

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci

**Určení aktivity *trans*-4-thujanolu na odchyt lýkožrouta smrkového
(*Ips typographus* L.) do feromonových lapačů.**

Diplomová práce

Autor: Bc. Kamil Košík

Vedoucí práce: Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Kamil Košík

Lesní inženýrství

Název práce

Určení aktivity *trans*-4-thujanolu na odchyt lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) do feromonových lapačů.

Název anglicky

Determination of the effect of *trans*-4-thujanol on pheromone trap catches of *Ips typographus*.

Cíle práce

Cílem diplomové práce je určit aktivitu potenciálního anti-atraktantu (*trans*-4-thujanolu alias sabinen hydrátu) na odchyt lýkožrouta smrkového do feromonových lapačů a posoudit možnost využití anti-atraktantů při ochraně smrkových porostů.

Metodika

Na vybrané lokalitě s vysokou populační hustotou lýkožrouta smrkového ve VLS Libavá bude instalováno 14 lapačů typu Ecotrap navzájem agregacním feromonem a feromonem s potenciálním anti-atraktantem *trans*-4-thujanolem v různých koncentracích.

Po dobu experimentu budou úlovky v lapačích pravidelně kontrolovány, zachycení brouci budou odebráni a uskladněni k pozdější analýze v laboratoři. Feromonové návnady budou při každém odběru přemísťovány podle předem připraveného randomizačního schématu.

Po skončení terénních prací budou úlovky lýkožrouta smrkového tříděny dle pohlaví a data budou statisticky zpracována s cílem zjistit vliv různých dávek *trans*-4-thujanolu na počet zachycených brouků. Získané výsledky budou diskutovány s ohledem na možnost využití anti-atraktantů při ochraně smrkových porostů.

Doporučený rozsah práce

40-60 str.

Klíčová slova

sabinen hydrat, *trans*-4-thujanol, *Ips typographus*, smrk ztepilý, anti-atraktant

Doporučené zdroje informací

- BLAZYTE-CERESKIENE, L.; APSEGAITE, V.; RADZIUTE, S.; MOZURAITIS, R; BUDA, V. Electrophysiological and behavioural responses of *Ips typographus* (L.) to *trans*-4-thujanol a host tree volatile compound. *Annals of Forest Science*, 2016, vol. 73, no. 2, s. 247-256. ISSN: 1286-4560
- JAKUS, R.; BLAZENEC, M. Princípy ochrany dospělých smrekových porastov pred podkôrným hmyzom. Zvolen: Ústav ekológie lesa SAV, 2015. 232 s.
- JAKUS, R.; SCHLYTER, F.; ZHANG, Q.H.; BLAZENEC, M., VAVERCAK, R.; GRODZKI, W. ; BRUTOVSKY, D.; LAJZOVA, E.; TURCANI, M.; BENGTSSON, M.; BLUM, Z.; GREGOIRE, J.C. Overview of development of an anti-attractant based technology for spruce protection against *Ips typographus*: From past failures to future success. *Anzeiger Fur Schadlingskunde-Journal of Pest Science*, 2003, vol. 76, no. 4, s. 89-99. ISSN: 1436-5693
- RAFFA, K.F.; ANDERSSON, M.N.; SCHLYTER, F. Host Selection by Bark Beetles: Playing the Odds in a High-Stakes Game. In: TITTIGER, C., BLOMQUIST, G.J. eds. *Pine Bark Beetles*. London: Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, 2016, vol. 50, s. 1-74. ISBN: 78-0-12-82744-8
- SCHIEBE, C.; BLAZENEC, M.; JAKUS, R.; UNELIUS, C. R.; SCHLYTER, F. Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges. *Journal of Applied Entomology*, 2011, vol. 135, no. 10, s. 726-737. ISSN 0931-2048
-

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Ing. Roman Modlinger, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2018

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2018

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 19. 04. 2019

Prohlášení

"Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Určení aktivity *trans*-4-thujanolu na odchyt lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) do feromonových lapačů vypracoval samostatně pod vedením Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědom, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby."

V..... dne.....

Podpis autora

Poděkování

Rád bych poděkoval Ing. Anně Jirošové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a Ing. Romanu Modlingerovi, Ph.D., za konzultaci a za pomoc při statistickém zpracování dat.

Abstrakt

Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.t.) (Coleoptera, Scolytinae) způsobuje v posledních letech rozsáhlé kalamity ve smrkových porostech. Tato práce se zabývá zjištěním potencionální antiatrakční aktivity (+)-*trans*-4-thujanolu (sabinen hydratu), látky produkované mladými smrky, v porovnání s feromonem lýkožrouta smrkového. A dále určení enantiomerního složení (+)-*trans*-4-thujanolu ze smrku a v syntetické testované látce. Ve feromonových lapačích byl testován (+)-*trans*-4-thujanol samostatně ve třech dávkách, a v kombinaci se dvěma dávkami syntetického feromonu *I. t.* (2methyl-3-buten-2-ol, *cis*-verbenol). Jako reference byl použit 1,8-cineol, látka s prokázanými antiatrakčními účinky a dále samotný feromon a prázdný lapač. Cílem bylo porovnat snížení odchytů brouků po přidání různých dávek antiatraktivních látek k feromonu vůči samotnému feromonu. Rovněž jsme zjišťovali aktivitu (+)-*trans*-4-thujanolu samotného. Experiment se konal na lokalitě Libavá v průběhu května a června 2017. Enantiomerní čistota (+)-*trans*-4-thujanolu produkovaného smrkem byla porovnána s komerční látkou metodou chirální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Výsledky ukázaly statisticky významnou antiatrakční aktivitu vysoké dávky (+)-*trans*-4-thujanolu v kombinaci s nízkou i vysokou dávkou feromonu, která byla porovnatelná s aktivitou známého potentního anti-atraktantu 1,8-cineolu. Odchyty na samotný (+)-*trans*-4-thujanolu nebyly signifikantně rozdílné od prázdné pasti. Enantiomerní kompozice *trans*-4-thujanolu emitovaného smrkem byla určena jako 100% (+)-, stejná kompozice pak byla určena u syntetické látky používané při testování, testovali jsme přírodní enantiomer. (+)-*Trans*-4-thujanol snižuje přitažlivost lýkožrouta smrkového k agregačnímu feromonu, je tedy potentním anti-atraktantem a může být použit při optimalizacích antiatrakčních směsí s potencionálním použitím v managementu.

Klíčová slova

trans-4-thujanol, lýkožrout smrkový, sabinen hydrat, *Ips typographus*, smrk ztepilý, anti-atraktant

Abstract

Spruce bark beetle *Ips typographus* (I.t.) (Coleoptera, Scolytinae) has caused extensive calamities in spruce stands in recent years. This work deals with the detection of potential anti-attraction activity of (+) - trans-4-thujanol (sabinen hydrate), a substance produced by young spruce trees, in comparison with the pheromone of spruce bark beetle. Furthermore, the determination of the enantiomeric composition of (+) - trans-4-thujanol from spruce and in the synthetic test substance. In pheromone traps, (+) - trans-4-thujanol was tested alone in three doses, and in combination with two doses of synthetic pheromone I.t. (2-methyl-3-buten-2-ol, cis-verbenol). As a reference was used 1,8-cineol, a substance with proven anti-attraction effects and a pheromone alone, and an empty trap. We also investigated the activity of (+) - trans-4-thujanol alone. The experiment took place in Libavá during May and June 2017. Enantiomeric purity of (+) - trans-4-thujanol produced by spruce was compared with commercial substance by chiral gas chromatography with mass detection. The results showed a statistically significant anti-attractive activity of a high dose of (+) - trans-4-thujanol in combination with both low and high dose pheromone, which was comparable to those of the known potent anti-attractant 1,8-cineol. Traps on (+) - trans-4-thujanol alone were not significantly different from the empty trap. The enantiomeric composition of trans-4-thujanol emitted by spruce was determined to be 100% (+) -, the same composition was then determined for the synthetic material used in testing, we tested the natural enantiomer. (+) - trans-4-thujanol reduces the attractiveness of spruce bark beetle to the aggregate pheromone, it is thus a potent anti-attractant and can be used in the optimization of anti-attraction mixtures with potential use in management

Keywords

trans-4-thujanol, spruce bark beetle, sabinen hydrat, *Ips typographus*, Norway spruce, anti-attractant

Obsah

1 Úvod	11
2 Cíl práce	12
3 Rozbor problematiky (literární rešerše)	13
3.1 <i>Scolytinae</i> (kůrovcovití)	13
3.2 Lýkožrout smrkový <i>Ips typographus</i> L.	13
3.3 Současná situace přemnožení <i>Ips typographus</i> L. v ČR.....	18
3.4 Ochrana lesa	21
3.5 Feromony u druhu <i>Ips typographus</i> L.	28
3.6 Anti-atraktanty	30
3.7 Selektce stromu.....	33
3.8 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS).....	37
3.9 Vojenský újezd Libavá.....	39
4 Metodika	40
5 Výsledky	44
6 Diskuze	48
7 Závěr	50
Seznam literatury a použitých zdrojů	51

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. 1: Lýkožrout smrkový (Zahradník, Geráková, 2007).....	14
Obr. 2: Vnější znaky pohlavního dimorfismu lýkožrouta smrkového; <i>a-samice, b-samci</i> <i>1-záhlaví, 2- hustota ochlupení na záhlaví, 3-hrbolek na čele, 4-tvar prostředního zubu</i> (Schlyter, Cederholm, 2009).....	15
Obr. 3: Vývoj požerku lýkožrouta smrkového (Pfeffer, 1955).....	16
Obr. 4: Prostorové rozmístění kůrovců na smrku (Knížek, Zahradník, 2004)	17
Obr. 5: Schéma náletu lýkožrouta smrkového na hostitele a dynamika vývoje feromonů	18
Obr. 6: Při zpracování kůrovcové kalamity vznikají rozsáhlé holiny, jež bude obtížné znovu zalesnit (Libavá, Olomoucko, 2017).....	21
Tab. 1: Stupně odchyty (napadení) lýkožroutem smrkovým (Knížek, Zahradník, 2004)	24
Obr. 7. Feromonový lapač - štěrbínový a křížový (Zahradník, Geráková, 2010).....	26
Obr. 8: Vzorce feromonů a anntiatraktantu l. smrkového (Schiebe, 2012).....	29
Obr. 9: Biosyntéza agregačního feromonu lýkožrouta smrkového.....	30
Obr. 10. Vzorec 1,8-cinelou (vlevo) a <i>trans</i> -4-thujanolu (vpravo).....	32
Obr. 11: Látky působící na Lýkožrouta smrkového při výberu hostitele jako negativní signál.....	36
Obr. 12: Schéma posloupnosti možného vyhledávání hostitele lýkožroutem smrkovým (Schlyter, Birgersson, 1999)	36
Obr. 13: Schéma plynového chromatografu s hmotnostní detekcí GC-MS	38
Obr. 14: Umístění feromonových lapačů v terénu (vojenský újezd Libavá, ČR).....	41
Tab. 2. Přehled zdroje směsi, čistoty, návrhů odparníky a poměr odparuv laboratoři a terénu	42
Tab. 3. Přehled použitých návnad v experimentu.	43
Obr. 14: Chromatogramy enantioselektivní analýzy GC-MS (Cyclodex-b kolona) smrkového extraktu a syntetických standardů.	44
Tab. 4 Průměrné počty <i>I. typographus</i> L. odchyceného v lapačích během období odběru vzorků pro různé varianty návnad a odpovídající směrodatné odchylky.	45

Graf 1. Průměrný počet odchycených brouků <i>Ips typographus</i> L. na lapače během období odběru vzorků pro různé nástrahy. Svislé čáry představují 95% průměrného intervalu spolehlivosti.....	46
Graf 2. Průměrný počet odchycených samců <i>Ips typographus</i> L. na lapače během období odběru vzorků pro různé nástrahy. Svislé čáry představují 95% průměrného intervalu spolehlivosti.	46
Graf 3. Průměrný počet odchycených samic <i>Ips typographus</i> L. na lapače během období odběru vzorků pro různé nástrahy. Svislé čáry představují 95% průměrného intervalu spolehlivosti.	47

Seznam použitých zkratk a symbolů

1,8 Ci 1,8-cineol

4-Thol *trans*-4-thujanol

CV *cis*-verbenol

EI elektronová ionizace

GLV těkavé látky ze zelených listů

GC-EAD plynová chromatografie - elektroantennografická detekce

GS – MS Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

MB 2-methyl-3-buten-2-ol

NHV nehostitelské těkavé látky

OSN čichový senzorický neuron

Ph feromon

PE polyethylenový

SDH hypotéza biochemické

SSR záznam jednotlivých senzil

1 Úvod

Tato práce se zabývá chemickou ekologií v současnosti největšího škůdce českých smrkových porostů. Lýkožrout smrkový patří, v posledních desetiletích, mezi nejvýznamnější škůdce smrkových porostů v Evropě. Objem napadeného dříví ve střední Evropě každoročně stoupá (Zahradník, Geráková, 2010).

Anti-atraktanty jsou směsí syntetických látek, které nejsou atraktivní pro kůrovce a po aplikaci na okraji porostu, zakryjí původní pach vhodného hostitele a působí na kůrovce repelentním způsobem (Jakuš et al. 2015). Anti-atraktanty budí velký zájem v lesnickém výzkumu s ohledem na jejich použití při ochraně proti škůdcům.

Vznik první elektrofyziologické analýzy dal možnost zjistit, na které látky hmyz reaguje a které může vnímat. Touto technologií se dalo ověřit, zda látky, které lýkožrouti smrkový produkují, jsou agregační feromony (*cis-verbenol*) nebo antiagregační feromony (*verbenone*). Testovaly se i jiné látky, které nepocházely od kůrovců, a bylo tak objeveno několik sloučenin, které na lýkožrouta smrkového působí jako anti-atraktanty. Jsou to látky z nehostitelských rostlin, jako jsou GLV - těkavé látky ze zelenolistých rostlin, a látky z hostitelských rostlin. 1,8-cineol (*eucalyptol*) smrku ztepilého je jeden z oxidovaných terpenů, jehož koncentrace vzrůstá při napadení herbivory či při nakažení patogenní houbou. Vyšší koncentrace této látky byla objevena i ve smrcích, které byly rezistentní vůči napadení kůrovcem (Andersson et al. 2010). Schiebe et al. (2012) při laboratorních testech zjistili silnou odezvu na tykadlech na 1,8-cineol. Andersson et al. (2011) tento anti-atraktant, otestovali v terénu a zjistili silný antiatraktivní efekt.

Metodami chemické ekologie, vědy o chemických látkách, které zprostředkovávají komunikaci jedinců mezi sebou (feromony), nebo komunikaci brouků s okolím, (kairomony, vůně hostitelského stromu) jsme určovali polní a antenální aktivitu potenciálního anti-atraktantu *trans-4-thujanolu* (*sabinen hydra*), který má přímý vztah koncentrace na věku smrku ztepilém. To znamená, že se koncentrace s přibývajícím věkem snižuje. Antiatraktivní účinek na lýkožrouta smrkového byl potvrzen pouze laboratorně (Blažytė-Čereškienė et al. 2015), avšak v terénu zatím nebyl otestován. Terénní experiment je hlavní náplní této práce a je nezbytný pro určení aktivity *trans-4-thujanolu* jako potenciálního anti-atraktantu.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je určit aktivitu potenciálního anti-atraktantu *trans*-4-thujanolu (sabinen hydrátu) na odchyt lýkožrouta smrkového do feromonových lapačů a posoudit možnost využití. Dílčími úkoly bylo vypracování literární rešerše, obsahující informace týkající se dané problematiky, dále samostatný výzkum, skládající se z několika částí. První částí bylo určení přítomnosti a enantiomerní čistoty *trans*-4-thujanolu v kůře smrku ztepilého. Druhým cílem bylo evaluovat antiatrakční aktivitu této potencionálně účinné látky a porovnat ji s aktivitou známého anti-atraktantu 1,8-cineolu. V polním pokusu s feromonovými lapači jsme porovnávali snížení odchytlů brouků po přidání různých dávek antiatraktivních látek k feromonu vůči samotnému feromonu. Rovněž jsme zjišťovali aktivitu (+)-*trans*-4-thujanolu samotného. Součástí experimentu byl výběr vhodných lokalit, design odparníků s účinnými látkami a feromonem s určeným koeficientem odparu a nakonec zpracování výsledků jako determinace druhu a pohlaví brouků a statistické vyhodnocení. Nový anti-atraktant pak může být zahrnut do optimalizace ochranné směsi v managementu.

3 Rozbor problematiky (literární rešerše)

3.1 *Scolytinae* (kůrovcovití)

I když svou morfologií kůrovcovití připomínají spíše červotočovitě, fylogeneticky jsou příbuzní s nosatcovitými. Na území české republiky se nachází asi 104 druhů kůrovcovitých, z nichž některé druhy napadají pouze dřeviny listnaté a některé pouze dřeviny jehličnaté (Křístek et al. 2013). Z druhů vyskytujících se na jehličnanech jsou, podle zákona č. 289/1995 Sb., Zákon o lesích a změně některých zákonů (lesní zákon), resp. jeho prováděcí vyhlášky č. 101/1996 Sb., ve znění novely č. 236/2000 Sb., považovány za kalamitního škůdce tři druhy a to *Ips typographus* (Linnaeus, 1758) a *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus, 1761), *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836). Nedostatek stromů vhodných k napadení, potravní a prostorová kompetice jsou jedny z přirozených regulačních faktorů působící na kůrovcovité. Regulačně působí i obranyschopnost dřevin proti napadení, která je při studeném a deštivém počasí posilněna. Toto počasí zároveň způsobuje omezení při rozmnožování a vývoji kůrovců. Pro kůrovce je při rozmnožování ideální teplé a slunné počasí, protože dochází k velkým suchům

a obranyschopnost napadených stromů klesá. To však neplatí pro kalamitní plochy, nacházející se na velmi slunných místech, za extrémně teplého počasí, protože zde v důsledku rychlého vysychání dřeva dochází k vyššímu úmrtí kůrovcových larev. Mezi další negativní vlivy lze zařadit také predátory, parazitoidy a původce nemocí (Křístek et al. 2013).

3.2 Lýkožrout smrkový *Ips typographus* L.

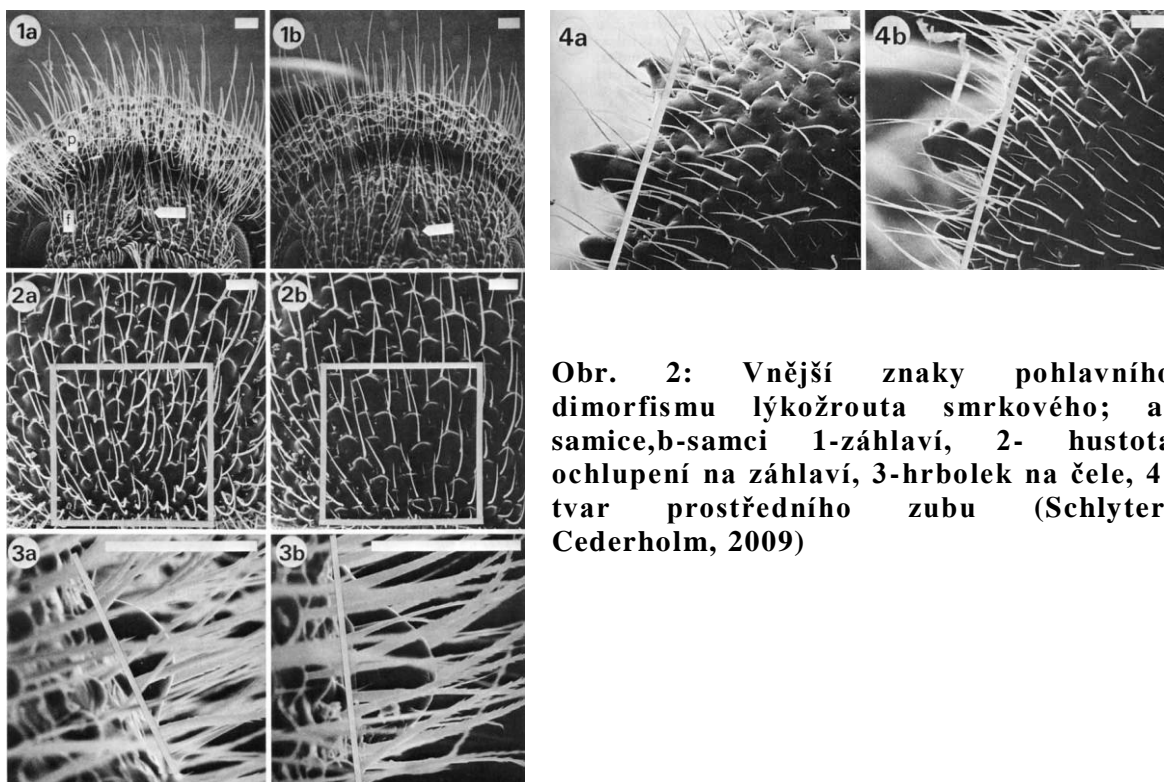
Lýkožrout smrkový (Obr. 1) patří mezi nejškodlivější kůrovce u nás. Nachází se od nížin až po vysokohorské polohy, všude tam, kde se vyskytuje smrk. Kudela (1970) uvádí, že velmi snadno dochází k přemnožení na včas nezpracovaných vývrstech a odlomených částech kmene. Po rozsáhlých větrných kalamitách dochází obvykle v dalších letech ke gradacím lýkožrouta smrkového, kdy napadá i zcela zdravé stromy, které poté během 6-10 týdnů zahubí (Pfeffer, 1989).



Obr. 1: Lýkožrout smrkový (Zahradník, Geráková, 2007)

Morfologie

Velikostí se pohybuje mezi 4,2 mm a 5,5 mm. Je nápadně lesklý, hnědočerný a patří do skupiny lýkožroutů, kde je zadní část krovek ozdobena čtyřmi hrbolky. Zrnité a hrbolkované čelo je opatřeno nápadným a velkým hrbolkem uprostřed předního okraje. Žlutavá tykadla mají paličky se zřetelnými švy. Štít, který je spíše delší než širší, je vepředu hrbolkovaný a vzadu jemně tečkovaný. Krovky mají válcovitý tvar a jsou málo sbíhavé, v řádkách jsou hluboce tečkované, lesklé a v zadní vyhloubené části matné. Mezirýží krovek je hladké, lesklé a tečkování je vidět pouze v zadní části. Přítomnost teček pouze v zadní části těla, odlišuje lýkožrouta smrkového od druhů, které mají na konci krovek také čtyři zuby. Horní zub na vyhloubené zadní části krovek je nejmenší, druhý zub je při kořenu tlustší, třetí zub je největší a je knoflíkovitě protažený, poslední je opět menší. Brouk je po celém obvodu těla pokryt dlouhými, světle žlutými chlupy (Pfeffer, 1955). Tvar zubů na krovkách, hustota ochlupení a tvar hrbolku na čele jsou znaky pohlavního dimorfismu, a je podle nich možné rozlišit pohlaví živých jedinců. Této vlastnosti se využívá v chemické ekologii, vědě zabývající se chemickými látkami, které lýkožrouti používají při komunikaci mezi sebou (feromony), při komunikaci s okolím a výběru vhodného hostitele (Schlyter, Cederholm, 2009).

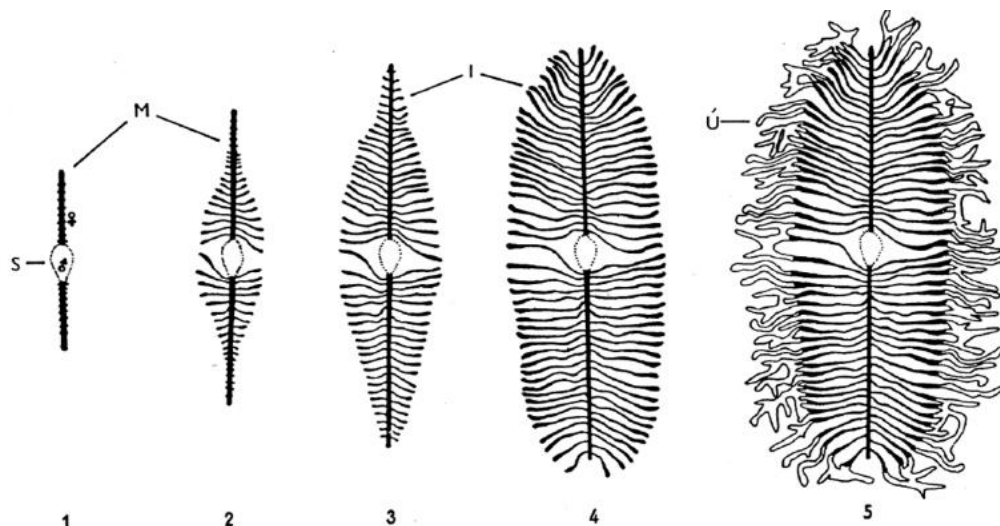


Obr. 2: Vnější znaky pohlavního dimorfismu lýkožrouta smrkového; a-samice, b-samci 1-záhloví, 2- hustota ochlupení na záhloví, 3-hrbolek na čele, 4-tvar prostředního zubu (Schlyter, Cederholm, 2009)

Ekologie

Lýkožrout smrkový se vyvíjí hlavně pod kůrou smrku a jen výjimečně i pod kůrou jiných jehličnanů.

Požerek je svérázný. Snubní komůrka se nachází v kůře a po odloupení je zpravidla znatelná. Z komůrky vycházejí nahoru a dolů matečné chodby, které jsou svislé, rovné, nezprohýbané, což je odlišné od příbuzných druhů a každá chodba má jednotlivé větrací otvory. Délka chodeb je 6 - 12 cm a šířka je 3 - 3,5 mm. Délky chodeb jsou závislé na tom, zdali je lýkožrout přemnožen (Obr. 3). Při přemnožení jsou chodby kratší, a pokud přemnožen není, jsou delší. Nejčastěji se vyskytuje dvouramenný požerek, velmi často se však objevují i požerky tříramenné. Pokud dojde k velkému přemnožení lýkožrouta, jsou na kmenech nalézány většinou požerky jednoramenné.

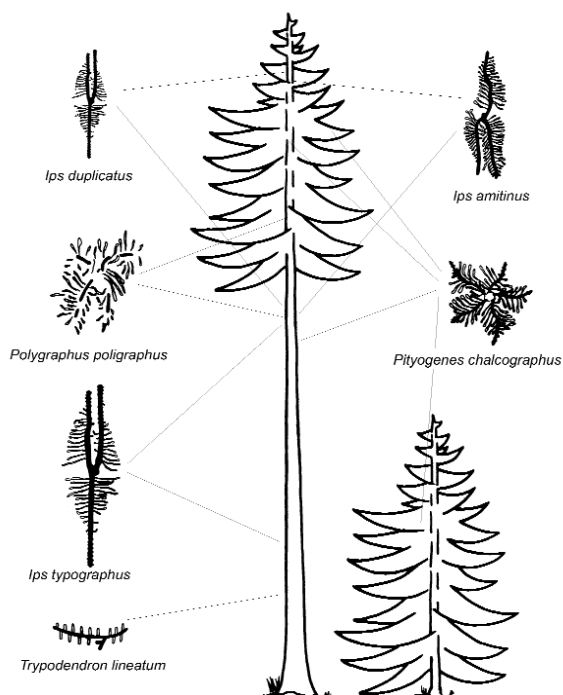


Obr. 3: Vývoj požerku lýkožrouta smrkového (Pfeffer, 1955)

Lýkožrout smrkový se vyskytuje spíše na vzrostlých stromech, protože potřebuje silnější vrstvu lýka pro vývin larev. Napadá tedy smrky starších věkových tříd, 60 let a výše. Mladší porosty mívají a objevuje se zde až když dojde k silnému přemnožení. Zahradník (2007) uvádí, že v tomto případě se také častěji objevuje uvnitř porostů. Lýkožrout zahajuje nálet na stojící, dosud zelené stromy, na rozhraní suchých a zelených větví, přičemž se šíří směrem nahoru i dolů. Vrcholy stromu s průměrem pod 10 cm většinou nenapadá, protože je ve slabším materiálu omezen výskytem jiných druhů kůrovců (Obr. 4).

Oddenkové části do 1 - 1,5 metru zpravidla zůstávají bez napadení. U ležících kmenů nálet probíhá po celé vhodné části kmene. Larvové chodby odbočují z mateční chodby a z počátku vedou vedle sebe. Později míří larvy do volného prostoru a chodby se začnou od sebe oddalovat. Z matečné chodby většinou vychází 10 - 25 larvových chodeb z obou stran. Hustota požerků je závislá na rozměrech kmene a intenzitě náletu lýkožrouta.

První nálet je většinou směřován na místo, kde přecházejí suché větve ve větve zelené. Z tohoto místa je strom postupně napaden lýkožroutem směrem nahoru a dolů (Pfeffer, 1955).



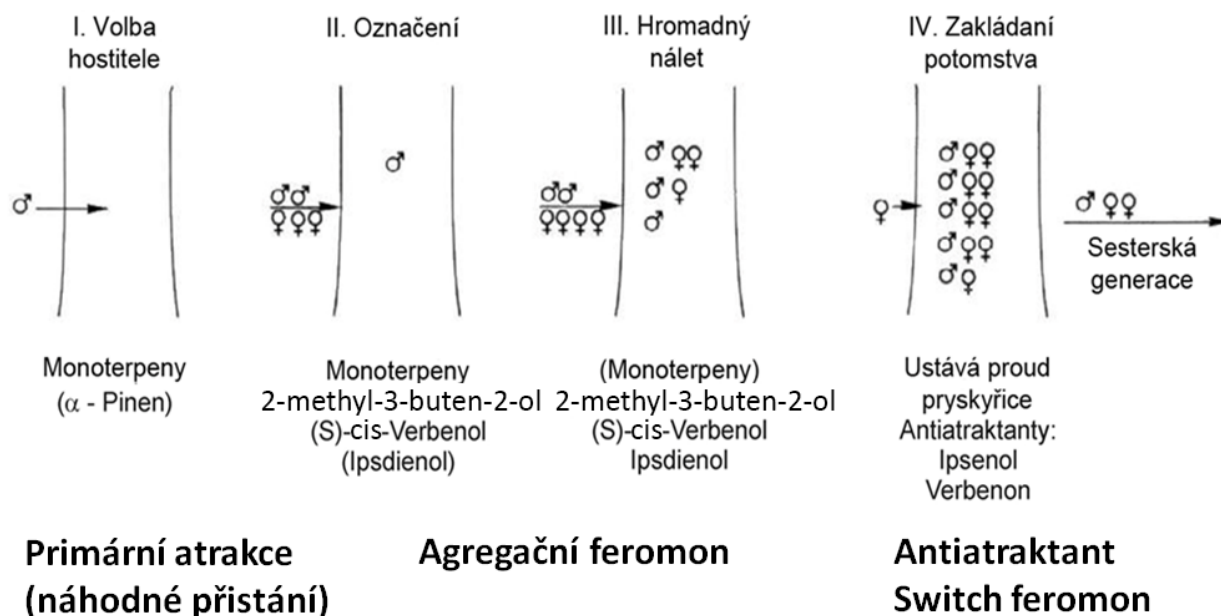
Obr. 4: Prostorové rozmístění kůrovců na smrku (Knížek, Zahradník, 2004)

Bionomie

Rojení lýkožrouta začíná na jaře, během teplých odpoledních hodin, kdy brouci opouštějí prezimovací úkryty. Po zahřátí kůry nebo hrabanky na 14°C se začnou brouci pohybovat, při 20°C je rojení silné a při 29°C dosahuje vrchol rojení a nastává pro lýkožrouta tepelné optimum. Toto období nastává koncem dubna a během května. Pohlavně nedospělí jedinci létají 1 - 2 týdny před tzv. svatebním rojením. Hromadně nalítávají na okraje odloupané čerstvé kůry na pařezech, na krajích neoloupaných klad, na odříznuté čerstvé vrcholky stromů a na spodní stranu silnějších, na zemi ležících, větví kde provádí úživný žír a pohlavně dospívají. Dospělí brouci, kteří svůj úživný žír ukončili již na podzim, zakládají snubní komůrky při prvním poletování a začínají se rozmnožovat dříve než nedospělí jedinci, i když jejich rojení začalo později. Jarní rojení je ukončeno během deseti až dvanácti dnů a je hromadnější než rojení letní. Celkový vývoj lýkožrouta smrkového, od zavrtání po plně vyspělého jedince, trvá nejméně 6 - 10 týdnů (Pfeffer, 1955).

2 - 3 týdny po prvním náletu dochází k sesterskému rojení, přerojování samic na stejný nebo jiný strom, probíhá při všech generacích (Obr. 5). Samice prodělávají regenerační žír a poté bez další kopulace pokračují v kladení vajíček v novém požerku, který nemá

snubní komůrku. Podíl samic, které se zapojují do sesterského rojení, kolísá od 10% do 90%. Dochází i k přerojování, kdy po spáření s jiným samečkem samička vytváří nový požerok ale se snubní komůrkou, zpravidla s jednou matečnou chodbou, tudíž se neliší od standardních požerků (Zahradník, Geráková, 2010).



Obr. 5: Schéma náletu lýkožrouta smrkového na hostitele a dynamika vývoje feromonů

3.3 Současná situace přemnožení *Ips typographus* L. v ČR

Lýkožrout smrkový patří mezi nejvýznamnější škůdce v Evropě, s výjimkou Středomoří a Britských ostrovů. Znamé jsou rozsáhlé kalamity v posledních třech desetiletích ze Skandinávie, pobaltských zemí a z Běloruska, které dosáhly desítek milionů m³. Ve střední Evropě dosáhl objem kůrovcového dříví za období 2006-2009 přibližně 43 milionu m³. V České Republice dosáhl objem napadeného dříví přes 29 milionů m³ za posledních 30 let, kdy byl lýkožrout smrkový přemnožen. Objem kůrovcového dříví ve střední Evropě prakticky každoročně stoupá, v lepším případě se drží zhruba na stejné úrovni. Výjimku tvoří Sasko, kde lýkožrout smrkový v poslední době prakticky žádné problémy nepůsobí (Zahradník, Geráková, 2010).

V devadesátých letech procházela Šumava třetím obdobím přemnožení lýkožrouta smrkového od roku 1880 (Pfeffer. Skuhravý, 1995). První dvě kalamity (1870-1876 a 1945-1954) byly následkem větrných bouří, jejichž výsledkem byly rozsáhlé polomy. Skoro celá Šumava byla po těchto kalamitách znovu zalesněna geneticky problematickým

materiálem. Smrky, které byly introdukovány z území Rakouska-Uherska. Tyto monokulturální lesy byly založeny pro ekonomické účely (Boháč, 2004).

Třetí kalamita probíhá od roku 1980 do současné doby a má několik antropogenních i přirozených příčin. Mezi přirozené příčiny patří polomy po opakujících se silných větrných bouřích. Kalamitní výskyt kůrovce po roce 1954 nebyl kontrolován z geopolitických příčin, ani po roce 1989, protože se spoléhalo na samoregulační schopnosti lesních ekosystémů. Kontrola kůrovce byla zahájena až v posledních letech, kdy jeho populační exploze dosáhla v některých územích měřítko skutečné kalamity. Management parku se proto vrátil k původní klasické a ověřené metodě pro kontrolu kůrovce - důslednému a rychlému kácení napadených stromů a odstranění kůry (Skuhrový, 2002).

Do roku 2010 byly zdokumentovány dvě gradace lýkožrouta, které způsobily velkoplošný rozpad stromového patra v šumavských lesích. K té první došlo v polovině 90. let minulého století v oblasti Modravska, ke druhé po klimaticky extrémním roce 2003. V tomto roce byly lesní porosty na celém území republiky značně oslabeny vlivem extrémního sucha a na mnohých místech se již v průběhu léta a zejména pak počátkem podzimu začalo významně projevovat jejich poškození. Ve smrkových porostech usychaly stojící stromy, ze kterých postupně opadávalo šedozeleně zbarvené jehličí. Tyto podmínky napomohly k nadměrnému zvýšení početního stavu kůrovců. Vzniklo tak reálné nebezpečí Přemnožení kůrovce, tedy vzniku kalamitního stavu a nepředvídatelných škod na lesních majetcích na území celé České republiky. Stromy byly nejčastěji napadány lýkožroutem smrkovým a lýkožroutem lesklým. V roce 2003 došlo k úplnému dokončení tří generací lýkožrouta smrkového v podstatě ve všech nadmořských výškách naší republiky. Místy došlo k vylétnutí brouků třetí generace, a to zpravidla pro založení další generace, příp. za účelem dokončení zralostního žiru a následného prezimování (Knížek, Zahradník, 2004). Po této gradaci byl rozpad porostů urychlen větrnou kalamitou v lednu 2007. Kindlmann et al. (2012) ukazují na datech z výzkumných ploch v povodí Plešného jezera a na Modravsku, že druhové složení rostlinných společenstev se po náhlém rozpadu stromového patra, způsobeném těmito gradacemi, příliš neměnilo, pokud však nedošlo k takzvané asanační těžbě.

Období od roku 2010 do 2018 patří mezi nejteplejší v historii měření Českého hydrometeorologického ústavu. Postupné zvyšování průměrné teploty v našich zeměpisných šířkách a nedostatečná, případně nerovnoměrná distribuce srážek v průběhu roku negativně ovlivňuje celkovou vodní bilanci v krajině. Tato vodní bilance je dána

rozdílem úhrnu srážek a celkového výparu z prostředí. Celoročně se však vlivem vyšší celkové teploty zvyšuje reálný výpar a dostupné vláhy v lesních ekosystémech výrazně ubývá. Důsledkem je zvyšování sucha a tím zvyšování stresových faktorů pro lesní dřeviny. Paralelní efekt těchto vlivů snižuje vitalitu lesních porostů a ovlivňuje především smrk ztepilý, který je náchylnou dřevinou (Obr. 6). Smrk trpí stresem z nedostatku vláhy pod 600 milimetrů ročního úhrnu. Mělký kořenový systém pronikající jen několik decimetrů do půdy není schopen využívat stále klesající hladinu dostupné vody. Tím se snižuje jeho obranyschopnost před škodlivými organismy, především pak před podkorním hmyzem, tedy kůrovcem. Negativní dopad srážkově podprůměrných let 2015 a 2016 způsobil rozsáhlé chřadnutí smrkových porostů, které se lavinovitě šíří do našich končin od východu. Primárně suchem oslabené dřeviny nejsou schopny vytvářet obranné látky a sekundárně tak podléhají podkornímu hmyzu nebo třeba houbovým onemocněním. Navíc dlouhotrvající extrémní teploty urychlují vývoj běžných druhů kůrovců a umožňují zvýšení počtu generací či šíření u nás doposud nepřiliš rozšířených druhů, např. lýkožrouta severského. Historicky byl pro nás smrk ztepilý hlavní hospodářskou dřevinou ve všech lesních vegetačních stupních, ale z dnešního pohledu je tento stav již neudržitelný. Škody na jehličnatých porostech v nižších polohách jsou tak rozsáhlé, že v oblasti Nízkého Jeseníku je nutné jednorázově odlesňovat stovky hektarů víceméně monokulturních porostů. Lavinovitě šíření kůrovcové kalamity nerespektuje státní ani vlastnické hranice.

Obdobná situace se vyskytuje v polských i slovenských lesích, v lesích vojenských, obecních či církevních. V praxi by se k regulaci používaly plastové feromonové lapače, stromové lapáky, insekticidní postřiky, sítě pro zakrývání napadeného dříví. Situace je však o mnoho komplikovanější, protože i s mnohem menším počtem atakujících brouků si chronicky oslabené porosty nedokážou samy poradit a množství hmyzu tak roste geometrickou řadou (Pospíšil, 2018).



Obr. 6: Při zpracování kůrovcové kalamity vznikají rozsáhlé holiny, jež bude obtížné znovu zalesnit (Libavá, Olomoucko, 2017) (http://www.silvarium.cz/media/k2/items/cache/bcf12a472243d7c5b8cc804b4a1e72a8_XL.jpg)

3.4 Ochrana lesa

Problematika ochrany lesa v smrkových porostech je během gradací podkorního hmyzu poměrně široce diskutována (Jakuš et al, 2015). V lesním zákoně (zákon č. 289/1995 Sb., o lesích a o změně a doplnění některých zákonů, v platném znění) je v § 32 věnovanému ochraně lesa zakotveno, že vlastník lesa je povinen provádět taková opatření, aby se předcházelo a zabránilo působení škodlivých činitelů na les, zejména aby se preventivně bránilo vývoji, šíření a přemnožení škodlivých organismů. Tato ustanovení jsou dále rozvedena v příslušné oborové vyhlášce, kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa (vyhláška MZe č. 101/1996 Sb., v platném znění), kde je v § 2 uvedeno, že při zabezpečení ochrany lesa jsou identifikováni škodliví činitelé, a podle § 4 se vzniku zvýšeného stavu hmyzích škůdců předchází zejména soustavným vyhledáváním a včasným zpracováním všech napadených stromů. Také v platné české technické normě

ČSN 481000, ochrana lesa proti kůrovčům na smrku, je jednoznačně uvedeno, že po celý rok se pečlivě vyhledává, vyznačuje, eviduje a včas zpracovává kůrovcové dříví (Lubojacký et al, 2018).

Kontrola

Kůrovcové stromy je nutné vyhledávat v porostech smrku s věkem nad 60 let a při výši zastoupení větší než 20% této dřeviny v zásadě po celý rok. Kůrovcovým dřívím se rozumí kůrovcové stromy (stromy, ve kterých se nachází vývojová, životaschopná stádia lýkožroutů, jednotlivě nebo společně), napadené lapáky, ležící napadené nezpracované dřevo nebo lýkožroutem napadené sortimenty (ČSN 48 1000 2005), nebo stromy, vyrobené dříví, odpad a zbytky dřeva, které jsou napadeny lýkožrouty a umožňují jim dokončit vývoj až do stádia brouka (Vyhláška č. 236/2000 Sb.). Klíčové období však představuje doba během jarního a letního rojení a krátce po něm, kdy se pochůzkou zjišťuje přítomnost kůrovce za pomoci zbarveného jehličí, je rezavé a opadá, a prostřednictvím přítomnosti drtinek na bázích kmenů. Následně poté lze stromy včas pokácet a asanovat. Tato kontrola se provádí při základním stavu (Lubojacký et al, 2018).

Při vyhledávání kůrovcových stromů je potřeba se zaměřit na místa jejich nejpravděpodobnějšího výskytu, jako jsou zejména:

- porostní stěny, které vznikly při těžbě napadených stromů v minulém roce,
- místa, která se nacházejí v blízkosti včas nezpracované kalamity,
- okolí kůrovcových souší,
- porostní stěny, které vznikly po poškození porostu větrem, obzvláště osluněné části, a porosty se sníženým zápojem, vzniklým po kůrovcových těžbách,
- místa, kde byly v loňském roce použity feromonové lapače a okolí stávajících lapačů a lapáků,
- porosty v blízkosti odvozních míst, skládek a dřevoskladů, kde byly soustředěny napadené stromy

(Lubojacký et al, 2018).

Lýkožrout smrkový je podle §3, vyhlášky č. 101/1996 Sb. v platném znění jmenován jako kalamitní škůdce, při jejichž přemnožení jsou správci nebo vlastníci povinni přijímat obranná opatření. V příloze této vyhlášky je pro něj, stanoven stav, podle populační hustoty a poškození lesních porostů:

- základní stav - je takový početní stav lýkožroutů, kdy objem kůrovcového dříví z předchozího roku v průměru nedosáhl 1 m³ na 5 ha smrkových porostů, a nedošlo k vytváření ohnisek;
- zvýšený stav - je takový početní stav, kdy objem kůrovcového dříví v průměru překročil 1 m³ na 5 ha smrkových porostů a došlo k vytvoření ohnisek; tento stav upozorňuje na možnost přemnožení;
- kalamitní stav - je takový početní stav, který způsobuje rozsáhlá poškození porostů na stěnách, příp. vznik rozsevů uvnitř porostů

(Knížek, Zahradník, 2004, Zahradník, Geráková, 2010).

Závrtové i výletové otvory lýkožrouta smrkového mají v průměru 2-2,5 mm. Koruna usychá v místě náletu, nejčastěji v místě přechodu suchých a zelených větví. Stromy, které jsou dominantně napadené lýkožroutem smrkovým, jsou obvykle ve spodní část koruny suché, přičemž vrchol koruny zůstává déle zelený (Lubojacký et al, 2018).

Ochrana

Z hlediska účinné ochrany lesa proti kůrovcům je v období rojení důležité splnění všech potřebných opatření k utlumení jejich gradace. Při nesplnění těchto opatření včas a v nedostatečné kvalitě a rozsahu dochází k dalšímu ohrožení lesů, a to i sousedních vlastníků. Důsledné dodržení všech metod boje proti napadení kůrovci je akutním obecným zájmem ochrany lesa, neboť jinak vynaložené prostředky na obranná opatření budou znehodnoceny a nepovedou k požadovanému cíli (Jakuš et al. 2015; Knížek, Zahradník, 2004, Zahradník, Geráková, 2010).

Základní principy ochrany lesa a preventivní opatření proti kůrovcům jsou:

- včasné zpracování atraktivního dříví vhodného pro vývoj a další namnožení lýkožrouta smrkového (polomy, dříví po těžbě apod.);
- včasné a důsledné vyhledávání napadených stromů a jejich účinná a včasná asanace;
- soustředění a hubení lýkožrouta smrkového v ohniscích žíru a na dalších ohrožených místech (např. lapáky, feromonovými lapači, otrávenými lapáky apod.).

(Knížek, Zahradník, 2004).

Obranná opatření

Efektivní obranná opatření vycházejí z důkladně realizovaných preventivních zásahů, a to z důsledného a včasného odstraňování veškerého kůrovci napadeného dříví. K odstraňování těchto škůdců jsou využívány odchyťová zařízení a další netradiční metody. Počet odchyťových zařízení pro jarní rojení je stanoven podle kalamitního základu za období od 1. 8. do 31. 3. a rovná se 1/8 závčas zpracovaných stromů napadených lýkožroutem. K tomuto množství se přidají 1-2 odchyťová zařízení na každý částečně nebo zcela opuštěný strom. Počet odchyťových zařízení pro letní rojení se určuje podle stupně odchyty (napadení). Při slabém stupni se mohou odchyťová zařízení přemístit na jinou, vhodnější lokalitu. Při středním stupni zůstávají ve stejném počtu, při silném se adekvátně zvyšují.

Stupeň odchyty (napadení)	Lapač, otrávený lapák	Lapák
	Počet odchytených lýkožroutů	Počet závrťů na 1 dm ²
Slabý	Do 1000	Do 0,5
Střední	1000-4000	0,5-1,0
Silný	Nad 4000	Nad 1,0

Tab. 1: Stupně odchyty (napadení) lýkožroutem smrkovým (Knížek, Zahradník, 2004)

Lapáky

Lapák je nejznámější kontrolní metodou lýkožrouta smrkového. Lapákem se rozumí skácený, zdravý, odvětvený smrk nebo jeho části, které jsou atraktivní pro nálet kůrovců a vhodné pro založení druhého pokolení, připravený pro jejich kontrolu a hubení (Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004). Lapáky nesmí zarůst bušením a jsou zpravidla umisťovány do polostínu. Lapáky I. série, určené k zachycení přezimujících brouků z jarního rojení, se připravují koncem února a začátkem března, v horských polohách v dubnu. Lapáky se umisťují po okraji porostů, dvě třetiny lapáků se umístí na osluněná, mísa a jedna třetina do polostínu v porostu. Počet lapáků I. série na lýkožrouta smrkového se doporučuje stanovit tak, že jednak na každý částečně nebo zcela opuštěný kůrovcový strom se připraví 1 lapák a jednak se na každých 10m³ včas zpracovaného dříví připraví 1-2 lapáky. Stupně napadení se hodnotí v nejvíce napadené části kmene a jsou uvedeny v Tab. 1 (Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004).

Lapáky II. série, k zachycení dalších generací lýkožrouta, se připravují průběžně. Měly by být připraveny před asanací starých lapáku. Počet lapáků II. série se odvíjí ze

stupně napadení lapáků I. série. Při slabém stupni napadení lapáků I. série se lapáky II. série nemusí pokládat a mohou se položit na vhodnější lokalitu. Při středním stupni napadení se počet lapáků nemění. Při silném stupni napadení se přiměřeně zvyšuje počet lapáků II. série. Podle průběhu vývoje lýkožrouta smrkového, je-li nebezpečí založení 3. generace, kladou se lapáky další série za stejných podmínek jako při kladení lapáků II. série (Zahradník, Geráková, 2010). Pravidelná kontrola lapáků se provádí od počátku rojení v intervalu 7-14 dní až do doby jejich asanace. Při evidenci lapáků se evidují důležité informace o lapáku, jako jsou čísla a série zaznamenávající místo a datum položení lapáku, data kontrol se stupněm vývoje lýkožrouta, stupeň napadení a datum asanace. Pro úspěšné použití této metody je nejdůležitějším momentem včasná asanace lapáku a to v okamžiku kdy se nachází ve stadiu larvy (Jakuš et al. 2015; Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004).

Feromonové lapače

Vyrobením syntetických sekundárních atraktantů a jejich fixací do různých medií, z nichž se postupně uvolňují, vznikl feromonový odparník. To dalo možnost cíleně lákat dospělé kůrovce a vyžádalo si vytvoření odchyťového zařízení, lapače. Toto zařízení zabraňuje dospělcům unikát a je možné provádět kontrolu počtu ulovených jedinců. Také slouží jako prostředek přímé ochrany. Feromonový lapač je past sloužící k zachycení lákaného kůrovce za použití feromonové návnady, obsahující agregační feromony odchyťovaného druhu a upravené tak, aby se látky samovolně uvolňovali do ovzduší v takovém množství vhodném pro lákání kůrovce (Zahradník, Zahradníková, 2016; Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004). V České republice je používání feromonových lapačů dáno vyhláškou č. 101/1996 Sb., ve znění vyhlášky č. 236/2000 Sb., a ČSN 48 1000 (Knížek, Zahradník, 2004).

Povolené feromonové odparníky jsou v registru vedeném Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, z něhož vychází každoročně publikovaný Seznam povolených přípravků a dalších prostředků na ochranu lesa, dále jako Seznam (Zahradník, Geráková, 2010). Existuje několik typů feromonových lapačů - nárazové dvoustěnné a čtyřstěnné, dosedací a štěrbinové (Obr. 7).



Obr. 7. Feromonový lapač - štěrbinový a křížový (Zahradník, Geráková, 2010)

Feromonové lapače se instalují podle následujících zásad, bez ohledu na typ:

- bezpečnostní vzdálenost od nejbližšího zdravého smrku nemá klesnout pod 10 m a neměla by překročit 25 m;
 - lapač nesmí být zakrytý buřením (to platí po celé období odchyty);
 - účinná plocha nárazových lapačů má být zhruba v prsní výšce;
 - minimální vzdálenost mezi jednotlivými feromonovými lapači se doporučuje 20 m, při kalamitním stavu v rozsáhlých ohniscích mohou být rozestupy i mnohem menší;
- (Zahradník, Zahradníková, 2016; Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004).

Feromonová návnada se vyvěšuje těsně před rojením a lapače se kontrolují v intervalu 7-10 dní, v období vrcholného rojení v kalamitních oblastech i častěji. Zahradník a Zahradníková (2016) ještě uvádějí interval 10-14 dnů. Při kontrole feromonových lapačů se provádí i kontrola okolních stromů, z důvodu možného náletu.

Při evidenci feromonových lapačů se kromě čísla lapače zaznamenává místo instalace, datum vyvěšení návnady, datum kontroly s počtem zachycených brouků a stupeň odchyty. Pro jarní rojení se doporučuje instalovat na každý částečně nebo čerstvě opuštěný kůrovcový strom alespoň 1 feromonový lapač a dále 1-2 feromonové lapače na každých 10 m³ včas zpracovaného kůrovcového dříví. Při stanovení počtu feromonových lapačů pro letní rojení se vychází ze stupně odchyty v jarním rojení, stejně jako u stanovení počtu lapáků. Přepočet platící pro určení množství zachycených jedinců, v 1 cm³ (1 ml) je přibližně 35 jedinců lýkožrouta smrkového, po odstranění hrubých nečistot včetně velkých druhů necílového hmyzu. Stupně odchyty jsou uvedeny v Tab. 1. Výměna feromonové návnady by se měla provádět po ukončení doby účinnosti uvedené na etiketě přípravku a v Seznamu (Jakuš et al. 2015; Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004).

Otrávené lapáky

Otráveným lapákem rozumíme skácený a odvětvový smrk a jeho části optimálně ve čtyřmetrových výřezech. Musí být celopovrchově ošetřený vhodným insekticidem uvedeným v Seznamu těsně před začátkem rojení kůrovců a opatřený feromonovou návnadou, která se nachází se středu sekce na zastíněné straně (Zahradník, Geráková, 2010, Knížek, Zahradník, 2004). Také se používá trojnožka sestavené z čerstvých polen o délce 1-2 m a tloušťce alespoň 20 cm, které jsou v horní části pevně spojeny železným trojzubcem, hřebíky, dráty nebo provazy. Insekticidním postříkem se ošetří povrch trojnožky, podle doporučeného množství insekticidu, barviva a vody stanovené výrobcem (Jakuš et al. 2015; Zahradník, Geráková, 2010; Knížek, Zahradník, 2004).

Asanace kůrovcového dříví, včetně lapáků

Jsou dva druhy asanace: mechanická a chemická.

Mechanická asanace se provádí buď odkorněním, štěpkováním, drcením nebo pálením. Odkornění lze provést buď ručně, oloupáním kůry za pomoci loupáku, nebo odstraněním pomocí stroje, frézovým odkorňovacím adaptérem k motorové pile. Mechanická asanace je zcela účinná, pokud se provádí ve stadiu larvy. Objeví-li se v požercích kukly nebo žlutí či hnědí brouci, je již asanace neúčinná, jelikož zde dochází k zahubení pouze poškozených brouků (Jakuš et al. 2015; Zahradník, Geráková, 2010, Knížek, Zahradník, 2004).

Při chemické asanaci smějí být použity pouze schválené přípravky uvedené v Seznamu. Chemická asanace lapáků předpokládá uplatnění insekticidních přípravků s hloubkovým a s krátkým reziduálním účinkem. Chemickou asanaci je lze provádět v jakémkoliv stádiu vývoje lýkožrouta. Pokud se provede správně, je chemická asanace vysoce účinná. Při správném použití insekticidů, v souladu se Seznamem a platnými etiketami, jsou účinné po dobu min. 8 týdnů.

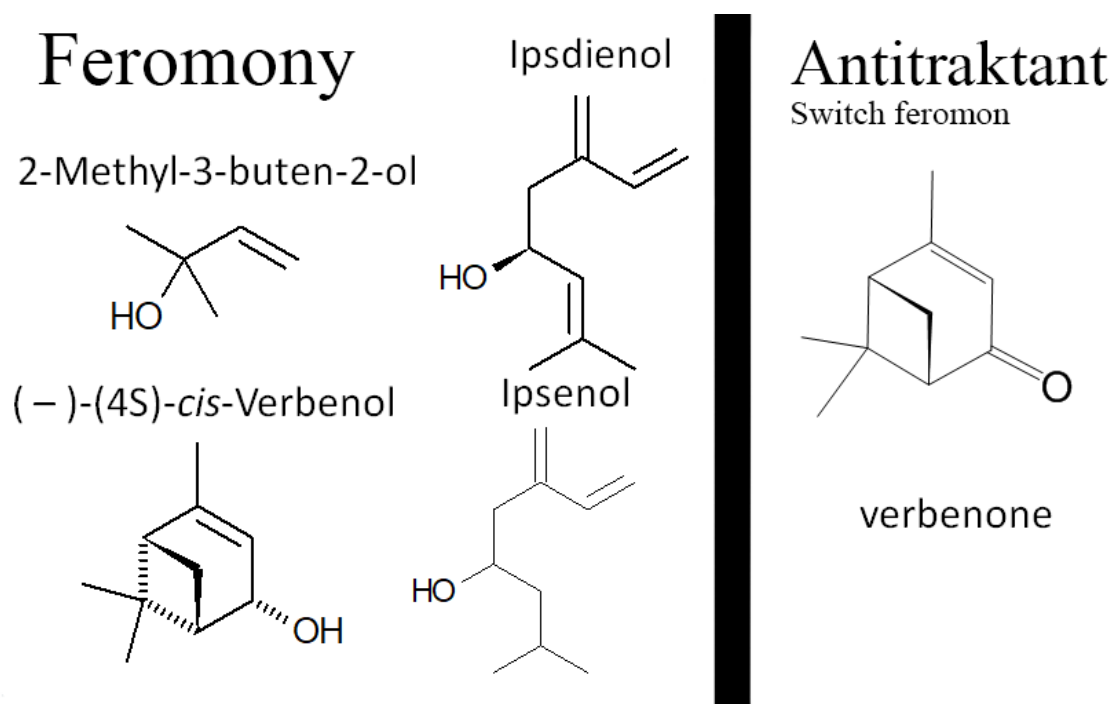
3.5 Feromony u druhu *Ips typographus* L.

Kolonizaci smrku *Ips typographus* L. iniciují samci. Během epidemií napadají živé stromy, jejichž odpor pryskyřičným proudem je překonán masovým útokem. Samice jsou přijímány samci poté, co došlo k vytvoření snubních komůrek v lýku pod kůrou (Postner, 1974). Agregace kůrovců ke specifickému stromu je řízena feromony. Feromony v kůrovci byly nejprve zkoumány u druhu *Ips paraconfusus* (Lanier, 1970), u kterého bylo prokázáno, že používá kombinaci ipsdienolu, ipsenolu a *cis*-verbenolu (Silverstein et al. 1966; Wood et al. 1966) jako agregační feromon. Všechny tři látky byly později prokázány jako produkty oxidace monoterpenových uhlovodíků hostitelské pryskyřice (Wood, 1982). I když pozdější výzkumy ukazují, že ipsdienol a ipsenol může být syntetizován broukem samotným. Ukázalo se, že tyto látky jsou charakteristické pro rod *Ips* a jedna nebo více z nich je přítomna ve střevě všech zkoumaných druhů (Vité et al. 1972; Wood, 1982).

Monoterpeny jsou těkavé sloučeniny, které se vyskytují v jehličnanech a jiných rostlinách. Mnoho brouků používá tyto hostitelské monoterpeny (α -pinen, myrcen), vlastními enzymy je oxiduje a potom je používá jako agregační feromon. Monoterpeny samotné jsou toxické a pryskyřice, ve který se vyskytují, je viskózní a lepkavá, což způsobuje zachycení a udušení brouků (Erbilgin et al. 2007).

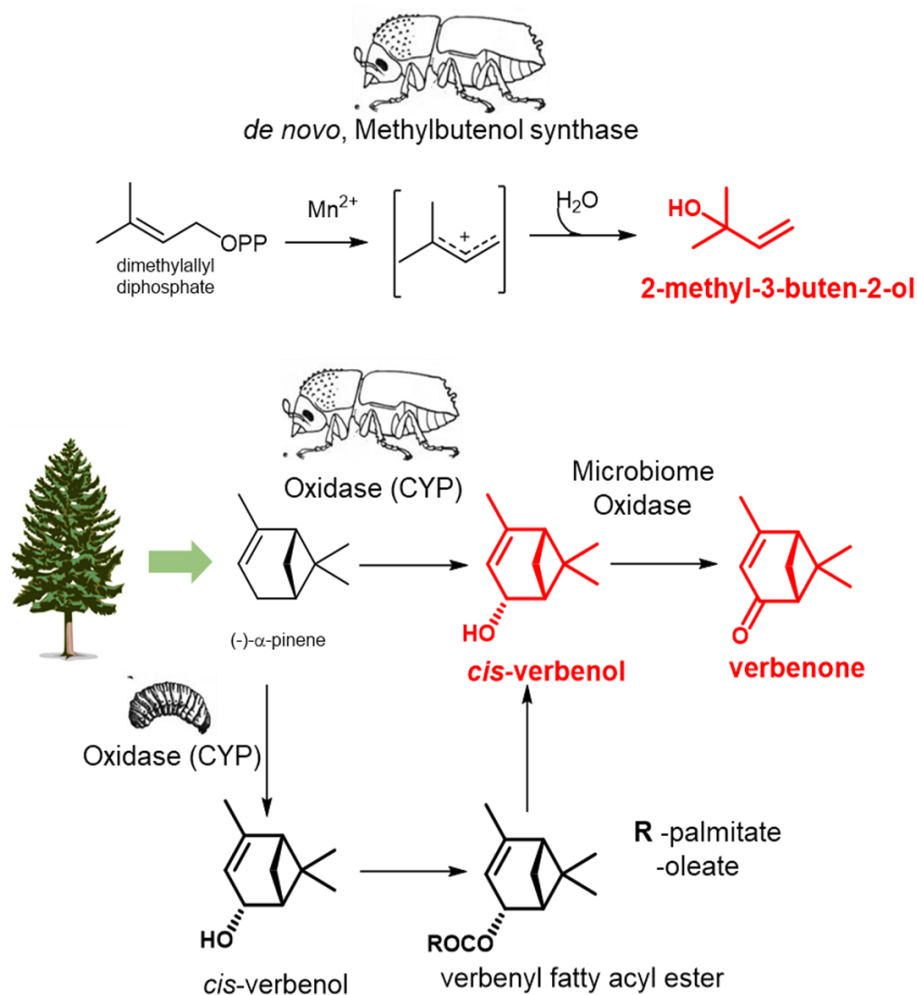
Oxidované feromonové látky ipsdienol spolu s *cis*- a *trans*- verbenolem byly identifikovány a později v polních pokusech testovány jako samčí agregační feromon s velkými odchytnými vlastnostmi (Bakke, 1976). Později byl pomocí GC-MS identifikován izoprenový alkohol 2-methyl-3-buten-2-ol jako další složka feromonu (Bakke et al. 1977), která v kombinaci s *cis*-verbenolem a ipsdienolem ukázala nejvyšší úlovky a byl navržen jako agregační feromon, který je dodnes plněn do komerčních odparníků pro *Ips typographus* L. Vzorce lze vidět na Obr.8. Biologické testy ukázaly pokles přitažlivosti u samců poté, co byli spojeni se samicemi. Chemické analýzy ukázaly,

že nespárování samci nemají ipsdienol (Bakke, 1976; Hackstein, Vité, 1978) a velmi malé množství *cis*-verbenolu, ale velká množství 2-methyl-3-buten-2-ol (Hackstein, Vité, 1978).



Obr. 8: Vzorci feromonů a antitraktantu I. smrkového (Schiebe, 2012)

Samci lýkožrouta smrkového se obecně musí krmit několik hodin na hostitelském stromu, aby produkovali detekovatelné feromony ve svých fekálních peletách. Významná přitažlivost nemusí být dosažena, dokud samci nebudou na krmení déle než 24 hodin (Byers, 1989). Samci lýkožrouta získají α -pinen z par absorbovaných během dýchání v komůrkách a z požitého floému, poté oxidují (S)-(+)- α -pinen na (S)-*cis*-verbenol nebo (R)-(+)- α -pinen na (1R,4S,5R)-(+)-*trans*-verbenol v závislosti na tom, zda je prekurzor S nebo R chiralita. Avšak *trans*-verbenol, i když je specifický pro samce, se neuplatňuje v komunikaci mezi brouky (Dvořáková et al. 2011, Renwick, 1976). Z verbenolů poté vznikají (S)-(-)-verbenon a (R)-(+)-verbenon, které slouží jako antiagregační feromony vysílající signál o vysoké hustotě napadení smrku škůdcem (Obr. 8). Tyto feromony odpuzují další brouky od hostitelského stromu, který je již kolonizován. Směs *cis*-verbenolu, 2-methyl-3-buten-2-olu a kafry, se používá jako agregační feromon pro masový odchyt dospělců lýkožrouta smrkové, protože směs signalizuje pokročilé poškození smrku ztepilého (Dvořáková et al. 2011; Bakke et al. 1977).



Obr. 9: Biosyntéza agregačního feromonu lýkožrouta smrkového

3.6 Anti-atraktanty

Nehostitelské rostliny

Hypotéza semiochemické diverzity (SDH) naznačuje, že pokles oligofagního hmyzu může být způsoben přítomností antiatraktivních těkavých látek z nehostitelských rostlin (např. těkavé látky ze zelenolistých stromů - GLV), což snižuje efektivitu vyhledávání u tohoto hmyzu (Zhang, Schlyter, 2003). Proto se mohou kůrovci aktivně vyhnout nevýhodným lesním stanovištím, jelikož emitované anti-atraktanty ukazují na přítomnost malého množství vhodných hostitelských stromů, ve srovnání s hledáním v jehličnatých dominantách bohatých na terpenické látky. Četné studie týkající se kůrovců ukázaly, že nehostitelské těkavé látky (NHV) snižují přitažlivost k jednotlivým zdrojům, k feromonům, mohou tedy být potenciálními anti-atraktanty. Další látky rostlinné a mikrobiální potencionálně aktivní látky byly objeveny díky elektroantenografické technice single sensillum recording (SSR), která dovoluje v komplexním buketu

hostitelských a nehostitelských rostlin najít látky, pro které mají kůrovci receptory a jsou na tyto látky citlivý (Zhang, Schlyter, 2004). Díky těmto technikám se podařilo určit, pro které z těchto látek mají kůrovci specifické receptory a které receptory reagují na více látek najednou.

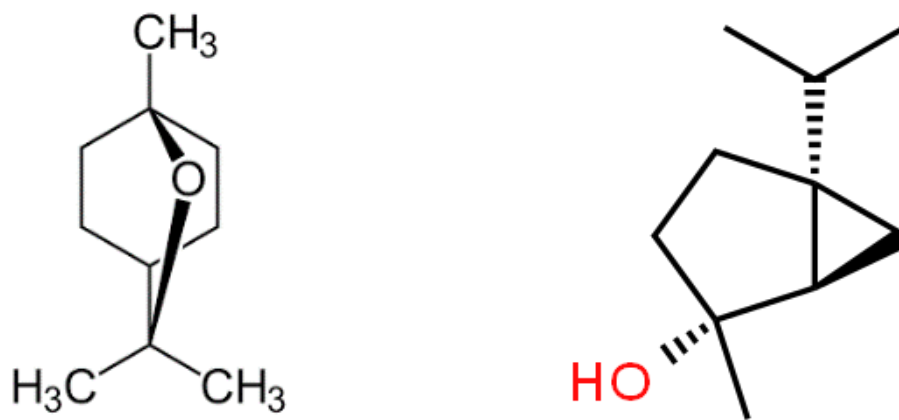
Látky zelenolistých stromů jsou alifatické 6-uhlíkové primární alkoholy, aldehydy a acetáty, které se vyskytují v listnatých stromech a bylinných rostlinách. Všechny jsou odvozeny od volných mastných kyselin, kyseliny linolové a kyseliny linoleové skrze 6-uhlíkové aldehydy (Visser et al. 1979). Studie v Evropě a Severní Americe ukázaly, že se GLV uvolňují nejen z tkáně listů, ale také kůra krytosemenných stromů (Zhang et al. 2000). Tři nehostitelské GLV-alkoholy. 1-hexanol, (E)-2-hexenol a (Z)-3-hexenol, snižují přitažlivost lýkožrouta smrkového k jeho agregačnímu feromonu. Tyto tři sloučeniny jsou behaviorálně nadbytečné, a proto může být směs všech tří sloučenin nahrazena např. 1-hexanolem se stejným antiatraktivním účinkem vzhledem k tomu, že celkový odpařovací poměr se udržuje ve stejném množství (Zhang, Schlyter, 2003). Antiatraktivní sloučeniny, které synergizují inhibiční účinek GLV (Zhang, Schlyter, 2003), jsou detekovány různými neurony, které na GLV nereagují (Andersson et al. 2009; Tømmerås, 1985). Jedná se o verbenon a *trans*-conophthorin, látka uvolňována z kůry břízy a topolu.

Hostitelské rostliny

Během neepidemických populačních hustot napadají poloagresivní druhy, jako je lýkožrout smrkový, pouze oslabené stromy a dávají přednost staršímu než mladšímu lépe chráněnému hostiteli (Grodzki et al. 2006). Dalo by se tedy očekávat, že takové druhy budou mít čichovou schopnost rozlišovat oslabené stromy od silných. Záznamy plynové chromatografie a elektroantennografické detekce (GC-EAD) skutečně ukázaly, že antény lýkožrouta smrkového reagují na několik sloučenin spojených se stresem nebo věkem stromů (Blažytė-Čereškienė et al. 2015; Schiebe, 2012). Oxidované terpeny jsou přítomny v kůře zdravých stromů ve velmi malém množství, které vzrůstá po napadení kůrovcem (Azeem et al. 2013) a také po indukci umělé obrany pomocí hormonu methyl jasmonate (Martin et al. 2003). Oxidované monoterpeny tak mohou poskytnout brouku klíčové informace o zdravotním a obranném stavu potenciálního hostitelského stromu. U lýkožrouta smrkového byly silné reakce GC-EAD vyvolány několika sloučeninami souvisejícími se stresem, např. 1,8-cineol, *trans*-4-thujanol, terpinene-4-ol, kafr a pinocarvone. Dvě neterpenoidní sloučeniny estragol (4-allylanisol) a styren také vyvolaly

silnou aktivitu při GC-EAD (Schiebe, 2012). Látky aktivní na anténách byly následně testovány SSR a pro některé z nich byly identifikovány specifické třídy OSN. Jedna třída reagovala primárně na *trans*-4-thujanol se sekundárními odpověďmi vyvolanými terpinen-4-olem a několika dalšími alkoholy. Druhá třída OSN reagovala specificky na styren, zatímco třetí třída reagovala primárně na pinocarvone a byla téměř stejně silně aktivována kafrem (Schiebe, 2012).

Kromě toho bylo nedávno prokázáno, že množství určitých hostitelských sloučenin, včetně 1,8-cineolu (Obr. 10) a p-cymenu, vzrůstá ve smrku ztepilém silně napadeném *I. typographus* L. Bylo prokázáno, že 1,8-cineol silně inhibuje feromonovou přitažlivost *I. typographus* L., a může tedy také sloužit jako negativní signál při hodnocení vhodnosti hostitele (Andersson et al. 2010). Schiebe et al (2012) prokázali, že 1,8-cineol je přítomen ve významně vyšších množstvích ve smrku ztepilém, které byly rezistentní vůči napadení kůrovci ve srovnání s těmi, které byly úspěšně napadeny a usmrceny. Je tedy pravděpodobné, že kůrovec zvyšuje své šance na přežití a reprodukci tím, že se vyhne stromům se silnou chemickou obranou zprostředkovanou 1,8-cineolem (Andersson et al. 2010).



Obr. 10. Vzorec 1,8-cinelou (vlevo) a *trans*-4-thujanolu (vpravo)

Trans-4-thujanol

Bylo prokázáno, že množství *trans*-4-thujanolu (Obr. 10) emitovaného smrkem ztepilým klesá s věkem stromu, u smrků ve vhodném věku pro kůrovce, tedy 60 a více let je jeho množství již stopové, což může představovat signál vhodnosti hostitele na základě věku. V průměru bylo množství extrahované z 10letých smrkových stromů 3krát vyšší než u 35- 40letých stromů, 27krát vyšší než u stromů ve věku 70- 80 let a 200krát vyšší než u stromů ve věku 120 let (Blažytė-Čereškienė et al. 2015). Dále bylo v laboratorních testech Y olfaktometru zjištěno, že vyšší dávky *trans*-4-thujanolu signifikantně odpuzují kůrovce. Malá množství této sloučeniny bylo také nalezeno jako specifická emise samců kolonizujících brouků *Polygraphus poligraphus* (Linnaeus, 1758)(Kohnle et al. 1985; Rahmani et al. 2015), kteří mohou s lýkožroutem smrkovým obývat stejný strom.

V laboratorních testech byl prokázán repelentní účinek na lýkožrouta smrkového, ale zatím nejsou žádné údaje o vlivu *trans*-4-thujanolu na kůrovce v terénu.

3.7 Selektce stromu

Čichové podněty z rostlin hrají v hostitelské lokalitě klíčovou roli, při selekci býložravým hmyzem a při jejich vnitřní a vnější interakci. Zvláště zajímavé jsou interakce mezi kůrovci napadajícími strom a jejich jehličnatými hostiteli, protože několik druhů kůrovců je schopno zabít zdravé stromy, což způsobuje značné ekonomické ztráty (Wood, 1982). S příznivými povětrnostními podmínkami po kalamitní události a bez dostatečného odstranění popadaných stromů je populační přemnožení obecně nevyhnutelné. V počátečním stádiu růstu populace jsou však stále upřednostňovány stresované stromy a napadení se šíří podél sousedních stromů tak dlouho, dokud jsou kůrovci přitahováni k vyzařujícímu feromonovému oblaku. V pozdějších fázích růstu populace jsou stojící stromy kolonizovány s vyšší hustotou než padlé stromy.

Vhodnost stromu jako zdroje pro reprodukci brouků je definována dvěma hlavními faktory: vitalitou stromu a dynamikou populace brouků (Paine et al. 1984). Složitá rovnováha mezi těmito dvěma faktory, kterou určuje počasí, definuje práh úspěšného útoku a schopnost překonat obranu hostitele. Třetí faktor je také velmi důležitý. Brouci volí kůru s vysokou kvalitou, vzhledem k možnosti přežití v živém hostiteli, který se brání. U poškozených a zlomených stromů jsou preferovány stromy o větším průměru než stromy s menším průměrem (Göthlin et al. 2000) a při útoku na stojící stromy jsou preferovány velké stromy a zralý les (Wermelinger, 2004). Na druhé straně je síla stromů vztažena

k prahu následného útoku, tzn. je zapotřebí více brouků, aby se usmrtil strom s vysokou vitalitou a vysoce kvalitním floémem (Mulock, Christiansen, 1986).

Kolonizace silně stresovaných stromů však také přináší určité nevýhody (Lindgren, Raffa, 2013). Za prvé, takové stromy jsou relativně neobvyklé a vysoce nepředvídatelné v prostoru a čase (Atkins, 1966) a jak je každý stresovaný strom kolonizován, je vyloučen z možnosti napadení. Takže přísné spoléhání na stresované stromy zvyšuje riziko neúspěchu, tzn. neschopnost reprodukce. Za druhé, vysoce stresované stromy jsou k dispozici nejen pro primární druhy kůrovce, ale také pro mnoho jiných druhů kůrovců, dřevokazů a saprogenních hub (Safranyik et al. 2000). Zatřetí, stromy, které jsou pod tlakem, mají často tenčí floém nebo mohou mít nízkou kvalitu živin, čímž poskytují méně kvalitní potravu (Raffa, 2016).

Relativní význam hostitelských sloučenin oproti agregačním feromonům v hostitelské atrakci se liší mezi druhy kůrovců. Například druhy, které vykazují tzv. primární přitažlivost, jsou přitahovány hostitelským sloučeninami i bez feromonů, zatímco druhy se sekundární přitažlivostí používají agregační feromony jako hlavní přitažlivost pro hostitelskou kolonizaci (Byers, 2004). Všechny druhy, které jsou schopny úspěšně kolonizovat a zabít zdravé stromy, vykazují sekundární přitažlivost a koordinují hromadné útoky pomocí agregačních feromonů (Byers, Zhang, 2011). Stále jsou však vedeny debaty jak pionýrství jednotlivci těchto druhů najdou na dálku hostitelský strom.

Jedna hypotéza spočívá v tom, že brouk přistane na stromě náhodně (Wood, 1982) a pak se rozhoduje, který strom se budou obsazovat na základě kontaktních chemických a fyzikálních podnětů. Po přijetí hostitele následuje produkce a uvolnění agregačních feromonů, které přitahují většinu útočících jedinců. To je slučitelné s názorem, že hostitelské sloučeniny mohou přitahovat brouky ke správnému stanovišti, nikoli však ke specifickým stromům (Saint-Germain et al. 2007).

Hlavní hostitelské monoterpeny mohou také synergizovat přitažlivost feromonů a to jak u druhů s primární, tak i sekundární přitažlivostí. Je dobře známo, že čichový systém brouka je schopen reagovat na několik složek hostitele, ale úloha jednotlivých sloučenin pro přitažlivost hostitele je stále neznámá. Tykadla brouků mají spoustu čichových senzoričkových neuronů, které reagují na hostitelské sloučeniny, nehostitelské sloučeniny, vnitrodruhové feromony nebo feromony konkurenčních druhů (Dickens, 1978; Andersson a kol., 2009). Ventrální strana anténní paličky brouků je pokryta senzilou, s nejvyšší hustotou ve dvou zvlněných pásech uprostřed segmentu a třetí oblastí na distální

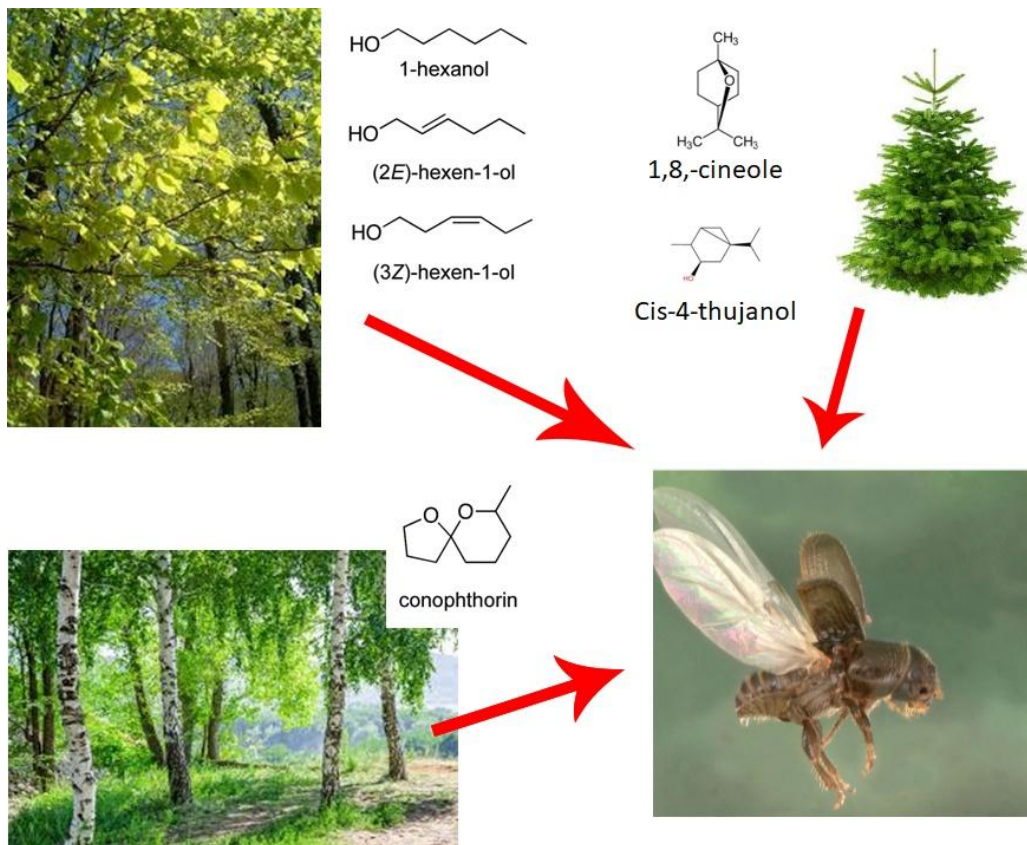
části paličky. Vazba molekul odorantů (nazývaných ligandy) na receptorové proteiny, umístěné v dendritických membránách neuronů, spouští molekulární mechanismy uvnitř buňky, které nakonec vyvolávají elektrický signál podél neuronu. Neuronální signál se šíří neuronem a konverguje se signály z jiných neuronů v anténním laloku. Výsledné chování může být reakce na modulovaný signál. V důsledku toho není možné předpovědět chování pouze ze zaznamenané elektrofyziologické odpovědi (Schiebe, 2012).

Možnou hypotetickou metodou kůrovců, k nalezení správného stanoviště, správného druhu hostitelského stromu a vhodného hostitelského stromu, může být využití těkavých látek ze zelenolistých stromů (Schlyter, Birgersson, 1999).

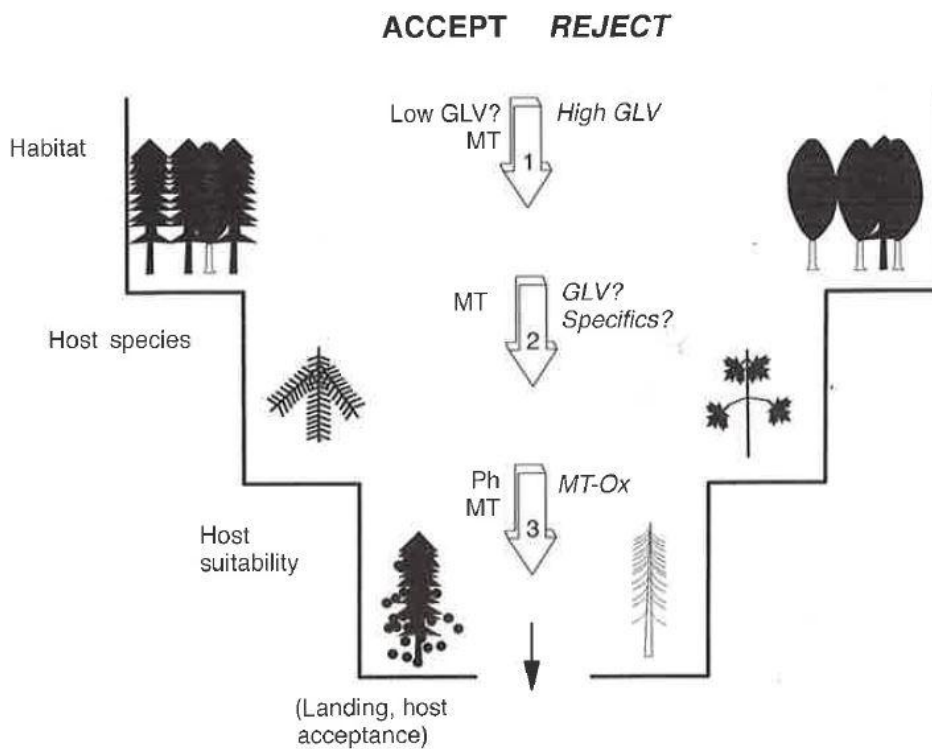
Prvním krokem při hledání hostitelských stromů je nalezení nejlepšího stanoviště pro umístění hostitele. Pro lýkožrouta smrkového je na Obr. 12 znázorněna posloupnost voleb. Kůrovci jsou odpuzováni běžnými těkavými látkami z listnatých rostlin. GLV dominují stanovištěm nehostitelských stromů a ukazují nízkou možnost nalezení vhodného hostitele (Schlyter, Birgersson, 1999).

Druhý krok, nalezení stromu správného hostitelského druhu ve smíšeném lese, by mohl být veden spíše obecnými signály, jako jsou nízké hladiny těkavých látek ze zelených listů nebo přítomnost pozitivního signálu těkavých látek jehličnanů, jako jsou monoterpenové uhlovodíky. Specifický negativní signál však existuje v těkavých látkách z kůry listnatých nehostitelských stromů, které zabraňují přitažlivosti pro kůrovce jehličnatých stromů (Schroeder, 1992). Složka v tomto signálu, (5S, 7S)-trans-conophthorin byla chemicky identifikována v aeracích z kůry *Betula spp.* (Linnaeus). Kůra snižuje účinnost agregačního feromonu v oblasti (Byers et al. 1998) a syntetický (5S, 7S)-trans-conophthorin je synergický s GLV nebo verbenonem při snižování přitažlivosti feromonů v terénu (Schlyter, Birgersson, 1999)(Obr. 11).

Třetí krok je komplexnější, protože brouk se může setkat se směsí sloučenin s negativními nebo pozitivními účinky na přitažlivost z hostitelských stromů, stejně tak i od brouků, kteří jsou již na nebo v hostiteli. Pozitivní chemický signál indikuje vhodného hostitele, může pocházet z několika zdrojů, včetně samotného hostitelského stromu, z hmyzu nebo jejich kombinací. Jakmile hmyz vytvoří agregační feromony (Ph), v tomto případě směs alespoň dvou sloučenin, *cis*-verbenolu a 2-methyl-3-buten-2-olu (3-hydroxy-3-methylbuten), dá signál o vhodnosti hostitele (Schlyter, Birgersson, 1999).



Obr. 11: Látky působící na Lýkožrouta smrkového při výberů hostitele jako negativní signál



Obr. 12: Schéma posloupnosti možného vyhledávání hostitele lýkožroutem smrkovým (Schlyter, Birgersson, 1999)

3.8 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS)

Gas Chromatography - Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je metoda určené k separaci a určení zplynitelných látek, jejichž bod varu je do cca 400 °C. Metoda rozděluje složky mezi dvě fáze, fázi mobilní a stacionární (Zachař, Sýkora, 2008).

V GC je mobilní fázi tzv. nosný plyn, nejčastěji používány je vodík, dusík, helium nebo argon. Nosný plyn transportuje kolonou složky vzorku a separačního procesu se neúčastní (Sýkora, 2011). Stacionární fáze je pevná látka nanesená v tenké vrstvě na pevném inertním nosiči a nachází se chromatografické koloně. V dnešní době se používají především kapilární kolony. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanesená v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry (Obr. 13).

Plynový chromatograf je složen z regulátoru tlaku a průtoku, injektoru, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení, například počítače.

Separace látek plynovou chromatografií funguje tak, že kolonou se stacionární fázi stále prochází nosný plyn. Vzorek se vloží do vyhřívaného bloku injektoru, kde se odpaří a poté ve formě par za pomoci nosného plynu prochází kolonou. Složky ze vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Jednotlivé složky ze vzorku postupují kolonou svou vlastní rychlostí, která je závislá na distribuční konstantě. Látky postupně vycházejí z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru. Detektor indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Signál detektoru je vhodně upraven a plynule se registruje. Výsledný grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram.

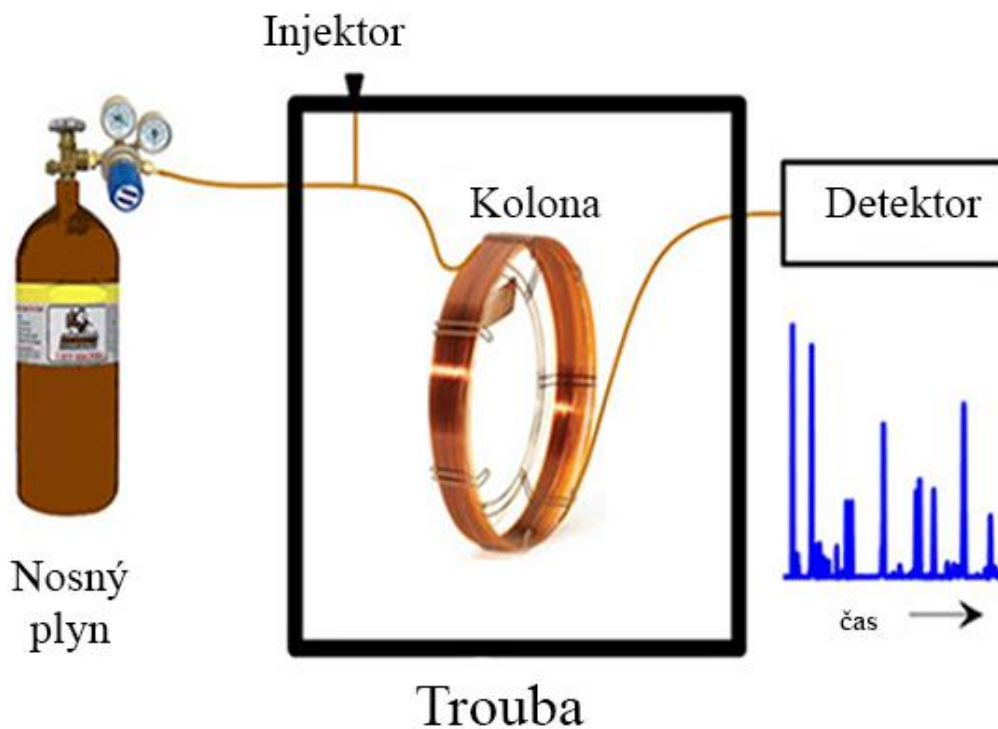
Dojde-li na chromatografické koloně k rozdělení-separaci všech n-složek analyzovaného vzorku, obsahuje chromatogram n-elučních křivek - píků těchto složek. Podle polohy píku lze vyslovit předpoklad o identitě látky (Zachař, Sýkora, 2008).

Mass Spectrometry - Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je svoji podstatou separační metoda podobná chromatografické. Rozdílem je prostředí, ve kterém dochází k separaci. Jedná se o

fyzikálně-chemickou metodu, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Je založena na vzájemném působení nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Tato technika se používá k určování látek v organické chemii, biochemii, při analýze povrchů pevných látek a anorganických materiálů. Základní součásti hmotnostního spektrometru jsou: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor částic. Dále obsahuje záznamové zařízení a zdroj vakua.

Do vstupu hmotnostního spektrometru se zavádí vzorek. V iontovém zdroji se valenční elektron nenávratně odštěpí a při velmi energetické ionizace se molekuly fragmentují. V analyzátoru se ionty separují na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z). K časovému rozdělení iontů podle m/z dochází na základě jejich odlišné doby letu od iontového zdroje k detektoru. Pokud jsou ionty těžší, jsou zároveň pomalejší a k detektoru dorazí později než ionty lehčí (Sýkora, 2011). Ionty, které jsou hmotnostním analyzátozem vybrány, jsou detektorem zapsány a tento signál je převeden do digitálního výstupu, který nazýváme hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou látku. Totožnost látek se poté určuje porovnáním spekter s knihovny.



Obr. 13: Schéma plynového chromatografu s hmotnostní detekcí GC-MS

3.9 Vojenský újezd Libavá

Polní experiment se prováděl na vojenském újezdu Libavá, kde jsou smrkové porosty momentálně postiženy těžkou kalamitou lýkožroutem smrkovým.

Vojenský újezd Libavá se nachází v Olomouckém kraji, asi 25 km severovýchodně od města Olomouc, v oblasti Nížkého Jeseníku, jehož východní část se nazývá Oderské vrchy. Celková rozloha újezdu činí 32 724 ha. Z toho je 10 434 ha využíváno pro výcvik, 1 127 ha je v pronájmu a zbylých 21 136 ha je využíváné k hospodářským účelům

V roce 1947 byly na území dnešního vojenského újezdu založeny Vojenské lesy se sídlem v Lipníku nad Bečvou a Vojenské statky se sídlem v Potštátě, které zajišťovaly hospodářské využití tohoto území. V roce 1953 došlo rozhodnutím Ministerstva národní obrany k založení výrobně hospodářské jednotky Vojenské lesy a statky - trustu - národních podniků. Podnik Vojenské lesy a statky ČR s. p. divize Lipník nad Bečvou vznikl v dnešní podobě v roce 1956 sloučením Vojenských lesů Lipník nad Bečvou a Vojenských statků Potštát. Jeho součástí se tehdy stal i lesní hospodářský celek Libavá (Vojenský újezd Libavá, 2005).

4 Metodika

Stanovení enantiomerního složení trans-4-thujanolu ve smrkové kůře

Ze tří náhodně vybraných stromů z lesního porostu v Libavé, byly odebrány tři vzorky kůry ze 40 let starých stromů smrku ztepilého. Z kmenů vybraných stromů (1,5 m nad zemí) byly vyříznuty kůry o velikosti cca 3 x 20 cm a transportovány do laboratoře v hliníkových pytlích. V laboratoři bylo 10g z každého proužku kůry zmrazeno kapalným dusíkem a poté rozdrobeno na prach v třecí misce. Tento práškový materiál byl kvantitativně přemístěn do Erlenmeyerovy baňky a postupně extrahován pomocí směsí 3 x 100 ml etheru a pentanu v poměru 3: 7. Během každé extrakce byly vzorky třepány 10 minut na třepačce. Potom se zbytek kůrového prášku odstranil filtrací a všechny tři extrakty se spojily a koncentrovaly na 0,5 ml extrakt použitím proudu argonu.

Extrakty byly analyzovány Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole plynovým chromatografem (GC) a hmotnostním spektrometrem (MS). Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu elektronové ionizace (EI) 70 eV, rozsah skenování 29-500 amu a rychlost skenování 2 skeny/s. Plynový chromatograf byl vybaven enantioselektivní cyklodextrinovou kapilární kolonou GC (Restek-Dex 325 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 um film). Teplotní program byl 50 °C - 120°C se zvyšováním o 5°C / min a zahříváno 10 min. Jako nosný plyn bylo použito helium a průtok byl udržován na 1,0 ml / min. 1 µl vzorků byl injektován v režimu dělení s děleným poměrem 20.

Eluční pořadí trans-4-thujanolových enantiomerů bylo stanoveno podle syntetických standardů připravených v laboratoři.

Odchytové experimenty v terénu

Terénní pokusy zaměřené na detekci inhibičních účinků trans-4-thujanolu byly provedeny v květnu a červnu 2017 v přírodním smrkovém lese v Libavé v České republice. Oblast byla vybrána z důvodu přemnožení lýkožrouta smrkového následkem velkého sucha. V řadě bylo umístěno 14 nárazových lapačů Ecotrap 50 m od čerstvé porostní stěny smrkového porostu (přibližné GPS souřadnice 49°38'39.2"N 17°34'13.9"E)(Obr. 14). Lapače byly od sebe vzdáleny 10 m a ve výšce 1,5 m nad zemí. Během experimentu byly lapače periodicky rotovány podle způsobu latinského čtverce a bylo získáno 14 replikací. Během každé rotace byli brouci z lapače vysypáni a uloženi v etanolu. Později byli v laboratoři spočtení a byla provedena taxonomická analýza a určení pohlaví jednotlivých brouků dle vnějších znaků.



Obr. 14: Umístění feromonových lapačů v terénu (vojenský újezd Libavá, ČR)

Bylo použito několik typů nástrah. Jako agregační feromon byla použita kombinace 2-methyl-3-buten-2-olu (MB) a *cis*-verbenolu (cV) v poměru 50: 1. Byly testovány nízké (L) a vysoké (H) feromonové dávky. Nízké a vysoké dávky odpovídaly 100 a 1000 ME (male equivalents) odpovídající k poměru odpařování: MB - 5 a 50 mg / den, cV - 0,1 a 1 mg / den. 1,8-cineol (1,8 Ci) byl použit jako negativní kontrola, protože je to známý inhibitor přitažlivosti, v dávce odpovídající poměru odpařování 10 mg / den a *trans*-4-thujanol (4-Thol), který byl testován na potenciálně inhibiční účinek, ve třech dávkách: nízká (L), střední (M) a vysoká (H), která odpovídala poměru odpařování 0,1, 1 a 10 mg / den. Všechny sloučeniny byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

Sloučeniny byly nanесeny jednotlivě do různých dávkovacích systémů (odparníků) vyrobených z polyethylenových (PE) obalů (Kartell 730, 731 a 733 vzorkové lahvičky, Kartell SpA, Itálie) a PE sáčků, s vloženými plstěnými čtverci nebo bez nich, pro různé poměry odpařování. Čisté chemikálie byly aplikovány do těchto odparníků, ze kterých se odpařovaly přes stěny nebo přes malé otvory různých průměrů předvrtaných ve víčcích lahviček s vloženými skleněnými kapilárami nebo bez nich. Přehled navrhovaných dávkovačů a jejich koncentrací je uveden v Tab. 2.

Sloučenina	Zdroj	Čistota	Dávka	Odpářovací poměr (mg / den)			Design odparník
				Nominální	Lab/ ¹	Terén/ ²	
MB	Phytopharm Ltd., Slovakia	98	Nízká	5	11.07±3.72	19,24	PE-lahvička (Kartell 730) s průměrem 2 mm. otvor ve víčku a skleněná kapilára OD 2 mm. ID 1,2
			Vysoká	50	109.66±20.17	71,12	PE-lahvička (Kartell 733)
cV	Phytopharm Ltd., Slovakia	98	Nízká	0,1	0.04±0.06	0,28	PE-lahvička (Kartell 733) s průměrem 9 mm. otvor ve víčku
			Vysoká	1	1.53±0.15	0,54	PE-lahvička (Kartell 731) 9 mm
Ci	Sigma Aldrich		Vysoká	10	9,48±4,87	8,06	32/5000 PE-lahvička (Kartell 731) 2 mm
4-Thol	Sigma Aldrich	96	Nízká	0,1	0,04±0,09	1,66	PE-lahvička (Kartell 730) uzavřena
			Střední	1	2,65±1,24	3,33	PE sáček 3,5x5 cm, tloušťka 0,25 mm, bavlněné čtverce 2,5x3,1 cm
			Vysoká	10	45,90±24,80	22,51	PE sáček 6,5x11,5 cm, tloušťka 0,05 mm, bavlněné čtverce 5,5x11 cm
Zkratky: cV – cis verbenol, MB - 2-methyl-3-buten-2-ol, Ci - 1,8-cineol, 4Thol – 4-Thu							
Poznámky: / ¹ - 3 měření, / ² - 1 měření							

Tab. 2. Přehled zdroje směsi, čistoty, návrhů odparníky a poměr odparův laboratoři a terénu

Poměry odpařování pro různé odparníky byly stanoveny nejen v laboratoři, ale i v terénu. V laboratoři byly odparníky umístěny v aerodynamickém tunelu a vystaveny proudění vzduchu o rychlosti větru 0,5 m/s. V terénu byly odparníky vystaveny venkovním podmínkám v lese. Odpářovací poměr byl stanoven na základě ztráty hmotnosti v důsledku odpařování sloučeniny (mg / den). Odparníky vystavené laboratorním i polním podmínkám byly denně váženy po dobu 14 dnů, křivky rychlosti uvolňování byly uvedeny pro každý typ odparníku a pro každý lapač byla připravená jiná návnada.

V experimentu byly použity tři typy kontrol. První slepá kontrola (lapač bez návnady), druhá „pozitivní kontrola“ (lapače vybavené agregačním feromonem, kombinace 2-methyl-3-buten-2-ol a *cis*-verbenol v poměru 50:1), a třetí „negativní kontrola“ (lapače s kombinací feromonu a anti-atraktantu 1,8-cineolem). *Trans*-4-thujanol byl testován samostatně a ve 3 různých kombinacích - s vysokou, střední a nízkou dávkou

s agregačním feromonem ve vysoké a nízké dávce. Přehled testovaných návnad je znázorněn v Tab.3.

Typ návnady	
Slepá kontrola	Prázdný lapač
Pozitivní kontrola(L)	MB+cV (L)
Pozitivní kontrola(H)	MB+cV (H)
Negativní kontrola (L)	1,8 Ci + MB+cV (L)
Negativní kontrola (H)	1,8 Ci + MB+cV (H)
Testovaný inhibitor 1	4Thol (L) + MB+cV (L)
Testovaný inhibitor 2	4Thol (M) + MB+cV (L)
Testovaný inhibitor 3	4Thol (H) + MB+cV (L)
Testovaný inhibitor 4	4Thol (L) + MB+cV (H)
Testovaný inhibitor 5	4Thol (M) + MB+cV (H)
Testovaný inhibitor 6	4Thol (H) + MB+cV (H)
Testovaný inhibitor 7	4Thol (L)
Testovaný inhibitor 8	4Thol (M)
Testovaný inhibitor 9	4Thol (H)

Tab. 3. Přehled použitých návnad v experimentu.

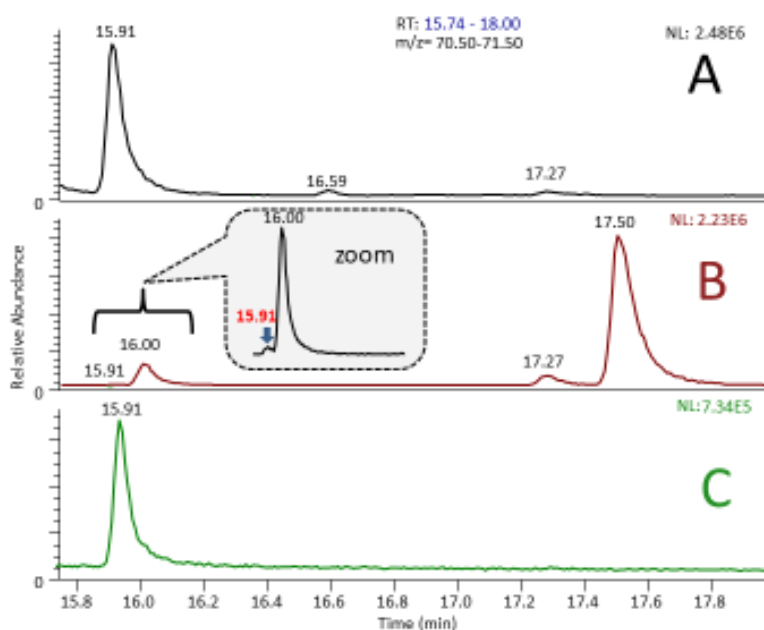
Statistické zpracování

Vzhledem k nadměrné disperzi dat byl vztah mezi návnadou a ulovenými brouky hodnocen pomocí negativně binomického modelu. Model byl ověřen diagnostickými grafy jako poměr zbytkových hodnot odchylky na predikovaných hodnotách. Rozdíly v úlovcích byly považovány za významné při $\alpha = 0,05$ (R core) pomocí softwaru Team 2016.

5 Výsledky

Enantiomerní analýza *trans*-4-thujanolu ve smrku.

Naše analýza potvrdila, že smrk ztepilý obsahuje *trans*-4-thujanol a ve 40 letém stromu má hlavní zastoupení oproti *cis*-4-thujanolu, a to v poměru 93:7. *Trans*-4-thujanol byl zastoupen pouze jako enantiomer (1*R*,4*S*,5*S*), tedy *trans*-4-thujanol. Byly porovnávány 3 vzorky, extrakt kůry ze 40 let starého smrku ztepilého (A), laboratorně připravené směsi všech 4-thujanolových stereoisomerů (B) a *trans*-4-thujanol od firmy Sigma-Aldrich (C) (Obr. 6). Syntetický *trans*-4-thujanol, zakoupený pro terenní experiment, obsahoval čistý (+)-(1*R*,4*S*,5*S*) enantiomer.



Obr. 14: Chromatogramy enantioselektivní analýzy GC-MS (Cyclodex-b kolona) smrkového extraktu a syntetických standardů.

Odchytové experimenty v terénu

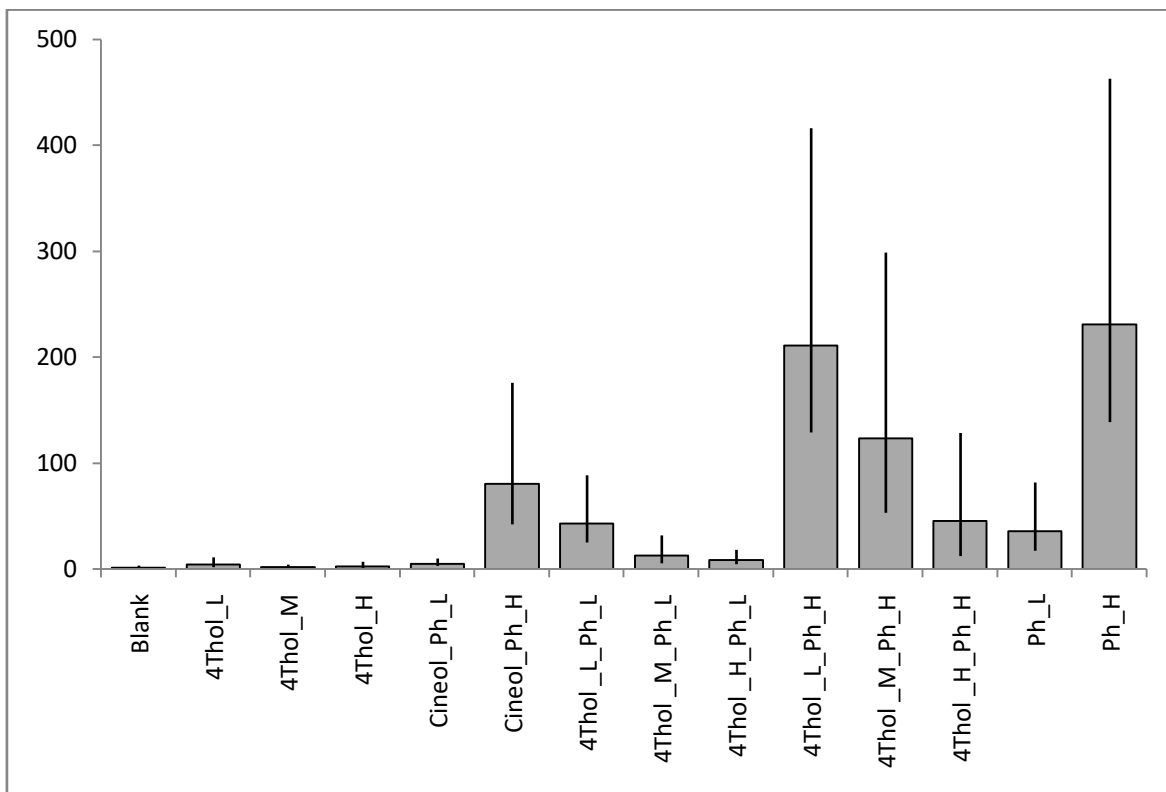
Úlovky v pastích s různými nástrahami byly statisticky velmi významné ($n=196$; $df=13$; $p = 0,894$). Nejnižší počet chycených brouků byl v prázdné pasti, což se dalo očekávat, z důvodu absence jakékoliv látky. Stejně se dal očekávat i nejvyšší odchyt brouků v lapačích s vysokou koncentrací samotného agregáčního feromonu. U návnad, obsahujících pouze čistou látku *trans*-4-thujanol, byly nejmenší úlovky pozorovány při střední koncentraci. Lapače s návnadou střední a vysoké dávky *trans*-4-thujanolu byly

podobně neatraktivní. Úlovky v lapačích s nízkými dávkami *trans*-4-thujanolu byly vyšší než v prázdných lapačích (blízko k hladině významnosti $p < 0,1$), což naznačuje nízkou přitažlivost, resp. náhodné přistání brouků. Úlovky tykající se kombinace anti-atraktantu a feromonu byly následující: nejvyšší úlovky byly pozorovány u pastí se směsí vysoké koncentrace agregačního feromonu a nízkou dávkou *trans*-4-thujanolu. Atraktivita feromonu se snížila, když byly přidány *trans*-4-thujanol nebo 1,8-cineol. Antiatraktivní účinky *trans*-4-thujanolu a 1,8-cineolu byly podobné. U *trans*-4-thujanolu byl nejvyšší účinek zaznamenán při kombinaci vysoké dávky *trans*-4-thujanolu s vysokou či nízkou koncentrací feromonu, stejně jako u 1,8 -cineolu. Obě sloučeniny významně snížily počet zachycených brouků. Přehled chycených brouků se nachází v Tab. 4 a grafech 1 - 3. Podle výsledků bylo v pastích, obsahující směs feromonu a *trans*-4-thujanol, chyceno více samic než samců. U variant s nízkou koncentrací feromonu bylo v průměru 36% samic a u varianty s vyšší koncentrací 27% samic.

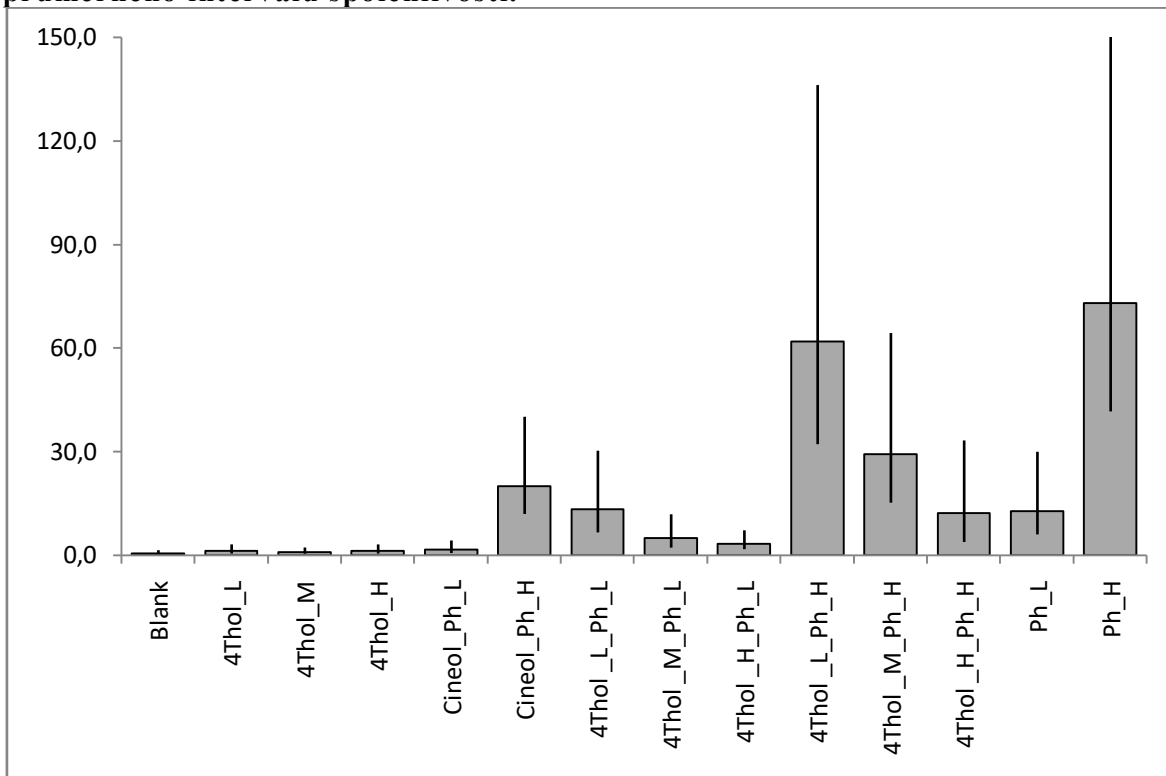
Sloučenina	Celkový počet		Samci		Samice	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Blank	1,5	1,7	0,5	0,9	1,0	1,0
4Thol_L	4,4	6,6	1,2	1,9	3,2	4,8
4Thol_M	2,1	2	0,9	1,3	1,2	1,1
4Thol_H	2,6	4,2	1,2	1,9	1,4	2,2
Cineol_Ph_L	4,9	5	1,6	2,6	3,3	3,6
Cineol_Ph_H	80,3	95,4	19,9	20,1	60,4	73,5
4Thol_L_Ph_L	43,1	45,3	13,3	16,9	29,8	32,3
4Thol_M_Ph_L	12,9	18,8	4,9	6,9	8,0	12,3
4Thol_H_Ph_L	8,4	9,7	3,3	3,9	5,1	6,0
4Thol_L_Ph_H	210,9	205,1	61,8	74,3	149,1	143,2
4Thol_M_Ph_H	123,2	175,4	29,2	35,1	94,0	138,4
4Thol_H_Ph_H	45,4	83	12,2	21	33,2	59,6
Ph_L	35,6	46	12,8	17,1	22,8	27,6
Ph_H	231,2	231,5	72,9	78,3	158,3	145,4

Tab. 4 Průměrné počty *I. typographus* L. odchyceného v lapačích během období odběru vzorků pro různé varianty návnad a odpovídající směrodatné odchylky.

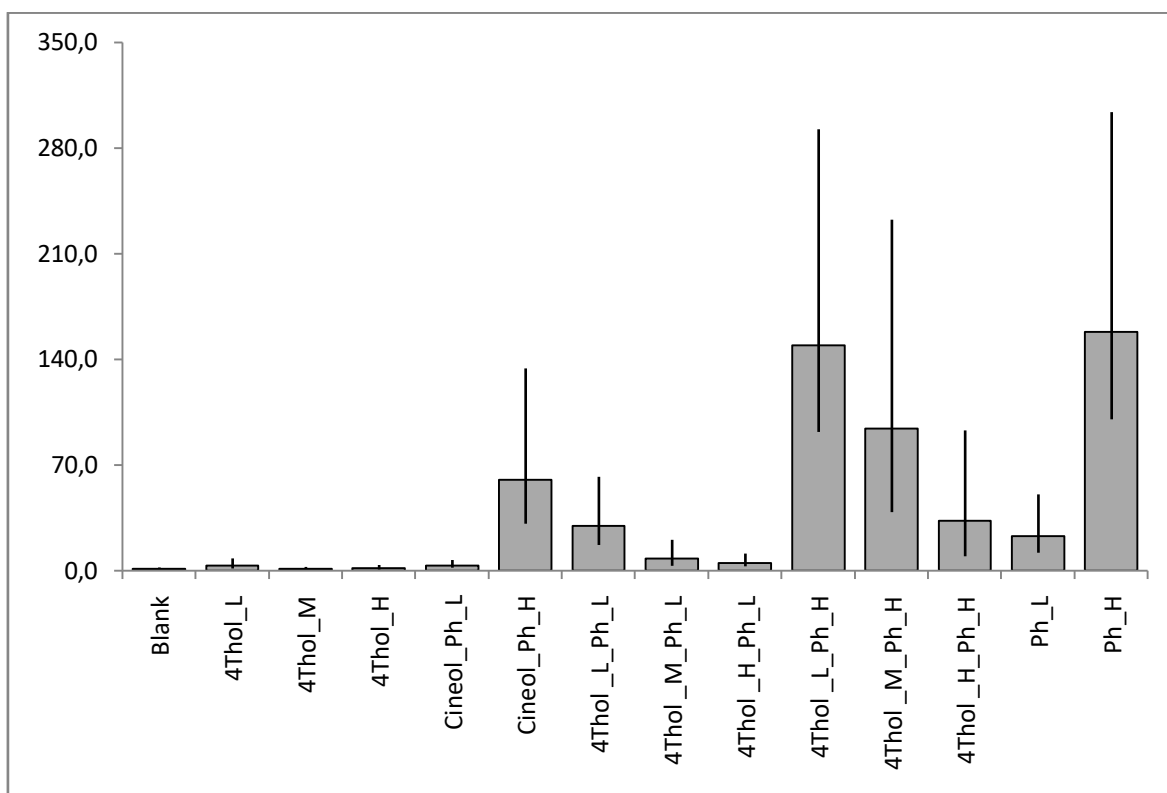
Graf 1. Průměrný počet odchycených brouků *Ips typographus* L. na lapače během období odběru vzorků pro různé nástrahy. Svislé čáry představují 95% průměrného intervalu spolehlivosti.



Graf 2. Průměrný počet odchycených samic *Ips typographus* L. na lapače během období odběru vzorků pro různé nástrahy. Svislé čáry představují 95% průměrného intervalu spolehlivosti.



Graf 3. Průměrný počet odchytených samic *Ips typographus* L. na lapače během období odběru vzorků pro různé nástrahy. Svislé čáry představují 95% průměrného intervalu spolehlivosti.



6 Diskuze

Enantiomerní analýza potvrdila, že se v kůře smrků nachází enantiomer (1*R*,4*S*,5*S*), tudíž ten stejný, který se používá ke komerčnímu využití. V terénním experimentu bylo prokázáno, že (+)-*trans*-4-thujanol má významný inhibiční efekt na přitažlivost lýkožrouta ke svému agregačnímu feromonu a snižuje počet odchycených brouků. Jedná se tedy o anti-atraktant, jak je vidět v porovnání *trans*-4-thujanol s feromonovým atraktantem a prázdného lapače, protože počet brouků je vyšší než v prázdném lapači. Kdyby se jednalo o repelent, musely by být počty nižší než u prázdné pasti.

1,8-cineol nebyl v pokusu testován samostatně, ale vždy pouze v kombinaci s agregačním feromonem a dávka 1,8-cineolu odpovídala nejvyšší koncentraci testované pro *trans*-4-thujanol, což bylo potvrzeno i vzájemným porovnáním těchto variant (Cineol_Ph_L vs. Cineol_Ph_H: kontrast χ^2 z value = 6,687; $p < 0,001$). Při nízké koncentraci anti-atraktantu a agregačního feromonu měly 1,8-cineol a *trans*-4-thujanol stejný vliv na počet odchycených jedinců. Zvýšení koncentrace agregačního feromonu vedlo u 1,8-cineol k statisticky významně vyššímu množství odchycených brouků. Z výsledků lze vyčíst, že (+)- *trans*-4-thujanol má při vyšších dávkách, stejný inhibiční účinek jako 1,8 - cineol. Při kombinaci vyšších dávek anti-atraktantů s vyšší dávkou feromonu, byl odchyt nižší u *trans*-4-thujanolu, avšak vyšší repelentní efekt byl statisticky neprůkazný (4Thol_H_Ph_H: kontrast χ^2 z value = - 1,411; $p > 0,05$).

Blažytě-Čereškienė et al. (2015) zaznamenali větší EAG amplitudu, při měření aktivity u samic lýkožrouta smrkového, což by potvrzovalo data Anderssona et al. (2009) o tom, že samice mají vyšší podíl receptorových neuronů naladěných na sloučeniny hostitelského rostlinného původu než samci. To by mohlo znamenat, že jsou samice citlivější na *trans*-4-thujanol a měly by se mu více vyhýbat a poměr samic a samců by se měl snižovat (Blažytė-Čereškienė et al. 2015). Tato hypotéza nebyla potvrzena, protože u všech variant byla průměrné zastoupení samic okolo 70%. Poměr se tudíž nesnižoval.

Trans-4-thujanol není složkou, která se nachází pouze ve smrku ztepilém, je také sekundárním produktem látkové přeměny metabolismu mnoha dalších různých rostlinných druhů (Bhatia et al. 2008) vytvořených enzymatickou cyklizací geranylpyrofosfátu (Hallahan, Croteau, 1988). Mezi těkavými látkami vycházející z tenkých polen, napadené lýkožroutem smrkovým, byl také nalezen *trans*-4-thujanol (Francke et al. 1995) a také je přítomný mezi těkavými látkami spojenými s napadením smrku broukem *Polygraphus poligraphus* L. (Kohnle et al. 1985; Rahmani et al. 2015). *Trans*-4-thujanol je

semiochemická látka a je důležitá i pro jiné druhy hmyzu. Například slouží jako kairomonový signál pro motýla *Papilio polyxenes* (Fabricius, 1775) (Baur et al. 1993). V kombinaci s některými dalšími oxidovanými monoterpeny a benzenoidy, je součástí signálu, který indikuje 3-4 týdenní kůrovcové napadení a silný kairomonální signál pro mnohé predátory a parazitoidy těchto brouků (Sullivan et al. 2000; Pettersson, 2001; Pettersson, Boland, 2003).

Je možné, že antiaktraktivní účinky *trans*-4-thujanolu se mohou na různých místech a při různých podmínkách lišit. Dále je třeba zjistit, zda má tato látka stejný vliv na obě pohlaví.

7 Závěr

Primárním úkolem bylo zjištění antiatraktivní aktivity *trans*-4- thujanolu u druhu *Ips typographus* L. a zjištění enantiomerní čistoty této látky emitované smrkem. Na lesním vojenském újezdě v Libavé byly odebrány tři vzorky kůry ze smrku ztepilého pro vyhodnocení obsahu *trans*-4-thujanolu ve stromu. Na této lokalitě bylo nainstalováno 14 lapačů s různými typy návnad a provedeno 14 replikací po způsobu latinského čtverce. Pomocí GS-MS byla zjištěna přítomnost *trans*-4-thujanolu v kůře ve stejné formě, která je komerčně dostupná. Statický významný účinek anti-atraktantu se projevil při nejvyšší koncentraci *trans*-4-thujanolu s vysokou dávkou agregačního feromonu. Tento experiment potvrdil, že *trans*-4-thujanol je efektivní nejen v laboratorních podmínkách ale také v terénu. Aktivita tohoto antitraktantu byla shodná s aktivitou kontrolního vzorku 1,8-cineolem, který byl dříve jinými autory potvrzen jako účinný anti-atraktant.

U nově testované látky jsme stanovili vysokou účinnost jako anti-atraktantu, což ji předurčuje k dalším testům při optimalizaci antiatrakčních směsí pro lýkožrouta smrkového, které mohou být v budoucnu použity při managementu tohoto brouka.

Seznam literatury a použitých zdrojů

Česko. Ministerstvo zemědělství. Vyhláška č. 236 ze dne 18. července 2000, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 101/1996 sb., kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor služebního odznaku a vzor průkazu lesní strážce. *Sbírka zákonů České republiky*. 2000, částka 72, s. 3418-3432.

Česko. Vláda. Zákon č. 289/1995 Sb., o lesích a o změně a doplnění některých zákonů, v platném znění. *Sbírka zákonů České republiky*. 1995, částka 76, s. 3946-3984.

ČSN 481000, Ochrana lesa proti kůrovcům na smrku. Praha: Český normalizační institut, 2005. 8 s.

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

ANDERSSON, M.N.; BINYAMEEN, M.; SADEK, M.M.; SCHLYTER, F. 2011. Attraction modulated by spacing of pheromone components and anti-attractants in a bark beetle and a moth. *Journal of Chemical Ecology*, 2011, vol. 37, s. 899-911.

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

ANDERSSON, M.N.; LÖFSTEDT, C.; NEWCOMB, R.D. Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3.2015, s. 53.

AZEEM, M.; RAJARAO, G.K.; NORDENHEM, H.; NORDLANDER, G.; BORG-KARLSON, A.K. 2013. *Penicillium expansum* volatiles reduce pine weevil attraction to host plants. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, vol. 32, s. 120-128.

BAKKE, A. Spruce bark beetle, *Ips typographus*: Pheromone production and field response to synthetic pheromones. *Naturwissenschaften*, 1976, vol. 63, s. 92.

BAKKE, A.; FRÖYEN, P.; AND SKATTEBÖL, L. Field response to a new pheromonal compound isolated from *Ips typographus*. *Naturwissenschaften*, 1977, vol. 64, s. 98-99.

BAUR, R.; FEENY, P.; STÄDLER E. Oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly: Identification of electrophysiologically active compounds in carrot volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, vol. 19, s. 919-937.

BHATIA, S.P.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on 4-thujanol. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, s. 295-296.

BLAŽYTĚ-ČEREŠKIENĚ. L.; APŠEGAITĚ, V.; RADŽIUTĚ, S. Electrophysiological and behavioural responses of *Ips typographus* (L.) to trans-4-thujanol—a host tree volatile compound. *Annals of Forest Science*, 2015, vol. 73, s. 247-256.

BOHÁČ, J. *Biodiverzita a udržitelný rozvoj Šumavy*. [online]. České Budějovice, 2006. [cit. 2019-01-13]. Dostupné z [www: http://www.infodatasys.cz/vav2003/sumava/biodiverzita-Sumava.pdf](http://www.infodatasys.cz/vav2003/sumava/biodiverzita-Sumava.pdf)

BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; STAMM, D.; HECKER, E. Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. *Z. Naturforschg*, 1959, vol. 14, s. 283-284

BYERS, J.A. Chemical ecology of bark beetles. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1989, vol 43, s. 271-283

BYERS, J. A.; ZHANG, Q.-H.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, B. Volatiles from non-host birch trees inhibit pheromone response in spruce bark beetles. *Naturwissenschaften*, 1998, vol. 85; s. 557-561.

BYERS, J.A. Chemical ecology of bark beetles in a complex olfactory landscape. In: LIEUTIER, F.; DAY, K.R.; BATTISTI, A.; GR_EGOIRE, J.-C.; EVANS, H.F. (eds.). *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, s. 89-134. ISBN 978-1-4020-2241-8.

BYERS, J.A.; ZHANG, Q.H. Chemical ecology of bark beetles in regard to search and selection of host trees. In: Liu, T., Kang, L. (eds.). *Recent Advances in Entomological Research*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011, s. 150-190.

DVOŘÁKOVÁ, M; VALTEROVÁ, I.; VAŇEK, T. Monoterpeny v rostlinách. *Chem. Listy*. 2011. Vol. 105, s. 839-845.

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

FRANCKE, W.; BARTELS, J.; MEYER, H. Semiochemicals from bark beetles: New results, remarks, and reflections. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, vol. 21, s. 1043-1063

GÖTHLIN, E.; SCHROEDER, L.M.; LINDELÖW, A. Attacks by *Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus* on windthrown spruces (*Picea abies*) during the two years following a storm felling Scandinavian. *Journal of Forest Research*, 2000, vol. 15, s. 542 - 549.

GRODZKI, W.; JAKUŠ, R.; LAJZOVÁ, E.; SITKOVÁ, Z.; MACZKA, T. Effects of intensive versus no management strategies during an outbreak of the bark beetle *Ips typographus* (L.) (Col.: Curculionidae, Scolytinae) in the Tatra Mts. in Poland and Slovakia. *Annals of Forest Science*, 2006, vol. 63, s. 55-61.

IGNELL, R.; HANSSON, B. Insect olfactory neuroethology: an electrophysiological perspective. In: CHRISTENSEN, T.A. (eds.). *Methods in insect sensory neuroscience (frontiers in neuroscience)*. Boca Raton: CRC Press, 2004, s. 319-348. ISBN 978-08-493-2024-8.

HACKSTEIN, E.; VITÉ, J.P. Pheromonbiosynthese und Reizkette in der Besiedlung von Fichten durch den Buchdrucker. *Ips typographus*. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, 1978, vol. 1, s. 185-188.

HALLAHAN, T.W.; CROTEAU, R. Monoterpene biosynthesis: Demonstration of a geranyl pyrophosphate: Sabinene hydrate cyclase in soluble enzyme preparations from sweet marjoram (*Majorana hortensis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, vol. 264, s. 618-631.

HALLEM, E.; CARLSON, J. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, 2006, vol. 12, s. 143-160.

HANSSON, B.; HALLBERG, E.; LÖFSTEDT, C.; STEINBRECHT, R. Correlation between dendrite diameter and action potential amplitude in sex pheromone specific receptor neurons in male *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Cell*, 1994, vol. 26. s. 503-512.

JAKUŠ, R.; BLAZENEC, M.; HOLUŠA, J. *Princípy ochrany dospelých smrekových porastov pred podkôrnym hmyzom*. [Zvolen]: Ústav ekológie lesa, Slovenská akadémia vied, 2015, s. 231. ISBN 978-80-89408-21-4

KEIL, T.A. Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In: HANSSON, B. S. (eds.). *Insect olfaction*. New York: Springer, 1999, s. 5-47. ISBN 35-406-5034-2

KINDLMANN, P.; MATĚJKA, K.; DOLEŽAL, P. *Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody*. Praha: Karolinum, 2012. S. 328. ISBN 978-80-246-2155-5.

KNÍŽEK, M.; ZAHRADNÍK, P. *Kůrovci na jehličnanech*. [online]. [Praha], Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o., 2004. [cit. 2019-01-13]. Dostupné z WWW <http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2004/2004_kurovci.pdf>.

KŘÍSTEK, J.; URBAN, J. *Lesnická entomologie*. 2. vydání. Praha: Academia, 2013. 445 s. ISBN 978-80-200-2237-0.

KUDELA, M. *Atlas lesního hmyzu: škůdci na jehličnanech*. 1. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1970. 278 s.

LINDGREN, B.; RAFFA, K. Evolution of tree killing in bark beetles (Coleoptera: Curculionidae): trade-offs between the maddening crowds and a sticky situation. *The Canadian Entomologist*, 2013, vol. 145, s. 471-495.

LUBOJACKÝ, J.; KNÍŽEK, M.; LIŠKA, J. *Symptomy napadení stromu kůrovci ve smrkových porostech*. [online]. [Praha], Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o., 2018. [cit. 2019-03-13]. Dostupné z WWW<http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2004/2018_kurovci_symptomy_napadeni_kurovcoveho_drivi_ve_smrkovych_porostech.pdf>.

MARTIN, D.M.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiology*, 2003, vol. 132, s. 1586-1599.

MULOCK, P.; CHRISTIANSEN, E. The threshold of successful attack by *Ips typographus* on *Picea abies*: A field experiment. *Forest Ecology and Management*, 1986, vol. 14, s. 125-132.

OLSSON, SH.; HANSSON, B. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. *Methods in molecular biology*, 2013, vol. 1068, s. 157-177

PAINE, T.D.; STEPHEN, F.M.; TAHA, H.A. Conceptual model of infestation probability based on bark beetle abundance and host tree susceptibility. *Environmental Entomology*, 1984, vol. 13, s. 619-624.

PETTERSSON, E.M. Volatiles from potential hosts of *Rhopalicus tutela* a bark beetle parasitoid. *Journal of Chemical Ecology*, 2001, vol. 27, s. 2219-2231.

PETTERSSON, E.M.; BOLAND, W. Potential parasitoid attractants, volatile composition throughout a bark beetle attack. *Chemoecology*, 2003, vol. 13, s. 27-37.

PFEFFER, A. *Fauna ČSR*. 1. vydání. Praha: Československá akademie věd, 1955. 324 s.

PFEFFER, A. *Kůrovcovití (Scolytidae) a jádrohlodovití (Platypodidae)*. 1. vydání. Praha: Academia, 1989. 137 s. ISBN 80-200-0089-5.

PFEFFER, A., SKUHRAVÝ, V. The bark beetle (*Ips typographus* L.) (Col., Scolytidae) and its problem in the Czech Republic. *Anz. Schadlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 1995, vol. 68, s. 151-152.

POSPÍŠIL, T. Aktuální situace chřadnutí smrkových porostů a kůrovcová kalamita z pohledu Lesů ČR, *Ochrana přírody*, 2018, vol.2, s. 38-41.

POSTNER, M. Scolyidae, Borkenkäfer. In: SCHWENKE, W. (eds.). *Die Forstschadlinge Europas*, Hamburg-Berlin: 2. Paul Parey, 1974, s. 334-482.

RAFFA, K.; ANDERSSON, M.N.; SCHLYTER, F. Host selection by bark beetles: playing the odds in a high-stakes game. *Advances in Physiology Education*, 2016, vol. 50, s. 1-74.

RAHMANI, R.; HEDENSTRÖM, E.; SCHROEDER, M. SPME collection and GC-MS analysis of volatiles emitted during the attack of male *Polygraphus poligraphus* (Coleoptera, Curculionidae) on Norway spruce. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 2015, vol. 70, s. 265-273.

RENWICK, J. A. A.; HUGHES. P. R.; KRULL. I. S. Selective production of cis- and trans-verbenol from (-)- and (+)- α -pinene by a bark beetle. *Science*, 1976, vol. 199, 199-201.

ROELOFS, W.L. Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. In HUMMEL, H.E.; MILLER, T.A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Berlin: Springer-Verlag, 1984, s. 131-159. ISBN 978-1-4612-9743-7

SAFRANYIK, L.; LINTON, D.A.; SHORE, T.L. Temporal and vertical distribution of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) captured in barrier traps at baited and unbaited lodgepole pines the year following attack by the mountain pine beetle. *The Canadian Entomologist*, 2000, vol. 132, s. 799-810.

SAINT-GERMAIN, M.; BUDDLE, C.M.; DRAPEAU, P. Primary attraction and random landing in host-selection by wood-feeding insects: a matter of scale. *Agricultural and Forest Entomology*, 2007, vol. 9, s. 227-235.

SCHIEBE, C. *Attraction and resistance in the Picea abies—Ips typographus system*. Acta Universitatis agriculturae Sueciae (1652-6880), 91 Department of Plant Protection Biology, Alnarp:Swedish University of Agricultural Sciences, 2012, 57s.

SCHIEBE, C.; HAMMERBACHER, A.; BIRGERSSON, G.; WITZELL, J.; BRODELIUS, P.E.; GERSHENZON, J.; HANSSON, B.S.; KROKENE, P.; SCHLYTER, F. Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia*, 2012, vol. 170, s. 183-198.

SCHLYTER, F.; CEDERHOLM, I. Separation of the sexes of living spruce bark beetles, *Ips typographus* (L.), (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 2009, vol. 92, s. 42 - 47.

SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. Forest beetles. In: HARDIE, J.; MINKS, A.K. (eds.). *Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants*. Oxford:CAB International, 1999, s. 113-148.

SCHNEIDER, D. Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. *Experientia*, 1957, vol. 13. s. 89-91.

SILVERSTEIN, R.M.; RODIN, J.O.; WOOD, D.L. Sex attractants in frass produced by male *Ips confusus* in ponderosa pine. *Science*, 1966, vol. 154, s. 509-510.

SKUHRAVÝ, V. *Lýkožrout smrkový Ips typographus (L.) a jeho kalamity*. Praha: Agrospoj, 2002. ISBN 80-7084-238-5.

SULLIVAN, B.T.; PETTERSSON, E.M.; SELTMANN, K.C.; BERISFORD, C.W. Attraction of the Bark Beetle Parasitoid *Roptrocercus xylophagorum* (Hymenoptera:

Pteromalidae) to Host-Associated Olfactory Cues. *Environmental Entomology*, 2000, vol. 29, s. 1138-1151.

SÝKORA, R. *Využití GC/MS při analýze léčiv*. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, 2011, s. 69.

TØMMERÅS, B. Å. Specialization of the olfactory receptor cells in the bark beetle *Ips typographus* and its predator *Thanasimus formicarius* to bark beetle pheromones and host tree volatiles. *Journal of Comparative Physiology A*, 1985, vol. 157, s. 335-342.

VITÉ, J.P.; BAKKE, A.; RENWICK, J.A.A. Pheromones in *Ips* (Coleoptera: Scolytidae): Occurrence and production. *The Canadian Entomologist*, 1972, vol. 104. s. 1967-1975.

VISSER, J.H.; VAN STRATEN, S.; MAARSE, H. Isolation and identification of volatiles in the foliage of potato, *Solanum tuberosum*, a host plant of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Chemical Ecology*, 1979, vol. 5, 13-25.

VOJENSKÝ ÚJEZD LIBAVÁ. *Vojenský újezd Libavá* [online]. 2005. [cit. 2018-02-05] Dostupné z WWW: <http://www.vojujezd-libava.cz/vojensky-ujezd-libava/d-3381>

WERMELINGER, B. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecology and Management*, 2004, vol. 202, s. 67-82.

WOOD, D.L.; BROWNE, L.E.; SILVESTEIN, R.M.; RODIN, J.O. Sex pheromones of bark beetles. I. Mass production, bio-assay, source, and isolation of the sex pheromone of *Ips confusus* (LeC.). *Journal of Insect Physiology*. 1966, vol. 12. s 523-536.

WOOD, D.L. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology*, 1982, vol. 27. s. 411-446.

ZAHRADNÍK, P. *Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.)* [online]. [Praha], Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o., 2007. [cit. 2016-03-20]. Dostupné z WWW: <http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2007/2007_lykozrout_smrkovy.pdf>.

ZAHRADNÍK, P.; GERÁKOVÁ, M. *Lýkožrout smrkový Ips typographus (L.)*. [online]. [Praha], Nakladatelství a vydavatelství Lesnická práce, s. r. o., 2010.

ZAHRADNÍK, P.; ZAHRADNÍKOVÁ M. *Použití feromonových lapačů v ochraně lesa proti lýkožroutu smrkovému*. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, 2016. s. 23. ISBN 978-80-7417-103-1

ZHANG, Q.H.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. Bark volatiles from nonhost angiosperm trees of spruce bark beetle, *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolytidae): Chemical and electrophysiological analysis. *Chemoecology*, 2000, vol. 10, s. 69-80.

ZHANG, Q.H.; SCHLYTER, F. Redundancy, synergism, and active inhibitory range of non-host volatiles in reducing pheromone attraction in European spruce bark beetle *Ips typographus*. *Oikos*, 2003, vol. 101, s. 299-310.

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

ZACHAŘ, P., SÝKORA, D. *Plynová chromatografie*. Vysoká škola chemicko-technická v Praze, 2011, s. 16.