ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020 Bc. PETRA MAJEROVÁ

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE

Behaviorální pokusy a atraktivita vybraných volatilních látek u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)

Behavioral tests and atractivity towards volatile compounds in bark beetles (*Ips typographus*)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Ing. Hana Šípková, Ph.D.
Konzultant: Ing. Jiří Synek, Ph.D.
Diplomant: Bc. Petra Majerová

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Petra Majerová

Inženýrská ekologie
Ochrana přírody

Název práce

Behaviorální pokusy a atraktivita vybraných volatilních látek u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)

Název anglicky

Behavioral tests and atractivity towards volatile compounds in bark beetles (*Ips typographus*)

Cíle práce

1. Rešeršní část diplomové práce bude věnována souhrnu dostupných informací o primární atraktivitě smrku pro lýkožrouta smrkového a možnostech behaviorálních testů kůrovců
2. Osvojit si základní principy behaviorálních experimentů v laboratoři (manipulace s živými brouky, standardizace výběru, fyziologie, vymezení cirkadiánní aktivity brouků, vliv fyziologických (hladovění, pohlaví) a behaviorálních podmínek (světlo, tma) na jejich aktivitu, zásady prevence kontaminace laboratoře testovanými látkami, standardizace postupů přípravy návnad a experimentálních podmínek.
3. Ověřit behaviorální odpovědi kůrovců na nabízené volatilní látky
4. Výsledky porovnat s dostupnou literaturou a vyvodit závěry.

Metodika

Chemická ekologie hmyzu se studuje behaviorálními testy v terénu či laboratoři. Cílem této práce je zjistit, jakou odezvu budou mít kůrovci na nabízené návnady (volatilní látky – VOC) pomocí olfaktometrů (arének) v laboratoři. Lýkožrouti budou vpouštěni do jednotlivých olfaktometrů a po určitou vymezenou dobu bude sledována jejich reakce. Případná atraktivita nebo repelentní účinek k testovaným návnadám budou kvantifikovány a výsledky budou statisticky vyhodnoceny pomocí programu R – GLM a konfrontovány s dosavadními poznatky.

Doporučený rozsah práce

cca 40 stran

Klíčová slova

lýkožrout smrkový, bark beetle, volatile compounds (VOC)

Doporučené zdroje informací

Andersson M.N., Larsson M.C., Schlyter F., 2009: Specificity and redundancy in the olfactory systems of the bark beetles Ips typographus: Single-cell responses to ecologically relevant odors. Journal of Insect Physiology. 55: 556-567

Ghmire R.P., Kivimäenpää M., Blomqvist M., Holopainen T., Lyytikäinen-Saarenmaa P., Holopainen J.K., 2016: Effect of bark beetle (@Ips typographus L.@) attack on bark VOC emissions of Norway spruce (Picea abies Karst.) trees. Atmospheric Environmnet, 126: 145-152.

Jakuš R., Blaženec M., 2011: Response of walking spruce bark beetles Ips typographus to host odours. Folia Ecologica, 1:38-45.

Kandasamy D., Gershenzon J., Andersson M., Hammerbacher A., 2019: Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (Ips typographus) with its fungal symbionts. The ISME Journal, 13:1788–1800.

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

ing. Jiří Synek, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 22. 11. 2019

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 11. 2019

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 22. 06. 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: ***Behaviorální pokusy a atraktivita vybraných volatilních látek u lýkožrouta smrkového (Ips typographus)*** vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

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

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

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

V Praze dne 22. 06. 2020

…….

Poděkování

Tímto bych moc ráda poděkovala vedoucí práce Ing. Haně Šípkové, Ph.D. za její cenné rady a připomínky, věcné konzultace, poskytnutí materiálů, trpělivost a odborné vedení při práci. Dále velmi děkuji Ing. Jiřímu Synkovi, Ph.D. za cenné praktické rady, věcné konzultace k metodice, pomoc (při sestavování olfaktometru, determinaci pohlaví u lýkožrouta) a vytvoření kvalitních podmínek pro měření. Dále bych chtěla poděkovat za konzultace při statistickém zpracování Ing. Petrovi Chajmovi a Mgr. Martinovi Sládečkovi. Mé poděkování patří též Ing. Blance Kalinové, CSc. a Ing. Anně Jirošové, Ph.D. za umožnění měření v laboratoři na Fakultě lesnické a dřevařské v Praze. Za jejich odborné rady a poskytnutí živého materiálu k testování a celému týmu Extemit-K.

V neposlední řadě děkuji mé rodině, příteli a blízkým za jejich trpělivost a velkou podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je významným činitelem v lesním ekosystému. Svým působením při velkých kalamitách, kdy je hustota populace lýkožrouta extrémně vysoká, dokáže udolat i velmi silné a vitální stromy a tím způsobuje rozsáhlé odumírání lesa. A proto je lýkožrout smrkový považován za jednoho z hlavních lesních škůdců smrkových porostů nejen v Evropě. Cílem práce bylo ověření behaviorální odpovědi lýkožrouta smrkového na nabízené atraktivní látky, které by mohly být využity při omezování počtu jedinců v populaci. Kůrovci mají silně vyvinutou chemickou komunikaci a velmi citlivě reagují na volatilní organické látky (VOC´s). Behaviorální chování lýkožrouta bylo otestováno při laboratorních podmínkách ve speciálním olfaktometru s otevřenou a uzavřenou arénkou. Pozorovaný jedinec byl testován proti proudu rozptýlené chemické látky v aréncе a byla zaznamenána jeho olfaktorická reakce - buď byl látkou lýkožrout přiváben či odpuzován. V této práci byly ověřeny dva druhy feromonových návnad, komerční agregační feromon Pheagr IT Extra s účinnými látkami (S)-*cis*-verbenol a (+/-) ipsdienol a feromon připravený skupinou Extemit K (syntetická směs (4S) *cis*-verbenolu a 2 -methyl-3-buten-2-olu). Předpokládá se, že látka (4S)-*cis*-verbenol by mohla hrát zásadní roli při ochraně smrkových dřevin a při ovlivnění výběru stromů brouky. Byla pozorována behaviorální odpověď na feromony z 91 % celkového počtu sledovaných jedinců. Na základě naměřených dat je zřejmé, že lýkožrout smrkový reaguje přibližně stejně citlivě na oba použité feromony. Pomocí behaviorálních testů bylo zjištěno, že odpověď testovaných jedinců na obě nabízené volatilní látky, je závislá na pohlaví. Pozitivní olfaktorická reakce byla zaznamenána pouze u samic lýkožrouta smrkového.

Klíčová slova:

lýkožrout smrkový, kůrovci, volatilní látky

Abstract:

The European spruce bark beetle, *Ips typographus*, is an essential factor of every spruce forest ecosystem. However, at extremly high population densities, *Ips typographus* can defeat even very strong and vital trees, during large calamities and causes large forest death. Therefore is *Ips typographus* considered the most important forest pest of spruce forest not just in Europe. The aim of the work was to verify the behavioral response of *Ips typographus* to the offered attractive substances, which could be used to reduce numbers of his population. Bark beetles have a strongly developed chemical communication and sensitively react to volatile organic compounds (VOC´s). The observed individual beetle was tested against (down wind) dispersed chemical substance in the arena and his olfactory response was recorded - the attractivity or repellency. Here were tested two different odours, commercial aggregation pheromone Pheagr IT Extra with active substances (4S)-*cis*-verbenol and (+/-) ipsdienol and pheromone prepared by the collective of Extemit-K (synthetic blend that consists of cis-verbenol a 2 -methyl-3-buten-2-ol). This study supposes with that (4S)-*cis*-verbenol could play major role in the protection of spruce trees and the preference host trees be bark beetle. Behavioral response to pheromones was observed in 91% of the total number of beetles. Based on the measured data, it is clear that the *Ips typographus* reacts approximately equally sensitively to both used pheromones. Using behavioral tests it was found that the olfactory response of tested beetlea to both offered volatile substances is dependent on sex. A positive olfactory reaction was observed only for female *Ips typographus*.

Key words:

Ips typographus, bark beetles, volatile organic compounds.

Obsah

1 Úvod 1
2 Cíl práce 2
3 Literární rešerše 3
3.1 Kůrovci (Scolytinae) 3
3.2 Lýkožrout smrkový - *Ips typographus* (De Geer, 1775) 8
3.2.1 Systematické zařazení 8
3.2.2 Morfologie 10
3.2.3 Geografické rozšíření druhu 12
3.2.4 Biologie druhu 13
3.2.5 Přirození nepřátelé 16
3.3 Chemická komunikace 17
3.3.1 Syntéza feromonů 22
3.3.2 Agregační feromony 25
3.3.3 Antiagregační feromony 25
3.4 Behaviorální pokusy 27
3.4.1 Olfaktometrie 28
3.4.2 Druhy olfaktometru 28
4 Metodika 32
4.1 Princip behaviorálních pokusů s lýkožroutem smrkovým 32
4.2 Biologický materiál 33
4.3 Typy použitých olfaktometrů 34
4.3.1 Olfaktometr s otevřenou arénkou 34
4.3.2 Olfaktometr s uzavřenou arénkou 35
4.4 Feromonové návnady 36
4.5 Provedené experimenty v olfaktometru s otevřenou arénkou 37
4.6 Provedené experimenty v olfaktometru s uzavřenou arénkou 38
4.7 Statistické zpracování dat 41
5 Výsledky 42
5.1 Výsledky experimentů v olfaktometru s otevřenou arénkou 42
5.2 Výsledky experimentů v olfaktometru s uzavřenou arénkou 42
6 Diskuze 51
7 Závěr a přínos práce 55
8 Přehled literatury a použitých zdrojů: 56

1 Úvod

V současné době je v České republice dominantním zástupcem dřevin smrk (*Picea spp*.), který tvoří přes 50 % lesních porostů (Mze, ©2018) Většina lesních činitelů tedy i kůrovec za normálních podmínek napadá převážně jednotlivé oslabené stromy a hraje důležitou roli při obnově lesního ekosystému (Edburg et al., 2012). Se změnou klimatických podmínek, zejména pak při abnormálním suchu, mechanickém poškození velkého počtu stromů mokrým sněhem či bořivým větrem nebo poškození lesů imisemi, dochází ke „kalamitnímu přemnožení" zejména lýkožrouta smrkového, jehož důsledkem může být úplný rozvrat napadených lesních porostů a rozsáhlé hospodářské ztráty v lesním hospodářství (Modlinger et al., 2015a). K významnému rozšíření povědomí o „kalamitách" lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) došlo po druhé polovině dvacátého století (Mze, ©2018). Ve stejné době došlo k pokroku v chemické ekologii hmyzu, kdy byly objeveny feromony, tj. chemikálie šířené za účelem vnitrodruhové komunikace jedinců (Valterová, 2015). Ačkoli mají kůrovci silně vyvinutou chemickou komunikaci, tak všechny dosud používané metody chemické atrakce slouží pouze pro monitoring, nikoli pro snižování jejich počtu (Knížek &Zahradník, 2007; Luxová & Valterová, 2006).

Podkorní hmyz využívá pro vyhledávání vhodných hostitelských dřevin vizuální a čichové podněty (tvar, barva, rostlinné těkavé látky). Při napadení dřevin lýkožroutem smrkovým hraje významnou roli olfaktorická orientace (Andersson et al., 2009). Žďárek (2002) uvádí, že olfaktometrie spočívá v testování vlivu feromonu (těkavých pachových látek) na zkoumaný druh hmyzu. Moderní analytické metody vyžadují velmi drahé vybavení, naštěstí ale umožňují pracovat jen s malým množstvím výchozího biologického materiálu. V laboratorních podmínkách se využívají různé typy olfaktometrů, mimo jiné i tzv. větrný tunel (Hoskovec, 2000; Hanks et al., 2012). V olfaktometru je rozptýlena semiochemikálie do proudu čistého vzduchu na jedné straně (kontrola) a z druhé strany je většinou vypouštěn živý testovaný jedinec. Testy prováděné v olfaktometru se nazývají behaviorálními pokusy (Matthews & Matthew, 2009). Behaviorální pokusy byly provedeny s pestrou škálou druhů hmyzu, jako jsou Lepidoptera (motýli a můry), Hymenoptera (vosy a včely), Diptera (dvoukřídlí), a nebo Blattodea (švábi). Významným kritériem pro výběr hmyzu je jejich dostupnost, snadných chov či význam pro člověka. Behaviorální zkoumání významně přispělo k rozvoji vědních disciplín, jako jsou zejména fyziologie (neurofyziologie), ekologie anebo etologie hmyzu (Žďárek, 2002).

V této práci byly prováděny behaviorální testy na lýkožroutu smrkovém při laboratorních podmínkách. Byly ověřovány nové atraktivní látky, které by mohly být využity při monitorování počtu populací lýkožrouta v České republice. Snahou těchto biologických pokusů je pozorování reakce daného jedince na testovanou chemickou látku, zda je ovlivněna instinktivně (přirozeně) či uměle („naučeně"), (Mustaparta, 1984; Matthews & Matthew, 2009). Hlavním cílem práce je tedy ověření behaviorální odpovědi lýkožrouta smrkového na nabízené volatilní látky, přesněji na komerční feromon a feromon připravený v univerzitní laboratoři (Extemit-K).

2 Cíl práce

1) Rešeršní část diplomové práce bude věnována souhrnu dostupných informací o primární atraktivitě smrku pro lýkožrouta smrkového a možnostech behaviorálních testů kůrovců.
2) Osvojit si základní principy behaviorálních experimentů v laboratoři (manipulace s živými brouky, standardizace výběru, fyziologie, vymezení cirkadiánní aktivity brouků, vliv fyziologických (hladovění, pohlaví) a behaviorálních podmínek (světlo, tma) na jejich aktivitu, zásady prevence kontaminace laboratoře testovanými látkami, standardizace postupů přípravy návnad a experimentálních podmínek.
3) Ověřit behaviorální odpovědi kůrovců na nabízené volatilní látky.
4) Výsledky porovnat s dostupnou literaturou a vyvodit závěry.

3 Literární rešerše

3.1 Kůrovci (Scolytinae)

Součástí lesního ekosystému je řada významných lesních činitelů, mezi které lze zařadit heterotrofní organismy (houby, bakterie a viry), z obratlovců především spárkatou zvěř a bezobratlé, převážně hmyz (Edburg et al., 2012). Modlinger et al. (2015a) uvádí, že v České republice je známo více než 25 tisíc druhů hmyzu (Insecta), z toho přibližně polovina je vázána na lesní stanoviště. Za škodlivé činitele čili „škůdce" lesa lze ale považovat pouze zhruba 200 druhů hmyzu. Hmyzí „škůdci" se dělí do několika skupin, podle toho jakým způsobem škodí samotnému lesnímu porostu (Urban & Křístek, 2004). Listožravý hmyz, jako např. ploskohřbetky rodu *Cephalcia spp.* se živí převážně listy či jehlicemi dřevin. Za defoliátory výhradně jehličnatých dřevin lze považovat bekyni mnišku (*Lymantria monacha*), píďalky (*Larentiinae*) a obaleče na dubech či modřínu (Mze, ©2018). Savý hmyz (mšice - Aphidoidea, roztoči - Acari) škodí stromům tím, že z nich vysávají důležité cukernaté rostlinné šťávy a při sání se mohou vytvářet na listech specifické kulovité útvary, zvané hálky. Hmyz také může požírat pletiva nadzemních částí kmene a větví (kortikolní hmyz). Do této skupiny hmyzu se řadí klikoroh borový - *Hylobius abietis,* který je považován za „kalamitního škůdce" jehličnatých výsadeb - semenáčků a sazenic smrků (Modlinger et al., 2015a). Na semenáčcích a sazenicích jehličnatých stromů škodlivě působí zástupci rodu *Hylastes* - lýkohubi. Další hmyzí druhy škodí svým vývojem, který probíhá v samotné dřevině pod kůrou v lýku či dřevě (podkorní a dřevokazný hmyz). Svým specifickým stylem života pod kůrou a především žírem rodičovských brouků způsobují uhynutí napadeného stromu nebo jeho částí (Lubojacký et al., 2019). A právě do této skupiny patří podčeleď kůrovců (Knížek & Zahradník, 2007).

Kůrovci (Scolytinae) jsou bohatou a rozmanitou skupinou živočichů třídy hmyzu (Insecta), řádu brouků (Coleoptera), čeledi nosatcovití (Curculionidae) a patří mezi kůrovcovité brouky (BioLib, ©2020). Nosatcovití (Curculionidae) jsou celosvětově nejpočetnější čeledí brouků s nápadným dlouhým tenkým noscem a charakteristickými lomenými tykadly. Kůrovci jsou drobní brouci, kteří jsou přirozenou součástí lesa. Jedná se o lesní hmyz, který se živí výhradně dřevinami, které jsou staré, polámané či jinak stresované (Knížek, 2006; Mze, ©2018). Jsou považováni za konzumenty odumírající dřevní hmoty a podílejí se na důležitém dekompozičním rozkladu při obnově lesa (Skuhravý, 2002).

Celosvětová populace kůrovců čítá více než 6 000 druhů a převážná většina druhů se vyskytuje zejména v oblasti rovníku, tropickém a subtropickém podnebném pásu (Pfeffer, 1952; Pfeffer, 1955; Wood, 1982a). Nejvíce druhů bylo objeveno a popsáno v palearktické oblasti a přes 600 druhů v Severní Americe (Knížek & Beaver, 2004). V Evropě bylo zaznamenáno okolo 250 druhů kůrovcovitých brouků a z toho 80 druhů je považováno za „škůdce" (Skuhravý, 2002). Nejpočetnější skupinou kůrovcovitých brouků, která se vyvíjí na nejrůznějších dřevinách, jsou zástupci rodů

Scolytus, Trypodendron, Xyleborus, Ips, Pityogenes, Pityophthorus, Cryphalus a *Crypturgus*. V Evropě a hlavně v ČR jsou významné především druhy kůrovců rodu *Ips, Chalcographus, Dendroctonus* a *Tomicus*. Hlavně proto, že zástupci zmíněných rodů způsobují velké hospodářské škody (Knížek, 2006).

Hlavní ekologický problém představuje především „kalamitní" přemnožení populace lesních „škůdců", kdy se zdravé stromy stávají velmi ohroženou skupinou (Byers, 2004). Pouze malá část všech zástupců kůrovcovitých brouků je schopna při gradaci silně poškodit les na velkých plochách (Knížek & Zahradník, 2007). V přirozeném lesním ekosystému se kůrovci vyvíjí hlavně ve starších a poškozených dřevinách. S tímto napadením se lesní porosty dokážou vyrovnat. Lesy v České republice jsou silně pozměněné vlivem člověka (Lubojacký et al., 2019). V posledních desetiletích v lesním porostu převažují jehličnaté dřeviny, které jsou vysazované mimo svá původní stanoviště. Takové porosty jsou mnohem náchylnější ke „kalamitám" různého charakteru. Zahradník & Knížek (2000) udává, že klíčovými faktory pro nárůst populační hustoty kůrovců je kombinace nepříznivých klimatických podmínek a negativní působení lesních „škůdců". Za škodlivé abiotické činitele lze považovat nadměrné sucho, vysoké teploty, vítr, nízké fitness dané dřeviny, imise, polomové dříví, nebo zanedbání ochranných opatření lesního hospodářství (Mze, ©2018). Jak uvádí Wang et al. (2017), vlivem větrných „kalamit" a sucha dochází k poškození stromů, jejich nedostatečnému zásobování vodou, kdy jedinec usychá a ztrácí svoji přirozenou odolnost. Polámané dřeviny následkem silného větru jsou právě velmi atraktivní pro rozvoj populace kůrovců. Při silném napadení vede žír kůrovců k neodvratnému úhynu stromů. Takto narušené dřeviny ve velkém odumírají a ztrácí tím další hospodářské využití. Což může mít zásadní ekologický a ekonomický dopad na lesní ekosystém a člověka. Vzhledem k rozsáhlým škodám, které brouci působí při jejich přemnožení, se stávají významným objektem pro lesnický, ekologický a biologický výzkum (Knížek & Zahradník, 2007; Modlinger et al., 2015b).

Lesní „škůdci" ze zákona č. 289/1995 Sb., 1. příloha vyhlášky 76/2018 jsou:

- Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*)
- Lýkožrout severský (*Ips duplicatus*)
- Lýkožrout lesklý (*Pityogenes chalcographus*)
- Klikoroh borový (*Hylobius abietis*)
- Ploskohřbetky na smrku (rodu *Cephalcia*)
- Bekyně mniška (*Lymantria monacha*)
- Obaleč modřínový (*Zeiraphera diniana*)

§ 2 odstavec 2 zní:
„(2) Podle populační hustoty „škůdce" se rozlišuje:"

- základní - nízký stav, kdy nehrozí jeho přemnožení ani významné škody na lesních porostech

- zvýšený - možnost vzniku hospodářsky významných škod na lesním pozemku
- „kalamitní“ - vznik hospodářsky významných škod, přemnožení populace

Výše zmíněných tzv. „kalamitních škůdců“ se lesníci obávají nejvíce. Lesní zákon č. 289/1995 Sb., stanovuje konkrétní povinnosti a práva vlastníků lesních pozemků. Vlastník lesa je povinen dělat soubor takových opatření, aby se předcházelo a zmírnilo negativnímu působení lesních činitelů. Taková opatření zahrnují identifikaci a evidenci výskytu škodlivých organismů. Je nutná prevence tj. snaha o omezení vývoje a šíření lesních „škůdců“. Sleduje se zdravotní stav lesního ekosystému a přítomnost biotických činitelů. Pokud dojde k přemnožení lesních „kalamitních škůdců“, je lesník povinen informovat místně příslušný orgán státní správy lesů. Ochrana lesa spočívá v provádění konkrétních kontrolních, ochranných a obranných metod (ČSN 48 1000).

Nejdůležitějším kontrolním opatřením, které vede k regulaci stavu lýkožrouta smrkového je vyhledávání konkrétních napadených dřevin a jejich včasná asanace tj. odvoz dřeva, odkornění či chemické ošetření kontaktními insekticidy (ČSN 48 1000). Tzv. „aktivní kůrovcové stromy“ lze rozpoznat velmi jednoduše podle vytékající mízy ze závrtových otvorů v kůře a hlavním symptomem napadení kůrovcem smrkovým je tvorba drtinek. Hromádky rezavých drtinek, vypadávají ze závrtu v kůře stojících dřevin u paty kmene, u ležících stromů se objevují vždy vedle závrtů. Po odloupnutí kůry napadených dřevin jsou patrné typické požerky l. smrkového v různém životaschopném stádiu vývoje. V této fázi je nutné zamezit jeho šíření na okolní dřeviny a vytěžit či vyklidit takto napadené a pro lýkožrouta atraktivní dříví a včas ho asanovat (Zahradník, 2006; Kindlmann et al. 2012).

Ke kontrole lýkožrouta smrkového jsou ze zákona, využívány v zásadě dvě metody - stromové lapáky a feromonové lapače. Pro stanovení počtu stromových lapáků a feromonových lapačů se v daném porostu vždy vychází z tzv. „kalamitního základu“ (množství veškerého kůrovcového dřeva zpracovaného za období od 1. 8. - 31. 3.). Lýkožrout smrkový je významným činitelem středoevropských jehličnatých lesů. Zatímco listožravý hmyz byl v lesích zaznamenán spíše lokálně, podkorní hmyz a především lýkožrouti rodu *Ips* způsobují poškození lesních porostů až z 80 %. (Mze, ©2018). V roce 2018 bylo v Česku evidováno (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství) 12 mil. m^3 vytěženého smrkového kůrovcového dříví, což představuje více než dvojnásobný nárůst ve srovnání s rokem 2017, kdy bylo zaznamenáno cca 5,34 mil. m^3 (v roce 2016 - 4,21 mil. m^3).

V ČR se vyskytuje okolo 112 druhů těchto zajímavých brouků. Kůrovci se svým vzhledem podobají červotočovitým a jsou fylogeneticky příbuzní nosatcovitým. Jsou drobní, s hnědým válcovitým tělem, blanitými křídly a typicky lomenými tykadly. Na kulovité hlavě mají ploché složené oči. Pouze samci rodu *Xyleborus* mají křídla zakrnělá. Kůrovcovití brouci mají různě tvarované krovky, které jsou typické pro jednotlivé rody (Pfeffer, 1989; Urban & Křístek, 2004) viz níže.

- ploché mají zástupci rodu *Scolytus*
- zaoblené, kryjící zadeček i ze stran (*Hylesinus*)

- zaoblené, ale s rovnou bází a na zádi zaoblené (*Dendroctonus*), zkoseně uťaté (*Taphrorychus*), promáčklé (*Pityophthorus*) nebo vyhloubené (*Pityogenes, Ips, Pityokteines*)

Kůrovce lze dělit do několika skupin podle toho, kde se na dřevině vyvíjejí (Zahradník & Knížek, 2000). Většina druhů žijících pod kůrou v lýku se nazývá phloeofágním hmyzem (lýkožrouti rodu *Ips*). Xylofágní či xylomycetofágní (dřevokazné) druhy přežívají v běli hostitelských dřevin. Kolařík (2004) uvádí, že hlavním zástupcem hmyzu mrtvých dřevin je lýkohub (*Myelophilus piniperda*), který škodí až svým úživným žírem dospělců na výhoncích borovic. Patří sem i tzv. ambrozioví brouci, kteří mají vytvořenou silnou symbiotickou vazbu s dřevokaznými vřeckovýtrusnými houbami, konkrétně z řádu *Ophiostomatales* a *Microascales* (Hulcr, 2003; Bleiker & Six, 2007). Další zvláštní skupinou jsou bělokazové (*Scolytini*), kteří se vyvíjejí v narušených a nemocných stromech. Saproxylofágní kůrovci se živí pouze zetlelým lýkem a dřevem. Nezpůsobují žádné škody na lesních porostech a není u nich známa žádná interakce s hostitelskou dřevinou (Wermelinger, 2004). Další druhy kůrovců mohou způsobit poškození ovocným stromům, tím jak se vyvíjejí v různých semenech a plodech tzv. druhy spermofágní. Horáková & Horák (2010) uvádí ve své práci dva druhy bělokaze z rodu *Scolytus* a dva zástupce drtníků z rodu *Xyleborus*, kteří napadají hlavně dřeviny z čeledi Rosaceae. Drtníci jsou však schopni napadat i jiné listnaté dřeviny. Někteří kůrovcovití brouci škodí dřevinám svým vývojem v centrální části drobných větviček či stoncích rostlin nebo řapících listů - druhy myelofágní (Knížek, 2006). Kolařík (2004) uvádí, že v evropském mírném pásmu převažuje phloeofágie (vývoj pod kůrou) - až 90 % druhů kůrovců. Naopak v tropech, kde jsou ideální podmínky (teplo a vlhko) pro růst hub, je převaha xylomycetofágních (ambróziových) kůrovců až 60 %.

Hostitelskými druhy kůrovců jsou většinou dřeviny, ať listnaté či jehličnaté. Podkorní hmyz nehraje v poškození listnatých stromů příliš významnou roli (Knížek & Beaver, 2004). Je známo, že listnaté dřeviny, případně byliny jsou poškozovány o něco méně (46 známých druhů). Mezi nejčastější hostitele patří duby (bělokaz dubový - *Scolytus intricatus* a krasci rodu *Agrilus*), jilmy (bělokaz jilmový - *Scolytus scolytus*, vektor grafiózy jilmů), buky, jasany (lýkohubi rodu *Hylesinus*), topoly a ovocné stromy. Březové dříví je nejčastěji napadáno bělokazem březovým - *Scolytus ratzeburgii* (Knížek, 2006). Citlivost jehličnatých stromů k poškození hmyzem je obecně vyšší než u listnatých dřevin. Přibližně 69 druhů kůrovcovitých brouků (60 %) preferuje dřeviny jehličnaté - hlavně smrk, jedli, modřín a borovici.

Obecně smrkové porosty ve smíšeném lese jsou více odolné. Jak uvádí Knížek (2006), rozsáhlé hospodářské monokultury smrkového porostu pěstované v nepůvodních podmínkách, často ve špatném zdravotním stavu, poskytují škodlivým činitelům bohatou nabídku potravy a příhodné podmínky k rozsáhlým gradacím (přemnožením). Na smrku, hlavní hospodářské dřevině v ČR (*Picea spp.*) se vyskytuje více než 30 druhů nejobávanějších „škůdců“ lesního hospodářství rodu *Pityogenes, Pityophthorus, Scolytus, Ips,* lýkohubi rodu *Tomicus* a smoláci - *Pissodes scabricollis*

(Knížek & Beaver 2004; Knížek, 2006). V ČR největší kůrovcovitý brouk lýkohub smrkový (*Dendroctonus micans*) osídluje oddenkovou část mechanicky poškozených smrků. Jemu příbuzný brouk lýkohub matný (*Polygraphus poligraphus*) obsazuje smrkovou dřevinu (tyčkoviny až slabé kmenoviny) vlhčích stanovišť, po celé délce jejího kmene (Modlinger et al., 2015a). Lýkožrout lesklý (*Pityogenes chalcographus*) preferuje nejčastěji mlaziny, tyčkoviny a vrcholky starších stromů. Lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) napadá tyčkoviny a horní partii kmene. Lýkožrout menší - *Ips amitinus* hojný brouk horských smrčin, vyhledává též horní části kmene nebo kmeny s tenčí vrstvou lýka. Z kůrovcovitých brouků, které škodí smrku, dominuje mimo zmíněné lýkožrout smrkový - *Ips typographus* (Skuhravý, 2002; Modlinger et al., 2015a).

Jedle (*Abies spp.*) mají své hmyzí „škůdce" z rodu *Pityokteines* (lýkožrout prostřední - *Pityokteines spinidens*, l. malý (*P. vorontzowi*) či kůrovec křivozubý - *Pityokteines curvidens* (Knížek et al., 2016). Lýkožrout modřínový (*Ips cembrae*) napadá modřín (*Larix spp*). Nejvíce ohrožené jsou borovicové a smrkové porosty středního věku, které rostou v nižších a středních polohách (Zahradník & Knížek, 2000). Největší počet druhů hmyzu je právě vázán na tyto dřeviny. Horské porosty jsou ohrožené lesními „škůdci" méně. Dřeviny stresované imisemi jsou více náchylné na napadení podkorním hmyzem (Lubojacký et al., 2019). Borovici (*Pinus spp.*) využívá ke svému vývoji více než 40 druhů kůrovců, někteří z nich se mohou vyvíjet i na smrku. Dle Knížek et al. (2016) škodí borovicím nejvíce (40 %) lýkohubi rodu *Tomicus*, konkrétně lýkohub sosnový (*Tomicus piniperda*), 30 % tvoří lýkožrout vrcholkový (*Ips acuminatus*), z 15 % krasec borový (*Phaenops cyanea*) a lýkožrout borový (*Ips sexdentatus*). Kromě již výše uvedených druhů se zde obdobně jako ve smrkových porostech může lokálně přemnožit konkrétně lýkožrout obecný - *Pityophthorus pityographus* (Urban & Křístek, 2004).

3.2 Lýkožrout smrkový - *Ips typographus* (De Geer, 1775)

3.2.1 Systematické zařazení

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) patří do pestré třídy hmyzu (Insecta), řádu brouků (Coleoptera), řadí se do čeledi nosatcovití (Curculionidae), podčeledi kůrovci (Scolytinae), konkrétně tribu lýkožrouti (Ipini) a rodu *Ips* (De Geer, 1775). Základní systematický přehled je zobrazen níže v Tab. 1.

Třída:	Hmyz - Insecta
Řád:	Brouci - Coleoptera
Čeleď:	Nosatcovití - Curculionidae
Podčeleď:	Kůrovci - Scolytinae
Tribus:	Lýkožrouti - Ipini (Bedel, 1888)
Rod:	Lýkožrout - *Ips* (De Geer, 1775)
Druh:	lýkožrout smrkový - *Ips typographus*

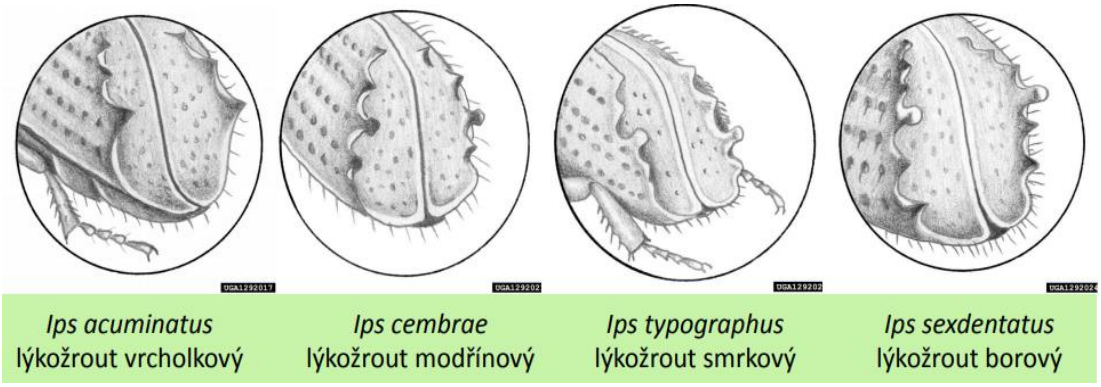
Tab. 1: Vědecká klasifikace lýkožrouta smrkového (BioLib, ©2020).

Tribus lýkožrouti (Ipini) je světově zastoupen šesti rody - *Acanthotomicus* (Blandford, 1894), *Orthotomicus* (Ferrari, 1867), *Pityogenes* (Bedel, 1888), *Pityokteines* (A. G. Fuchs, 1911), *Pseudips* (Cognato, 2000) a *Ips* (DeGeer, 1775). Lýkožroutů rodu *Ips* je na celém světě celkem 13 druhů (BioLib, ©2020). Hrbolkatý povrch těla je charakteristickým rysem pro tento rod a další jako jsou *Trypodendron*, *Ernoporus*, *Ernoporicus* a *Trypophloeus*. Doležal (2013) uvádí, že v České republice se vyskytuje kromě lýkožrouta smrkového dalších pět druhů:

- lýkožrout vrcholkový (*Ips acuminatus*) - žijící na borovici
- lýkožrout borový (*Ips sexdentatus*) - žijící na borovici
- lýkožrout modřínový (*Ips cembrae*) - vyvíjející se na modřínu
- lýkožrout menší (*Ips amitinus*) - žijící na smrku
- lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) - žijící na smrku

Brouci se vyznačují tmavým válcovitým tělem, pětičlennými končetinami s hrbolky na vnějším okraji předních holení a speciálně tvarovanými tykadly, která slouží k determinaci druhů. Tykadlová palička se skládá ze tří plochých článků. Je

malá, oválná a opatřená zřetelnými švy. Brouci mají vpředu nápadně hrbolkatý štít a jejich charakteristickým rozlišovacím znakem jsou zuby, které bývají v páru po 3,4 nebo 6, viz Obr. 1 (Procházka, 2012). Výše zmínění zástupci rodu *Ips* se vyvíjejí v lýku jehličnatých dřevin, s výjimkou jedle. Hlavní význam této skupiny kůrovcovitých brouků spočívá především v tom, že při svém přemnožení jsou schopni způsobit rozsáhlé škody v lesním hospodářství (Urban & Křístek, 2004).

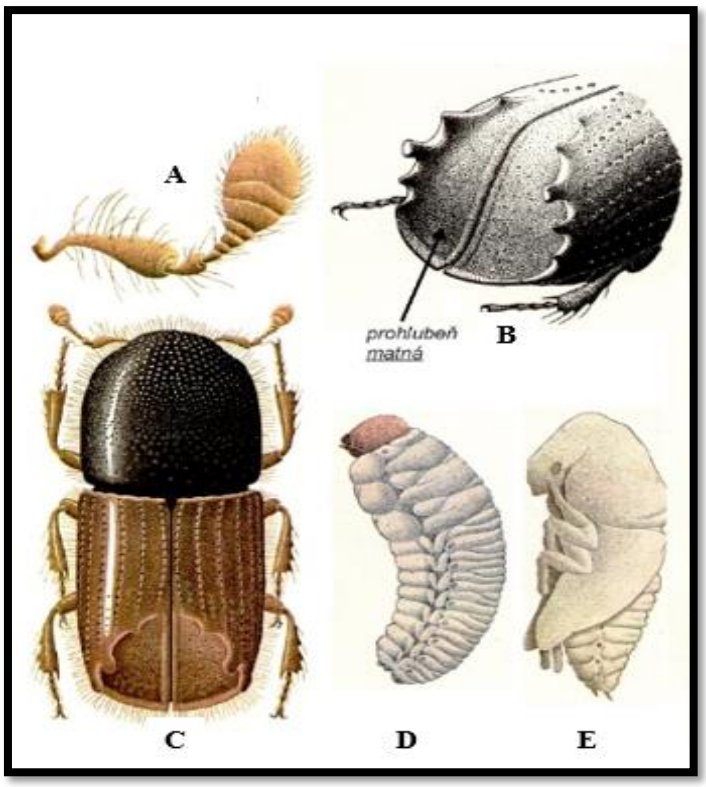


Obr. 1: Rozlišovací znaky lýkožroutů rodu *Ips* (Procházka, 2012).

Lýkožrout vrcholkový je menším broukem rodu *Ips* s nápadně rezavě hnědými krátkými krovkami se 3 páry zubů a je velmi podobný l. menšímu. Lýkožrout menší má na rozdíl smrkového rovné švy na tykadlech a je méně chlupatý (Urban & Křístek, 2004). Jak je zřejmé z Obr. 1, nejdelší zaoblené krovky se 6 páry zubů má největší brouk z rodu *Ips* - lýkožrout borový. Lýkožrout smrkový si je morfologicky velmi podobný s dalšími druhy, které se vyznačují 4 páry hrbolkatých zubů na konci krovek - lýkožrout severský, menší a modřínový (Skuhravý, 2002). Od ostatních příbuzných druhů rodu *Ips* se lýkožrout smrkový odlišuje barvou ochlupení (žlutá) a také specifickými krovkami, jejichž mezirýží je hladké a netečkované s matnou zadní částí. Lýkožrout modřínový a ostatní zmíněné druhy mají na rozdíl od l. smrkového prohlubeninu v zadní části krovek lesklou. Lýkožrout severský je nejmenší jedinec rodu *Ips* a má charakteristický „dvojzub“ a třetí zub má tvar „bambulky“ (Knížek & Zahradník, 2007).

3.2.2 Morfologie

Dle práce Urban & Křístek (2004) je dospělec lýkožrouta smrkového přibližně 4 - 5,5 mm velký brouk pokrytý jemnými zlatavými chloupky. Tykadla dle Obr. 2A jsou zvlněná a zakončená kulovitou paličkou tvořenou třemi články. Tykadlová palička má zřetelně zprohýbané švy. Krovky jsou poměrně krátké, válcovité, ozubené a v zadní části zkosené s matnou prohlubní, viz Obr. 2B (Modlinger et al., 2015b). Poznávacím znakem lýkožrouta smrkového jsou čtyři páry hrbolkovitých zubů na konci krovek, z nichž třetí pár je výrazně zvětšený (Skuhravý, 2002). Jeho válcovité tělo je lesklé a červenohnědě zbarvené, které lze vidět na Obr. 2C. Hlava je kryta podlouhlým štítkem, který je vpředu hrbolkatý a v zadní části řídce tečkovaný. Imága čerstvě po vylíhnutí jsou většinou bílá, postupně žloutnou (medoví či zlatí brouci) a až dosáhnou dospělosti, tak zhnědnou. Tmavnou nejdříve krovky, pak horní a nakonec i dolní část těla brouka (Pfeffer, 1989; Zahradník & Knížek, 2000).

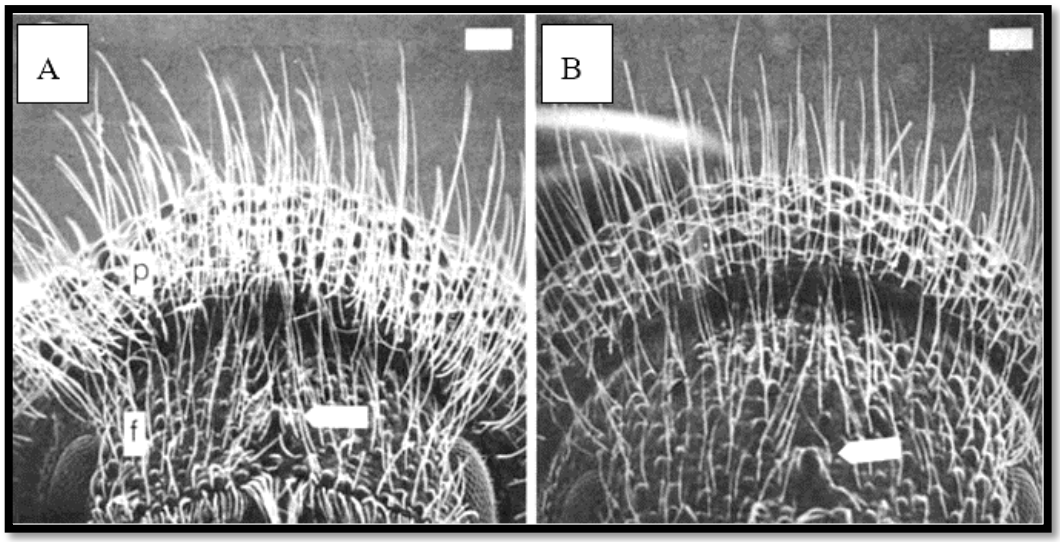


Obr. 2: Morfologie lýkožrouta smrkové: A - tykadlo, **B** - krovky, **C** - dospělec , **D** -larva, **E** - kukla (Novák et al., 1974, upraveno).

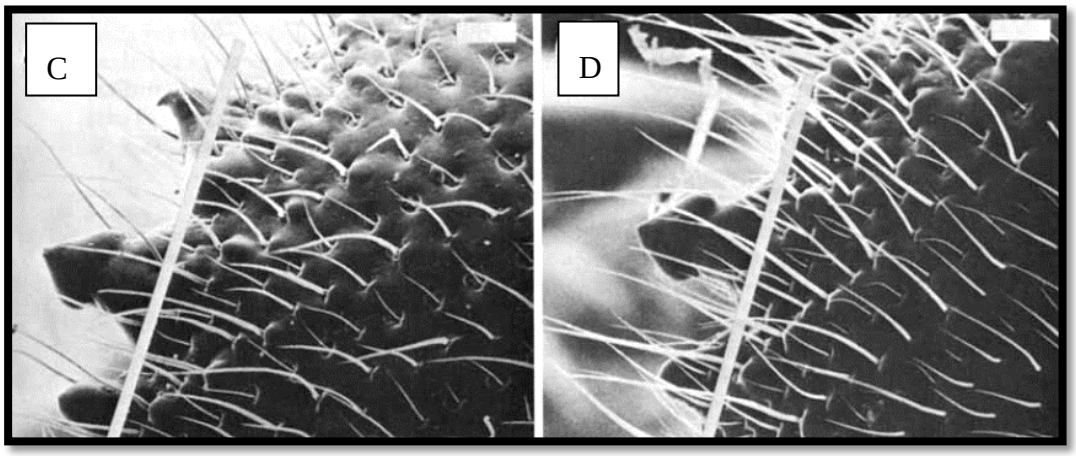
Vajíčka lýkožrouta smrkového bývají vejčitá, světle sivá a matně lesklá. Čerstvě vylíhlá larva je přibližně stejně velká jako dospělec, beznohá (apodní) a eucephální (má zřetelně vyvinutou hlavu i ústní ústrojí, obdobně jako u larev nosatců a krasců) a poněkud zahnutá do tvaru „C“ (ale nikoliv scarabeiformní jako u zlatohlávků), což lze vidět na Obr. 2D. Má baculaté článkované bílé tělo, v hrudi ztluštělé s drobnými

hnědými kusadly. Kukla (Obr. 2E) je 4 mm velká, bledě žlutě zbarvená, skoro průhledná se dvěma krátkými trny na zadečku (Pfeffer, A. 1989; Wermelinger, 2004).

U lýkožrouta smrkového je patrný pohlavní dimorfismus. Samice se od samce liší dle Skuhravý (2002) a Schlyter (2009) v hustotě žlutavého ochlupení na předním okraji štítku a vytvořenými rýhami pod ústním ústrojím, jak lze vidět na Obr. 3 a 4. Rozdíly mezi pohlavími jsou také ve velikosti čelního výrůstku a třetího zoubku.



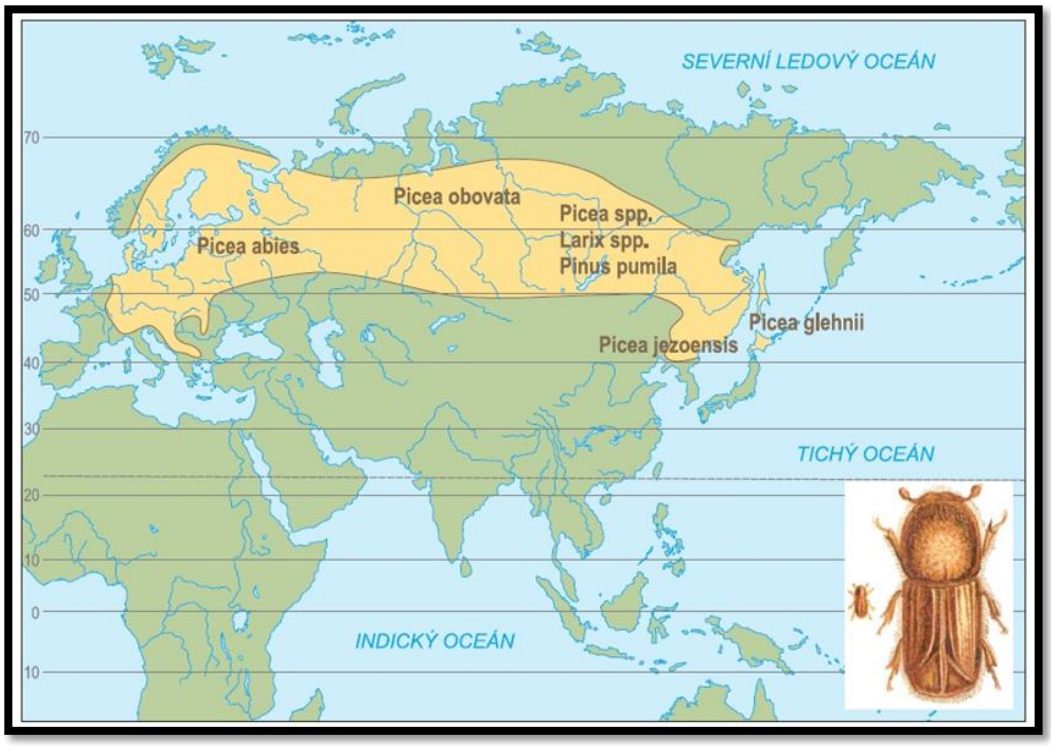
Obr. 3: Rozlišovací znaky samice a samce lýkožrouta smrkového. **A** - samice má hustší štětiny na protonu a menší čelní výrůstek (znázorněno bílou šipkou); **B** - samec má ochlupení řidší a výrůstek větší (Schlyter, 2009).



Obr. 4: Rozdíly mezi samicí a samcem lýkožrouta smrkového. C - samice má větší třetí zoubek na krovkách **D** - samec menší (Schlyter, 2009).

3.2.3 Geografické rozšíření druhu

Původně se lýkožrout smrkový vyskytoval pouze v klimatickém pásmu horských smrčin, ale pěstováním smrku prakticky na všech stanovištích i v nižších polohách se jeho oblast výskytu později významně rozšířila. V současně době ho lze pozorovat již od nejnižších oblastí nížin až po horní hranici lesa (Urban & Křístek, 2004). Podle práce Skuhravý (2002) zástupci druhu lýkožrouta smrkového zaujímají ohromný euroasijský areál s přirozeným výskytem jeho živné dřeviny, což naznačuje žlutá barva na Obr. 5. Z obrázku je patrné, že na severu zasahuje do Skandinávie, na západě sahá do horského pásma Francie (Vogézy), prochází přes střední Evropu, jižními svahy Alp, pohořím Rila v Bulharsku až k Balkánskému poloostrovu (Doležal, 2013). Východní hranice rozšíření pak pokračují přes smrkovou tajgu v Rusku (Sibiř a dálný východ), přes Čínu, Koreu až do Japonska (Kindlmann et al., 2013).



Obr. 5: Zeměpisné rozšíření lýkožrouta smrkového (Skuhravý, 2002).

Lýkožrout smrkový vyžaduje ke svému vývoji smrk ztepilý (*Picea abies*). Ve střední Evropě je rozšířen všude tam, kde se nacházejí rozsáhlé smrkové lesy, tedy po celém území ČR, v Německu, Rakousku, na Slovensku a v severní části Polska a Maďarska (Wermelinger, 2004). Na severovýchodě kolonizuje lýkožrout smrkový hlavně smrk sibiřský (*Picea obovata*) nebo ve východní Asii smrk ajanský (*Picea jezoensis*) a smrk Glehnův (*Picea glehnii*). Lýkožrout smrkový se může vyvíjet i na modřínu (*Larix spp.*) a výjimečně na borovici zakrslé - *Pinus pumila* (Skuhravý, 2002).

3.2.4 Biologie druhu

Životní cyklus lýkožrouta smrkového je tvořen ze tří částí - kolonizace vhodných hostitelských stromů, vlastní vývoj brouka a jejich následná disperze na další dřeviny v jejich okolí (Zahradník & Knížek, 2000). Samec vyhledává vhodné jehličnaté stromy k založení nového potomstva, hned po ukončení disperzního letu (přibližně na konci dubna). Za standartních podmínek jsou velmi atraktivními dřevinami pro dospělého brouka hlavně ty starších nad 60 let, oslabené či čerstvě poražené s oslabenou přirozenou rezistencí. Dle Byers (2004) je kolonizace stromů brouky založená na biochemii, tedy na jejich reakci na specifické chemické podněty, které jsou hostitelskými dřevinami vylučovány. Na tyto pachové látky citlivě reaguje lýkožrout smrkový, díky velmi dobře vyvinutému čichu, který je umístěn na paličkách jeho tykadel. Chemie také působí i mezi jedinci opačného pohlaví, pomocí tzv. feromonů (Wainhouse, 2008). Samec reaguje na monoterpenen α-pinen, který indikuje rozklad dřevní hmoty stromu (Hanks et al., 2012). Musí překonat přirozenou obranyschopnost hostitele (dřeviny). Vitalita (životaschopnost) dřeviny je limitujícím faktorem pro úspěšnost kolonizace hostitelské dřeviny. Vitální strom je schopný ubránit se náletu dospělce, vytvořením odpudivých obranných chemických látek - terpenoidů, fenolických látek, fytohormonů či pryskyřice (Franceschi, 2005; Krokene, 2015). Obrana stromu je energeticky náročná, a funguje jen po určitou dobu. Starší dřeviny jsou méně odolné k napadení lýkožroutem smrkovým, navíc může jejich odolnost být významně snižována pomocí nejrůznějších faktorů (biotických, abiotických nebo antropogenních) a závisí na jejich fyziologickém stavu (Hulcr, 2003; Hofstetter et al., 2006). Jediný brouk by nestačil k zahubení vybraného stromu, proto samci lýkožrouta smrkového útočí hromadně prostřednictvím agregačního feromonu (Wainhouse, 2008).

Lýkožrout patří do třídy hmyzu s proměnou dokonalou, jehož vývoj se převážně odehrává pod kůrou jehličnatého stromu (ve stádiu larvy) a zahrnuje tato vývojová stádia: vajíčko - larvální stádium (instar, lýkožrout prochází třemi instary) - kukla a dospělec (Wermelinger, 2004). Vše začíná na jaře, kdy se samci po úspěšné kolonizaci zavrtávají pod kůru a v lýku vyžírají po dobu 4 dnů páří chodby tzv. snubní komůrky. Poté naláká samice (jednu až výjimečně tři) ke spáření pomocí pohlavních feromonů (Skuhravý, 2002; Wainhouse, 2008). Jak se zmiňuje Bleiker et al. (2013) lýkožrout smrkový patří mezi druhy polygamní, schopný opakovaného páření. U druhů monogamních je tomu právě naopak, jedna samice se zavrtává do lýka v kůře a přiláká jednoho samce ke kopulaci, probíhající na povrchu kmene nebo ve vyhlodaných chodbách v kůře. Ve snubní komůrce si každá samice hloubí svou matečnou chodbu rovnoběžně s vlákny floému (lýka) a do zářezů podél nich klade zhruba 80 vajíček (Doležal, 2013). Nestrávené lýko vyhazují ve formě jemných drtin vstupním otvorem ven. Z vajíček se za 6-18 dní vylíhnou larvy, které hlodají cesty kolmo na směr matečných chodeb. Larvy se živí pletivem hostitelských dřevin a během svého života se několikrát svlékají. Jak nabývají na objemu, tak se chodby prodlužují a na jejich konci jsou larvami utvářeny kukelní komůrky (Faccoli, 2009). Zde se nakonec larvy

uložené v kukelní kolébce v lýku zakuklí a z komůrky vylézá dospělý brouk (Wermelinger, 2004). Vývojový cyklus lýkožrouta smrkového je ukončen tzv. úživným (zralostním) žírem, který slouží k pohlavnímu dospívání vylíhlých jedinců a trvá přibližně 3 týdny - zhruba od poloviny dubna do konce září (Skuhravý, 2002).

Úspěšný vývoj jediné generace trvá za příznivých podmínek přibližně okolo dvou měsíců, počet generací se mění se stoupající nadmořskou výškou. V ČR má lýkožrout smrkový zpravidla jednu až dvě dceřiné generace ročně (Doležal, 2013). Ve vyšších polohách středoevropských hor a především na severu se vyvine pouze jedna generace brouků (Wermelinger, 2012). Za určitých klimatických podmínek (teplota a nízké srážky) během jarních a letních měsíců může dojít k časnějšímu rojení a významnému urychlení vývoje nedospělých stádií (Kindlmann et al., 2013). Po každém základním rojení může nastat při nedostatku úživného materiálu (v lýkovém prostoru) pro nakladená vajíčka a pro regeneraci samotných samic ještě tzv. přerojování samic. Samice přeruší kladení vajíček a přesune se do jiné části stromu či jsou schopny zdolat zcela jiný strom v blízkém okolí a po regeneračním žíru pokračuje bez další kopulace v kladení vajíček. Vývoj dceřiné a sesterské generace se obvykle částečně překrývá (Wermelinger, 2004; Knížek &Zahradník, 2007).

Lýkožrout smrkový během svého života (ve všech svých vývojových stádiích) pod kůrou dřeviny vykouše do lýka síť spletitých chodeb, tzv. požerek, který lze vidět níže na Obr. 6. Zahradník (2006) uvádí, že se zpravidla každý požerek skládá ze snubní komůrky, různého počtu matečných chodeb (podle toho s kolika samicemi se samec lýkožrouta smrkového spáří), chodeb larválních a kukelní komůrky. Nejčastěji lze pod kůrou vzrostlých stromů nalézt požerky dvouramenné či trojramenné (každá chodba je 12 cm dlouhá a stejně 3 - 3,5 cm široká), v případě velkého přemnožení lýkožrouta smrkového pouze jednoramenné (Doležal, 2013).

Obr. 6: Požerek lýkožrouta smrkového

(https://wiki.pestinfo.org/wiki/*Ips_typographus*#/media/File:*Ips_typographus*_IPM1370036.jpg).

Ve střední Evropě, hlavně v České republice na konci léta (přibližně koncem srpna) nastává u lýkožrouta smrkového imaginální diapauza. Diapauza je geneticky a hormonálně řízená. Takto brouk reaguje na zkrácení délky dne, pokles teplot hlavně během noci a změnu vlhkostních podmínek. Dochází k utlumení veškerých aktivit brouka (rozmnožování, létání) a akumulaci energie a zásob pro úspěšné přečkání nepříznivých podmínek během zimních měsíců (Wermelinger et al., 2012). Lýkožroutovi smrkovému vyhovují spíše dlouhodobě nízké teploty, než mírná zima. Na základě experimentálního pozorování Košťál et al. (2011), brouci lýkožrouta pravděpodobně mnohem lépe odolávají vystavení teplotám pod bodem mrazu (-5 °C a -10 °C) po delší dobu, než mírnějším teplotám okolo 5 °C. V tomto období je limitující stav lýka v místě přezimování, proto jedinci lýkožrouta smrkového nejčastěji přečkávají zimní období ve všech jeho vývojových stádiích (kromě vajíčka) pod kůrou stojících dřevin (Zahradník & Knížek, 2000; Faccoli, 2002). V chladnějších severních oblastech např. ve Skandinávii, přezimují brouci v opadané kůře na zemi ve smrkovém jehličí. Košťál (2007) uvádí, že lýkožrout smrkový je mrazuvzdorný. Hlavní riziko úhynu brouka představuje tvorba ledových krystalků v jeho tělesných tekutinách. Akumulací specifických kryoprotektivních látek, dochází ke snížení teploty, tání hemolymfy a jiných tělních tekutin, a tím se zabrání před umrznutím. Kryopretaktanty, o kterých se zmiňuje Košťál et al. (2011), jsou tvořeny směsí cukrů a polyolů (ethylenglykol, glycerol a jiné vícesytné alkoholy). Na přelomu prosince a ledna, populace přechází z diapauzy do klidové fáze (post-diapauzní kviescence). V tomto klidovém období brouci postupně zcela regenerují, a za příhodných podmínek prostředí dokončují svůj vývoj (Košťál, 2006; Doležal & Sehnal, 2007).

Další generace lýkožrouta smrkového je zpravidla (obzvláště v období gradace) nucena vyhledat nový živný strom, neboť ten původní byl zcela zničen předchozí generací. Jedinci po zdolání živné dřeviny a budování chodeb ztrácí schopnost létání (Skuhravý, 2002; Doležal & Sehnal, 2007). Zároveň samice vylučují antiagregační feromon, kterým informuje ostatní jedince v populaci, že si mají nalézt k napadení jinou část dřeviny či jiného stromu v okolí (Byers, 2004; Chapman, 2013). Po vykladení vajíček dochází k regeneraci létajících svalů. Lýkožrout smrkový patří mezi tzv. druhy s diurnální aktivitou, což znamená, že létají ve dne. Brouci jsou schopni se do nových oblastí rozšiřovat (dispergovat) za pomoci aktivního letu, až do vzdálenosti v řádech kilometrů (Zahradník & Geráková, 2010). Potřebují však pro aktivní let vhodné podmínky, které jsou limitovány teplotou, srážkami a silou větru. Hledání nového hostitele bývá tím těžší, čím menší je procentuální zastoupení napadnutelných stromů v okolním porostu (Kindlmann et al., 2012).

3.2.5 Přirození nepřátelé

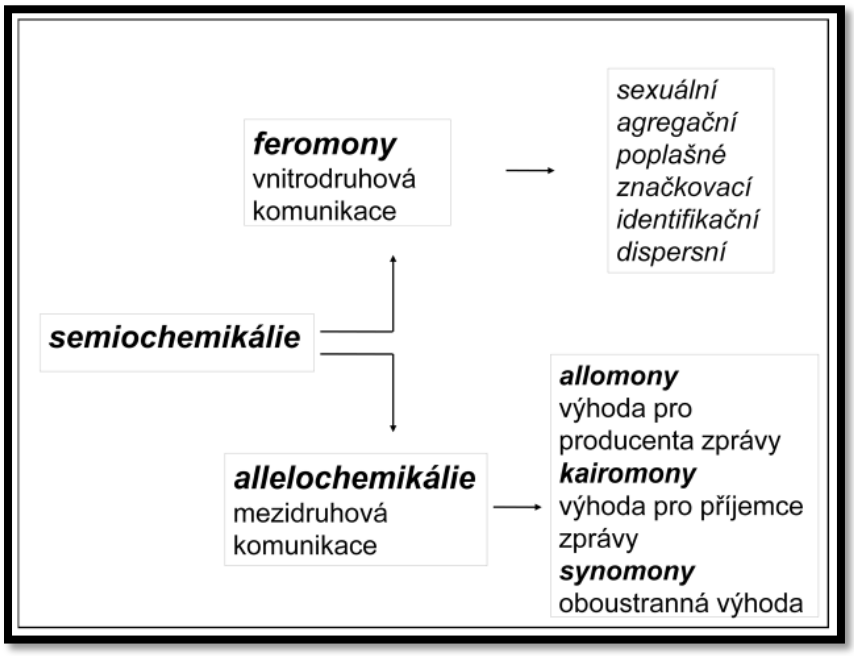
Lýkožrout smrkový představuje „noční můru“ mnoha biologů, entomologů včetně lesníků a člověk jej považuje za hlavního nepřítele smrkových lesů. Přesto i on má na svém přirozeném stanovišti celou řadu nelítostných nepřátel (Hofstetter et al., 2006). Protože patří do rozmanitého společenstva lesního ekosystému, stává se kořistí hmyzích predátorů, či hostitelem mnoha parazitů a parazitoidů (Wegensteiner et al., 2015). Dle Wermelinger (2002) lze za dobře známé nepřátele lýkožrouta smrkového (antagonisty) z říše hmyzu považovat mimo jiné např. parazitické vosy (Hymenoptera: Pteromalidae, Braconidae), dravé druhy brouků (Coleoptera: Cleridae: *Thanasimus formicarius* - pestrokrovečník mravenčí), dlouhošíjky (Raphidioptera), svižníky (Cicindelinae), střevlíky rodu *Carabus* a mouchy (Diptera: Dolichopodidae: *Medetera*). Dalšími predátory jsou hmyzožraví ptáci (Aves) - datel černý (*Dryocopus martius*), strakapoud velký (*Dendrocopos major*) a datlík tříprstý - *Picoides tridactylus* aj. (Knížek & Zahradník, 2007). „Nejzákeřnějšími“ konkurenty lýkožrouta smrkového jsou patogenní organismy zahrnující viry (*Entomopoxvirus typographi*), bakterie, entomopatogenní houby (*Beauria bassiana*), mikrosporidie (hromadinka *Gregarina typographi*) a prvoky (Landa et al, 2007; Lukášová & Holuša, 2014).

Obr. 8: Antagonisté lýkožrouta smrkového. A -pestrokrovečník mravenčí, **B** - parazitická vosa (https://www.waldwissen.net/wald/tiere/insekten_wirbellose/wsl_borkenkaefer_gegenspieler/index_EN).

Predátoři a parazitoidi obecně vyhledávají své hostitele pomocí mnoha různorodých podnětů (čichových, optických či tepelných aj.). Sullivan et al. (2000) uvádí, že k nalezení vhodného hostitele využívají těkavých (volatilních) látek tj. monoterpenů, vylučovaných z pryskyřice hostitelských dřevin (Wermelinger, 2002; Wainhouse, 2008). Mezi brouky, kteří jsou vázani na specifické dřeviny a dobře adaptovani na přímý lov lýkožrouta smrkového patří například pestrokrovečník mravenčí (Kenis et al., 2004), viz Obr. 8A. Který se celoročně vyskytuje na kmenech jehličnatých i listnatých dřevin a aktivně loví lýkožrouta smrkového. Na Obr. 8B je parazitická vosa z čeledi Pteromalidae, která parazituje na larvách nebo kuklách brouka, někdy dokonce i na dospělci. Efektivně redukují početnost lýkožrouta smrkového a způsobují až 80 % mortalitu druhu (Wermelinger, 2002).

3.3 Chemická komunikace

Komunikace mezi živočichy je velmi důležitou součástí jejich života. Jde obecně o přenos informace mezi jednotlivci i ve skupině pomocí signálů, jež vyvolávají bezprostřední odpověď, většinou změnu chování (Skuhravý, 2002; Veselovský, 2005). Zmíněná interakce probíhá nejrůznějšími způsoby - akusticky (zpěv ptáku, stridulace hmyzu), pomocí pohybů či posunky (varovné signály), elektricky (různé druhy ryb), dotykem a v neposlední řadě chemicky (pomocí semiochemikálií), (Valterová, 2015). Semiochemikálie slouží k přenosu informací uvnitř nebo mezi druhy. Hmyz se chemikáliemi řídí ve všech jeho vývojových fázích, výjimkou není ani rozmnožování. Hmyz (Insecta) tyto chemické signály využívá k informacím o obživě, při reprodukci, obraně či při symbióze nebo parazitizmu. Jedná se o látky signalizační, které jsou vylučované živými organismy (Larsson, 2016). Nejvíce výzkumů se dle Luxová & Valterová (2006), zaměřuje přednostně na čtyři řády hmyzu: šváby (Blattodea), brouky (Coleoptera), dvoukřídlé (Diptera) a motýly (Lepidoptera). Hlavní výhodou zkoumané skupiny hmyzu je dostupnost materiálu, z laboratorních chovů a tak činí z této živočišné třídy unikátní model pro studium chemické ekologie živočichů (Luxová & Valterová, 2006). Hmyz mezi sebou takto komunikuje a získává informace o svém okolním prostředí (Seybold et al., 2000). Semiochemikálie jsou podle práce Wainhouse (2008) specifické těkavé látky, které ovlivňují chování lýkožrouta. Přehled základního dělení semeochemikálií lze vidět na Obr. 9.



Obr. 9: Základní dělení semiochemikálií (Hoskovec, 2000).

Feromony slouží jako komunikační pachové látky (organické těkavé látky - VOC´s) na vnitrodruhové úrovni (Luxová &Valterová, 2006). Dle práce Baker (2004) je známo, že kůrovcovití brouci produkují různé typy feromonů. Kvantitativní a kvalitativní složení feromonů je jedinečné pro každý jednotlivý druh. Jedinec daného druhu uvolní konkrétní feromon a tím dojde k ovlivnění jeho chování či vyvolání

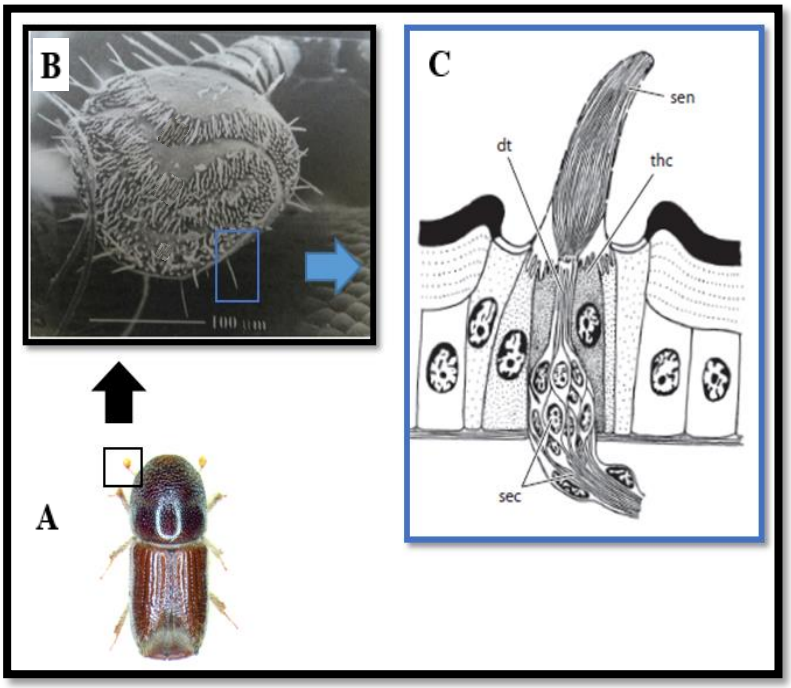
fyziologické reakce u dalšího jedince v populaci (Wood, 1982b). Vedle pohlavních feromonů používá hmyz ke své komunikaci i další feromony, kterými jsou agregační, antiagregační, značkovací (stopovací), poplašné, teritoriální a identifikační. Sexuální feromony slouží jedincům lýkožrouta smrkového k lákání opačného pohlaví. Mohou být produkovány samci i samicemi (Žďárek, 2002). Mezi dobře prostudované feromony u čeledi kůrovcovitých patří agregační feromony. Andersson (2012) uvádí, že lýkožrout smrkový pomocí těchto feromonových látek lákají obě pohlaví a někdy dokonce i jejich larvy. Jedinci rodu *Ips* ho využívají ke snazší kolonizaci jehličnatých dřevin, viz níže. Stopovací feromony slouží především sociálnímu hmyzu (jako jsou včely, mravenci a termiti) k nasměrování ostatních jedinců druhu k nalezenému zdroji potravy. Zmíněný sociální hmyz ke své komunikaci využívá také identifikačních feromonů, k identifikaci jedinců daného společenstva (Valterová, 2015). U blanokřídlého hmyzu jsou nejlépe prozkoumány poplašné čili alarmní feromony, které signalizují potenciální nebezpečí. Jsou produkovány kusadlovými a jedovými žlázami a slouží k obraně či úniku jedince před predátorem. Pomocí teritoriálních hormonů si hmyz značí své území - teritorium (Žďárek, 2002; Wainhouse, 2008).

Výše popsané feromony lze stanovit pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií nebo případně nukleární magnetická rezonance. V současné době, jak uvádí ve své práci Kalinová et al. (2014), patří mezi základní používané analytické metody pro měření volatilních organických látek (VOC´s) elektroantenografie (EAG) a elektrosenzilografie (ESG). Dle prací Erbilgin et al. (2007) či Skuhravý (2002) jsou speciální semiochemikálie (infochemikálie) vnímány tykadly lýkožrouta, poté jsou v mozku analyzovány a následně dochází k ovlivňování chování jedinců (Larson, 2016). Elektroantenografie ve spojení s plynovou chromatografií monitoruje celkovou odpověď všech čichových buněk na tykadle brouka na dané feromonové látky. Elektrosenzilografie na rozdíl od elektroantenografie analyzuje změny signálu již jediné čichové receptorové buňky (Chapman, 2013). Správnost identifikace nakonec, ale musí potvrdit behaviorální pozorování, respektive zjištění, zda daná látka nebo směs skutečně vyvolává totožné chování jako přirozený stimul (Hoskovec, 2000).

Dorozumívání u hmyzu pomocí různých chemických signálů představuje základ existence hmyzí populace (Francke & Schulz, 1999; Larson, 2016). Na úrovni mezidruhové se využívá především allelochemikálií, jako jsou kairomony, allomony a synomony. Pomocí kairomonů predátoři a parazitoidi rozpoznávají a vyhledávají svou kořist. V průběhu posledních několika let se využívá přírodních nepřátel pro biologickou kontrolu zvýšené populace přemnožených brouků (Wegensteiner et al., 2015). V práci Podskalská et al. (2009) byly zkoumány kairomony tj. těkavé semiochemikálie emitované rozkládajícími se těly obratlovců. Toho využívají především hrobaříkovití (Sylphidae) k lokalizaci zdroje potravy. Kairomonů využívají například i kůrovci (Wood, 1982b; Miller, 2006). Terpeny vylučované napadeným jehličnanem vyvolávají agregační chování u lýkožrouta smrkového (Wainhouse, 2008) Tyto chemické látky mohou škodit pouze druhu, který je produkuje, a vždy prospívají druhu, který je přijímá (Matthews & Matthew, 2009).

Allomony jsou chemikálie, které slouží k dezorientaci predátora, v tomto případě má z feromonu užitek živočich, který specifické pachové látky vysílá (Valterová, 2015). Prakticky lze allomon považovat za přesný opak feromonu. Producenti těchto specifických látek jsou zvýhodněni a škodí druhům, které je přijímají. Potenciální predátor je odpuzován pomocí vysílání repelentních látek kořisti. Mezi allomony patří např. repelenty, protilátky, antibiotika a atraktanty (Wood, 1982b). Infochemikálie, známé jako synomony zprostředkují informaci výhodnou jak pro producenta, tak i příjemce emitované látky, například vůně květin přiláká hmyz, který zajistí jejich opylení a zároveň tak najde svůj zdroj potravy (Žďárek, 2002).

Dle Kočárek (2005) je schopnost vnímat chemické podněty z okolí základní vlastností všech živých buněk (chemorecepce). Chemorecepce feromonů je zřejmě komplikovaný a specializovaný proces chemické detekce u hmyzu. Pachové látky se přenášejí větrem ve formě plynů ve vzduchu z jejich zdroje uvolnění a jsou zachyceny pomocí receptorů, které se nacházejí na čichovém orgánu konkrétního jedince. Receptory či receptorové buňky jsou speciálně přizpůsobené pro příjem těchto informací (Andersson et al., 2009). U hmyzu se jedná většinou o receptory kolem ústního ústrojí, na kladélku, tykadlech, na nohách apod. Nejdůležitějším chemoreceptorem u lýkožrouta jsou tykadla, jejichž palička je tvořena antennomery pokrytými chemosenzory umožňujícími detekovat různé pachy (Beutel et al, 2014).



Obr. 10: Hlavní smyslový orgán lýkožrouta smrkového s čichovými senzory. A - dospělec lýkožrouta smrkového s tykadly uzpůsobenými k zachycení těkavých semiochemikálií (Knížek & Zahradník, 2007). **B** - záznam tykadla brouka z elektronového mikroscanu (Andersson, 2012). **C** - schematický diagram olfaktorické senzily. (sec - senzorická receptorová buňka, dt - dendrit, thc - thekogennní buňka, sen - chemoreceptor). (Beutel et al, 2014).

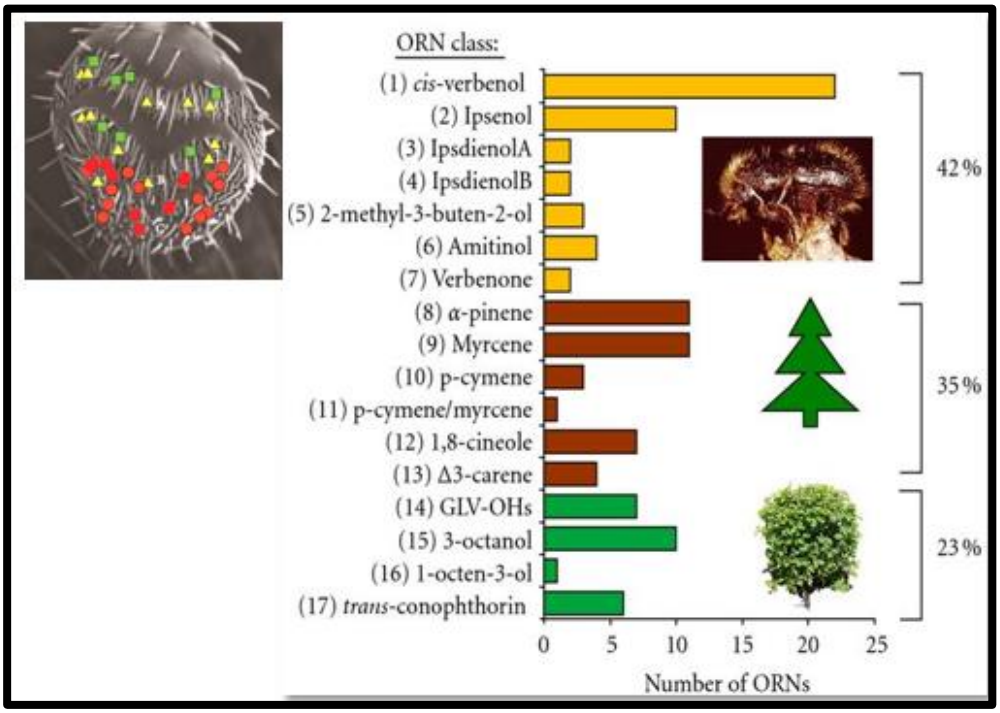
Antény čili tykadla slouží jako určitý typ biosenzoru pro stanovení těkavých látek, zejména feromonů (Riffell et al, 2008). Jak lze vidět výše na Obr. 10, na tykadlech lýkožrouta jsou umístěné jednotlivé čichové senzily (různé speciálních chloupky), které jsou nestejně citlivé na těkavé infochemikálie. Senzila je základní funkční a strukturální jednotkou kožních mechanoreceptorů a chemoreceptorů u hmyzu. Olfaktorické senzily mají kutikulární povrch perforovaný drobnými póry, kterými se těkavé látky dostávají ke smyslovým receptorovým buňkám v nitru senzily, tedy až do senzilární lymfy (Beutel et al, 2014). Lymfa obsahuje velké množství proteinů, na které se navážou konkrétní odoranty (OBP´s, odorant-binding proteins) tj. chemické těkavé látky. Proteiny OBP´s zajišťují transport těkavých hydrofobních látek senzilární lymfou k příslušným receptorům (Andersson et al., 2009; Žďárek, 2012).

Molekuly těkavé látky rozpuštěné ve vzduchu vniknou pórem do senzily na dendrit receptorické buňky v tykadlech (Matthews & Matthew, 2009; Žďárek, 2012). Zde vznikne akční potenciál a čichový podnět se šíří do nervového centra jedince (Vosshall & Stocker, 2007). Receptorové buňky, schopné akceptovat širokou škálu volatilních molekul VOC´s se dle práce Vickers (2000) dělí na receptory čichové (OR - olfactory receptor) a ionotropní (IR - ionotropic receptor). Čichové senzily či brvy jsou velice významné v chemické ekologii a to nejen u kůrovců, potažmo lýkožrouta smrkového. První experimenty pro základní identifikaci ORN (olfactory receptor neurons) byly prováděny v 80. letech minulého století pomocí tzv. single-sensillum recording (SSR), čili elektrofyziologických záznamů (Matthews & Matthew, 2009). Mnohem později se provedly komplexní laboratorní studie neuronů čichových receptorů lýkožrouta smrkového, octomilky obecné - *Drosophila melanogaster* či komára - *Culex quinquefasciatus* (Abuin et al., 2011).

Čichová senzila lýkožrouta smrkového je tvořena třemi články (Skuhravý, 2002). Jak lze vidět níže na Obr. 11., každý článek olfaktorické brvy (tedy oblast A, B a C) je různě citlivý na konkrétní skupinu semiochemikálií (Raffa et al., 2016). Brouk je velmi vnímavý jak k hostitelským, tak rostlinným chemickým sloučeninám, které přinesly hodnotné informace o tom, jak funguje mechanismus kódování pachových látek hmyzu (Andersson et al., 2010). Dle práce Raffa et al. (2016) je nejcitlivějším článkem čichové senzily pro látky *cis*-verbenol, *α*-pinen a 1,8 -cineol, oblast C.

Podle práce Andersson (2012) hrají těkavé organické sloučeniny (VOC´s) emitované hostitelskou dřevinou podstatnou úlohu při výběru a následné kolonizaci smrkové dřeviny (Erbilgin et al., 2007). Bylo prozkoumáno a identifikováno mnoho infochemikálií, které mají buď přitažlivé nebo odpudivé (repelentní) účinky na lýkožrouta smrkového (Byers, 2004). Ten velmi senzitivně reaguje na celou řadu emitovaný látek (Kalinová et al., 2014). Především na sloučeniny jako jsou například *α*-pinen, *cis*-verbenol, ipsdienol, ipsenol, verbenon a *exo*-brecicomin. Ke studiu chemické reakce hmyzu na dané specifické těkavé látky se běžně navíc provádějí elektrofyziologické záznamy a testy chování tzv. behaviorální testy. V takových studiích jsou syntetické infochemikálie obvykle zředěny v rozpouštědle a aplikovány

na nějaký druh dávkovače, ze kterého se odpařují molekuly zápachu (Larson, 2016). Andersson (2012) provedl ve své práci elektrofyziologickou studii pestré skupiny pachových látek - syntetických feromonů, hostitelských a rostlinných sloučenin. Ověřili přibližně 150 čichových senzil brouka, 17 různých chemických sloučenin a 3 skupiny ORN (olfactory receptor neurons), z toho 42 % senzil reagovalo na feromonové látky lýkožrouta smrkového (znázorněno žlutou barvou), 35 % na hostitelské sloučeniny jehličnanu (červenohnědá barva) a 23 % rostlinné látky listnatých dřevin (GLV OH´s - green leaf volatile alcohols, zelená barva). Výsledek studie Andersson (2012) je znázorněn níže na Obr. 11.



Obr. 11: Elektrofyziologická analýza ORN na čichové senzile lýkožrouta smrkového (Andersson, 2012). Poznámky: ORN - neurony čichových receptorů.

Feromonové ORN jsou na tykadle brouka nejčetnější a zároveň nejcitlivější na základní složky feromonových sloučenin (Baker et al., 2004). Výše na Obr. 11 lze vidět, jak lýkožrout smrkový reaguje nejcitlivěji na chemickou látku *cis*-verbenol (Andersson, 2012). Feromonové sloučeniny jsou většinou chirální látky, tedy vyskytují se ve dvou konfiguracích (*cis* a *trans*). Atrakce je vyvolána obecně pouze jedním z enantiomerů (dvě látky se stejným sumární a strukturním vzorcem, jejichž prostorové uspořádání molekul je zrcadlově převrácené), (Seybold et al., 2000; Luxová &Valterová, 2006). Dle výsledku studie Andersson (2012) je zřejmé, že lze infochemikálie dělit do tří skupin a podle reakcí na tři různé oblasti olfaktometrické senzily. Obecně rostlinné sloučeniny a syntetické feromony jsou detekovány čichovými receptory v oblasti A až B článku senzily lýkožrouta smrkového.

3.3.1 Syntéza feromonů

Lýkožrout smrkový produkuje pestrou škálu feromonů, jak lze vidět níže v Tab 2.

Semiochemical	Origin	Role identified in different species
Ips		
cis-Verbenol	Monoterpene	Aggregation
Methylbutenol	Hemiterpene	Aggregation
Ipsdienol	Monoterpene/*de novo* biosynthesis	Aggregation–antiaggregation–multifunctional
Ipsenol	Monoterpene/*de novo* biosynthesis	Aggregation–antiaggregation
Verbenone	Monoterpene/microorganisms	Antiaggregation

Tab 2: Semiochemikálie lýkožrouta rodu *Ips*. **Poznámky**: Většina těchto látek je syntetizováno z monoterpenů hostitelské dřeviny, některé jsou syntetizovány de novo jako reakce na napadení obecně kůrovci (novo biosynthesis). V některých případech může behaviorální reakce záviset na konfiguraci izomeru látky (Seybold et al., 2000).

Z chemického hlediska jsou feromony rozsáhlou skupinou nejrůznějších organických chemických sloučenin zahrnující - isoprenoidy, deriváty mastných kyselin, heterocykly, monoterpenické alkoholy a ketony, látky odvozené od aminokyselin apod. (Luxová & Valterová, 2006; Chapman, 2013). Jen málo feromonů si obecně lýkožrouti jsou schopni tvořit sami tj. bez pomoci symbiotických oragnismů. Převážně jsou syntetizovány z monoterpenů hostitele (Seybold et al., 2000). Novější studie ukazují, že podstatná část terpenoidních složek feromonu je ve skutečnosti syntetizovaná ze základních prekurzorů biosyntézou de novo (Seybold & Vanderwel, 2003).

Monoterpeny jsou organické těkavé látky (VOC´s - z anglické názvu volatile organic compounds) převážně rostlinného původu. Jsou složené ze dvou či více isoprenových jednotek. Molekula isoprenu je tvořena řetězcem pěti uhlíkových atomů. Základními monoterpeny jehličnatých stromů jsou α-pinen, β-pinen, myrcen a další. Zajišťují regulaci růstu a obranný mechanismus dřevin, a podílejí se na přenosu signálu některých organismů (Singer et al., 2003). Zmíněné organické látky se dostávají do těla vyšších živočichů potravou. Některé organismy jako převážně rostliny, bakterie a některé druhy hmyzu, jsou schopni vlastní syntézy (Dvořáková et al., 2011). Tvořením monoterpenů, se dřevina brání proti okusu a hlavně proti napadení brouky a závisí na interakci dřeviny a hmyzu (Dudareva et al., 2004). Lýkožrout smrkový je schopný rozpoznat dřevinu pomocí svého čichu, a rostlinné i hostitelské monoterpeny slouží jako prekurzory k přeměně na feromony (Phillips & Croteau, 1999).

Zdrojem semiochemikálií tj. feromonů bývají různě specializované žlázy s vnější sekrecí, které vylučují své produkty z těla do okolí nebo do střeva, odkud se

dostávají ven z organismu společně s trusem - viz agregační feromony lýkožrouta smrkového (Žďárek, 2012). Jejich syntéza probíhá třemi základními způsoby (Vanderwell & Oehlschlager, 1987; Seybold et al., 2000):

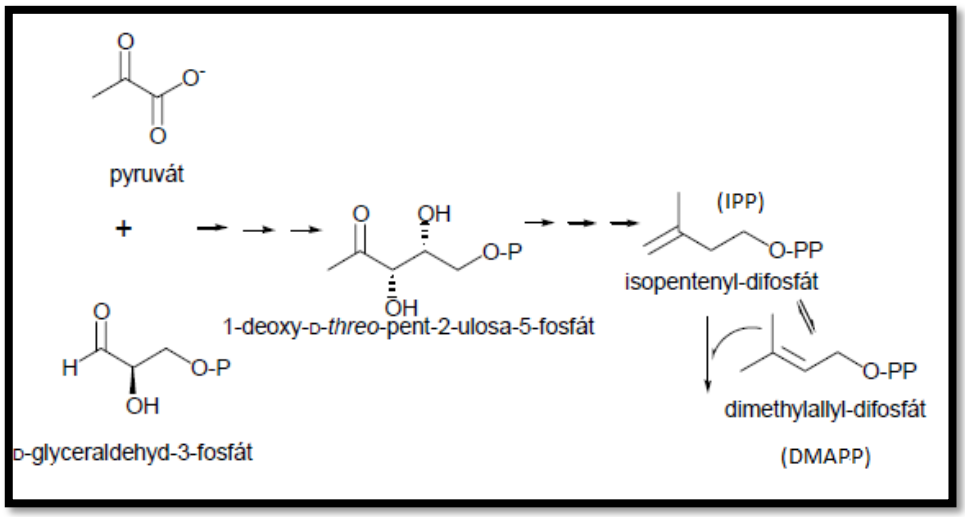
- rostlinné látky si uloží k pozdějšímu použití v nezměněném stavu
- upravením látek, které přijali v potravě a jejich následnou biosyntézou
- de novo biosyntézou

Obecně monoterpenické látky přijaté potravou jsou většinou pro organismus brouka škodlivé. Tyto toxické látky musí projít určitou úpravou (detoxikace, oxidace) a následnou biosyntézou vznikají feromony (Skuhravý, 2002). Tímto způsobem vznikají základní feromony u lýkožrouta smrkového (Seybold & Vanderwell, 2003). Látka α-pinen je základním prekurzorem v biosyntéze nejběžnějších feromonů kůrovců, především lýkožrouta smrkového. Syntéza feromonů se neobejde bez významné pomoci aerobních symbiotických organismů ve střevě brouka (Hulcr, 2003). Dle práce Kandasamy et al. (2016) je symbióza mezi broukem a jeho střevní mikrobiotou velice prospěšný mutualistický vztah, který plní řadu fyziologických a ekologických funkcí. Střevní mikroorganismy jsou významné v biologii obecně veškerého hmyzu, konkrétně u lýkožrouta smrkového napomáhají s produkcí důležitých feromonů (Hansen & Moran, 2014). Symbióza je řízena chemickými podněty, které jsou emitované jedním nebo oběma účastníky symbiózy.

De novo biosyntéza monoterpenů probíhá dvěma způsoby prostřednictvím:

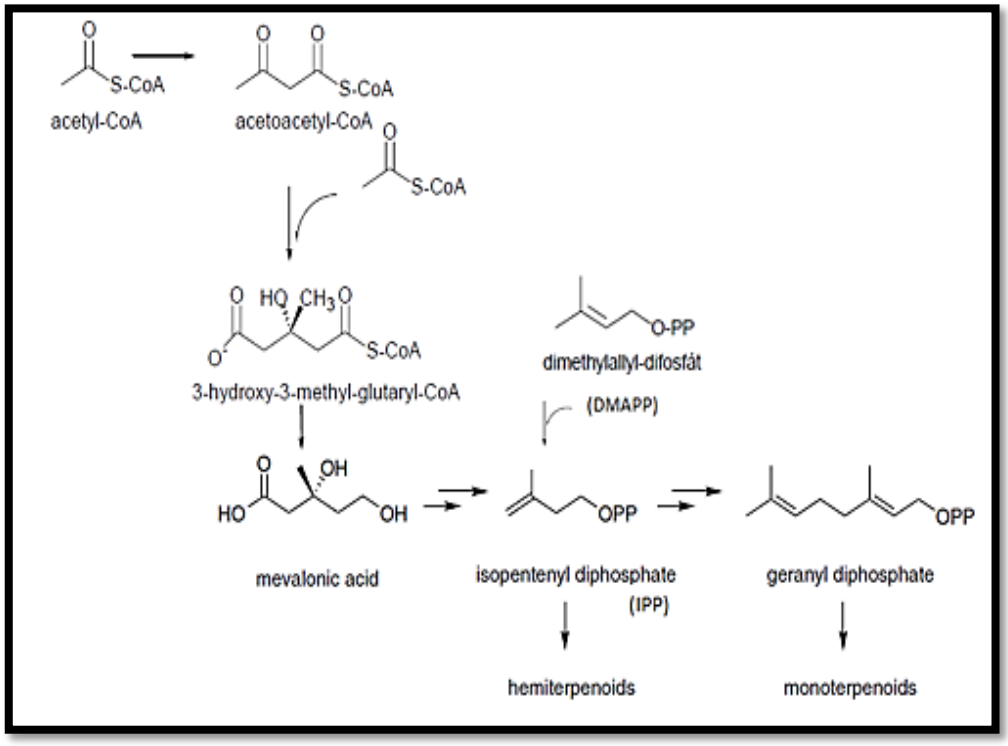
- mevalonátové cesty - přes kyselinu mevalonovou
- pyruvátové (Rohmerovy cesty) - přes 1 -deoxy-D-threo-pent-2-ulosa-5-fosfát

Jak uvádí Mahmoud & Croteau (2002) se tyto dvě syntézy od sebe liší ve vzniku základních prekurzorů terpenů, isopentenyldifosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP). Pyruvátová syntéza se odehrává v rostlinné a bakteriální buňce, přesněji uvnitř plastidu. Kondenzací základních produktů krebsova cyklu (D-glyceraldehyd-3-fostátu) a glykolýzy (pyruvátu), za katalytické enzymové reakce pentosového cyklu přes 1 -deoxy-D-threo-pent-2-ulosa-5-fosfát, vznikají základní stavební jednotky terpenů - IPP a DMAPP (vzniká přesmykem IPP). Touto reakcí vznikají prekurzory některých monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů (Rohmer et al., 1993). Poprvé byla Rohmerova cesta popsána jen pro bakteriální mikroorganismy. O pár let později byla objevena a prokázána i u vyšších rostlin a řas (Seybold & Vanderwell, 2003, Chapman, 2013). Pyruvátová reakce je znázorněná níže na Obr. 12.



Obr. 12: Rohmerova biosyntéza (Tillman et al., 1999, upraveno).

Mevalonátová biosyntéza se odehrává v cytosolu neboli intracelulární tekuté složce cytoplazmy, mimo organely (Dudareva et al., 2004). IPP vzniká z acetyl-CoA prostřednictvím kyseliny mevalonové (Mahmoud & Croteau, 2002). Tato biosyntéza de novo vede ke vzniku monoterpenických jednotek, především hemiterpenů, sesquiterpenů a triterpenů. Chemismus biosyntézy je naznačen níže na Obr. 13. (Luxová &Valterová, 2006, Chapman, 2013).

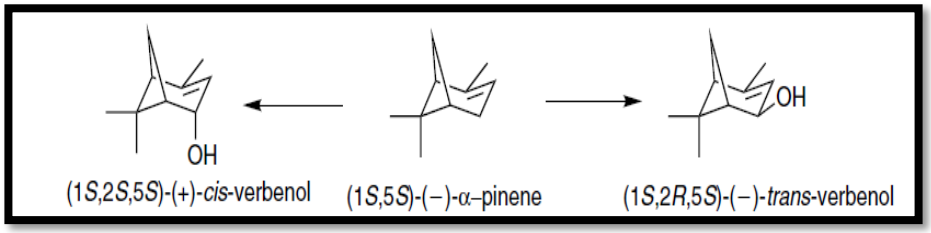


Obr. 13: Mevalonátová cesta (Tillman et al., 1999, Chapman, 2013, upraveno).

3.3.2 Agregační feromony

Agregační feromony mohou produkovat jen dospělí jedinci lýkožrouta smrkového, nezávisle na pohlaví. Informují ostatní jedince o úspěšném zdolání dřeviny a zahájení páření (Phillips & Croteau, 1999). Obecně tento druh atraktivního feromonu je prospěšný celé populaci lýkožrouta smrkového (Seybold et al., 2000), kdy je synchronizace ve skupině velice výhodná. Snižuje se tím riziko predace nebo parazitace jedinců. Zvyšuje se efektivnost využívání zdrojů (nutriční a prostorové podmínky) a pravděpodobnost úspěšného nalezení kompatibilního sexuálního partnera. Především se těchto feromonů, dle prací Wood (1982b) a Skuhravý (2002), používá při lákání lýkožrouta smrkového ke kolonizaci vybrané hostitelské dřeviny, kdy se zvyšuje úspěšnost útoku ve velké skupině. Agregační feromony jsou směsí látek *cis*-verbenolu a metylbutenolu (Chapman, 2013).

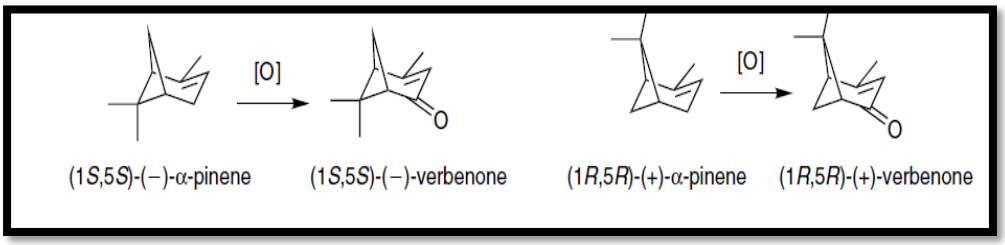
K syntéze feromonu dochází pravděpodobně již v trávicím traktu lýkožrouta smrkového. Dochází zde k oxidaci monoterpenu (*α*-pinenu) obsaženého v pryskyřici jehličnanu (viz Obr. 14). K této reakci je zapotřebí ještě symbiotických organismů, které pomáhají broukovi v natrávení celulózy (Skuhravý, 2002, Mori, 2005). Tímto způsobem vzniká látka *cis*-verbenol, která pak slouží jako složka agregačního feromonu. Izomerní forma *trans*-verbenol se v chemické komunikaci lýkožrouta smrkového neuplatňuje (Phillips & Croteau, 1999).



Obr. 14: Oxidace monoterpenu α-pinenu (Chapman, 2013).

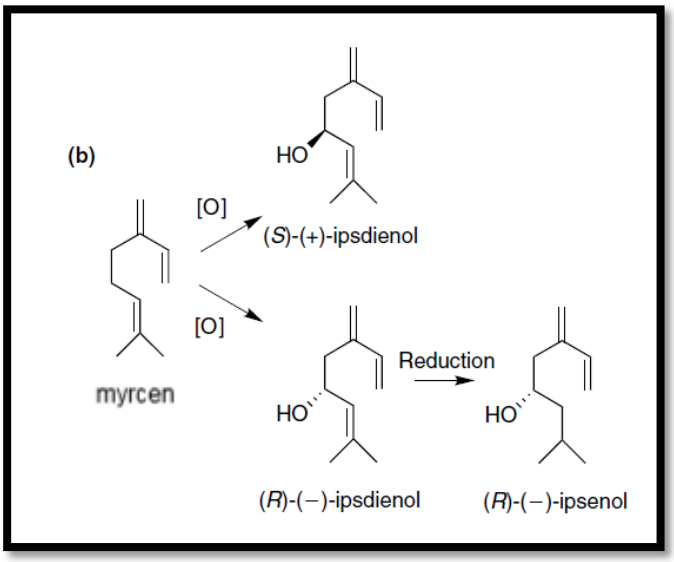
3.3.3 Antiagregační feromony

Jak uvádí Wainhouse (2008), antiagregační feromony slouží k regulaci hustoty a distribuci lýkožrouta smrkového na kmeni hostitelské dřeviny. Tímto typem feromonu lze zabránit dalšímu náletů samců i samic na hostitelský smrk, který byl již kolonizován. Složky látek verbenon, ipsdienol a ipsenol hrají významnou roli při syntéze antiagregačních feromonů. Syntéza probíhá v zadním střevě brouka, kde probíhá oxidace monoterpenu (*α*-pinenu) na feromon verbenon, což je znázorněno níže na Obr. 15. (Phillips & Croteau, 1999; Skuhravý, 2002).



Obr. 15: Vznik verbenonu (Chapman, 2013)**.**

Zmíněné těkavé organické látky verbenon, ipsdienol a ipsenol jsou produkovány samicemi lýkožrouta smrkového, které tak zajišťují prostor pro vývoj svých larev a proto nálet dalších brouků takto regulují (Skuhravý, 2002). Látka ipsdienol vzniká oxidací monoterpenu (myrcenu) a ipsenol vzniká redukcí ipsdienolu, viz níže Obr. 16. (Chapman, 2013).



Obr. 16: Vznik látek ipsdienol a ipsenol (Chapman, 2013).

3.4 Behaviorální pokusy

Behaviorální experimenty jsou experimenty založené na objektivním zkoumání chování živého jedince (etologie modelového organismu) na konkrétní podněty. Behaviorální chování je jakákoli aktivita, kterou jednotlivec provádí v reakci na impulz či změnu jeho prostředí, kterou lze pozorovat a určitým způsobem popsat (Veselovský, 2005). Hmyz se však často chová také spontánně, bez zjevného podnětu. Chování tedy zahrnuje celý komplex studií, který vede k poznání, jakým způsobem hmyz informace přijímá ze svého okolí, zpracovává a jakým způsobem následně jedná (Renou & Guerrero, 2000; Brattoli et al, 2011). Cílem těchto pokusů je zjištění, předvídání či ovládání chování daného testovaného jedince. Především se jedná o laboratorní výzkum živočichů či dokonce člověka, při kterém se zjišťuje jejich změna chování na určité podněty a metody učení zkoumaného jedince. Tento přístup ověřování vyžaduje podrobnější znalosti o daném organismu např. studie chování a chemická ekologie apod. (Pometlová et al, 2012).

Analýza chování hmyzu využívá technik z několika různých vědních disciplín včetně anatomie, biochemie, ekologie, etologie, genetiky, psychologie a fyziologie (Matthews & Matthews, 2009). Princip chování hmyzu lze rozdělit do několika po sobě jdoucích kroků: i) rozpoznávání daného stimulu, ii) přenos signálu, iii) integrace a odezva na daný podnět, což vede k behaviorální reakci (Veselovský, 2005).

Snahou mnoha vědců, kteří se behaviorálním pokusům věnovali, bylo zjistit, zda je reakce daného jedince na zkoumanou látku ovlivněna instinktivně (přirozeně) či uměle („naučeně“). Behaviorální testy významně přispěly k rozvoji vědních oborů, zejména fyziologie (neurofyziologie), ekologie a etologie hmyzu (Hoskovec, 2000). Systém centrálního nervového systému a chování hmyzu se může zdát být složité, ale je možné a velice efektivní rozlišit mechanismy a pravidla upravující jeho chování (Anonym, ©2015). Výsledky takového testování mají pak hlavně velký význam pro výzkum ekologie hmyzu a uplatnění chemických atraktantů či repelentů na bázi rostlinných látek či sexuálních feromonů. Dokonalé a hlubší pochopení principu chemické komunikace hmyzu, lze významně uplatnit v praxi - především v ekologii, zemědělství či lestnictví (např. ekologicky šetrná ochrana zemědělsky významných plodin či kontrola populačních hustot škodlivých organismů), (Hoskovec, 2000; Matthews & Matthew, 2009).

Chování živočichů tj. způsoby, kterými se organismus dokáže adaptovat okolnímu prostředí a interagovat s ním, je fascinující oblastí studia a především hmyz je vynikajícím předmětem k jeho výzkumu, hlavně proto že jsou většinou jedinci většinou snadno dostupní, rozmanití a relativně snadno se s nimi manipuluje (Matthews & Matthew, 2009). Behaviorální pokusy byly provedené s pestrou škálou živočichů - se savci (potkani, myši, králíci, morčata), ptáky, rybami, obojživelníky (žáby), mořskými plži, a dokonce i s člověkem. Nejvíce experimentů bylo provedeno především u hmyzu, jako jsou například Lepidoptera (motýli a můry), Hymenoptera (vosy a včely), Diptera (dvoukřídlí), Blattodea (švábi) a Coleptera (brouci).

Při behaviorálních experimentech je velmi důležité dodržovat stálé optimální podmínky prostředí (světelné, teplotní, chemické či vlhkostní aj.). Je nutné uvážit a hlavně omezit nadměrné stresování pozorovaného organismu (při jakékoli manipulaci s živým materiálem) a poskytnout mu dostatek času, aby si na dané experimentální prostředí přivykl (Veselovský, 2005). Některé testy, hlavně v případě sledování spontánního chování organismu v bludištích, či otevřených arénkách tvz. „open area", jsou na dobu přivyknutí velmi citlivé (Mustaparta, 1984; Pometlová et al, 2012). Behaviorální pokusy závisí také na správném fyziologickém stavu testovaného druhu - věk, hladovění, pohlaví (Brattoli et al, 2011).

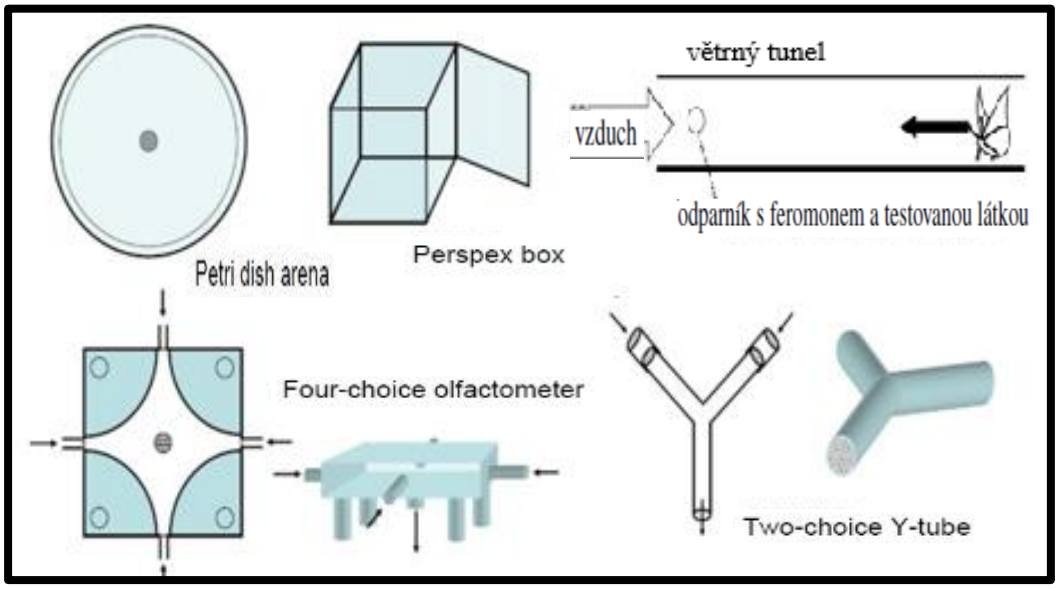
3.4.1 Olfaktometrie

Ke studiu chování jedinců konktrétně u hmyzu, ale i jiného organismu se využívají specifické uzavřené aparatury či nádoby, tzv. olfaktometry. V těchto speciálních olfaktometrech se provádí experimentální testování reakce konkrétního jedince v přítomnosti specifické chemikální látky, tj. feromonu. Při behaviorálních experimentech je zapotřebí jistá péče o olfaktometry (Anonym, ©2015). Obecně je doporučováno po každém jednotlivém pokusu otřít celý olfaktometr 96 % ethanolem a měnit pozici se zdrojem návnady. Hlavním důvodem takového ošetření je minimalizace pachových stop, tzn. zabránění dalšímu testovanému exempláři, aby mohl upřednostnit cestu jedince měřeného před ním (hmyz má určitou formu paměti) a nemohlo tak dojít ke zkreslení naměřených výsledků (Mustaparta, 1984; Pometlová et al, 2012). Proto jsou většinou olfaktometry vyrobeny ze skla či plexiskla, a aby se zkoumaný objekt mohl dobře pozorovat (Žďárek, 2002). Měřící aparatury musí také splňovat určitá kritéria designu olfaktometru, aby byly olfaktorické testy efektivní, jako např. nízká propustnost (aby se minimalizovala ztráta vzorku difúzí /adsorpcí), minimální fyzikální a chemické reakce se vzorkem či vzduchem, minimální či žádné riziko kontaminace zkoumané infochemikálie, minimalizace vnitřní povrchové plochy apod. (Brattoli et al, 2011). Behaviorální olfaktorické měření je obecně problematické, časově náročnější a vyžaduje hodně trpělivosti.

3.4.2 Druhy olfaktometru

Pro studium chemického chování hmyzu se nejvíce využívají dle práce Hare (1998) uzavřené prostory - Petriho misky, boxy, olfaktometr ve tvaru „Y", olfaktometr s různými počty ramen (nebo jisté modifikace již zmíněných) či tzv. větrné tunely, jak lze vidět na Obr. 17. Všechna tato zařízení pracují obecně na stejném principu. Sledovaný živý jedinec je vpuštěn do speciálně uzavřeného prostoru (olfaktometru), kde do proudu čistého vzduchu byla rozptýlena těkavá semiochemikálie a je

pozorována jeho preference směru pohybu vůči zdroji těkavých látek. Ramena tunelu jsou od sebe navzájem separována. Na jedné straně je umístěn zdroj odorantu a strana druhá slouží jako kontrolní prostor, kde proudí konstantní čistý vzduch (Mustaparta, 1984; Anonym, ©2015). Je možné použití také olfaktometrů s otevřenou arénkou.



Obr. 17: Typy konkrétních olfaktometrických aparatur pro behaviorální testování hmyzu (upraveno, https://www.cronodon.com/BioTech/Insect_Behaviour.html).

Nejjednodušší behaviorální testy lze provést v Petriho misce (SRB test - z anglického short-range behavior test), kde je obecně zdroj pachové látky umisťován většinou doprostřed arénky. Tato metoda s drobnou úpravou byla použita v práci Hoskovec (2000), ve které byla provedena studie chemického chování motýla obaleče východního (Lepidoptera: *Cydia molesta*). Jako zdroj odorantu pro sledování reakce motýla byl použit analog sexuálního feromonu motýla, který byl umístěn do Petriho misky. V Petriho misce byla umístěn také samice motýla, která byla zdrojem přírodního sexuálního feromonu. Výsledná úspěšnost kopulace byla srovnána s kontrolou (bez analogu pohlavního feromonu). Kromě Petriho misky Hoskovec (2000) použil ještě větrný tunel (LRB test - z anglického long-range behavior test). Jak je již z názvu patrné, tunel byl opatřen systémem ventilátorů, který zajišťuje rovnoměrné proudění zvlhčeného čistého vzduchu. Ve větrném tunelu z plexiskla a při konstantní teplotě, době a intenzitě osvětlení, bylo testováno letové chování samce motýla. Odparník s volatilní látkou byl umístěn za přívod vzduchu do tunelu a samec motýla byl vypuštěn proti proudu odorantu (Hoskovec, 2000).

Behaviorálními experimenty s lýkožroutem smrkovým se zabýval ve své práci Kandasamy et al. (2019). Testy byly provedeny v aréncе v plastových Petriho miskách, do které byly vytvořeny čtyři otvory pro čtyři plastové válečky s návnadou. Jako návnada v této studii byla použita houba, napěstovaná na PDA agaru (PDA - potato dextrose agar), samotný PDA agar a dva válečky s kontrolou (bez houby a bez agaru).

Brouci byli lákáni pomocí těkavých látek uvolňujících se z houby. Petriho miska byla vyplněna filtračním papírem, aby byl testovanému broukovi usnadněn pohyb. Samotný pokus probíhal v uzavřené Petriho misce s perforovaným víčkem (zajištění cirkulace vzduchu), ve tmě v laminárním boxu, při teplotě 25 °C po dobu 6 hodin. Po skončení pokusu byly těkavé látky detekovány plynovou chromatografií (Kandasamy et al., 2019).

Další behaviorální technikou je olfaktometr s větším počtem ramen, kde je několik vstupů, kam je přiváděn proud vzduchu do komory a ve zbývajících vstupech může proudit semiochemikálie v proudu čistého vzduchu (zdroj návnady). Tento prostor umožňuje hmyzu volný pohyb po arénce buď směrem ke zdroji vůně, nebo směrem od něj. Čtyř-výběrový olfaktometr s uzavřenou arénkou byl použit pro behaviorální pokusy s parazitickými vosami (Hymenoptera: Braconidae) v experimentální práci Luquet et al. (2019). Pomocí olfaktometrických testů byly pozorovány preference samic parazitických vos na rostliné stimuly (ječmen či fazole zamořené mšicemi). V jiné práci byla prověřena repelentnost volatilních látek methylsalicylátu a verbenonu vůči dvěma druhům ambrosiových kůrovců (Coleoptera: Scolytinae a Platypodinae), konrétně *Xyleborus volvulus* a *Xyleborus bispinatus* (Rivera et al., 2020). Těchto poznatků, by se mohlo využít v lesnictví, k odlákání kůrovců od náletu na hostitelskou dřevinu.

Obecně olfaktometr tvaru „Y“, je tvořen dvěma tzv. výběrovými komorami, kde se zjišťuje preference pozorovaného brouka - atrakce či odpudivost. Arénky bývají uzavřené, aby se zabránilo úniku sledovaného jedince. A zdroj těkavé látky se většinou vkládá do jednoho z ramen. Lýkožrout smrkový byl otestován i v této arénce v práci Blažytė-Čereškienė et al. (2016). Byla použita arénka v jisté modifikaci Schlyter & Löfqvist (1986). Jako návnada byla použita látka *trans*-4-thujanol, což je bioaktivní sloučenina norské smrkové kůry, která se mění v závislosti na stáří stromů a ovlivňuje tak chování lýkožrouta. Byly prověřeny olfaktorické odpovědi na tuto sloučeninu a nakonec byla ještě provedena plynová chromatografie pro detekci a ověření nabízené feromonové návnady. V tomto typu olfaktometru byly testovány i jiné druhy kůrovců. Například v článku (Zhu et al., 2020) ověřovali behaviorální odpověď „škůdce“ meruňových stromů, konkrétně bělokaze *Scolytus schevyrewi Semenov* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) na těkavé rostlinné hostitelské stimuly. V jiné vědecké práci Marler & Marler (2018), ověřovali ovlivnění chemického behaviorálního chování brouka, konkrétně *Rhyzobius lophanthae* (Coleoptera:Coccinellidae - slunéčkovití) těkavými látkami, uvolňujících se z napadených listů a sazenic „škůdcem“ cykasu. Yu et al. (2015) použili „Y“olfaktometr ke sledování behaviorálního chování samic komárů, *Culex. pipiens palens* (Diptera:Culicidaena - komárovití) na zdroj těkavého odorantu a jeho syntetických směsí (α-pinen, β-pinen, D-limonen, linalool, methylsalicylát aj.). Například v článku Kalinová et al, (2009) využili tento druh olfaktometru ke zkoumání chemického chování u brouků hrobaříky (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae). Kde byla testována role těkavých látek (DMS, DMDS a DMTS), které jsou emitované při rozkladu těla drobných obratlovců (konkrétně laboratorní myši).

Výše zmíněné olfaktometry byly vždy s uzavřeným typem arénky. Nicméně se používají i jiné typy olfaktometrů, a to s otevřenou arénou, tzv: „open arena“. Princip behaviorálního testování zůstává stejný. Tento typ arénky vyzkoušeli ve svých článcích Browne et al. (1974), Zhang (2003), Zhang & Schlyter (2010), v jisté modifikaci Jakuš & Blaženec (2011), Schlyter & Löfqvist (1986) a další. Podobná studie behaviorálních pokusů s lýkožroutem smrkovým byla provedena v práci Jakuš & Blaženec (2011) ve dvouvýběrovém rovném olfaktometru (jistá modifikace „open area“ arénky), kde byla otestována atraktivita jedinců na těkavé látky, uvolňujících se ze smrkového dřeva s feromonem.

Dle Blood et al. (2018) může být atraktivita chemických látek (volatilní látky, uvolňované ořešákem královským) zkoumána například i v jednoduché rovné dlouhé skleněné zkumavce, která poslouží jako olfaktometr pro behaviorální otestování kůrovce *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Tento drobný druh kůrovce škodí ořešáku královskému (*Juglans regia*). Zvláštním typem olfaktometru, ve tvaru “T“ byl použit v článku Stelinski & Tiwari (2013) k ověření atraktivních či repelentích účinků citrusových těkavých látek u „škůdců“ citrusu (Hemiptera:Psylloidea:*Diaphorina citri* - mery). Jedná se o skleněnou dlouho trubici, která byla ve svislé poloze, do které byl vkládán teflonový proužek, který byl z jedné strany ošetřen odorantu a z druhé strany kontrolní látkou. „T olfaktometr využívá pozitivní fototaxi (přitažlivost ke světlu) a negativní geotaxe (tendence chodit nebo létat vzhůru). Sledovaní jedinci byli vypouštěni zezdola a ke zdroji těkavé látky museli dolézt/doletět po stěně trubice.

4 Metodika

Veškeré naměřené behaviorální laboratorní experimenty byly provedené na Fakultě lesnické a dřevařské, České zemědělské univerzity v Praze. V laboratořích skupiny Extemit-K byla testována atraktivita vybraných volatilních látek na živých jedincích lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). Cílem této práce bylo zjistit, jakou odezvu budou mít brouci na nabízené návnady (VOC´s) pomocí olfaktometrů (arének) při laboratorních podmínkách.

Místnost, kde probíhaly veškeré behaviorální experimenty s lýkožroutem smrkovým, byla vybavena vlastní klimatizací, k udržení stálé teploty pro probíhající experimenty s vlastním odtahem vzduchu (odsávací rameno značky Nederman). Místnost byla vybavena vzduchovým olfaktometrem (Air delivery systém VCS, 0 - 1,3 LMP), který zajišťuje rovnoměrný proud tlaku vzduchu do arénky. Přívod vzduchu do arénky byl zajištěn silikonovými hadičkami a odváděn odtahem vzduchu z arénky. Vzduch byl stlačován v jiné části laboratoře, kde je kontaminace okolí méně pravděpodobná. Laboratoř se nejprve musela upravit, aby byly zajištěny vhodné podmínky pro měření. Lýkožrout smrkový je mimo jiné atrahován světlem. Pro eliminaci jakéhokoli zdroje světla zvenčí bylo nutné zatemnit tyto části neprostupným materiálem - alobalem. Alobalem byla zakrytá skleněná tabulka dveří (na obou stranách místnosti) a mezera pode dveřmi a podlahou byla eliminována dřevěným prahem. Tímto způsobem bylo též ošetřeno, aby nedocházelo k úniku pozorovaných jedinců z místnosti (včetně ucpání veškerých mezer - např. i klíčová dírka aj.).

4.1 Princip behaviorálních pokusů s lýkožroutem smrkovým

Behaviorální testy byly prováděny na živých jedincích lýkožrouta smrkového ve speciálně upraveném prostoru (olfaktometru). Testovaní brouci byli šetrně odebíráni pokaždé stejným způsobem, ve stejnou hodinu (i během dne) a byla jim umožněna dostatečná doba na přivyknutí experimentálnímu prostředí. Zdroj odorantu byl umisťován doprostřed arénky, v případě olfaktometru s otevřenou arénkou. V olfaktometru s uzavřenou arénkou byl zdroj feromonové návnady umisťován vždy do jednoho ze dvou možných ramen olfaktometru a pozice s feromonem se po každém změření měnila (minimalizace možného ovlivnění dalších měřených jedinců). Zdrojem nabízeného odorantu pro pozorování chování lýkožrouta smrkového, byly dva typy feromonu - feromonová směs látek (4S) - *cis*-verbenol a 2 -methyl-3-buten-2-ol a komerční feromon (Pheagr IT Extra), které byly rozptýleny do proudu čistého vzduchu V olfaktometru byla sledována preference směru pohybu brouka vůči zdroji těkavé látky. Reakce jedince byla pozorována vždy po určitou stejně dlouhou dobu. Výsledná úspěšnost reakce (atraktivní/odpudivý účinek) byla zaznamenána a srovnána s kontrolou (bez feromonové návnady). Každý brouk byl otestován pouze jednou. Při

olfaktorických testech byly dodržovány stálé konstantní experimentální podmínky - zdroj světla, teplota, tlak a vlhkost vzduchu. Také byly dodržovány jisté zásady prevence kontaminace laboratoře, povrchu olfaktometru, použitých laboratorních pomůcek a samotných měřených brouků chemickými látkami.

Při každém experimentu se dodržovaly základní kroky:

Den před měřením:

1) Vysbírání potřebného počtu jedinců ze smrkového chovného polena.
2) Vložení brouků do plastové zkumavky a uložení do ledničky.

Před vlastním měřením:

3) Ošetření pomůcek ethanolem.
4) Nastavení teploty místnosti, změření vlhkosti vzduchu v arénce.
5) Rozsvícení zdroje světla, příprava feromonových návnad.
6) Zapnutí hlavního přívodu vzduchu.
7) Příprava arénky.
8) Zhasnutí veškerého jiného světla (svítí pouze zdroj denní světla nad arénkou).
9) Odebrání konkrétních jedinců k měření do Petriho misky s navlhčenou buničinou (pro přivyknutí na dobu 5 min).

Vlastní měření:

10) Vlastní měření.
11) Výměna feromonových návnad/zdroje světla.
12) Zaznamenání reakce brouka - repelentní a atraktivní účinek.
13) Označení a očíslování jedince.

Ukončení pokusu:

14) Vypnutí přístrojů.
15) Otření pomůcek ethanolem.
16) Uložení feromonu do mrazáku.

4.2 Biologický materiál

Pro behaviorální pokusy byli použiti jedinci lýkožrouta smrkového F1 generace z chovů univerzity ČZU FLD. Všichni testovaní brouci byli stejného stáří, byli sesbíráni z jedné konkrétní lokality (Křivoklátsko) a odchováni konkrétně na *Picea abies*. Biologický materiál byl uchováván v plastové zkumavce s perforovaným víčkem (pro přísun vzduchu) a kouskem zvlhčené bučiny v ledničce (při 4°C). S biologickým materiálem bylo zaházeno šetrně, vždy pomocí měkké pinzety, aby docházelo k minimálnímu stresování jedinců. Každé ráno ve stejnou dobu (i během dne), vždy před samotným experimentem byli vybráni nejaktivnější jedinci z plastové

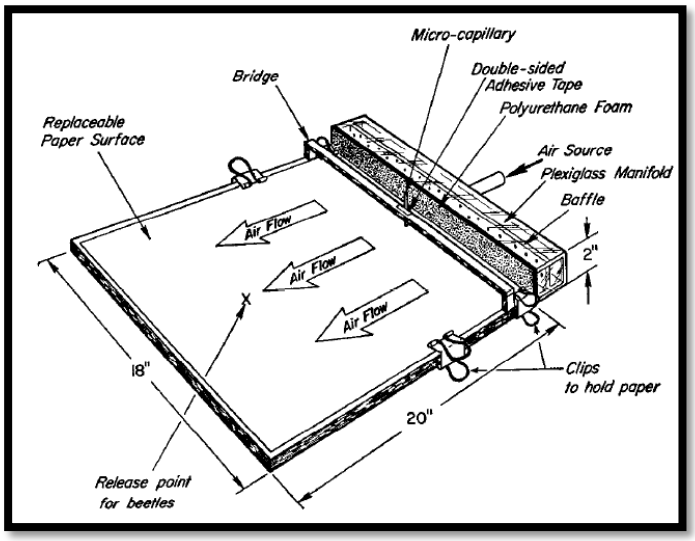
zkumavky z ledničky a odpočítáni na plastovou Petriho misku (Ø 9 cm) s kouskem filtračního papíru (na dobu 5 minut, pro přivyknutí experimentálnímu prostředí).

4.3 Typy použitých olfaktometrů

Pro měření behaviorální odezvy lýkožrouta smrkového na nabízené volatilní látky byly použity dva typy olfaktometru, které byly vyrobeny z pevného průhledného materiálu. Neustálá cirkulace vzduchu v prostoru arénky byla zajištěna vzduchovým olfaktometrem. Přívod vzduchu do uzavřené arénky byl zajištěn silikonovými hadičkami, které vedly malým otvorem do plastové zkumavky pro chytání pozorovaných brouků a odváděn odtahem vzduchu z prostředka arénky. Před každým experimentem a následně i po změření celé série pokusů bylo nutné olfaktometr ošetřit 96 % ethanolem. Případné znečištění arénky olfaktometru bylo minimalizováno filtračním papírem, kterým se zakryla celá její spodní část, a po každém experimentu se použil nový. Filtrační papír byl použit také k lepšímu pohybu brouka v arénce.

4.3.1 Olfaktometr s otevřenou arénkou

Jako první k otestování lýkožrouta smrkového byl použit olfaktometr s otevřenou arénkou (Browne et al. 1974), viz níže Obr. 18. Olfaktometr s obdélníkovou arénkou (18 x 20 cm) je vyroben z akrylátového plastu. Konstantní tlak vzduchu byl vháněn středem do arénky silikonovou hadičkou. Rovnoměrné proudění vháněného vzduchu do olfaktometru je zajištěno přepážkou a polyuretanovou pěnou (5 x 2 cm). Směr proudu vzduchu je na Obr. 18 naznačen šipkami. Pro upevnění filtračního papíru k arénce se použily klipsy. V první třetině arénky je děrovaná kapilární trubice, která slouží jako feromonový odparník s konkrétním feromonem (sem se vkládala feromonová návnada). Tato mikrokapilára je připevněna lepicí páskou k nosnému můstku, který je podél arénky. Písmenem X je na obrázku níže naznačeno startovní pole testovaného brouka.

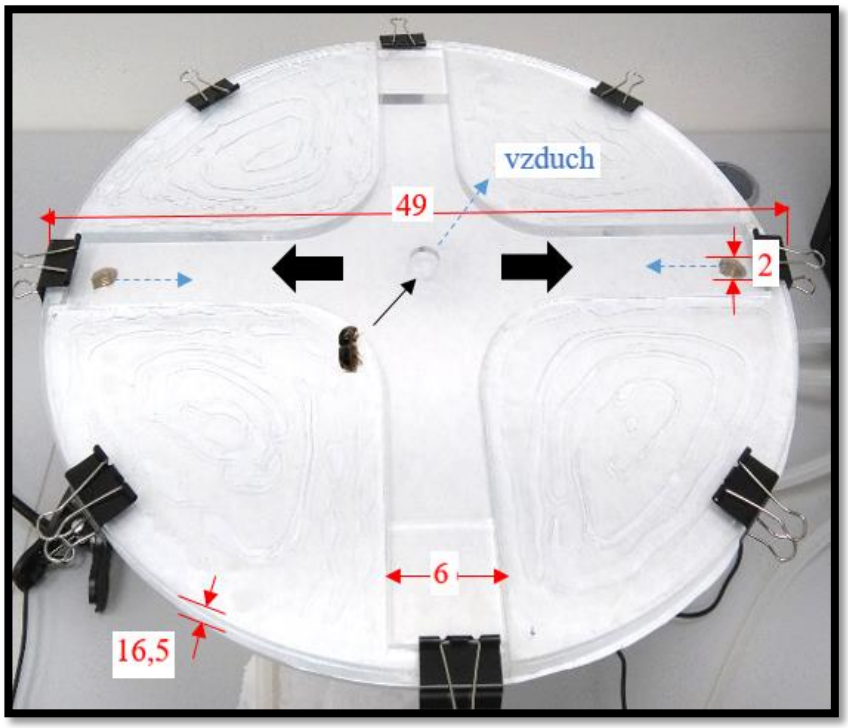


Obr. 18: Olfaktometr s otevřenou („open arena“) arénkou (Browne et al. 1974).

4.3.2 Olfaktometr s uzavřenou arénkou

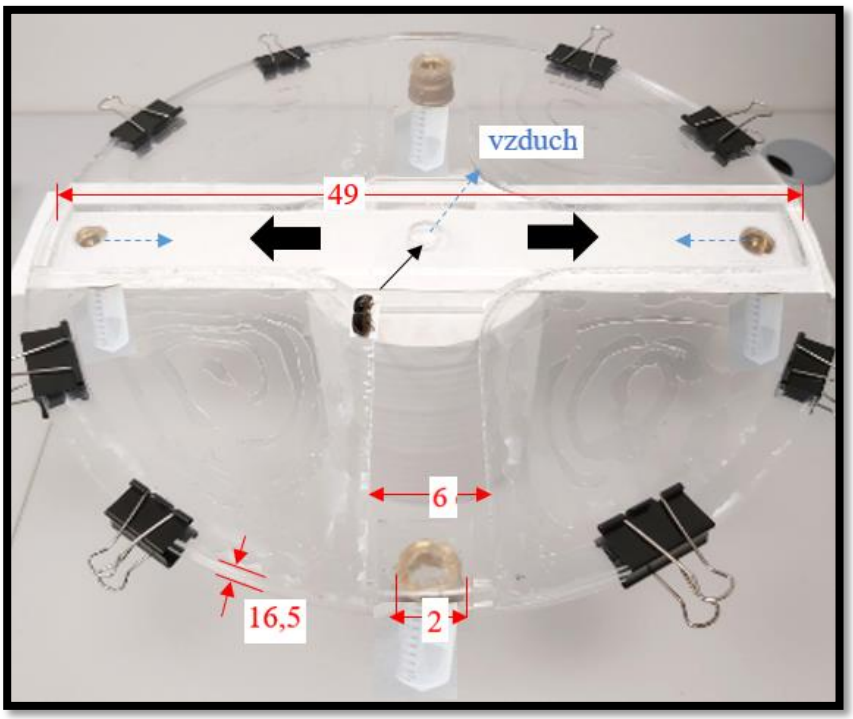
Druhým typem olfaktometru, který byl použit při experimentální laboratorním testování lýkožrouta smrkového na nabízenou feromonovou návnadu, byl olfaktometr s uzavřenou arénkou se čtyřmi výběrovými rameny, viz níže Obr. 19. Olfaktometr má tvaru kruhu (r = 49 cm, tloušťka olfaktometru 16,5 cm) a je vyrobený z průhledného materiálu - plexiskla. Ramena arénky jsou stejně široká (6 cm) a na konci opatřena otvory (d = 2 cm) pro chytání pozorovaných brouků do připravený plastových zkumavek (objem zkumavky 20 ml), které byly našroubované na kovové závity. Modrými šipkami je naznačen proud vzduchu v aréne. Testovaný jedinec se vkladál vždy otvorem uprostřed arénky (naznačeno tenkou černou šipkou) a měl na výběr dvě možnosti pohybu v aréne - k feromonové návnadě (atraktivní účinek nabízeného odorantu)/ od návnady (repeletní účinek), což je na Obr 19. naznačeno 2 černými tlustými šipkami.

1) Při prvních pilotních experimentech byly otestovány všechny čtyři ramena (návnada, ostatní ramena sloužily jako blank - kontrola).



Obr. 19: Olfaktometr s uzavřenou arénkou. Poznámky: Červeně jsou naznačeny parametry (v cm); modře je naznačen proud vzduchu v aréne; černou šipkou ➡ je naznačen možný pobyh brouka, místo vložení živého jedince je naznačeno → (Majerová, ©2019).

2) Při dalších následujících pokusech s lýkožroutem smrkovým v olfaktometru s uzavřenou arénkou byly používány již jen dvě ramena, viz níže Obr. 20. Olfaktometr je opatřen speciálně vytvořenými přepážkami, kterými se znemožnil přístup do dalších dvou možných chodeb resp. možností/návnad, na které mohl testovaný jedinec reagovat. Vše ostatní zůstalo stejné.



Obr. 20: Olfaktometr s uzavřenou arénkou. **Poznámky**: Červeně jsou naznačeny parametry (v cm); modře je naznačen proud vzduchu v aréne; černou šipkou ➡ je naznačen možný pobyh brouka, místo vložení živého jedince je naznačeno → (Majerová, ©2019).

4.4 Feromonové návnady

Pro laboratorní behaviorální testy lýkožrouta smrkového byly použity dva typy feromonových návnad. První návnada byla směsí z feromonů (4S) - *cis* -verbenolu a 2 -methyl-3-buten-2-olu v poměru (1:50), která byla připravena v laboratoři skupinou Extemit-K. Jako druhá návnada byl použit komerční feromon Pheagr IT Extra. Jakákoli manipulace s feromonovou návnadou probíhala v jiné místnosti, aby nedošlo ke kontaminaci testovaných jedinců ani použitých pomůcek a pouze v jednorázových rukavicích. Použité pomůcky včetně samotného olfaktometru byly vždy před každým pokusem ošetřeny 96 % ethanolem. Feromony byly skladovány v jiné místnosti v mrazáku ve speciální folii (komerční feromon) a vialky s feromonovou směsí uloženy v uzavřené plastové zkumavce. Feromony před měřením byly vloženy do plastové zkumavky (objemu zkumavky 20 ml) a našroubovány na závit olfaktometru s

uzavřenou arénkou těsně před provedením experimentu. Pozice umístění feromonu do ramena olfaktometru s uzavřenou arénkou se pokaždém změření měnila.

Feromon č. 1 (F1) - cV+MB

Směs feromonu byla připravena z látek (4S) - *cis*-verbenolu (cV) a 2 -methyl-3-buten-2-olu (MB) v poměru (1:50). Každá látka byla zvlášť připravena do Kartellových vialek (velikosti 731 mm). Do kterých se vytvořily malé dírky pro snazší rozptýlení v olfaktometru.

Feromon č. 2 (F2) - komerční feromon (Pheagr IT Extra)

Jedná se syntetický agregační feromon, který je založený na principu kombinace biologicky aktivních látek s atraktivními účinky na lýkožrouta smrkového. Tato těkavá látka se používá ve feromonových lapačích, otrávených lapácích, případně ke zvýšení atraktivity preventivně ošetřeného dříví. Použitá těkavá látka láká obě pohlaví lýkožrouta. Agregační feromon obsažený v destičce z buničiny je postupně uvolňován skrz stěnu odparníku (speciální fólie). Účinnou látkou komerčního feromonu je (S)-*cis*-verbenol a (+/-) ipsdienol.

4.5 Provedené experimenty v olfaktometru s otevřenou arénkou

Byla ověřována atraktivita lýkožrouta smrkového na feromonovou návnadu, která byla vložena do děrované kapilární trubice, která slouží jako feromonový odparník. V olfaktometru byl otestován vždy jeden exemplář a to vždy pouze jednou. Měřený jedinec byl umístěn přibližně do první třetiny plochy arénky (označeno písmenem X, viz výše Obr. 18) a mohl se tedy volně pohybovat po celé ploše arénky. Brouk, který byl volatilní chemickou látkou atrahován, měl dojít do těsné blízkosti pod feromonový odparník. Reakce brouka na zdroj chemické návnady byla sledována po dobu 10 minut. Byly použity oba dva typy feromonových návnad. Živí jedinci byli testováni proti proudu čistého vzduchu za konstantní teploty (první série pokusu při teplotě 20°C, druhá série poksů při teplotě 26°C), tlaku vzduchu (0,5 l/min) a vlhkosti vzduchu. Celkem bylo proměřeno 20 jedinců.

Výsledky: Tento typ arénky při behaviorálních pokusech lýkožrouta smrkového nevyhovoval. Práce s tímto olfaktometrem představovala dva zásadní problémy. Při nízké teplotě brouci nijak nereagovali a při vyšších teplotách se snažili uletět.

Změny: Bylo nutné arénku uzavřít a proto další behaviorální testy probíhaly již v olfaktometru s uzavřenou arénkou.

4.6 Provedené experimenty v olfaktometru s uzavřenou arénkou

1) Prvotní behaviorální pokusy byly provedeny pouze v olfaktometru s uzavřenou arénkou, viz níže Obr. 19. Celkem byly provedeny 3 série pilotních experimentů. Živí jedinci byli testováni proti proudu čistého vzduchu za konstantní teploty (použity dvě různé teploty vzduchu - 21 a 25 °C), tlaku vzduchu (0,5 l/min), vlhkosti vzduchu a vždy jednoho typu osvětlení - žádné (tma, bodové a plošné světlo). V olfaktometru bylo testováno pokaždé 100 jedinců naráz a to vždy pouze jednou. Měření jedinci byli vpouštěni vždy otvorem uprostřed arénky (naznačeno tenkou černou šipkou) a měli na výběr dvě možnosti pohybu v aréne - k feromonové návnadě (atraktivní účinek nabízeného odorantu)/ od návnady (repeletní účinek), viz výše Obr. 19. Brouci se mohli částečně pohybovat i do dvou zbývajících ramen olfaktometru arénky. Reakce jedinců byla sledována vždy po dobu 30 minut, zaznamenána a nachytaní brouci byli spočítáni. Celkově bylo změřeno okolo 3000 brouků. Pro zpracování výsledků byly použity průměrné počty pozorovaných jedinců, ze série třech opakování pomocí excelu.

A) Nejprve byl otestován vliv bodového zdroje světla na chování jedinců lýkožrouta smrkového. Pak bylo vyzkoušeno, jak se jedinci chovají ve tmě, jako kontrola k jejich chování na zdroj světla. Zdrojem bodového světla byla LED lampička (barva světla; warm white - 3000 Kelvin), viz Obr. 1 (Příloha). Test probíhal nejprve při teplotě 26° C a pak byl pokus proveden podle stejné metodiky, jen při teplotě 21° C.

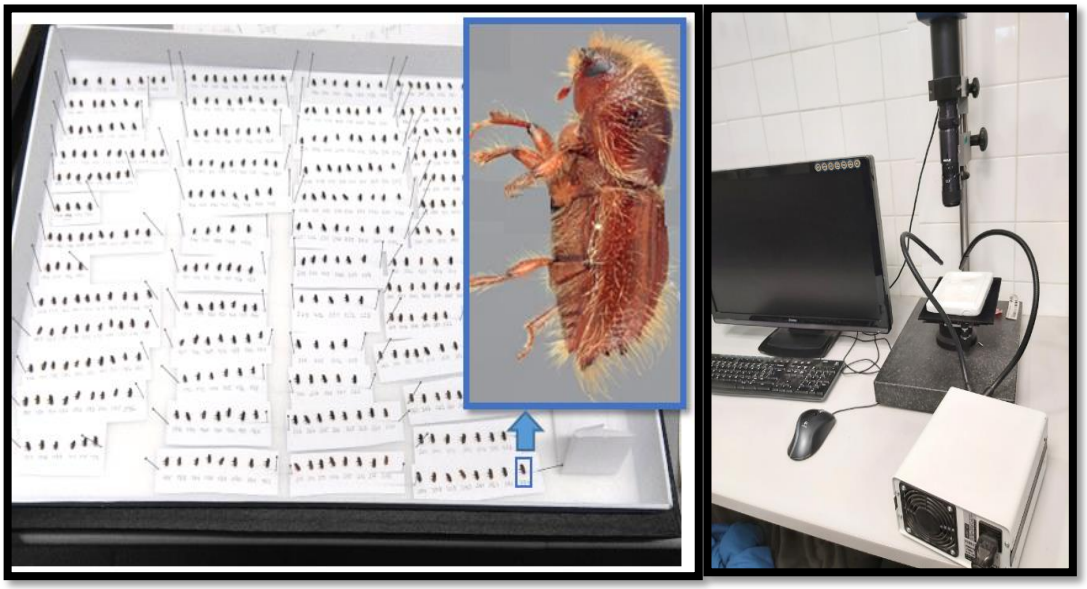
B) Následně byl sledován vliv bodového zdroje světla (stejný jako v předchozí sérii pokusů A) a feromonové návnady - směs feromonu cV+MB z látek (4S) - *cis*-verbenolu a 2 -methyl-3-buten-2-olu v poměru (1:50) na reakci pozorovaných jedinců, což je znázorněno níže na Obr. 2 (viz Příloha). Pak bylo vyzkoušeno, jak se jedinci chovají ve tmě ovlivnění feromonem, jako kontrola k jejich chování na zdroj světla a ovlivnění feromonem. Pokus probíhal nejprve při teplotě 26°C a pak byl proveden znovu stejnou metodikou, jen při teplotě 21°C.

C) Následně byl ověřován vliv plošného zdroje světla a feromonové návnady - směs feromonu z látek (4S) - *cis*-verbenolu a 2 -methyl-3-buten-2-olu v poměru (1:50) na chování testovaných jedinců. Pak bylo vyzkoušeno, jak se jedinci chovají pouze za plošného zdroje světla, jako kontrola k jejich chování na zdroj světla ovlivnění feromonem. Zdrojem plošného světla byla zářivka. Test probíhal nejprve při teplotě 26°C a pak byl pokus proveden znovu úplně stejně, jen při teplotě 21°C.

Změny: Při následujícím olfaktorickém měření se nově použily rovné přepážky z plexiskla, pro lepší orientaci brouků v arénce a také kvůli zamezení vstupu brouka do ostatních dvou výběrových ramen. Při měření byl použit jiný zdroj bodového osvětlení, které zajišťuje/imituje široké spektrum denního světla (4000 - 4400 lux, 50 W, UV, λ = 200 - 200 nm) pro lýkožrouta smrkového. Žárovka byla umístěna tak, aby rovnoměrně osvítila celou kruhovou arénku. Teplota byla nastavena po celou dobu měření na 26°C. Došlo také k modifikaci měření, kdy byl vpuštěn pouze jediný brouk do středu arénky.

2) Po sérii prvotních pokusů a všech jeho úpravách (olfaktometr, zdroj světla, teplota při měření, vpouštění biologického materiálu do arénky) byly následující behaviorální pokusy provedeny v olfaktometru s uzavřenou arénkou (viz Obr. 3., Příloha), aby bylo možné získaná data statisticky zpracovat. Ve finálních pokusech byla otestovaná atraktivita lýkožrouta smrkového na feromonovou návnadu, která byla vložena vždy do jednoho ramena olfaktometru (naproti byla vždy kontrola - čistý vzduch). Při behaviorálních testech se strany s testovanou látkou střídaly a střídaly se i feromonové návnady. Měřený jedinec měl dvě možnosti k rozhodování a byly otestovány na oba dva typy návnady. Živí jedinci byli testováni proti proudu čistého vzduchu, za konstantní teploty (26 °C), tlaku vzduchu (0,5 l/min), vlhkosti prostředí (36 %) a zdroje světla. Zdrojem světla byla speciální lampa, která imituje široké spektrum denního světla pro podporu aktivity brouků při měření. V olfaktometru byl pozorován vždy jediný exemplář (aby se eliminovalo jakékoli ovlivnění jedinců navzájem), který byl šetrně umístěn doprostřed arénky. Jednotliví jedinci lýkožrouta smrkového byli testováni proti směru proudu těkavé látky z protilehlého ramene olfaktometru a po určitou vymezenou dobu (3 min) byla sledována jejich reakce. Brouk, který se do této doby nerozhodl, byl z olfaktorického pokusu vyřazen. Každý změřený brouk byl vložen do plastové eppendorff zkumavky opatřené číslem a do uzavíratelného plastového sáčku (s datem měření). Plastové sáčky se všemi změřenými brouky byly dány do mrazáku. Po ukončení celé série experimentů byli brouci změřeni (velikost jejich krovek) a byla provedena determinace pohlaví za použití speciálního mikroskopu. Celkem bylo proměřeno 400 jedinců za čtyři dny (a to vždy od 8:00 - 16:00).

Po ukončení olfaktorického měření lýkožrouta smrkového v olfaktometru s uzavřenou arénkou byli zamražení brouci (po rozmražení) nalepeni na entomologický štítek a označeni (viz Obr. 21). Pomocí elektronového mikroskopu se speciální kamerou, který snímal brouka do počítače, byla proměřena velikost krovek konkrétního jedince. Nakonec byl biologický materiál rozseparován na samce a samice, pomocí speciálního mikroskopu (viz níže Obr. 22), dle rozlišovacích znaků (Schlyter, 2009), viz výše kapitola 3.2.2.



Obr. 21: Vlevo - příprava změřených jedinců lýkožrouta smrkového před separací. Vpravo - mikroskop k měření krovek lýkožrouta smrkového (Majerová ©2019).

Obr. 22: Speciální mikroskop pro rozlišení pohlaví změřených jedinců lýkožrouta smrkového (Majerová ©2019).

4.7 Statistické zpracování dat

Veškeré naměřené výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí excelu a programu R studio (verze 4.0.0.). Výsledky jsou popsány pro jednotlivé experimenty.

Pro otestování pilotních dat byl použit Chí-kvadrát test.

Naměřená data finální experimentů jsou jak kvalitativního typu (tj. kategorická proměnná - faktor - „F“/“M“, „F1“/“F2“), tak kvantitativního typu (numerická proměnná - *čas, krovky*). Za tímto účelem byl použit zobecněný lineární model (GLM) s binomickým rozdělením, kde kategorickou vysvětlovanou (závisle) proměnnou je *reakce* (reakce jedince, nabývající hodnot 0/1 - binární data) a vysvětlující (nezávisle) proměnné byly: *feromon* („F1“,“F2“); *pohlaví* („F“, „M“); *den*, kdy byli jedinci sledováni (1,2,3,4); *čas* odezvy jedince (celá nezáporná čísla), *den_doba* (konkrétní čas měření brouka během dne) a *krovky* - jejich velikost (desetinná nezáporná čísla). Celkem bylo proměřeno 400 jedinců a z toho jich 36 nijak nereagovalo.

Při testování se zpočátku počítalo s faktorem *den_doba* (konkrétní čas během dne, kdy byl jedinec otestován), ale jelikož všichni testovaní brouci byli předem aktivní (přednostní výběr aktivních jedinců) a v pilotních pokusech byla aktivita prověřena, tak již s denní dobou jsem dále nepočítala. (Podskalská et al, 2009). Lineární model byl použit k ověření závislosti všech vysvětlujících proměnných a interakce *feromon* a *sex*. Nejprve bylo provedeno ošetření předpokladů lineárního modelu (normální rozdělení chyb - reziduí, homogenita rozptylu chyb a vzájemná nezávislost měření). Pomocí funkce *anova* se provedla analýza rozptylu (srovnání středních hodnot) s cílem vyhodnotit průkaznost rozdílu mezi více než dvěma porovnávanými průměry. Funkcí *summary* byly získány odhady parametrů modelu (*Estimate*) a jejich střední chyby (*Std. Error*) a testovací statistiku včetně p - hodnot. Pomocí této funkce lze spočítat intervalový odhad parametru a po transformaci funkcí *expit*, použít pro vložení chybových úseček do grafického znázornění.

5 Výsledky

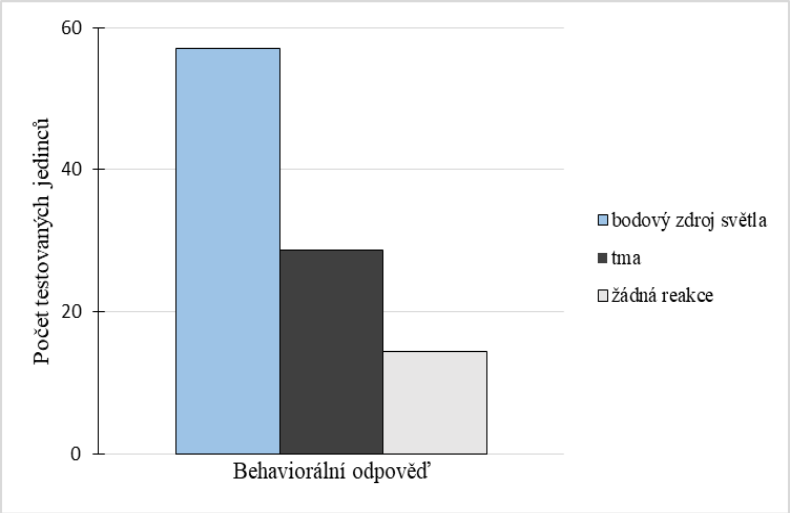
5.1 Výsledky experimentů v olfaktometru s otevřenou arénkou

Cílem experimentu v olfaktometru s otevřenou arénkou, bylo zjistit behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na nabízenou volatilní látku při teplotách (21 °C a 25 °C). Pokus se bohužel nepovedl kvůli nevyhovujícímu typu arénky. Při nízké teplotě nebyla zaznamenáná žádná behaviorální odpověď na chemickou návnadu a naopak při výšší teplotě byla snaha jedinců z arénky uletět. Proto následující behaviorální pokusy probíhaly již v olfaktometru s uzavřenou arénkou.

5.2 Výsledky experimentů v olfaktometru s uzavřenou arénkou

1) Pilotní pokusy

A) Cílem pilotních pokusů v olfaktometru s uzavřenou arénkou bylo ověření behaviorální reakce pozorovaných jedinců na atraktant - vliv bodového zdroje osvětlení (lampička) viz Obr. 23. Pak bylo vyzkoušeno, jak se brouci chovají ve tmě, jako kontrola k jejich chování na zdroj světla. Test probíhal při teplotě 21°C. Na zdroj bodového světla (lampička, viz výše kapitola 4. 6.) bylo přilákáno celkem 57 % jedinců.

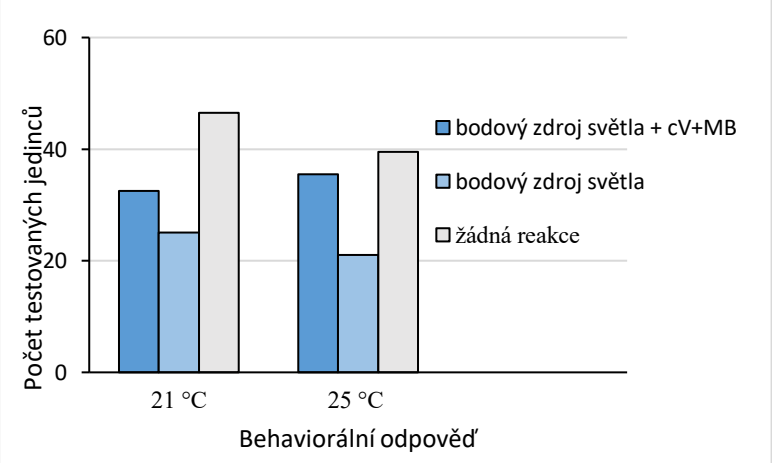


Obr. 23: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (zdroj bodového světla) v olfaktometru s uzavřenou arénkou.

Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1) Chi-Square = 28,87879 df = 2 p = ,000001; NOTE: Unequal sums of obs. & exp. frequencies				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)			
Behaviorální reakce brouka	observed	expected	O - E	(O-E)**2
světlo	57,0000	33,00000	24,0000	17,45455
tma	29,0000	33,00000	-4,0000	0,48485
nikam nedošli	14,0000	33,00000	-19,0000	10,93939
Sum	100,0000	99,00000	1,0000	28,87879
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1) Chi-Square = 9,116279 df = 1 p = 0,002534				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)			
Behaviorální reakce brouka	observed	expected	O - E	(O-E)**2
světlo	57,00000	43,00000	14,0000	4,558140
tma	29,00000	43,00000	-14,0000	4,558140
Sum	86,00000	86,00000	0,0000	9,116279

Obr. 24: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (zdroj bodového světla) v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. **Poznámka**: observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

B) Cílem pokusu bylo otestování vlivu bodového zdroje světla (lampička, viz výše kapitola 4. 6.) a atraktant - směs feromonu cV+MB (viz výše kapitola 4. 4.) na chování sledovaných jedinců. Poté byla provedena kontrola (světlo bez feromonu) Pokus probíhal při teplotách (21°C a 25°C). Výsledkem experimentu byla vyšší atraktivita testovaného biologického materiálu na feromon za zdroj bodového světla oproti kontrole, což je naznačeno níže na Obr. 25.



Obr. 25: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za bodového zdroje světla v olfaktometru s uzavřenou arénkou.

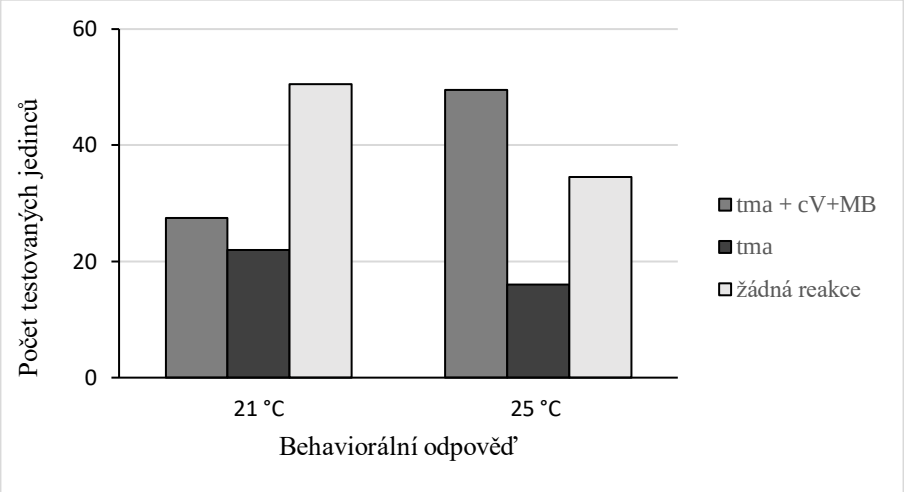
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 7,085714 df = 2 p = ,028932				
	Observed vs. Expected Frequencies			
Behaviorální reakce brouka (při 21°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
bodový zdroj světla + (cV+MB)	33,0000	35,0000	-2,0000	0,114286
bodový zdroj světla	25,0000	35,0000	-10,0000	2,857143
nikam nedošli	47,0000	35,0000	12,0000	4,114286
Sum	105,0000	105,0000	0,0000	7,085714
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 1,103448 df = 1 p = ,293511				
	Observed vs. Expected Frequencies			
Behaviorální reakce brouka (při 21°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
bodový zdroj světla + (cV+MB)	33,00000	29,00000	4,00000	0,551724
bodový zdroj světla	25,00000	29,00000	-4,00000	0,551724
Sum	58,00000	58,00000	0,00000	1,103448

Obr. 26: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (zdroj bodového světla) v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. **Poznámka:** observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 6,206186 df = 2 p = ,044911				
Behaviorální reakce brouka (při 25°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
bodový zdroj světla + (cV+MB)	36,00000	32,33333	3,6667	0,415808
bodový zdroj světla	21,00000	32,33333	-11,3333	3,972509
nikam nedošli	40,00000	32,33333	7,6667	1,817869
Sum	97,00000	97,00000	0,0000	6,206186
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 3,947368 df = 1 p = ,046946				
Behaviorální reakce brouka (při 25°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
bodový zdroj světla + (cV+MB)	36,00000	28,50000	7,50000	1,973684
bodový zdroj světla	21,00000	28,50000	-7,50000	1,973684
Sum	57,00000	57,00000	0,00000	3,947368

Obr. 27: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (zdroj bodového světla) v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. **Poznámka**: observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

Behaviorální odpověď jedinců na atraktant (feromon cV+MB, viz výše kap. 4. 4.) za tmy byla ve srovnání s kontrolou (za tmy, bez feromonu) vyšší, což je znázorněno níže na Obr. 28. Jedinci reagovali na feromon při vyšší teplotě (25 °C).



Obr. 28: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za tmy v olfaktometru s uzavřenou arénkou.

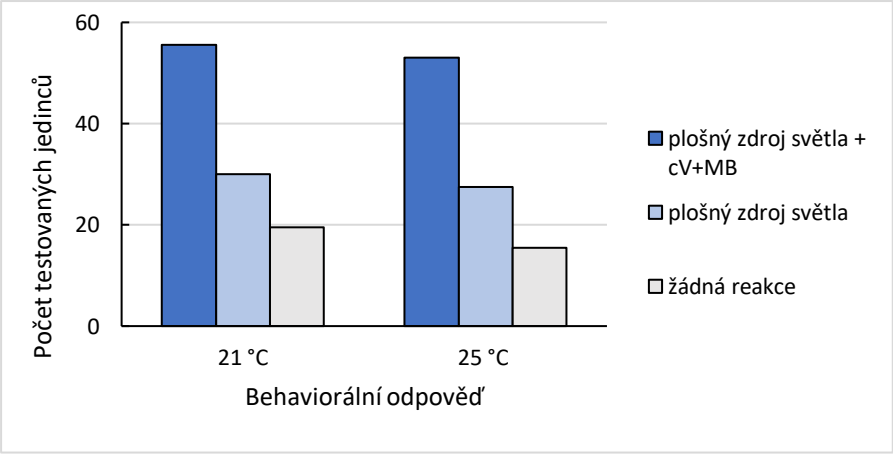
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 13,92079 df = 2 p = ,000949				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 21°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
tma	28,0000	33,6667	-5,6667	0,95380
tma + (cV+MB)	22,0000	33,6667	-11,6667	4,04290
nikam nedošli	51,0000	33,6667	17,3333	8,92409
Sum	101,0000	101,0000	0,0000	13,92079
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = ,7200000 df = 1 p = ,396145				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 21°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
tma	28,00000	25,00000	3,00000	0,360000
tma + (cV+MB)	22,00000	25,00000	-3,00000	0,360000
Sum	50,00000	50,00000	0,00000	0,720000

Obr. 29: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za tmy v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. Poznámka: observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 17,24752 df = 2 p = ,000180				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 25°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
tma	50,0000	33,6667	16,3333	7,92409
tma + (cV+MB)	16,0000	33,6667	-17,6667	9,27063
nikam nedošli	35,0000	33,6667	1,3333	0,05281
Sum	101,0000	101,0000	0,0000	17,24752
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = ,7200000 df = 1 p = ,396145				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
	observed	expected	O - E	(O-E)**2
Behaviorální reakce brouka (při 25°C)	50,00000	33,00000	17,0000	8,75758
tma	16,00000	33,00000	-17,0000	8,75758
tma + (cV+MB)	66,00000	66,00000	0,0000	17,51515

Obr. 30: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za tmy v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. Poznámka: observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

C) V tomto experimentu byla sledována behaviorální odpověď otestovaných jedinců ovlivněná plošným zdrojem světla a atraktantu - feromon (cV+MB, viz výše kap. 4. 4.). Pak bylo vyzkoušeno, jak se jedinci chovají pouze za plošného zdroje světla, jako kontrola k jejich chování na zdroj světla ovlivnění feromonem. Testování probíhalo při dvou teplotách (21 a 25°C). Výsledkem byla výrazně vyšší behaviorální odpověď jedinců na atraktant (feromon) za zdroje plošného světla (zářivka) ve srovnání s kontrolou (za zdroje světla, bez feromonu), což je znázorněno níže na Obr. 31. Jedinci reagovali na feromon přibližně stejně při obou teplotách. V tomto případě je i značně nízký počet brouků, kteří nereagovali (16 - 20 %) při obou teplotách.



Obr. 31: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za zdroje plošného světla v olfaktometru s uzavřenou arénkou.

Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 19,54717 df = 2 p = ,000057				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 21°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
plošný zdroj světla + (cV+MB)	56,0000	35,3333	20,6667	12,08805
plošný zdroj světla	30,0000	35,3333	-5,3333	0,80503
nikam nedošli	20,0000	35,3333	-15,3333	6,65409
Sum	106,0000	106,0000	0,0000	19,54717
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 7,860465 df = 1 p = ,005053				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 21°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
plošný zdroj světla + (cV+MB)	56,00000	43,00000	13,0000	3,930233
plošný zdroj světla	30,00000	43,00000	-13,0000	3,930233
Sum	86,00000	86,00000	0,0000	7,860465

Obr. 32: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za zdroje plošného světla v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. Poznámka: observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 22,04124 df = 2 p = ,000016				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 25°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
plošný zdroj světla + (cV+MB)	53,00000	32,33333	20,6667	13,20962
plošný zdroj světla	28,00000	32,33333	-4,3333	0,58076
nikam nedošli	16,00000	32,33333	-16,3333	8,25086
Sum	97,00000	97,00000	0,0000	22,04124
Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet1)Chi-Square = 7,716049 df = 1 p = ,005474				
	Observed vs. Expected Frequencies (Spreadsheet			
Behaviorální reakce brouka (při 25°C)	observed	expected	O - E	(O-E)**2
plošný zdroj světla + (cV+MB)	53,00000	40,50000	12,5000	3,858025
plošný zdroj světla	28,00000	40,50000	-12,5000	3,858025
Sum	81,00000	81,00000	0,0000	7,716049

Obr. 33: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na atraktant (feromon) za zdroje plošného světla v olfaktometru s uzavřenou arénkou. Statistické zpracování pomocí metody Chí-kvadrát testu. Poznámka: observed - pozorované hodnoty, expected - očekávané hodnoty. O-E - rozdíl hodnot.

2) Finální pokusy

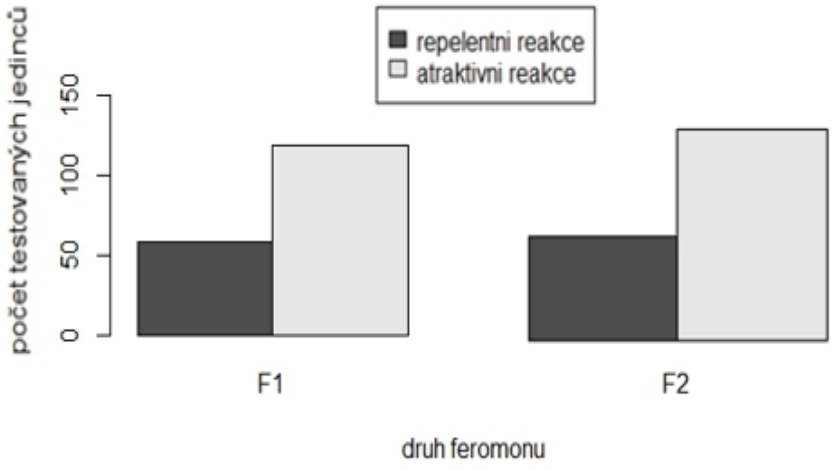
Cílem finální experimentů v olfaktometru s uzavřenou arénkou bylo zjistit, jaká je reakce chování testovaného jedince lýkožrouta smrkového na nabízené infochemikálie a jestli behaviorální reakce závisí na pohlaví, či velikosti jeho krovek. Výsledkem obecného lineárního modelu bylo, že reakce sledovaného jedince lýkožrouta smrkového na nabízené volatilní látky statisticky významně závisí na pohlaví (n = 364, df = 357, p = 2.18e-05), viz níže Obr 34. Pohlaví otestovaných jedinců mělo na behaviorální odpověď významný vliv (p > 0,001). Samice byly na oba testované feromony citlivější, než samci. Vliv feromonu na behaviorální odpověď jedinců nebyl statisticky významný a feromony se od sebe statisticky významně nelišily. Faktor velikost krovek a faktor času nevyšel průkazně.

```
Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.9837  -1.2064   0.6074   0.9795   1.3375

Coefficients:
                   Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)        0.249382   2.117296   0.118    0.906
krovky             0.462723   0.633376   0.731    0.465
feromon"F2"        0.035084   0.380212   0.092    0.926
sex"M"            -1.487850   0.350408  -4.246 2.18e-05 ***
cas               -0.005392   0.004352  -1.239    0.215
feromon"F2":sex"M" 0.196142   0.488218   0.402    0.688
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

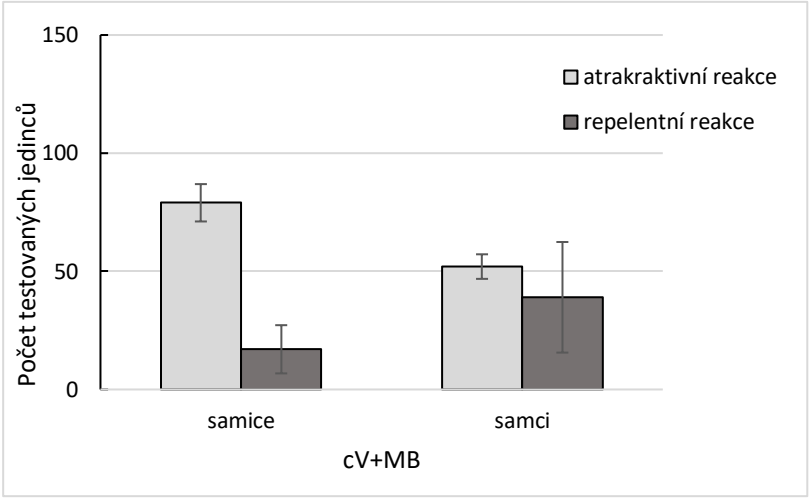
Obr. 34: Výsledek GLM modelu. (Estimate - odhad efektu, Std. Error - střední chyba průměru (SE), z value - z statistika, p - hodnota).

Cílem experimentu bylo otestovat účinek feromonové směsi cV+MB a komerčního feromonu Pheagr IT Extra na behaviorální chování jedinců lýkožrouta smrkového. Celkem bylo feromonovou směsí cV+MB atrahováno 119 jedinců a 58 jedinců (n=364) bylo odpuzováno, jak je znázorněno níže na Obr. 35. Komerční feromon Pheagr IT Extra měl atraktivní účinek pro 131 jedinců a repelentní pro 56.



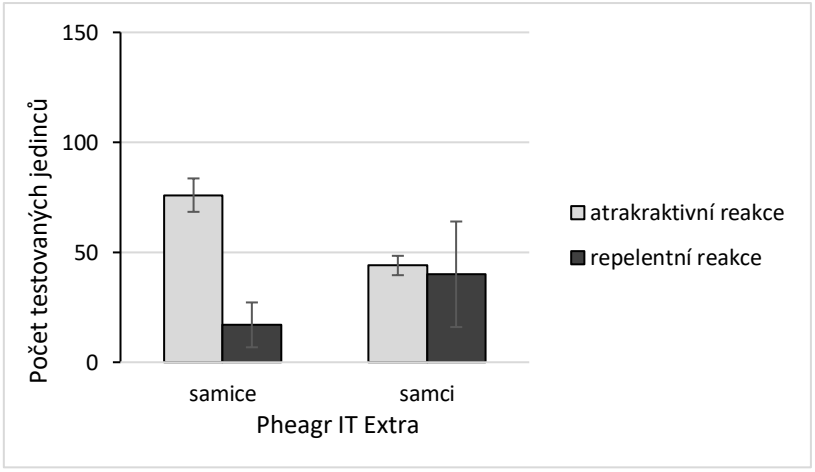
Obr. 35: Účinek feromonu na behaviorální odpověď testovaných jedinců.

Z Obr. 36 je zřejmé, že pouze u samic lýkožrouta smrkového byla zaznamenána pozitivní behaviorální reakce na feromonovou směs (cV+MB).



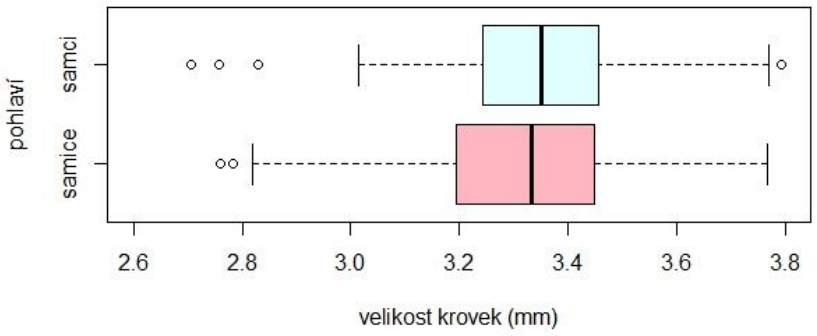
Obr. 36: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na feromonovou směs cV+MB.

Cílem experimentu bylo ověření behaviorální odpovědi jedinců lýkožrouta smrkového na komerční feromon Pheagr IT Extra. Byla zaznamenána podobná behaviorální opověď, jako výše na Obr. 37. Atraktivní účinek na feromon byl prokázán opět jenom u samic lýkožrouta smrkového.



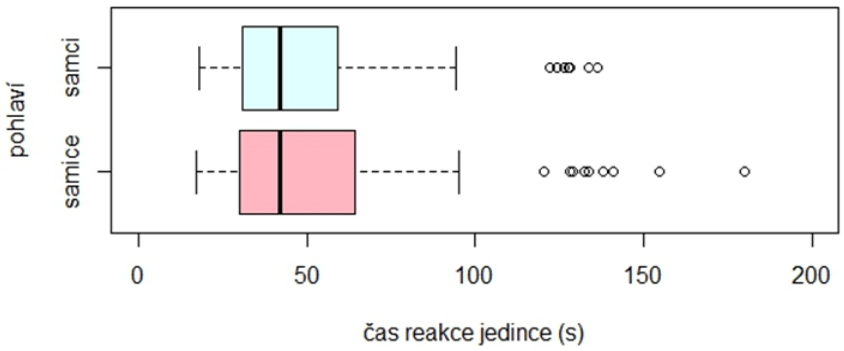
Obr. 37: Behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na komerční feromon Pheagr IT Extra.

Na Obr. 38 je znázorněn vztah velikosti krovek a pohlaví měřených jedinců lýkožrouta smrkového. Samice měly průměrnou velikost krovek 3,33 mm a samci 3,35 mm.



Obr. 38: Vztah velikosti krovek (mm) a pohlaví měřených jedinců lýkožrouta smrkového.

Na Obr. 39 je znázorněn vztah času reakce brouka a pohlaví měřených jedinců lýkožrouta smrkového. Průměrný čas reakce u obou pohlaví byl 42 s.



Obr. 39: Vztah času reakce jedince (s) na pohlaví lýkožrouta smrkového.

6 Diskuze

Behaviorálními pokusy s lýkožroutem smrkovým se zabývalo mnoho vědců ve svých článcích (Browne et al., 1974; Zhang, 2003; Jakuš & Blaženec, 2011; Blažytė-Čereškienė et al., 2016; Kandasamy et al., 2019) a další, nicméně tyto testy jsou prvotními výsledky, které se zabývají feromonem cV+MB.

Při prvotních experimentech bylo ověřeno, že behaviorální testy může negativně ovlivňovat celá řada faktorů kromě teploty a vlhkosti vzduchu v místnosti, například i nepatrné drobnosti jako jsou stín dopadající na olfaktometr, světlo pod dveřmi, vibrace stolu atd. Další zkreslení výsledků behaviorálních pokusů může být způsobeno špatnou manipulací s živým biologickým materiálem. Protože případné hrubší zacházení, anebo manipulace s pinzetou silou, mohlo vést k poškození a především vystresování jedince. A proto byl pozorovaným broukům poskytnut dostatek času na přivyknutí na dané experimentální prostředí (5 minut), což se ukázalo jako dostačující.

Ve většině článků o kůrovcích či jiných druzích brouků se právě tyto metodické postupy někdy zcela nepopisují, resp. uvádějí se neúplné kroky. A tak každá taková metodika je vlastně originální, protože i prostředí laboratoře je unikátní. Jakékoli i jemné rozdíly ve zkušebních podmínkách mohou ovlivnit výsledky behaviorálních testů. Jisté rozdíly ve výsledcích, v porovnání s jinými autory, mohou také vznikat tím, že v některých článích (Zhang, 2003; Stelinski & Tiwari, 2013; Yu et al, 2015 a další) testují brouky či jiný druh hmyzu po hromadě anebo jim poskytli ještě další šanci (byli změřeni ještě podruhé) jako v práci Browne et al. (1974). V této práci byl každý jedinec otestován zvlášť (po jednom) a vždy jen jednou. Hlavním důvodem bylo možné riziko zanechání specifických pachových stop pozorovaného jedince v olfaktometru (na filtračním papíru), které by mohly ovlivnit výsledky behaviorálních testů.

V případě experimentu provedeného v olfaktometru s otevřenou arénkou, jsem se snažila o zopakování behaviorálního metodického postupu, popsaného ve vědeckém článku Browne et al. (1974). Pokus se bohužel nepovedl. Při nízké teplotě nebyla zaznamenáná žádná významná behaviorální odpověď (brouci si nevybrali ani jednu z možností - nešli ani k feromonu, ani od něj) lýkožrouta smrkového na chemickou návnadu a naopak při výšší teplotě byla snaha jedinců z arénky uletět. Přesto, že byla dodržena teplota, při které je jedinec aktivní - 22 - 26 °C (Wermelinger, 2004). Chyběli zde například některé informace o experimentálních podmínkách - zdroj osvětlení či teplota.

Cílem pilotních pokusů v olfaktometru s uzavřenou arénkou bylo zjistit behaviorální chování pozorovaných jedinců na dané atraktanty - světlo (vliv bodového/plošného zdroje osvětlení), tma a teplota.

V první sérii pilotních pokusů byla prokázána aktivita brouků světlem. Výsledná reakce byla srovnána s kontrolou (za tmy). Test probíhal při teplotě 21 °C. Světlem bylo přilákáno celkem 57 % jedinců tj. až dvojnásobně více oproti kontrole. Tím byla potvrzena aktivita brouka za světla. Lýkožrout smrkový patří mezi tzv. druhy s diurnální aktivitou, což znamená, že jsou lákány světlem a je tomu tak i v přírodě.

Brouk aktivuje především za teplých slunných dnů během jarních a letních měsíců, především během dne (Kindlmann et al., 2013). Vyšší činnost jedince byla zaznamenána při teplotě 25 °C, což by odpovídalo chování jedince v přirozených podmínkách.

V následující sérii olfaktorických testů byl zkoumán vliv feromonu za daného bodového osvětlení na reakci sledovaného lýkožrouta smrkového. Test byl proveden při dvou různých teplotách (21 a 25 °C). Zde se nepodařilo prokázat, že aktivita lýkožrouta byla vyšší při vyšší teplotě, jako v předchozí sérii pokusů. Byl pouze prokázán vliv feromonu, který aktivitu o ještě podpořil.

Další testování probíhalo ve tmě a byl ověřen pouze vliv feromonu. Opět za dvou různých teplot, kde byl opět prokázán atraktivní účinek feromonu (oproti kontrole - tma, bez feromonu). Vyšší behaviorální aktivita lýkožrouta smrkového byla opět zaznamenána při vyšší teplotě tj. 25 °C. Navíc se zvýšila aktivita brouků, kteří při nižší teplotě nereagovali vůbec (respektive si nevybrali ani cestu k feromonu, ani od feromonu) a to o 16 %.

A nakonec byl testován atraktant - světlo (zdroj plošného osvětlení) a feromon, opět při dvou různých teplotách. Výsledkem byla výrazně vyšší behaviorální odpověď jedinců na atraktant (feromon) za zdroje plošného světla (zářivka) ve srovnání s kontrolou (za zdroje světla, bez feromonu). Jedinci reagovali na feromon i světlo přibližně stejně při obou teplotách. V tomto případě je i značně nízký počet brouků, kteří nereagovali (16 - 20 %) při obou teplotách. V posledních dvou experimentech se nepotvrdila aktivita světlem při vyšší teplotě.

Hlavním výsledkem finálních behaviorálních pokusů je, že reakce chování testovaného lýkožrouta smrkového na nabízené feromony závisí na pohlaví a testovaný faktor velikost krovek, druh feromonu a čas nevyšly průkazně. Pozitivní reakce na feromon byla zaznamenána pouze u samic lýkožrouta smrkového. Byl předpoklad, že když se použije agregační feromon, bude atraktivní účinek zaznamenán u obou pohlaví. Nabízí se však otázka, proč reagovali pouze samice a proč brouci reagovali přibližně stejně na oba feromony - feromonová směs (cV+MB) má účinné látky (4S) - *cis*-verbenolu (cV) a 2 -methyl-3-buten-2-olu (MB) v poměru (1:50) a komerční feromon (Pheagr IT Extra) s účinnou látkou (S)-*cis*-verbenolem a (+/-) ipsdienolem. Mohlo to být pravděpodobně tím, že mají společnou účinnou složku feromonu - *cis*-verbenol. Navíc chemické látky *cis*-verbenol a methylbutenol jsou složkami samčího feromonu (Modlinger et al, 2015). Nebo to může být tím, že samci se orientují pomocí semiochemikálií především pro vyhledání vhodného stromu (pravděpodobně tedy vnímá infochemikálie k širší orientaci a proto stačí větší koncentrace těchto látek) a samice jsou lákány samci do snubní komůrky ke kopulaci a založení nové populace (pravděpodobně vnímá votilních látek k úžší orientaci, proto je zapotřebí těchto látek v menší koncentraci) (Jakuš & Blaženec, 2011). Navíc některé složky feromonu jsou samotně téměř neúčinné, ale ve správném poměru (tj. směsi) s ostatními infolátkami mohou vyvolat obrovský nárůst atraktivity lýkožrouta. Rozhodujícím faktorem atraktivity feromonu pro lýkožrouta může být pravděpodobně

jen správně namíchaná směs účinných látek (Hulcr, 2003; Luxová & Valterová, 2006). Nabízí se také otázka, jak je to s účinností feromonových směsí, používaných v terénu. Jestli se do instalovaných pastí s určitým komerčním agregačním feromonem chytají více samci či samice, nebo je pohlaví chytaných jedinců vyrovnaný.

Byl předpoklad, že by velikost krovek mohla mít souvislost s reakcí brouka na feromon. To se při behaviorálních testech neprokázalo. Průměrná velikost krovek brouků byla zhruba stejná, u samic 3,33 mm a u samců 3,35 mm. Posledním ověřovaným faktorem byl čas, který nevyšel průkazně. Průměrný čas reakce brouka (který byl přiváben či odpuzen) byl u obou pohlaví stejný a to do 1 minuty (42 s). Čas reakce brouka se pohyboval v rozmezí 20-90 s. Čas reakce brouka opět potvrzuje aktivitu porozovaných jedinců.

Asi nejpodobnější článek, který se zabývá stejnou otázkou a velmi podobnou metodikou behaviorálních pokusů - stejná s feromonová směs cV+MB (v jiném poměru 1:150) k ověření behaviorální odpovědi lýkožrouta smrkového, byl proveden v článku Zhang (2003). Behaviorální testy byly provedeny ve dvouvýběrovém oflaktometru s otevřenou arénkou, měření probíhalo při světle (200 lux a teplotě 23 - 24 °C), podobně jako v této práci. Nicméně výskedky publikace naznačují podobnou reakci u samic. Reagovaly více než samci a hlavně byly citlivější na nižší koncentrace feromonu, oproti samcům. Hlavní rozdíl oproti mé práci byl ten, že brouci byli vpouštěni do arénky po skupinách a taky to, že den před experimentem byli ponecháni v letové komoře (při 25 °C a osvětlení 4000lux - pro zvýšení přivyknutí brouků na zdroj feromonu). Výsledky staticky zpracovávali pomocí jednocestné analýzy ANOVA a následným velšským (REGW) vícenásobným Q-testem. Poměr pohlaví v každém experimentu byl ošetřen 95% binomickým intervalem spolehlivosti.

K podobnému závěru došli i ve vědecké práci Blažytė-Čereškienė et al. (2016), kde sice ověřovali účinek jiné volatilní látky a v olfaktormetru tvaru „Y“, ale stejně jako v této práci, byly samice citlivější, než samci. Brouci byli vpouštěny do arénky po skupině a navíc byli rozseparovány dle pohlaví ještě před samotným testem. Touto metodou mohlo dojít patrně k jistému zkreslení dat. V článku použili ještě porovnání anténních odpovědí brouka (EAG) na volatilní látky. Výsledky byly zpracovány G-testem. Další článek poukazuje na obdobný výsledek, kdy samice reagovaly více než samci (Jakuš & Blaženec, 2011). V článku Ceballos et al., (2015) byl zkoumán jiný druh hmyzu (Coleoptera: Bruchidae - zrnokaz) a na jinou těkavou látku, přesto pomocí olfaktorického testu dospěli k podobnému závěru.

Význam této práce vidím v bližším poznání a všeobecném porozumění chemickému chování hmyzu (etologii), především u hmyzích „škůdců“. Poznatky z behaviorálních biotestů mohou mít případné využití pro člověka, ale často také přímo v oblasti ochrany přírody a životního prostředí. Například výsledky v článcích (Borden 1996, Schroeder; Zhang et al. 2000) jasně ukazují na fakt, kdy jiné dřeviny (listnatné) mohou uvolňovat těkavé organické látky (isoprenoidy, monoterpeny, seskviterpeny, heterocyklické uhlovodíky aj.) např. bříza (*Betula pendula, b. pubescens*), bez černý (*Sambucus nigra*) a topol (*Populus tremula*), které mohou lýkožrouty odlákat od

případného náletu do lesních porostů s těmito stromy. Další přínos práce vidím využití lesníky a hospodáře s lesními celky. Cílem veškeré snahy o zjištění informací o kůrovcích, jejich ekologii, morfologii a etologii, které jsou zásadní a kvůli kterým se tyto olfaktorické testy provádí a to k ovlivnění gradace u lýkožrouta a je náletu či výběr hostitelských smrkových porostů. Nebo by mohly být výsledky práce uplatněny k monitoringu populačních hustot škodlivých organismů či k ochraně dřevin proti škodlivým druhům brouků či jiného hmyzu, které mohou pomoci v lesnictví. Potenciál behaviorálního výzkumu vidím ve využití parazitoidů ke kontrole mšic (Luquet et al., 2019) a jiných predátorů (Marler & Marler, 2018) ke kontrole herbivorních „škůdců". Nebo k potenciálnímu využití k ochraně rostlin a zemědělských produktů. Vzhledem k rozsáhlým škodám i ekonomickým ztrátám, které brouci působí při jejich přemnožení, se stávají významným objektem pro lesnický, ekologický a biologický výzkum.

I přes počáteční nezdary v laboratoři, jsem měla možnost se seznámit s prací entomologa a chemika najednou, resp. entomologa se specializací na chemickou komunikaci a etologii hmyzu (brouků). Je to jednoznačně velmi zajímavá, i když překvapivě náročná práce, která mi poskytla mnoho cenných zážitků a poznatků, jak teoretických tak i hlavně praktických. Jsem ráda, že jsem měla tu příležitost poznat ekologii a entomologii v praxi. Víceméně krok po kroku po odstranění drobných problémů spojených s behaviorálními testy u hmyzu, vznikla dobře propracovaná metodika, podle které lze pokusy zopakovat při dalších otázkách feromonových odpovědí i odpovědí lýkožroutů na jiné atraktanty, anebo při behaviorálních pokusech jiných druhů lýkožroutů i dokonce jiného řádu hmyzu.

7 Závěr a přínos práce

- Cílem práce bylo seznámení se s primární atraktivitou smrku (*Abies spp.*) pro lýkožrouta smrkového a základním principem behaviorálních olfaktometrických metod ke sledování chování živých jedinců na nabízené těkavé organické látky (VOC´s).
- Součástí práce byla standardazice metodiky, navržení a výběr vhodného designu olfaktometru k reprodukovatelnosti olfaktorického měření.
- K dosažení kvalitních dat, byly stanoveny vhodné experimentální podmínky testů (teplota, tlak vzduchu, vpouštění jedinců do arénky, zdroj osvětlení).
- Byly otestovány dva typy olfaktometrů (s otevřenou a uzavřenou arénkou) a dva druhy feromonu (cV+MB; Pheagr IT Extra).
- Olfaktometr s otevřenou arénkou se při testu neosvědčil. Brouci se za vyšší teploty snažili z arénky uniknout. Proto následující behaviorální testy probíhaly v olfaktometru s uzavřenou arénkou.
- Výsledkem pilotních pokusů je vyšší aktivita lýkožrouta smrkového světlem (bodové, plošné), při vyšší teplotě (25 °C) a podpořena feromonem (cV+MB).
    - Světlem (bodové) bylo přilákáno 57 % jedinců tj dvojnásobně oproti kontrole (ponechání brouků ve tmě).
    - Feromonem (cV+MB) za tmy bylo přilákáno o 50 % více jedinců za vyšší teploty 25°C, oproti kontrole (ponechání brouků ve tmě bez feromonu).
    - Světlem (plošné) a feromonem (cV+MB) bylo přilákáno o 50 % jedinců nezávisle na teplotě oproti kontrole. (ponechání brouků při osvětlení bez feromonu).
- Výsledkem finálních experimentů je, že behaviorální odpověď lýkožrouta smrkového na nabízené volatilní látky statisticky významně závisí na pohlaví ($p = 2.18e\text{-}05$). Atraktivita feromonu byla zaznamenána pouze u samic lýkožrouta smrkového.
- Z celkového počtu otestovaných jedinců z finálních pokusů reagovalo 91 %.
    - Lýkožrout smrkový reagoval přibližně stejně na oba testované feromony.
    - Faktor velikosti krovek vyšel neprůkazně. Nebyl prokázán vztah velikosti krovek a pohlaví. Průměrná velikost krovek samic je 3,33 mm a samců 3,35 mm.
    - Faktor času reakce lýkožrouta vyšel neprůkazně. Nebyl prokázán vztah času reakce brouka (s) a pohlaví. Průměrný čas reakce samic a samců je 42 s.
- Přínosem této práce je porozumění principu behaviorálního chování hmyzu (etologii), především obecně u „škůdců“ a využití těchto poznatků ve prospěch člověka.
- Praktické využití znalostí z behaviorálních biotestů v oblasti a životního prostředí (lesnictví - monitoring škodlivých činitelů, zemědělství, ekologie).
- Behaviorální olfaktorické měření je celkově obecně problematické, časově náročnější a vyžaduje hodně trpělivosti.

8 Přehled literatury a použitých zdrojů:

1. Abuin L., Bargeton B., Ulbrich MH., Isacoff EY., Kellenberger S. & Benton R., 2011: Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron* 69, 44-60.
2. Anonym, ©2015: Insect Behaviour (online) [cit. 2012.03.20], dostupné z <https://www.cronodon.com/BioTech/Insect_Behaviour.html>.
3. Andersson MN., Larsson MC. & Schlyter F., 2009: Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single-cell responses to ecologically relevant odors. *Journal of Insect Physiology* 55, 556-567.
4. Andersson MN., Larsson MC., Blaženec M., Jakuš R., Zhang QH. & Schlyter F., 2010: Peripheral modulation of pheromone response by inhibitory host compound in a beetle. *Journal of Experimental Biology* 213, 3332-3339.
5. Andersson MN., 2012: Mechanisms of odor coding in coniferous bark beetles: from neuron to behavior and application. *A Journal of Entomology* 2012, 1-14.
6. Baker TC., Ochieng SA., Cossé AA., Lee SG., Todd JL., Quero C. & Vickers NJ., 2004: A comparison of responses from olfactory receptor neurons of *Heliothis subflexa* and *Heliothis virescens* to components of their sex pheromone. *Journal of Comparative Physiology A* 190, 155-165.
7. Beutel RG., Friedrich F., Yang XK. & Ge SQ., 2014: *Insect morphology and phylogeny*: a textbook for students of entomology. De Gruyter, Boston, 516 s.
8. BioLib, © 2020: *Ips typographus* (lýkožrout smrkový) (online) [cit. 2010.04.20], dostupné z <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id13952/>.
9. Blažytė-Čereškienė, L., Apšegaitė V., Radžiutė S., Mozūraitis R., Būda V. & Pečiulytė D., 2016: Electrophysiological and behavioural responses of *Ips typographus* to *trans*-4-thujanol-a host tree volatile compound. *Annals of Forest Science* 73, 247-256.
10. Bleiker KP. & Six DL., 2007: Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: Potential implications of multiple associates on host population dynamics. *Environmental Entomology* 36, 1384-1396.
11. Bleiker KP., Heron RJ., Braithwaite EC. & Smith GD., 2013: Preemergence mating in the mass-attacking bark beetle, *Dendroctonus ponderosa* (Coleoptera: Curculionidae). *The Canadian Entomologist* 145, 12-19.
12. Blood BL., Klingeman WE., Paschen MA., Hadžiabdić Đ., Couture JJ. & Ginzel MD., 2018: Behavioral responses of *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) to volatiles of black walnut and *Geosmithia morbida* (Ascomycota: Hypocreales: Bionectriaceae), the causal agent of thousand cankers disease. *Environmental Entomology* 47, 412-421.
13. Borden JH., 1996: Pheromone research: New directions. In R. T. Cardé, and A. K. Minks. (eds.): *Disruption of semiochemical-mediated aggregation in bark beetles.* Chapman and Hall, New York, 421-438.
14. Brattoli M., Gennaro G., Pinto V., Demarinis Loiotile A., Lovascio S. & Penza M., 2011: Odour detection methods: Olfactometry and chemical sensors. *Sensors* 11, 5290-5322.
15. Browne L., Birch MC. & Wood DL., 1974: Novel trapping and delivery systems for airborne insect pheromones. *Journal of Insect Physiology* 20, 183-193.
16. Byers, JA., 2004: Chemical ecology of bark beetles in a complex olfactory landscape. In: Lieutier, F., Day, KR., Battisti, AJ., Grégoire, C., Evans, HF. (eds.): *Bark and wood boring insects in living trees in Europe* - A synthesis. Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 89-134.

17. Ceballos R., Fernández N., Zúñiga S., & Zapata N., 2015: Electrophysiological and behavioral responses of pea weevil *Bruchus pisorum*. (Coleoptera: Bruchidae) to volatiles collected from its host *Pisum sativum*. *Chilean journal of agricultural research* 75, 202-209.
18. ČSN 48 1000: Ochrana lesa proti kůrovcům na smrku. Český normalizační institut, Praha 2005, 8 s.
19. Doležal P., 2013: Jak se žije v lese (smrkovém) - kapitoly ze života lýkožrouta smrkového. *Živa* 5, 229 - 230.
20. Doležal P. & Sehnal F., 2007: Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology* 131, 165-173.
21. Dvořáková M., Valterová I. & Vaněk T., 2011: Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy* 105, 839-845.
22. Dudareva N., Picherski E. & Gershenzon J., 2004: Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 135, 1893-1902.
23. Edburg SL., Hicke JA., Brooks PD., Pendall EG., Ewers BE., Norton U., Gochis D., Gutmann ED. & Meddens AJH. (2012): Cascading impacts of bark beetle-caused tree mortality on coupled biogeophysical and biogeochemical processes. *Frontiers in ecology and the Environment* 10, 416-424.
24. Erbilgin N., Krokene P., Kvamme T. & Christiansen E., 2007: A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera Curculionidae Scolytidae) responses to its aggregation pheromone. *Agricultural and forest Entomology* 9,135-140.
25. Faccoli M., 2002: Winter mortality in sub-corticolous populations of *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) and its parasitoids in the south-eastern Alps. *Anzeiger für Schädlingskunde* 75, 62-68.
26. Faccoli M., 2009: Effect of weather on *Ips typographus* (Coleoptera, Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the southeastern Alps. *Environmental Entomology* 38, 307-316.
27. Franceschi VR., Krokene P., Christiansen E. & Krekling T., 2005: Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New phytologist trust* 167, 353-376.
28. Francke W. & Schulz S., 1999: Pheromones. In. Sir Barton D. Nakanishi K. & Meth-Cohn O. (eds.): Comprehensive Natural Products, *Elsevier* 8, Amsterdam. 197-261.
29. Hare JD., 1998: Bioassay methods with terrestrial invertebrates. In. Haynes KF. &. Millar JG. (eds.): *Methods in chemical ecology* sv. 2, kap. 5. New York. *Springer Science*, Business Media. 212-270.
30. Hanks LM., Millar JG., Mongold-Diers JA., Wong JCH., Meier LR., Reagel PF. & Mitchell RF., 2012: Using blends of cerambycid beetle pheromones and host plant volatiles to simultaneously attract a diversity of cerambycid species. *Canadian Journal of Forest Research* 42, 1050-1059.
31. Hansen AK. & Moran NA., 2014: The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular ecology* 23,1473-1496.
32. Hofstetter RW., Cronin JT., Klepzig KD., Moser JC. & Ayres MP., 2006: Antagonisms, mutualisms and commensalisms affect outbreak dynamics of the southern pine beetle. *Oecologia* 147, 679-91.
33. Horáková J. & Horák J., 2010: Beetles of the subfamily Scolytinae (Coleoptera: Curculionidae) feeding on fruit trees: a literature review. *Elateridarium* 4, 1-32.
34. Hoskovec M., 2000: Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika. *Chemické listy* 94, 897-904.
35. Hulcr J., 2003: Kůrovci, miláčci evoluce. *Vesmír* 82, 692-696.

36. Chapman RF., 2013: *The Insects. Structure and function*. 5th edition, Cambridge University Press, Cambridge, 959 s.
37. Jakuš R. & Blaženec M., 2011: Response of walking spruce bark beetles *Ips typographus* to host odours. *Folia Oecologica* 38, 38-45.
38. Kalinová B., Břizová R., Knížek M., Turčáni M. & Hoskovec M., 2014: Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod Plant Interactions* 8, 305-316.
39. Kalinová B., Podskalská H., Růžička J. & Hoskovec M., 2009: Irresistible bouquet of death - how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorus) attracted by carcasses. *Naturwissenschaften* 96, 889-899.
40. Kandasamy D., Gershenzon J., Hammerbacher A., 2016: Volatile organic compounds emitted by fungal associates of conifer bark beetles and their potential in bark beetle control. *Journal of Chemical Ecology* 42, 952-969.
41. Kenis M., Wermelinger B. & Gregoire JC., 2004: Research on parasitoids and predators of Scolytidae - a review. In: Lieutier F., Day KR., Battisti A., Gregoire JC. & Evans HF. (eds.): *Bark and wood boring insects in living trees in Europe* - A synthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 237-290.
42. Kindlmann P., Matějka K. & Doležal P., 2012: *Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody*. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum, 325 s.
43. Kindlmann P., Matějka K. & Doležal P., 2013: Co je za přemnožováním (gradací) lýkožrouta smrkového na Šumavě. *Živa* 96, 231-233.
44. Knížek M. & Beaver R., 2004: Taxonomy a systematics of bark a ambrosia beetles. In Lieutier F., Day KR., Battisti A., Grégoire JC. & Evans HF. (eds.): *Bark a wood boring insects in living trees in Europe* - A synthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 41-54.
45. Knížek M. & Zahradník P., 2007: Kůrovci na jehličnanech. *Lesnická práce*, Příloha 86, 1-8.
46. Knížek M., 2006: Diagnostické klíče hospodářsky významných druhů čeledi kůrovcovití (Coleoptera: Scolytidae). Česká zemědělská univerzita, Fakulta lesnická a environmentální, Praha. 152 s. (disertační práce). „nepublikováno". Dep. SIC ČZU v Praze.
47. Knížek M., Liška J. & Modlinger R., 2016: Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2015 a jejich očekávaný stav v roce 2016. (eds.): *Zpravodaj ochrany lesa*, Supplementum, 66 s.
48. Kočárek P., 2005: *Fyziologie živočichů*. Ostravská univerzita, Ostrava, 184 s.
49. Kolařík M., 2004: Fascinující svět podkorního hmyzu - houbové symbiózy. *Živa* 52, 73-75.
50. Košťál V., 2006: Ecophysiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52, 113-127.
51. Košťál V., Doležal P., Rozsypal J., Moravcová M., Zahradníčková H. & Šimek P., 2011: Physiological and biochemical analysis of overwintering and cold tolerance in two Central European populations of the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology* 57, 1136-1146.
52. Košťál V., Zahradníčková H., Šimek P. & Zelený J., 2007: Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology* 53, 580-586.
53. Krokene P., 2015: Conifer defense and resistance to bark beetles. In:Vega FE. &Hofstetter RW. (eds.): *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*. Elsevier, 177-207.
54. Křístek J. & Urban J., 2004: *Lesnická entomologie*. Academia, Praha, 445 s.

55. Landa Z., Křenová Z. & Vojtěch O., 2007: Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce* 86, 646-647.
56. Larsson MC., 2016: Pheromones and other semiochemicals for monitoring rare and endangered species. *Journal of Chemical Ecology* 42,853-868.
57. Lubojacký J, Knížek M. & Liška J, 2019: Ochrana lesa před kůrovci na smrku pro menší lesní majetky. *Lesnická práce*. Příloha 4, 1-4.
58. Lukášová K. & Holuša J., 2014: Problematika patogenů u lýkožroutů. *Živa* 5, 203-205.
59. Luquet M., Tritto O., Cortesero AM., Jaloux B. & Antonet S., 2019: Early olfactory environment influences antennal sensitivity and choice of the host-plant complex in a parasitoid wasp. *Insects*. 10, 127-140.
60. Luxová A. &Valterová I., 2006: Biosyntéza hmyzích feromonů, *Chemické listy* 100, 243-255.
61. Mahmoud SS. & Croteau RB., 2002: Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in plant science* 7, 366-373.
62. Marler TE. & Marler PN., 2018: *Rhyzobius lophanthae* Behavior is influenced by cycad plant age, Providing odor samples in a Y-tube olfactometer. *Insects* 9, 194-201.
63. Matthews Robert W.·& Matthews JR., 2009: *Insect behavior*, 2nd edition, Springer, USA, 519 s.
64. Miller DR., 2006: Ethanol and (-)-α-pinene: Attractant kairomones for some large wood-boring beetles in southeastern USA. *Journal of Chemical Ecology* 32, 779-794.
65. Modlinger R., Liška J., Knížek M., 2015a: *Hmyzí škudci našich lesů*. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci s VÚLHM v. v. i., Praha, 20 s.
66. Modlinger R., Liška J., Knížek M., Adam D., Janík D. & Hort L., 2015b: *Ochrana lesa před lýkožroutem smrkovým v ochranném pásmu lesních rezervací ponechaných samovolnému vývoji*. Lesnický průvodce 9. VÚLHM, Strnady, 67.
67. Mori K., 2005: Organic Synthesis in Pheromone Science. *Molecules* 10, 1023-1047.
68. Mustaparta H., 1984: Olfaction. In: Bell WJ., Cardé RT. (eds): Chemical ecology of insects. Springer, *Chemical Ecology of Insects*. Boston, MA. 37-70.
69. Novák V., Hrozinka F. & Starý B., 1974: Atlas hmyzích škůdců lesních of univoltine and bivoltine *Ips typographus* populations and associated natural enemies. *Journal of Applied Entomology* 136, 212-224.
70. Pfeffer A., 1952: *Kůrovec - lýkožrout smrkový a boj proti němu*. Brázda, Praha, 46 s.
71. Pfeffer, A. 1989: Kůrovcovití - *Scolytidae a jádrohlodovití* . Academia. Praha, 163 s.
72. Pfeffer, A., 1955: *Fauna ČSR. Kůrovci - Scolytoidea*, ČSAV, Praha, 324 s.
73. Phillips MA. & Croteau RB., 1999: Resin-based defenses in conifers. *Trends in plant science* 4,184-190.
74. Podskalská H., Růžička J., Hoskovec M. & Šálek M., 2009: Use of infochemicals to attract carrion beetles into pitfall traps. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 132, 59-64.
75. Pometlová M., Nohejlová K. & Šlamberová R., 2012: Některé problémy behaviorálního testování. *Československá fyziologie* 61, 45-50.
76. Procházka, 2012: *Modularizace výuky evoluční a ekologické biologie* CZ.1.07/2.2.00/ Determinační cvičení ze suchozemských bezobratlých. Kůrovci (Scolytinae). Masarykova univerzita, Brno - učební texty.
77. Raffa KF., Andersson MN. & Schlyter F., 2016: Host selection by bark beetles: playing the odds in a high-stakes Game. In: Tittiger C. and Blomquist GJ. (eds.): *Advances in insect physiology*. Oxford: Academic Press 50,1-74.

78. Riffell JA., Abrell L. & Hildebrand JG, 2008: Physical processes and real-time chemical measurement of the insect olfactory environment. *Journal of chemical ecology* 34, 837-853.
79. Rivera MJ., Martini X., Conover D., Mafra-Neto A., Carrillo D. & Stelinski LL., 2020: Evaluation of semiochemical based push-pull strategy for population suppression of ambrosia beetle vectors of laurel wilt disease in avocado. *Scientific Reports* 10, 2670-2682.
80. Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B. & Sahm H., 1993: Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate *Biochemical Journal* 295, 517-524.
81. Seybold SJ., Bohlmann J. & Raffa KF., 2000: Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: evolutionary perspective and synthesis. *Canadian Entomologist* 132, 697-753.
82. Seybold, SJ., Vanderwell, D., 2003: Insect pheromone biochemistry and molecular biology. In. Blomquist GJ. & Vogt RG. (eds.): *The Biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles.* Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 137.
83. Schlyter F. & Löfqvist J., 1986: Response of walking spruce bark beetles *Ips typographus* to pheromone produced in different attack phases. *Entomologia experimentalis et apliccata* 41, 219-230.
84. Schlyter F., 2009: Separation of the sexes of living spruce bark beetles, *Ips typographus*, (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 92, 42-47.
85. Schroeder LM., 1992: Olfactory recognition of nonhosts aspen and birch by conifer bark beetles *Tomicus piniperda* and *Hylurgops palliatus*. *Journal of chemical ecology* 18, 1583-1593.
86. Singer AC., Crowley DE. & Thompson IP., 2003: Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* 21, 123-153.
87. Skuhravý V., 2002: *Lýkožrout smrkový* (*Ips typographus*) *a jeho kalamity*. Agrospoj, Praha,196 s.
88. Stelinski L. & Tiwari S., 2013: Vertical T-maze Choice Assay for Arthropod Response to Odorants. *Journal of Visualized Experiments* 72,1-5.
89. Sullivan BT., Pettersson EM., Seltmann KC. & Berisford CW., 2000: Attraction of the bark beetle parasitoid *Roptrocerus xylophagorum* (Hymenoptera: Pteromalidae) to host-associated olfactory cues. *Physical and Chemical Ecology* 29, 1138-1151.
90. Tillman JA., Seybold SJ., Jurenka RA. & Blomquist GJ., 1999: Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect biochemistry and molecular biology* 29, 481-514.
91. Valterová I., 2015: *Chemická ekologie živočichů*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha, 284 s.
92. Vanderwell, D., Oehlschlager, AC., 1987: Biosynthesis of pheromones and endocrine regulation of pheromone production in Coleoptera. In.Blomquist GJ. & Prestwich GD., (ed.): *Pheromone biochemistry* .Academic Press, Orlando, 175 s.
93. Veselovský, Z., 2005: *Etologie*. Biologie chování zvířat. Academia, Praha. 407 s.
94. Vickers NJ., 2000: Mechanisms of animal navigation in odor plumes, *Biological Bulletin* 198, 203-212.
95. Vosshall LB. & Stocker RF., 2007: Molecular architecture of smell and taste in Drosophila, *Annual Review of Neuroscience* 30, 505-533.
96. Vyhláška č. 76/2018 Sb., o opatřeních k ochraně lesa a vzor služebního odznaku a vzor průkazu lesní stráže, ve znění vyhlášky č. 236/2000 Sb.
97. Wainhouse D., 2008: *Ecological methods in forest pest management*. Oxford, Oxford University Press, 228 s.

98. Wang S., Zhou F., Wang B., Xu D., Cao Q. & Lu M., 2017: Volatiles produced by bacteria alleviate antagonistic effects of one associated fungus on *Dendroctonus valens* larvae. *Science. China life sciences* 60, 924-926.
99. Wegensteiner, R., Wermelinger, B., Herrmann, M., 2015: Natural enemies of bark beetles: Predators, parasitoids, pathogens, and nematodes In: Vega FE & Hoffstetter RW (eds.): *Bark beetles: Biology and ecology of native and invasive species*. Elsevier, Amsterdam, 247-304.
100. Wermelinger B, 2002: Development and distribution of predators and parasitoids during two consecutive years of an *Ips typographus* (Coleoptera., Scolytidae) infestation *Journal of Applied Entomology* 126, 521-527.
101. Wermelinger B., 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecology and Management* 202, 67-82.
102. Wermelinger B., Epper C., Kenis M., Ghosh S. & Holdenrieder O., 2012: Emergence patterns of univoltine and bivoltine *Ips typographus* populations and associated natural enemies. *Journal of Applied Entomology* 136, 212-224.
103. Wood SL., 1982a: The bark beetles and ambrosia beetles of North America and Central America (Coleoptera, Scolytidae), a Taxanomic monograph. *Great Basin naturalist memoirs* 6, 1-1359.
104. Wood, DL., 1982b: The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual review of entomology* 27, 411-446.
105. Yu BT. Yu, Ding YM. & Mo JC., 2015: Behavioural response of female *Culex pipiens pallens* to common host plant volatiles and synthetic blends. *Parasites & Vectors* 8, 598-606.
106. Zahradník P. & Geráková M., 2010: Lýkožrout smrkový. *Ips typographus*. *Lesnická práce*, Příloha 89, 1-8.
107. Zahradník P. & Knížek M., 2000: Lýkožrout smrkový *Ips typographus*. *Lesnická práce*, Příloha 79, 1-8.
108. Zahradník P., 2006: *Základy ochrany lesa v praxi*. 2. vydání. *Lesnická práce*, Kostelec n. Č. l., 128 s.
109. Zhang QH., 2003: Interruption of aggregation pheromone in *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) by non-host bark volatiles. *Agricultural and forest entomology* 5, 145-153.
110. Zhang QH., Schlyter F. & Birgersson G., 2000: Bark volatiles from nonhost angiosperm trees of spruce bark beetle, *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae): Chemical and electrophysiological analysis. *Chemoecology* 10, 69–80.
111. Zhu X., Xu B., Kader A., Song B., Zhang Z, Li F. & Yang S., 2020: Behavioral responses of *Scolytus schevyrewi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) to volatiles from apricot tree (Rosales: Rosaceae). *Environmental Entomology* 49, 586-592.
112. Zákon č. 289/1995 Sb., zákon o lesích a o změně některých zákonů (lesní zákon).
113. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2018: Ministerstvo zemědělství.
114. Žďárek J., 2002: *Fyziologické a etologické funkce přírodních látek*. Chemie a biochemie přírodních látek. 27. svazek, Organická chemie, ÚOCHB AV ČR, 25-78 s.
115. Žďárek J., 2012: *Etologie a smyslová fyziologie hmyzu*. Vymezení předmětu, základní pojmy. Praha (učební texty