské 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 .....

.....

Podpis autora

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Haně Šípkové, Ph.D. za trpělivé vedení mé práce, odbornou pomoc a příjemnou spolupráci. Dále bych chtěl velmi poděkovat RNDr. Blance Kalinové, CSc za velmi vyčerpávající odbornou pomoc v teoretické a praktické části této bakalářské práce a za laskavý přístup po celou dobu.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Bc. Jaromíru Bláhovi za cenné rady a manuální pomoc v laboratoři.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině a svým blízkým za nekonečnou podporu.

## Abstrakt

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je největší škůdce smrkových porostů (*Picea abies*). K úspěšné kolonizaci stromu samci produkují agregační feromon, který láká brouky obou pohlaví. Tento feromon a jiné vůně dokáže vnímat pomocí velmi citlivých čichových receptorů, které se nacházejí v senzilah na tykadle. Tato práce měla za cíl identifikovat antenálně aktivní látky v repelentních esenciálních olejích (EO) *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare*.

V této práci jsem nejprve zjišťoval pomocí elektroantennografie (EAG), jak dlouho je schopno izolované tykadlo kůrovce reagovat na čichové podněty. Druhý experiment byl zaměřen na porovnání EAG aktivity různých koncentrací (1, 10 100 µg/µl, 1, 10, 100 ng/µl) tří esenciálních olejů *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare*. Ve třetím experimentu jsem pomocí plynové chromatografie spojené s elektroantennografickou detekcí (GC-EAD), analyzoval jednotlivé esenciální oleje a následně pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), a Kovatsových indexů byly identifikovány antenálně aktivní látky EO.

Bylo zjištěno, že izolované tykadlo lýkožrouta reaguje na čichové podněty po dobu 14 minut. V EAG experimentech vyvolával nejsilnější reakce tykadel *Origanum vulgare* ve všech testovaných koncentracích. Odpovědi větší než hexan se vyskytovaly od koncentrace 100 ng/µl a větších. V GC-EAD a GC-MS experimentech bylo identifikováno celkem sedm antenálně aktivních látek, které vyvolaly různě silné antenální odpovědi.

Identifikované antenálně aktivní látky repelentních EO byly anetol, carvacrol, caryophyllen, cymen, estragol, thymol,  $\gamma$ -Terpinen. Estragol, cymen a  $\gamma$ -Terpinen již byly u *Ips typographus* studovány a bylo zjištěno, že jsou vnímány specifickými čichovými neurony (OSN). Ostatní látky anetol, carvacrol, caryophyllen a thymol doposud studovány nebyly a budou základem dalších studií.

## Abstrakt

Spruce bark beetle (*Ips typographus*) is the economically important pest of spruce forests (*Picea abies*). To successfully colonize the tree, males produce an aggregation pheromone that attract both sexes of beetle. Beetles perceive the pheromone and other scents with very sensitive olfactory receptors on antennae. Aim of this work was to identify antennally active substances from essential oils with repellent effect - *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare*.

Using electroantennography (EAG), I first tried to determine how long isolated antennae are able to respond to olfactory stimulations. EAG was also used for efficiency comparison of various concentrations (1, 10, 100 µg/µl, 1, 10, 100 ng/µl) of three essential oils *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare*. Finally, using gas chromatography with electroantennographic detection (GC-EAD), we analyzed individual essential oils to determine antennally active compounds. By means of gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS), and Kovats retention indexes we identified these antennally active substances.

I observed that isolated antennae of spruce bark beetles can react about 14 minutes. In EAG dose-response experiments, it was also observed that *Origanum vulgare* elicited strongest EAD reactions in all concentrations tested. EAG responses higher than hexane were observed above concentration 100 ng/µl. In GC-EAD analyses we identified seven antennally active areas. Using GC-MS we identified 7 antennally active compounds anethole, carvacrol, caryophyllene, cymene, estragole, thymol, γ-Terpinene.

The substances estragole, anethole, cymene and γ-terpinene have been already studied on *Ips typographus* and specific olfactory neuron receptors were found on bark beetle antennae. Compounds carvacrol, caryophyllene and thymol are new and will be studied in further experiments.

## **Klíčová slova**

*Ips typographus*, esenciální oleje, EAG, Scolytinae

## **Key words**

*Ips typographus*, essential oils, EAG, Scolytinae



# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce .....	2
3. Literární rešerše .....	2
3.1 Ips typographus.....	2
3.1.1 Taxonomie.....	3
3.1.2 Binomie .....	3
3.2 Hostitelský strom.....	4
3.3 Kolonizace hostitele .....	5
4. Komunikace hmyzu.....	7
4.1 Chemická komunikace kůrovců .....	7
4.2 Semiochemikálie .....	10
5. Esenciální oleje.....	11
5.1 Repelentní a toxické účinky .....	12
5.2 Studie repelence esenciálních olejů.....	13
6. Metodika .....	15
6.1 Chov brouků .....	15
6.2 Ředění esenciálních olejů (EO) .....	15
6.2.1 Příprava stimulačních zásobníků .....	16
6.3 Příprava a zapojení tykadla.....	16
6.3.1 Stimulace tykadla .....	18
6.4 Používaná zařízení .....	18
6.5. Experimenty.....	23
6.5.1 Studium změn citlivosti tykadel po zapojení mezi elektrody.....	23
6.5.2 Porovnání účinnosti testovaných EO .....	23
6.5.3 Identifikace antenálně aktivních látek EO pomocí GC-EAD .....	25
7. Výsledky .....	30
8. Diskuze .....	41
7. Závěr .....	45
8. Seznam použité literatury .....	46
9. Přílohy.....	52

# 1. Úvod

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L., Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) je největším škůdcem smrkových porostů. V současné době v České republice převažují monokultury smrku ztepilého (*Picea abies*), který tvoří až 50 % lesní plochy (Zelená správa, 2018). V poslední době vlivem klimatických změn dochází v letním období k dlouhotrvajícím obdobím sucha, které má za následek oslabení smrkových porostů. Vyšší teplota a oslabení stromů vytvářejí ideální podmínky pro vývoj kůrovců. Tyto skutečnosti přispěly k současné obrovské kůrovcové kalamitě. V roce 2018 bylo v České republice evidováno 12. mil. m<sup>3</sup> vytěženého smrkového kůrovcového dřeva. Tento údaj je více než dvojnásobný v porovnání s rokem 2017 (5,34 mil. m<sup>3</sup>). Zelená správa (2018) také uvádí, že na většině území platí kalamitní stav a naopak v žádném z okresů neplatí stav základní. Z dlouhodobého hlediska znamená vytěžené kůrovcové dřevo v roce 2018 rekordní hodnotu, která nebyla dosud na území České republiky zaznamenána. Nejhorší stav panuje i nadále v oblasti severní a střední Moravy a Slezska. K extrémnímu zhoršení stavu dochází na území Vysočiny a Jihočeského kraje. Kalamitní stav lesů v důsledku působení kůrovců se však týká celé střední Evropy.

Lýkožrout smrkový je vědci studován už mnoho let. Současná situace upoutává pozornost široké veřejnosti, vědců a politiků. V posledních letech vzniklo mnoho projektů, které mají za cíl lépe popsat biologii samotného brouka a najít účinné způsoby ochrany proti němu. Tato práce se může řadit do oblasti chemické ekologie, která má za cíl porozumět fyziologii vnímání těkavých látek, které ovlivňují chování kůrovců *I. typographus*. Nedávno bylo zjištěno, že některé esenciální oleje mají repelentní účinky na chování *I. typographus*. Je zřejmé, že jenom látky, které je schopen kůrovec vnímat, mohou ovlivňovat chování. Zajímalo nás proto, které látky z těchto esenciálních olejů jsou kůrovci *I. typographus* vnímány.

## 2. Cíle práce

Cílem práce je definovat antenálně aktivní látky obsažené v EO *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, a *Thymus vulgaris*, aby mohly být dále studovány v behaviorálních a fyziologických experimentech.

## 3. Literární rešerše

### 3.1 *Ips typographus*

*Ips typographus* je velmi četný euroasijský druh. Areál jeho výskytu je zaznamenán od severské tundry, až do hor balkánského poloostrova. Na západě se vyskytuje od Pyrenejí, dále přes střední Evropu, značnou částí Sibíře až k Japonsku. Ve střední Evropě byl jeho původním výskytem horský smrkový les (do 2000 m n. m.) odtud se díky uměle vytvořeným hospodářským smrkovým monokulturám dostal i do nížin (Křístek, Urban 2013). Zahradník a kol. (1993) uvedli, že do skupiny kůrovcovití je řazeno na 5000 druhů. Na území České republiky se nachází celkem 106 zástupců.

### 3.1.1 Taxonomie

Taxonomické zařazení podle Lobl, Smetana (2011)

Říše: Živočichové (Animalia)

Podříše: Mnohobuněční (Metazoa)

Kmen: Členovci (Arthropoda)

Podkmen: Vzdušnicovci (Tracheata)

Nadtřída: Šestinozí (Hexapoda)

Třída: Hmyz (Insecta)

Řád: Brouci (Coleoptera)

Podřád: Všežraví (Polyphaga)

Nadčeleď: Curculionidae

Čeleď: Nosatcovití (Curculionidae)

Podčeleď: Kůrovci (Scolytinae)

Rod: lýkožrout (*Ips*)

### 3.1.2 Binomie

Lýkožrout smrkový je malý 4,2 - 5,5 mm dlouhý a 1,9 mm široký brouk. V dospělosti je leskle tmavohnědý až černohnědý, na stranách má výrazné ochlupení zbarvené do zlatavé barvy. Krovky má lesklé bez teček naproti tomu záď krovek je prohnutá, matná se čtyřmi zuby na každé straně. Nejvýraznější z těchto zubů je třetí, který je rozšířen do tvaru knoflíku (Zumr 1995). Pffefer (1989) popisuje, že tykadla má zakončené paličkou. Na paličkách jsou viditelné vlnkovitě zprohýbané oblasti čichových senzil a oblasti bez nich. V taxonomické literatuře se toto druhově charakteristické uspořádání smyslových oblastí na tykadlech nazývá švy (Zahradník a kol. 1993; Gries 2009).

Křístěk, Urban (2013) uvádí, že lýkožrout smrkový žije pod kůrou smrků *Picea abies*. Samci na vybraném stromě vytváří pod kůrou snubní komůrku. Během tvorby snubní komůrky samci uvolňují agregační feromon. Samci se v komůrkách páří z pravidla až se třemi samicemi. Oplozené samičky hloubí matečné chodby o délce šest až deset cm, které jsou rovnoběžné s osou stromu. Samice kladou v matečných chodbách až 60 vajíček, ze kterých se přibližně po dvou týdnech líhnou beznohé larvy, které hloubí chodby kolmé k matečné chodbě. Larvy se v průběhu dvou týdnů 3x svlékají a kuklí se v komůrce na konci chodby. Po jednom až dvou týdnech se z kukly líhne bílý brouk, který potřebuje dvou - tří týdenní úživný žír, během něhož tělo sklerotizuje, brouk hnědne, pohlavně dospívá a vylétá. Z pravidla se dospělci líhnou v poměru 1:1, polovina populace jsou samci a polovina samice (Zumr 1995; Byers 2004; Wermelinger 2004).

Během sezóny se v našich podmínkách vyvíjí jedna až tři generace v závislosti na nadmořské výšce a teplotě (Zahradník 2004). Jak uvádí Skuhřavý (2002) v některých případech část dospělých brouků, kteří již založili kolonii, zakládá tzv. sesterské generace s druhým úživným žírem, kterým brouci obnovují tukové zásoby a letové svaly a jsou schopni dále kolonizovat další stromy.

Dospělí brouci přezimují v kůře stromu, nebo ve svrchní vrstvě hrabanky v blízkosti napadené dřeviny. V případě, že se nestihnou na podzim vyvinout v dospělé brouky, dokáží zimu přečkat jako larvy nebo kukly v mateřském stromě (Kindlmann a kol. 2012). Byers (2004) popisuje, že larvy kůrovců svým žírem poškodí nevratně vodivá pletiva stromu a tím ho zabijí. Dále také přenáší pro smrk patogenní houby mezi jinými především rod *Ceratocystis*, které napadají vodivá pletiva stromu a celkově oslabují jeho kondici.

### **3.2 Hostitelský strom**

Základním obranným mechanismem stromů je pryskyřice. Tato viskózní kapalina se tvoří v pryskyřičných kanálcích a je složena těkavými látkami, převážně terpeny, v nichž jsou rozpuštěny netěkavé složky, díky kterým je pryskyřice lepivá. Specifické složky jsou alfa-pinen, beta-pinen, delta-3 karene, sabinen, limonen a terpinolen a další terpenické látky. Při hloubení snubních komůrek samci poškozují pryskyřičné kanálky, což vede k výronu pryskyřice, která může být vytlačována na povrch stromu tlakem až 1,5 MPa. Pokud je tlak a množství pryskyřice

v pryskyřičných kanálcích dostatečný, může ronící se pryskyřice jednotlivé kůrovce usmrtit. Tlak v pryskyřičných kanálcích závisí na tlaku v okolních buňkách. Při nedostatku vody v období sucha se tlak v kanálcích snižuje a tím je fyzikální obrana stromu zeslabena. Tlak vytlačované pryskyřice může být i nulový, v takové situaci se stává strom zcela bezbranným, jelikož není schopen použít pryskyřici v boji s napadajícím broukem, tento jev však nastává za velkého sucha. Důležitým faktorem obrany je také samotná viskozita pryskyřice. Ta je závislá na teplotě. Pro lýkožrouta smrkového je tak ideální doba k napadení stromu během odpoledne, kdy teploty dosahují nejvyšších hodnot (Zahradník 2004; Souček, Tesař 2009).

### 3.3 Kolonizace hostitele

Křístek, Urban (2013) uvádí, že pro snazší kolonizaci stromu preferuje *I. typographus* stromy starší 60 let. Hostitelské dřeviny vybírají samci. Při normálních populačních hustotách (tzv. endemická fáze) pionýrští samci preferují stromy poškozené nebo oslabené, např. stromy polámané nebo vyvrácené vichřicí, sněhem nebo stromy jinak fyziologicky oslabené, nejčastěji pak suchem, teplem a jinými environmentálními faktory. V endemické fázi se lýkožrouti stromům v plné síle vyhýbají. Při zvýšené populační hustotě (epidemická fáze) však napadají a jsou schopni usmrtit i zcela zdravé stromy. Schopnost kůrovců kolonizovat zdravé stromy je umožněna účinným agregačním feromonem, který láká další brouky obou pohlaví a synchronizuje kolonizaci. Agregační feromon je klíčový pro synchronizaci napadení hostitele (Birgesson a kol. 1984).

Zahradník a kol. (1993) popisuje primární složky tohoto feromonu, 2-metyl-3-buten-2-ol (MB), který působí v blízkosti stromu a slouží pro přesnou lokalizaci hostitele a *cis*-verbenol (cV), jež je lýkožrout schopný zachytit při větší vzdálenosti. Tyto látky vznikají ve střevě samců. Pokud je na napadeném stromě brouků přespříliš a hrozí nedostatek potravy pro následnou generaci, samci lýkožrouta vytváří anti-agregační feromony ipsenol a verbenon. Ty inhibují atraktivitu napadeného stromu a směřují napadení na stromy sousední (Schlyter a kol. 1987). Skuhřavý (2002) dále uvádí, že kromě regulace kolonizační hustoty verbenon také reguluje rovnoměrné rozptýlení kůrovců na kmeni stromu.

Zatímco MB je syntetizován *de novo*, o cV se soudí, že vzniká detoxifikací hostitelských terpenů a druhotně je využíván jako klíčová složka agregačního feromonu (Jakuš a kol. 2015).

Syntéza *de novo* byla poprvé prokázána při testu u druhu *Ips paraconfusus*, kde se použily radioaktivně označené chemické látky. Samci *Ips paraconfusus* z označených látek [1-<sup>14</sup>C] acetátu a [2-<sup>14</sup>C] tvořily radioaktivní ipsenol a ipsdienol v tzv. mevalonátové biosyntetické dráze. Podobně byla *de novo* syntéza zjištěna také u *Ips duplicatus* a *Ips pini* (Seybold a kol. 2000). U *I. typographus* byl tento jev dokázán pro hemiterpen MB (Blomquist a kol. 2010). *Ips* spp. se tak dá zařadit mezi druhy hmyzu, které vytváří feromony dvěma způsoby (*de novo* a oxidací hostitelských prekurzorů), dále uvádí Seybold a kol. (2000), avšak poměr mezi těmito dvěma způsoby není objasněn.

Tajemstvím zůstává u *I. typographus* také způsob výběru hostitelského stromu. Jak popisuje Kalinová a kol. (2014) existují dvě hypotézy. První hypotéza hovoří o tom, že se samci orientují a vyhledávají hostitelský strom na základě čichových podnětů. Hostitelské stromy emitují směsi těkavých látek, obecně nazývaných primární atraktanty. Složení těchto směsí se mění v závislosti na fyziologickém stavu hostitele a tyto změny pak mohou být podkladem pro výběr hostitele. Druhá teorie předpokládá, že kůrovci naletují na různé stromy náhodně a teprve při kontaktu vyhodnocují jeho vhodnost pro případnou kolonizaci. Nedávné výzkumy ukázaly, že tykadla kůrovců reagují na mnoho hostitelských těkavých látek, a to nejen na ty, které jsou zastoupeny ve vysokých koncentracích jako například terpeny  $\alpha$  a  $\beta$  pinen, ale také na látky, které jsou přítomné ve velmi malých množstvích (Schiebe a kol. 2011, Schiebe a kol. 2012). Zda a jak se tyto látky podílejí na výběru hostitele, zůstává prozatím nevysvětleno (Kalinová a kol. 2014). Kromě chemických látek ovlivňují orientaci kůrovců v ekosystému i další faktory jako je počasí, nebo struktura porostu (Jakuš a kol. 2015).

## 4. Komunikace hmyzu

Obecně, hmyz pro vzájemnou komunikaci dokáže využívat specifické dorozumívací prostředky. Jde o velmi širokou škálu signálů, které se dají rozdělit na fyzikální a chemické (Myles 2002).

Chapman (1998) řadí mezi fyzikální komunikaci signály zrakové, hmatové, sluchové, vibrační a elektromagnetické podněty. Vibrační komunikace, která se může šířit substrátem či rostlinným tělem, ale i vibrace nesené vzduchem, je způsob dorozumívání pomocí vln, které mají své specifické vlastnosti (amplituda, frekvence a vlnová délka) (Hanuš, Šobotník 2005).

Typický akustickým signálem je stridulace, která je často projevem teritoriálního chování samců, šíření poplachu, nebo sexuální chování. U lýkožrouta probíhá toto dorozumívání pomocí stridulačního ústrojí, které se nazývá gula, popisuje Chapman (1998). Ačkoli je toto ústrojí velmi jemné, dokáže vytvořit signál, jehož pomocí se brouci dorozumívají ve svém i v sousedním požerku. Akustická komunikace ovlivňuje rozložení vajíček a rozprostření či počet chodeb v kmeni (Rudinský 1962).

Zrak je u lýkožrouta smrkového vyvinut slabě, jeho oči obsahují 100-240 omatidií a dva typy barevných receptorů. Tyto receptory mají maximální absorpci světla v oblasti vlnových délek 450 nm (modrá) a 520 nm (zelená). Zrak je tak kůrovci využíván hlavně k orientaci při přistávání na kmen stromu. Společně v kombinaci se smyslem čichovým se zrak patrně podílí i na hledání hostitelského stromu. To potvrzují i vyšší úlovky ve feromonových pastech umístěných vedle siluety stromu, než úlovky pastí ve volném prostoru (Byers 2004).

### 4.1 Chemická komunikace kůrovců

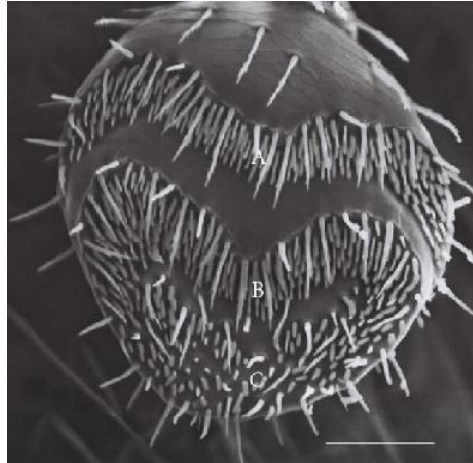
Pro *Ips typographus* je však nejdůležitější komunikace chemická (chuťová a čichová). Obecně platí, že chuť vnímá chemické látky rozpuštěné ve vodě, zatímco čichem jsou percipovány látky těkavé (Schlyter a kol. 1987).



Chuťové signály vnímají kontaktní chemoreceptory, s jejich pomocí je brouk schopen zachytit a rozpoznat molekuly určité látky (Jánský, Novotný 1981). Chuťové receptory se nachází okolo kusadel a na ostatních částech těla jako je kladélko, nebo tykadla. Právě na tykadlech se nachází velký počet chemoreceptorů a mechanoreceptorů, jejich výskyt můžeme pozorovat také na tarzálních člancích nohou (Byers 2004).

Čichová komunikace představuje obecně u většiny hmyzu nejběžnější způsob dorozumívání. Při této komunikaci hmyz reaguje na chemické látky, rozptýlené ve vzduchu. Klíčovým orgánem čichu hmyzu jsou tykadla. Ty jsou pokryta velkým množstvím malých specializovaných brv a chloupků rozmanitého uspořádání (Klutsch a kol. 2009). Senzily jsou duté, pórovité kutikulární útvary, v jejichž nitru jsou čichové receptorové neurony. Morfologie senzil je velice různorodá, jednotlivé typy se liší jak počtem, tak i typem čichových receptorových neuronů, které obsahují. Póry, které mají průměr 10-25 nm, umožňují průnik těkavých látek do nitra senzily. Jejich hustota pórů se liší podle typu senzil. Podle délky můžeme rozlišit senzily na krátké (např. bazikonické a dlouhé (např. trichoidní) nebo mističkovité (např. coelokonické) apod. (Andersson, a kol. 2009). V bazikonických senzilách jsou čichové receptorové neurony naladěné na vnímání různých rostlinných vůní. Byers (2004) uvádí, že naproti tomu trichoidní senzily obvykle vnímají látky feromonové povahy.

U kůrovců *I. typographus* jsou čichové senzily pouze na ventrální straně paličky tykadla. Jsou rozmístěny kolem apikální části tykadla (špička tykadla) a ve dvou specificky zprohýbaných pruzích. V těchto oblastech jsou různé typy senzil navzájem promíchány i když jednotlivé oblasti se liší v jejich poměrných zastoupeních (Andersson 2011).



**Obrázek 1: Čichová senzila na paličce tykadla *Ips typographus*. Písmeny A, B, C jsou označena místa, kde se vyskytují čichové receptorové neurony (ORN) (Andersson a kol. 2009).**

Vůně jsou vnímány čichovými receptorovými neurony. Membrány jejich výběžků, které zasahují do nitra senzil, jsou vybaveny čichovými receptory. Tyto receptory mají schopnost reagovat s molekulami vůní, které pronikají do nitra senzil kutikulárními póry. Čichové receptory jsou velmi citlivé a specifické. Je prokázáno, že k podráždění feromonových receptorů samců bource morušového (*Bombyx mori*) stačí jediná molekula feromonu bombykolu (Minor , Kaissling 2003).

Každý čichový receptorový neuron obsahuje jenom jeden typ čichových receptorů (bílkovin), které mají jeden typ vazebného místa. To reaguje na určitý specifický set voňavých molekul. Selektivnost i citlivost čichových receptorů, které vnímají feromony, je z pravidla vyšší než u receptorů naladěných na vnímání jiných (neferomonových) vůní. U lýkožrouta smrkového bylo pomocí analýzy rozpoznáno kolem 70 typu receptorových bílkovin. Míru schopnosti kůrovců vnímat své voňavé prostředí můžeme jenom odhadovat (Andersson a kol. 2009). (Pozn.: v sítnici člověka existují jenom 4 typy různých receptorů).

Jak uvádí Andersson (2011), výsledkem interakce molekuly vůní s čichovým receptorem je změna napětí na membráně neuronu. Tyto změny je možné zaznamenávat a vyhodnocovat elektrofyziologickými metodami. Ty měří změnu potenciálu, která nastane po podráždění v jednotlivých receptorových neuronech (tzv. elektrosenzilografie, ESG), nebo na úrovni celého čichového orgánu (elektroantenografie EAG). EAG zaznamenává celkovou změnu potenciálu všech čichových receptorových buněk reagující na daný podnět. Amplituda EAG vypovídá o intenzitě stimulace, průběh pak o jeho trvání.

## 4.2 Semiochemikálie

Těkavé chemické látky, které přenášejí určitou informaci se nazývají semiochemikálie, jak popisuje Weatherson, Minks (1995) a jsou vnímány čichem. Zprostředkovávají vnitrodruhovou (feromony) a mezidruhovou (alomony, kairomony a synomony) komunikaci (Nation 2002).

Karlson a Butenandt (1959) uvádí, že alomony zvyhodňují vysílacího jedince a jsou neutrální pro příjemce, producent tak může s jejich pomocí zmást predátora, odradit jej od útoku nebo přilákat kořist. Mezi alomony se řadí zejména repelenty, antibiotika, únikové látky, veniny, atraktanty a protilátky. Kairomony jsou naopak semiochemikálie, které dokážou zvyhodnit příjemce signálu, s jejichž pomocí získá příjemce informace o poloze například kořisti. Synomony prospívají producentovi, i příjemci signálu například vůně entomogamních květů.

V rámci jednoho druhu se hmyz dorozumívá feromony. Jejich těkavé molekuly jsou součástí mnoha typů charakteristického chování. Například značkování, sledování značek, vyhledávání sexuálních partnerů, identifikace druhu, sociálního statutu aj. (Nation 2002). Veselý (1985) popsal feromony jako směsi více látek v určitém druhově specifickém poměru. Tento poměr je druhově specifický (tedy kvalitativně stálý), ale jeho kvantita se může do určité míry měnit v závislosti na stáří, fyziologickém stavu jedince, případně v různých podmínkách. Feromony jsou vytvářeny v exokrinních žlázách, což jsou žlázy vnější sekrece, které vylučují své produkty mimo tělo jedince. Jsou to látky různě volatilní (např. terpeny), které se šíří vzduchem. Cílový jedinec zachycuje molekuly feromonu čichovými orgány na tykadlech, na nichž dochází k interakci molekuly vůně s bílkovinnými čichovými receptory čichových receptorových neuronů v čichových senzilách. Výsledkem interakce molekuly vůně s čichovým receptorem je depolarizace smyslového neuronu, který vysílá tuto informaci do čichových center v mozku. Zde je příslušná čichová informace identifikována, integrována s jinými smyslovými informacemi a po zpracování slouží jako podklad pro adaptivní změny chování či změny ve vývojových procesech (Chapman 1998).

Vander Meer a kol. (2019) rozdělují feromony podle funkce do následujících skupin:

- **agregační:** slouží k soustředění populace, nebo drží kolonii pohromadě
- **antiagregační:** je používán jako signalizace k obsazení prostoru, nedostatku potravy, aj.
- **ovipoziční:** slouží k signalizaci, že je v určitém místě již nakladeno potomstvo
- **značkovací:** tento typ feromonu je hojně využíván zejména u včel, signalizuje květy, u kterých již proběhl sběr, další člen populace je tak informován dokud feromonová značka nevyprchá, v jiných případech slouží k označení teritoria
- **pohlavní:** slouží k přilákání opačného pohlaví, stimulují ke kopulaci
- **larvální:** tento feromon používá larva za účelem vymezení svého prostoru mezi ostatními larvami (např.: v požerku kmene stromu u lýkožroutů), jiné larvy stejný feromon používají k vynucení péče
- **stopovací:** je používán při značení cest a účelnému pohybu v prostoru (např. u mravenců a housenek), nebo také k označení místa zdroje potravy
- **poplašné:** známé jako "alarm" feromony, jsou vydávány v reakci na disturbance či hrozící nebezpečí jedince jejich percepce spouští sled poplašných projevů chování
- **identifikační:** hlavní využití u sociálního hmyzu, kdy každá kolonie má svojí specifickou vůni
- **mrtvolné:** tyto feromony vydává mrtvé rozkládající tělo jedince

## 5. Esenciální oleje

Esenciální oleje (EO) jsou těkavé aromatické tekutiny získané z keřů, rostlin, kořenů, stromů, semen rostlin aj. Jsou to produkty sekundárního metabolismu rostlin. Tyto bezbarvé kapaliny, rozpustné v alkoholu, tucích a éteru nejsou, ale rozpustné ve vodě. Slouží k ochranné funkci proti škůdcům a chorobám, pro opylovače naopak působí jako lákadlo. Z hlediska chemického to jsou velmi složité směsi desítek až stovek jednotlivých substancí (Bulánková 2005). V dnešní době je definováno přes 3000 éterických olejů. Majoritní látky v éterických olejích jsou fenolické

sloučeniny a látky terpenoidního charakteru (diterpeny, sekviterpeny a monoterpeny). Jejich přítomnost a vzájemné poměry jednotlivých typů jsou typické pro daný druh rostliny (Pavela 2011).

Esenciální oleje se získávají lisováním, extrakcí tuků, vodní a parní destilací a extrakcí těkavých látek organickými rozpouštědly (Kocourková a kol. 2015). Kocourková a kol. (2015) pak dále uvádí, že látky esenciálních olejů jsou v rostlinách syntetizovány hlavně ve speciálních orgánech květů, listů a plodů, v kořenech či kůře. Jejich složení a množství je proměnlivé a závisí například na druhu rostlin, klimatickými a pěstebními podmínkami, technologickým způsobem zpracování, nebo dobou (před květem bývá v rostlině největší množství), ale také na denní době.

## 5.1 Repelentní a toxické účinky

Esenciální oleje mají širokou škálu účinků - antiseptické, sedativní, antioxidační, expektorační, antirevmatické, desinfekční, antimikrobiální, insekticidní a případně protirakovinné.

Repelenty jsou definovány jako látky které mají odpuzující vlastnosti Pavela (2011). Rostlinné repelenty se využívaly již ve starověku (kouř při spalování rostlin). Na počátku minulého století byl nejpoužívanější repelent v Evropě citronelový olej. V průběhu let jsou přírodní repelenty postupně nahrazovány syntetickými látkami. Z přírodních zdrojů byly repelentní účinky pro hmyz zjištěny u různých druhů rostlin z čeledi miříkovité (Apiaceae), hvězdicovité (Asteraceae), kakostovité (Geraniaceae), hluchavkovité (Lamiaceae), vavřínovité (Lauraceae), myrtovité (Myrtaceae), borovicovité (Pinaceae), růžovité (Rosaceae), routovité (Rutaceae) a zázvorníkovité (Zingiberaceae) (Bulánková 2005).

Jako repelentní složky EO byly prokázány například kyslíkaté monoterpeny (např. mentol, pinen, eucalyptol, geraniol, citronellol, limonen) (Pavela 2006). Mnohé esenciální oleje jsou dlouhodobě považovány za relativně účinné a pro zdraví člověka neškodné alternativy k syntetickým insekticidům (Pavela 2011). Jejich hlavní nevýhoda v porovnání se syntetickými repelenty je jejich relativně omezená účinnost. Například v pokusech, kde byly srovnávány repelentní účinky hřebíčkového oleje a syntetický repelent DEET (N, N-dietyl-*meta*-toluamid)

proti komárům, měl neředěný hřebíčkový olej účinnou repelentní dobu 3 hodiny, zatímco 100 % DEET působil až 10 hodin (George a kol. 2014).

## 5.2 Studie repelence esenciálních olejů

Nedávné výzkumy prokázaly, že některé EO jsou účinné i na kůrovce *I. typographus*. Mudročenková a kol. (2018) ve studii insekticidních a repelentních účinků EO proti dospělým broukům *I. typographus* používala éterické oleje rostlin čeledi Lamiaceae (*Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Hyssopus officinalis*, a *Mentha piperita*) a čeledi Apiceae (*Pimpinella anisum* a *Foeniculum vulgare*).

Chemické složení uvedených esenciálních olejů bylo analyzováno pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a jejich repelentní a toxické účinky byly měřeny v laboratorních biotestech na toxicitu a repelenci.

Test na kontaktní toxicitu byl prováděn v Petriho miskách s vloženým filtračním papírkem, na který bylo nanášeno celkem pět různých dávek esenciálního oleje (0,017; 0,043; 0,084; 0,0123 a 0,161  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) v deseti replikacích, EO dávky byly ředěny acetonem. Brouci *Ips typographus* byli vneseni do středu papírového disku a Petriho miska byla uzavřena a inkubována ve tmě při 23 °C a 70-80 % vlhkosti po dobu maximálně 96 hodin. Úmrtnost brouků byla zaznamenávána po (24, 48, 72 a hodinách). V tomto experimentu měli nejlepší insekticidní účinky *O. vulgare*, *T. vulgaris* a *P. anisum*. Nejvíce toxický, a to ve všech dávkách, byl *O. vulgare*. Naopak nejnížší míra úmrtnosti byla zjištěna u *M. piperita*.

Biotest odpudivosti se lišil od výše popsaného tím, že ve víku Petriho misky byl vytvořen otvor pro přístup vzduchu. Filtrační papírový disk byl rozdělen na dvě poloviny, kde polovina disku byla ošetřena roztokem esenciálního oleje a druhá acetonem pro kontrolu. Bylo použito šest dávek (0,015; 0,013; 0,077; 0,150; 0,219 a 0,286  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) v deseti opakováních. Brouci byli vpuštěni do Petriho misky podobně jako v předešlém experimentu a inkubováni ve tmě při 23 °C a 70-80% vlhkosti. V průběhu následujících 12 hodin byly v pravidelných intervalech (po 2, 4, 6, 8 a 12 hod.) vyhodnocovány počty jedinců na ošetřené a kontrolní půlce filtračního papíru. V tomto experimentu se repelentní účinnost látek měnila na základě dávky, která byla použita. Celkově však výrazně vyšších repelentních účinků

dosáhly EO z *P. anisum*, *O. vulgare* a *T. vulgaris*. Naopak u *M. piperita* repelentní účinek nebyl prokázán.

Biotest odpudivosti byl rozšířen o experimenty, kdy byla EO ošetřena kůra smrkových špalků, které byly pak ponechány samecům kůrovců ke kolonizaci. Následně bylo porovnáváno množství zavrtnutých brouků. Tři EO, které v Petriho miskách v laboratorních podmínkách prokazovaly repelentní účinnost, tj. *P. anisum*, *O. vulgare* a *T. vulgaris*, byly aplikovány v různých dávkách (1,039; 1,385 a 2,077  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). EO byly ředěny acetonem. Ošetřené a kontrolní smrkové špalky, které byly rozděleny na 3 části, z nichž každá byla postříkána 7ml EO ve 3 zmíněných dávkách, byly umístěny ve skleněných boxech, jehož půdorys byl rozdělen na 4 části. V každé části byl umístěn špalek ošetřen daným EO a ve 4. části byl umístěn špalek ošetřený acetonem. Do takto připraveného boxu bylo vypuštěno 100 jedinců obou pohlaví. Repelence byla pozorována stěhováním brouků do neošetřených míst. Repelentní účinek byl potvrzen u všech dávek EO. Výsledky prokázaly, že repelentní účinek nezmizel ani po 72 hodinách po aplikaci. Při ošetření dávkou (1,039  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), se neprojevíly žádné významné rozdíly, naopak u dávek (1,385 a 2,077  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), EO *P. anisum* a *T. vulgaris* vykazoval vyšší repelentní účinek než EO *O. vulgare*.

Výsledek této studie naznačuje, že esenciální oleje *O. vulgare*, *P. anisum* a *T. vulgaris* mají silný odpudivý účinek na *I. typographus*. Tyto experimenty Mudročenkové a kol. (2018) ukazují, že esenciální oleje mohou mít určitou perspektivu při kontrole kůrovců například na skládkách. Na základě popsanych dat jsem provedl experimenty, jejichž cílem byla snaha identifikovat ty látky EO, které jsou kůrovci *I. typographus* vnímány, a tudíž se mohou na pozorované repelenci vůči tomuto broukovi podílet.

## 6. Metodika

Fotografie uvedené v této práci byly pořízeny autorem v únoru 2020.

### 6.1 Chov brouků

Brouci, použiti k experimentům pocházeli z druhé generace, která byla vychována v laboratorních podmínkách. První generace pocházela z napadených stromů získaných v Kostelci nad Černými lesy ve středních Čechách. Napadené stromy byly rozřezány na kusy (50 cm). Nařezaná polena byla převezena do laboratoře a umístěna v chladicím boxu s teplotou 5 °C. Před experimenty byla polena přenesena do chovů s řízeným teplotním a světelným režimem (25 °C teplota, vlhkost 66 %) a umístěna do izolátorů. Z takto ošetřených polen se líhli brouci. Jedinci, kteří vylítli, byli druhově determinováni a 80-100 dospělých brouků obou pohlaví rodičovské generace bylo přeneseno na nenapadené smrkové poleno (25 cm průměr, délka 50 cm), aby založili novou generaci. Polena byla umístěna v plastovém boxu. Jejich úspěšnost zavrtání byla okolo 80-90 %. Vylíhli brouci nové generace byli sbíráni a shromažďováni po dobu 10 dní. Poté bylo matečné poleno odkorněno a zbytek brouků byl manuálně vybrán. Plastový box s druhou generací kůrovců měl větrací otvory, překryté sítkou, která bránila úniku brouků a byl napojen na řízenou ventilaci (příloha 6). Koloběh vzduchu byl zajištěn díky zadnímu otvoru v boxu, kde byla napojená hadice se zdrojem odtahu. Vybraní brouci první laboratorní generace byli uchováni v plastovém boxu (20x30x10 cm, š, h, v). Brouci byli vypuštěni na několik vrstev plátů kůry, ponecháni při pokojové teplotě, aby se zažrali. Po zažrání byl box s kůrou v lednici při teplotě 5 °C. Takto vychovaní brouci byli následně odebráni na jednotlivé experimenty.

### 6.2 Ředění esenciálních olejů (EO)

Pro elektroantenografické (EAD) experimenty a experimenty prováděné pomocí plynové chromatografie s biologickou detekcí (GC-EAD) byly použity EO *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare* (Certified Therapeutic Essential Oils, CTEO®). Tyto esenciální oleje byly zakoupeny od firmy BEWIT®. Pro potřeby analýzy byly EO ředěny hexanem (rozpuštědlo), protože čisté EO jsou příliš koncentrované. Celkem bylo namícháno sedm koncentrací (1, 10, 100 µg/µl, 1, 10, 100 ng/µl a 10ng/nl) esenciálních olejů *Pimpinella anisum*,



*Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare*. Roztoky byly naředěny do skleněných vialek o objemu 2ml s šroubovacím víčkem vybaveným teflonovým septem. Příprava samotných koncentrací probíhala následovně. Pomocí mechanické pipety byl odebrán 1 $\mu$ l esenciálního oleje a toto množství bylo naředěno 1000 $\mu$ l hexanu. Tím vznikla první základní koncentrace 1ng/nl. Vialka s takto připravenou koncentrací byla protřepána v zařízení Vortex V-1, jež je zařízení, které je vybaveno kloboučkem o průměru 20 mm, v němž při tlaku přiložené zkumavky dojde k intenzivnímu protřepání obsahu. Pro získání další koncentrace bylo pipetou odebráno 100 $\mu$ l koncentrace 1ng/nl, toto množství bylo smícháno s 900 $\mu$ l hexanu tím vznikla koncentrace 100ng/ $\mu$ l, která byla znovu promíchána pomocí Vortexu V-1. Z této koncentrace byla stejným způsobem namíchána koncentrace 10ng/ $\mu$ l a následně 1ng/ $\mu$ l. Druhá základní koncentrace 100  $\mu$ g/ $\mu$ l byla namíchána v poměru 100 $\mu$ l EO a 1000 $\mu$ l hexanu. Při následném ředění, které probíhalo stejně, jak je výše popsáno, bylo docíleno koncentrace 10 $\mu$ g/ $\mu$ l a 1 $\mu$ g/ $\mu$ l. Takto namíchané dávky EO byly uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

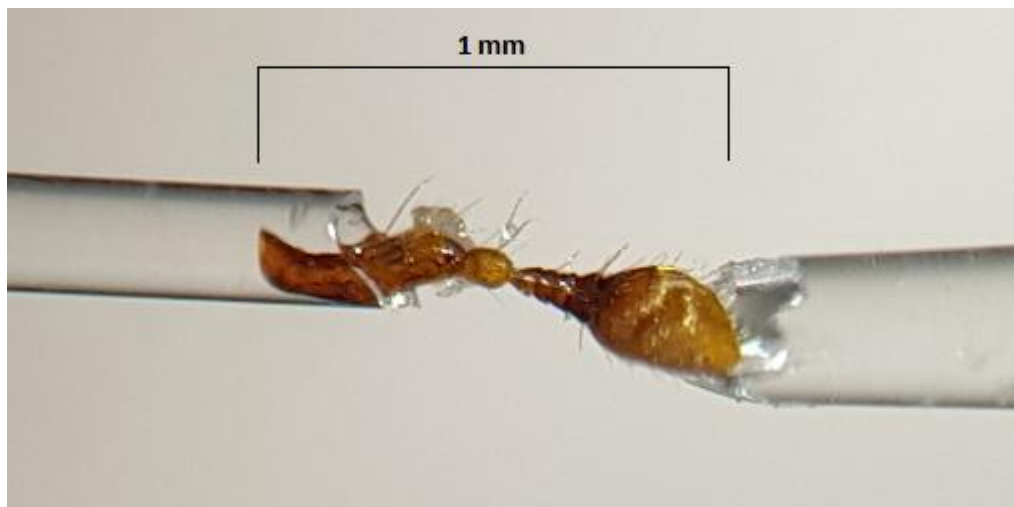
### 6.2.1 Příprava stimulačních zásobníků

Pro EAD experimenty bylo nutno vytvořit stimulační zásobníky. Do skleněných pasteurových pipet byl vložen filtrační papír o rozměru 3x1,5 cm. Tento papír byl napuštěn 10  $\mu$ l potřebného roztoku. Bylo vytvořeno šest testovacích pipet s šesti koncentracemi od každého EO - *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare*. Dále byla vytvořena prázdná pipeta (označena jako vzduch), pipeta s filtračním papírem s 10  $\mu$ l hexanu a pipeta kde bylo na filtrační papír nanášeno 1 a 5ng/ $\mu$ l cis-verbenolu (jedna ze dvou komponent agregačního feromonu *Ips typographus*), který byl používán jako standardní stimulus pro stanovení citlivosti tykadel. Celkem bylo vytvořeno 22 testovacích pipet. Po odpaření rozpouštědla (cca jedna minuta) byly všechny pipety (stimulační zásobníky) uzavřeny víčkem, které bylo utěsněno parafilmem (elastická páska). Stimulační zásobníky byly uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

### 6.3 Příprava a zapojení tykadla

K zahájení experimentů bylo zapotřebí úspěšně zapojit tykadlo mezi dvě skleněné elektrody. Brouk *Ips typographus* byl uchopen entomologickou pinzetou. Následně byl položen pod stereomikroskop se zvětšením 20 - 30x. Pro snadnější

práci byl brouk položen dorzálně a současně mu byla oddělena hlava od těla pomocí skalpelu. Po oddělení hlavy od těla byla hlava přidržena pomocí pinzety a druhou pinzetou bylo jedno tykadlo brouka odtrženo od hlavy. Následně se tykadlo zapojilo pomocí stereomikroskopu (Nikon SMZ 18) mezi dvě skleněné elektrody upevněné v mikromanipulátorech s možností pohybu v osách x, y, z. Skleněné elektrody byly vyrobeny ze skleněných trubiček délky 10 cm a průměru 1,5 mm vertikálním tahačem elektrod PC-100 (NARISHIGE) viz příloha 4. Elektrody s mírně ulomeným hrotem byly naplněny Ringerovým roztokem (složení roztoku: 12,2 g chloridu sodného (NaCl), 0,21 g chloridu draselného (KCl) a 0,20 g chloridu vápenatého (CaCl<sub>2</sub>) v 1 litru destilované vody). Tento roztok propojuje tykadlo prostřednictvím do něj zanořených stříbrných drátků s předzesilovačem (10x, Syntech Universal Probe) a analogo-digitálním převodníkem (Syntech, IDAC-2). Správnost zapojení tykadla signalizoval zesilovač zelenou led diodou. Pokud nedošlo k propojení, svítila červená kontrolka. Doba potřebná k zapojení tykadla mezi elektrody a zahájení jednotlivých pokusů trvala dvě minuty.



**Obrázek 2: Zapojení izolovaného tykadla kůrovce *Ips typographus* mezi 2 skleněné mikroelektrody. Snímací elektroda je v kontaktu s čichovými sensilami na paličce tykadla. Referenční elektroda je propojena s hemolymfou na bázi tykadla.**



**Obrázek 3:** Typická odpověď tykadla na stimulaci čichovým podnětem. Po zahájení stimulace tykadlo odpovídá depolarizací a po jeho skončení se potenciál tykadla pomalu vrací k výchozím hodnotám. Míra depolarizace – amplituda - je udávána v mV. (úsečka v horní části záznamu ukazuje dobu stimulace).

Mezi snímací a referenční (zemní) elektrodou existuje klidový potenciál. Jeho hodnota se mění v průběhu podráždění tykadla čichovým podnětem a vzniká tak elektroantenografická (EAG) odpověď obrázek 3 (černá vodorovná čára - 0,3 sec.). Hodnoty EAG dosahují několik mV a jejich amplituda závisí na typu podnětu a jeho koncentraci.

### 6.3.1 Stimulace tykadla

V GC-EAD experimentech byla tykadla stimulována látkami vycházejícími z GC. V EAD experimentech stimulace tykadel probíhala pomocí pasteurových pipetek, které obsahovaly filtrační papírky s 10  $\mu$ l zkoumaných látek. Obsah pipet byl injikován do proudu vzduchu směřujícího na tykadlo pomocí vzduchového pulzu, který procházel pipetkou a trval 0,5 vteřiny. K produkci vzduchových pulzů byl využit stimulator (Syntech CS-55). Pulzy byly aplikovány do proudu vzduchu dírkou umístěnou 1 cm od ústí trubice s proudem vzduchu. Stimulátor vzduchových pulzů byl aktivován pomocí nožního pedálu.

### 6.4 Používaná zařízení

K experimentům jsem využil elektroantenogram (EAG), plynovou chromatografii s biologickou detekcí (GC-EAD) a plynovou chromatografii s hmotnostní (MS) detekcí. EAG byla využita při porovnávání účinnosti jednotlivých esenciálních olejů (EO) a stanovení koncentrací, které vyvolávají odpověď na tykadlech *I. typographus*. GC-EAD byla použita k rozdělení látek jednotlivých EO a k určení jejich biologické aktivity. GC-MS byla využita k identifikaci antenálně aktivních látek.

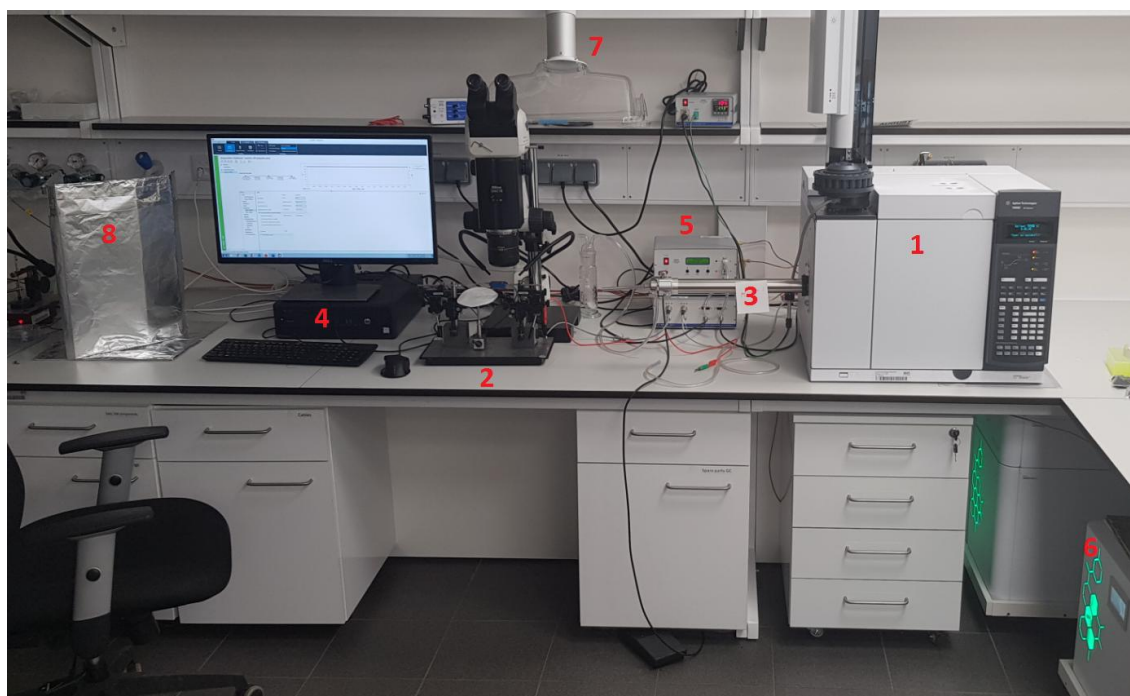
Elektroantenografie (EAG) je neurofyziologická metoda, která pomocí elektrod zaznamenává aktivitu čichových receptorových neuronů na tykadle hmyzu formou záznamu změny napětí mezi referenční elektrodou připojenou na špičku tykadla a elektrodou snímací, připojenou na bázi tykadla, během stimulace. Změna napětí (amplituda) závisí na typu látky a její koncentraci. Změny napětí jsou nejprve zesilovány předzesilovačem 10x (Syntech, Universal Probe) a poté jsou digitalizovány pomocí analogo-digitálního převodníku (IDAC-2) a vedeny do PC, kde jsou zaznamenávány a vyhodnocovány pomocí EAG Pro softwarem (Olsson, Hansson 2013).

Ve spojení s plynovou chromatografií (GC) je elektroantenografie používána k identifikaci těkavých látek, které hmyz tykadly vnímá a které mohou ovlivňovat jeho chování (GC-EAD). V GC-EAD analýze je hmyzí tykadlo stimulováno látkami vycházejícími z plynového chromatografu a slouží jako biologický detektor odpovídající na látky, pro které jsou na tykadlech receptory (Myrick, Baker 2011).

Plynová chromatografie (GC) umožňuje dělení a analýzu těkavých látek a jejich směsí s bodem varu do cca 400 °C. Analyzované látky jsou děleny pomocí dvou fází, mobilní a stacionární. U kapilární plynové chromatografie, která byla v experimentech použita, je stacionární fáze nanášena v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry (kolona, 0,23 mm tenká až 30 m dlouhá kapilára). Mobilní fáze je nosný plyn (většinou helium nebo vodík). Princip separace látek je následující. Látka se vnese (nastříkne) do vyhřívaného injektoru a v něm se zplyní. Následně je ve formě par unášena nosným plynem do kolony. Složky vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak se desorbují čerstvým přicházejícím nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Každá složka vzorku postupuje kolonou svou vlastní rychlostí závislou na distribuční konstantě složky pro dané fáze. Při využití biologického detektoru (hmyzího tykadla) je eluát z chromatografické kolony dělen pomocí děliče (splitteru) do dvou ramen - jedno vede na tykadlo, druhé do chromatografického detektoru, kterým byl v těchto experimentech tzv. plameno-ionizační detektor (FID). Obě ramena jsou tvořena kapilárou bez vnitřní fáze o stejné délce a průměru. Tím je zajištěno stejné retenční chování látek procházejících oběma detektory, EAD a FID. Odpověď tykadel

je snímána pomocí mikroelektrod (v tomto případě se jednalo o skleněné mikropipety naplněné Ringerovým roztokem s Ag/AgCl drátky, které převáděly antenální signály do zesilovací aparatury. Pokud z chromatografu vychází látka, na kterou reagují čichové receptory na tykadle, vzniká negativní elektrický potenciál (depolarizace), který se po odeznění stimulace vrací do klidového stavu. Signál obou detektorů je od nástřiku vzorku kontinuálně registrován. Grafický záznam závislosti EAG a FID signálu na čase se nazývá GC-EAD chromatogram (na ose y je zaznamenána odezva detektorů a na ose x čas). Každá látka je charakterizována FID chromatografickým píkem (ten má tvar Gaussovy distribuce a jeho výška je úměrná množství látky). Aktivní látka je charakterizována EAD odpovědí (jejíž průběh závisí na typu a koncentraci antenálně aktivní látky, resp. na typu a množství čichových receptorů na tykadle. Stejně látky mají za daných chromatografických podmínek shodný retenční čas, tj. dobu, která uplyne od nástřiku do průchodu látky detektorem (Sparkman a kol. 2011). Experimentální zařízení využívané pro GC-EAD je na obrázku 4.

Princip plameno-ionizačního detektoru (FID) je následující: eluát z GC kolony se v něm mísí s vodíkem a vzniklá směs hoří v malé trysce. Plamínek je obklopen elektrodou a mezi tryskou a elektrodou je relativně napětí, které sbírá ionty vytvářené hořením procházejících látek. Výsledný signál je zesílen a zaznamenáván. FID detektor vyžaduje tři plyny s přesnou regulací. Obvykle se používají vodík pro hoření, helium nebo dusík jako nosný plyn protékající kolonou a dále pak vzduch pro podporu hoření. FID detektor má velmi široký dynamický rozsah s vysokou citlivostí a s výjimkou několika nízkomolekulárních látek detekuje všechny látky s uhlíkem. Detektor je vybaven nezávislým vyhříváním, které brání kondenzaci vody v detektorovém prostoru popisuje (Olsson, Hansson 2013).



**Obrázek 4: Pracoviště pro vykonávání experimentů.**

- 1- Plynový chromatograf Agilent 7890B (Agilent Technologies, USA) s autosamplérem pro automatický nástřik látky
- 2- EAD (mikromanipulátory, stereomikroskop (Nikon SMZ 18) s možností pohybu v osách x, y, z
- 3- Vyhřívaný interface mezi GC a EAD
- 4- Počítač připojený k plynovému chromatografu s potřebným programem, kterým je možno ovládat GC a vyhodnocovat experimenty
- 5- Analoگو-digitální převodník (Syntech IDAC-2) a vzduchový generátor vzduchu (Syntech CS-55)
- 6- Generátor vodíku (PEAK Scientific)
- 7- Odsávací systém vzduchu, který zvyšuje kvalitu měření
- 8- Kryt, vyrobený z kartonu obalený hliníkovou folií, pro zastínění a ochranu tykadla během analýzy

Hmotnostní (MS) detektor umožňuje určování hmot volných molekul, jejich částí a s jejich pomocí umožňuje identifikaci látek. V těchto experimentech byl využit ve spojení s plynovou chromatografií. Princip funkce MS detektoru je následující: látky rozdělené v GC jsou v MS detektoru nejprve ionizovány (obvyklá ionizace využívá proudu elektronů - electron impact ionizace, EI). MS detektor slouží jako iontově optické zařízení, které ze směsi plynných molekul a iontů odděluje nabitě částice podle jejich efektivních hmot ( $m/z$ ) a měří jejich intenzity. Na základě hmotnosti iontů, jejich intenzity a vzájemných vztahů mezi molekulárními a fragmentačními ionty lze provést predikci identity analyzovaných látek. Charakter hmotového spektra závisí na podmínkách a způsobu ionizace, uspořádání analyzátorů iontů a způsobu registrace iontů (Olsson, Hansson 2013). V experimentech byl použit speciální typ MS detektoru, tzv. TOF MS detektor.

## 6.5. Experimenty

### 6.5.1 Studium změn citlivosti tykadel po zapojení mezi elektrody

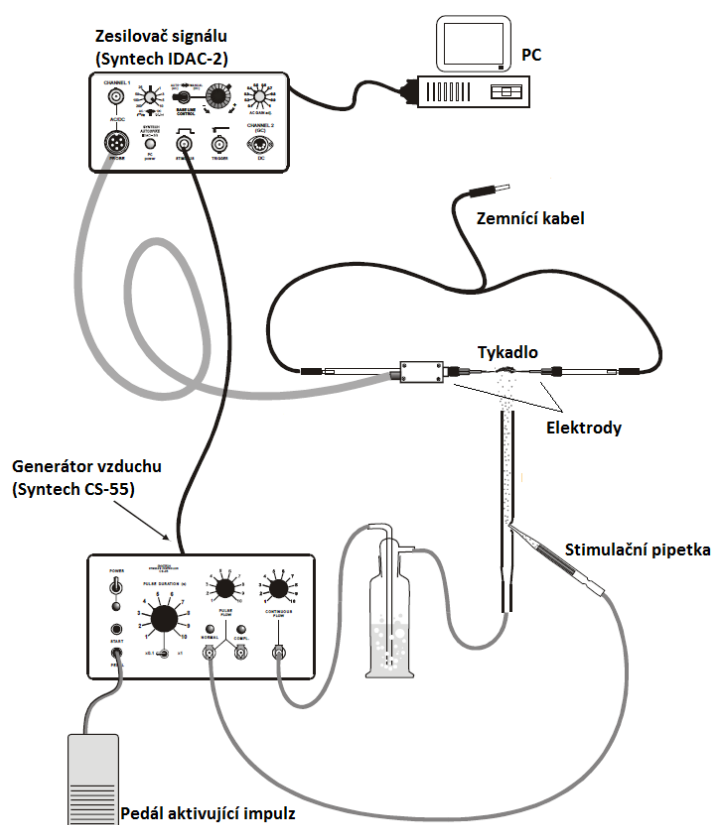
Protože tykadlo zapojené mezi elektrody má omezenou životaschopnost, jeho schopnost odpovídat na čichové podněty v čase slábne, až zcela vymizí. To je významné v experimentech, kdy je využito izolovaného tykadlo jako biologický detektor k hledání aktivních látek v přírodních vzorcích. První experiment měl proto za cíl zjistit průběh snižování citlivosti tykadla po zapojení mezi elektrody. Tykadlo bylo stimulováno 0,5 vteřinovými pulzy cis-verbenolu (pasteurova pipeta s dávkou 1 ng/  $\mu$ l), jedné ze dvou komponent agregačního feromonu *I. typographus*. Tykadlo bylo stimulováno v pravidelných 1 min. intervalech až do doby, kdy již nebylo schopno reagovat. Tento typ pokusu byl opakován na třech tykadlech. Odpovědi tykadel byly zaznamenávány v milivoltech pomocí softwaru EAG Pro (Syntech). Hodnoty z měření byly zprůměrovány a prezentovány pomocí grafu (Microsoft Office Excel). Schéma zapojení EAG měřící aparatury a způsob stimulace je znázorněn na obrázku 5.

### 6.5.2 Porovnání účinnosti testovaných EO

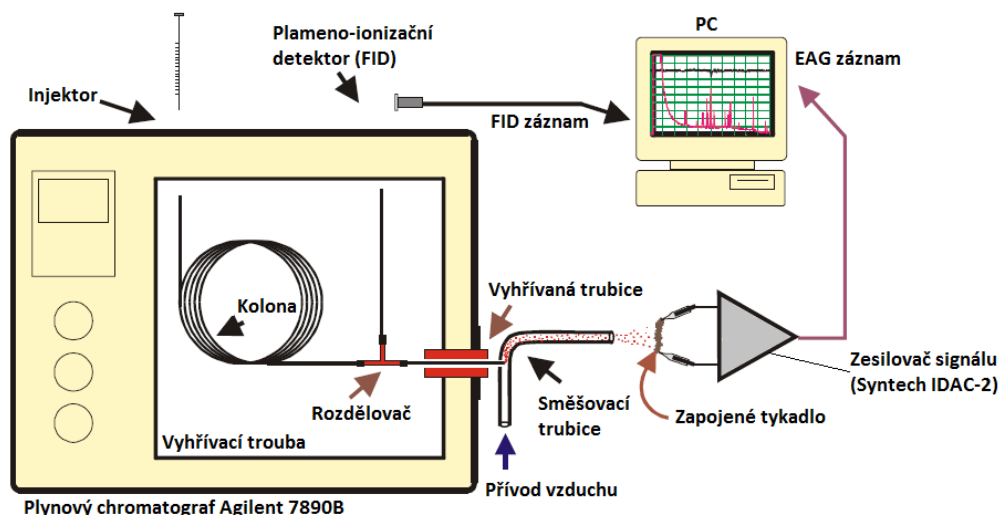
V těchto pokusech bylo zapotřebí zjistit, zda EO jsou schopny vyvolávat odpovědi tykadel a pokud ano, jaké koncentrace jsou k jejich vyvolání potřeba. V těchto experimentech byl použit software EAG Pro. Tento program zaznamenává odpovědi tykadel na jednotlivá podráždění. Při stimulaci podněty s zvyšující se koncentrací, umožňují sestavit závislost odpovědi tykadla na dávce určité látky (dose response). EAG reakce je zaznamenávána graficky a současně je vyhodnocována maximální negativní výchylka (depolarizace) EAG ve voltech. K tomuto experimentu byly použity stimulační zásobníky (pasteurovy pipety) s koncentracemi 1ng/  $\mu$ l, 10ng/  $\mu$ l, 100ng/  $\mu$ l, 1  $\mu$ g/  $\mu$ l, 10  $\mu$ g/  $\mu$ l a 100  $\mu$ g/  $\mu$ l esenciálních olejů *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* a *Oreganum vulgare*. Jako kontroly byly použity prázdné pipety, pipety s hexanem a cis-verbenolem. Po zapnutí daného programu a následném zapojení tykadla mezi dvě skleněné elektrody bylo tykadlo umístěno do proudu vzduchu k ústí stimulační trubice a postupně stimulováno připravenými stimuly. Pořadí stimulace tykadla byla následovná. První impuls byl proveden prázdnou pipetou (vzduch), pipetou



s hexanem a standardem (cis-Verbenol 5ng/  $\mu$ l). Po standartu následovaly koncentrace daného esenciálního oleje v pořadí 1ng/  $\mu$ l, 10ng/  $\mu$ l, 100ng/  $\mu$ l, 1  $\mu$ g/  $\mu$ l, 10  $\mu$ g/  $\mu$ l a 100  $\mu$ g/  $\mu$ l. Po těchto impulsích následovala stimulace standardem pro porovnání reakcí před a po stimulaci esenciálními oleji. Odstup mezi jednotlivými stimulacemi byl minimálně 30 sekund. Pro každý EO byla použita 4 tykadla. Celkem bylo v tomto experimentu provedeno 12 pokusů. Výsledky byly vyhodnocovány v programu EAD Pro a grafy byly vytvořeny v Microsoft Office Excel. Tykadla reagovala malými odezvami i na kontrolní stimuly (prázdný zásobník, zásobník s hexanem). Stimulace zásobníky s čichově aktivními látkami vyvolávala výrazně vyšší odezvy.



**Obrázek 5: Schéma EAG experimentálního zapojení.**



Obrázek 6: Schéma zapojení GC-EAD.

### 6.5.3 Identifikace antenálně aktivních látek EO pomocí GC-EAD

K nalezení antenálně aktivních látek v EO byla použita plynová chromatografie spojená s elektroantenografickou detekcí (schéma je uvedeno na obrázku 6).

V plynovém chromatografu je kolona propojena s dělicím zařízením (splitterem, děličem), z něho pak jsou látky dělené kolonou rozvedeny do dvou ramen. Jedno je zapojeno do chromatografického detektoru a druhé vychází mimo chromatograf do vyhřívané trubice (GC-EAD interface), která ústí do směsné komůrky, kde se eluát z GC mísí s proudem vzduchu a je směřován na tykadlo. Teplota vyhřívané trubice byla regulována pomocí teplotního regulátoru (Syntech, TC-02).

Vzorky byly do GC injikovány pomocí Autosampleru (na schématu není uveden), který umožňuje automatický nástřik potřebné látky s vysokou reprodukovatelností. Analýzy byly provedeny na chromatografické koloně 0,25  $\mu\text{m}$  ID, 30 m délka. Kolona ústila do splitteru. Z něho pak vycházely 1 m úseky kapilárních kolon bez fáze. Jedna část byla napojena na detektor (FID), druhá ústila do směsné komůrky a dále na tykadlo. Teplotní program chromatografu začínal na 30  $^{\circ}\text{C}$ . Na této hladině byla teplota udržována jednu minutu, poté se teplota

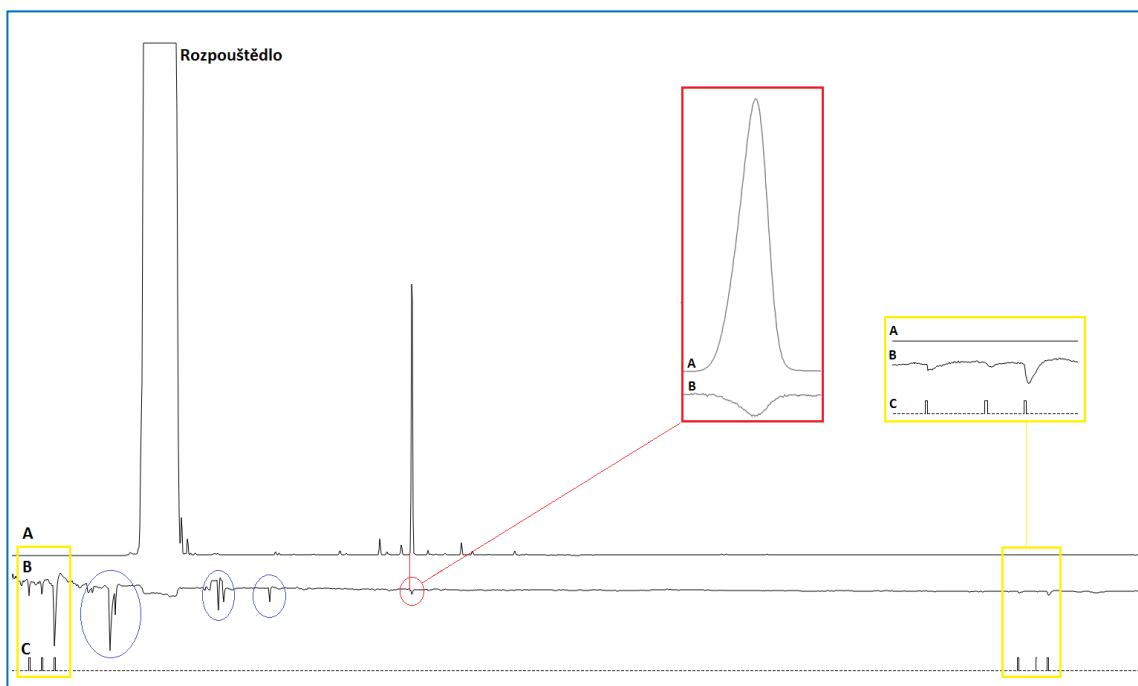
zvyšovala gradientem 30 °C/min dokud nedosáhla 300 °C. Na této výsledné teplotě byla udržována pět minut. Poté byl celý systém chlazen na výchozí teplotu. Teplota nástřiku byla 200 °C, teplota detektoru 250 °C. Jedna analýza trvala 15 minut. Pro provoz plynového chromatografu (GC) Agilent 7890B (Agilent Technologies, USA) byl použit jako nosný plyn helium z vysokotlaké bomby. Pro provoz detektoru byl zajištěn přísun vzduchu (kompresor), dusíku (vysokotlaká plynová bomba) a vodíku (generátoru vodíku PEAK Scientific).

Antenální detektor (tykadlo *I. typographus*) byl zapojen způsobem, který již byl popsán.

GC-EAD experimenty vždy začínaly analýzou hexanu, který sloužil ke kontrole případné kontaminace po předchozích analýzách. Následovaly analýzy jednotlivých koncentrací (100ng/μl a 1μg/μl) esenciálních olejů. Po nástřiku vzorku do GC byla tykadla stimulována sérií testovacích stimulů (vzduch, hexan, standart). Stejná série stimulů byla aplikována i na konci měření, abychom viděli, jak v průběhu analýzy poklesla citlivost daného tykadla. Po ukončení GC-EAD analýzy byla možnost hodnotit výsledky pomocí počítačového software (Syntech GC-EAD).

Během analýzy docházelo u jednotlivých tykadel k určitým rušivým elementům. Aby se minimalizoval tento efekt, bylo během měření kolem připojeného tykadla postaveno stínění (improvizovaná Faradayova klec) vyrobené z kartonu, který byl obalen hliníkovou fólií. Toto stínění mělo za cíl chránit tykadlo před vnějšími elektrickými indukovanými jevy, statickou elektřinou a vzduchovými turbulencemi. Přesto však docházelo v průběhu měření k výchytkám, které byly způsobeny těmito vlivy (artefakty měření).

Záznam GC-EAD analýzy je zobrazen na obrázku 7. K prezentaci byl vybrán experiment s minimálním množstvím artefaktů (artefakty jsou orámovány modře, odpověď červeně). Záznam A - představuje FID odpověď při GC-EAD analýze EO *Pimpinella anisum* (100ng/μl), B – ukazuje antenální aktivitu, záznam C – znázorňuje dobu stimulace tykadla pomocí Pasteurových pipet.



**Obrázek 7: GC-EAD analýza *Pimpinella anisum* (100ng/μl). Záznam A - představuje FID odpověď, B - antenální aktivitu, C – čas aplikace externí stimulace prostřednictvím Pasteurových pipet – pro kontrolu citlivosti tykadla na začátku a na konci analýzy (žluté rámečky). Modře jsou vyznačeny artefakty, červeně aktivita tykadla vyvolaná aktivními látkami EO.**

Na záznamu A je patrný velký první pík rozpouštědla a pak následují další malé píky o různé intenzitě. To jsou komponenty daného EO, které jsou přítomné v různých koncentracích. Vidíme, že EO je směs více látek.

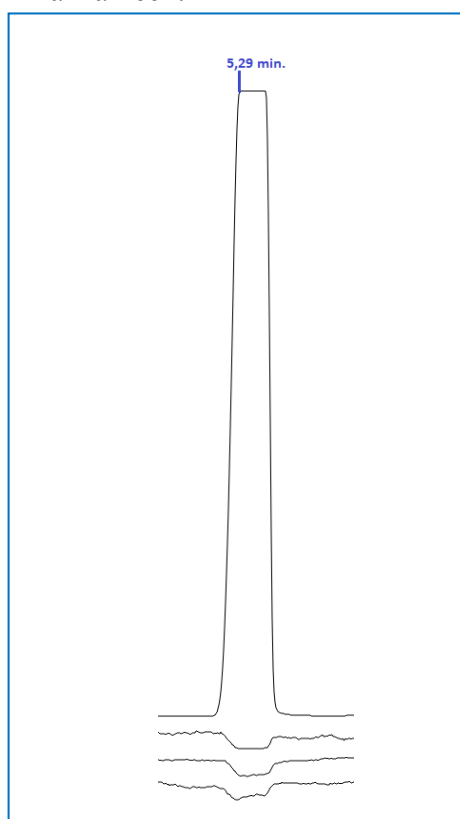
Za konstantních parametrů GC-EAD analýz jsou retenční časy všech píků (látek) reprodukovatelné, a tudíž srovnatelné mezi jednotlivými analýzami.

Záznam antenální aktivity (B) ukazuje odpovědi na tykadla na stimulaci prázdným zásobníkem (vzduch), zásobníkem s naneseným rozpouštědlem (hexan) a zásobníkem s cis-verbenolem (standard). Stimuly byly aplikovány na začátku a na konci analýz (čas aplikace těchto stimulací je zřejmý na záznamu C).

Na záznamu B ve žlutém orámování je zřejmé, že tykadlo reagovalo na vzduch a hexan podobně, ale cis verbenol vyvolával vyšší antenální odpověď. V žlutém rámečku na konci GC-EAD záznamu je zřejmé, že se citlivost tykadla na stimulaci kontrolními stimuly snížila, ale tykadlo bylo stále schopné proporcionálně odpovídat. Na EAD záznamu (B) je dále patrné, že uvedené tykadlo reagovalo na rozpouštědlo (hexan) a na látku eluující v retenčním čase 5,29 min

(majoritní pík EO). Na záznamu jsou před a po píku rozpuštědla modře označené artefakty měření.

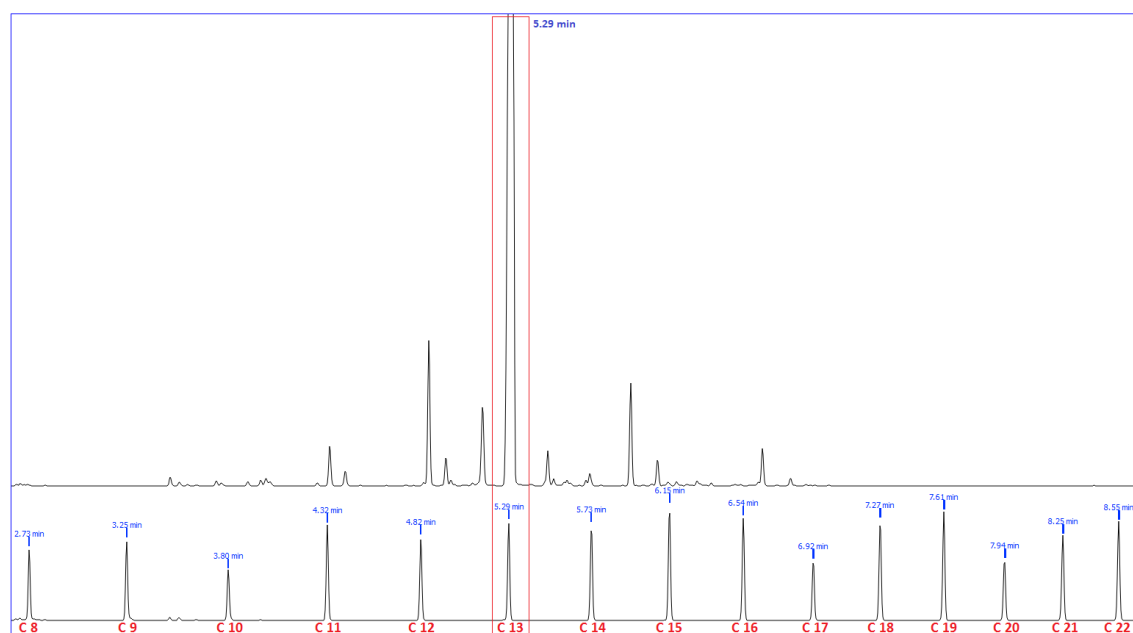
Po GC-EAD analýze všech EO a jejich koncentrací Byly srovnány analýzy nejprve v rámci jednoho EO a vyhledávány oblasti, ve kterých tykadla odpovídala opakovaně. Poté se porovnály GC-EAD průběhy různých EO a hledaly se antenálně aktivní látky, které jsou pro analyzované EO společné. Aby mohla být látka považována za aktivní, musela se odpověď na danou látku ve stejný čas vyskytnout minimálně ve třech EAD záznamech.



**Obrázek 8: Detail odpovědi tykadla u *Pimpinella anisum* 100ng/μl na látku vycházející v retenční čase 5,29 min. Horní záznam reprezentuje FID odpověď, dolní 3 záznamy jsou záznamy antenální aktivity 3 různých tykadel.**

Na obrázku 8 je možno vidět opakovanou EAD aktivitu u tří různých tykadel. Horní záznam reprezentuje FID signál, dolní 3 záznamy jsou EAD odpovědi na danou látku u 3 následujících analýz dané koncentrace EO. Z obrázku je zřejmé, že EAD odpovědi mají podobný průběh, který kopíruje průběh GC píku, ale různou amplitudu v závislosti na citlivosti tykadla (citlivost tykadel je různá a závisí na absolutní citlivosti, způsobu zapojení a na čase po odstřížení).

U potvrzených odpovědí se zaznamenali jejich retenční časy (Rt).



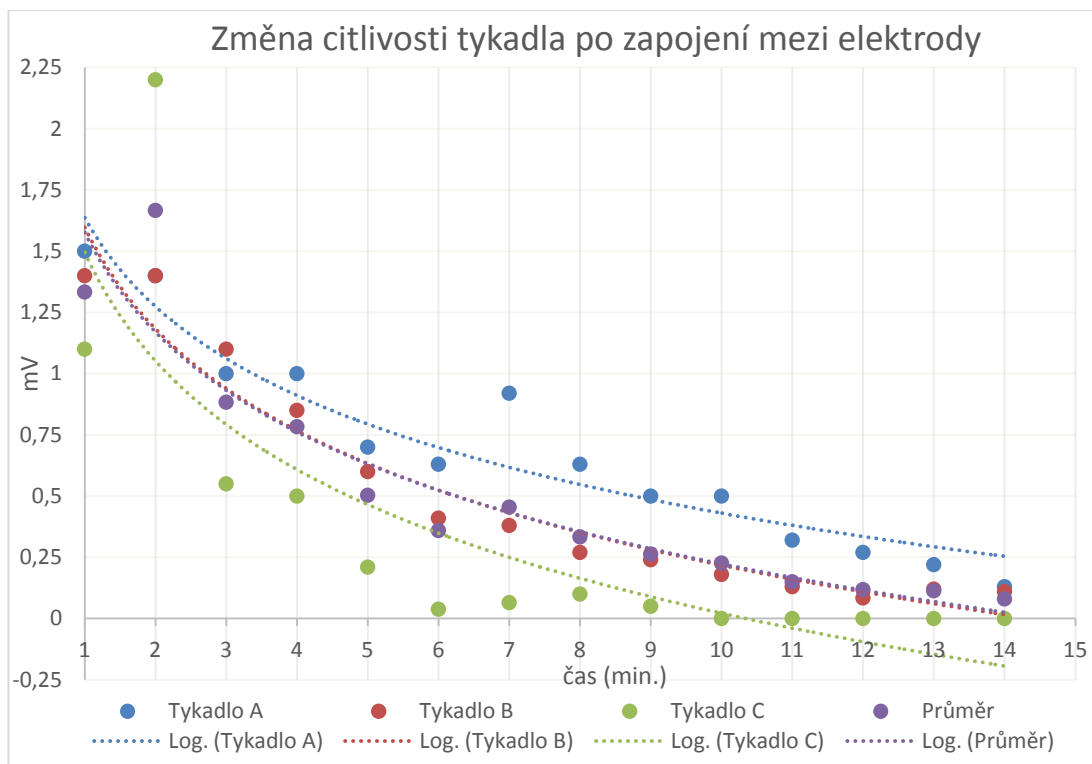
**Obrázek 9: Srovnání C8-C22 s *Pimpinella anisum* 1 $\mu$ g/ $\mu$ l V červeném rámečku je vyznačena látka, která byla EAD aktivní s RT 5,29 min. Tato látka eluuje podobně jako C13 a její KI je 1300.**

EAD aktivní látky byly dále charakterizovány pomocí tzv. Kovatsového indexu. To je retenční index normalizovaný na retenční časy dvou n-alkanů (uhlovodíků), které jsou detekovány před aktivní látkou a za ní. Zatímco retenční časy se u jednotlivých chromatografických systémů liší (např. s ohledem na délku kolony, tloušťku filmu, průměr, rychlost nosného plynu a tlaku apod.), odvozené retenční indexy jsou nezávislé na těchto parametrech a umožňují porovnání. Pro zjištění KI byly analýzy EO doplněny analýzou série uhlovodíků C8 - C22 (obrázek 9).

## 7. Výsledky

### Změna citlivosti tykadla po zapojení mezi elektrody

V pokusech bylo používáno izolované tykadlo, jehož schopnost odpovídat je omezená. Pro GC-EAD, kde tykadlo funguje jako biologický detektor, je nutné vědět, jak dlouho může čichově aktivní látky detekovat. Proto proběhl experiment, ve kterém byl zjišťován pokles citlivosti tří různých tykadel v čase (obrázek 10). Jak ukazuje obrázek 10, citlivost tykadel se s rostoucím časem postupně snižovala a ve 14. minutě byla prakticky nulová. Mezi druhou a třetí minutou měření došlo k výraznému snížení citlivosti a to u všech třech měření. Tykadlo C vykazovalo od začátku měření nižší reakce, kdy odpověď v první minutě byla 1,1 mV, zatímco u tykadla A byla reakce 1,5 mV a u tykadla B 1,4 mV. Je však zajímavé pozorovat náhlou vysokou reakci ve druhé minutě a následný výrazný pokles z hodnoty 2,2 mV na hodnotu 0,55 mV. Z grafu je dále patrné, že u tohoto tykadla došlo k další výrazné skokové změně v páté minutě. Následně v 10. minutě toto tykadlo již přestalo reagovat na stimulaci. Další výchylka v měření se projevila u Tykadla A, které v sedmé minutě měření vykazovalo skokovou hodnotu 0,93 mV. Tykadlo B nejlépe vykazovalo očekávaný průběh odpovědí a jeho křivka poklesu citlivosti se blížila průměrným hodnotám.



**Obrázek 10: Velikost odpovědi tykadla na standardní stimulus aplikovaný v intervalu jedné minuty. Průměr jednotlivých tykadel je zobrazen logaritmickou přímkou. Fialová křivka zobrazuje logaritmický průměr ze tří tykadel a znázorňuje křivku citlivosti tykadla po dobu 14 minut.**

Celkově můžeme pozorovat rychlý úbytek citlivosti do čtvrté minuty a následně pozvolný pokles k nule. Dále se v grafickém znázornění prokázalo, že tvar křivky umírání tykadla je u všech tří tykadel stejný. Křivka logaritmického průměru pak nejlépe prezentuje hodnoty odpovědi tykadla po dobu 14 minut.



## Porovnání účinnosti EO

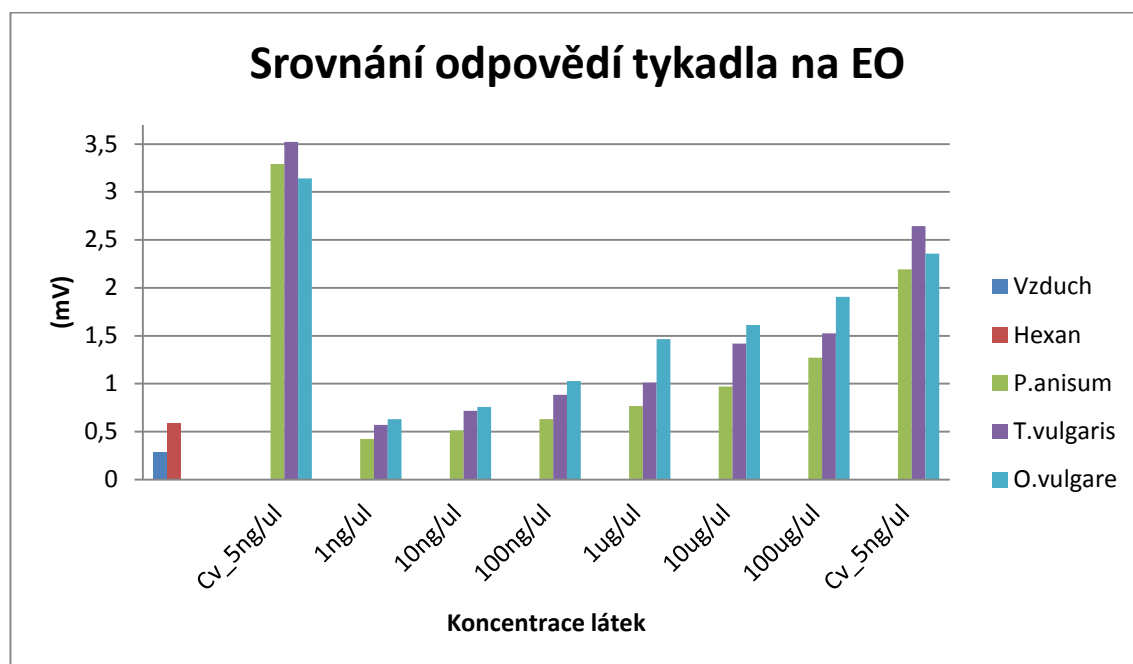
Ve druhém experimentu bylo cílem zjistit aktivitu různých koncentrací esenciálních olejů na tykadle brouka *Ips typographus*. Výsledky experimentu jsou uvedeny v tabulce I a obrázku 11.

Průměrná hodnota odpovědi na stimulaci vzduchem byla 0,29 mV. Hexan dosáhl průměrné hodnoty 0,59 mV. Z tabulky můžeme pozorovat, že antenální reakce byly závislé na typu EO a jeho koncentraci EO. Je patrné, že u koncentrace 100ng/μl se u všech EO projevila větší průměrná odpověď než na hexan (*Pimpinella anisum* 0,63 mV, *Thymus vulgaris* 0,88 mV a *Origanum vulgare* 1,02 mV). Tabulka 1 dále poukazuje na lišící se hodnoty u cis-Verbenolu, které se na začátku měření odpovědi pohybovali v rozmezí 0,003 - 0,0035 V. Naproti tomu na konci se hodnoty pohybovali v intervalu 0,002 - 0,0025 V. Tento rozdíl je způsoben dobou kdy na dané tykadlo byla aplikována koncentrace 5ng/μl. Kdy časový odstup mezi těmito impulsy cis-Verbenolu byl cca 3,5 minuty.

<i>Pimpinella anisum</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Origanum vulgare</i>	
Látka	Průměr (mV)	Látka	Průměr (mV)	Látka	Průměr (mV)
Vzduch	0,313	Vzduch	0,285	Vzduch	0,275
Hexan	0,836	Hexan	0,591	Hexan	0,592
Cv_5ng/ul	3,291	Cv_5ng/ul	3,523	Cv_5ng/ul	3,141
1ng/ul	0,422	1ng/ul	0,571	1ng/ul	0,630
10ng/ul	0,512	10ng/ul	0,717	10ng/ul	0,757
100ng/ul	0,630	100ng/ul	0,885	100ng/ul	1,026
1ug/ul	0,768	1ul/ul	1,012	1ug/ul	1,466
10ug/ul	0,971	10ug/ul	1,419	10ug/ul	1,613
100ug/ul	1,270	100ug/ul	1,525	100ug/ul	1,906
Cv_5ng/ul	2,192	Cv_5ng/ul	2,645	Cv_5ng/ul	2,356

**Tabulka 1: Hodnoty odpovědi tykadla na stimulaci uvedených látek a koncentrací. Každý test EO byl proveden na čtyřech tykadlech. Uvedené hodnoty jsou vypočítaným aritmetickým průměrem.**

Při grafickém srovnání účinnosti jednotlivých EO (obrázek 11) je jasné, že nejvyšších hodnot dosahoval *O.vulgare*. Naopak nejméně antenálně aktivní se prokázal EO *Pimpinella anisum*.

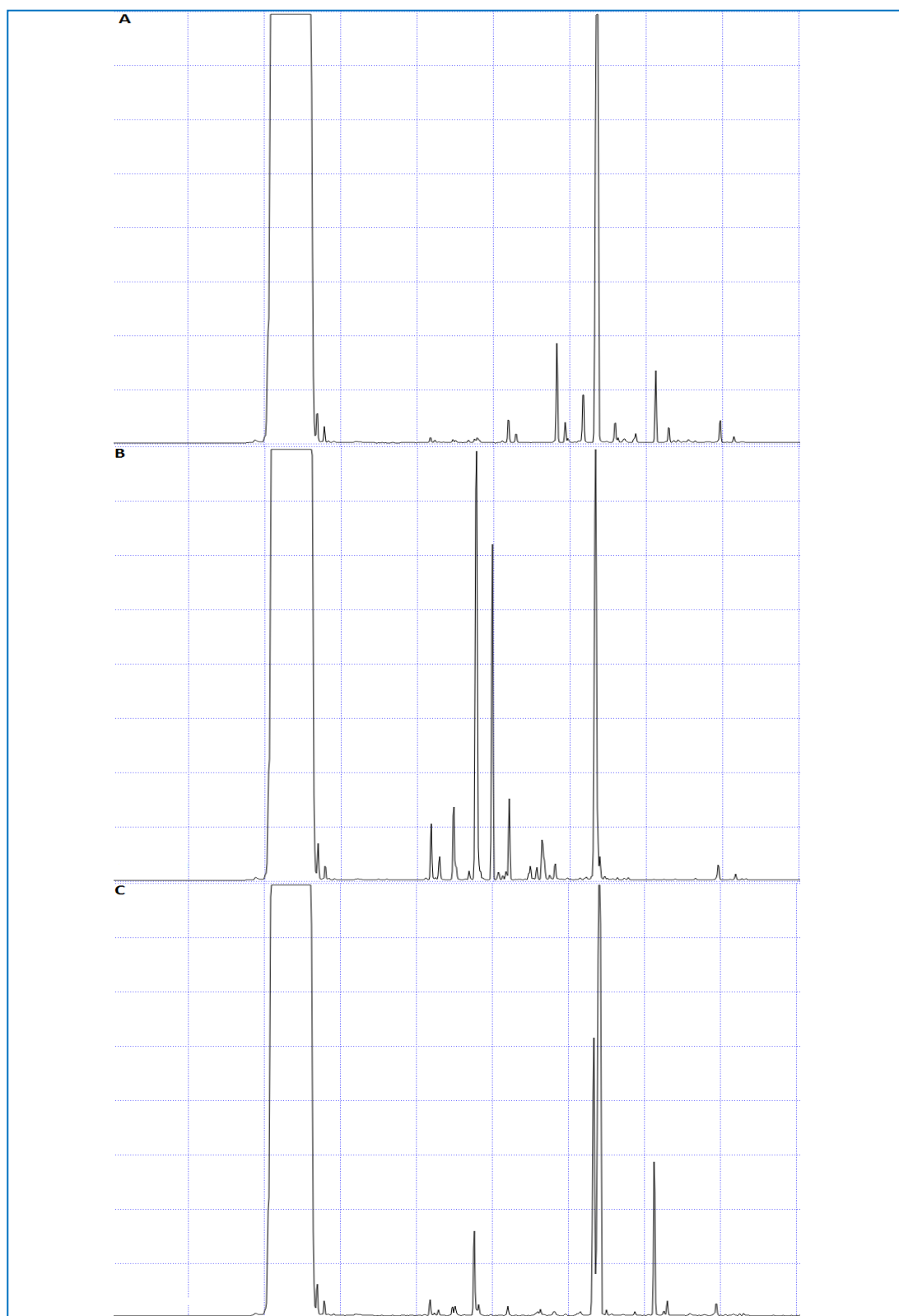


**Obrázek 11:** Graf zobrazující velikost EAG odpovědí na stimulaci vzduchem, hexanem, standardem a jednotlivými koncentracemi EO. Hodnoty představují aritmetický průměr ze 3 měření.

Do dalšího experimentu, kde byla použita plynová chromatografie s antenální detekcí (GC-EAD) byly vybrány koncentrace EO 100ng/μl a 1μg/μl.

### GC-EAD analýza

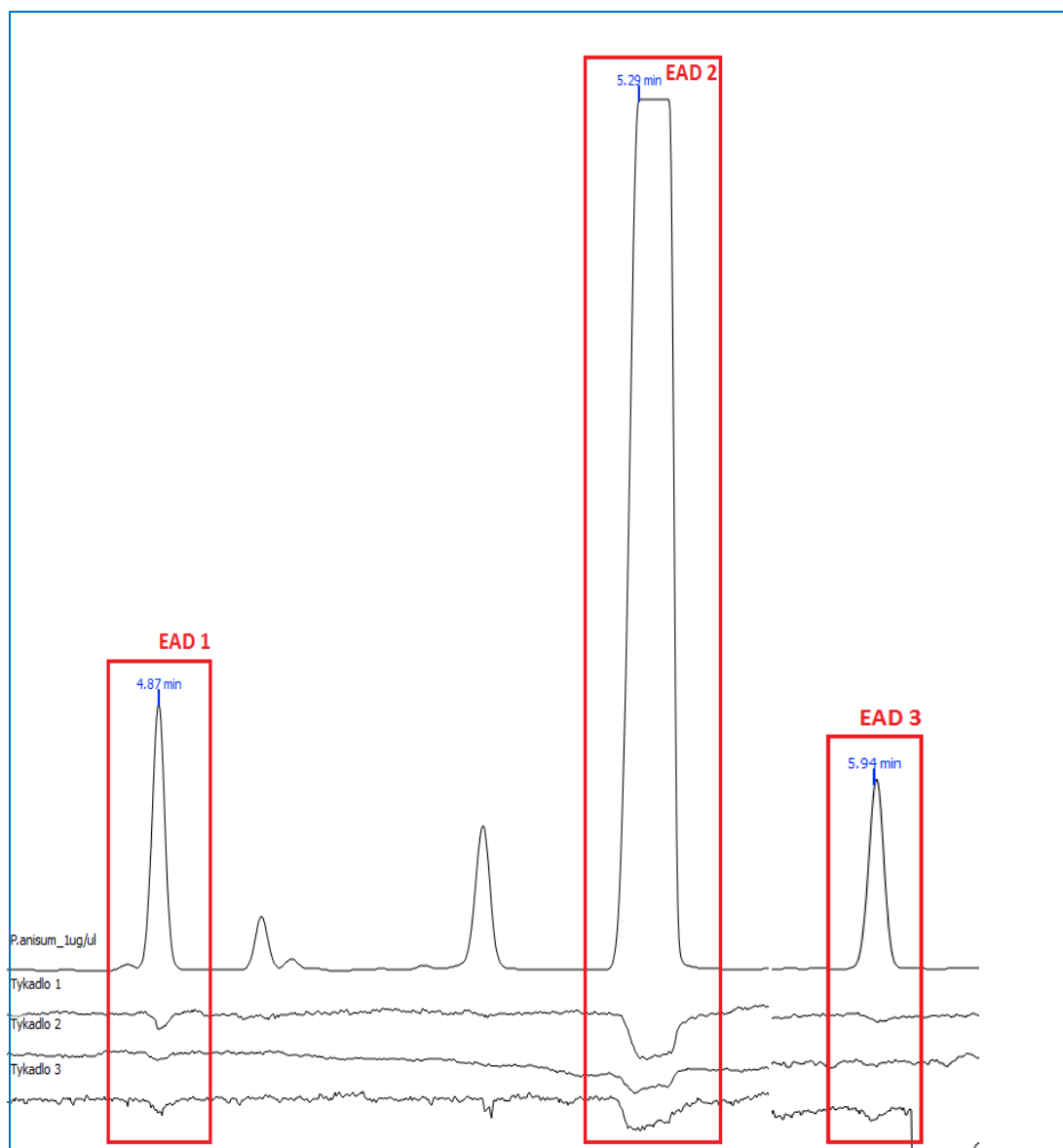
Chromatografické analýzy tří vybraných EO (koncentrace 1μ/μl) jsou zobrazeny na obrázku 12. V detailu tohoto obrázku je zcela patrné, že se esenciální oleje liší různou bohatostí a koncentrací látek. Při porovnání s obrázkem příloha 1, si můžeme povšimnout, že se chromatogram jednotlivých EO při odlišné koncentraci liší. Je patrné, že se při nižší koncentraci (100ng/μl) projevuje daleko méně látek než je tomu u koncentrace 1 μg/μl. Jako nejvíce pestrý se prokázal esenciální olej *Thymus vulgaris*. S nejmenším množstvím látek se ukázal esenciální olej *Origanum vulgare*, který byl v předcházejícím experimentu potvrzen jako nejvíce EAD aktivní.



Obrázek 12: Chromatogram jednotlivých EO při koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . A-*Pimpinella anisum*, B-*Thymus Vulgaris*, C-*Origanum vulgare*.

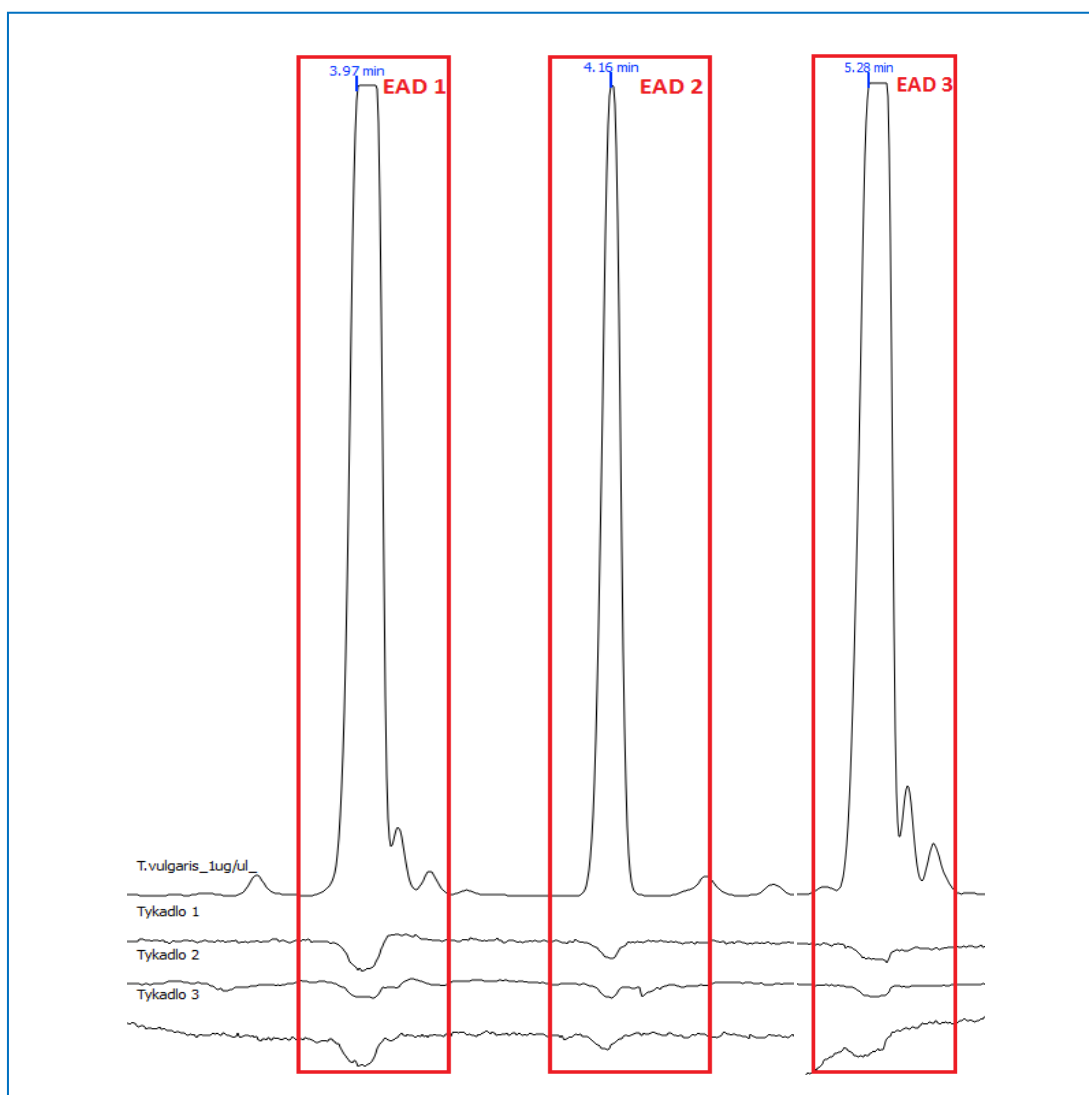
Při GC-EAD analýze nižších koncentrací se prokázala u všech EO pouze jedna aktivita. Při GC-EAD analýzách vyšších koncentrací byly pozorovány odpovědi vyšší intenzity a k hlavním aktivním látkám přibyli další. V následujících obrázcích bude proto zobrazována u všech EO pouze koncentrace 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

EO *Pimpinella anisum* při koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  vykázal tři oblasti EAD aktivity, na které tykadlo reagovalo (obrázek 13). Na tomto obrázku můžeme vidět EAD aktivitu při RT 4,87min., 5,29 min. a 5,95 min.) Průměrná hodnoty u EAD 1,2,3 byly: EAD1 - 0,1 mV, EAD2 - 0,25 mV a EAD 3 - 0,05 mV).



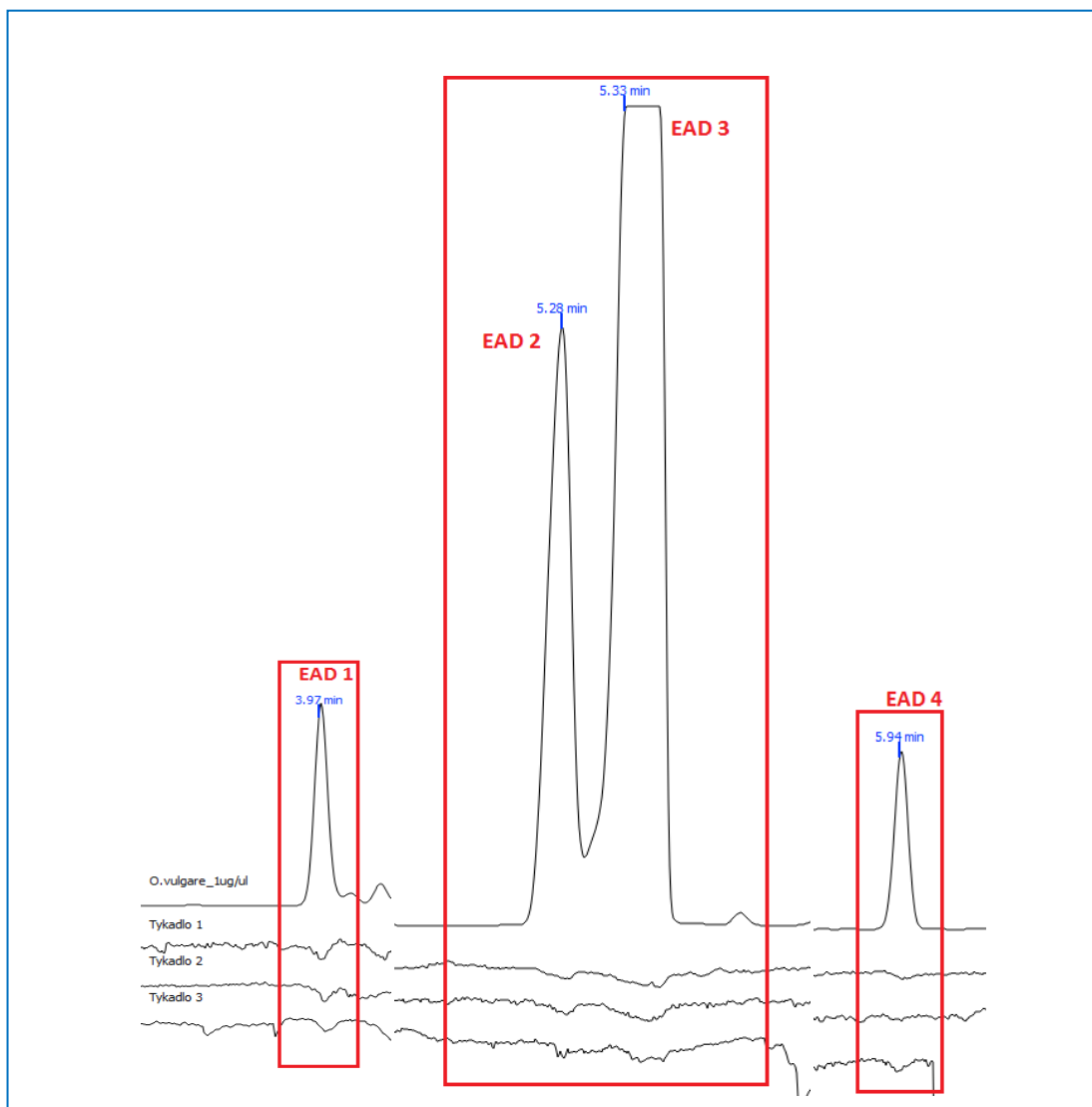
**Obrázek 13: Oblasti antenálně aktivních látek přítomných v GC-EAD analýze EO *Pimpinella anisum* (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Horní linie - FID záznam, dolní 3 linie - EAD záznamy 3 různých tykadel.**

Oblasti antenální aktivity při GC-EAD analýze EO *Thymus vulgaris* jsou zobrazeny na obrázku 14. Tento olej obsahoval tři látky, které opakovaně vyvolávaly odpověď tykadel: Pík EAD 1 - v retenčním čase 3,97 min vyvolal odpověď, která byla v průměru 0,29 mV. EAD 2 - v čase 4,26 min a průměrná odpověď tykadla byla 0,16 mV a u EAD 3 v čase 5,28 min s průměrnou hodnotou 0,1 mV.



**Obrázek 14: Oblasti antenálně aktivních látek přítomných v GC-EAD analýze EO *Thymus vulgaris* (1 $\mu$ / $\mu$ l). Horní linie - FID záznam, dolní 3 linie - EAD záznamy 3 různých tykadel.**

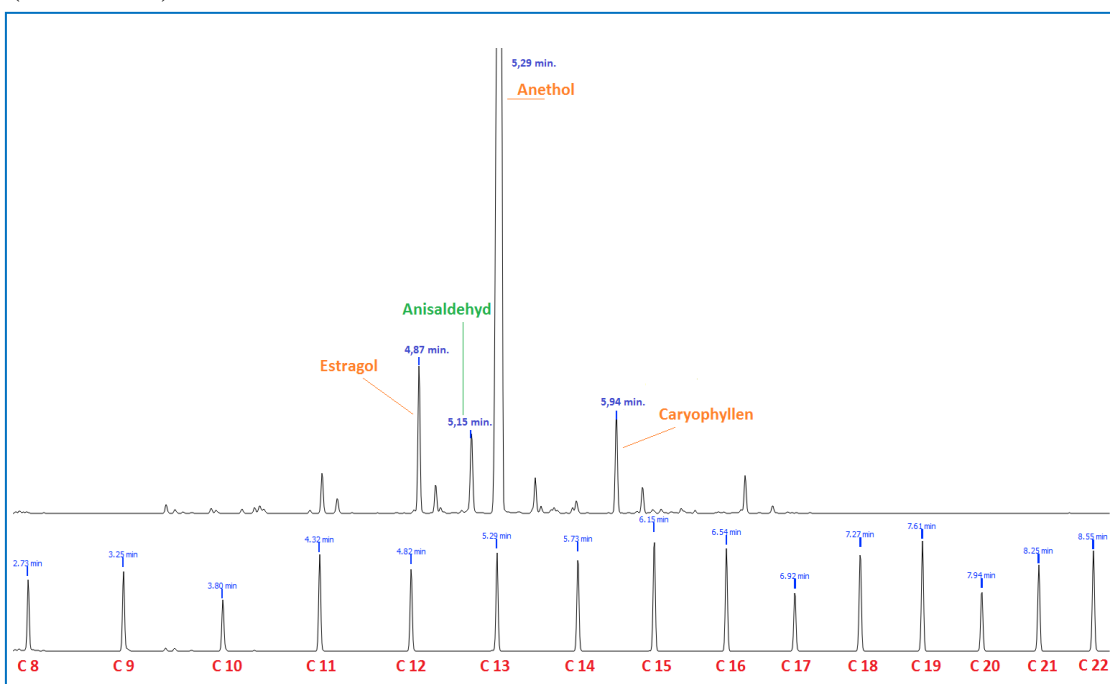
Obrázek 15 zobrazuje čtyři oblasti EAD odpovědi na látky obsažené v EO *Origanum vulgare*. Jejich průměrná hodnota (mV) a retenční čas (min) byl: EAD1 - 0,3 mV, 3,97 min., EAD2 - 0,1 mV, 5,28 min, EAD 3 - 0,2 mV, 5,28 min. a EAD 4 - 0,05 mV, 5,94 min.



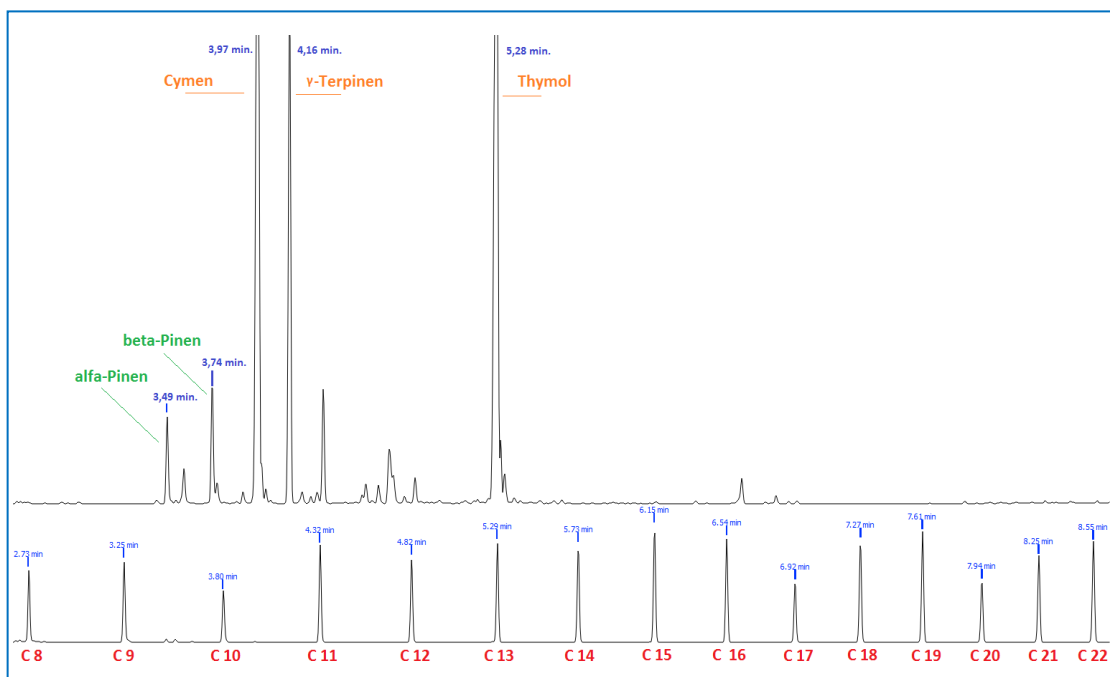
Obrázek 15: Oblasti antenálně aktivních látek přítomných v GC-EAD analýze EO *Origanum vulgare* (1 $\mu$ / $\mu$ l). Horní linie - FID záznam, dolní 3 linie - EAD záznamy 3 různých tykadel.

## Identifikace EAD aktivních látek

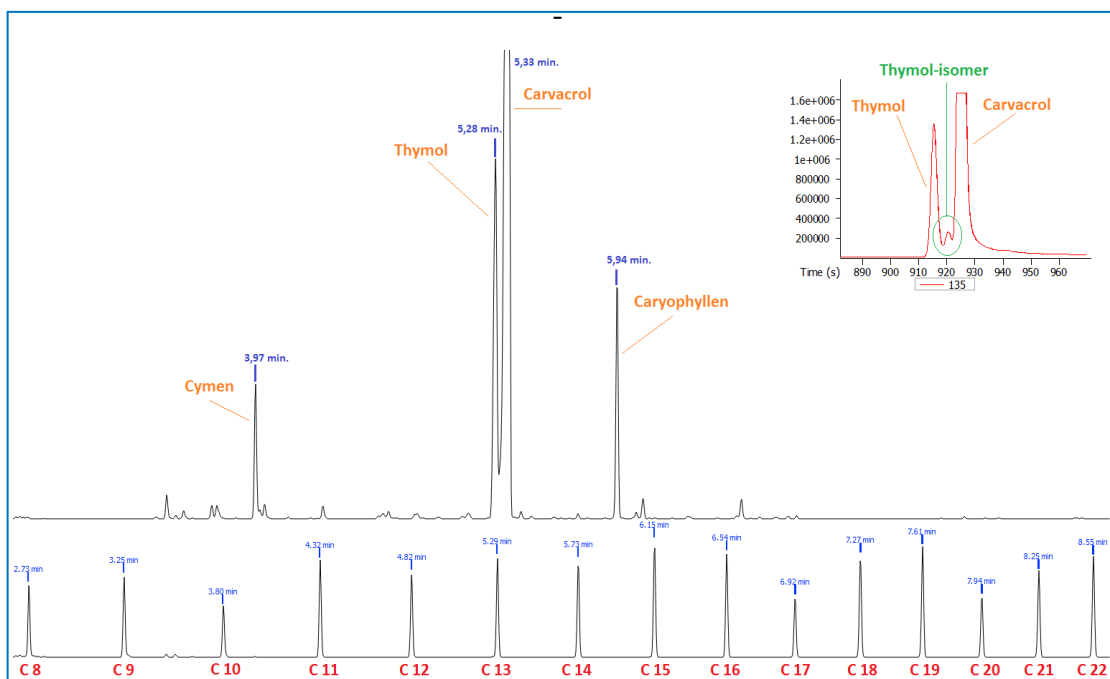
Obrázky 16, 17 a 18 znázorňují analýzu identifikovaných látek obsažených v EO pomocí MS a porovnání s chromatogramem uhlovodíků C8-C22. U *Pimpinella anisum* (obrázek 16) byly identifikovány čtyři látky Estragol, Anisaldehyd, Anethol a Caryophyllen. Na obrázku 17 je možno vidět analýzu *Thymus vulgaris*, látky které byly objeveny jsou alfa-Pinen, beta-Pinen,  $\gamma$ - Terpinen a Thymol, u *Origanum vulgare* jsou to Cymen, Thymol, Carvacrol a Caryophyllene (obrázek 18).



**Obrázek 16:** Porovnání chromatogramu EO *Pimpinella anisum* (1 $\mu$ l) a série uhlovodíků C8-C22. Látky identifikované pomocí MS jsou zobrazeny zeleně, látky, které byly antenálně aktivní jsou zvýrazněny oranžově.



Obrázek 17: Porovnání chromatogramu EO *Thymus vulgaris* (1 μ/μl) a série uhlovodíků C8-C22. Látky identifikované pomocí MS jsou zobrazeny zeleně, EAD aktivní látky oranžově.



Obrázek 18: Porovnání chromatogramu EO *Origanum vulgare* (1 μ/μl) a série uhlovodíků C8-C22. Látky identifikované pomocí MS jsou zobrazeny zeleně. EAD aktivní látky jsou označeny oranžově. V pravém horním rohu je možno vidět detail identifikace hlavního píku.



## Antenálně aktivní látky

V tabulce 2 jsou znázorněny látky, které vyvolaly antenální reakci. V EO *Pimpinella anisum* a *Thymus vulgaris* se vyskytovaly tři aktivní látky. V EO *Origanum vulgare* se projevíly 4 látky. Látky Cymen, Thymol a Caryophyllen se vyskytovaly ve dvou EO.

Největší antenální reakci v EO *Pimpinella anisum* vyvolal Estragol, u kterého byl poměr ploch FID-EAD 0,04 a průměrná reakce byla 0,1 mV. Nejvíce aktivní látka u *Thymus vulgaris* byl Cymen s průměrnou hodnotou 0,29 mV a poměrem FID-EAD 0,032. Tato látka měla největší průměrnou hodnotu i u EO *Origanum vulgare* 0,3 mV s poměrem FID-EAD 0,13.

Za nejvíce antenálně aktivní látku, vzhledem k poměru ploch FID-EAD, která byla nalezena je Cymen. Látka, která měla druhou nejlepší reakci je Estragol. Anethol byl v porovnání aktivních látek na třetím místě.

Látka	RT (min.)	KI	Poměr ploch píků FID-EAD	EO
Estragol	4,87	1211	0,040	<i>Pimpinella anisum</i>
Anethol	5,29	1300	0,031	<i>Pimpinella anisum</i>
Caryophyllen	5,94	1450	0,028	<i>Pimpinella anisum</i>
Cymen	3,97	1034	0,032	<i>Thymus vulgaris</i>
$\gamma$ -Terpinen	4,16	1070	0,017	<i>Thymus vulgaris</i>
Thymol	5,28	1297	0,011	<i>Thymus vulgaris</i>
Cymen	3,97	1034	0,130	<i>Origanum vulgare</i>
Thymol	5,28	1297	0,017	<i>Origanum vulgare</i>
Carvacrol	5,33	1309	0,025	<i>Origanum vulgare</i>
Caryophyllen	5,94	1450	0,012	<i>Origanum Vulgare</i>

Tabulka 2: Antenálně aktivní látky obsažené v EO, jejich retenční časy a Kovatsovy indexy a relativní aktivity.

## 8. Diskuze

Testované esenciální oleje, byly vybrány na základě dat publikovaných v práci Mudročenkové a kol. (2018), která zkoumala toxicitu a repelenci EO čeledí Lamiaceae (*Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Hyssopus officinalis* a *Mentha piperita*) a Apiaceae (*Pimpinella anisum* a *Foeniculum vulgare*) pro kůrovce IT. Práce prokázala rozdílnou míru repelence u jednotlivých EO. Obecně byla repelence závislá na typu EO, aplikované dávce a na době, která od aplikace uběhla. EO *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare* a *Thymus vulgaris* byly více repelentní než *Foeniculum vulgare*, *Hyssopus officinalis* a *Mentha piperita*. Při nízkých dávkách nebyl mezi EO *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare* a *Thymus vulgaris* pozorován signifikantní rozdíl v repelenci. Při vyšších dávkách EO *Pimpinella anisum* a *Thymus vulgaris* vykazovaly signifikantně vyšší repelentní účinek než *Origanum vulgare*.

### Stanovení citlivosti tykadel k EO

V experimentech, kde byly porovnávány účinnosti tří nejvíce repelentních EO *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare* a *Thymus vulgaris* na tykadla kůrovců, bylo zjištěno, že *Origanum vulgare* je z těchto tří EO nejvíce antenálně aktivní. Nejméně aktivní byl *Pimpinella anisum*. Pořadí účinnosti bylo shodné u všech testovaných koncentrací. Naše výsledky potvrzují studii Mudročenkové a kol. (2018).

### GC-EAD analýza EO a identifikované látky

V GC-EAD experimentech bylo zjištěno, že izolované tykadlo brouka *I. typographus* je schopno detekovat čichově aktivní látky maximálně po dobu 14 minut. Během této doby konstantně snižuje svojí citlivost. Na základě těchto výsledků byly upraveny parametry GC-EAD analýzy tak, aby bylo možno identifikovat jednotlivé látky obsažené v EO během tohoto časového úseku.

GC-EAD analýzy prokázaly, že počet detekovaných antenálně aktivních látek v daném EO roste s koncentrací analyzovaného EO. V EO *Pimpinella anisum* byly identifikovány při koncentraci 1 µg/µl tři aktivní látky: estragol, anetol

a caryophyllen. Při koncentraci 100ng/μl byl EAD aktivní pouze anetol, ostatní komponenty byly pod detekčním limitem EAD detektoru. *Thymus vulgaris* obsahoval aktivní látky cymen, γ-Terpinen a thymol. Thymol vyvolával EAD aktivitu i v koncentraci 100ng/ μl. Nejvíce antenálně aktivních látek obsahoval EO *Origanum vulgare*. V nižší koncentraci byl EAD aktivní pouze cymen, který vyvolal ve vyšší koncentraci nejsilnější reakci. Další identifikované látky byly thymol, carvacrol a caryophyllen. Celkově byly tedy identifikovány ve zkoumaných EO tyto látky: anetol, caryophyllen, carvacrol, cymen, estragol, thymol a γ-Terpinen (tabulka struktur příloha 3).

Všechny tyto identifikované látky jsou v nějaké podobě součástí vůní ovlivňujících chování různých druhů hmyzu (slouží jako semiochemikálie – tj. komunikační látky, předávající určitou informaci). Například, naše nejvíce antenálně aktivní látka cymen, působí jako alomon u několika druhů tesaříkovití (*Cerambycidae*). Anetol vnímají někteří mandelinkovití (*Chrysomelidae*) jako kairomon. Thymol je u ploštic (*Heteroptera*) vnímán jako feromon (The Pherobase © 2018). Také čichová aktivita některých látek identifikovaných v EO byla u kůrovců *I. typographus* dříve studována. Jde například o látky estragol, cymen a γ-Terpinen, pro něž existují na tykadlech citlivé specifické čichové smyslové neurony (OSN) (Andersson 2012, Schiebe a kol. 2019). Mezi látky, které jsou z tohoto hlediska nové a v předchozích výzkumech čichových schopností *I. typographus* nebyly testovány, jsou anetol, thymol, caryophyllen a carvacrol. Anetol má molekulární strukturu podobnou již studovanému estragolu a mohl by být vnímán estragolovým čichovým smyslovým neuronem. Nově identifikované látky budou muset být dále zkoumány na úrovni jednotlivých čichových senzil i behaviorálně s cílem zjistit, zda jsou vnímány specializovanými čichovými smyslovými neurony nebo stimulují neurony se širší specificitou a jaké behaviorální reakce zprostředkují.

Čichový systém IT je v poslední době hodně studován především proto, že se jedná o ekonomicky významného škůdce. Na základě dostupných fyziologických a behaviorálních dat je známo, že kůrovec během své orientace v prostředí vnímá jak atraktivní, tak i repelentní stimuly. Mezi atraktivní stimuly patří složky agregačního feromonu, hostitelské kairomony a vůně symbiotických hub. Mezi repelentní stimuly patří vůně nehostitelských rostlin, některé složky

indukované obrany hostitele, některé vůně kůrovci plně kolonizovaných stromů. Na tykadle bylo pomocí analýzy transkriptomu tykadla identifikováno 73 typů čichových receptorů (Andersson a kol. 2015, Andersson a kol. 2020). Jenom u malé části z nich jsou identifikovány molekuly, které je aktivují.

### **Fyziologické mechanismy, které mohou být za repelenci EO zodpovědné**

Přirozeně vyskytující se vůně jsou velmi složité směsi, které mohou obsahovat jak atraktivní látky, které vyvolávají pohyb směrem ke zdroji, tak i látky repelentní, které naopak tomuto pohybu ke zdroji brání (Verschut a kol. 2019). Porozumění fyziologickým mechanismům, jak vzájemné interaktivní účinky atraktivních a repelentních látek ovlivňují chování hmyzu je proto zcela klíčové nejen z hlediska základního výzkumu ale i při případném využívání různých látek k ovlivňování a chování škodlivých druhů hmyzu.

Čich hmyzu je tvořen velice jemně vyladěným periferním sensorickým systémem pro detekci hostitelských vůní (tykadlo s čichovými smyslovými neurony, OSN umístěných v čichových senzilách) a centrálním čichovými centry v mozku, které zpracovávají a vyhodnocují přijaté signály z periferie a formují behaviorální odpovědi. Čichové smyslové neurony na tykadlech, jsou velmi variabilní ve svých reakcích na různé vůně. Některé typy reagují vysoce selektivně pouze s jedním typem molekul (specialisté), jiné jsou schopny reagovat na více látek (generalisté).

Na úrovni vysoce specializovaných ORN (specialisté) existují 2 základní mechanismy, jak mohou látky působit repelentně: 1) buď aktivují ORN, které jsou předurčeny k detekci repelentů (například látky CO<sub>2</sub>, geosmin a některé organické kyseliny jsou selektivními repelenty pro rod *Drosophila*) (Semmelhack, Wang 2009), nebo 2) inhibují nebo modifikují ORN, které detekují atraktivní látky.

Na úrovni generalistů je situace poněkud složitější. Generalisté jsou čichové neurony, které reagují na více látek a jedna látka je často vnímána více neurony. Informace o přítomnosti určité vůně je do mozku předávána prostřednictvím většího počtu smyslových neuronů (populační kódování). Klíčové pro rozpoznání určité specifické vůně je synchronní stimulace určitého specifického setu smyslových neuronů. V tomto případě vjem může být změněn koncentrací. Některé vůně, které se v malých koncentracích jeví jako látky atraktivní, mohou vyvolat při vyšší

koncentraci averzivní chování. Jedno z možných vysvětlení tohoto jevu je, že vysoké koncentrace aktivují typy ORN, které nízké koncentrace neaktivují (Semmelhack, Wang 2009, Verschut a kol. 2019).

Bruce (2015) uvádí, že při vnímání a rozpoznávání vůní má kromě molekulární struktury vůně velký význam jejich kombinace a zároveň i časový rozměr (to zda jednotlivé vůně stimulují tykadlo současně nebo ne). Webster a kol. (2010) ve svých pokusech při studiu hostitelské vůně fazolí pro mšice (*Aphis fabae*) pozoroval, že vůně fazolí byla v olfaktometru atraktivní, pokud byly mšice vystaveny kompletní vůni. V případě, že byly jednotlivé složky hostitelské vůně testovány jednotlivě, byly repelentní. Tento pokus dokazuje, že atraktivita a repelence nezávisí pouze na molekulární struktuře vůně a čase, kdy jednotlivé látky stimulují čichové receptory na tykadle, ale také na kontextu, ve kterém jsou jednotlivé látky vnímány. Kromě kombinací látek a jejich společné přítomnosti v čase mohou být důležité také vzájemné poměry látek ve směsi. Cha a kol. (2011), zjistili, že zdvojnásobení koncentrace kterékoli ze složek syntetické hostitelské těkavé směsi vinné révy při zachování konstantní koncentrace ostatních sloučenin významně snížila přitažlivost vůně pro samičky motýla (*Paralobesia viteana*).

Některé látky, které byly identifikovány v repelentních EO, jsou pro IT známé, ale nejsou známy jejich behaviorální aktivity. Není známo, zda jsou mezi nimi specializované inhibitory či látky, které spíše modifikují čichový vjem. K plnému pochopení je třeba rozklíčovat samotný systém vzájemného ovlivňování jednotlivých látek a vůní. Ačkoliv tedy máme relativně hodně informací o čichovém systému IT, je vysvětlení repelence EO obtížné, protože vliv jednotlivých látek na chování IT není znám.

## 7. Závěr

V této bakalářské práci byly shromážděné výsledky experimentů, které se zabývaly testováním účinnosti směsí tří esenciálních olejů *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare* na tykadlech kůrovců *I. typographus*. Cílem bylo nalezení a identifikace antenálně aktivních látek. Tyto experimenty byly provedeny v laboratořích lesnické fakulty v zázemí České zemědělské univerzity v Praze. S pomocí záznamu elektrické aktivity tykadel zapojených mezi 2 elektrody (EAG) bylo zjištěno, že izolované tykadlo, je schopno odpovídat na čichové podněty maximálně 14 minut. Po tuto dobu je možné využít izolované tykadlo jako biologický detektor pro detekci čichově aktivních látek v EO. V EAG experimentech bylo dále prokázáno, že nejsilnější čichové odpovědi vyvolával EO *O. vulgare* a následně pak *T. vulgaris* a *P. anisum*. V GC-EAD a GC-MS experimentech bylo dále ve zkoumaných EO identifikováno celkem sedm antenálně aktivních látek: Anethol, Caryophyllen, Carvacrol, Cymen, Estragol, Thymol a  $\gamma$ -Terpinen.

Tato bakalářská práce tak splnila stanovené cíle práce. Některé identifikované látky již byly dříve studovány a známe jejich specifické ORN. Látky thymol, caryophyllen a carvacrol jsou nově objevené a budou předmětem dalšího studia. Na tykadlech *I. typographus* doposud studované nebyly.

## 8. Seznam použité literatury

- 1) ANDERSSON M. N., LARSSON M. C., SHLYTER F., 2009: Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single - cell responses to ecologically relevant odors. *Journal of Insect Physiology* 55 (6): 556-567.
- 2) ANDERSSON M. N., 2011: *Olfaction in the Spruce Bark Beetle, Ips typographus - Receptor, Neuron and Habitat*. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.
- 3) ANDERSSON M. N., 2012: Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche: A Journal of Entomology* 2012: 14.
- 4) ANDERSSON M. N., LÖFSTEDT CH., NEWCOMB R. D., 2015: Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. *Frontiers in Ecology and Evolution* 3: 53.
- 5) ANDERSSON M. N., YURAVAJ J. K., ROBERTS R. E., SONNTAG Y., HOU X., GROSSE-WILDE E., MACHARA A., HANSSON B. S., JOHANSON Z., LÖFSTEDT CG., 2020: Putative ligand binding sites of two functionally characterized bark beetle odorant receptors.
- 6) BIRGERSSON G., SCHLYTER F., LÖFQVIST J.; BERGSTRÖM G., 1984: Quantitative variation of pheromone in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology* 10: 1029-1055.
- 7) BLOMQUIST G., FIGUEROA-TORAN R., AW M., SONG M., GORZALSKI A., ABBOTT N., CHANG E., TITTIGER C., 2010: Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 699-712.
- 8) BRUCE T. J. A., 2015: Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. *Journal of Experimental Botany* 66 (2): 455-465.
- 9) BULÁNKOVÁ L., 2005: *Léčivé rostliny na naší zahradě*. Grada, Praha. Česká zahrada.

- 10) BYERS J., Chemical Ecology of Bark Beetles in a Complex Olfactory Landscape. In LIEUTIER F., DAY K., BATTISTI A., GRÉGOIRE J., EVANS H., 2004: *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 11) GEORGE D. R., FINN R. D., GRAHAM K. M., SPARAGANO O. A. E., 2014: Present and future potential of plant - derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites & Vectors* 7: 28.
- 12) GRIES G., 2009: Zur Frage der Dispersion des Buchdruckers (*Ips typographus* L.). *Journal of Applied Entomology* 99 (1-5): 12-20.
- 13) HANUŠ R., ŠOBOTNÍK J., 2005: Význam feromonů v životě včel. *Včelařství* 55: 233-235.
- 14) CHA D. H., LINN Jr CH. E., TEAL P. E. A., ZHANG A., ROELOFS W. L., LOEB G. M., 2011: Eavesdropping on Plant Volatiles by a Specialist Moth. *PLoS ONE* 6 (2): 1-8.
- 15) CHAPMAN N. F., 1998: *The Insects. Structure and Function*. 4. vyd., Cambridge University Press, Cambridge.
- 16) JAKUŠ R., HOLUŠA J., BLAŽENEC M., 2015: *Principy ochrany dospělých smrkových porostů před podkorním hmyzem*. 1. vyd., Carter Reproplus, Praha.
- 17) JÁNSKÝ L., NOVOTNÝ I., 1981: *Fyziologie živočichů a člověka*. 1. vyd. Avicenum, Praha.
- 18) KALINOVÁ B., BŘÍZKOVÁ R., KNÍŽEK M., TURČÁNI M., HOSKOVEC M., 2014: Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions* 8: 305-316.
- 19) KARLSON P., BUTENANDT A., 1959: Pheromones (Ectohormones) in Insects. *Annual Review of Entomology* 4: 39-58.
- 20) KINDLMANN P., MATĚJKA K., DOLEŽAL P., 2012: *Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody*. 1. vyd., Karolinum, Praha.



- 21) KLUTSCH J. G., NEGRÓN J. F., COSTELLO S. L., RHOADES C. R., WEST D. R., POPP J., CAISSIE R., 2009: Stand characteristics and downed woody debris accumulations associated with a mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae* Hopkins) outbreak in Colorado. *Forest Ecology management* 258: 641-649.
- 22) KOCOURKOVÁ B., PLUHÁČKOVÁ H., HABÁN M., 2015: *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny a základy fytoterapie*. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
- 23) KŘÍSTEK J., URBAN J., 2013: *Lesnická entomologie*. 2. vyd. upravené., Academia, Praha.
- 24) LÖBL I., SMETANA A., 2011: *Catalogue of Palaearctic Coleoptera*. vol. 7., Apollo Books, Denmark.
- 25) MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ, ©2019: *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2018* (online) [cit. 2019.02.05], dostupné z <<https://www.uhul.cz/>>.
- 26) MINOR A. V., KAISLING K. E., 2003: Cell responses to single pheromone molecules may reflect the activation kinetics of olfactory receptor molecules. *Journal of Comparative Physiology* 189 (3): 221-30.
- 27) MUDROČENKOVÁ S., FERENČÍK J., GRUĽOVÁ D., BARTA M., 2018: Insecticidal and repellent effects of plant essential oils against *Ips typographus*. *Journal of Pest Science* 92: 595-608.
- 28) MYLES T., 2002: Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology* 40: 243-255.
- 29) MYRICK A. J., BAKER T. C., 2011: Chopper - stabilized gas chromatographyelectroantennography: Part I. Background, signal processing and example. *Biosensors and Bioelectronics* 31: 197-204.
- 30) NATION J. L., 2002: *Insect Physiology and Biochemistry*. 2. ed., CRC, Boca Raton.

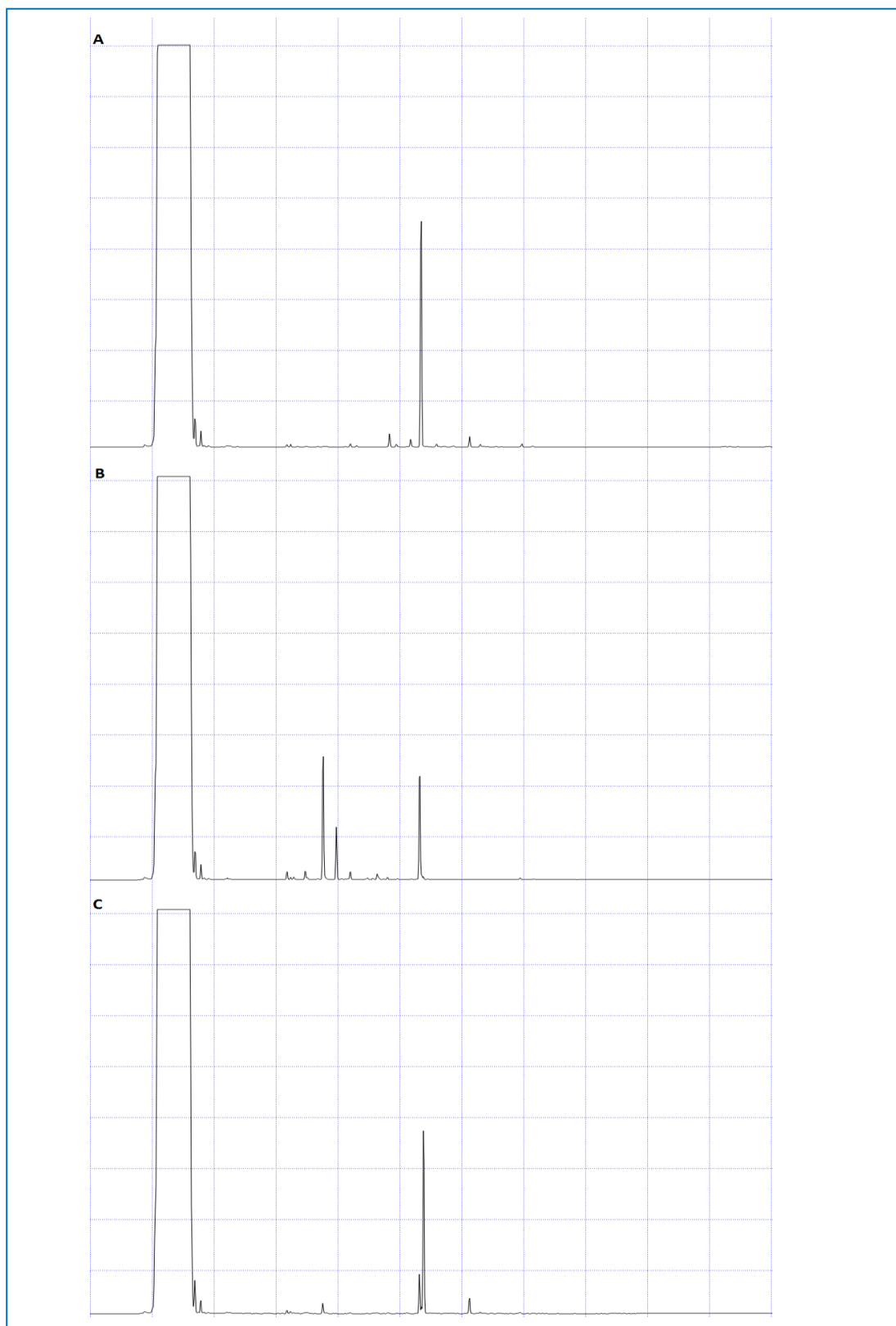
- 31) OLSSON S. B., HANSSON B., 2013: Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. *Methods in molecular biology* ( Clifton N. J.,) 1068: 157-77.
- 32) PAVELA R., 2006: *Rostlinné insekticidy: hibíme hmyz bez chemie*. 1. vyd., Grada, Praha.
- 33) PAVELA R., 2011: *Botanické pesticidy*. Kurent, České budějovice.
- 34) PFFEFER A., 1989: Kůrovcovití *Scolytidae* a jádrohlo dovití *Platypodidae*. 1. vyd., Academia, Praha.
- 35) RUDINSKÝ J. A., 1962: Ecology of Scolitydae. *Annual Review Entomology* 7: 327-348.
- 36) SEMMELHACK J. L., WANG J. W., 2009: Select *Drosophila glomeruli* mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature* 459: 218-223.
- 37) SEYBOLD S., BOHLMANN J., RAFFA K., 2000: Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis. *The Canadian Entomologist* 132: 697-753.
- 38) SCHIEBE CH., BLAŽENEC M., JAKUŠ R., UNELIUS C. R., SCHLYTER F., 2011: Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges. *Journal of Applied Entomology* 135: 726-737.
- 39) SCHIEBE C., HAMMERBACHER A., BIRGERSSON G., WITZELL J., BRODELIUS P. E., HANSSON B. S., KROKENE P., SCHLYTER F., 2012: Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce barkbeetle. *Oecologia* 170: 183–198.
- 40) SCHIEBE CH., ZHAO T., GANJI S., BOHMAN B., WEINSTEIN P., KROKENE P., BORG-KARLSON A. K., UNELIUS C. R., 2019: Cinvergent evolution of semiochemicals across Kingdoms: bark beetles and their fungal symbionts. *The ISME Journal* 13: 1535-1545.
- 41) SCHLYTER F., BYERS J., LÖFQVIST J., 1987: Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: Density-Regulation Mechanisms in Bark Beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* 13: 1503-1523.
- 42) SKUHRAVÝ V., 2002: *Lýkožrout smrkový a jeho kalamity*. Agrospoj, Praha.

- 43) SOUČEK J., TESAŘ V., 2008: *Metodika přestavby smrkových monokultur na stanovištích přirozených smíšených porostů: recenzovaná metodika*. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Strnady.
- 44) SPARKMAN O., PENTON Z. E., KITSON F. G., 2011: *Gas - chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. 2. ed., Elsevier, Oxford.
- 45) THE PHEROBASE © 2019: *Extensive Database of Pheromones and Semiochemicals* (online) [cit. 2019.02.05], dostupné z<<https://www.pherobase.com/>>.
- 46) VANDER MEER R. K., BREED M. D., ESPELIE K. E., WINSTON M. L., 2019: *Pheromone Communication in Social Insects: Ants, Wasps, Bees and Termites*. Routledge, New York.
- 47) VERSCHUT T. A., CARLSSON M. A., HAMBÄCK P. A., 2019: Scaling the interactive effects of attractive and repellent odours for insect search behaviour. *Scientific Reports* 9, 15309.
- 48) VESELÝ L., 1985: *Včelařství*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- 49) WEATHERSTON I., MINKS A. K., 1995: Regulation of semiochemicals - global aspects. *Intergrated Pest Management Reviews* 1: 1-13.
- 50) WEBSTER J., KEGLEY S., GIBSON K., GILLETTE N., PEDERSON L., MORI S., 2010: Individual-tree tests of verbenone flakes, verbenone puches, and green-leaf volatiles to procect lodgepole pines from mountain pine beetle attack. Numbered Report 10-02. Coeur d'Alene, ID: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Region, Forest health Protection: 12 pp.
- 51) WERMELINGER B., 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - A review of recent research. *Forest Ecology and Management* 202 (1-3): 67-82.
- 52) ZAHRADNÍK P., ŽDÁREK J., LIŠKA J., 1993: *Feromony hmyzu v ochraně lesa*. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha.
- 53) ZAHRADNÍK P., 2004: *Ochrana smrčín proti kůrovcům*. 1. vyd., Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.

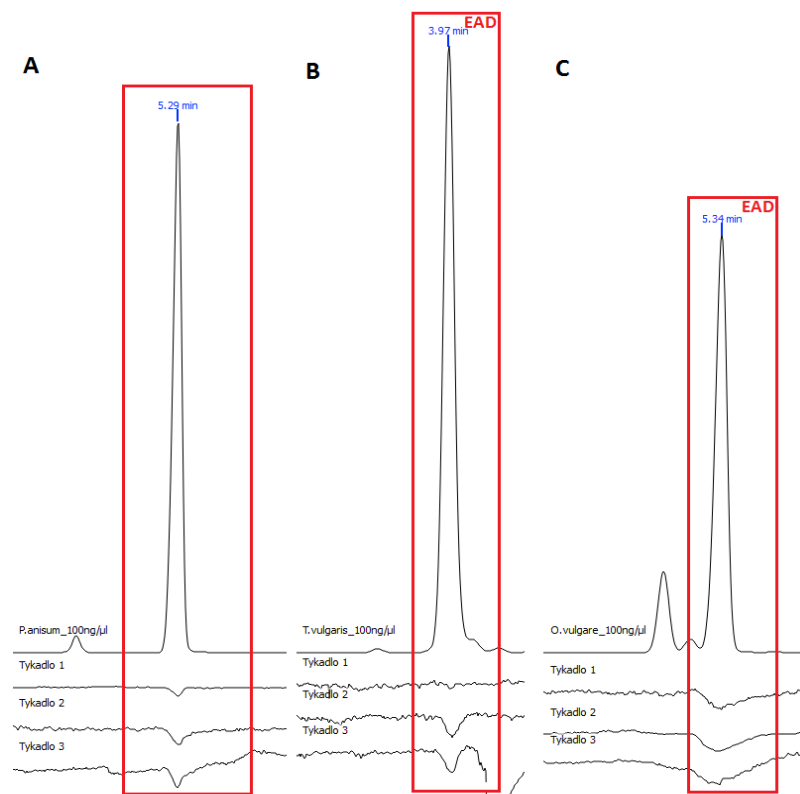
54) ZUMR V., 1995: *Lýkožrout smrkový-biologie, prevence a metody boje*. 1. vyd.,  
Matice Lesnická, Písek.

## 9. Přílohy

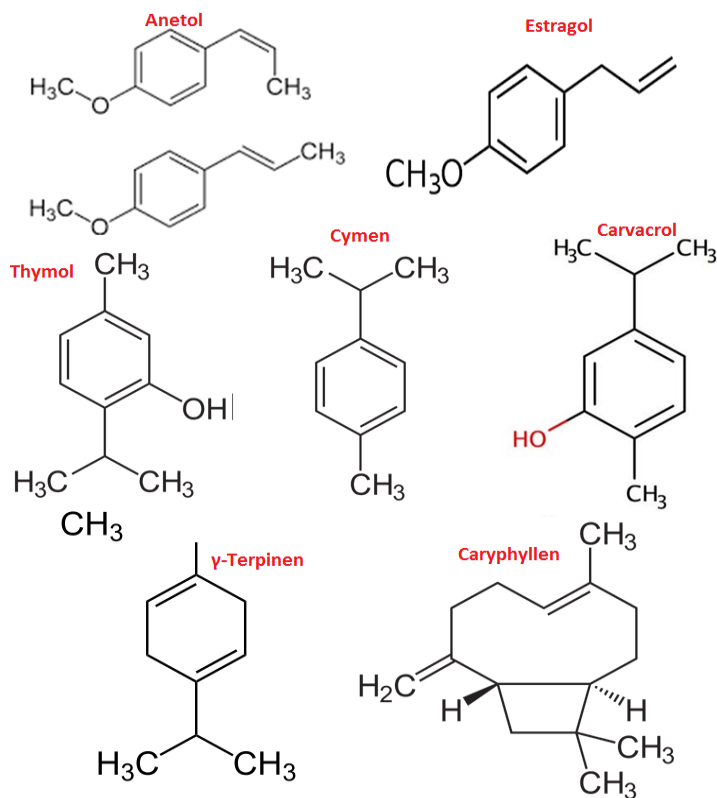
Příloha 1: Chromatogram jednotlivých EO při koncentraci 1µg/µl. A- <i>Pimpinella anisum</i> , B- <i>Thymus Vulgaris</i> , C- <i>Origanum vulgare</i> .....	53
Příloha 2: Oblasti antenálně aktivních látek přítomných v GC-EAD analýze. Horní linie - FID záznam, dolní 3 linie - EAD záznamy 3 různých tykadel. A - <i>Pimpinella anisum</i> , B - <i>Thymus vulgaris</i> , C - <i>Origanum vulgare</i> . .....	54
Příloha 3: Struktury antenálně aktivních látek, které byly prokázány v GC-EAD analýze. ..	54
Příloha 4: Vertikální tahač elektrod PC-100 (NARISHIGE).....	55
Příloha 5: Skleněné elektrody, sloužící k zapojení tykadla, vyrobené pomocí vertikálního tahače PC-100. ....	55
Příloha 6: Laboratorní chov IT v plastových boxech se smrkovými poleny s řízeným teplotním a světelným režimem (25 °C teplota, vlhkost 66 %). ....	56



**Příloha 1: Chromatogram jednotlivých EO při koncentraci 1 µg/µl. A-*Pimpinella anisum*, B-*Thymus Vulgaris*, C-*Origanum vulgare*.**



**Příloha 2: Oblasti antenálně aktivních látek přítomných v GC-EAD analýze. Horní linie - FID záznam, dolní 3 linie - EAD záznamy 3 různých tykadel. A - *Pimpinella anisum*, B - *Thymus vulgaris*, C - *Origanum vulgare*.**



**Příloha 3: Struktury antenálně aktivních látek, které byly prokázány v GC-EAD analýze.**



**Příloha 4: Vertikální tahač elektrod PC-100 (NARISHIGE).**



**Příloha 5: Skleněné elektrody, sloužící k zapojení tykadla, vyrobené pomocí vertikálního tahače PC-100.**





**Příloha 6: Laboratorní chov IT v plastových boxech se smrkovými poleny s řízeným teplotním a světelným režimem (25 °C teplota, vlhkost 66 %).**