

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Vliv čichových stimulů na produkci feromonu u kůrovce *Ips  
typographus***

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Veronika Hammerová

Vedoucí práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

2022

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Veronika Hammerová

Lesní inženýrství  
Lesní inženýrství

Název práce

**Vliv čichových stimulů na produkci feromonu u kůrovce *Ips typographus***

Název anglicky

**Effect of olfactory stimuli on pheromone production in *Ips typographus***

---

### Cíle práce

Hlavním hostitelem kůrovce *Ips typographus* (IT) je smrk. V nižších populačních hustotách IT vyhledává oslabené nebo mrtvé stromy, při přemnožení napadá i stromy zdravé. V obou případech jsou to "pionýrští" samci, kteří vybírají hostitele a zahajují kolonizaci tvorbou snubní komůrky pod kůrou a produkcí agregačního feromonu. Úspěch kolonizace živých stromů je závislý na množství kolonizujících brouků, množství produkovaného agregačního feromonu a na dostatečné populaci brouků, kteří mohou být feromonem přilákáni. Je zřejmé, že větší množství feromonu přiláká větší počet brouků a ti tak společně mají vyšší šanci na případné překování obrany stromu. Na druhé straně je produkce feromonu energeticky náročná a příliš vysoká hustota kolonizace snižuje kvalitu nové generace. Je tedy možné, že kůrovci náklady a přínosy kolektivní kolonizace optimalizují. Jedním z možných mechanismů takové optimalizace může být systém negativní zpětné vazby prostřednictvím tykadel. U brouků *Anthonomus grandis* (Coleoptera, Curculionidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) a *Ips pini* (Coleoptera, Curculionidae) bylo prokázáno, že jedinci bez tykadel produkují větší množství feromonu v porovnání s intaktními brouky (Dickens et al., 1988, 2002, Ginzl et al., 2007). Také u IT samci bez tykadel vytvářejí větší množství feromonu než intaktní brouci (Veronika Hammerová, CZU FLD\_BP 2020). Feromon je tvořen ve střevech samců. Je směsí dvou látek 2-methyl-3-buten-2-olu (MB) a cis verbenolu (cV). Zatímco MB vzniká de novo v mevalonátové syntetické dráze, cV je syntetizován z alfa-pinenu hostitele. Produkce MB, je regulována prostřednictvím juvenilním hormone (JH) uvolňovaného z neurokrinního systému corpora allata (CA) v mozku. Potrava, kterou samci během kolonizace přijímají, stimuluje syntézu JH v corpora allata a ten následně reguluje expresi genů a regulačních faktorů mevalonátové dráhy (Tillman et al. 2004; Keeling a kol. 2004, Ginzl and Keeling, 2007). Antenektomie u IT snižuje produkci MB, ale ne cV (Veronika Hammerová, CZU FLD\_BP 2020).

Podstata pozorovaného negativního vlivu antenektomie na produkci MB není známa. Odstraněním tykadel kůrovci přicházejí o všechny čichové vjemy včetně schopnosti vnímat feromon. Čichové podněty jsou detekovány prostřednictvím čichových neuronů (ORN) přítomných v čichových sensilách na tykadlech. Molekuly vůní stimulují ORN a informace o podráždění je předávána do čichových center mozku. Histologicky bylo prokázáno, že antenální lalok, primární čichové centrum mozku je prostřednictvím interneuronů propojeno s mnoha oblastmi mozku včetně endokrinního centra corpora allata.

Diplomová práce navazuje na práci bakalářskou (Veronika Hammerová CZU FLD BP 2020): "Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu?" a rozšiřuje problematiku bakalářské práce o zjištění, zda a jak různá expozice kůrovců k čichovým podnětům včetně feromonu ovlivňuje tvorbu feromonu. Cílem práce bude 1) doplnění pilotních pokusů vlivu odstranění tykadel na feromonovou produkci provedených v BP tak, aby výsledky mohly být statisticky vyhodnoceny, 2) provedení nových experimentů, ve kterých budou samci IT vystaveni různým koncentracím agregačního feromonu (případně jiných látek) se záměrem stanovit vliv této expozice na následnou produkci feromonu. V práci tak budou porovnávány dvě skupiny brouků: i) brouci, u kterých bude tvorba feromonu vyvolána přirozeně žírem a ii) brouci, u kterých bude tvorba feromonu stimulována experimentálně aplikací syntetického juvenilního hormonu.

#### **Metodika**

Metodicky bude práce založena na kvantifikaci množství feromonu pomocí GC-FID a GC-MS.

V-VII 2021 literární rešerše

VII-VIII 2021 metodické seznámení

VIII – XII 2021 experimentální práce

I-II. 2022 analýza dat

II-III. 2022 sepsání a podání práce

## Doporučený rozsah práce

30-40

## Klíčová slova

Ips typographus, aggregation pheromone, antennectomy, pheromone biosynthesis

---

## Doporučené zdroje informací

- Birgersson, G. Host Tree Resistance Influencing Pheromone Production in Ips Typographus (Coleoptera: Scolytidae). *Holarctic Ecology* 12, no. 4 (1989): 451-56. Accessed March 24, 2021. <http://www.jstor.org/stable/3682055>.
- Blomquist GJ, Figueroa-Teran R, Aw M, Song M, Gorzalski A, Abbott NL, Chang E, Tittiger C. 2010 Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochem Mol Biol.* 40(10):699-712. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.07.013.
- Dickens J. C., McGovern W. L., and Wiygul G. (1988) EFFECTS OF ANTENNECTOMY AND A JUVENILE HORMONE ANALOG ON PHEROMONE PRODUCTION IN THE BOLL WEEVIL (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). *Journal of Entomological Science*: January 1988, Vol. 23, No. 1, pp. 52-58. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-23.1.52>
- Dickens, J.C., Oliver, J.E., Hollister, B., Davis, J.C., Klun, J.A., 2002. Breaking a paradigm: male-produced aggregation pheromone for the Colorado potato beetle. *J. Exp. Biol.* 205, 1925e1933
- Ginzel, M.D., Bearfield, J.C., Keeling, C.I., McCormack, C.C., Blomquist, G.J., Tittiger, C., 2007. Antennally-mediated negative-feedback regulation of pheromone production in the pine engraver beetle, Ips pini. *Naturwissenschaften* 94, 61-64.)
- Jindra M, Palli SR, Riddiford L 2013. The juvenile hormone signalling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology* 58: 181-204. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>
- Lanne B.S., P. Ivarsson, P. Johnsson, G. Bergström, A.B. Wassgren 1989\_Biosynthesis of 2-methyl-3-buten-2-ol, a pheromone component of Ips typographus (Coleoptera: Scolytidae) *Insect Biochemistry* 19(2): 169-167. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(89\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0020-1790(89)90087-5)
- Seybold, S., Bohlmann, J., & Raffa, K. (2000). BIOSYNTHESIS OF CONIFEROPHAGOUS BARK BEETLE PHEROMONES AND CONIFER ISOPRENOIDS: EVOLUTIONARY PERSPECTIVE AND SYNTHESIS. *The Canadian Entomologist*, 132(6), 697-753. doi:10.4039/Ent132697-6
- Tillman JS, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ. 1999 Insect pheromones-an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 481-514
- Tittiger C., and Blomquist GJ. 2017. Pheromone biosynthesis in bark beetles, *Current Opinion in Insect Science* 24:68-74

---

**Předběžný termín obhajoby**

2021/22 LS – FLD

**Vedoucí práce**

RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

**Garantující pracoviště**

Excelentní tým pro mitigaci

**Konzultant**

Ing. Jaromír Hradecký, PhD

Elektronicky schváleno dne 1. 5. 2021

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 1. 3. 2022

**prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.**

Děkan

V Praze dne 08. 03. 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Vliv čichových stimulů na produkci feromonu u kůrovce *Ips typographus* vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Blanky Kalinové, CSc. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

V Praze dne 10.4. 2022

Podpis autora

## **Poděkování**

Chtěla bych velice poděkovat RNDr. Blance Kalinové, CSc. za trpělivé vedení diplomové práce a odbornou i manuální pomoc, Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za analyzování vzorků, odbornou pomoc při analytické části diplomové práce a její konzultace, Ing. Jiřímu Synkovi za odbornou i manuální pomoc při chovu *Ips typographus*. Bez těchto lidí by tato diplomová práce nemohla vzniknout. Dále děkuji mé rodině, přátelům a spolužákům za veškerou podporu a trpělivost.

## Abstrakt

*Ips typographus* (*I. typographus*) je jeden z nejvíce známých kalamitních škůdců smrkových porostů. Vylučováním agregačního feromonu při kolonizaci hostitele samci lákají další jedince z okolí. Na jejich počtu závisí úspěch kolonizace. Je-li strom živý a v dobré kondici je potřeba větší množství brouků k překonání jeho obranyschopnosti. Větší množství brouků produkuje kolektivně větší množství agregačního feromonu. Je možné, že brouci regulují feromonovou produkci podle potřeby, tj. v závislosti na množství feromonu v okolí kolonizovaného stromu. V části literární rešerše se diplomová práce zabývá a popisuje základní údaje a informace o čeledi kůrovců (*Scolytidae*), popisem rozpoznávacích znaků a bionomie konkrétního druhu *Ips typographus* (Linnaeus, 1758). Dále rozebírá popis tykadel a fyziologii čichového vnímání, složení a tvorbu agregačního feromonu a jeho regulaci. Cílem této práce bylo doplnit mé předchozí pilotní pokusy shrnuté v bakalářské práci: „Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu u *Ips typographus*?“ (Veronika Hammerová CZU FLD BP 2020), která přinesla zjištění, že brouci bez tykadel produkují více agregačního feromonu než brouci s tykadly. V předkládané diplomové práci jsem se pokusila o rozšíření této problematiky a zjištění, zda je produkce feromonu zpětnovazebně ovlivňována jeho přítomností v prostředí. Metodika diplomové práce je založena na kvantifikaci množství dvou hlavních feromonových komponent tj. 2-methyl-3-buten-2-olu (MB) a cis-verbenolu (cV) v extraktech střev samců pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Byly provedeny čtyři základní typy experimentů se samci s tykadly a bez nich. V prvním typu experimentu jsem porovnávala množství feromonu samců přirozeně zavrtaných ve smrkových políčkách. U druhého experimentu jsem porovnávala množství feromonu po aplikaci juvenilního hormonu. Uvedené typy experimentů byly opakováním experimentů z bakalářské práce. Třetí experiment porovnával množství feromonu ve střevech samců, u nichž byla feromonová produkce stimulována přítomností par dvou hlavních komponent pryskyřice ( $\alpha$ -pinenu a myrcenu), které jsou uváděny jako prekurzory feromonové produkce. Čtvrtý experiment porovnával množství tvořeného feromonu u brouků vystaveným různým dávkám feromonu. Z neznámých důvodů práce nepotvrdila mé dřívější výsledky a nepřinesla jednoznačné výsledky vypovídající o tom, zda je produkce feromonu autoregulována jeho přítomností v okolí. V diskusi se zabývám kritickou analýzou, proč tomu tak bylo.



## Abstract

*Ips typographus* is one of the most known calamity pests of spruce stands. By releasing aggregation pheromone during host colonization, males attract further individuals nearby. The success of colonization depends on the numbers of beetles joining the attack. Living tree in a good condition has strong defence ability that can be overcome by greater number of beetles. Greater number of beetles joining mass attack produce higher amount of pheromone. There is a possibility that newly arriving beetles adjust their pheromone production accordingly to pheromone amount around the attack tree. In the introductory part of my master thesis, I describe the basic data and information about the family of bark beetles (*Scolytidae*), the description of the species specific characteristics and bionomy of a *Ips typographus* (Linnaeus, 1758). The introductory part also discusses the antennal description and olfactory physiology as well as the composition and production of the aggregation pheromone, and its regulation. The aim of this work was to complete my previous pilot experiments published in my bachelor thesis: "Do antennae play a role in regulation of pheromone production in *Ips typographus*?" (Veronika Hammerová CZU FLD BT 2020). and extend the investigation of the topic by experiments aiming to figure out, whether and how exposure of beetles to pheromone and non-pheromone olfactory stimuli affects the aggregation pheromone production. The methodology was based on the quantification of the amount of two major aggregation pheromone components e.g. 2-methyl-3-buten-2-ol (MB) and cis-verbenol (cV) in the gut extracts of males using gas chromatography with mass detection (GC-MS). Four basic types of experiments were performed. The first experiment studied the pheromone production in the gut of males naturally boring in spruce logs. The second experiment investigated the pheromone production in beetles after juvenile hormone application. The third experiment determined the pheromone production in beetles exposed to resin components  $\alpha$ -pinene and myrcene. The fourth experiment aimed to figure out, whether pheromones biosynthesis is negatively regulated by the pheromone presence in the environment. The first two experiments were repetition of those performed in my bachelor thesis, which provided evidence, that antennectomy increase the pheromone production. The latter two experimental types were novel ones and aimed to investigate how olfactory signals affect the pheromone production. For unknown reasons, the work did not bring clear results. The results are discussed along with speculation as to why this was the case.

## **Klíčová slova**

Kůrovec, *Ips typographus*, biosyntéza feromonu, feromonová produkce, agregační feromon, antennektomie, negativní zpětná vazba, prekurzory, mevalonátová cesta

## **Key words**

Bark beetle, *Ips typographus*, biosynthesis of pheromone, pheromone production, aggregation pheromone, antennectomy, negative feed-back, precursors, mevalonate pathway

## Obsah

1. Literární rešerše .....	15
1.1. Kůrovci ( <i>Scolytidae</i> ) .....	15
1.2. Lýkožrout smrkový ( <i>Ips typographus</i> , Linnaeus, 1758).....	15
1.3. Anatomie tykadel .....	17
1.4. Primární atraktanty .....	19
1.5. Agregační feromon.....	20
1.6. Produkce feromonu a jeho regulace .....	21
1.7. Biosyntéza ve střevech .....	24
1.8. Mevalonátová dráha (de novo) a syntéza JHIII .....	25
2. Materiál a metodika .....	27
2.1. Chov a sběr <i>I. typographus</i> .....	27
2.2. Typy provedených experimentů.....	27
2.3. Výběr samců.....	28
2.4. Odstranění tykadel .....	28
2.5. 3-denní žír a aplikace JHIII.....	28
2.6. Hostitelské prekurzory a feromon.....	30
2.7. Extrakce střev .....	30
2.8. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí .....	31
2.9. MS detektor .....	32
2.10. Chromatografická analýza.....	32
2.11. Kvantifikace .....	32
3. Výsledky .....	35
3.1. Kvantifikace feromonové produkce u brouků po 3–denním žíru .....	35
3.2. Kvantifikace feromonových komponent po aplikaci JHIII.....	38
3.3. Kvantifikace feromonových komponent v experimentech s expozicí brouků hostitelským prekurzorům .....	39
3.4. Kvantifikace feromonových komponent po expozici k feromonům.....	41
4. Diskuze .....	46
5. Závěr.....	48
6. Seznam literatury.....	49

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Čichové sensily tykadla <i>Ips typographus</i> .....	18
Obrázek 2: Princip chemické komunikace u <i>Ips typographus</i> .....	20
Obrázek 3: První identifikované feromonové složky kůrovce .....	23
Obrázek 4: Diagram mevalonátové cesty a biosyntézy JH u hmyzu.....	26
Obrázek 5-6: Porovnání hustoty chloupků u samce a samičky .....	28
Obrázek 7: Dvojměrný plynový chromatograf.....	33
Obrázek 8-9: Překryv XIC (m/z 71; m/z 94) chromatogramů.....	33
Obrázek 10: Hmotnostní spektrum MB s píkem .....	34
Obrázek 11: Hmotnostní spektrum cV s píkem.....	34
Obrázek 12: Sloupcový graf-koncentrace MB po 3-denním žíru.....	36
Obrázek 13: Překryv XIC (m/z 71) chromatogramů-bez tykadel-3-denní žír .....	37
Obrázek 14: Překryv XIC (m/z 71) chromatogramů-intaktní-3-denní žír. ....	37
Obrázek 15: Sloupcový graf-koncentrace MB po aplikaci acetonu a JHIII. ....	38
Obrázek 16: Sloupcový graf-koncentrace MB po vystavení parám hostitelských prekurzorů.....	40
Obrázek 17: Sloupcový graf-koncentrace cV po vystavení parám hostitelských prekurzorů.....	40
Obrázek 18: Sloupcový graf-koncentrace MB po expozici feromonu (10 BE)....	42
Obrázek 19: Sloupcový graf-koncentrace MB po expozici feromonu (100 BE)...	42
Obrázek 20: Sloupcový graf-koncentrace MB po aplikaci 10 $\mu$ L oleje. ....	43
Obrázek 21: Sloupcový graf-koncentrace cV po expozici feromonu (10 BE).. ...	43
Obrázek 22: Sloupcový graf-koncentrace cV po expozici feromonu (100 BE).. ...	44
Obrázek 23: Sloupcový graf-koncentrace cV po aplikaci 10 $\mu$ L oleje.....	44

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled skupin brouků .....	29
Tabulka 2: Průměrná kvantifikace MB a cV-3-denní žír. ....	36
Tabulka 3: Průměrná kvantifikace MB-aplikace acetonu a JHIII .....	39
Tabulka 4: Průměrná kvantifikace MB a cV po expozici parám hostitelských prekurzorů.....	41
Tabulka 5: Průměrná kvantifikace MB a cV exponovaných působení 10 a 100 BE feromonu.....	45

## Úvod

Hlavním hostitelem lýkožrouta smrkového (*I. typographus*) je smrk. Při nízké populační hustotě, kůrovci napadají především oslabené jedince, u kterých snadno překonají jejich obranu. Při přemnožení *I. typographus* napadá i vitální stromy. Hostitele vybírají tzv. pionýrství samci a tvorbou snubní komůrky pod kůrou zahajují kolonizaci. Při tvorbě komůrky produkují agregační feromon, na jehož množství závisí úspěch kolonizace. Pomocí regulace feromonové produkce jsou samci schopni ovlivnit, jaké množství brouků bude na hostitele přilákáno. Více brouků produkuje větší množství feromonu a to přiláká více jedinců, kteří mají větší šanci na případné překonání obrany stromu. produkce feromonu je však energeticky náročná a příliš vysoká hustota kolonizace snižuje kvalitu nové generace. Je možné, že kůrovci náklady a přínosy kolektivní kolonizace optimalizují. Jeden z možných mechanismů takové optimalizace je například systém negativní zpětné vazby prostřednictvím tykadel. U brouků *Anthonomus grandis*, *Leptinotarsa decemlineata* a *Ips pini* bylo prokázáno, že jedinci bez tykadel produkují větší množství feromonu než brouci intaktní (DICKENS *et al.*, 1988, 2002; GINZEL *et al.*, 2006). Také u *I. typographus* vytvářejí samci bez tykadel větší množství agregačního feromonu než brouci intaktní (HAMMEROVÁ, 2020). Feromon je vytvářen ve střevech samců a skládá se ze dvou látek 2-methyl-3-buten-2-olu (MB) a cis verbenolu (cV). Směs těchto dvou látek tvoří agregační feromon. MB vzniká *de novo* v tzv. mevalonátové biosyntetické dráze, zatímco cV je syntetizován z  $\alpha$ -pinenu hostitele. Produkce MB je regulována prostřednictvím juvenilního hormonu (JH) uvolňovaného z neukrinního systému corpora allata (CA) v mozku. Potrava, kterou samci během kolonizace přijímají, stimuluje syntézu JH v CA a ten následně reguluje expresi genů a regulačních faktorů mevalonátové dráhy (KEELING *et al.* 2004; GINZEL *et al.* 2006). Zjistila jsem, že u *I. typographus* absence tykadel zvyšuje produkci MB, ale ne cV (HAMMEROVÁ, 2020). Podstata zvýšení produkce MB po odstranění tykadel není známa. Jelikož jsou veškeré čichové podněty detekovány prostřednictvím čichových neuronů (ORN), které se nacházejí v čichových sensilách na tykadlech, odstraněním tykadel přijdou kůrovci o všechny smyslové vjemy z tykadel. Není jasné, zda se jedná o nesespecifickou fyziologickou změnu a nebo výpadek vnímání některých významných čichových informací jako jsou hostitelské kairomony a nebo agregační feromony.

## Cíl práce

Podstata pozorovaného pozitivního vlivu antenektomie na produkci MB (antenektomie zvyšuje produkci feromonu) není známa. Tato diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci „Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu u *Ips typographus*?“ (Veronika Hammerová CZU FLD BP 2020) a rozšiřuje tuto problematiku o zjištění, zda a jak různá expozice brouků k čichovým podnětům (rostlinným kairomonům a feromonu) ovlivňuje tvorbu a produkci agregačního feromonu. Cílem této práce je doplnění pilotních pokusů provedených v bakalářské práci (vliv odstranění tykadel na feromonovou produkci) a statistické vyhodnocení. V této doplňující studii budeme zkoumat dvě skupiny brouků: a) samce, u kterých bude tvorba feromonu vyvolána přirozeně žírem a b) samci, u kterých bude tvorba feromonu stimulována aplikací syntetického juvenilního hormonu. Pilotní experimenty budou rozšířeny o experimenty, ve kterých budou samci *I. typographus* vystaveni těkavým látkám hostitele ( $\alpha$ -pinen, myrcen) a různým koncentracím agregačního feromonu se záměrem stanovit zda expozice specifickým čichovým podnětům má vliv na produkci feromonu. Metodicky bude práce založena na kvantifikaci množství feromonu v extraktech střev brouků pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, GC-MS.

## 1. Literární rešerše

### 1.1. Kůrovci (*Scolytidae*)

Pod pojmem kůrovci zahrnujeme brouky, kteří převážně žijí pod kůrou stromů a živí se floémem (polyfágní druhy) nebo kůrovce živící se symbiotickým houbovým produktem (někteří *Scolytidae* a všichni *Platypodidae*), který roste ve vyvrtných chodbičkách (*Xylomycetophagus*). Někteří *Scolytidae* se také mohou vyvíjet uvnitř tvrdých semen a plodů (*Spermophagus*), uvnitř dřevě větviček a malých stonků či řapíků spadaného listí (*Myelophagus*). Kůrovci obvykle žijí na rozptýlených stanovištích, která jsou příhodná pro vývoj pouze jednoho pokolení brouků. Z toho důvodu se nově vzniklá generace brouků musí po vylíhnutí rozptýlit a najít nová místa pro rozmnožování. Tyto dva atributy nám stanovují, že populace brouků živící se floémem i brouků živící se symbiotickými houbami, jsou velmi variabilní jak v prostoru, tak v čase. Jednoduše závisí na prostorové a časové dostupnosti vhodného hostitelského materiálu. Proto je velmi důležité studovat jejich časovou a prostorovou dynamiku, nejenom z hlediska ekonomického, ale též ekologického (LIEUTIER *et al.*; 2004).

### 1.2. Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*, Linnaeus, 1758)

Lýkožrout smrkový, lidově známý jako „kůrovec“, je brouk, který je rozšířený v jehličnatých lesích v oblasti severní a střední Evropy. Napadá především oslabené smrky. Je známý jako tzv. sekundární škůdce, jelikož napadá stromy převážně již poškozené nebo oslabené jinými abiotickými faktory. Nejvíce mu vyhovují druhově chudé monokultury se smrkem, pěstované mimo jejich přirozené stanoviště. Při napadení zdravého a vitálního smrku, by byl kůrovec zadušen kapkou smoly, jakmile by se provrtal do kůry. Na nevhodných stanovištích jsou smrky většinou tak oslabeny, že nejsou schopny se bránit. To může vést k masovému přemnožení kůrovce a k následnému zničení všech lesů (DREYER & DREYER, 2019). Spolu s výskytem lýkožrouta smrkového se také často vyskytuje houba *Ophiostomata polonicum*, která je pro smrk silně patogenní. Lýkožrout smrkový je jejím častým přenašečem (KŘÍSTEK *et al.*, 2004).

Výskyt *I. typographus* je také obvykle doprovázen lýkožroutem lesklým (*Pityogenes chalcographus*) a v dnešní době na většině území také lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*) (ZELENÁ ZPRÁVA, 2020).

Velikost kůrovce *I. typographus* se pohybuje v rozmezí 4,0–5,5 mm, samičky bývají částečně zavalitější. Zbarvení brouka je tmavohnědé až černohnědé a po stranách více lesklé s výrazným ochlupením. Krovky mají v zadní části značné vyhloubení a jsou matné s jemnými tečkami. Na okrajích krovek se nachází vroubkování (4 páry zubů) (KŘÍSTEK *et al.*, 2004).

*I. typographus* je druh preferující smrk, ale ve vzácných případech se může vyvíjet i pod kůrou borovice a modřínu. Ve střední Evropě je jeho výskyt nejvíce zaznamenán v horských smrčínách (do 2000 m n.m.), ale z důvodu umělého zavádění smrku se rozšířil i do mnohem nižších poloh. Doba rojení a počet populací za rok závisí na nadmořské výšce. V nižších polohách (300–400 m n. m.) dochází k prvnímu rojení ke konci dubna, obvykle se třemi generacemi. V chlumech (400–600 m n. m.) dochází k prvnímu rojení v polovině května, zpravidla se dvěma generacemi. Na horách (nad 600 m n. m.) rojení proběhne až ve druhé polovině května nebo z počátku června a generace už je převážně pouze jedna. Rojení je závislé na počasí, a podle jeho průběhu může trvat 10–20 dnů (KŘÍSTEK, *et al.*; 2004).

Lýkožrout smrkový je polygamní druh, který se běžně páří s 1-3 samičkami. Požerek má tvar podélné hvězdice až se šesti rameny. Rovné matečné chodby pokračují směrem nahoru i dolů spolu s několika větracími otvory. Délka těchto chodeb může dosahovat až 10 cm a šířky 3 – 3,5 cm. Snubní komůrky se nachází v kůře (KŘÍSTEK *et al.*, 2004; ZAHRADNÍK & GERÁKOVÁ, 2010)

Samičky několik dní usilovně pracují na hloubení matečných chodeb, do kterých pak začnou klást vajíčka. V jednom dni zvládnou naklást 1 až 2 vajíčka a za celý svůj život mohou v průměru naklást až 60 vajíček. Z vajíček se po jednom až dvou týdnech začnou líhnout larvy. Ty si začnou z matečné chodby vykusovat menší chodbičky, které vedou různými směry. Larvy se čtyřikrát až pětkrát svléknou a nakonec zakuklí. Přibližně po dvou týdnech se z kukly líhne mladý dospělý brouk (KŘÍSTEK *et al.*, 2004).

*I. typographus* je v přírodě přirozenou potravou některých predátorů. Mezi nejvíce zastoupené dravce patří například draví brouci (*Cleridae*), mouchy (*Dolichopodidae*) a parazitární vosy. Druh predátora pak závisí na druhu hostitelského stromu (WERMELINGER, 2004).



### 1.3. Anatomie tykadel

Tykadla jsou pro kůrovce důležitým smyslovým orgánem, který vnímá především čichové podněty (ANDERSSON, 2012). Důležitost tykadel, jako čichového orgánu, byla u kůrovců prokázána behaviorálně (BORDEN & WOOD, 1966) i elektrofyzilogicky (PAYNE, 1970). Znalost morfologie tykadel je nezbytná pro porozumění čichového vnímání a chování hmyzu. (PAYNE, 1973).

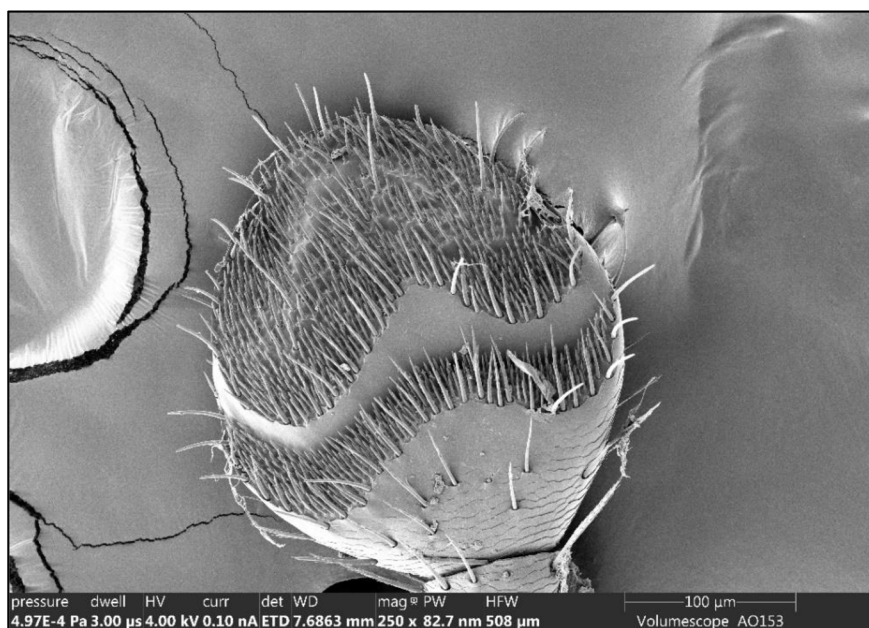
Tykadla u kůrovců jsou párová a článkovaná. Umístěna jsou na přední straně hlavy. Bazální článek je velký, rozšiřující se scapus, který vyrůstá z tykadlové jamky (fovea antennalis). Kromě tykadlového nervu, který jím probíhá, obsahuje svaly ovládající nejen scapus, ale i druhý tykadlový článek pedicellus. Zbývající tykadlové články (4) tvoří stopku tykadla a jsou bez vlastní muskulatury (funicle). Poslední tykadlový článek je rozšířený v paličku. (NAKLÁDAL, 2015 ; PAYNE *et al.*, 1973).

Na ventrální ploše paliček nalezneme velké množství různých druhů sensil. Při morfologickém zkoumání tykadel bylo nalezeno šest různých druhů sensil Moeck (1968). Jedná se například o sensilla chaetica – dlouhé, tuhé chloupky připevněné na bázi pohyblivou membránou. Můžou být buď nerozvětvené, jednostranně, dvoustranně nebo mnohostranně rozvětvené. Dalším typem sensil kůrovců je například sensilla trichodea typu I – jedná se o krátké, tenké chloupky, které jsou kloubově spojeny v důlku. Sensilla trichodia typu II – jsou na rozdíl od typu I dlouhé a tenkostěnné chloupky, ostře špičatého tvaru a jemně zahnuté. Sensilla trichodia typu III – jsou silnostěnné a tupě zakončené chloupky s výrazným zakřivením. Posledním typem je sensilla basiconica – jedná se buď o dlouhý typ, který je tenkostěnný, většinou válcovitý, ke konci se zužující. Oproti tomu krátký typ sensilla basiconica jsou krátké chloupky kolíkovitého tvaru, které se vyskytují ve velmi malém počtu (PAYNE *et al.*, 1973). Sensily různého tvaru vnímají různé typy smyslových stimulů (mechanické, akustické, chemické). V našem kontextu jsou významné čichové sensily, které mají kutikulární stěnu perforovanou drobnými otvůrkami (póry), kterými čichově aktivní látky pronikají do nitra sensily k čichovým receptorovým neuronům.

Čichové receptorové neurony reagují na přítomnost specifické těkavé látky změnou svého elektrického potenciálu. Můžeme si je představit jako maličké baterie, které se při interakci s molekulou vůně na malý okamžik změny svoje napětí. Podráždění je vedeno vláknem čichových receptorových neuronů, které tvoří antenální nerv do mozku, do

primárního čichového centra v antenálním laloku. Z něj pak jsou čichové informace vedeny do vyšších mozkových center do houbovitých těles a laterálních rohů mozku, kde po integraci s jinými smyslovými signály je vytvářen základ pro případné chování (ANDERSSON, 2012).

Čichové sensily u *Ips typographus* nalezneme na ventrální straně paličky tykadla. Jsou uspořádány do charakteristických 3, více méně oddělených smyslových oblastí, kterými jsou špička tykadla a dvě oblasti hustě uspořádaných sensil tvořících charakteristicky zprohýbané pruhy (ANDERSSON, 2012).



Obrázek 1: Čichové sensily na ventrální straně paličky tykadla *Ips typographus*. Dva vlnkaté proužky jsou typickým taxonomickým znakem pro tento druh.

Pro kůrovce *I. pini* (GINZEL *et al.*; 2006) a pro několik dalších druhů brouků bylo zjištěno, že tykadla mají důležitou funkci jako orgán, který je schopen ovlivňovat produkci feromonu. Poprvé byl tento regulační systém popsán u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a později u nosatce bavlníkového (*Anthonomus grandis*) (DICKENS *et al.*; 1988, 2002). V obou výzkumech se zjistilo, že jedinci bez tykadel produkují vyšší množství feromonu v porovnání s jedinci s tykadly. U *L. decemlineata* se po aplikaci JH III zvýšila feromonová produkce v kombinaci s odstraněním tykadel (antenektomie) až 200x. (DICKENS *et al.*; 2002). Také u *A. grandis* kde po aplikaci JH nebo po antenektomii došlo ke zvýšení feromonové produkce (DICKENS *et al.*; 1988).

Při studiu *I. pini* byla zjištěna nejenom výrazně větší produkce feromonů u samců bez tykadel, ale také hladina mRNA genů mevalonátové dráhy. Ta je důležitá pro syntézu feromonu. Při odstranění tykadel byly tyto geny indukovány ve velké míře, což naznačuje transkripční regulaci produkce feromonu. Přesný mechanismus této regulace není znám. Bylo však prokázáno, že glomeruly (oválné struktury přítomné v antenálním laloku), jsou propojeny prostřednictvím svých interneuronů i s oblastmi mozku, které regulují produkci JH (*Corpora cardiaca a Corpora allata*) (GINZEL *et al.*; 2006).

Veškeré odezvy čichových sensil jsou měřitelné elektrofyzilogicky pomocí mikroelektrodových sond. K měření odezvy z celého tykadla se používá elektroantenogram (EAG), který měří souhrnnou elektrickou odpověď daným podnětem aktivovaných čichových smyslových neuronů na tykadle. Signály z tykadel po zesílení lze zobrazit na PC obrazovce a jejich velikost a průběh vyhodnocovat. Jako u většiny sensorických neuronů, jsou i čichové receptory spontánně elektricky aktivní a vykazují stálou nízkou úroveň výbojů na pozadí (LARSSON *et al.*, 2004)

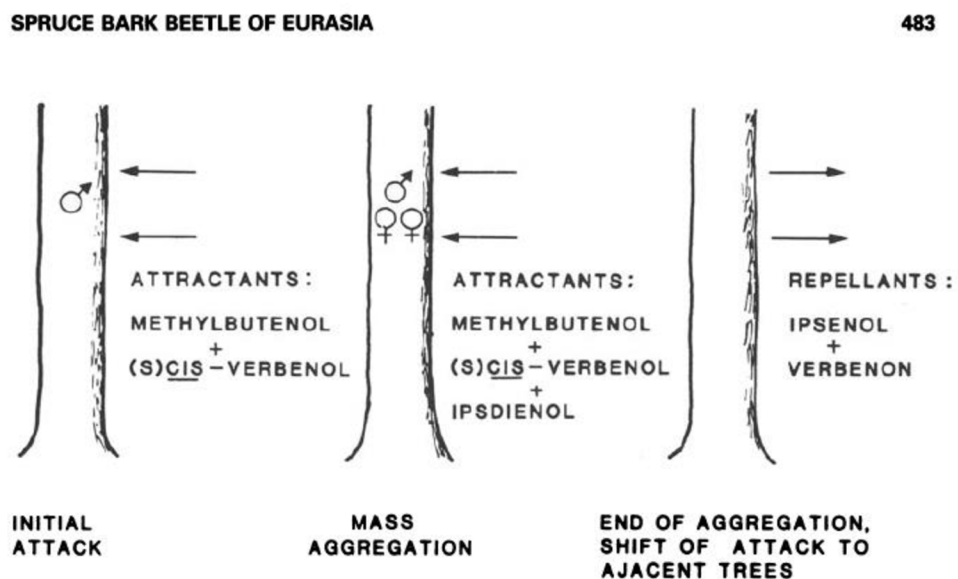
#### **1.4. Primární atraktanty**

Primární atraktanty jsou hostitelské těkavé látky, přitahující kůrovce k vhodnému hostitelskému stromu. Tyto látky jsou součástí pryskyřice a při poškození nebo oslabení stromu jsou vylučovány do prostoru a kůrovci jsou schopni je vnímat a orientovat se pomocí čichu ke zdroji vůně. Pro mnoho druhů kůrovců jsou primárními atraktanty velmi významné, ale pro *I. typographus* není tento jev příliš výrazný. Nicméně, bylo zjištěno, že *I. typographus* velmi citlivě vnímá velké množství hostitelských, nehostitelských a houbových látek a jeho čichový repertoár je nesmírně bohatý (YUVARAJ, 2021, ANDERSSON, 2012).

O tom, jak kůrovci *I. typographus* nacházejí vhodného hostitele existují dvě obecné teorie. První teorií je, že brouci lokalizují hostitelské stromy, pomocí volatilních látek stromu (primární atrakce). Druhá teorie předpokládá, že brouci nalétávají na hostitele náhodně a vybírají jedince ke kolonizaci po přistání na základě chemických podnětů působících na krátké vzdálenosti. Obě tyto teorie se vzájemně nevylučují a každá může primárně fungovat u každého konkrétního druhu (KALINOVÁ *et al.*; 2014; ANDERSSON, 2012; SAINT-GERMAIN, 2007)

Předpokládá se, že samci *I. typographus* vhodného hostitele vybírají podle jeho zdravotního stavu. Ke kolonizaci jsou většinou vhodné stromy oslabené, méně odolné, nemocné, či vyvrácené. Zdravé stromy napadá kůrovec pouze v případě přemnožení, kdy je schopný svým vysokým počtem úspěšně překonat obranyschopnost svého hostitele (KAUSRUD *et al.*, 2012 ; TOFFIN *et al.*, 2017; RAFFA *et al.*, 2016). Také se předpokládá, že oslabené stromy mohou být charakterizováni jiným spektrem těkavých látek v porovnání se zdravými jedinci a tyto rozdíly mohou ovlivňovat výběr hostitele (NETHERER *et al.*, 2021).

S pomocí elektrofyziologických metod snímání aktivity čichových receptorových neuronů bylo zjištěno, že jedinci *I. typographus* vnímají široké spektrum volatilních látek. (KALINOVÁ *et al.*, 2014; KANDASAMY *et al.* 2016, 2019; SCHIEBE *et al.* 2011). Jeden z hlavních hostitelských monoterpenů ( $\alpha$ -pinen) je využíván samci k přeměně na jednu ze složek agregačního feromonu (cV) (DVOŘÁKOVÁ *et al.* 2011), na rozdíl od druhé složky agregačního feromonu (MB), který si kůrovec vytváří z vlastních zdrojů (*de novo*) (LANNE *et al.*, 1988).



Obrázek 2: Princip chemické komunikace u *Ips typographus* (BERRYMAN; 1988)

## 1.5. Agregační feromon

Během výběru vhodného hostitele pionýrskými brouky je možné, že těkavé látky ze smrku mohou pomoci s orientací k vhodnému hostiteli. Po zavrtání do kůry, produkují

samci hloubící snubní komůrku vysoce atraktivní agregační feromon, který láká další brouky obojího pohlaví (tzv. sekundární atrakce). Samci se připojují ke kolonizaci, samice se páří se samci ve snubních komůrkách. Hlavními komponenty agregačního feromonu *I. typographus* jsou 2-methyl-3buten-2 ol (MB) a cis-verbenol (cV). CV je produkován i dalšími druhy kůrovců, avšak MB je specifický pouze pro *I. typographus* (BERRYMAN; 1988; BYERS, 2004).

V pozdějších fázích kolonizace jsou samci *I. typographus* a s brouky asociovanými mikroorganismy produkovány další látky jako je ipsenol, ipsdienol a verbenon (SEYBOLD 1995, SCHLYTER 1987). Ipsdienol je typická feromonová komponenta pro většinu druhů kůrovců, ale u *I. typographus* hraje zanedbatelnou nebo žádnou roli. Další dvě složky, ipdienol a verbenon, inhibují odpověď na agregační feromon a tak působí jako antiagregační feromony. Antiagregační feromon reguluje hustota populace na daném hostiteli a umožňuje přeměrování přilákaných brouků na dalšího nejbližšího hostitele. Feromonové komponenty mohou být tvořeny z hostitelských prekurzorů nebo vytvářeny *de novo* (BERRYMAN, 1988).

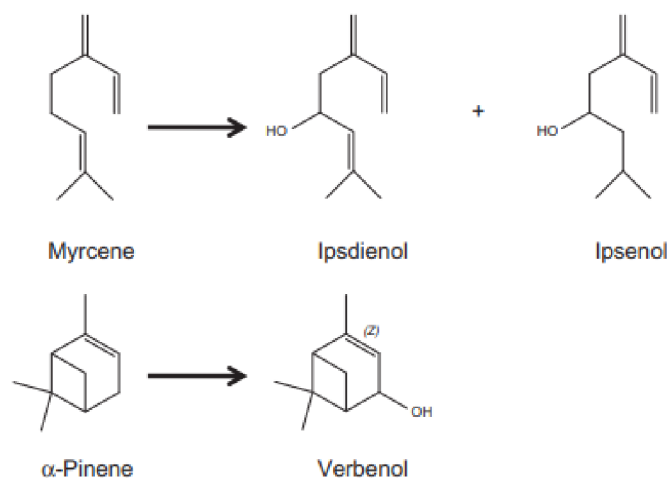
## 1.6. Produkce feromonu a jeho regulace

V endemických podmínkách kůrovec nemá dostatečnou hustotu populace, aby zabil zdravé hostitelské jedince, takže se snaží vyhledávat stromy oslabené nebo odumírající. Pokud je množství takových stromů vysoké, obvykle umožní nárůst populace kůrovců. K tomu dochází, v důsledku polomů či jiných kalamitních událostí a nebo v důsledku snížení odolnosti stromů vlivem klimatické změny, sucha, vysokých teplot, a jiných biotických či abiotických faktorů. Rychlé navýšení populace umožní kůrovcům změnu hostitele a ti začnou napadat i relativně zdravé stromy. Za pomoci agregačních feromonů, se velká množství kůrovců shromáždí na vybraném hostiteli a kolonizují ho. Velké množství kůrovců dokáže překonat obranyschopnost i zdravých stromů. Samci *I. typographus* tvoří agregační feromon ve střevě z prekurzorů hostitele (TITTIGER & BLOMQUIST 2016; GINZEL *et al.* 2006) nebo *de novo* tzv. mevalonátovou biosyntetickou cestou (GINZEL *et al.* 2006, LANNE *et al.*, 1988). Agregační feromon je atraktivní pro obě pohlaví a působí zvýšení hustoty populace kolonizujících brouků na daném hostiteli až do doby, kdy by další navýšení vedlo ke snížení potravy pro vyvíjející se novou generaci. Nadměrný počet kolonizujících brouků vede ke změně uvolňovaných těkavých látek z kolonizovaných stromů, která je charakterizována snížením produkce agregačního feromonu a nárůstem produkce

feromonů anti-agregačních (ipsdienol a verbenon) (SEYBOLD 1995, SCHLYTER 1987). To následně vede k rychlému poklesu nově kolonizujících brouků na daném stromě a k přesměrování jejich aktivity na stromy okolo stojící. Tyto změny chování jsou zprostředkovány smyslovými informacemi z čichových receptorů nacházejících se na tykadlech (GINZEL *et al.* 2006; LIEUTIER *et al.*; 2004).

V přírodních podmínkách je produkce feromonu zahajována žírem. Experimentálně je možno syntézu feromonu vyvolat aplikací juvenilního hormonu. (IVARSSON; BIRGERSSON 1995). Alternativně je možné pozorovat tvorbu agregačního feromonu u samců *I. typographus* po expozici k parám hostitelského stromu, zvláště  $\alpha$ -pinen a myrcen. (SEYBOLD *et al.* 1995, DICKENS 1981).

První agregační feromon kůrovce byl identifikován u *I. paraconfusus* jako směs ipsdienolu, ipsenolu a cis-verbenolu. Jednalo se také o první popsany vícesložkový hmyzí feromon. Strukturní podobnost mezi rostlinnými monoterpeny myrcen a  $\alpha$ -pinen a feromonovými složkami ipsdineol a verbenol inspiroval návrh, že kůrovci produkují svoje feromonové složky za pomoci hydroxylací prekurzorů hostitelů. Ke konci 80. a 90. let se začalo pochybovat o tom, že by složky terpenoidních feromonů kůrovce byly výhradně tvořeny pouze z hostitelských prekurzorů. Byers a Birgersson (1990) předložili důkazy, že ve stravě některých druhů kůrovců, nebylo dostatek myrcenu, aby odpovídalo množství produkovaného feromonu. Ivarsson a kol. (1993) dokázali, že kompaktin, statin, který inhibuje 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktázu (HMGR) v mevalonátové dráze, inhiboval produkci ipsdienolu a E-myrcenolu v *Ips duplicatus*, což poskytlo nepřímý důkaz pro biosyntézu *de novo*. Kompaktin také neinhiboval syntézu cis-verbenolu, to odpovídá tomu, že cis-verbenol pochází z  $\alpha$ -pinenu hostitelského stromu (TITTIGER & BLOMQUIST, 2016). Jako přímý důkaz toho, že kůrovci syntetizují monoterpenoidní feromony ipsdienol a ipsenol *de novo* prostřednictvím mevalonátové dráhy, bylo prokázání inkorporace <sup>14</sup>C-acetate a <sup>14</sup>C-mevalonolactone do obou složek u *I. pini* and *I. paraconfusus* (TITTIGER & BLOMQUIST, 2016). Dnes už víme, že většina složek kůrovcových feromonů je produkována *de novo*. Avšak u několik složek, včetně verbenolu, verbenonu a verbenenu a 1- a 2-heptanolu se stále předpokládá, že jejich produkce probíhá pomocí prekurzorů hostitelského stromu (TITTIGER & BLOMQUIST, 2016).



Obrázek 3: První identifikované feromonové složky kůrovce (*ipsdienol*, *ipsenol* a *verbenol*) (TITTIGER; BLOMQUIST 2016).

2-Methyl-3-buten-2-ol (MB) a (4S)-cis-verbenol (cV) jsou základními složkami agregačního feromonu *I. typographu*. Množství těchto dvou sloučenin v zadních střevcích je maximální, v průběhu prvních několika dní po zavrtání během hloubení snubní komůrky pod kůrou. Později, když se samci spáří a samice kladou vajíčka, množství produkovaného MB a cV podstatně klesají, zatímco dochází k navýšení tvorby ipsdienolu (Id) a ipsenolu (Ie) Id jako synergista a Ie jako inhibitor agregačního feromonu (SCHLYTER, 1987).

Schlyter (1987), ve své práci rozebírá dvě hypotézy, jak k regulaci hustoty dochází. Předpokládá, že regulace hustoty kolonizujících broků probíhá jedním nebo oběma mechanismy:

1. Kvantitativní hypotéza – kdy samci zpočátku kolonizují hostitele v závislosti na množství vylučovaných těkavých látek. Čím vyšší množství uvolněných agregačních feromonů, tím více samců se při kolonizaci od původního hostitele odkloní a soustředí se na napadení hostitelů v blízké vzdálenosti.
2. Kvalitativní hypotéza – po spáření se snižuje produkce agregačního feromonu samci a dochází k produkci vyššího množství látek, které snižují atraktivitu hostitele (inhibitorů, jako jsou verbenon a ipsenol). (SCHLYTER, 1987).

Z kvantitativní hypotézy vyplývají alespoň dvě předpovědi: 1. Brouci mezi zdroji rozlišují s různým množstvím uvolňování a samci v porovnání se samičkami by měli být přitahováni výrazně méně k vyšším množstvím. 2. Rozlišování by mělo být výrazné i přesto, že se zdroje od sebe nacházejí jen několik metrů. Z kvalitativní hypotézy vyplývá:

Přítomnost Ipsdienolu a Ipsenolu by měla, při vyšším vylučovaném množství, snížit počet přitahovaných brouků.

Chemické údaje od Birgersson et al. (1984) a biologické údaje od Schlytera (1986) a z výsledků této studie, byla nakonec navržena kombinovaná hypotéza. Jsou v ní zahrnuty jak kvantitativní, tak i kvalitativní mechanismy. Při vysokém množství MB a cV dochází k zahájení hromadného útoku a také se zvětšuje oblast útoku, jelikož mnoho samců skončí na sousedních stromech. Agregace se pak převádí do nových oblastí nebo na nové hostitele, jakmile dojde k výraznému poklesu MB a cV v kombinaci s nárůstem množství ispdienolu a ipsenolu a dalších možných látek.

## 1.7. Biosyntéza ve střevech

*I. typographus* při kolonizaci používá kombinaci dvou feromonových signálů. (agregační feromonový systém). Jako první, samci vylučují agregační feromon v nejvyšším množství, hned po napadení hostitele a láká tak další jedince stejného druhu a pomáhá se synchronizací útoku velkého množství jedinců. Poté co přiletí samičky, se jeho produkce pozvolně sníží (SCHLYTER *et al.* 1987). Druhým signálem je antiagregační feromon, kterým kůrovci regulují kolonizaci na hostiteli a přesměrovávají další jedince na okolní stromy. Tím zajišťují dostatek potravy pro všechny brouky (DVOŘÁKOVÁ *et al.* 2011). Jak kůrovci dokáží rozpoznat optimální hustotu zatím nebylo ukázáno, ale teorií je, že využívají různé smyslové signály (chemické, zvukové) (SCHLYTER *et al.* 1987). Hlavní agregační feromony *I. typographus* tvoří dvě komponenty - 2-methyl-3-buten-2-ol a cis-verbenol. Tyto sloučeniny jsou utvářeny v zadní části střev u samečků (SCHLYTER, 1987). S MB a cV byly ve střevě identifikovány i další sloučeniny, jako např. trans-verbenol, myrtenol, trans-myrtanol, 2-fenylethanol, ipsenol a ipsdienol (Schlyter et al. 1987). U kůrovců byla testována atraktivita těchto sloučenin, avšak atraktivita se prokázala pouze u MB a cV. Jiné látky neměly na účinnost feromonu žádný vliv (SCHLYTER *et al.* 1987). V pozdější fázi dochází k uvolňování antiagregačního feromonu verbenol, ipsdienol a ipsenol (SCHLYTER *et al.* 1987, DVOŘÁKOVÁ *et al.* 2011).

Pro každou z těchto látek je odlišná biosyntetická cesta. Konkrétně u *I. typographus* MB je tvořen ve střevech samců *de novo* mevalonátovou cestou, zatímco pro cV využívá hostitelský isoprenoid  $\alpha$ -pinen a hydroxyluje ho (DVOŘÁKOVÁ *et al.* 2011). U obou způsobů je však syntéza regulována různými vnitřními a vnějšími faktory. Syntézu může



ovlivňovat pohlaví, vývojové stádium, stáří brouků, jejich letová aktivita a žír v průběhu kolonizace hostitele (BLÁHA, 2019).

Nejvýznamnějším podnětem, ke stimulaci feromonové biosyntézy je žír, který poskytuje metabolické prekurzory a energetické zdroje pro syntézu feromonů. Žír je také významným signálem pro endokrinní regulaci syntézy (SEYBOLD *et al.* 2000) U *I. pini* bylo prokázáno, že žír stimuluje produkci JHIII a ten následně ovlivňuje hlavní regulační enzymy syntézy feromonu. Produkce JHIII je ovládána mozkiem kůrovce a to prostřednictvím neurohemálního orgánu Corpora cardiaca (CC) a endokrinní žlázou Corpora allata (CA) (BEARFIELD *et al.*, 2009)

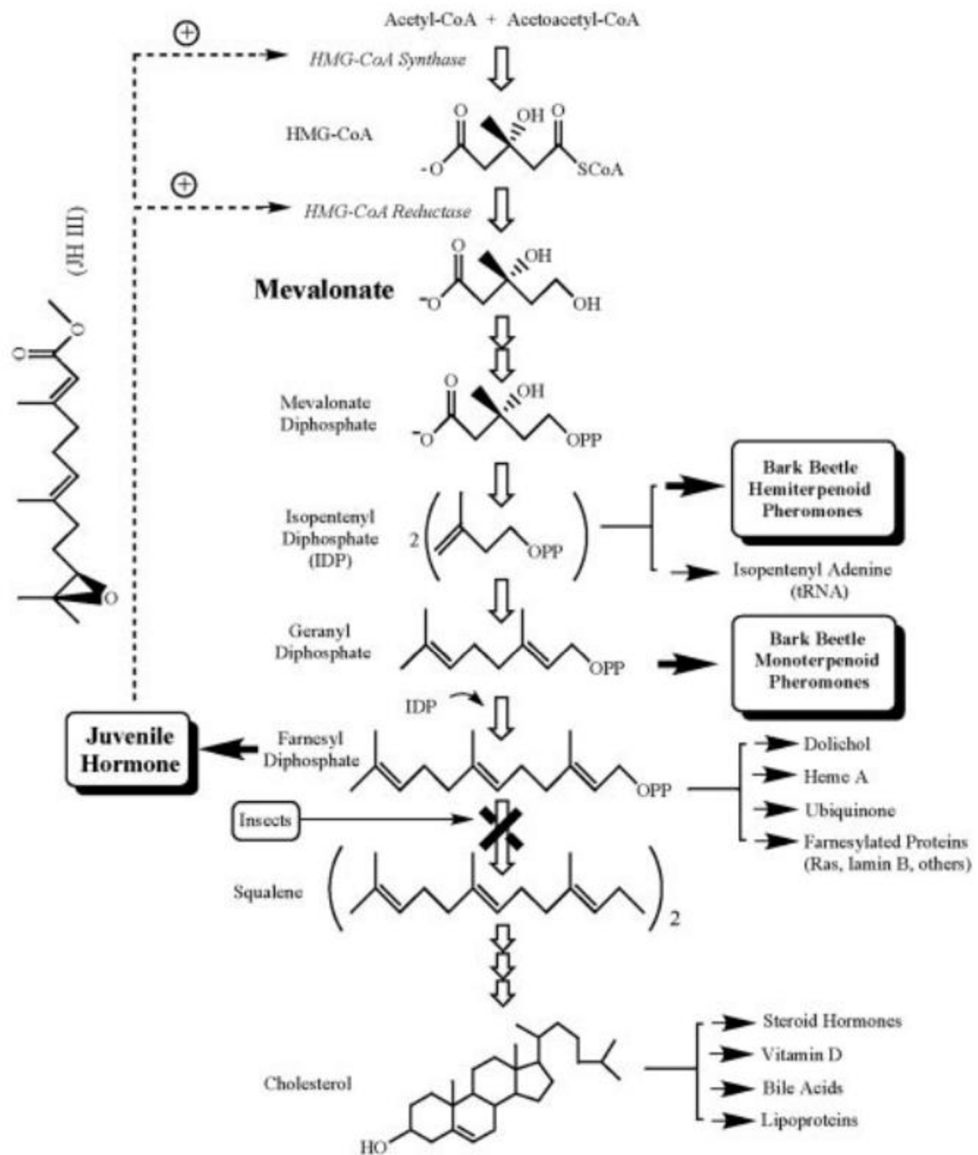
### **1.8. Mevalonátová dráha (de novo) a syntéza juvenilního hormonu u hmyzu**

Hmyz produkuje několik forem juvenilního hormonu (JH), jedná se o jedinečné sekviterpenoidní hormony, které regulují embryonální vývoj, potlačují metamorfózu a u většiny druhů hmyzu indukují syntézu vitellogeninu a produkci feromonů. Dosud bylo popsáno šest forem juvenilního hormonu. JHI - JHVI, přičemž typ JHIII je nejrozšířenějším typem juvenilního hormonu u hmyzu. Úplná odpověď na otázku, jak JH reguluje mevalonátovou cestu a tudíž feromonovou produkci zatím není známá (BELLÉS *et al.*, 2005).

Mevalonátová cesta je rozvětvená metabolická cesta, která je založena na reduktivní polymeraci acetyl-CoA, což vede k velké různosti isoprenoidních sloučenin. Pro vytvoření farnesyl difosfátu (klíčový enzym, který hraje důležitou roli při biosyntéze u hmyzu) jsou zapotřebí speciální homoisoprenoidové meziprodukty a enzymy. Úplná odpověď na otázku, jak hmyz obecně reguluje mevalonátovou cestu zatím není známá (BELLÉS *et al.*, 2005).

Endokrinní regulace produkce feromonů je pro kůrovce náročná a zdá se, že jejich produkce úzce souvisí s regulací JHIII a žírem. Je známo, že žír spouští biosyntézu feromonů, pravděpodobně pomocí stimulace CA, což vede k produkci JHIII. U některých druhů je přítomnost JHIII spouštěčem pro produkci feromonu (*I. duplicatus* a *I. pini*), u některých k tomu tak není (*I. confusus* a *I. paraconfusus*). Tato zjištění naznačují, že u některých druhů jsou důležité i jiné faktory, např. peptidový hormon (TITTIGER 2017).

Tato regulace je velmi zřetelná u některých kůrovců, jelikož regulace JHIII je dostačující pro stimulaci transkripce genů u mevalonátové cesty, ale to neplatí pro aktivitu kódovaných enzymů. Regulace produkce feromonů je složitá a proto je potřeba v budoucnu vytvořit další výzkumy, které mohou odhalit nové mechanismy.



Obrázek 4: Diagram mevalonátové cesty a biosyntézy juvenilního hormonu u hmyzu (Seybold 2003)

## 2. Materiál a metodika

### 2.1. Chov a sběr *I. typographus*

Chov brouků probíhal v chovné místnosti na fakultě lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze. Brouci byli získáváni ze školních lesních pozemků v Kostelci nad Černými lesy. Vybrané napadené stromy byly rozřezány na cca 50 cm dlouhé špalky, které se následně převezly do chladové místnosti, ve které byly uskladněny při teplotě 5 °C. Před experimenty byla napadená polena přemístěna do plastických kontejnerů v chovné místnosti se světelným režimem L:D, teplotou 24–26 °C a vlhkostí 52–60 %. Jakmile začali brouci vylétávat z polen (cca po 12 týdnech po přemístění), polena byla odkorněna a vylíhlí brouci byli taxonomicky rozřazeni. Pro chov bylo vybráno přibližně 100 jedinců *I. typographus*, kteří byli vypuštěni na nové poleno nenapadaného smrku umístěné v plastovém chovném boxu s větrací mřížkou a ventilací. Tímto se založila nová F1 generace brouků, která byla použita ve všech typech experimentů.

### 2.2. Typy provedených experimentů

Celkově byly provedeny následující typy experimentů:

1. Prvním z pokusů bylo porovnání obsahu feromonu ve střevech samců bez tykadel a s tykadly po přirozeném 3–denním žíru ve smrkovém poleni.
2. Druhým typem experimentů bylo porovnání obsahu feromonu ve střevech samců bez tykadel a s tykadly po aplikaci juvenilního hormonu.
3. Třetím typem experimentů bylo porovnání obsahu feromonu samců bez tykadel a s tykadly vystavených působení par prekurzorů ( $\alpha$ -pinen a myrcen)
4. Ve čtvrtém experimentu bylo porovnání obsahu feromonu samců bez tykadel a s tykadly u brouků vystavených nízké a vysoké koncentraci feromonu.

V každém typu experimentů bylo použito celkem 120 samců F1 generace: 60 s tykadly a 60 bez tykadel. Do doby extrakce střev byly brouci uskladněni v mrazícím boxu při teplotě (-80°C).

### 2.3. Výběr samců

Rozlišování se provádělo u živých brouků pomocí binokulární lupy při 30x zvětšení. Při uchopení brouka a natočení z boku lze pozorovat dvě různé rozlišovací metody. Použitá byla kombinace obou těchto metod. První metoda je založena na rozdílné hustotě chloupků na pronotu. Samička má na pronotu mnohem větší hustotu chloupků (průměrně 301 na 1 mm<sup>2</sup>) než sameček (průměrně 186 chloupků na 1 mm<sup>2</sup>). U této metody je určení pohlaví s přesností 98,5 %, proto se při určování rozhoduje hlavně podle ní (SCHYLER & CEDERHOLM, 1981). Druhá metoda se zaměřuje na rozdílnou velikost čelního hrbolku. U samičky je hrbolok podstatně menší a jeho nástup je pozvolný. U samců je hrbol větší a vystupuje téměř kolmo nahoru. Tato metoda je více méně doplňující, jelikož není tak přesná a spolehlivá, ale kombinací obou metod se dosahuje téměř stoprocentních výsledků. Kontrola přesnosti je pak provedena při extrakci střev, kdy dojde k vypreparování sklerotizovaného penisu samečka (BLÁHA, 2019).



Obrázek 5- 6: Porovnání hustoty chloupků na pronotu u samce (vlevo) a samičky (vpravo) (Canadian Journal of Arthropod Identification)

### 2.4. Odstranění tykadel

Odstranění tykadel bylo provedeno bezprostředně před konkrétním experimentem za pomoci binokulární lupy (OLYMPUS SZ61) s 30x zvětšením a pinzety.

### 2.5. 3-denní žír a aplikace JHIII

Prvním z pokusů bylo porovnání obsahu feromonu ve střevech samců bez tykadel a s tykadly po 3–denním žíru ve smrkovém poleni. Obě porovnávané skupiny brouků (intaktní a bez tykadel) byli přeneseni na smrková polena v plastových boxech a po 3 dnech žíru byli z polen vyloupani a sesbíráni. Hned poté se živí kůrovci rozdělili do 2

skupin (intaktní a bez tykadel) po 10 broucích pro 3 opakování. Skupiny se poté odděleně vložili do plastových vialek a do mrazícího boxu (-80°C), do doby extrakce střev.

U druhého pokusu se porovnával obsah feromonu ve střevech samců bez tykadel a s tykadly, po aplikaci JHIII. Pro pokus bylo použito celkem 120 brouků. Brouci byli rozděleni do 4 skupin: 30 intaktních samců, kterým byl aplikován juvenilní hormon; 30 intaktních samců ošetřených pouze rozpouštědlem; 30 samců bez tykadel, ošetřených juvenilním hormonem a 30 samců bez tykadel ošetřených pouze rozpouštědlem (viz. tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled skupin brouků

Skupiny	Intaktní brouci	Brouci bez tykadel
JH III	3 opakování po 10 broucích	3 opakování po 10 broucích
Aceton (kontrolní brouci)	3 opakování po 10 broucích	3 opakování po 10 broucích

Při aplikaci JH a rozpouštědla byly použity následující pomůcky a chemikálie: Binokulární lupa (OLYMPUS SZ61), pinzety, filtrační papír, injekční stříkačka (Hamilton o celkovém objemu 1 ul), stojan, Petriho misky, vata, aceton (PESTINORM SUPRA TRACE, VWR CHEMICALS), juvenilní hormon III. (JH III SIGMA 10mg/0,5ml).

Pro každou skupinu byl aplikován buď aceton, jako rozpouštědlo (0,5 µl acetonu) nebo JHIII rozpuštěný v acetonu (0,5 µl roztoku JH v acetonu – koncentrace 10mg/0,5ml). Aplikace probíhala pod binokulární lupou se 30x zvětšením pomocí injekční stříkačky. Po ošetření byla každá jednotlivá skupina uzavřena do Petriho misek se zvlhčenou vatou a po dobu 19 hodin se nechala v odděleně uzavřených polystyrenových boxech při pokojové teplotě inkubovat. Po inkubaci se živí brouci vložili podle jednotlivých skupin do plastových vialek, mrazícího boxu (-80°C) a do doby extrakce střev.

## 2.6. Hostitelské prekurzory a feromon

U třetího pokusu se porovnával obsah feromonu ve střevech samců bez tykadel a s tykadly vystavených po dobu 24 hodin působení par po aplikaci 1  $\mu$ l jednoho ze dvou hostitelských prekurzorů ( $\alpha$ -pinen; SIGMA ALDRICH 98% čistota, myrcen; SIGMA ALDRICH 98% čistota). (KLIMETZEK & FRANCKE, 1980). Po uplynutí této doby živí kůrovci byli skladováni v mrazícím boxu (-80°C), do doby extrakce střev.

U čtvrtého typu pokusu jsme studovali vliv expozice brouků ke 2 různým hladinám feromonu. Průměrná hodnota množství produkovaného feromonu samce během prvních dnů kolonizace je 100  $\mu$ g/denně MB a 1-2  $\mu$ g/denně cV (SCHLYTER 1987). Pro naše expoziční experimenty jsme vybrali koncentrace odpovídající 10 a 100 BE (beetle equivalentů) feromonu. Před vlastním experimentem jsme připravili zásobní roztok feromonu (poměr MB:cV = 50:1) (ACROS ORGANICS 2-Methyl-3-buten-2-ol 97%; Aldrich cV 95%). Jelikož je MB těkavá látka a cV tuhá, byl roztok připraven navážením 2,38 mg cV do vialky a poté byl přidán 1 ml parafinového oleje. Teprve až po rozpuštění cV se napipetovalo 29  $\mu$ l MB, který byl následně přidán do vialky. Tento zásobní roztok má odpovídal cca 1000 BE/10  $\mu$ l. Pro roztok 1 (odpovídající 100 BE/10  $\mu$ l) bylo použito 100  $\mu$ l zásobního roztoku a 0,9 ml přidaného parafinového oleje. Pro roztok 2 (odpovídající 10 BE/10  $\mu$ l) bylo přidáno 0,9 ml parafinového oleje do roztoku 1.

Experiment byl zahájen aplikací 1  $\mu$ l feromonových roztoků o různé síle na filtrační papír v Petriho miskách. Poté byli do Petriho misek vloženi brouci a byli exponováni feromonu po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Poté byli brouci podle jednotlivých skupin uschováni v plastových vialkách v mrazícího boxu (-80°C) do doby extrakce střev.

## 2.7. Extrakce střev

Při extrakci střev byly použity následující chemikálie a pomůcky: Binokulární lupa (OLYMPUS SZ61), pinzety, filtrační papír, vialka s vnitřním insertem, vialka, pipeta (90 mikrolitrů), suchý led, hexan (PESTINORM, Min. 99%, for GC – capillary grade) – jako rozpouštědlo (90 mikrolitrů), bromododekan – jako interní standard.

Kůrovci byli narkotizováni chladem. Extrakce probíhala pod binokulární lupou se 30x zvětšením. Za pomoci špendlíku jim byla rozevřena křídla a následně se pomocí pinzety pod špičkou zadečku vypreparovalo střevo. Při extrakci se zároveň zkontrolovalo pohlaví, a to inspekcí přítomnosti penisu. Střevo byla poté vložena do předem připravených skleněných 2ml chromatografických vialek s vnitřní skleněnou konickou

vložkou (insertem) (200 mikrolitrů). Uvnitř insertu bylo připraveno 90 mikrolitrů hexanu. Vialky při manipulaci musely být skladovány na suchém ledě z důvodu vysoké těkavosti hexanu a MEBU.

Vialky se střevy byly uchovány v lednici 48 hodin. Po této době bylo rozpouštědlo (hexan) s rozpuštěnými feromony odsáto za pomoci pipety od zbytku střev. K odsátému extraktu se ještě přidalo 10 mikrolitru interního standardu roztoku bromododekanu o koncentraci 20 mikrogramů na mililitr hexanu. Hned tentýž den se vzorky analyzovaly za pomoci plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

## **2.8. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí**

Plynová chromatografie je metoda používaná k dělení a stanovení kapalin, plynů či pevných látek s bodem varu okolo 400 °C. Při vyšších teplotách hrozí rozklad látek. Rozdělení složek probíhá mezi dvěma fázemi, fáze mobilní a fáze stacionární. Stacionární fáze je nanášena na vnitřní stěny chromatografické kapilární kolony, kterou pak prochází nosní plyn (helium, vodík nebo dusík), který slouží jako mobilní fáze. Nosný plyn by měly být dostatečně čisté (99,9995 %). Volba plynu záleží na tom, jaká rychlost analýzy bude zvolena. Jedna část vzorku je poté vstříkována do vyhřívaného injektoru. Dvě části vzorku jsou poté odfouknuty pryč. Množství vzorku se pohybuje většinou od 0,1–0,2 ul. Vzorek se dále v injektoru odpaří a formou par je za pomoci nosného plynu unášen do kolony. Na začátku kolony se složky ze vzorku se nejprve sorbují na stacionární fázi a poté se desorbují nosným plynem. Tento proces se stále opakuje, až do doby, kdy se složky ze vzorku dostanou za až na konec kolony. Každá složka vzorku postupuje kolonou rychlostí závislou distribučních konstantách ve stacionární a mobilní fázi. Rozdělené látky opouští kolonu v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant. Látky jsou dále detekovány a identifikovány v MS detektoru, který umí reagovat na koncentraci látek v nosném plynu.

Od nástřiku vzorku je v MS detektoru neustále registrován jeho signál a vzniká grafický záznam v podobě chromatogramu, závislý na signálu detektoru a čase. Na ose y je zaznamenána odezva neboli intenzita detektoru a na ose x je zaznamenán čas. Každou z látek charakterizuje chromatografický pík, tvaru Gaussovy distribuce. Podle polohy píku lze identifikovat látku. Plocha a výška píku je úměrná množství látky ve vzorku. Pík popisují tři parametry: retenční čas  $t_R$ , výška píku  $h$  a šířka píku, která je měřená buď

na základní linii  $w_d$  nebo v polovině výšky píku  $w_h$  (PODEHRADSKÁ & VOZŇÁKOVÁ, 1997).

## 2.9. MS detektor

Detektor hmotnostní spektrometrie je iontově optické zařízení, v němž dochází k separaci nabitých částic ze směsi plyných molekul (iontů). Látky vstupují do detektoru a jsou nejdříve ionizovány a poté jsou tyto nabitě částice odděleny podle jejich efektivních hmot ( $m/z$ ). Na základě hmotnosti iontů a vztahu mezi molekulárními a fragmentačními ionty lze mluvit o identitě všech analyzovaných látek. Hmotnostní spektrum a jeho charakter závisí na postupu zavedení vzorku do detektoru, podmínkách a způsobu ionizace, uspořádání analyzátorů iontů a způsobu registrace iontů. MS je velmi často využíván spolu s plynovou chromatografií. (Podehradská & Vozňáková 1997).

## 2.10. Chromatografická analýza

Analýza střev byla provedena jednorozměrnou plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (GC-TOF-MS) dvourozměrným plynovým chromatografem Agilent 7890 B, který byl vybaven kapilárními kolonou (DB – WAX UI: 15m x 0,25mm x 0,25  $\mu$ m) a hmotnostním spektrometrickým detektorem s rychlým sběrem dat a s analyzátozem doby letu TOF Pegasus 4 D (Leco Corporation, USA). Nástřik se provedl při teplotě 20°C se splitovacím poměrem 1:3 do injektoru o teplotě 275 °C (vyhřáto rychlostí 8°C/s). Teplotní program 1 D peci byl na začátku 40 °C, poté se pec postupně zahřívala každou minutu o 10 °C, dokud nedosáhla teploty 210 °C. Od této hodnoty se poté opět postupně ohřívala o 20 °C každou minutu, dokud nedosáhla konečné hodnoty 320 °C. Tato hodnota byla nastavena po dobu 6 minut. Nosným plynem bylo helium, jehož průtok byl 1 ml/min. Teplota při přenosné linky plynu byla 280°C. Energie ionizace u detektoru hmotnostní spektrometrie byla nastavena na -70 eV. Hmotnostní rozsah byl 35-500  $m/z$ . Celková doba analýzy byla 30 minut a aktivizační rychlostí 10 spekter/s. Doba zpoždění rozpouštědla byla 480 s. Celková teplota iontového zdroje byla 250 °C.

## 2.11. Kvantifikace

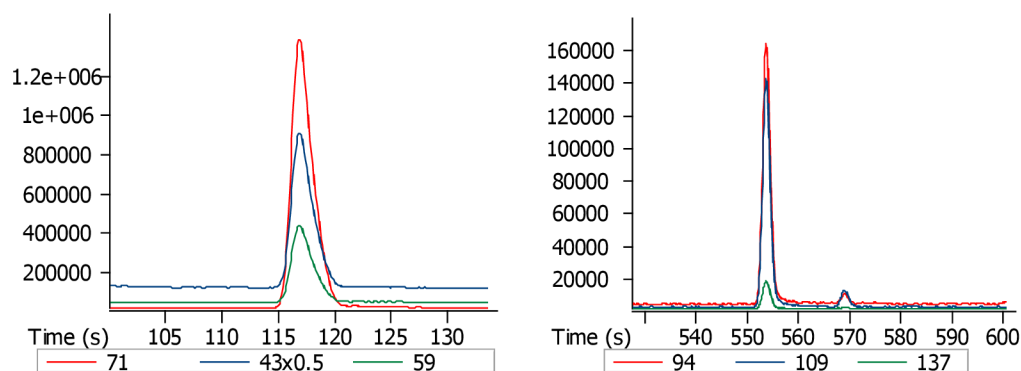
Při kvantifikaci se napřed provedla identifikace látky (MB, cV). Poté se u již identifikované látky nařadila série koncentrací (například 1pg – 1 $\mu$ g/ $\mu$ l) a ty byly za pomoci GC-MS změřeny. Software, používaný k vyhodnocování, byl využit ke změření plochy píků jednotlivých koncentrací. Následně byl na závislosti této plochy a



koncentraci vytvořen graf. Plocha námi zjištěné látky byla dále změřena a odečtena z koncentrace z kalibrační křivky za pomoci softwaru.



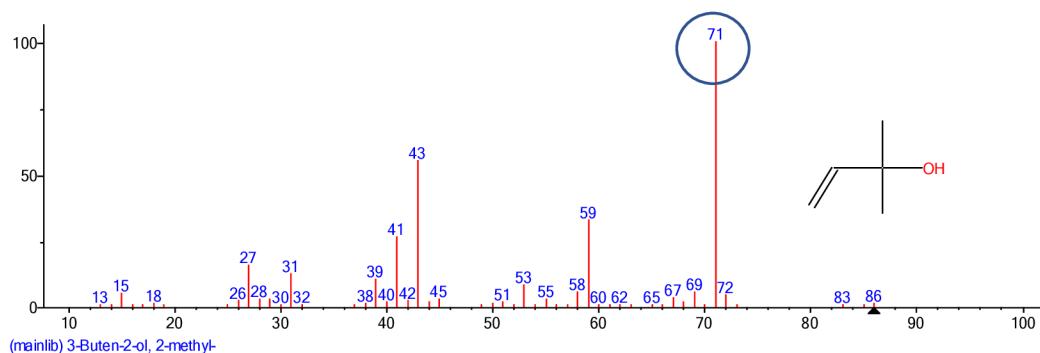
Obrázek 7: Dvojměrný plynový chromatograf Agilent 7890 B s hmotnostním spektrometrickým detektorem TOF Pegasus 4D (Leco Coporation, USA) s automatickým ramenem pro nástřik vzorků (vlastní zdroj)



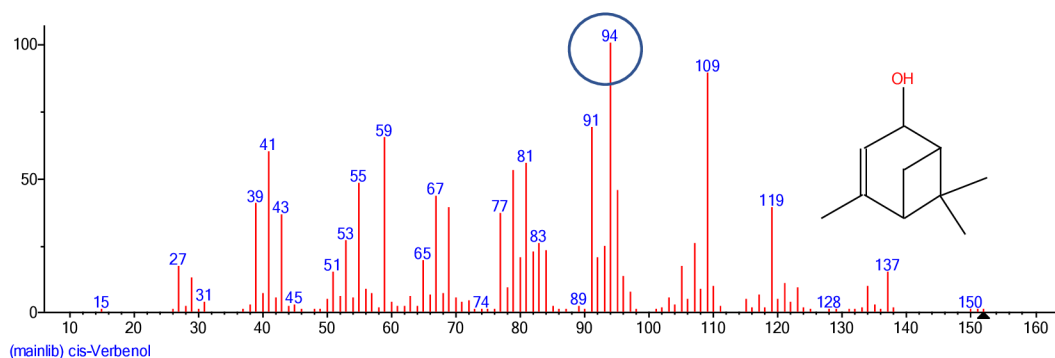
Obrázek 8-9: Překryv XIC ( $m/z$  71;  $m/z$  94) chromatogramů znázorňujících ukázkou poměru vybraných hmot v syntetických standardech. Vlevo pro MB, vpravo pro cV. Na ose x je znázorněn retenční čas a na ose y je znázorněna intenzita iontu.

Kvantifikace byla provedena na základě výskytu a intenzitě charakteristických iontů pro jednotlivé komponenty feromonu. Zatímco MB má typické charakteristické ionty 71 a 59, cV je charakterizován ionty 94, 109 a 107.

Na doplňujícím obrázku jsou znázorněna hmotnostní spektra MB a cV. Pro MB je zobrazen charakteristický iont ( $m/z$ ) 71, zatímco pro cV je to iont 94. Tyto charakteristické fragmenty jsou označeny modrým kruhem.



Obrázek 10: Hmotnostní spektrum MB s vyznačeným základním píkem (fragment označený modrým kruhem). V pravé části obrázku je vykreslena struktura MB. Na ose x je znázorněna hmotnost fragmentů, na ose y jejich intenzita.



Obrázek 11: Hmotnostní spektrum cV s vyznačeným základním píkem (fragment označen modrým kruhem). V pravé části obrázku je vykreslena struktura cV. Na ose x je znázorněna hmotnost fragmentů, na ose y jejich intenzita.

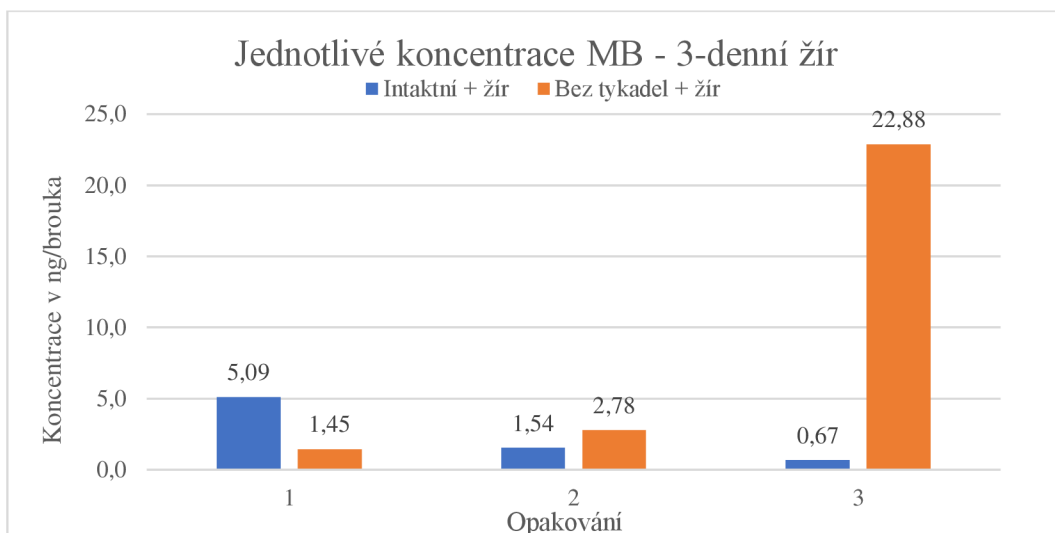
### 3. Výsledky

V předchozích experimentech bylo prokázáno, že u brouků po zažrání i u brouků po aplikaci JH, dochází ke zvýšené produkci MB i cV. Analýza GC-TOF-MS neprokázala, že by tomu tak bylo. Analýza také neprokázala, že brouci s tykadly produkují méně feromonu v porovnání s brouky bez tykadel. Následující grafy a tabulky ukazují porovnání jednotlivých hodnot MB a cV a konkrétní hodnoty u brouků s tykadly a bez tykadel. Identifikace sloučenin byla provedena na základě shody retenčních časů a hmotnostních spekter látek ve vzorku, s retenčním časem se syntetickými standardy, které také byly použity pro kvantitativní analýzu. Dva chromatogramy jsou zobrazeny v modu Extracted-ion chromatogram (XIC) a zobrazují vlastnosti dané hmotnosti ( $m/z$ ) a její rozsah hmotnosti jako funkci času.

Tabulky (kvantifikace feromonů) uvádějí hodnoty odečtené z kalibračních křivek látek MB a cV. Plochy píků byly odečteny z chromatogramů, zobrazených za pomoci charakteristických iontů pro jednotlivé látky (71 pro MB a 94 pro cV). Hladiny detekce pro různé látky jsou odlišné, protože jejich detekce působí s rozdílnou citlivostí. Hodnoty v tabulce pod LCQ, znamenají v případě MB, že je obsah menší než 0.6 ng, v případě cis-verbenolu je obsah menší než 1,5 ng.

#### 3.2. Kvantifikace feromonové produkce u brouků po 3–denním žíru

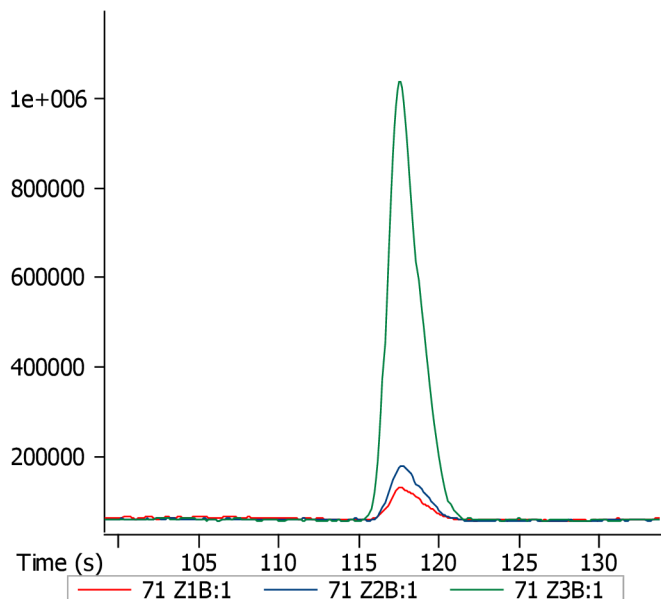
V prvním pokusu se analyzovaly střeva u brouků bez tykadel a brouků intaktních po 3–denním žíru na smrkovém polenu. V tomto pokusu došlo v prvním opakování ke zvýšení MB spíše u brouků intaktních (5,09 ng/brouka). Ve třetím opakování byla naměřena vychylující se extrémní hodnota (22,88 ng/brouka). Hodnoty cV produkovaného brouky nebyly kvantifikovány z důvodu malého množství, které je pod limitem kvantifikace. Z důvodu dvou nadhodnocených výsledků, byl pro výpočet průměrných hodnot zvolen medián, místo aritmetického průměru. Překryv XIC ( $m/z$  71) chromatogramů nám na obrázcích 13 a 14 znázorňuje množství MB v intenzitě iontů v určitém retenčním čase. Pro lepší přehled výsledků byl také zvolen sloupcový graf. Na obrázku 12 je vidět poměr jednotlivých koncentrací MB po 3-denním žíru. V tabulce 2 se nachází průměrné hodnoty koncentrace v ng/brouka.



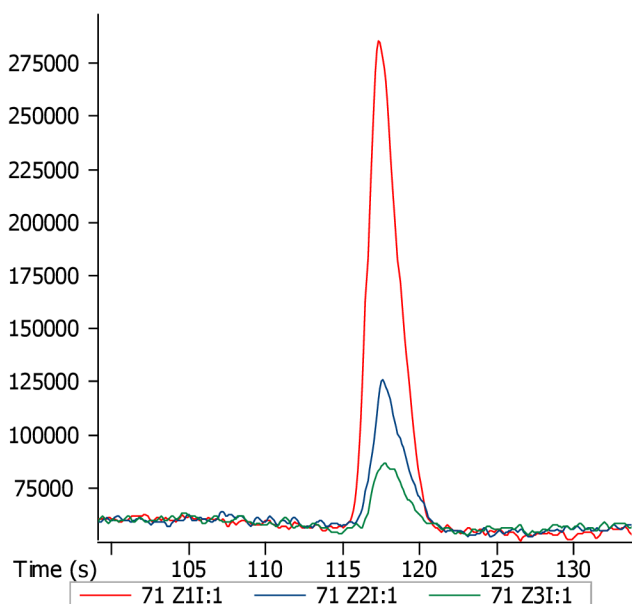
Obrázek 12: Sloupcový graf zobrazující koncentrace MB v extraktech střev brouků po 3-denním žíru (Hodnoty 1,2,3 představují jednotlivé extrakty z 10 brouků – replikace) (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).

Tabulka 2: Průměrná kvantifikace MB a cV v extraktech střev brouků srovnávaných kategorií (bez tykadel x s tykadly). Pro výpočet hodnot byl zvolen medián.

Průměrná hodnota koncentrace v ng/brouka		
Vzorek	MB	cV
	koncentrace v ng/brouka	koncentrace v ng/brouka
Intaktní + žír	1,5	≤ 1,5
<b>Bez tykadel + žír</b>	<b>2,8</b>	<b>≤ 1,5</b>
Odhad LCQ (ng na brouka)	0,6	1,5



Obrázek 13: Překryv XIC ( $m/z$  71) 3 chromatogramů znázorňujících množství MB v extraktech střev **brouků bez tykadel** po 3–denním žíru. Na ose  $x$  je znázorněn retenční čas a na ose  $y$  je znázorněna intenzita iontu 71. Hodnoty Z1B, Z2B a Z3B znázorňují jednotlivé replikace).

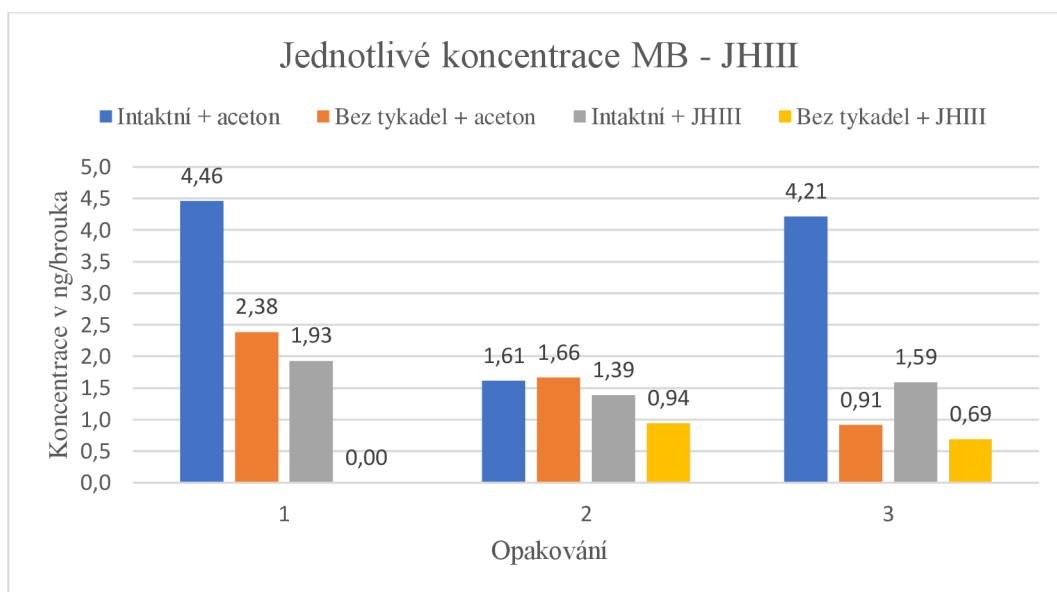


Obrázek 14: Překryv XIC ( $m/z$  71) 3 chromatogramů znázorňujících množství MB v extraktech střev brouků **intaktních** po 3–denním žíru. Na ose  $x$  je znázorněn retenční čas a na ose  $y$  je znázorněna intenzita iontu 71. Z1I, Z2I a Z3I reprezentují jednotlivé replikace).

Srovnání obrázku 13 a 14 ukazuje, že po 3–denním žíru je tvorba MB vyšší ve střevech brouků bez tykadel než u brouků s tykadly. Tento výsledek je ve shodě s předpokladem. cV byl pod hranicí pro kvantifikaci, což je v rozporu s předpokladem.

### 3.3. Kvantifikace feromonových komponent po aplikaci JHIII

Ve druhém pokusu, byl analyzován obsah střev u brouků s tykadly a bez nich po ošetření JHIII. Z předchozích pokusů (Veronika Hammerová CZU FLD BP 2020) a odborné literatury byl předpoklad výsledků následující: 1. Po aplikaci JHIII by brouci měli produkovat pouze MB (*de novo*); 2. Produkce MB po aplikaci JHIII bude výrazně vyšší u brouků bez tykadel, podobně jako tomu bylo v experimentech v bakalářské práci. Množství MB v extraktech střev bylo u všech skupin brouků naměřeno, avšak největší hodnoty byly pozorovány u brouků intaktních po aplikaci acetonu (průměrná hodnota 3,4 ng/brouka). Nejmenší koncentrace byly naměřeny u skupin bez tykadel s aplikací JHIII. Hodnoty cV produkovaného brouky nejsou uvedeny, z důvodu malého množství, které se nachází pod limitem kvantifikace. Obrázek 15 znázorňuje poměr jednotlivých koncentrací MB pro každou skupinu a opakování. V tabulce 3 se nachází průměrné hodnoty koncentrace v ng/brouka. Pro jejich statistické znázornění byl použit aritmetický průměr.



Obrázek 15: Sloupcový graf zobrazující koncentrace MB v extraktech střev porovnávaných kategorií brouků (intaktní a bez tykadel) po aplikaci acetonu (kontrola) a JHIII (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).

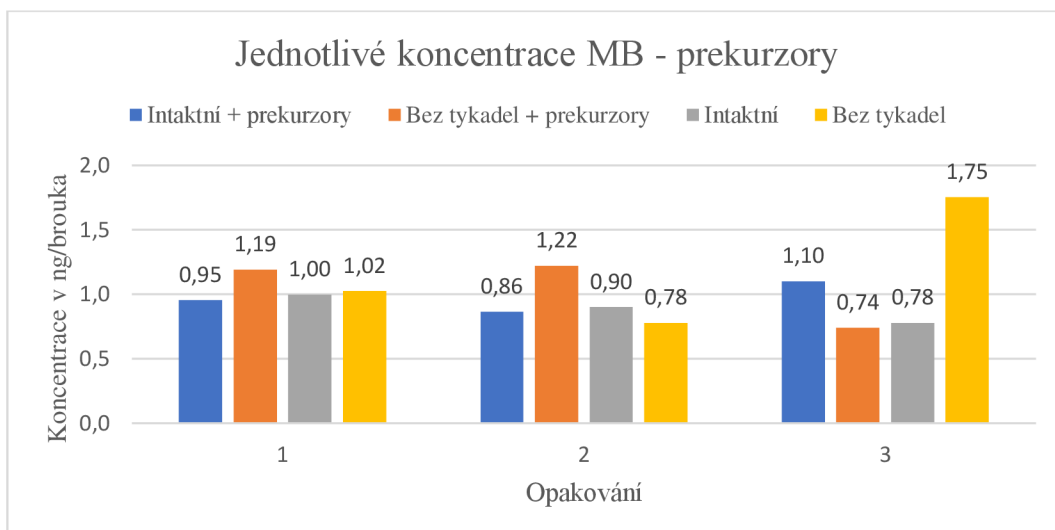
Tabulka 3: Průměrná kvantifikace MB v extraktech střev porovnávaných kategorií brouků (bez tykadel a intektních) po aplikaci acetonu (kontrola) a JHIII. Pro výpočet hodnot byl zvolen aritmetický průměr.

Průměrná hodnota koncentrace v ng/brouka		
Vzorek	MB	cV
	koncentrace v ng/brouka	koncentrace v ng/brouka
Intaktní + aceton	3,4	≤ 1.5
<b>Bez tykadel + aceton</b>	1,7	≤ 1.5
Intaktní + JHIII	1,6	≤ 1.5
<b>Bez tykadel + JHIII</b>	0,5	≤ 1.5
Odhad LCQ (ng na brouka)	0,6	1,5

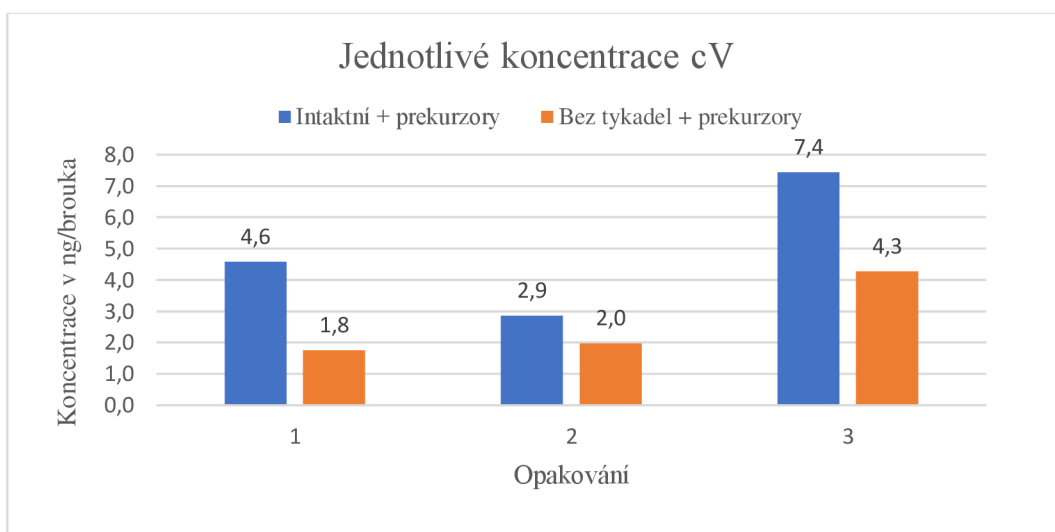
Obrázek 15 ukazuje, že po aplikaci JHIII je tvorba MB vyšší ve střevech u brouků s tykadly. Tento výsledek je v rozporu s předpokladem. cV byl pod hranicí pro kvantifikaci.

### 3.4. Kvantifikace feromonových komponent v experimentech s expozicí brouků hostitelským prekurzorům

U třetího pokusu se analyzoval obsah střev u brouků s tykadly a bez nich po ošetření prekurzory. Předpokladem byla vyšší produkce MB a cV u ošetřených brouků. Nejvyšší hodnoty koncentrace MB byly naměřeny u brouků bez tykadel. Koncentrace cV měla nejvyšší hodnoty u brouků intaktních. Na obrázku 16 je zobrazen poměr jednotlivých koncentrací MB pro každou skupinu. Na obrázku 17 jsou znázorněny poměry jednotlivých koncentrací cV pouze u skupin s aplikovanými prekurzory. V tabulce 4 jsou zapsány průměrné hodnoty koncentrace v ng/brouka. Pro jejich statistické znázornění byl použit aritmetický průměr.



Obrázek 16: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace MB v extraktech střev srovnávaných kategorií brouků (intaktní a bez tykadel) po vystavení parám hostitelských prekurzorů alfa-pinenu a myrcenu. (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).



Obrázek 17: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace cV v extraktech střev srovnávaných kategorií brouků (intaktní a bez tykadel) po vystavení parám hostitelských prekurzorů alfa-pinenu a myrcenu. (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).



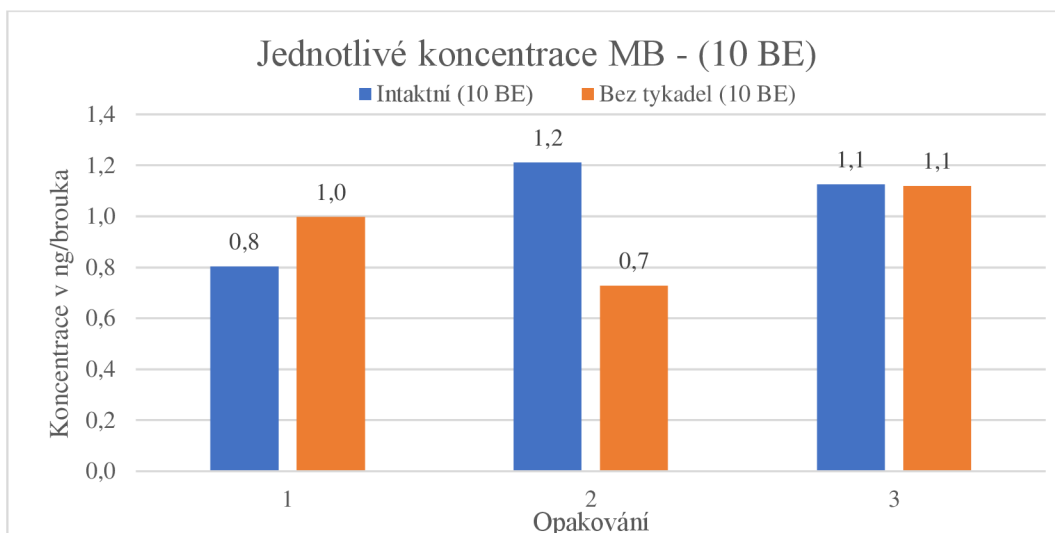
Tabulka 4: Průměrná kvantifikace MB a cV v extraktech střev srovnávaných kategorií brouků (intaktní a bez tykadel) po expozici parám hostitelských prekurzorů alfa-pinenu a myrcenu). Pro výpočet hodnot byl zvolen aritmetický průměr

Průměrná hodnota koncentrace v ng/brouka		
Vzorek	MB	cV
	koncentrace v ng/brouka	koncentrace v ng/brouka
Intaktní + prekurzory	1,0	5,0
<b>Bez tykadel + prekurzory</b>	1,0	2,7
Intaktní	0,9	≤ 1.5
<b>Bez tykadel</b>	1,2	≤ 1.5
Odhad LCQ (ng na brouka)	0,6	1,5

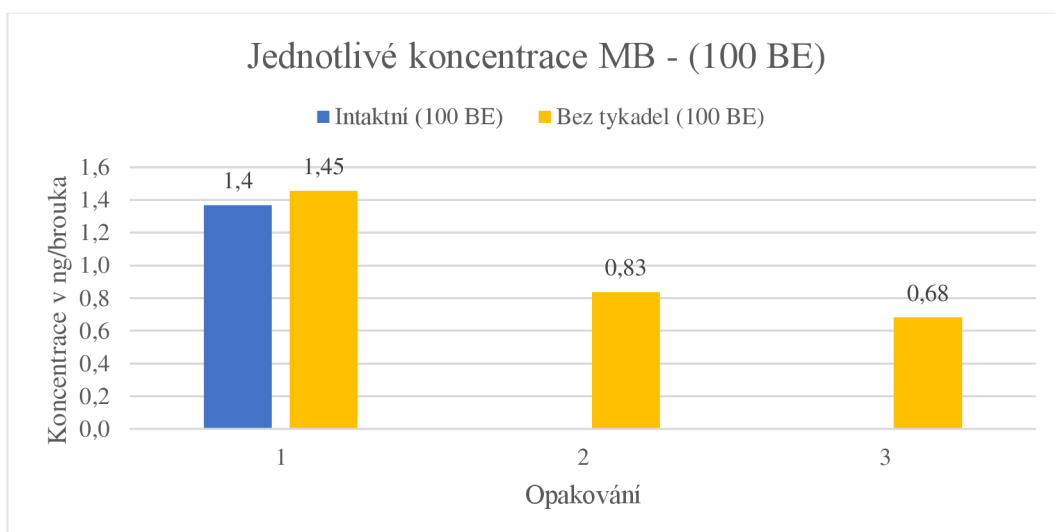
Obrázky 16 a 17 ukazují, že po expozici hostitelských prekurzorů je tvorba MB stejná ve střevech brouků bez tykadel i u brouků s tykadly. Tento výsledek je v rozporu s předpokladem. cV byl produkován pouze u brouků vystavených hostitelským prekurzorům, což je ve shodě s předpokladem.

### 3.5. Kvantifikace feromonových komponent po expozici k feromonům

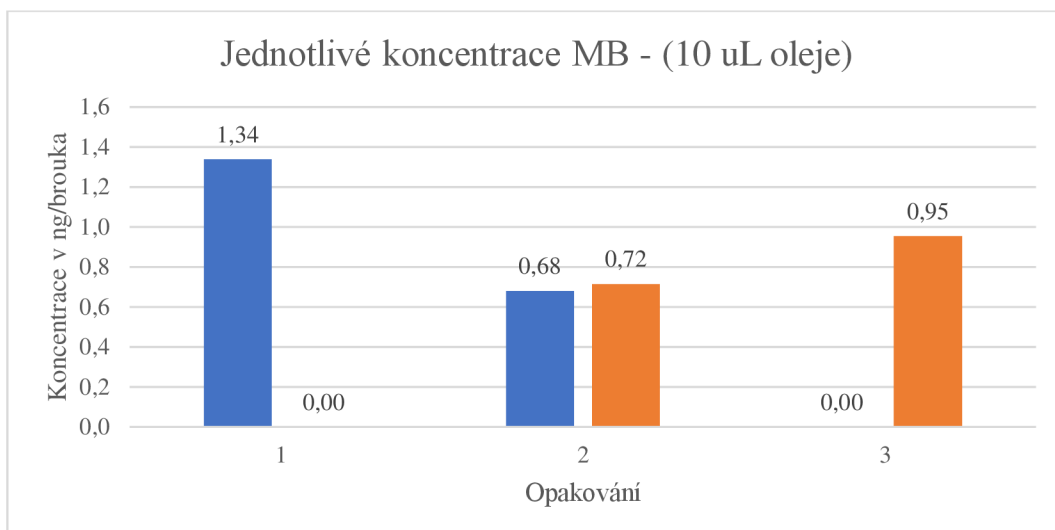
V posledním pokusu byl analyzován obsah střev u brouků bez tykadel a intaktních po aplikaci feromonu. Aplikací prekurzorů byla předpokladem i produkce cV. Pro porovnání byla provedena kontrola. Nejvyšší koncentrace MB byla naměřena u brouků intaktních s koncentrací feromonu odpovídající 100 BE (broučí ekvivalent). Nejvyšší hodnoty cV byly naměřeny u brouků bez tykadel s koncentrací feromonu odpovídající 100 BE. Následující obrázky zobrazují poměry hodnot. V tabulce 5 jsou zapsány průměrné hodnoty koncentrace v ng/brouka. Pro jejich statistické znázornění byl použit aritmetický průměr a medián.



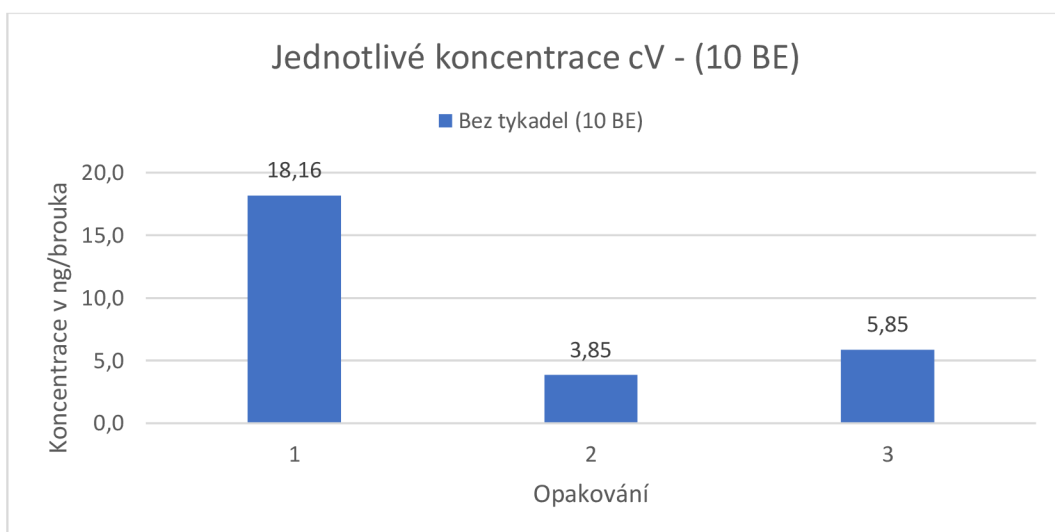
Obrázek 18: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace MB v extraktech střev brouků porovnávaných kategorií (intaktních a bez tykadel) po expozici feromonu (10 BE). (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).



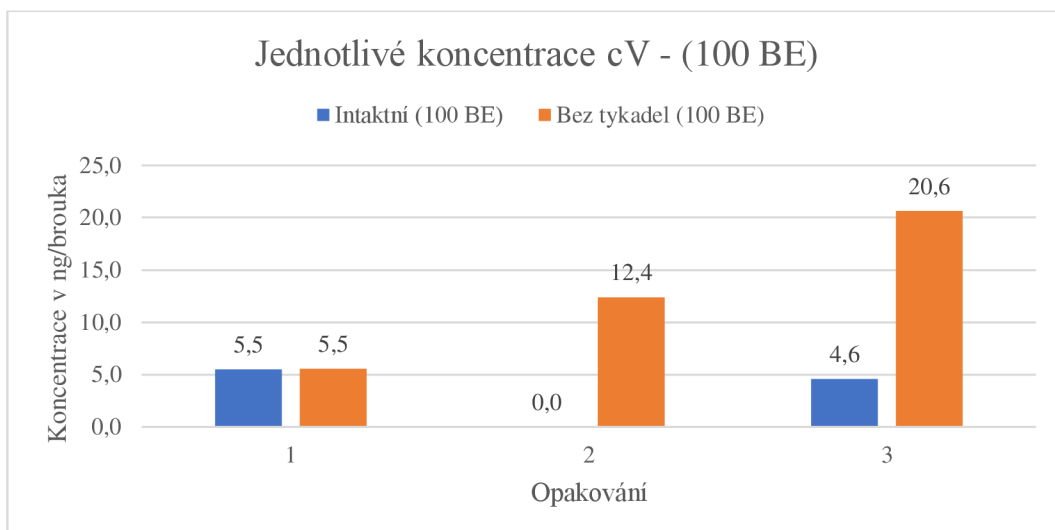
Obrázek 19: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace MB ve střevech brouků srovnávaných kategorií (intaktní a bez tykadel) po vystavením působení feromonu (100 BE) (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků). Zbývající hodnoty u opakování 2 a 3 jsou pod limitem kvantifikace.



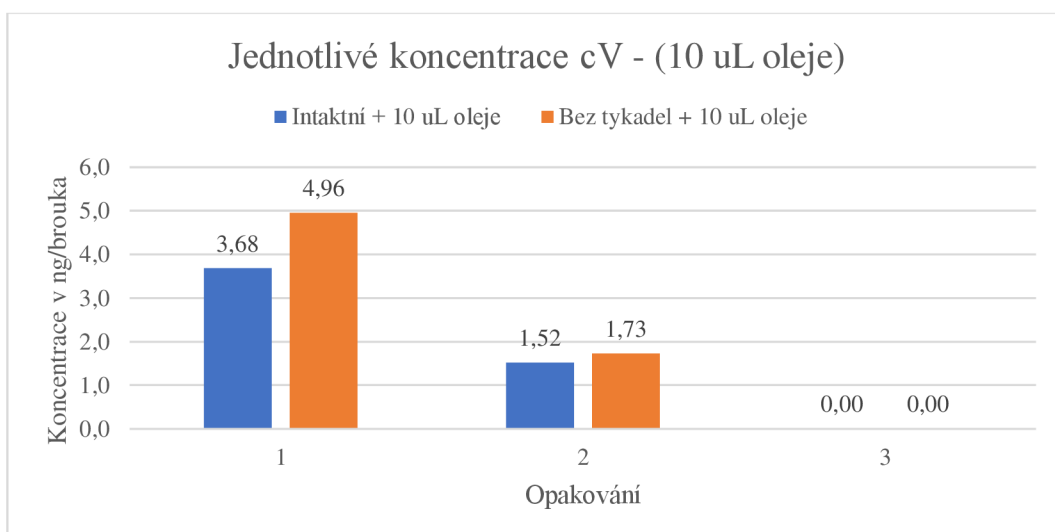
Obrázek 20: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace MB v extraktech střev brouků srovnávaných kategorií (intaktních a bez tykadel) v kontrolním experimentu po aplikaci 10  $\mu$ L oleje (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).



Obrázek 21: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace cV ve střevech brouků srovnávaných kategorií (bez tykadel) vystavených působení feromomu (10 BE). (Hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty cV ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků)(cV u brouků intaktních byl pod limitem kvantifikace).



Obrázek 22: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace cV v extraktech střev srovnávaných kategorií brouků (intaktní a bez tykadel) vystavených působení feromonu (100 BE) (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty cV ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).



Obrázek 23: Sloupcový graf zobrazující jednotlivé koncentrace cV ve střevech brouků srovnávaných kategorií (intaktní brouci x brouci bez tykadel) v kontrolním experimentu (po aplikaci 10  $\mu$ L oleje) (hodnoty 1,2,3 jsou hodnoty MB ve 3 extraktech, každý z 10ti brouků).

Tabulka 5: Průměrná kvantifikace MB a cV ve střevech brouků všech srovnávaných kategorií (intaktní x bez tykadel exponovaných působení 10 a 100 BE feromonu). Pro výpočet hodnot byl zvolen aritmetický průměr.

Průměrná hodnota koncentrace v ng/brouka		
Vzorek	MB	cV
	koncentrace v ng/brouka	koncentrace v ng/brouka
Intaktní (10 BE)	1,0	≤ 1,5
<b>Bez tykadel (10 BE)</b>	0,9	5,8
Intaktní (100 BE)	1,4	5,0
<b>Bez tykadel (100 BE)</b>	1,0	12,9
Intaktní + 10 uL oleje	0,7	1,8
<b>Bez tykadel + 10 uL oleje</b>	0,6	3,3
Odhad LCQ (ng na brouka)	0,6	1,5

Tabulka 5 a grafy 5-10 ukazují, že po expozici hostitelských prekurzorů je tvorba MB vyšší ve střevech brouků s tykadly a koncentrací feromonu odpovídající 100 BE. CV byl více produkován u brouků bez tykadel s koncentrací feromonu odpovídající 100 BE.

## 4. Diskuze

V této práci bylo zjištěno:

1. U brouků bez tykadel po 3-denním žíru byla produkce MB vyšší než u brouků intaktních.
2. U brouků po 3- denní žíru měl být stimulační efekt pozorován pro oba hlavní feromonové komponenty, avšak cV se nacházel pod limitem kvantifikace.
3. Brouci intaktní produkovali více MB po aplikaci JHIII.
4. Antennektomie měla zvýšit produkci MB, ale ke zvýšení nedošlo.
5. Brouci po expozici hostitelských prekurzorů produkovali větší množství MB u brouků bez tykadel a bez prekurzorů. Nejvyšší množství cV bylo naměřeno u brouků intaktních s prekurzory.
6. Po aplikaci feromonu produkovali větší množství MB u brouci intaktní (100 BE). Nejvyšší množství cV bylo naměřeno u brouků bez tykadel (100 BE).

V této práci bylo zjištěno, že brouci bez tykadel po 3-denním žíru tvořili více MB než brouci intaktní. Tento výsledek byl ve shodě s předpokladem, nicméně cV byl pod hranicí kvantifikace, což bylo v rozporu s předpokladem. Jelikož žír přirozeně indukuje produkci agregačního feromonu, předpokládaly se zvýšené hodnoty MB i cV, ale v případě cV byl efekt antennektomie nejednoznačný. Konkrétní studie uvádí, že žír u samců stimuluje CA k syntéze JHIII a ten stimuluje feromonovou produkci ve střevech. (GINZEL et al. 2007). Naše získaná data nejsou dostatečná a nepotvrzují schodu s výsledky v odborné literatuře ani s předchozími pokusy.

Po ošetření JHIII tvořili více MB brouci intaktní. To bylo v rozporu s naším předpokladem. Z předchozích experimentů víme, že by po antennektomii mělo dojít k výraznému navýšení produkce MB. Výsledky s předchozími experimenty tudíž nelze porovnat. Stimulace produkce feromonu po antennektomii byla jako první pozorována u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a u nosatce bavlníkového (*Anthonomus grandis*) (DICKENS et al., 1988, 2002). U jedinců bez tykadel došlo k výraznému zvýšení produkce feromonu. U nosatce antennektomie zvýšila feromonovou produkci více než aplikace analogu JHIII hormonu (DICKENS et al., 1988) Ke stejnému zjištění došlo také u kůrovců *I. pini* (GINZEL et al.2006).

Podstata pozorovaného pozitivního vlivu antenektomie na produkci MB v této práci nebyla prokázána. Výsledky nelze doplnit a statisticky vyhodnotit s pilotními pokusy provedených v bakalářské práci (vliv odstranění tykadel na feromonovou produkci).

Pilotní experimenty byly rozšířeny o experimenty, ve kterých samci *I. typographus* byli vystaveni těkavým látkám hostitele ( $\alpha$ -pinen, myrcen) a různým koncentracím agregačního feromonu se záměrem stanovit zda expozice specifickým čichovým podnětům má vliv na produkci feromonu.

Brouci jsou schopni vnímat široké spektrum volatilních látek (KALINOVÁ *et al.* 2014; KANDASAMY *et al.* 2016, 2019; SCHIEBE *et al.* 2011). Jedním z hlavních hostitelských monoterpenů je  $\alpha$ -pinen s jehož pomocí samci vytváří jednu ze složek agregačního feromonu - cV (DVOŘÁKOVÁ *et al.* 2011). U jedinců vystavených hostitelským prekurzorům ( $\alpha$ -pinen, myrcen) byla průměrná hodnota MB stejná u brouků bez tykadel i intaktních. CV byl produkován pouze u brouků vystavených hostitelským prekurzorům, což je ve shodě s předpokladem. Hodnota byla vyšší u brouků intaktních. Z literatury víme, že terpeny hostitelských stromů mohou ovlivňovat přitažlivost kůrovců i jejich agregační feromony a že byly zaznamenány jak synergické, tak inhibiční účinky.  $\alpha$ -pinen dokáže přilákat dvakrát více brouků než samotný feromon (ERBILGIN *et al.*, 2007). Hostitelské prekurzory také zvyšují produkci feromonu u *Dendroctonus valens* (XU *et al.* 2014). Z těchto zdrojů lze vyvodit, že tvorba feromonu je silně ovlivňována rostlinnými kairimony. I přesto, že byly v této práci provedeny 3 opakování, výsledky neposkytují dostačující data, především v případě efektu antennektomie a prekurzorů u cV a MB.

V posledním pokusu byl po aplikaci feromonu analyzován obsah střev u brouků bez tykadel a intaktních. Koncentrace extraktů byly vypočteny jako broučí ekvivalenty (BE), na základě počtu brouků a objemů extraktů. Aplikací prekurzorů byla předpokladem i produkce cV. Nejvyšší koncentrace MB byla naměřena u brouků intaktních s koncentrací feromonu odpovídající 100 BE. Nejvyšší hodnoty cV byly naměřeny u brouků bez tykadel s koncentrací feromonu odpovídající 100 BE. Brouci tedy reagovali nejvíce na nejsilnější koncentraci feromonu.

Brouci produkovali nízké množství feromonových komponent (průměrná hodnota při začátku kolonizace je 100 $\mu$ l/denně u MB a 1-2  $\mu$ l/denně u cV) (SCHLYTER 1987). Důvod proč tomu tak bylo, není znám. Jednou z možných příčin je dlouhodobé

uchovávání brouků v lednici. Z důvodu rekonstrukce laboratoří, byli brouci uchovávaní v lednici po delší dobu než v předchozích experimentech (3-7 dní). Vzhledem k tomu, že jde o jedinou změnu v experimentu, je možné, že toto je příčinou neobvyklých výsledků. Protože neexistuje žádná studie, zabývající se délkou uchovávání brouků v chladu, nelze tuto domněnku ověřit.

Výsledky této práce tak mohou být považovány za předběžné, vyžadující opakování a statistické zpracování.

## **5. Závěr**

Naše pokusy ukazují nejednoznačné výsledky. Antenektomie neprokázala nesespecifickou fyziologickou změnu v oblastech regulující feromonovou produkci. Také přímo neukázala, že je tvorba feromonu závislá na přítomnosti specifických čichových podnětů jako jsou rostlinné kairomony a agregační feromon. Nejednoznačnost výsledků vyžaduje opakování a následné statistické zpracování.



## 6. Seznam literatury

ANDERSSON, M. N. Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche: A Journal of Entomology* [online]. 2012, 2012, 1-14 [cit. 2020-06-15]. doi: 10.1155/2012/149572. ISSN 0033-2615. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/psyche/2012/149572>

BEARFIELD, J. C., A. G. HENRY, C. TITTIGER, G. J. BLOMQUIST a M. D. GINZEL. Two Regulatory Mechanisms of Monoterpenoid Pheromone Production in *Ips* spp. Of Bark Beetles. *Journal of Chemical Ecology*. 2009, 35(6), 689-697. doi: 10.1007/s10886-009-9652-2. ISSN 0098-0331. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-009-9652-2>

BELLÉS, X., D. MARTÍN a M. D. PIULACHS The Mevalonate Pathway and the Synthesis of Juvenile Hormone in Insects. *Annual Review of Entomology* [online]. 2005, 50(1), 181-199 [cit. 2020-06-15]. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130356. ISSN 0066-4170. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>

BERRYMAN, A. A., ed. *Dynamics of Forest Insect Populations* [online]. Boston, MA: Springer US, 1988 [cit. 2021-7-27]. ISBN 978-1-4899-0791-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4899-0789-9

BLÁHA, J.; Produkují samci *Ips typographus* feromon před kolonizací hostitelského stromu?. Praha, 2019. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

BORDEN, J. H. a David L. WOOD. The Antennal Receptors and Olfactory Response of *Ips confusus* (Coleoptera: Scolytidae) to Male Sex Attractant in the Laboratory 1. *Annals of the Entomological Society of America* [online]. 1966, 59(2), 253-261 [cit. 2022-04-10]. ISSN 1938-2901. Dostupné z: doi:10.1093/aesa/59.2.253

BYERS, J. A. a G. BIRGERSSON. Pheromone production in a bark beetle independent of myrcene precursor in host pine species. *Naturwissenschaften* [online]. 1990, 77(8), 385-387 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/BF01135739

BYERS, J.A. Chemical Ecology of Bark Beetles in a Complex Olfactory Landscape. LIEUTIER, François, Keith R. DAY, Andrea BATTISTI, Jean-Claude GRÉGOIRE a

Hugh F. EVANS, ed. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004, s. 89-134 [cit. 2022-04-10]. ISBN 978-1-4020-2240-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-2241-8\_8

*Canadian Journal of Arthropod Identification* [online]. 38. 2019 [cit. 2022-03-21]. ISSN 19112173.

DICKENS, J. C., J. E. OLIVER, B. HOLLISTER, J. C. DAVIS aj. A. KLUN. Breaking a paradigm: male-produced aggregation pheromone for the Colorado potato beetle. *Journal of Experimental Biology* [online]. 2002, 2002(205) [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <https://jeb.biologists.org/content/205/13/1925.short>

DICKENS, J. C., W. L. MCGOVERN a G. WIYGUL. Effects of Antennectomy and a Juvenile Hormone Analog on Pheromone Production in the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science* [online]. 1988, 23(1), 52-58 [cit. 2020-06-15]. doi: 10.18474/0749-8004-23.1.52. ISSN 0749-8004. Dostupné z: <https://meridian.allenpress.com/jes/article/23/1/52/75211/EFFECTS-OF-ANTENNECTOMY-AND-A-JUVENILE-HORMONE>

DICKENS, J.C. (1981), Behavioural and electrophysiological responses of the bark beetle, *Ips typographus*, to potential pheromone components. *Physiological Entomology*, 6: 251-261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1981.tb00269.x>

DREYER, E. M. a DREYER W. Velký průvodce lesem. Přeložil Dagmar CHRISTOFOVÁ. Brno: Kazda, 2019. ISBN 978-80-88316-30-5.

DVOŘÁKOVÁ, M., I. VALTEROVÁ a T. VANĚK. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy*. 2011, 105(11).

ERBILGIN, N., P. KROKENE, T. KVAMME a Erik CHRISTIANSEN. A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) responses to its aggregation pheromone. *Agricultural and Forest Entomology* [online]. 2007, 9(2), 135-140 [cit. 2022-04-10]. ISSN 1461-9555. Dostupné z: doi:10.1111/j.1461-9563.2007.00329.x

GINZEL, Matthew D., Jeremy C. BEARFIELD, Christopher I. KEELING, Colin C. MCCORMACK, Gary J. BLOMQUIST a Claus TITTIGER. Antennally mediated negative feedback regulation of pheromone production in the pine engraver beetle, *Ips*

pini. *Naturwissenschaften* [online]. 2006, **94**(1), 61-64 [cit. 2021-7-6]. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/s00114-006-0158-2

HAMMEROVÁ, V. *Jsou tykadla důležitá pro regulaci produkce feromonu u Ips typographus?*. Praha, 2020. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

IVARSSON, Per a Göran BIRGERSSON. *Regulation and Biosynthesis of Pheromone Components in the Double Spined Bark Beetle Ips duplicatus (Coleoptera: Scolytidae)* [online]. 1995, 7 [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002219109500052V>

IVARSSON, Per, Fredrik SCHLYTER a Göran BIRGERSSON. Demonstration of de Novo pheromone biosynthesis in *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 1993, 23(6), 655-662 [cit. 2022-04-10]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/0965-1748(93)90039-U

J. Podehradská, Z. Vozňáková: *Návody pro laboratorní cvičení z Analytické chemie II. Plynová chromatografie*. VŠCHT, Praha 1997. *Obecné základy*

KALINOVÁ, B., R. BŘÍZOVÁ, M. KNÍŽEK, M. TURČÁNI a M. HOSKOVEC. Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions* [online]. 2014, 8(4), 305-316 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1007/s11829-014-9310-7. ISSN 1872- 8855. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11829-014-9310-7>

Kandasamy, D., Gershenson, J. & Hammerbacher, A. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *J Chem Ecol* **42**, 952–969 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0768-x>

Kandasamy, D., Gershenson, J., Andersson, M.N. *et al.* Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *ISME J* **13**, 1788–1800 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0390-3>

KAUSRUD, Kyrre, Bjørn ØKLAND, Olav SKARPAAS, Jean-Claude GRÉGOIRE, Nadir ERBILGIN a Nils Chr. STENSETH. Population dynamics in changing environments: the case of an eruptive forest pest species. *Biological Reviews* [online]. 2012, **87**(1), 34-51 [cit. 2022-04-09]. ISSN 14647931. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00183.x

KEELING, C.I., BLOMQUIST, G.J. & TITTIGER, C. Coordinated gene expression for pheromone biosynthesis in the pine engraver beetle, *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae). *Naturwissenschaften* **91**, 324–328 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0523-y>

Klimetzek, D., Francke, W. Relationship between the enantiomeric composition of  $\alpha$ -pinene in host trees and the production of verbenols in *Ips* species. *Experientia* **36**, 1343–1345 (1980). <https://doi.org/10.1007/BF01960087>

KŘÍSTEK, J. a URBAN, J. Lesnická entomologie. Praha: Academia, 2004. ISBN 80-200-1052-1

LANNE, B.S., P. IVARSSON, P. JOHANSSON, G. BERGSTRÖM a A.B. WASSGREN. BIOSYNTHESIS OF 2-METHYL-3-BUTEN-2-OL, A PHEROMONE COMPONENT OF *IPS TYPOGRAPHUS* (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE) [online]. 1988 [cit. 2020-06-15].

LARSSON, Mattias C., Ana I. DOMINGOS, Walton D. JONES, M.Eugenia CHIAPPE, Hubert AMREIN a Leslie B. VOSSHALL. Or83b Encodes a Broadly Expressed Odorant Receptor Essential for *Drosophila* Olfaction. *Neuron* [online]. 2004, **43**(5), 703-714 [cit. 2022-04-10]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2004.08.019

LIEUTIER, François, Keith R. DAY, Andrea BATTISTI, Jean-Claude GRÉGOIRE a Hugh F. EVANS, ed. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004 [cit. 2021-4-24]. ISBN 978-1-4020-2240-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-2241-8

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Zpráva o stavu lesů a lesního hospodářství České republiky v roce 2020 (Zelená zpráva). Praha: [s.n.]: 2021. ISBN 978-80-7434-625-5

NAKLÁDAL, Oto. Entomologie obecná a systematická. V Praze: Česká zemědělská univerzita, Fakulta lesnická a dřevařská, 2015. ISBN 978-80-213-2602-6.

NETHERER, Sigrid, Dineshkumar KANDASAMY, Anna JIROSOVÁ, Blanka KALINOVÁ, Martin SCHEBECK a Fredrik SCHLYTER. Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. *Journal of Pest Science* [online]. 2021, **94**(3), 591-614 [cit. 2022-03-22]. ISSN 1612-4758. Dostupné z: doi:10.1007/s10340-021-01341-y

PAYNE, T. L. Electrophysiological investigations of response to pheromone in bark beetles. *Contrib. Boyce Thompson Znst.* 1970, 24, 275–282.

PAYNE, Thomas L., Henry A. MOECK, Clyde D. WILLSON, Robert N. COULSON a Walter J. HUMPHREYS. Bark beetle olfaction—II. Antennal morphology of sixteen species of Scolytidae (Coleoptera). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* [online]. 1973, 2(3), 177-192 [cit. 2021-7-20]. ISSN 00207322. Dostupné z: doi:10.1016/0020-7322(73)90027-5

RAFFA, K.F., ANDERSSON, M.N., SCHLYTER, F., Chapter One - Host Selection by Bark Beetles: Playing the Odds in a High-Stakes Game, Editor(s): Claus Tittiger, Gary J. Blomquist, *Advances in Insect Physiology*, Academic Press, Volume 50, 2016, Pages 1-74, ISSN 0065-2806, ISBN 9780128027233, <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.02.001>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065280616300029>)

SAINT-GERMAIN, Michel, Christopher M. BUDDLE a Pierre DRAPEAU. Primary attraction and random landing in host-selection by wood-feeding insects: a matter of scale?. *Agricultural and Forest Entomology* [online]. 2007, **9**(3), 227-235 [cit. 2022-04-08]. ISSN 1461-9555. Dostupné z: doi:10.1111/j.1461-9563.2007.00337.x

SEYBOLD, S. J., D. R. QUILICI, J. A. TILLMAN, D. VANDERWEL, D. L. WOOD a G. J. BLOMQUIST. De novo biosynthesis of the aggregation pheromone components ipsenol and ipsdienol by the pine bark beetles *Ips paraconfusus* Lanier and *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1995, **92**(18), 8393-8397 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.92.18.8393

SEYBOLD, S. J., J. BOHLMANN a K. F. RAFFA. Biosynthesis of Coniferophagous Bark Beetle Pheromones and Conifer Isoprenoids: Evolutionary Perspective and

Synthesis. *The Canadian Entomologist*. 2000, 132(6), 697-753. DOI: 10.4039/Ent132697-6. ISSN 0008-347X. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0008347X0000688X/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0008347X0000688X/type/journal_article)

SEYBOLD, Steven J. a Claus TITTIGER. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF DE NOVO ISOPRENOID PHEROMONE PRODUCTION IN THE SCOLYTIDAE. *Annual Review of Entomology* [online]. 2003, **48**(1), 425-453 [cit. 2022-03-31]. ISSN 0066-4170. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ento.48.091801.112645

SCHIEBE, C., M. BLAŽENEC, R. JAKUŠ, C. R. UNELIUS a F. SCHLYTER. Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges. *Journal of Applied Entomology* [online]. 2011, **135**(10), 726-737 [cit. 2022-04-10]. ISSN 09312048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01624.x

SCHLYTER, F., J. A. BYERS a J. LÖFQVIST. Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: Density-Regulation Mechanism in Bark Beetle *Ips typographus* [online]. 1987 [cit. 2020-06-15]

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

TILLMAN, JULIE A., FANG LU, LANE M. GODDARD, et al. JUVENILE HORMONE REGULATES DE NOVO ISOPRENOID AGGREGATION PHEROMONE BIOSYNTHESIS IN PINE BARK BEETLES, *Ips* SPP., THROUGH TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF HMG-CoA REDUCTASE. *Journal of Chemical Ecology* [online]. 2004, **30**(12), 2459-2494 [cit. 2022-04-04]. ISSN 0098-0331. Dostupné z: doi:10.1007/s10886-004-7945-z

TITTIGER, C. a G.J. BLOMQUIST. Pheromone Production in Pine Bark Beetles. *Pine Bark Beetles* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 235-263 [cit. 2022-03-22]. Advances in Insect Physiology. ISBN 9780128027233. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aiip.2016.02.002

TITTIGER, Claus a Gary J BLOMQUIST. Pheromone biosynthesis in bark beetles. *Current Opinion in Insect Science* [online]. 2017, **24**, 68-74 [cit. 2022-03-31]. ISSN 22145745. Dostupné z: doi:10.1016/j.cois.2017.09.005

TOFFIN, E., E. GABRIEL, M. LOUIS, J. L. DENEUBOURG a J. C. GRÉGOIRE. Colonization of weakened trees by mass-attacking bark beetles: no penalty for pioneers, scattered initial distributions and final regular patterns. *Royal society open science* [online]. 2017, 5(2018) [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170454>

WERMELINGER, B. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*—a review of recent research. *Forest Ecology and Management* [online]. 2004, 202(13), 67-82 [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1016/j.foreco.2004.07.018. ISSN 03781127. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378112704005353>

XU, Bing-Bing, Zhu-Dong LIU a Jiang-Hua SUN. The effects of  $\alpha$ -pinene on the feeding performance and pheromone production of *Dendroctonus valens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* [online]. 2014, **150**(3), 269-278 [cit. 2022-04-10]. ISSN 00138703. Dostupné z: doi:10.1111/eea.12161

Yuvaraj, J.K., Roberts, R.E., Sonntag, Y. *et al.* Putative ligand binding sites of two functionally characterized bark beetle odorant receptors. *BMC Biol* **19**, 16 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00946-6>

ZAHRADNÍK, P. a M. GERÁKOVÁ. Lesní ochranná služba: Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.). *Letáky LOS* [online]. Strnady, 2010, 2010, **2010**(12), 8 [cit. 2022-04-04]. ISSN 0322-9254. Dostupné z: [http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2010/2010\\_lykozrout.pdf](http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2010/2010_lykozrout.pdf)