

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



Diplomová práce

**Behaviorální aktivita směsi těkavých látek původem z hub
asociovaných s lýkožroutem smrkovým.
Vývoj nových odparníků pro polní pokus.**

Autor: Bc. Václav Hosnedl

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

© 2021 ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Václav Hosnedl

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Behaviorální aktivita směsi těkavých látek původem z hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým. Vývoj nových odparníků pro polní pokus.

Název anglicky

Behavioral activity of volatile compounds mixture produced by European bark beetle's associated fungi. Development of new dispensers for field test.

Cíle práce

Kůrovec lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.) působí v současnosti ve střední Evropě masivní destrukci smrkových porostů. Ekonomická nebezpečnost tohoto brouka je mimo jiné způsobena jeho asociací s ophiostomatoidními houbami, které inokuluje do hostitelského smrku ztepilého, čímž znehodnotí dřevo napadeného stromu. Nedávné výzkumy v laboratoři se zabývaly chemicko-ekologickým vztahem lýkožrouta s jeho asociovanými houbami zprostředkovaným těkavými látkami produkovanými houbami. Tyto směsi látek v určité koncentraci prokazatelně lýkožrouta na krátkou vzdálenost lákaly. Cílem této diplomové práce je ověřit v polním pokusu s feromonovými lapači, zda a v jaké koncentraci je vybraná směs látek původem z asociovaných hub pro lýkožrouta smrkového lákavá. Bude zhodnocena její atraktivita na dlouhou vzdálenost v přirozených lesních podmínkách a na základě výsledků bude diskutováno její využití ke zvýšení efektivity feromonových odparníků.

Metodika

Z komerčně dostupných chemických látek, které byly identifikovány v houbách *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica* bude připravena směs o známém složení (Kandasamy 2019). Budou navrženy různé designy odparníků s koeficientem odparu 0,1 mg/den, 1 mg/den, 10 mg/den. Gravimetrickou analýzou bude pro každý koeficient odparu vybrán nejvhodnější design odparníku a odparníky budou připraveny pro navržený počet opakování. V lese s vysokým výskytem lýkožrouta smrkového bude vybrána vhodná holina s čerstvou porostovou smrkovou stěnou, na kterou budou instalovány feromonové odparníky s určenou kombinací návnad. Odparníky testované směsi budou do lapačů instalovány buď samostatně, nebo v kombinaci s feromonem. Referencí bude lapač se samotným feromonem a prázdný lapač. Návnady budou v lapačích randomizovány, abychom vyloučili poziční efekt. Odchytení brouci budou spočítáni a na základě statistické analýzy bude určena efektivita jednotlivých návnad. Na konci pokusu budou odparníky extrahovány do rozpouštědla, a kvantita zbývajících složek směsi bude určena pomocí plynové chromatografie, abychom určili koeficient odparu jednotlivých složek. Harmonogram: jaro 2020- design odparníků směsi látek s různými koeficienty odparu, polní pokus, podzim 2020- počítání odchytení, stanovení koeficientů odparů jednotlivých látek v laboratoři, zima/jaro 2020/21-kompilace výsledků

Doporučený rozsah práce

40-60

Klíčová slova

Ips typographus, lýkožrout smrkový, atraktant, Grosmannia europhioides, Grosmannia penicillata, Endocnidiophora polonica, odparník

Doporučené zdroje informací

- HULCR, J. (2003) Spojenecká armáda lýkožroutů a hub proti stromu. Vesmír. no. 82, s. 692. ISSN 1214-4029.
- CHRISTIANSEN E. (1985) Ips/Ceratocystis-infection of Norway spruce: what is a deadly dosage? Angew. Ent., no. 99, s. 6-11. ISSN 1439-0418.
- JANKOWIAK, R.; KOLAŘÍK, M.; BILAŇSKI, P. (2014) Association of Geosmithia fungi (Ascomycota: Hypocreales) with pine- and spruce-infesting bark beetles in Poland. Fungal Ecology. 2014, no. 11, s. 71-79. ISSN: 1754-5048.
- KANDASAMY, D., GERSHENZON, J., ANDERSSON, M. N., HAMMERBACHER, A. (2019). Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (Ips typographus) with its fungal symbionts. The ISME Journal, no. 13(7) s. 1788-1800, doi:10.1038/s41396-019-0390-3.
- 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 no. 42, s. 952-969.
- SCHLYTER F., BYERS J.A. AND LÖFQVIST J., (1987) Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing – Density-regulation mechanisms in bark beetle Ips typographus. Journal of Chemical Ecology. no 13 s 1503-1523 .
- VIIRI, H.; (1997) Fungal associates of the spruce bark beetle Ips typographus L. (Col. Scolytidae) in relation to different trapping methods. Journal of Applied Entomology. no. 121, s. 529-533. ISSN: 1439-0418.
-

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Anna Jírošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Ing. Kateřina Beránková

Ing. Roman Modlinger, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 8. 7. 2020

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 18. 10. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 26. 02. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma „Behaviorální aktivita směsi těkavých látek původem z hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým. Vývoj nových odparníků pro polní pokus.“ vypracoval samostatně pod vedením Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

V Praze dne: 20. 04. 2021

Podpis:

Poděkování

Tímto bych velice rád poděkoval vedoucí diplomové práce paní Ing. Anně Jirošové, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytnutí cenných rad a informací při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Romanu Modlingerovi, Ph.D. za odborné vedení při statistické analýze výsledků a Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za odborné vedení při analýze výsledků na plynovém chromatografu-hmotnostním spektrometru.

Abstrakt

Tato diplomová práce shrnuje v literární rešerši základní informace o lýkožroutu smrkovém, o jeho bionomii, výskytu, lesnickém významu nebo preventivních opatřeních a podrobné informace o jeho symbiotickém vztahu s ophiostomatoidními houbami Ascomycetes, konkrétně s houbami rodu *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica*. Především pak shrnuje jejich chemicko-ekologický vztah s kůrovcem, obsah látek, které jsou houbami emitovány a výzkum, jak tyto látky ovlivňují kůrovce a jak on na ně reaguje. Výhodou tohoto symbiotického vztahu pro kůrovce je, že houba poskytuje potravu pro jeho larvy, pomáhá při překonání obrany hostitelského stromu a také zvyšuje atraktivnost pro další kůrovce stejného druhu, protože jak bylo zjištěno, tyto houby sami dokážou produkovat jednu z hlavních atraktivních složek feromonu lýkožrouta smrkového, 2-methyl-3-buten-2-ol. Atraktivní směs 6ti sloučenin (3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethanol, 2-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethyl acetát) v poměru ekvivalentních objemů pocházející z těchto symbiotických hub byla použita v polním experimentu pro prokázání atraktivity pro kůrovce. Směs sloučenin byla dávkována prostřednictvím odparníků, které byly pečlivě navrženy, aby se z nich odpařovalo množství látky s požadovaným koeficientem odparu. Odparníky byly testovány v polním pokusu založeném na ploše s čerstvou porostní stěnou smrku ztepilého, a to ve feromonových lapačích v kombinaci s i bez feromonu.

Na konci experimentu byli kůrovci odchycení do feromonových lapačů spočítáni, vypitváni, byla vyhodnocena účinnost jednotlivých odparníků, a také byl určen poměr pohlaví kůrovců, kteří se na jednotlivé odparníky odchytili. Nejatraktivnější byly odparníky s nízkým koeficientem odparu testované směsi v kombinaci s feromonem. Odparníky obsahující samotnou směs mixu sloučenin bez feromonu byly na velmi nízké hladině atraktivity, a pouze nejvyšší dávka samotné směsi lákala nízký počet kůrovců.

Experiment přinesl poznání, že přídavek směsi komerčně dostupných levných látek zvyšuje atraktivitu samotné feromonové směsi pro kůrovce, což bude využito k vývoji účinnějších feromonových odparníků pro monitoring a kontrolu populace lýkožrouta smrkového. Dalším poznáním je, že látky emitované symbiotickými ophiostomatoidními houbami hrají roli v chemické komunikaci těchto brouků.

Klíčová slova: *Ips typographus*, lýkožrout smrkový, atraktant, *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*, odparník

Abstract

This diploma thesis summarizes in a literature search basic information about the spruce bark beetle *Ips typographus*, its bionomy, occurrence, forest significance or preventive measures and detailed information about its symbiotic relationship with ophiostomatoid fungi Ascomycetes, specifically with fungi of the genus *G. europioides*, *G. penicillata*, *E. polonica*. Above all, it summarizes their chemical-ecological relationship with bark beetles, the content of substances that are emitted by fungi and a research of how these substances affect bark beetles and how it reacts to them. The advantage of this symbiotic relationship for bark beetles is that the fungi provide food for its larvae, helps to overcome the defense of the host tree, and also increases attractiveness for other bark beetles of the same species, because these fungi have been found to produce one of the main attractive components of *Ips typographus*, 2-methyl-3-buten-2-ol. An attractive mixture of 6 compounds (3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butyl acetate, 2-phenylethanol, 2-methyl-1-butyl acetate, 2-phenylethyl acetate) in equivalent volume ratios derived from these symbiotic fungi was used in a field experiment to demonstrate the attractiveness for bark beetles. The mixture of compounds was dosed by means of dispenser, which were carefully designed to evaporate the amount of substance with the required evaporation coefficient. Dispensers were tested in a field experiment based on an area with a fresh stand of Norway spruce, in pheromone traps in combination with and without pheromone.

At the end of the experiment, the bark beetles captured in pheromone traps were counted, dissected, the efficiency of the individual dispensers was evaluated and the sex ratio of bark beetles that caught on individual dispensers was also determined. The most attractive were dispensers with a low evaporation coefficient of the tested mixture in combination with a pheromone. Dispensers containing a mixture of pheromone-free compounds alone were at a very low level of attractiveness, and only the highest dose of the mixture alone attracted a low number of bark beetles.

The experiment showed that the addition of a mixture of commercially available cheap substances increases the attractiveness of the pheromone mixture itself for bark beetles, which will be used to develop more efficient pheromone dispensers for monitoring and control of the *Ips typographus* population. Another finding is that substances emitted by symbiotic ophiostomatoid fungi play a role in the chemical communication of these beetles.

Keywords: *Ips typographus*, attractant, *Grosmannia europioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*, dispenser

Obsah

• Úvod.....	11
• Cíl práce	13
• Rešerše.....	14
1.1 Houby asociované s kůrovci	14
1.1.1 Lýkožrout smrkový a jeho symbiotický vztah s houbami	14
1.1.2 Inokulace asociované houby do stromu.....	17
1.1.3 Jiné druhy kůrovců a jejich asociovaný vztah s houbami.....	18
1.1.4 Volatilní těkavé látky uvolňované asociovanými houbami a jejich efekt na chování kůrovce.....	20
1.1.5 Predátoři kůrovců využívají těkavých látek z hub	24
1.2 Lýkožrout smrkový (<i>Ips typographus</i>).....	24
1.2.1 Morfologie	25
1.2.2 Popis životního cyklu.....	25
1.2.3 Výběh hostitele	26
1.2.3.1 Atraktivní látky pro kůrovce	26
1.2.3.2 Ne-atraktivní látky pro kůrovce.....	27
1.2.4 Obrana hostitele	29
1.3 Výskyt lýkožrouta smrkového a kalamitní stav v ČR.....	30
1.4 Alternativní metody monitoringu a kontroly populace	33
• Metodika	38
Plynová chromatografie GC	38
Hmotnostní spektrometrie MS	39
1.5 Metodika práce v laboratoři	39
1.5.1 Vývoj odparníků obsahující mix sloučenin z hub	39
1.5.2 Třídění kůrovců od necílového hmyzu a určení počtu odchycených kůrovců	42
1.5.3 Třídění samců a samic lýkožrouta smrkového	42
1.5.4 Analýza vzorků plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí	44
1.6 Metodika práce v terénu.....	45
1.7 Statistické vyhodnocení	48
• Výsledky	49
• Diskuse	54
• Závěr.....	56
• Seznam literatury a použitých zdrojů	58

Seznam tabulek

<i>Tab. č. 1:</i> Použité látky v experimentu s mixem sloučenin z hub.....	48
<i>Tab. č. 2:</i> Schéma výměny jednotlivých odparníků v lapačích (rotace po diagonále).	48
<i>Tab. č. 3:</i> Procentuální zastoupení látek obsažených v jednotlivých odparnících.....	50
<i>Tab. č. 4:</i> Absolutní hodnoty odchycených brouků na mix sloučenin z hub při jednotlivých sběrech.	50
<i>Tab. č. 5:</i> Počet vypitvaných samců a samic lýkožrouta smrkového odchycených na jednotlivé látky.	52

Seznam obrázků

<i>Obr. č. 1:</i> Test atraktivity jednotlivých druhů hub pro lýkožrouta smrkového (Kandasamy et al. 2019).	15
<i>Obr. č. 2:</i> Hlavní alkoholy a estery emitované asociovanými houbami s lýkožroutem smrkovým (Kandasamy et al. 2019).	22
<i>Obr. č. 3:</i> Feromony lýkožrouta smrkového (Kandasamy et al. 2016).	27
<i>Obr. č. 4:</i> Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v letech 2005-2019	32
<i>Obr. č. 5:</i> Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v roce 2018	32
<i>Obr. č. 6:</i> Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v roce 2019	32
<i>Obr. č. 7:</i> Vývoj odparníků, jejichž k.o. byl zjišťován za konstantních podmínek v laboratoři (Hosnedl 2020).	40
<i>Obr. č. 8:</i> Rozlišovací znaky u pohlaví lýkožrouta smrkového.	44
<i>Obr. č. 9:</i> Vypreparovaný falus lýkožrouta smrkového (Hosnedl 2020).....	44
<i>Obr. č. 10:</i> Lokalita experimentu (Konojedy, Klíče). Foto viz Mapy.cz.....	45
<i>Obr. č. 11:</i> Plocha po instalaci feromonových lapačů typu Ecotrap (Hosnedl 2020).....	46
<i>Obr. č. 12:</i> Schéma umístění lapačů s mixem sloučenin z hub.	47

Seznam grafů

<i>Graf č. 1:</i> Časová křivka rychlosti uvolňování mixu sloučenin ve vysoké dávce.	41
<i>Graf č. 2:</i> Časová křivka rychlosti uvolňování mixu sloučenin ve střední dávce	41
<i>Graf č. 3:</i> Časová křivka rychlosti uvolňování mixu sloučenin v nízké dávce	42
<i>Graf č. 4:</i> Procentuální zastoupení složek směsi v odparnících.	49
<i>Graf č. 5:</i> Průměrné absolutní odchvy kůrovců na jednotlivé dávky odparníků \pm směrodatná odchylka.....	51

<i>Graf č. 6: Relativní odchyty kůrovců na odparníky s 3 k.o. v kombinaci s feromonem, porovnáno s referencí feromon.</i>	51
<i>Graf č. 7: Porovnání atraktivity samotné směsi vztažené k prázdnému lapači jako referenci.</i>	52
<i>Graf č. 8: Procenta samic v odchycích na odparníky s různým k.o. v kombinaci s feromonem, v porovnání s feromonem.</i>	53

Seznam použitých zkratk

Ep – <i>Endoconidiophora polonica</i>
Gp – <i>Grosmannia penicillata</i>
Ge – <i>Grosmannia europhioides</i>
GLVs – green leaf volatiles
SSR – single sensillum recording
MB – 2-methyl-3-buten-2-ol
cV – cis-verbenol
tV – trans-verbenol
Id – ipsdienol
Ie – ipsenol
Vn – verbenone
Mt – myrtenol
tM – trans-myrtenol
PE – polypropylen
VOC – volatile organic compound
MeJa – methyl jasmonát
MZe – Ministerstvo zemědělství
LH – lesní hospodářství

- Úvod

Stejně jako jiné bakalářské a diplomové práce, i tato práce se zabývá lýkožroutem smrkovým, škůdcem na jehličnatých porostech tvořených smrkem ztepilým. Lýkožrout smrkový je kůrovec, o kterém by se dalo říct, že je jedním z nejobávanějších kůrovců jehličnatých porostů a je postrach nejen pro Českou republiku, ale také pro celou Evropu. V současnosti působí masivní destrukci smrkových porostů, a tím se stává i ekonomicky náročným a nebezpečným. Za rok 2019 bylo vytěženo 20,7 mil. m³ smrkového kůrovcového dříví.

Nicméně zde není vyzdvižováno, jak velké škody jsou tímto kůrovcem páčány, že napadá pouze smrkové monokultury pěstované v nepůvodních oblastech, a že současné klimatické podmínky jako je suché, teplé léto bez vydatných srážek jen podporují jeho četný a rychlý vývoj až se třemi generacemi za rok. Tato diplomová práce je především zaměřena na chemické sloučeniny pocházející z brouků a jejich hostitelských stromů a hlavní pozornost je věnována chemickým signálům, které pocházejí ze symbiotických hub lýkožrouta smrkového. Protože jak bylo zjištěno, tento kůrovec nepůsobí tyto závažné škody sám, ale ve spojení s ophiostomatoidními houbami, se kterými si vytvořil symbiotický vztah. Kůrovec těmto houbám slouží jako vektor, který je bezpečně inokuluje do hostitelského stromu, a tím dochází také ke znehodnocení dřeva. Především smrku ztepilého.

V posledních letech se několik výzkumů zabývalo tímto symbiotickým, chemicko-ekologickým vztahem lýkožrouta smrkového a jeho asociovanými houbami ve snaze pochopit, jak kůrovec s touto houbou spolupracuje, jaké benefity to každému z nich přináší nebo jaké látky se z houby uvolňují a jaký vliv to má na kůrovce. Bylo zjištěno, že tento vztah je zprostředkovan těkavými látkami, které houba produkuje. V určité koncentraci a na krátkou vzdálenost jsou tyto směsi pro lýkožrouta atraktivní. Dokonce některé ze symbiotických hub dokážou produkovat jednu z hlavních aktivních složek feromonu lýkožrouta smrkového.

Kůrovci působící na smrku či borovici jsou úzce spojeni s ophiostomatoidními houbami Ascomycetes, včetně rodů *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora*. Tyto houby zvyšují úspěch brouků při kolonizaci hostitelských stromů a houby jim ještě slouží jako výživa. Nevýhodou je, že přitahují kromě samotných kůrovců také predátory a parazity kůrovců.

Průzkumy odhalily, že ophiostomatoidní houby emitují za laboratorních podmínek různé těkavé organické sloučeniny, včetně organických alkoholů, terpenoidů, aromatických sloučenin a alifatických alkoholů, což jsou sloučeniny, u nichž bylo prokázáno, že vyvolávají behaviorální reakce u kůrovců, a fungujících jako atraktanty nebo anti-atraktanty. U dvou druhů hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhoides* bylo dokonce zjištěno, že produkují velké množství 2-methyl-3-buten-2-olu (MB), což je jedna ze základních složek pohlavního agregačního feromonu tohoto kůrovce (Zhao et al. 2015; Kandasamy et al. 2016; 2019).

Sloučeniny vylučované houbami by tedy mohly sloužit jako cenné látky v managementu kůrovce. Vztah mezi houbou a kůrovcem je však velmi složitý. Reakce brouků se liší podle druhu houby, stadia životního cyklu brouka, kvality hostitelského stromu atd.

Houby asociované s kůrovcem hrají klíčovou roli v úspěšném napadení hostitelského stromu kůrovcem, a proto by lepší znalost chemických interakcí mezi broukem a houbami mohla zvýšit naše chápání života kůrovce. Tyto cenné informace nám mohou pomoci při zdokonalování technik při managementu různých druhů kůrovců a při vývoji nových technik. Jak uvádí Kandasamy et al. (2016), použití těkavých látek uvolňovaných z hub jako atraktantů nebo anti-atraktantů ať už jednotlivě, nebo v kombinaci by mohlo zlepšit schopnost kontroly a managementu tohoto škůdce.

Jelikož některé houby, jako je třeba druh *E. polonica*, mohou být snáze manipulovatelné pro experimenty na živých stromech, lépe než samotní brouci, mohou být houby používány ke studiu odolnosti smrku ztepilého a jeho obranných mechanismů ve floému a xylému při pokusech s nízkou hustotou a hromadnou inokulací (Zhao et al. 2011; Skrøppa et al. 2015).

Rozmanitost těkavých sloučenin emitovaných houbami spojenými s kůrovcem má velký potenciál pro vývoj nových kontrolních opatření s použitím semiochemikálií pro tento hmyz. Další výzkumy zahrnující identifikaci těkavých látek a jejich vliv na chování kůrovců a jejich přirozené nepřátele poskytnou poznatky, které by mohly být využity k ochraně jehličnatých lesů. V současné době je však použití semiochemikálií pro management kůrovce v přírodních lesích omezeno mírou, v jaké by musely být nasazeny. Na druhou stranu, na malých plochách s jehličnany mohou být tyto techniky účinné a logisticky a ekonomicky možné. Na malých plochách by dokonce mohly být využity buněčné kultury hub jako návnady v pastí pro přilákání kůrovců (Kandasamy et al. 2016).

- Cíl práce

Protože bylo zjištěno, že těkavé látky uvolňované z asociovaných hub lýkožrouta smrkového lákají, cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda a v jaké koncentraci je vybraná směs látek původem emitovaná houbami v kombinaci s feromonem, nebo samostatně pro lýkožrouta lákavá. Z komerčně dostupných chemických látek (3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethanol, 2-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethyl acetát), které byly identifikovány v houbách *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica* bude připravena směs o známém složení (Kandasamy et al. 2019), jejíž atraktivita bude testována v polním pokusu s feromonovými lapači v kombinaci s feromonem či samostatně. Brouci odchycení do lapačů na jednotlivé typy návnad budou spočítáni a roztríděni dle pohlaví. Dle výsledků bude zhodnoceno, zda směs látek původem emitovaná asociovanými houbami zvyšuje atraktivitu feromonu pro lýkožrouta smrkového, či modifikuje poměr chycených pohlaví a mohla by být tudíž využitelná k vylepšení existujících feromonových odparníků.

- Rešerše

1.1 Houby asociované s kůrovci

1.1.1 Lýkožrout smrkový a jeho symbiotický vztah s houbami

Ač se může zdát, že kůrovec je jen malý, bezvýznamný brouk, není tomu tak. Poslední dobou se díky svému masivnímu šíření ve smrkových porostech a vytváření kalamit dostal do podvědomí snad každého. Podčeleď kůrovcovití (*Scolytinae*), do které ho řadíme, je jednou z nejrozmanitějších skupin hmyzu zahrnující 6000 druhů. Pro kůrovce je typické, že napadá především lýko a dřevo naprosté většiny stromů, ale také ho můžeme nalézt uvnitř ovoce, v semenech, v listech, v dužnině větvíček, ve stoncích bylin včetně kapradin či ve vzdušných kořenech mangrovů. A právě k tomu, aby byli schopni žít ve tkáních širokého spektra hostitelů, využívají symbiotické houby (Hulcr 2003), které plní řadu fyziologických a ekologických funkcí (Kandasamy et al. 2019).

Substrát obecně obsahuje nízký obsah živin a vysoký obsah toxických látek z obranných chemikálií, a proto hmyz potřebuje využít svých symbiontů. Pro přežití je vhodný výběr symbiontů zásadní. Ti totiž poskytují základní živiny a potravu pro jejich larvy a pomáhají degradovat obranyschopnost hostitele (Kandasamy et al. 2019).

S pomocí například dřevokazných hub jsou pak schopni usmrtit miliony stromů ročně (Hulcr 2003).

Jelikož se toho o symbióze mezi houbami a kůrovci ví poměrně málo, mohlo by se zdát, že tento trend se vyvinul nedávno. Nenechme se ale zmást. Vřeckovýtrusné houby z řádu *Ophiostomateles* se objevily už koncem období křídý, a jelikož měly stejný cíl jako kůrovci, oslabit obranný mechanismus stromů a usnadnit si cestu k jejich tkáním, evolucí došlo k vytvoření vzájemně výhodných přizpůsobení, která později přerostla až v úplnou vzájemnou závislost. Tato symbióza vznikla u mnoha skupin kůrovců (Hulcr 2003).

Přesto, že povaha symbiózy mezi lýkožroutem smrkovým a souvisejícími houbami je stále nejasná (Benz a Six 2006), i tento nejničivější škůdce lesních porostů v Evropě má vyvinutý symbiotický vztah s několika houbami, o nichž se předpokládá, že přispívají k jeho úspěšné invazi na smrku ztepilém (Kandasamy et al. 2019).

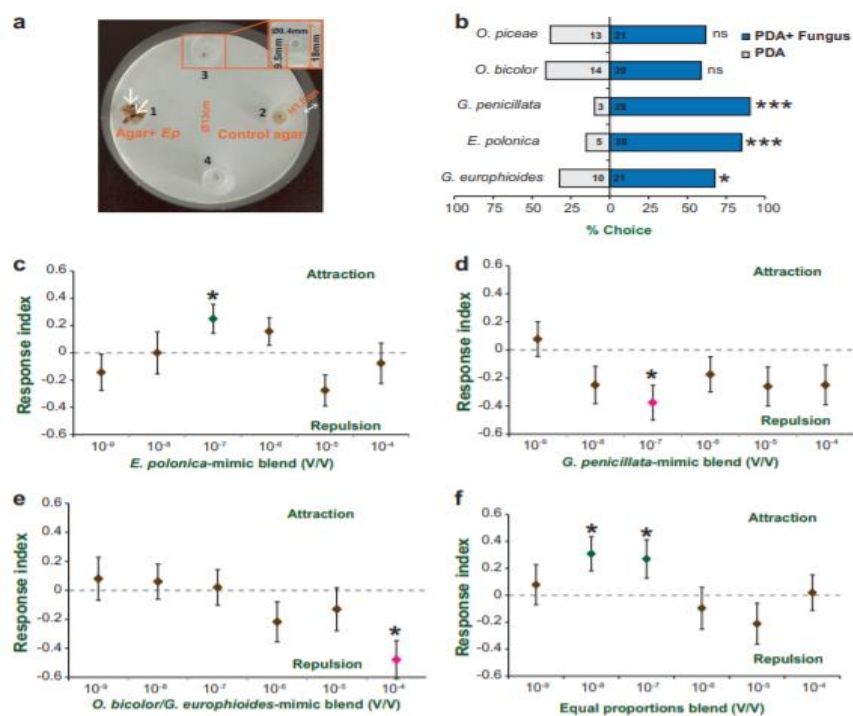
Většina hub nacházející se v asociovaném vztahu s kůrovci pochází nejčastěji z rodu *Ophiostoma* (Viiri 1997).

Lýkožrout smrkový má symbiotický vztah s houbami Ascomycetes rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis*, *Endoconidiophora* a *Entomocorticium* (De Beer et al. 2014).

Nejčastěji vyskytujícími se houbami ve společnosti lýkožrouta smrkového jsou *Endoconidiophora polonica* (Siemaszko), která je údajně jeho dominantním houbovým symbiontem v Norsku, Polsku a Rakousku. V dalších zemích je to pak *Ophiostoma bicolor* a *Grosmannia penicillata* (Grosmann). Mezi další objevené houby, které mají symbiotický vztah s lýkožroutem smrkovým, patří *Grosmannia europhioides*, *Ophiostoma ainoae* a *Ophiostoma piceae* (Münch) (Jankowiak et al. 2009).

Kandasamy et al. (2019) se ve svém výzkumu snažili zjistit, zda kůrovec smrkový dokáže rozpoznat jednotlivé houby v přírodě, vyskytující se v galeriích brouků, a rozlišovat mezi nimi. Vyvinuli behaviorální test v aréně Petriho misky, kde si nedospělí brouci mohli vybrat mezi médii kolonizovanými různými druhy houby, do kterých budou hlodat tunel. Použité kultury hub byly čtyři dny staré. Zjistili, že ze všech testovaných hub byly *Endoconidiophora polonica* (Ep), *Grosmannia penicillata* (Gp) a *Grosmannia europhioides* (Ge) nejatraktivnější ve srovnání s nekolonizovanou kontrolní stranou. Dále zjistili, že pokud jsou galerie kůrovců napadeny více druhy hub, např. *O. bicolor*, *G. penicillata*, *G. europhioides* včetně *E. polonica*, kůrovci jednoznačně preferují houbu *E. polonica*. Na druhou stranu těkavé sloučeniny pocházející z *O. piceae* a *O. bicolor* brouky nepřitahují.

Provedené testy vědců ze skupiny Kandasamy et al. (2019) zobrazuje (Obr. č. 1).



Obr. č. 1: Test atraktivity jednotlivých druhů hub pro lýkožrouta smrkového (Kandasamy et al. 2019).

1a) zobrazuje behaviorální test v petriho misce. Kůrovci zde využívají podnětů těkavých látek k rozlišení jednotlivých asociovaných hub. Jako kontrolní prvek byl použit samotný agar. **1b)** zobrazuje preferenci kůrovců, kteří si měli vybrat mezi agarem kolonizovaným houbami každého druhu (modré pruhy) a kontrolním agarem bez houby (bílé pruhy). **1c-f)** zobrazují syntetické směsi houbových těkavých látek, které byly nalezeny v aktivních single sensillum záznamech na tykadle kůrovce, které byly atraktivní nebo odpudivé pro nedospělé brouky v testech olfaktometru při konkrétních dávkách.

Některé z těchto hub rostou z galerií brouků do floému a živého xylému, kde jejich tmavé mycelium způsobuje rozsáhlé modrošedé nebo načernalé zbarvení dřeva. Houby spojené s brouky živícími se na jehličnanech jsou buď saprofytické, jako rod *Ophiostoma*, anebo nekrotrofní, jako rod *Grosmannia* a druh *Endoconidiophora* (De Beer et al. 2014).

Rody *Ophiostoma* a *Grosmannia* vykazují slabou až střední patogenitu, zatímco rod *Endoconidiophora* je naopak vysoce patogenní a může zabíjet zdravé jehličnany, pokud jsou uměle naočkovány (Krokene a Solhheim 2002).

Houby mohou také prospět broukům degradací obrany hostitelských stromů, které jsou pro brouky toxické. *Endoconidiophora polonica* a *Grosmannia penicillata* jsou také uváděny jako vysoce virulentní patogeny smrku, a proto mohou prospět broukům tím, že urychlí smrt stromu, zejména na počátku kolonizační fáze (Wadke et al. 2016).

Při výzkumu provedeném ve smrkových lesích jižního Norska a severovýchodního Polska bylo zjištěno, že *Endoconidiophora polonica* je často první ophiostomatoidní houbou, která se usazuje ve floémových tkáních sousedících s mateřskou galerií. Protože dobře roste v podmínkách s nízkým obsahem kyslíku a vysokou vlhkostí, má konkurenční výhodu oproti jiným druhům (Kirisits 2010).

Endoconidiophora polonica také detoxikuje chemickou obranu hostitele, která je vyvolána při útoku brouka, a zároveň poskytuje další výhodu larvám a dospělým broukům (Wadke et al. 2016).

Jakmile se kůrvec nachází v hostitelské dřevině a *Endoconidiophora polonica* začne růst do bělového dřeva, začnou se pomalu objevovat i jiné druhy hub jako například *O. bicolor*, *G. penicillata* a *G. europhioides* (Solheim 1992).

Role těchto ophiostomatoidních hub se velmi liší v závislosti na životní strategii a druhu brouka.

1.1.2 Inokulace asociované houby do stromu

Asociativní vztah mezi kůrovcem a houbou hraje významnou roli v kolonizaci hostitele lýkožroutem (Krokene a Solhheim 1998).

Zatímco brouk slouží jako houbový vektor, hledá vstupní otvor a naočkuje hostitelský strom (Hulcr 2003), houba může dodávat broukovi živiny, pomáhá degradovat obranyschopnost hostitele a následně zabít strom (Hammerbacher et al. 2013).

Kůrovec tedy hraje významnou roli pro přenos a spolehlivé zavlečení houby do nového hostitele (Hulcr 2003).

Tento symbiotický vztah má kůrovec však jen s několika druhy hub. Například, některé severoamerické houby jsou pro kůrovce škodlivé a samice kůrovce si musí v mycangiích, speciálních orgánech, nosit jiný druh houby, které té agresivní houbě konkurují, a tím umožňují larvám kůrovce nerušený vývoj (Hulcr 2003).

Zvláštní chování bylo pozorováno u ambrosiových brouků. Ti se živí podhoubím a plodnicemi svých symbiotických hub. Přenos a růst ambrosiové houby je plně závislý na kůrovci, který si při hloubení požerku do dřevě houby dopraví, stará se o ní, aby si ji „vypěstoval“, a houba mu na oplátku poskytuje kompletní potravu (Hulcr 2003).

Kůrovci mají speciální orgány, mycangia, ve kterých přenáší spory hub, které zavlékají do floému během vytváření snubní komůrky a chodeb (Viiri 1997).

Mycangium je žláznatá prohlubeň vyplněná olejovitými tekutinami, do které se zachytávají spory symbiotických hub. Spory hub jsou ale také přenášeny roztoči, kteří se na kůrovce přichytávají a cestují spolu s ním. Mnoho druhů ambrosiových brouků tomu adaptovalo svá těla a vytvořili si mycangia, aby s sebou mohli své houby nosit při vyhledávání nových hostitelských stromů a předat je svým potomkům (Hulcr 2003).

Jelikož lýkožrout smrkový nemá žádné uzpůsobení k transportu symbiotických mikrobů, jakými jsou třeba sekreční žlázy nebo mycangia, přenáší spory hub v zadní části *pronota*, v jamkách na krovkách neboli *elytra* a také v zaživacím traktu. Spory byly také pozorovány u roztočů asociovaných s brouky. Na povrchu těla kůrovce můžeme nalézt až tisíce askospor a konidií (Viiri 1997).

Distribuce různých ophiostomatoidních hub v rámci regionů může být způsobena rozdíly v teplotních optimech pro jejich růst, adaptací na klima, chemií hostitele či hladinou vlhkosti floému.

Hammerbacher et al. (2013) se domnívají, že houby mohou kromě poskytování živin lýkožroutu smrkovému také pomáhat metabolizovat toxiny hostitelského stromu nebo

překonat obranyschopnost stromů nadměrnou stimulací produkce oleoresinů a fenolických sloučenin.

Po napadení stromu kůrovcem dojde ke spuštění obranného mechanismu hostitelského stromu, který začne produkovat pryskyřici. K tomu, aby kůrovec dokázal tento obranný mechanismus překonat, využívá právě hub. Lýkožrout smrkový konkrétně dobře spolupracuje s houbou *Endoconidiophora polonica*. Strom při napadení kombinací této houby a zároveň silným útokem kůrovců nedokáže dlouho odolávat a dojde k jeho oslabení až úhynu. Brouci svým hloubením chodeb rozvrátí vodní režim stromu a dojde k vysušení pryskyřičných kanálků. Houby zase přerušují transport vody, ucpou cévy smůlou a produkují jedovaté izokumariny. Napadené dřevo se poté modře zbarví (Hulcr 2003).

Adams a Six (2008) zjistili, že pokud je do hostitelského stromu, který je napaden kůrovcem, zanesena symbiotická houba, strom začne produkovat jiné těkavé látky, které usnadní lokalizovat daný strom parazitoidům. Dá se tedy říct, že interakce mezi jehličnatou dřevinou, jako hostitelem, a kůrovcem je alespoň částečně zprostředkována mikroby.

Proto také v posledních letech dochází ke zkoumání symbiotických vztahů mezi hmyzem a mikroby. Vypadá to, že pro kůrovce je tento vztah velice přínosný. Mikroby umožňují kůrovci najít nové zdroje potravy, pomáhají s výživou nebo pomáhají se přizpůsobit nikám, které pro něj nejsou příznivé (Janson et al. 2008).

1.1.3 Jiné druhy kůrovců a jejich asociovaný vztah s houbami

Symbiotický vztah mezi kůrovcem a houbou byl studován i u amerického kůrovce *Dendroctonus rufipennis* (Kirby), který je asociovaný s houbou *Leptographium abietinum* (Peck). Bylo prokázáno, že tato houba dokáže produkovat ergosterol, což je steroid, který je vyžadován mnoha druhy hmyzu k produkci hormonů pro různé vývojové procesy. Rostliny často obsahují steroly pouze v malém množství, proto kůrovci, kteří se živí houbou *Leptographium abietinum* a jinými houbami, mohou být schopni doplnit svou stravu základními steroly (Cardoza et al. 2008).

Další výzkum se zabýval symbiotickým vztahem mezi kůrovcem *Dendroctonus ponderosae* (Hopkins), kůrovcem na borovici těžce rostoucí na americkém kontinentu, a houbami rodu *Grosmannia clavigera*, *Ophiostoma montium* a *Leptographium longiclavatum*. Tyto houby jsou stejně jako u lýkožrouta smrkového přenášeny na exoskeletu. Zajímavé je, že houba *Grosmannia clavigera* dokáže tolerovat vysoké hladiny monoterpenů v čerstvě napadené kůře použitím specifických transportérů, které exportují monoterpeny z buňky houby. Tento druh může také využívat monoterpeny jako zdroj uhlíku, což je mimořádně

zajímavé přizpůsobení pro přežití v kůře obsahující pryskyřici a dřevní tkáň (Wang et al. 2014).

Obě houby, *Grosmannia clavigera* i *Ophiostoma montium*, hrají zásadní roli ve vývoji *Dendroctonus ponderosae* tím, že koncentrují dusík a produkují ergosterol, který je zásadní pro vývoj a reprodukci brouků (Bentz a Six 2006).

Bleiker a Six (2007) zjistili, že brouci, kteří se živí floémem kolonizovaným houbou *Grosmannia clavigera*, opouštějí matečný strom rychleji a produkují více potomků s větší velikostí těla. Brouci krmení na houbě *Ophiostoma montium* jsou zase znatelně větší než brouci chovaní bez hub. Tento výzkum tedy prokazuje, že pokud se larvy kůrovců živí na floému naočkovaném oběma houbami, přináší jim to mnoho výhod a je nezbytné pro reprodukci brouků (Bleiker a Six 2007).

I u druhu *Dendroctonus frontalis* (Zimmermann), u kůrovce živícím se na borovici, byl prokázán příznivý vliv vývoje kůrovce zároveň s houbou. Díky tomu se brouci vyvíjejí ve větších velikostech a s vysokou plodností. Spory hub jsou přenášena na *pronotu* samic (Goldhammer et al. 1990).

Ve výzkumu zkoumajícím symbiotický vztah houby *Entomocorticium* sp. B a kůrovce *Dendroctonus brevicomis* (LeConte) bylo dokonce zjištěno, že kůrovci, kteří byli uchováváni bez přítomnosti této houby, nezapočali rojení (Bracewell a Six 2015).

Ne však všechny ophiostomatoidní houby mají vzájemný, podporující se vztah se svými asociovanými kůrovci. Například houba *Ophiostoma minus* (Hedgcock), která se často nachází v larválních galeriích *Dendroctonus frontalis*, je silným antagonistou pro tohoto kůrovce. *Ophiostoma minus* má totiž vzájemný vztah s roztoči. Těží především z toho, že kůrovec zde sehraje roli při dopravě těchto roztočů na svém těle do hostitelského stromu. Samotné larvy kůrovce se jinak při larválním žiru floému, který je kolonizovaný touto houbou snaží vyhnout vytvářením dlouhých tunelů, nicméně nakonec stejně uhynou. Přesný mechanismus antagonismu není znám, nicméně *Ophiostoma minus* produkuje bioaktivní polyfenoly, čímž můžeme vysvětlit, proč se jí larvy *Dendroctonus frontalis* vyhýbají (Hofstetter et al. 2006b).

Další případ velice silného symbiotického vztahu mezi kůrovcem a houbou byl popsán také u kůrovce *Ips pini* (Say) a houby *Ophiostoma ips* (Rumbold) Nannf. Tato houba je přenášena v jamkách na *exoskeletonu* kůrovce. U této houby bylo zjištěno, že má na kůrovce jak pozitivní, tak také negativní vliv. Záleží především na tom, kdy byla houba založena. Pokud je houba zanesena do hostitelského stromu dříve než samotný kůrovec, dochází k redukci náletu samic. Zatímco přítomnost této houby v larválních galeriích zvyšuje vývoj

potomstva. Tato studie naznačuje, že *Ips pini* může využívat těkavých látek emitovaných houbou jako podnětů k vyhodnocení rozsahu kolonizace hostitele stejnými brouky, čímž se vyhne hromadění kůrovců na jednom hostiteli (Kopper et al. 2004).

Stejné chování můžeme pozorovat i u lýkožrouta smrkového, který plně kolonizovaný strom s rozvinutými mycelii hub také nenapadá.

1.1.4 Volatilní těkavé látky uvolňované asociovanými houbami a jejich efekt na chování kůrovce

Symbiotické houby často emitují komplexní směsi různých sloučenin s nízkou molekulovou hmotností s výrazným zápachem/vůní. U těkavých látek vylučovaných houbami je známo, že usnadňují asociaci mezi houbami a hmyzem a působí jako feromony, kairomony a allomony. To, jakým způsobem tyto látky z hub přijímají kůrovci, bohužel nebylo dosud dostatečně prostudováno. Úzká interakce mezi kůrovcem a houbou je pravděpodobně zprostředkována těkavými organickými sloučeninami vycházejícími z houby, které brouky buď přitahují, nebo odpuzují. Kandasamy et al. (2016) se domnívá, že je tedy možné využít tyto sloučeniny k regulaci počtu kůrovců.

Kandasamy et al. (2016) shrnul v review chemické látky různých strukturních typů (alkoholy, alifatické alkoholy, acetáty, aromatické sloučeniny a terpeny) produkované ophiostomatoidními houbami, u nichž bylo prokázáno, že vyvolávají reakce na chování kůrovců různých druhů a fungují jako atraktanty nebo anti-atraktanty. V tomto review byla označena jako atraktivní pro kůrovce *Dendroctonus frontalis* látka isoamyl alkohol, isoamyl acetát, 2-fenylethyl acetát a (E)- β -Caryophyllene emitovaný houbou *Grosmannia penicillata*. Jako anti-atraktivní se pro kůrovce *Dendroctonus frontalis* a *Dendroctonus ponderosae* jevila látka 2-fenylethanol, na lýkožrouta smrkového neměla žádný efekt. Jako další anti-atraktivní se objevila látka 1-Hexanol pro kůrovce *Dendroctonus rufipennis*, na lýkožrouta smrkového působila až repelentně. Acetofenon působil anti-atraktivně na *Dendroctonus brevicomis*, *Dendroctonus pseudotsugae* a *Dendroctonus frontalis*. Geranyl aceton, který produkují houby *E. polonica*, *O. bicolor* a *G. clavigera* působil anti-atraktivně na *Ips subelongatus*.

Na Geranyl aceton dle Mayo et al. (2013) také výrazně reaguje lýkožrout smrkový nebo tesařiči, kteří ho využívají jako prekurzor k tvorbě jejich agregačního feromonu – fuscumolu (Mayo et al. 2013).

Nejnámějším zástupcem alifatických alkoholů je etanol, který je univerzálním atraktantem pro mnoho druhů brouků, ovšem lýkožrout smrkový na něj nereaguje. Z delších

alifatických alkoholů reagují kůrovci především na 1-Hexanol, což je jedna z těkavých látek, kterou produkují zelené listy, též označované jako green leaf volatiles (GLVs). Tato látka působí na lýkožrouta smrkového ve směsi s dalšími látkami jako - (Z)-3-hexen-1-ol a (E)-2-hexen-1-ol repelentně (Zhang et al. 1999).

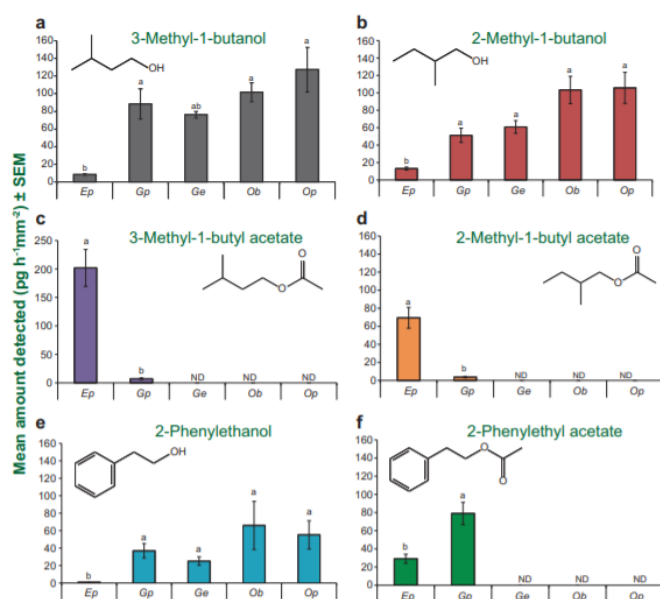
Podle Zhao et al. (2019) dokážou symbiotické houby kůrovce metabolizovat fenoly a terpenoidy z hostitelského stromu. Nejčastěji se jedná o alkoholy, acetáty a terpenoidy. Následně houby produkují těkavé látky, které na kůrovce působí jako jeho agregační feromony.

Nedávno bylo zjištěno, že houby *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhoides* produkují velké množství 2-methyl-3-buten-2-olu, což je jedna ze základních složek pohlavního agregačního feromonu lýkožrouta smrkového (Zhao et al. 2015).

Houby rodu *Endoconidiophora*, *Ophiostoma* a *Grosmannia* produkují také exobrevicomin, endo-brevicomin a (5S,7S)-*trans*-conophthorin, což jsou sloučeniny, která hrají důležitou roli v chemické komunikaci několika druhů kůrovců (Zhao et al. 2019).

Kandasamy et al. (2019) provedli experiment, během něhož sbírali těkavé látky z deseti druhů ophiostomatoidních hub asociovaných s kůrovcem. Tyto houby pěstovali na médiu a zkoumali účinky *de novo* syntetizovaných těkavých látek na kůrovce k určení, zda těkavé látky emitované při pěstování hub v médiu jsou podobné těm, které jsou emitovány za přírodních podmínek. Emisní profily několika hub spojených s lýkožroutem smrkovým nakonec porovnali. Těmito houbami byly: *E. polonica*, *O. bicolor*, *O. piceae*, *G. europhoides* a *G. penicillata*. Nakonec se jim podařilo zjistit, že houby pěstované v laboratorních podmínkách emitují stejné těkavé látky, které by emitovaly za přírodních podmínek.

Jelikož Kandasamy et al. (2019) pozorovali silnou preferenci kůrovců k některým těkavými látkám z určitých hub, odebrali vzorky z prostoru nad každým druhem houby, a hlavní těkavé sloučeniny identifikovali plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií k analýze těkavých profilů hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým. Dále pomocí elektrofyziologického záznamu z jediné sensily na kůrovcových tykadlech určili, které těkavé látky z hub byly vnímány. Nakonec byly směsi syntetických, těkavých látek z hub testovány na broucích v olfaktometru. Výsledky podporují dříve přehlíženou roli těkavých látek při udržování interakce mezi kůrovci a jejich symbiotickými houbami viz (Obr. č. 2).



Obr. č. 2: Hlavní alkoholy a estery emitované asociovanými houbami s lýkožroutem smrkovým (Kandasamy et al. 2019).

Obr. č. 2 zobrazuje, že houba *Endoconidiophora polonica* emitovala vyšší hladiny acetátu esteru a nižší hladiny mateřských alkoholů než jiné druhy. Mezi hlavními sloučeninami, které všechny druhy hub vylučovaly, byly zaznamenány pěti-uhlíkaté alkoholy C5, 3-methyl-1-butanol a 2-methyl-1-butanol, a aromatické alkoholy 2-fenylethanol. Houba *E. polonica* uvolňovala signifikantně nižší množství v porovnání s ostatními houbami. Obr. 2c, 2d zobrazuje, že *E. polonica* emitovala odpovídající estery acetátu, přičemž Obr. č. 2f zobrazuje, že 2-fenylethylacetát dominoval také v houbě *G. penicillata*. Profily těkavých látek z hub dále obsahovaly terpeny. *Endoconidiophora polonica* emitovala směs acyklických monoterpenů a sesquiterpenů, jako jsou citral, geranyl acetát, citronellyl acetát a 2,3-dihydropharnesyl acetát. *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* uvolňovaly vysokou dávku bicyklického sesquiterpenu (E)-β-caryophyllene a caryophyllene oxid. Pomocí single sensillum recording (SSR) byl proveden test na tykadle lýkožrouta smrkového, aby bylo zjištěno, na které z těchto látek nejvíce reaguje jeho tykadlo. U šesti neuronů byla zaznamenána silná odezva na látku 2-fenylethanol s další odezvou na uvolněné těkavé látky z hub zahrnující 2-fenylethyl acetát, 3-methyl-1-butanol, benzyl alkohol, 2-methyl-1-butanol a 1-hexanol. Ukázalo se, že dříve identifikovaná neuronová sensila čichu naladěná na agregační feromonovou složku 2-methyl-3-buten-2-ol (MB) reagovala na strukturálně podobné těkavé látky hub 2-methyl-1-butanol, a méně na několik dalších sloučenin včetně pinocarvonu (Kandasamy et al. 2019).

Elektrofyzilogické výzkumy ukazují, že tento kůrovec dokáže detekovat mnoho z hlavních sloučenin vyskytujících se v houbách a některé jeho neurony se dokonce specializují na těkavé látky z hub. V závislosti na vzájemné úloze hub souvisejících s lýkožroutem smrkovým mohou nově vylíhlí brouci používat těkavé látky jako podněty k detekci zón kůry s vysokou nutriční hodnotou (Six et al. 2011).

Schopnost těkavých látek z hub vyvolat behaviorální reakce u kůrovců znamená, že mohou být užitečné při managementu ohnisek tohoto ničivého kůrovce (Kandasamy et al. 2016).

Kandasamy et al. (2016) tvrdí, že asociované houby mohou produkovat mimo jiné i oxidované monoterpeny. Dále se Kandasamy et al. (2016) domnívá, že pro lýkožrouta smrkového mohou být těkavé látky uvolňující se z hub *E. polonica* užitečné jako atraktanty nebo repelenty a těkavé látky uvolňující se z hub *G. penicillata* a *G. europhioides* obsahující seskviterpeny mohou být insekticidní nebo podporovat růst entomopatogenních nematod. Volatilní těkavé látky uvolňované z hub jsou pravděpodobně syntetizovány *de novo* ve spolupráci s kůrovcem, ale také by mohly být produkovány metabolismem hostitelských rostlinných látek.

Uvádí se, že mnoho rostlinných patogenních hub transformuje terpenové olefiny na okysličené metabolity *in vitro*, jako je tomu u dobře známých patogenů *Botrytis cinerea* (Persoon), *Aspergillus niger* (Tieghem) a *Penicillium digitatum* (Persoon) Sacc. Například u ophiostomatoidní houby *G. clavigera* bylo zjištěno, že transformuje hostitelský derivát monoterpenu limonen na těkavé okysličené metabolity carvon, p-mentha-2,8-dienol, perillyl alkohol a isopiperitenol *in vitro*. Limonen pak tato houba využívá jako zdroj uhlíku pro růst stejně jako další druhy hub (Wang et al. 2014).

Protože se ukázalo, že oxidované monoterpeny experimentálně přitahují parazitoidy kůrovců (Pettersson 2001), tyto houbové přeměny limonenu mohou fungovat jako kairomony pro přirozené nepřátele, a tím negativně ovlivňovat kondici kůrovce.

Tyto látky, u kterých byla po houbové přeměně zaznamenána největší pozornost, jsou identické s feromonovou produkcí kůrovce. Zajímavý je také fakt, že mnoho druhů kvasinek nalezených ve střevě nebo na exoskeletu lýkožrouta smrkového dokážou převést agregační feromonový komponent (-)-cis-verbenol (cV) a (-)-trans-verbenol (tV) na (-)-verbenone. Tento úkaz byl prokázán i u *Ceratocystiopsis ranaculosum*, houby asociované s kůrovcem *Dendroctonus frontalis*. Oxidovaný monoterpen (-)-verbenon inhibuje/potlačuje agregaci kůrovců (Leufven et al. 1984).

1.1.5 Predátoři kůrovců využívají těkavých látek z hub

Bylo prokázáno, že někteří přirození nepřátelé kůrovců dokážou lokalizovat svou kořist prostřednictvím těkavých látek emitovaných symbiotickými houbami spojenými s kůrovci. Jeden takový příklad byl zjištěn u samiček parazitoidních vosiček rodu *Roptrocerus xylophagorum* (Ratzeburg) a *Spathius pallidus* (Ashmead). Tyto vosičky jsou nejběžnějším parazitoidem kůrovce v Severní Americe. Výzkum byl proveden pomocí olfaktometrické eseje lákáním samiček na volatilní látky uvolňované z hub *Ophiostoma ips* a *Ophiostoma minus* inokulovaných do borovice. Samičky byly přitahovány pouze na kůru, která byla kolonizována brouky a obsahovala i trus larev, což naznačuje roli asociovaných hub při poskytování atraktivních stimulů (Sullivan a Berisford 2004).

Další studie ukázala, že speciální parazitoidi, *Heydenia unica* a *Rhopalicus pulchripennis*, kteří se běžně živí pozdními larválními instary kůrovců, využívají těkavých látek emitovaných houbami *Ophiostoma ips*, *Grosmannia clavigera* a *Ophiostoma montium* jako atraktantů. Predátoři a parazitoidi obecně používají hlavně hostitelských feromonů a těkavých látek z rostlin k vyhledání svých hostitelů (Adams a Six 2008).

Jiní parazitoidi kůrovců mohou být přitahováni těkavými látkami asociovaných hub kůrovců. Studie, která byla provedena na lýkožroutovy smrkovém ukázala emisi několika oxidovaných terpenů a dalších těkavých látek, které jsou typicky produkovány asociovanými houbami kůrovců nebo autooxidací pryskyřice stromů. Bylo zjištěno, že syntetická směs 16 okysličených terpenů vyvolává čichové reakce u chalcidních vos, a že je pro tyto vosy v laboratorních biotestech velmi atraktivní (Kandasamy et al. 2016).

1.2 Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*)

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) (Linnaeus, 1758) je lesnicky nejvýznamnější hospodářský škůdce smrkových porostů současnosti. Nejohroženější jsou především smrkové porosty tvořené jím preferovanou dřevinou smrkem ztepilým (*Picea abies*) pěstovaným mimo areál přirozeného rozšíření. Ve většině případů lýkožrout smrkový napadá především oslabené stromy jako např. polomy a vývraty, které mají nižší schopnost odolat náletu kůrovce. V případě pravidelných abiotických změn dochází k výraznému, exponenciálnímu šíření tohoto škůdce, který poté napadá i zdravé stromy či i jiné druhy stromů, což vede k odumírání nejen jednotlivých stromů, ale také velmi rozsáhlých území smrkových porostů (Wermelinger 2004; Kidlmann et al. 2012).

Lýkožrout smrkový je původně montánní druh. Postupem času, kdy se smrk ztepilý začal z horských poloh rozšiřovat do nižších poloh, začal se i lýkožrout smrkový adaptovat k životu v nižších nadmořských výškách. V České republice je v současnosti zastoupen na celém území, na kterém se nachází smrkové porosty. Areál výskytu lýkožrouta smrkového zaujímá značný prostor jak v Evropě, tak i v Asii (Skuhravý 2002).

1.2.1 Morfologie

Lýkožrout smrkový měří od 4,2 – 5,5 mm. Šířka brouka se uvádí kolem 1,9 mm. Čerstvě vylíhlí brouci jsou žluté, zlatavé barvy, která následně hnědne a později tmavne. Tělo dospělého brouka je hnědočerné, lesklé a pokryté množstvím chloupků. Čelo lýkožrouta smrkového je hrboľkované s velkým hrboľem ve středu předního okraje. Z čela vychází žlutavá tykadla zakončená paličkou se zřetelně zprohýbanými švy. Krovky jsou hluboce tečkované, lesklé a zadní část je vyhloubená a matná. Okraj krovek je ozdoben čtyřmi páry zubů, nejmenší je první zub a největší třetí, který je knoflíkovitě zakončen, především u samečků. Mezi samci a samicemi je patrný pohlavní dimorfismus, kdy samice mají větší hustotu chloupků v přední části *pronota* oproti samcům a na čele spíše „kopcovitý“ útvar, zatím co u samce se u báze čela sbíhá a u vrcholu zužuje (Pfeffer 1995; Skuhravý 2002; Kindlmann et al. 2012).

1.2.2 Popis životního cyklu

Vývoj kůrovce probíhá pod kůrou vývratů či polomů smrkových kmenů. Po dokončení vývoje čerstvě vylíhlí brouci opouští strom a hledají vhodné stromy pro napadení a ke spáření se. První na vybraný strom nalétá sameček, který se následně zavrtá pod kůru a začne vyhlodávat snubní komůrku, což trvá cca 2-4 dny. Krátce poté začne produkovat a uvolňovat agregační feromon skládající se z látek (cis-verbenol a 2-methyl-3-buten-2-ol), který začne vábit samičky. Sameček se ve snubní komůrce se samičkami spáří a ty poté začnou hlodat matečné chodby do kůry a do nich následně klást bílá, lesklá vajíčka. Po dokončení celého cyklu se líhne bílý brouk, který poté žlutne a nakonec zhnědne. Poměr pohlaví bývá 1:1. Protože vylíhnutí brouci nejsou ihned schopni dalšího rozmnožování, protože musí pohlavně dozrát, hlodají ještě nepravidelnou chodbu z místa vylíhnutí, a to tzv. „úživný žír“. Po dokončení žíru může brouk opustit strom vývrťovým otvorem v kůře a začít hledat potravu (Pfeffer 1955; Skuhravý 2002; Kindlmann et al. 2012).

1.2.3 Výběr hostitele

1.2.3.1 Atraktivní látky pro kůrovce

Role těkavých podnětů ze stresovaných hostitelských stromů pro pionýrské brouky hledající hostitele zůstává neobjasněná. Wood (1972) a Byers (1989) předpokládají, že brouci přistávají náhodně a vybírají si hostitele na základě chemických stimulů působících na krátké vzdálenosti. Reagují na kairomony a feromony.

Podle Schiebe et al. (2011) kůrovci využívají při vyhledávání vhodného hostitelského stromu kombinaci pozitivních (atraktivních) a negativních (anti-atraktivních či repelentních) signálů pomocí čichových orgánů. Atraktivní signály zahrnují agregační feromony a těkavé látky uvolňované z hostitelského stromu, zatím co anti-atraktivní signály zahrnují feromony ne-hostitelských, listnatých dřevin a těkavé látky, které jsou obsažené v chemické obraně stromu (Zhang a Schlyter 2004).

Navigace stejných druhů kůrovců k vhodným hostitelům je poté vedena feromony a může být dále podpořena těkavými látkami uvolněnými symbiotickými houbami (Kandasamy et al. 2016).

Klíčovou sloučeninou pro počáteční hromadný útok a výrobu semiochemikálií je α -pinen. Během napadení kůrovcem je α -pinen stále častěji emitován z pryskyřičných kanálek a může přitahovat více brouků v synergii s nízkým množstvím feromonu (Schiebe et al. 2019).

Vhodného hostitele pro rozmnožování vyhledává lýkožrout smrkový také pomocí stromem uvolňovaných atraktantů, především monoterpenů. Monoterpeny slouží také jako prekurzory v syntéze sekundárních atraktantů, pohlavních agregačních feromonů. Pro lýkožrouta smrkového je podstatný α -pinen, který je prekurzorem (S)-cis-verbenolu.

Po úspěšném výběru hostitele na strom první nalétá samec, takzvaný pionýrský samec. Zavrtá se do kůry a vyhlodá snubní komůrku. Závrtím kůrovce do kůry strom spustí obranné mechanismy a začne produkovat pryskyřici. Ta obsahuje terpeny, které jsou pro kůrovce toxické. Lýkožrout smrkový je schopný pomocí prekurzorů, monoterpenů, hydroxylovat monoterpeny v pryskyřici na pineny. Jedním z těchto pinenů je i cV, komponent agregačního feromonu kůrovce. Druhým komponentem agregačního feromonu lýkožrouta smrkového je MB. Tyto dvě látky cV a MB tvoří dohromady agregační feromon lýkožrouta smrkového, který je uvolňován při vyhlodávání snubní komůrky kůrovcem a přitahuje obě pohlaví. Spolu s MB je uvolňován i ipsdienol (Id), který zvyšuje účinek MB a cV. Poté, co se samci spáří se samičkami, ve střevech samců se začne tvořit ipsenol (Ie). Po úplném obsazení hostitelského stromu dochází (lýkožroutem nebo jeho symbiotickými organismy) k oxidaci cV na keton

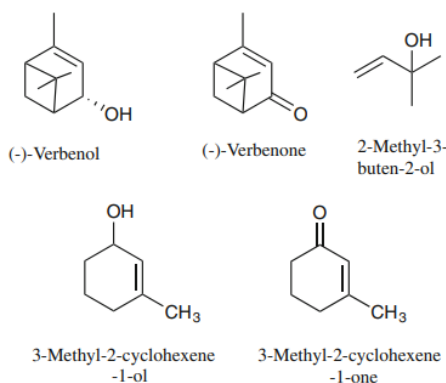
verbenone (Vn), který slouží jako tzv. „stop feromon“, který další brouky přesměruje na jiný, ještě neobsazený strom (Schlyter et al. 1987; Jakuš a Blaženc 2015).

Pionýrský kůrovec lýkožrouta smrkového se vyvinul tak, aby využíval tok pryskyřice hostitelských stromů jako kairomony v hostitelské lokalitě, a syntetizoval semiochemikálie zpočátku k detoxikaci pryskyřice. Ve střevech samců bylo nalezeno devět monoterpenových alkoholů, včetně cV a MB, a nízký podíl Id, který zvyšuje atraktivitu cV a MB. Vn a Ie jsou anti-atrakční feromony, které hrají důležitou roli při úpravě hustoty napadení a hustoty hmyzu pod kůrou (Sun et al. 2006).

Bakke (1976) uvádí, že střeva kůrovce obsahují při zahájení útoku stejné množství tV a cV; Id je také přítomen u samců při hlodání svatební komory a Ie se objevuje ve střevech samců poté, co samice zahájí ovipozici. Izomery verbenolu jsou samci produkovány, až když jsou vystaveni oleoresinu nebo α -pinenu.

Birgersson et al. (1984) detekovali ipsenol a ipsdienol u samců až po náletu samic. Během výzkumu různých fází útoku kůrovce identifikovali v jeho střevech kromě Vn, MB, cV, tV, Id a Ie také myrtenol (Mt), trans-myrtenol (tM) a 2-fenyletanol. Následující studie potvrdily, že Id a Ie byl nalezen pouze u spářených samců.

Schlyter et al. (1987) studovali chování lýkožrouta smrkového v různých útočných fázích a zjistili, že přítomnost samic snižuje produkci feromonů u samců, což snižuje přitažlivost samic, ale nikoli dalších samců.



Obr. č. 3: Feromony lýkožrouta smrkového (Kandasamy et al. 2016).

1.2.3.2 Ne-atraktivní látky pro kůrovce

Jako repelentní látky působí na kůrovce vysoké množství monoterpenů jako limonen, 3-carenen či 4-allylanisol, těkavé látky ze zelených listů (GLVs), které se vyskytují v rostlinách, listnatých keřích a stromech a trans-conophthorin obsažený v kůře stromů (Zhang et al. 2003).

V posledních letech bylo zjištěno, že těkavé látky z kůry ne-hostitelského stromu a zelených listů inhibují reakci lýkožrouta smrkového na jeho agregační feromony. Byers et al. (1998) zjistili, že těkavé látky ze zelených listů (GLV) z břízy, (Z) -3-hexen-1-ol a 1-hexanol snižují přitažlivost lýkožrouta smrkového a lýkožrouta lesklého k jejich agregačním feromonům.

Zhang et al. (1999a) analyzovali látky z ne-hostitelského stromu (GLV) z *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Populus tremula* a *Sambucus nigra* a zjistili, že tykadla lýkožrouta smrkového silně reagují na (Z) -3-hexen-1-ol, 1-hexanol a (E) -2-hexen-1-ol. Směs těchto tří alkoholů GLV plus Vn snižuje odchyt lýkožrouta smrkového v lapačích s návnadou na feromony o 95 %.

Zhang et al. (2003) dále ve svém výzkumu objevili, že kombinace trans-conophthorinu, 3-oktanolu, 1-okten-3-olu a Vn významně snižují přitažlivost k agregačním feromonům. Odchyty v pastích lze u jednotlivých jedinců snížit o 50-70 % pomocí těkavých látek z ne-hostitelských stromů.

Ve výzkumu Schlyter et al. (1987) bylo zjištěno, že vysoké koncentrace agregačních feromonů, zejména cV, snižují agregaci na kmenech hostitelských stromů.

Bakke (1991) jako jeden z prvních ve svém výzkumu zjistil, že verbenone je anti-atraktivní pro lýkožrouta smrkového. Původně byl verbenone považován za feromon a předpokládalo se, že je produkován kůrovci. Později se potvrdilo, že jeho produkce je závislá na mikrobiální degradaci hostitelské tkáně a oxidaci α -pinenu.

Verbenone působí jako anti-atraktivní při různých dávkách samostatně nebo v synergii s těkavými látkami z ne-hostitelských stromů a působí proti atraktivním účinkům agregačních feromonů (Zhang et al. 2003).

Podobně fungují oxidované monoterpeny jako je 1,8-cineol, uvolňovaný ze silně napadených stromů, který je také anti-atraktivní (Andersson et al. 2010).

Dokonce bylo zjištěno, že sloučenina 1,8-cineol je nejlepším prediktorem rezistentních stromů (Schiebe et al. 2012).

U několika oxidovaných terpenů (camphor, pinocamphone a terpinen-4-ol) bylo prokázáno, že přitahují parazitoidy kůrovce (Kandasamy et al. 2016).

Jako anti-atraktivní je považován také ipsenol (Bakke et al. 1970, 1977; Schlyter et al. 1987; Sun et al. 2006).

1.2.4 Obrana hostitele

Schopnost jehličnanů reagovat na různé stresory produkcí vysokého množství obranných chemikálií pravděpodobně přispívá k jejich dlouhému přežití. Smrk ztepilý spoléhá na konstitutivní i indukovanou obranu, aby odrazil napadení hmyzem a omezil šíření napadení houbových patogenů. První obrannou linií u smrku ztepilého je kůra, kde obranné chemikálie zabraňují invazi svými fyzikálními vlastnostmi a chemickou toxicitou. Jakmile strom rozpozná poranění nebo infekci, aktivuje se indukovaná obrana, včetně tvorby pryskyřice a buněk polyfenolického parenchymu (Netherer et al. (2021).

Smrk ztepilý se při obraně proti kůrovcům a patogenům velmi spoléhá na terpeny a fenoly. Terpeny, skládající se hlavně z monoterpenů, seskviterpenů a diterpenů, zahrnují sloučeniny, které jsou toxické pro hmyz a mikroorganismy (z monoterpenů je to třeba limonen a 3-careen). Semikrystalické kyseliny diterpenové mohou polymerovat a vytvářet bariéry, které utěsňují rány, zachycují útočný hmyz a inhibují růst houbových patogenů (Kusumoto et. al. 2014).

Stromy mohou zvýšit koncentrace terpenů až stokrát, což může v závislosti na dávce inhibovat kolonizaci kůrovce smrkového a související houby (Zhao et al. 2011b).

Terpeny pracují synergicky, aby odradily útočící hmyz a zabíjely patogeny. Především méně náchylné stromy vykazují silnější terpenové reakce po infekci (Schiebe et al. 2012).

Podobná obranná odpověď, tedy zvýšení terpenů, bylo zaznamenáno i ve výzkumu Axelsson et al. (2020), kteří naočkovali stromy smrku ztepilého jeho houbovými patogeny *Endoconidiophora polonica* a *Heterobasidion parviporum*. Též bylo zjištěno, že rezistence v genotypch smrku Sitka (*Picea sitchensis*) je spojena s látkami (+) - 3-careen a terpinolene.

Obranné sloučeniny v kůře a těkavé organické sloučeniny (VOC), jako jsou monoterpenové uhlovodíky a oxidované monoterpeny, jakož i feromonové složky, jsou důležitými chuťovými a čichovými signály pro hledání hostitele a napadení kůrovců. Symbiotické houby hrají klíčovou roli při detoxikaci sloučenin (terpenů a fenolů) a přitahování brouků ke stromu (Netherer et al. 2021).

U zdravých stromů jsou oxidované monoterpeny zastoupeny pouze ve stopovém množství. Po napadení kůrovcem a naočkování houbami se však koncentrace oxidovaných monoterpenů postupně zvyšuje skrz detoxikaci monoterpenových uhlovodíků ve střevě brouka a symbiotickými houbami (Kandasamy et al. 2016; Schiebe et al. 2019).

Změny v chemii smrku ztepilého, včetně zvýšení oxidovaných monoterpenových uhlovodíků, jsou jasně spojeny s biotickým stresem způsobeným útokem kůrovce, inokulací

hub nebo aktivací indukované obrany stromů ošetřených methyl jasmonátem (MeJa) (Netherer et al. 2021).

Oxidované monoterpeny v kůře jehličnanů jsou ekologicky významné jako feromonové složky mnoha druhů kůrovců (Schlyter et al. 1987).

V jednom z experimentů došlo po naočkování stromů smrku ztepilého dvěma druhy jeho houbových patogenů *Endoconidiophora polonica* a *Heterobasidion parviporum* ke zvýšení monoterpenů, sesquiterpenů a diterpenů ve stromech. Po naočkování *H. parviporum* také došlo ke zvýšení diterpenu geranylinalool. Je zajímavé, že genetické komponenty hrají u smrku ztepilého důležitou roli v odolnosti vůči *Endoconidiophora polonica* (Skrøppa et al. 2015).

U smrku ztepilého bylo pozorováno, že po inokulaci houbovými patogeny *Endoconidiophora polonica* a *Heterobasidion parviporum* bylo v kůře zvýšené množství látky (+) – 3-carene, což koreluje s tím, že došlo ke snížení počtu přeživších larev lýkohuba smrkového *Dendroctonus micans* a též vedlo v růstu houby *Endoconidiophora polonica*. (+) – 3-carene je charakteristický monoterpen, který může hrát velkou roli v rezistenci jehličnanů proti hmyzu a patogenům (Axelsson et al. 2020).

V kůře rezistentnějších genotypů bylo po ošetření methyl jasmonátem detekováno vyšší množství diterpenů, což naznačuje, že diterpeny také mohou ovlivňovat rezistenci vůči patogenům (Axelsson et al. 2020).

1.3 Výskyt lýkožrouta smrkového a kalamitní stav v ČR

To, že lýkožrout smrkový je významným hospodářským škůdcem dokazují i hodnoty uvedené ve Zprávě o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky (2019). Pro představu, jak rychlý je exponenciální růst napadení smrkových porostů v České republice uvádím zde.

V lesích ČR bylo v roce 2019 vytěženo celkem 32,58 mil. m³ surového dříví (2018 – 25,69 mil. m³), z toho 31,31 mil. m³ jehličnatého dříví (2018 – 24,21 mil. m³).

Rok 2019 lze označit celkově jako období opět velice nepříznivé. Jako v předchozích letech, výrazné objemy nahodilých těžeb (95 % těžeb celkových) byly způsobeny biotickými činiteli. U biotických škodlivých činitelů bylo opět zaznamenáno další výrazné zhoršení, neboť vzniklé poškození meziročně narostlo o přibližně 75 %. Především se jedná o poškození způsobené dlouhodobě přemnoženým podkorním hmyzem, obzvláště na smrku (a také na borovici). Nejhorší situace s kůrovcem na smrku panovala v loňském roce v jižní polovině republiky. Kůrovcová kalamita se šířila ze severní Moravy dále na západ do českých krajů a v důsledku nahodilých těžeb vznikaly i v tomto roce rozsáhlé holiny.

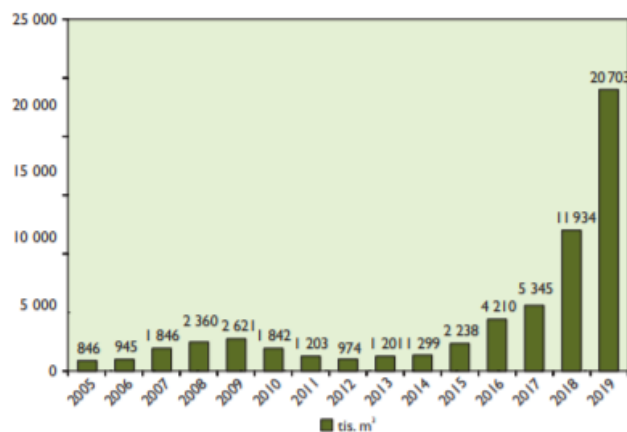
V roce 2019 bylo v Česku evidováno 20,7 mil. m³ vytěženého smrkového kůrovcového dříví, což představuje nárůst o více než 70 % ve srovnání s rokem předchozím (2018 – 12 mil. m³; 2017 – 5,34 mil. m³). Jedná se výlučně o dříví napadené lýkožroutem smrkovým *Ips typographus*, který je obvykle doprovázen lýkožroutem lesklým *Pityogenes chalcographus*. V oblasti severní a střední Moravy a Slezska, ale i ve středních Čechách pak lýkožroutem severským *Ips duplicatus*.

Z celkového objemu kůrovcového dříví za rok 2019 tvořily cca 1,5 % lapáky, tj. přibližně 360 tis. m³ (2018 – 400 tis. m³; 2017 – 660 tis. m³). Dalších cca 5–10 mil. m³ kůrovcové hmoty mimo evidenci představují nezpracované souše a kůrovcové stromy napadené lýkožrouty v roce 2019.

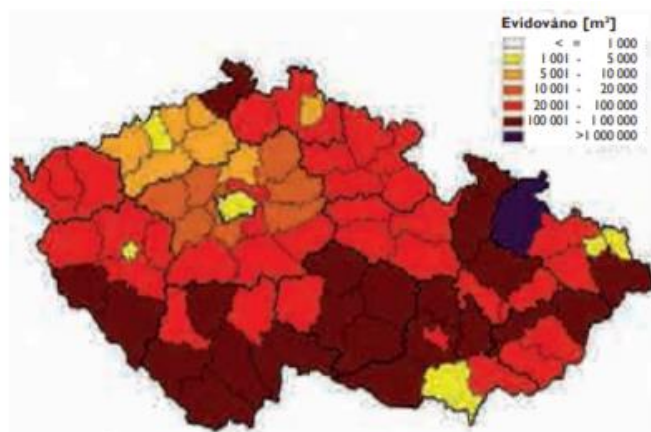
Na celém území Česka se kůrovci na smrku vyskytovali v roce 2019 v kalamitním stavu. Evidované kůrovcové dříví reprezentovalo v průměru alarmujících cca 15,9 m³/ha smrkových porostů, takže se jedná o cca 80x překročení hodnoty odpovídající základnímu stavu 0,20 m³/ha podle vyhlášky MZe č. 101/1996 Sb. ve znění vyhlášky č. 236/2000 Sb. a vyhlášky č. 76/2018 Sb. Celková výše vykázaného kůrovcového dříví v roce 2019 představuje rekordní hodnotu, které v Česku nebylo dosud dosaženo.

V roce 2019 byla mnohem více zasažena jižní část Česka, kde jen v krajích Vysočina, Jihočeském a Jihomoravském bylo vytěženo společně cca 10,46 mil. m³ kůrovcového dříví, tj. více než ve zbytku republiky. V oblasti severní Moravy a Slezska, kde byla situace v předchozích letech nejhorší se kalamita postupně „uklidňuje“ v souvislosti s úbytkem atraktivních smrkových porostů.

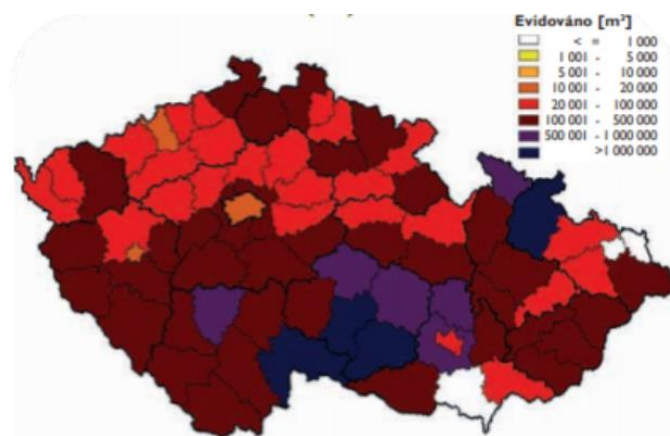
Z hlediska vytěžených objemů smrkového kůrovcového dříví za rok 2019 je pořadí sedmi nejvíce zasažených krajů následující: Vysočina (4,82 mil. m³), Jihočeský (3,39 mil. m³), Jihomoravský (2,25 mil. m³), Středočeský (1,70 mil. m³), Olomoucký (1,62 mil. m³), Moravskoslezský (1,57 mil. m³), Plzeňský (1,51 mil. m³) (Zpráva o stavu lesa a LH v ČR 2019).



Obr. č. 4: Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v letech 2005-2019 (tis. m³). Zdroj: Zpráva o stavu lesa a LH v ČR 2019.



Obr. č. 5: Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v roce 2018 (m³). Zdroj: Zpráva o stavu lesa a LH v ČR 2018.



Obr. č. 6: Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v roce 2019 (m³). Zdroj: Zpráva o stavu lesa a LH v ČR 2019.

1.4 Alternativní metody monitoringu a kontroly populace

I přes veškeré snahy včas vyhledávat a odstraňovat atraktivní dřevo pro kůrovce jako jsou polomy, vývraty, čerstvě vytěžené stromy ponechané na skladech nebo těžební odpad co nejrychleji vyvézt z porostu, umístování obranných zařízení a využívání ochranných prostředků a různých insekticidů na ochranu zdravých stromů, stále dochází k masivnímu napadení především jehličnatých porostů kůrovci. Rychlému odstranění velkého počtu napadených stromů někdy brání špatný přístup do odlehlých či chráněných oblastí nebo ekonomická a environmentální omezení, což samozřejmě vede k velkým ekonomickým ztrátám.

V minulosti se často k omezení útoků kůrovců na zdravé stromy využívaly pasti zvané lapáky, které měly úspěch. Pokácené nebo zdravé stojící stromy byly naočkovány feromony nebo feromony a insekticidy, aby došlo k tzv. odvrácení brouků a ti nenapadli zdravé stromy. Nevýhodou je, že pasti musí být z lesa včas odstraněny, aby se předešlo riziku rozšíření kůrovců ze zamořených stromů do okolních ne-navnaděných stromů, které by mohlo rychle vést k propuknutí kalamity. Pasti ošetřené insekticidy se stále používají i v současnosti pro napadení v malém měřítku, protože poskytují dostatek času na odstranění bez dalšího rizika zamoření. Především se ale používají k monitoringu (Modlinger et al. 2015).

Management populací kůrovce lze také provádět pomocí feromonů a dalších semiochemikálií, což je „zelenou“ alternativou k používání běžně, komerčně dostupných syntetických insekticidů. Semiochemikálie mohou být také používány k monitorování úrovně populace kůrovců a někdy k zachycení brouků, aby jejich populace zůstala pod prahovou hodnotou.

Kromě lapáků je další často využívanou metodou odchyt kůrovců do lapačů. Odchyt lýkožrouta smrkového do feromonových lapačů spočívá ve využití sekundárních atraktantů, tedy jeho pohlavních látek. Směs těchto látek se aplikuje na různá média, většinou se jedná o buničinu, čímž je dosaženo pozvolného odpařování. Připravený feromonový odparník je umístěn do tzv. lapacího zařízení, tedy feromonového lapače. Dospělci kůrovců jsou k těmto lapačům lákáni feromonem uvolňujícím se z odparníku. Brouci buď do těchto lapačů narážejí a propadávají do přidělané nádoby, tyto lapače se označují jako nárazové, nebo přistávají na povrch lapače a prolézají dovnitř, kde padají do přidělané nádobky. Tyto lapače se označují jako přistávací. U nás jsou nejčastěji používány nárazové feromonové lapače štěrbinového typu Theysohn a lapače křížového typu Ecotrap. Lapače se umísťují při okrajích smrkových porostů nebo do porostních mezer. Vzdálenost od nejbližšího stojícího stromu musí být min.

10-25 m a také by neměly být zakryty buření. Vzdálenost mezi jednotlivými lapači se pohybuje mezi 15-20 m a samotný lapač je umístěn ve výšce 1,5 m od země (Drong 2019).

Jakuš a Šimko (2000) se ve svém experimentu pokusili využít existujících komerčních odparníků se sníženou rychlostí uvolňování k odchytu více samců do feromonových lapačů. Zjistili však, že zvýšení počtu samců v lapači nelze dosáhnout kombinací standardních komerčních feromonů a komerčních feromonů se sníženou rychlostí uvolňování. To vede k poklesu odchytu samic i celkového odchytu. Jediným způsobem, jak dosáhnout vyváženého poměru pohlaví je příprava speciálních feromonových směsí s různými úrovněmi uvolňování cV a MB, které ve svém článku dobře popsal Schlyter et al. (1987). Zvýšením rychlosti uvolňování cV s konstantním uvolňováním MB zvýšilo počet odchycených brouků.

Jakuš a Šimko (2000) tedy ze svých výsledků usuzují, že zvýšení odchytu samců ve feromonových lapačích je možné použitím kombinace feromonových lapačů, kde některé mají feromony s vyšším uvolňováním cV a jiné mají feromony s nižším uvolňováním cV.

Stejný experiment zkusili Jakuš a Blaženec (2002). Ve svém experimentu také testovali možnost zvýšení efektivního odchytu samců lýkožrouta smrkového do feromonových, bariérových lapačů a do jednotlivých lapačů bez feromonu. Do lapačů zavěsili feromonové odparníky obsahující různé dávky látky cis-verbenol ve feromonové směsi. Výsledky ukázaly, že zvýšený odchyt samců kůrovce ve feromonových lapačích byl způsoben použitím kombinace feromonových lapačů v závislosti na dávce uvolňování cV. Ať už vysoké dávky nebo nízké dávky, což potvrdilo tvrzení Jakuš a Šimko (2000).

Proto Jakuš a Blaženec (2002) tvrdí, že pro zajištění správné funkce feromonových lapačů je nutné, aby lapače obsahovaly feromonové odparníky, a že klíčovou složkou odparníku je cis-verbenol.

Nakládal et al. (2010), kteří ve svém výzkumu zkoumali účinnost dvou typů odparníků, Ecolure classic a Ecolure tubus poukázali na to, že i vzhled, resp. balení odparníků je velice důležité pro správné uvolňování účinné látky a tím přitahování kůrovce.

Na druhou stranu Zahradník et al. (2014) testoval účinnost komerčně dostupných odparníků pro odchyt lýkožrouta smrkového. Jako jedny z nejúčinnějších odparníků se v experimentu jevily Pheagr IT a IT Ecolure, IT Ecolure Mega a FeSex Typo. Jako nevhodné pro odchyt lýkožrouta smrkového se ukázaly odparníky PCHIT Etokap a PCIT Ecolure. Nicméně každý odparník má trochu jiné účinky, a proto je třeba volit odparníky podle účelu použití (monitoring, odchyt, co nejdélejší výdrž bez výměny atd.).

Duelli et al. (1997) ve svém článku dokonce tvrdí, že použití feromonových lapačů může být vysoce účinné. Ve svém výzkumu s označováním čerstvě vylíhlých brouků zjistili, že i za

bezvětrí a bez potenciálních hostitelských stromů v okolí lze pomocí feromonových lapačů lokálně eliminovat asi jednu třetinu (35,4 %) čerstvě vylíhlých brouků v kalamitní oblasti.

Na což reagoval Nakládal et al. (2010), kteří ve svém článku zmiňují, že při použití feromonových lapačů v místě s vysokou hustotou kůrovců může být zachyceno pouze 3–10 % populace kůrovce.

Zhang et al. (2003) poukázal na to, že účinnost odchyty kůrovců do některých lapačů může být snížena v důsledku obsahu mrtvých těl kůrovce v lapači, ze kterých se odpařují 1-Hexanol a verbenone, typické anti-atraktivanty lýkožrouta smrkového.

V managementu se dále využívají strategie přitažlivosti (pull) a zastrasování (push). Strategie tahání využívá stimuly, jako jsou agregační feromony, těkavé látky hostitele nebo vizuální podněty, které jsou buď prezentovány samostatně, anebo kombinovány v konkrétních kombinacích. Tato metoda může být užitečná při hromadném odchyty kůrovců anebo sledování místních populací kůrovců (Bakke 1991).

Nevýhodou tahové (pull) strategie je potenciálně možné propuknutí kalamity a také náhodné zachycení užitečných přirozených nepřátel, kteří jsou přitahováni feromony kůrovců. Naopak strategie tlaku (push) využívá podněty, které odpuzují brouky a odrazují je od útoku na potenciální hostitelské stromy nebo od páření se. Odrazující sloučeniny (anti-atraktivní feromon, verbenon) a těkavé látky, které nejsou uvolňovány hostitelskými stromy (1-hexanol, (Z) -3-hexen-1-ol, (E) -2-hexen-1-ol, trans-conophthorin, 3-oktanol a 1-okten-3-ol) byly testovány v polních experimentech ke stanovení jejich účinnosti (Zhang et al. 1999).

Při pokusu ve smrkových porostech ve Švédsku a na Slovensku byla použita kombinace verbenonu a ne-hostitelských těkavých látek. Ukázalo se, že v takto ošetřených lokalitách tato kombinace zamezila útoku lýkožrouta smrkového na smrkové porosty (Schiebe et al. 2011).

Nicméně strategii (push) nelze použít jako samostatnou metodu vzhledem k tomu, že populace odpuzovaného brouka by mohla být odkloněna do nechráněných přilehlých oblastí. Proto musí být kombinován s jinými metodami dlouhodobého řízení. Též lze využít kombinace push a pull strategie, která byla úspěšně testována proti kůrovci *Dendroctonus ponderosae* a *Ips paraconfusus* (Cook et al. 2006).

Napadení kůrovcem lze také zvládnout využitím těkavých látek uvolňovaných houbami spojenými s kůrovcem. V článku Kandasamy et al. (2016) bylo identifikováno několik organických sloučenin, které by mohly zprostředkovat chování kůrovců a které by mohly být zkoumány pro kontrolu kůrovce.

Kandasamy et al. (2016) uvádí, že volatilní těkavé látky uvolňované z hub mohou být obzvláště užitečné v push-pull strategiích, kde mohou zvyšovat účinky jiných atraktivantů nebo

repellentů. Například pro zvýšení atraktivity u *Dendroctonus frontalis* stačí použít isoamyl acetát a fenylethyl acetát v kombinaci s feromonem. Naopak ke zvýšení účinnosti anti-atraktivity u různých druhů kůrovců na borovici lze použít přírodních těkavých látek produkovaných houbou *Ophiostoma ips*. Tato houba také produkuje acetofenon, u kterého bylo prokázáno, že působí jako silný repelent pro druhy *Dendroctonus*. Pro lýkožrouta smrkového mohou být užitečným atraktantem nebo anti-atraktantem látky isoamyl acetát a 2-fenylethanol, což jsou těkavé látky pocházející z jeho asociované houby *Endoconidiophora polonica*. Houby *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* zase produkují těkavé látky, které obsahují seskviterpeny jako (E)- β -karyofylen, který může být insekticidní nebo podporovat růst entomopatogenních hlístic. Profil těkavých látek produkovaných houbou *L. abietinum* zase obsahuje těkavé látky jako alifatické alkoholy, které přitahují dravé hlístice asociované s *Dendroctonus rufipennis*. Proto ji lze použít za tímto účelem.

Stromy, které jsou už napadené, uvolňují do ovzduší těkavé látky z hub, které odpuzují nově příchozí brouky. Ve stejnou dobu tyto těkavé látky v součinnosti s oxidovanými terpeny mohou sloužit jako kairomony pro přirozené nepřátele. U několika oxidovaných terpenů jako je camphor, pinocamphone a terpinen-4-ol bylo prokázáno, že přitahují parazitoidy kůrovců (Pettersson 2001; Pettersson a Boland 2003).

Kandasamy et al. (2016) se domnívají, že právě odparníky s těkavými látkami z hub a oxidované monoterpeny by mohly být použity k odpuzování brouků od potenciálně atraktivní oblasti a současně k přitahování predátorů a parazitoidů kůrovce do napadené oblasti. Rozmanitost těkavých sloučenin emitovaných houbami spojenými s kůrovcem má velký potenciál pro vývoj nových semiochemických kontrolních opatření pro tento hmyz. Další výzkumy zahrnující identifikaci těkavých látek a jejich vliv na chování kůrovců a jejich přirozené nepřátele poskytnou poznatky, které by mohly být využity k ochraně jehličnatých lesů. V současné době je však použití semiochemikálií pro management kůrovce v přírodních lesích omezeno mírou, v jaké by musely být použity. Na druhou stranu na malých jehličnatých plochách mohou být tyto techniky účinné a logisticky i ekonomicky možné. Na malých plochách by dokonce mohly být využity buněčné kultury hub jako návnady v pasti pro přilákání kůrovců.

Zajímavou otázkou si kladli Andersson et al. (2009). Jelikož jsou kůrovci schopni vnímat některé těkavé sloučeniny v nanogramech, zda by bylo množství těkavých látek emitovaných z houbové buněčné kultury dostatečné pro přilákání kůrovců do pastí obsahujících tuto houbu. V případě použití houbových kultur by bylo třeba vzít v úvahu také další faktory, jako např. že těkavé látky z kultur hub mohou být proměnlivé. Těkavé látky uvolněné z hub se liší s

dostupností živin. Jakmile je růstové médium vyčerpáno, těkavé látky jsou emitovány ve velice malém množství. Též existuje riziko zavlečení patogenů do přirozených lesů. Použití potenciálních patogenních hub může být také regulováno zákonem.

Těkavé látky z hub dle Kandasamy et al. (2019) mohou být použity jako čisté látky s atraktivní nebo odpudivou aktivitou a mohou být použity ve feromonových lapačích v kombinaci se známými komerčními produkty pro hubení kůrovců.

Vzhledem k tomu, že ambrosiový brouci jsou fylogeneticky úzce spjati s kůrovci, podobná strategie by se také mohla ukázat jako účinná při kontrole kůrovců. Je však třeba nejprve vyhodnotit účinnost, s jakou mohou být kůrovci odchyceni v terénu pomocí syntetických směsí houbových těkavých látek spolu s dalšími známými atraktanty nebo repelenty (Hulcr et al. 2011).

Monitorování těkavých látek by mohlo být zvláště užitečné při prevenci zavlečení kůrovců a s nimi spojených hub do nových oblastí. Monitorování těkavých látek v lesních ekosystémech může také poskytnout metodu pro včasné odhalení nových invazí kůrovce, které by mohly vést k včasnému odhalení nových druhů škůdců dřívě, než se usadí (Kandasamy et al. 2016).

- **Metodika**

V roce 2020 byla testována směs nejatraktivnějších sloučenin pocházejících z hub *Grosmannia europhoides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica* dle článku Kandasamy et al. (2019) v uměle vyrobených odparnících ve třech dávkách rychlosti uvolňování, a to buď v kombinaci s feromonem lýkožrouta smrkového, anebo jednotlivě. Design odparníků byl navržen s koeficientem odparu 0,1 mg/den, 1 mg/den a 10 mg/den. Gravimetrickou analýzou byl pro každý koeficient odparu vybrán nejvhodnější design odparníku a odparníky byly připraveny pro navržený počet opakování.

Samotný experiment probíhal na jaře roku 2020 na holině s čerstvou porostní smrkovou stěnou s vysokým výskytem lýkožrouta smrkového. Na této holině byly instalovány feromonové lapače s určenou kombinací odparníků, a to buď samostatně, nebo v kombinaci s feromonem. Referenčním neboli kontrolním lapačem byl lapač obsahující pouze samotný feromon a také prázdný lapač. Návnady byly v lapačích randomizovány podle schématu, který měl vyloučit poziční efekt. Odchycení brouci byly následně v laboratoři spočítány a na základě statistické analýzy byla určena efektivita jednotlivých odparníků. Na konci experimentu byly odparníky extrahovány do rozpouštědla a kvantita zbývajících složek směsi v odparníku byla detekována pomocí plynové chromatografie, čímž jsme získali koeficient odparu jednotlivých složek.

Plynová chromatografie GC

Plynovou chromatografií lze označit jako proces, který umožňuje rozdělení směsi na jednotlivé složky a následně identifikaci u látek do bodu varu 400 °C. Samotný chromatograf je složen z několika částí zahrnující zdroj nosného plynu (tlaková láhev), čistící zařízení, regulační systém, dávkovač, kolony, stacionární fáze, náplně kolony, detektor, vyhodnocovací zařízení a termostat. Nejčastěji používaným nosným plynem je vodík, helium, dusík a argon. Základem je rozdělení směsi do dvou fází – stacionární a mobilní. Mobilní fáze je nosný plyn, stacionární fáze je umístěna v koloně. Kolona je náplňová nebo kapilární.

Během samotného procesu je analyzovaná směs vstříknuta do injektoru a dochází k jejímu zplynění. Vzniklý plyn je pomocí mobilní fáze unášen do chromatografické kolony, kde vlivem fyzikálně-chemických dějů a teploty dochází k rozdělení jednotlivých složek směsi. Směsi jsou pak různou rychlostí unášeny do detektoru, který je identifikuje. Výsledkem je chromatogram neboli celkový iontový tok, kde je každá látka zaznamenána jako pík (Klouta 2013).

Hmotnostní spektrometrie MS

Hmotnostní spektrometrie je analyticko-chemická metoda používaná ke stanovení hmotnosti částic anebo určení složení směsi na základě separace iontů a jejich rozlišením podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Základní části hmotnostního spektrometru jsou zdroj iontů, hmotnostní analyzátor a detektor. Měření doby průletu jednotlivých iontů od zdroje k detektoru je měřeno spektrometrem. Po vložení vzorku do přístroje dojde k jeho ionizaci pomocí iontového zdroje, ionty se v hmotnostním analyzátoru oddělí podle poměru m/z a následně putují k detektoru. Těžší ionty mají pomalejší rychlost a doba jejich průletu je delší. Celý proces probíhá ve vakuu. Pro komplexní analýzu plyných, popřípadě kapalných směsí se využívá plynový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) (Klouda 2013).

1.5 Metodika práce v laboratoři

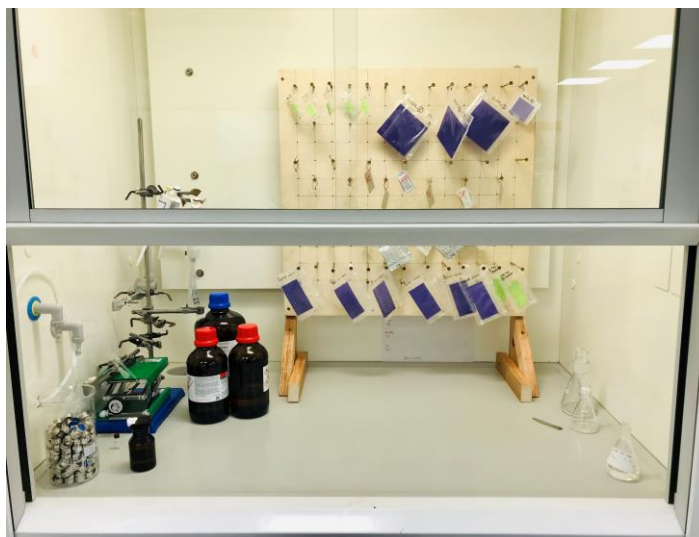
1.5.1 Vývoj odparníků obsahující mix sloučenin z hub

Odparníky se směsí těkavých látek původem z hub, která byla v Kandasamy et al. (2019) vyhodnocena jako nejvíce atraktivní v testech na krátkou vzdálenost při vysokém zředění viz (Obr. 1f), obsahovaly 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethanol, 2-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethyl acetát, všechny ve stejném objemovém poměru, 1:1:1:1:1:1. Z této směsi látek byly následně vytvořeny odparníky ve třech verzích, z toho každý s jiným koeficientem odparu (k.o.). Námi požadovaný koeficient odparu byl stanoven na 0,1 mg/den pro nízkou dávku, 1 mg/den pro střední dávku a 10 mg/den pro vysokou dávku. Pro každý požadovaný k.o. bylo v laboratoři vytvořeno několik variant designů, např. pytlíčky zatavené do plastové a aluminiové fólie s otvory o daném průměru nebo bez, skleněné vialky či plastové Kartelovy lahvičky s otvorem ve víčku či bez. Takto připravené odparníky byly uchovávány za konstantních podmínek 25 °C v digestoři. Koeficienty odparu jednotlivých variant byly za laboratorních podmínek zjištěny gravimetrickou analýzou, kdy jednotlivé odparníky byly váženy třikrát v týdnu po dobu cca. 20 dní ve známých časových intervalech a úbytek váhy byl zaznamenáván. Z přepočtu průměrného úbytku hmotnosti za 24 hodin byl spočítán průměrný k.o. Odparníky s optimálním k.o. byly vybrány pro polní pokus. Po zjištění průměrného k.o. za laboratorních podmínek jsme dále zjišťovali průměrný k.o. za přírodních podmínek ve venkovním

prostředí, který byl opět zjišťován gravimetrickou analýzou a z přepočtu průměrného úbytku hmotnosti za 24 hodin byl spočítán průměrný k.o.

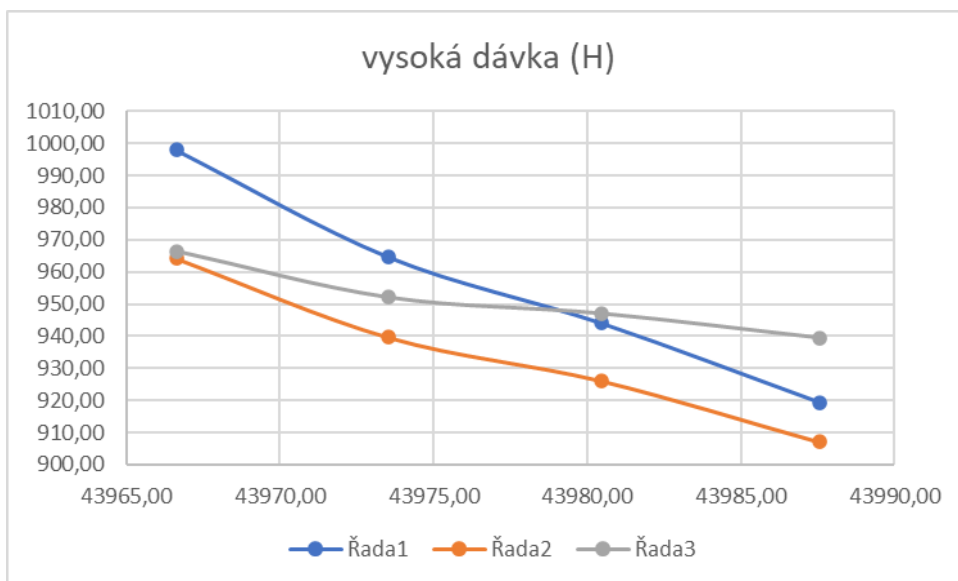
V konečné fázi byly zvoleny tyto designy: pro koeficient odparu 0,1 mg/den byla použita skleněná lahvička s dírou jehlou ve víčku; pro koeficient odparu 1 mg/den byl použit aluminiový pytlíček s dírou jehlou, do kterého byla zatavena houbička z přírodní celulózy nasycená testovanou směsí, a zatavena ve folii o tloušťce 100 mikrometrů; a pro koeficient odparu 10 mg/den byly použity dva podobné aluminiové pytlíčky s dírou kapilárou o rozměru 2 mm s vložkou z houbičky zatavenou ve folii.

V pokusu byl také použit syntetický feromon lýkožrouta smrkového, který se skládal ze dvou komponent naplněných do dvou odparníků. Jedním byl methylbutenol (2-methyl-3-buten-2-ol) s k.o. 50 mg/den a druhým cis-verbenol s k.o. 1 mg/den. Tyto dvě komponenty byly vždy použity dohromady. Methylbutenol byl dávkován v Kartelově vialce 731 s dírou ve víčku o průměru 1 mm, cis-verbenol byl dávkován též v Kartelově vialce 731 s dírou ve víčku o průměru 9 mm.

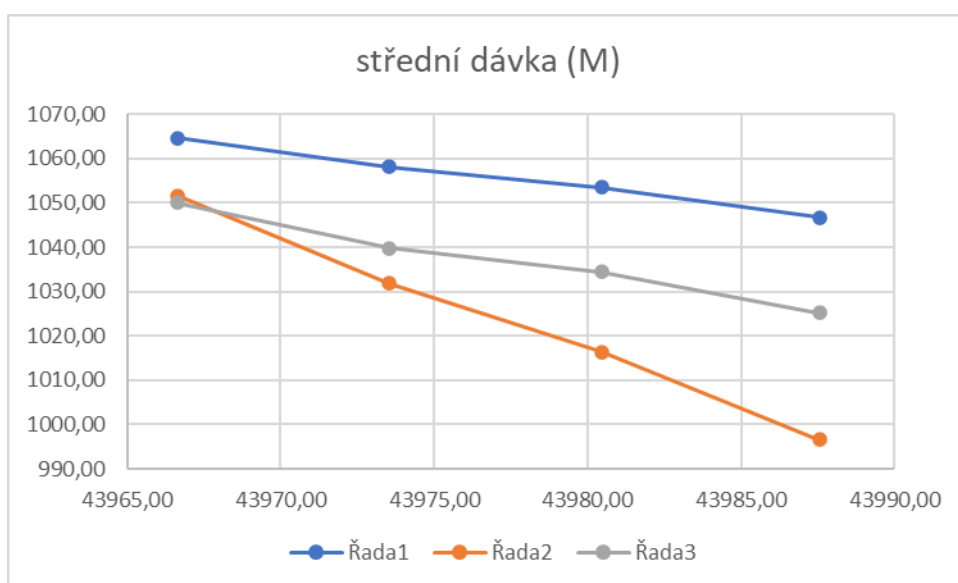


Obr. č. 7: Vývoj odparníků, jejichž k.o. byl zjišťován za konstantních podmínek v laboratoři (Hosnedl 2020).

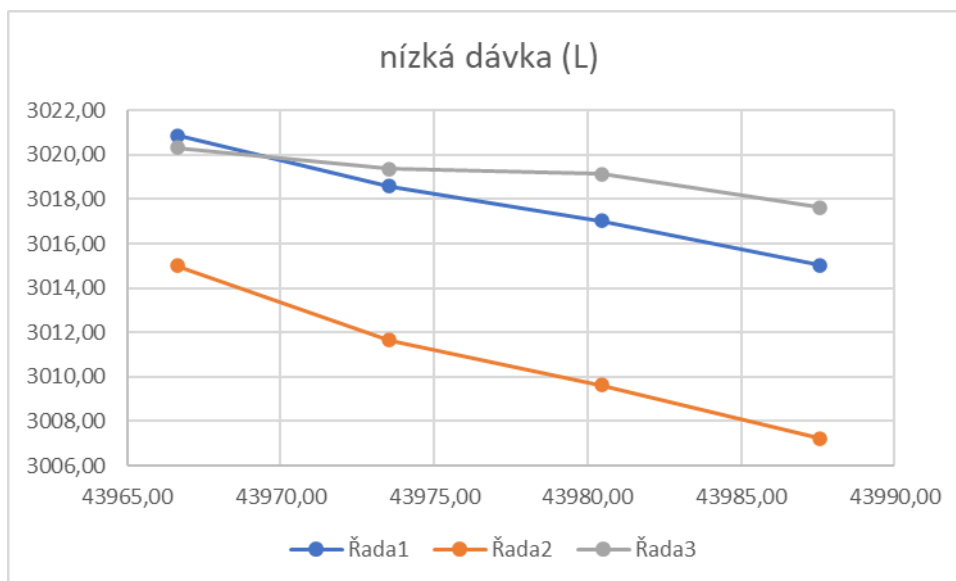
Graf č. 1, 2, 3 zobrazuje časovou křivku rychlosti uvolňování dané látky z odparníku daného designu a také úbytek této látky v odparníku. Osa X zobrazuje číselně vyjádřený den, měsíc, rok a hodinu vážení daného odparníku. Osa Y zobrazuje množství látky v mg v daném odparníku v den vážení. Pro každou dávku byly vytvořeny tři testovací odparníky pro dodržení statistické průkaznosti.



Graf č. 1: Časová křivka rychlosti uvolňování mixu sloučenin ve vysoké dávce. Nominální hodnota 5 mg/den z aluminiového pytlíčku s dírou kapilárou. V pokusu byl použit 2x.



Graf č. 2: Časová křivka rychlosti uvolňování mixu sloučenin ve střední dávce, 1 mg/den z aluminiového pytlíčku s dírou jehlou.



Graf č. 3: Časová křivka rychlosti uvolňování mixu sloučenin v nízké dávce, 0,1 mg/den z vialky 1,5 ml s dírou jehlou v septu.

1.5.2 Třídění kůrovců od necílového hmyzu a určení počtu odchycených kůrovců

Obsah jednotlivých polypropylenových lahvíček s odchycenými kůrovci, ale i dalším, necílovým hmyzem bylo zapotřebí v laboratoři roztřídit. Cílem bylo zjistit počet kůrovců lýkožrouta smrkového v jednotlivých lahvíčkách. Tím mohla být potvrzena či vyvrácena atraktivita jednotlivých odparníků hub. Kromě lýkožrouta smrkového se v lahvíčkách nacházel také lýkožrout lesklý *Pityogenes chalcographus*, pestrokrovečník mravenčí *Thanasimus formicarius*, mouchy, mušky, berušky, mravenci a další. Necílový hmyz byl uložen zvlášť do samostatné polypropylenové vialky s lihem a byl patřičně označen. Počty lýkožrouta smrkového v jednotlivých odchycích byly zaznamenány do MS excel tabulky, a nakonec byly statisticky vyhodnoceny. Celkem bylo odchyceno 3 514 ks lýkožrouta smrkového.

1.5.3 Třídění samců a samic lýkožrouta smrkového

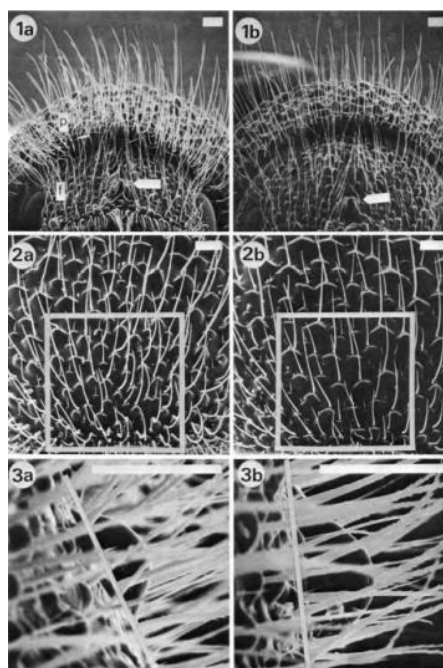
Určování pohlaví u lýkožrouta smrkového je poměrně obtížné. Dosud existuje jediná dostupná metodika pro určení pohlaví lýkožrouta smrkového, která je založená na určení hustoty chloupků na *pronotu* kůrovce. Tuto metodu popsal ve svém článku Schlyter et al. (1981) a tvrdí, že touto metodou je možné určit pohlaví kůrovců s 98 % spolehlivostí. Touto metodou je pohlaví lýkožrouta smrkového rozlišováno pod binokulární lupou. Zkoumaný jedinec je vzat entomologickou pinzetou, položen na bok a nejprve je zhodnocena hustota chloupků na *pronotu*. Mezi samci a samicemi lze pozorovat pohlavní dimorfismus. Samci

mají řídké chloupky na *pronotu*, samice naopak husté. Průměrný počet chloupků na 1 mm² je u samců nižší než u samic. Další znak, který je zkoumán, je čelo lýkožrouta. To je zrnitě hrbolkovité a u samců lze pozorovat velký, zřetelný hrbolek ve středu čela při předním okraji. Samička má na rozdíl od samečka hrbolek na čele menší (Obr. č. 8). Tykadla jsou žlutavá a na jejich konci je palička se zřetelnými zprohýbanými švy. Třetím zkoumaným znakem k určení pohlaví jsou zuby na zadní části krovek. Lýkožrout smrkový patří mezi skupinu lýkožroutů, pro něž je charakteristické, že mají zadní část krovek ozdobenou čtyřmi hrbolky, „zuby“ a narozdíl od ostatních druhů, které nesou stejné znaky na krovkách, je vzdálenost mezi těmito zuby stejná. Do této skupiny dále patří např.: lýkožrout menší *Ips amitinus* nebo lýkožrout severský *Ips duplicatus*. První zub se nachází na vyhloubené části krovek a je nejmenší. Druhý zub shora je na bázi viditelně ztloustlý. Třetí zub je nejdelší, největší a je knoflíkovitě protažen, čtvrtý zub je opět menší (Pfeffer 1955; Schlyter et al. 1981).

Všechny tyto znaky jsem si mohl vyzkoušet na živých jedincích lýkožrouta smrkového. Celkový čas potřebný k určení pohlaví se ze začátku pohyboval mezi 2-3 minutami, nicméně po několika minutách už tento čas klesl i na 30 vteřin na jednoho kůrovce.

Nicméně naši odchycení kůrovci byli uskladněni po nějaký čas v lahvičkách s lihem, kde u kůrovců dochází k polámání chloupků na *pronotu*, a proto tyto metody určování pohlaví podle ochlupení a dalších znaků nebyly k určení pohlaví vhodné. V našem případě bylo tedy pohlaví kůrovců určeno pomocí pohlavních znaků, tedy pitvou kůrovců. K pitvě bylo vždy vybráno 50 kůrovců z každé lahvičky s lihem. V případě, že bylo v lahvičce méně kůrovců než 50, byli vypitváni všichni.

Kůrovec byl vzat entomologickou pinzetou a položen na záda, kdy hlava mu směřovala na západ. Levou rukou byla držena pinzeta s kůrovcem a pravou rukou byl kůrovci za pomoci entomologické jehly odstraněn abdomen obsahující pohlavní ústrojí. Tento abdomen byl zakápnut kapkou vody a rozpitván, dokud nebylo nalezeno pohlavní ústrojí kůrovce. V případě, že byl nalezen *falus* (Obr. č. 9), tedy penis lýkožrouta, bylo jednoznačné, že se jedná o samce. V opačném případě se jednalo o samici.



Obr. č. 8: Rozlišovací znaky u pohlaví lýkožrouta smrkového. Číslo 1a, 2a a 3a značí samici. Číslo 1b, 2b a 3b značí samce (Schlyter a Cederholm 1981).



Obr. č. 9: Vypreparovaný falus lýkožrouta smrkového (Hosnedl 2020).

1.5.4 Analýza vzorků plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí

Odparníky, jejichž hmotnostní úbytek byl po dobu 14 dní vážen v laboratoři, byly rozstříženy, skleněné vialky byly otevřeny a zbývající látky byly vyextrahovány do rozpouštědla hexan (10ml_odparník). Jako reference byla použita směs chemikálií, která byla do odparníků před započítím pokusu dávkována. Jednotlivé vzorky byly po příslušném ředění, bylo-li třeba, měřeny na plynovém chromatografu Agilent 7890B, do kterého byly instalovány kapilární kolony Rxi-5Sil: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Teplotně vyhříváný nástřík byl programován od 20 °C, vyhřáto rychlostí 8 °C/s do teploty 275 °C. Teplotní program pro pec byl 40 °C (2 min) s gradientem 5 °C/min do 120 °C, 10 °C/min do 200 °C a

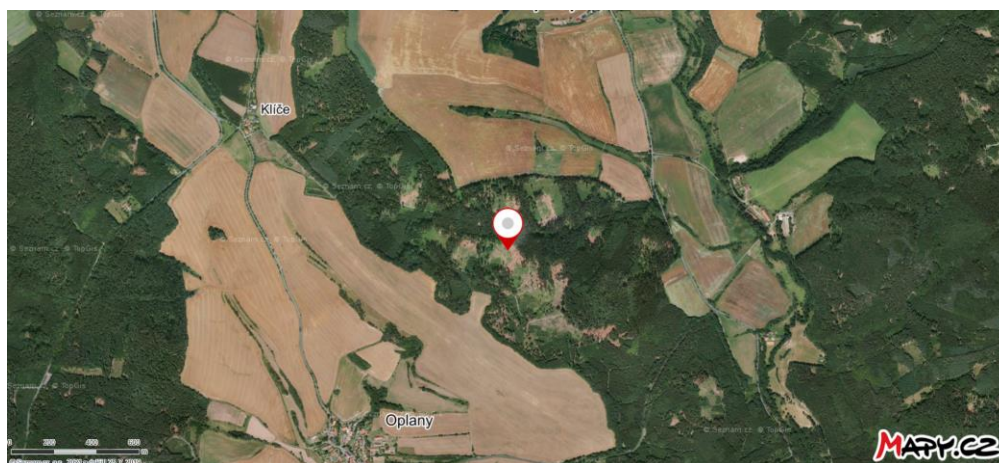
20 °C/min do 280 °C. Nosný plyn byl helium s konstantním průtokem 1 ml/min. Hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací 70 ev. Hmotnostní rozsah byl 35 – 500 m/z. Teplota iontového zdroje byla 250 °C. Kvantita látek v odparnicích byla zjištěna metodou konstrukce kalibračních křivek. Analýza byla provedena ve spolupráci s odborníkem Dr. Jaromírem Hradeckým. Poměr látek v odparnicích po proběhnutí pokusu byl srovnán s poměrem látek v odparnicích na začátku pokusu a byl spočten rozdíl.

1.6 Metodika práce v terénu

Lokalita

Po výběru vhodné lokality byl pokus založen 14. 5. 2020 na smrkových holinách, které musely být vykáceny kvůli kůrovcovým náletům v letech 2017-2019. Plocha, na které byl experiment proveden byla cca 150 m dlouhá a 200 m široká s porostní stěnou na západní světové straně. Souřadnice (49,93343N; 14,87704E) viz (Obr. č. 10).

Samotný experiment zahrnoval atraktivní mix sloučenin produkovaných houbami skládající se z 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethanol, 2-methyl-1-butyl acetát a 2-fenylethyl acetát, všechny ve stejném poměru, 1:1:1:1:1:1. Experiment byl po 8 replikacích ukončen 29. 5. 2020. Teplota ve dnech sběru byla průměrně kolem 19-25 °C.



Obr. č. 10: Lokalita experimentu (Konojedy, Klíče). Foto viz Mapy.cz



Obr. č. 11: Plocha po instalaci feromonových lapačů typu Ecotrap (Hosnedl 2020).

Samotný experiment

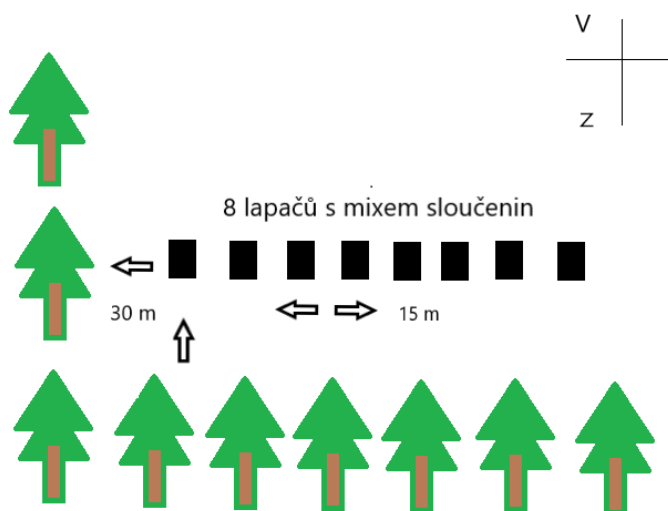
Po zatlučení dřevěných hranolů do půdy byly na tyto hranoly přidělaný ocelovým drátem feromonové lapače křížového typu Ecotrap, čímž nám vznikla řada osmi křížových lapačů pro experiment s mixem sloučenin. Schéma rozmístění lapačů zobrazuje (Obr. č. 11 a 12). Lapače upevněné na hranolech byly umístěny ve vzdálenosti 30 m podél okraje lesa dané mýtiny. Jednotlivé lapače pak byly instalovány ve vzdálenosti 15 m od sebe a ve výšce 1,5 m od země. Po instalaci lapačů bylo třeba pečlivě označit jednotlivé lapače a odparníky. Lapače byly označeny římskými číslicemi I až VIII. Odparníky byly označeny Ao až Ho. Malé o značilo odparník. Po označení byly odparníky do jednotlivých lapačů umísťovány dle připraveného schématu. Odparníky byly přidělaný elektrická páskou k železnému drátu, který sloužil k jednoduchému zavěšení odparníku do lapače, ale také k přenášení mezi jednotlivými lapači po pasece. Takto byly připevněny i Kartelky obsahující agregační feromon kůrovce.

Tento experiment, ve kterém byla zjišťována atraktivita kandidátních sloučenin z hub označených jako mix sloučenin, byla v lapačích dávkována ve třech dávkách buď v

kombinaci s feromonem, nebo bez něj. Do prvního lapače byl zavěšen odparník v nízké dávce s feromonem, do druhého odparník ve střední dávce s feromonem, do třetího odparník ve vysoké dávce s feromonem, do čtvrtého samotný feromon lýkožrouta smrkového (2-methyl-3-buten-2-ol a cis-verbenol) a do pátého nebyl zavěšen žádný odparník. Tento lapač byl prázdný a stejně jako lapač obsahující pouze feromon, sloužil jako kontrolní prvek. V dalších třech lapačích byly zavěšeny pouze odparníky bez feromonu, v pořadí nízká dávka, střední dávka a vysoká dávka. Jednotlivé použité látky a jejich dávky zobrazuje (Tab. č. 1).

Během každé replikace byly kůrovci odchycení do těchto lapačů přesypáni do polypropylenových lahvíček obsahující 95 % ethanol. Lahvičky byly vždy označeny pořadovým číslem lapače a písemným kódem feromonu. Takto uskladnění brouci byli později v laboratoři tříděni od ostatních druhů, přepočítáni a bylo u nich určeno pohlaví vnitřními znaky, tedy pitvou pohlavního ústrojí.

Rotace jednotlivých odparníků v lapačích probíhala dle připraveného schématu, tedy po diagonálně. Data jednotlivých replikací jsou zaznamenána v (Tab. č. 2). Při jednotlivých replikacích byly odparníky kontrolovány, zda jsou v pořádku. V případě, že bylo teplejší počasí, mohlo docházet k rychlejšímu odpařování feromonu, který byl také kontrolován a případně doplněn. Celkem bylo v 8 replikacích rotováno 8 odparníků.



Obr. č. 12: Schéma umístění lapačů s mixem sloučenin z hub.

Tab. č. 1: Použité látky v experimentu s mixem sloučenin z hub.

Označení	Použitá látka	Dávka
A	Mix L + Feromon	Nízká (L)
B	Mix M + Feromon	Střední (M)
C	Mix H + Feromon	Vysoká (H)
D	Feromon	Vysoká (H)
E	Blank - Prázdný lapač	X
F	Mix L	Nízká (L)
G	Mix M	Střední (M)
H	Mix H	Vysoká (H)

Tab. č. 2: Schéma výměny jednotlivých odparníků v lapačích (rotace po diagonále).

stanoviště	datum	lapač/odparník							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	18.05.2020	A	B	C	D	E	F	G	H
2	18.05.2020	H	A	B	C	D	E	F	G
3	18.05.2020	G	H	A	B	C	D	E	F
4	22.05.2020	F	G	H	A	B	C	D	E
5	22.05.2020	E	F	G	H	A	B	C	D
6	25.05.2020	D	E	F	G	H	A	B	C
7	27.05.2020	C	D	E	F	G	H	A	B
8	29.05.2020	B	C	D	E	F	G	H	A

1.7 Statistické vyhodnocení

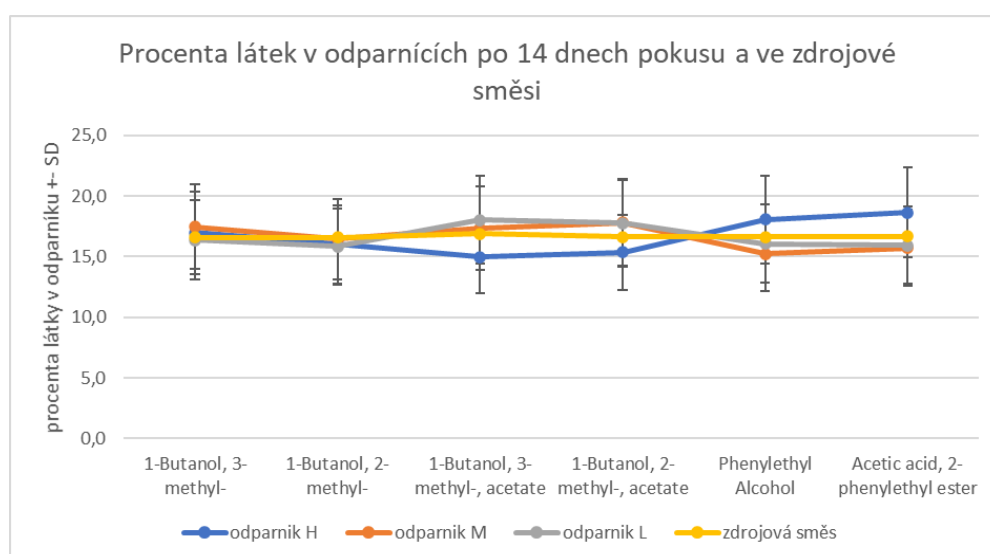
K vyhodnocení terénního pokusu s odparníky byl použit lineární model. Závisle proměnnou byl relativní počet odchycených lýkožroutů, nezávisle proměnnou jednotlivé varianty odparníku. Těsnost proložení modelu byla ověřována pomocí diagnostických grafů, zejména Q-Q grafu. Pro snížení velikosti reziduí bylo nutné závisle proměnnou logaritmičsky transformovat. Z datové sady byly z tohoto důvodu odstraněny varianty bez feromonu, které obsahovaly převažující množství nulových hodnot. Varianty s feromonem byly nenulové a šlo je tedy logaritmovat. Stanovení významnosti rozdílů mezi variantami odparníků s feromonem se uskutečnilo pomocí analýzy rozptylu. K porovnání úrovní nezávisle proměnné bylo použito kontrastů. Signifikance jednotlivých testů byla stanovena na obvyklé hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro vyhodnocení byly použity postupy uvedené v Crawley (2013). Statistická analýza byla provedena v software R verze 4.0.2 (R core team 2020).

• Výsledky

Celý tento experiment vycházel z výzkumu Kandasamy et al. (2019), který testoval účinnost látek emitovaných houbami asociovanými s lýkožroutem smrkovým na tohoto kůrovce. Jednotlivé směsi látek byly smíchány ve stejném objemovém poměru a následně byly použity k vytvoření odparníků mající požadovaný poměr odparu. Dále byly testovány v kombinaci s feromonem, kde bylo zjišťováno, zda jejich přidavek k feromonu zvýší atraktivitu feromonu. Také byly testovány samostatně, kdy bylo cílem určit jejich atraktivitu. Předpokladem bylo, že tato směs bude při použití v terénu pro kůrovce buď atraktivní, anebo anti-atraktivní.

Stanovení poměru odparu jednotlivých látek v odparnících

Poměr rychlosti uvolňování jednotlivých sloučenin v odparnících obsahujících mix sloučenin byl stanoven vážením a kvantitativní analýzou na GC-MS. Tři typy experimentálních odparníků byly váženy po dobu 3 dnů. Během jednoho týdne byly tyto 3 odparníky se známým úbytkem hmotnosti extrahovány do rozpouštědla hexanu, a kvantita zbývajících složek směsi v odparníku byla detekována pomocí plynové chromatografie (GC-MS), čímž byl získán koeficient odparu jednotlivých složek. Po zjištění kvantity jednotlivých složek metodou konstrukce kalibračních křivek byl poměr sloučenin nakonec porovnán s poměrem ve výchozí směsi aplikované během výroby odparníku. Tab. č. 3 zobrazuje procenta daných látek z mixu sloučenin z hub v jednotlivých dávkách odparníků.



Graf č. 4: Procentuální zastoupení složek směsi v odparnících.

Graf zobrazuje procentuální zastoupení jednotlivých složek směsi v odparnicích po 14 dnech, kdy pokus probíhal v porovnání se zastoupením ve výchozí směsi. Rozdíly mezi zastoupením látek v porovnání s výchozí směsí nepřesáhly chybu analytického stanovení a rozdíly v odparech jednotlivých látek tedy byly nevýznamné.

Tab. č. 3: Procentuální zastoupení látek obsažených v jednotlivých odparnicích.

látka	odparník H	odparník M	odparník L	zdrojová směs
	%	%	%	%
1-Butanol, 3-methyl-	17,0	17,5	16,4	16,6
1-Butanol, 2-methyl-	16,0	16,4	15,8	16,6
1-Butanol, 3-methyl-, acetát	15,0	17,3	18,0	16,9
1-Butanol, 2-methyl-, acetát	15,4	17,8	17,7	16,6
Fenylethyl Alkohol	18,1	15,2	16,1	16,6
Acetic acid, 2-fenylethyl ester	18,6	15,7	15,9	16,7

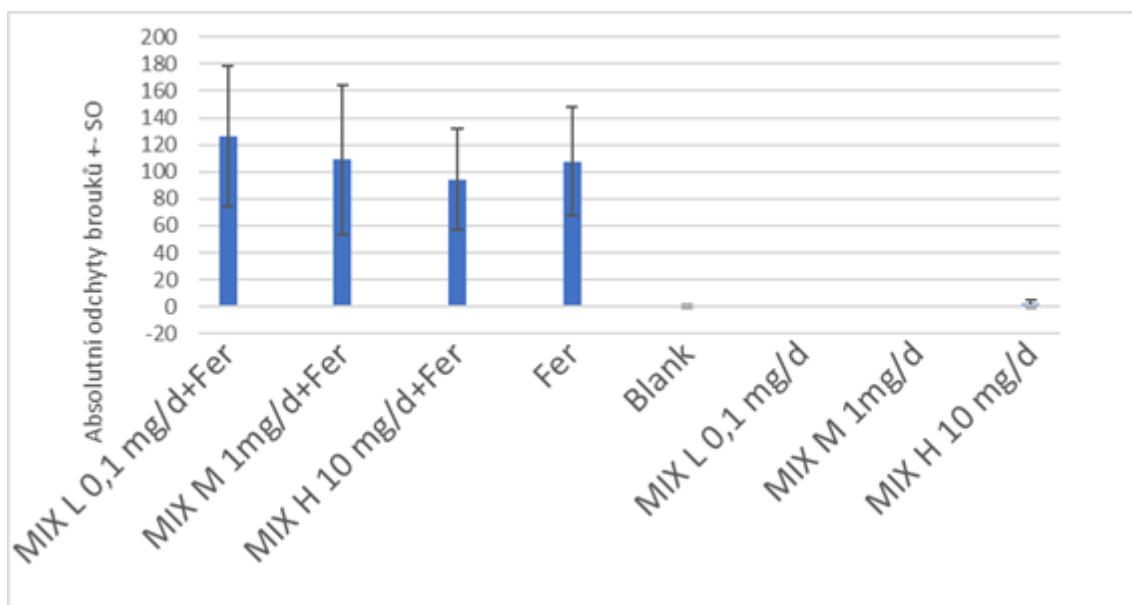
Výsledky polního pokusu

Celkem bylo za období od 14. 5. do 29. 5. do 8 lapačů během 8 replikací odchyceno 3 514 brouků lýkožrouta smrkového. Absolutní odchvytí kůrovců v jednotlivých replikacích na použité látky v odparnicích jsou znázorněny v (Tab. č. 4) a průměrné absolutní odchvytí jsou znázorněny v (Graf č. 5).

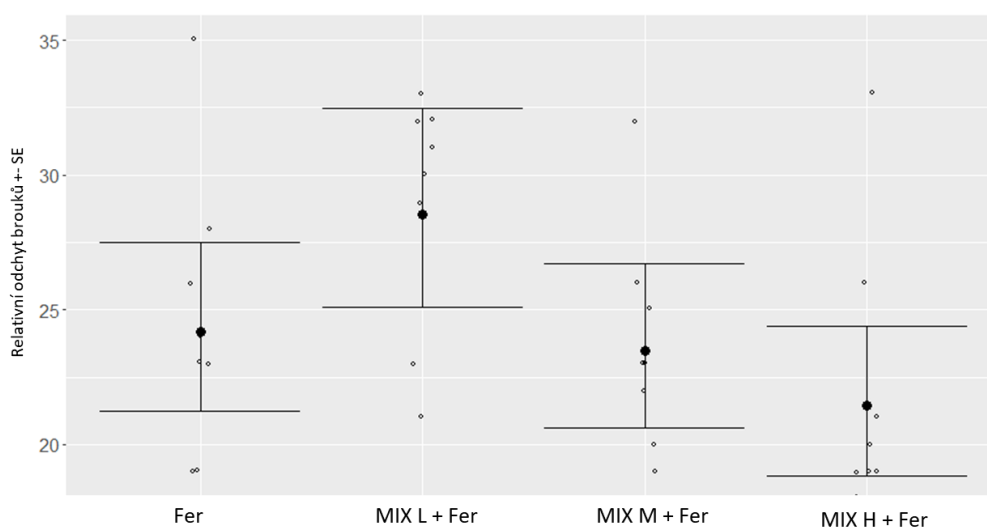
Tab. č. 4: Absolutní hodnoty odchycených brouků na mix sloučenin z hub při jednotlivých sběrech.

replikace	Celkový počet odchycených brouků na mix sloučenin							
	Mix L+Feromon	Mix M+Feromon	Mix H+Feromon	Feromon	Blank	Mix L	Mix M	Mix H
1	211	164	124	154	2	0	0	2
2	188	200	118	121	1	0	0	0
3	154	136	107	128	0	0	0	0
4	99	99	78	154	0	0	0	4
5	97	106	153	104	0	0	0	0
6	70	42	42	61	0	0	0	6
7	77	46	60	44	0	0	0	6
8	112	78	73	93	0	0	0	0

(Označení L, M a H je zkratka z ang. slova low, middle a high, neboli nízká, střední a vysoká dávka. Blank je prázdný lapač).



Graf č. 5: Průměrné absolutní odchyty kůrovců na jednotlivé dávky odparníků ± směrodatná odchylka.



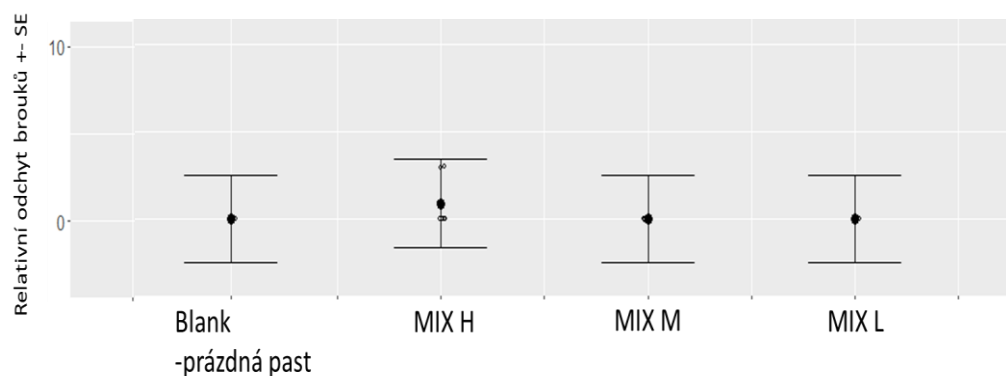
Graf č. 6: Relativní odchyty kůrovců na odparníky s 3 k.o. v kombinaci s feromonem, porovnáno s referencí feromon.

Černé tečky představují modelem predikovanou střední hodnotu, příčné linie 95 % interval spolehlivosti predikce, malé prázdné tečky pozorované hodnoty.

Porovnání účinnosti odparníků v kombinaci s feromonem, vztaženo k feromonu samotnému jako referenci.

Po statistickém zpracování výsledků byly relativní odchyty (počítáno procento brouků chycených na jednotlivou návnadu z celkového počtu brouků chycených v replikaci) na

nejnižší dávku s k.o. směsí 6ti sloučenin 0,1 mg za den vyšší, než na referenční samotný feromon. Odchyty se snižovaly se zvyšující se dávkou směsi přidané k feromonu. Mezi porovnávanými typy odparníků byl zjištěn statisticky významný rozdíl v relativním počtu odchycených lýkožroutů (ANOVA, $df = 3$, $p < 0,05$). Nejvyšší relativní odchyty byly zaznamenány ve variantě s mix L, rozdíl odchyťů v této variantě proti kontrolní feromonové návnadě však nebyl významný (contrast t test, $p = 0,09$). Se zvyšující se dávkou směsi se snižovaly relativní odchyty.



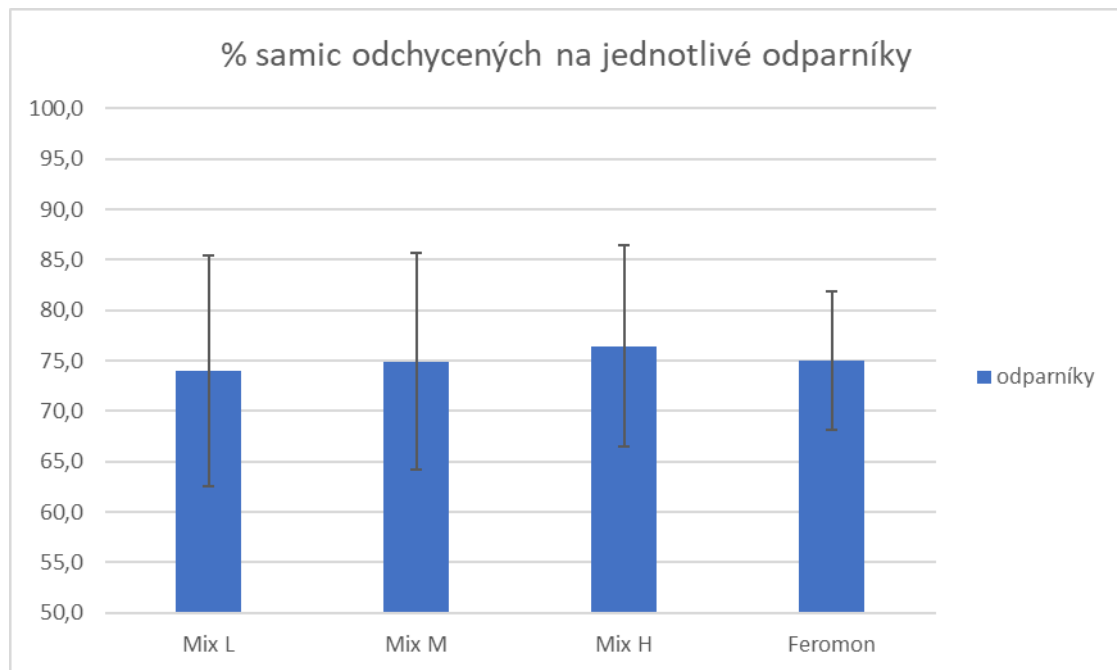
Graf č. 7: Porovnání atraktivity samotné směsi vztažené k prázdnému lapači jako referenci.

Díky nulovým odchytům ve všech variantách nebylo možné aplikovat statistický model. Porovnání relativních odchytů však ukazuje slabou atraktivitu nejvyšší dávky směsi látek oproti prázdnému lapači (Graf č. 7).

Při zjišťování počtu odchycených samců a samic lýkožrouta smrkového na jednotlivé odparníky byla použita metoda náhodného výběru, kdy bylo z každé lahvičky s brouky z jednotlivých replikací vybráno právě 50 ks, a ti byli vypitváni. Z celkového počtu 3 514 ks lýkožrouta smrkového bylo touto metodou vybráno celkem 1 595 ks kůrovce. Pitvou bylo stanoveno 1 194 samic a 401 samců, což procentuálně ukazuje, že 75 % odchycených brouků byly samice a pouze 25 % brouků byli samci.

Tab. č. 5: Počet vypitvaných samců a samic lýkožrouta smrkového odchycených na jednotlivé látky.

Pohlaví	Počet vypitvaných brouků odchycených na jednotlivé látky							
	Mix L+Feromon	Mix M+Feromon	Mix H+Feromon	Feromon	Blank	Mix L	Mix M	Mix H
samec	104	98	93	99	2	0	0	5
samice	296	290	299	295	1	0	0	13



Graf č. 8: Procenta samic v odchytech na odparníky s různým k.o. v kombinaci s feromonem, v porovnání s feromonem.

• Diskuse

Během vývoje odparníků pro použití v terénu bylo vybráno několik designů, které byly pravidelně testovány, aby bylo dosaženo požadovaného poměru odparu. Z těchto odparníků byly následně vybrány ty s nejlepším designem dosahující požadovaného poměru odparu. Pro nejnižší požadovaný poměr odparu v odparníku mixu sloučenin z hub byl použit design skleněná lahvička s dírou ve víčku. Pro střední požadovaný poměr odparu byl použit design aluminiový pytlíček s dírou jehlou a pro nejvyšší požadovaný poměr odparu dva aluminiové pytlíčky s dírou jehlou o průměru díry 2 mm. Tyto designy odparníků byly zvoleny především proto, že u nich byla zaznamenána dostatečná stabilita. Látky se z nich vypařovaly po dobu 14 dnů experimentu ve stejném poměru.

Ze získaných výsledků vyplývá, že největší počet odchycených kůrovců během 8 replikací, při porovnání mixu sloučenin s feromonem mezi sebou, byl zaznamenán u nízké dávky mixu sloučenin z hub v kombinaci s feromonem s 1 008 ks kůrovců. Na střední dávku s feromonem bylo odchyceno 871 ks kůrovců. Vysoká dávka mixu sloučenin s feromonem odchytila téměř ve všech replikacích nejmenší počet lýkožrouta smrkového s celkem 755 ks. Překvapivě v páté replikaci byl největší počet kůrovců odchycen na nejsilnější dávku s feromonem.

Při porovnání odchyťů na mix sloučenin, který byl zavěšen v kombinaci s feromonem, a mix sloučenin bez feromonu se ukázaly významně účinnější pro atraktivitu kůrovce odparníky v kombinaci s feromonem. Na mix sloučenin bez feromonu v nízké a střední dávce nebyl odchycen žádný kůrovec. Na mix sloučenin bez feromonu ve vysoké dávce se odchytilo celkem 18 ks kůrovců.

Lapač obsahující pouze feromon bez mixu sloučenin odchytil celkem 859 ks kůrovců, zatímco prázdný lapač pouze 3 ks. Z kontrolních lapačů obsahující pouze feromon a prázdný lapač byl tedy jednoznačně účinnější lapač obsahující feromon. To, že blank neboli prázdný lapač odchytil za celou dobu tři brouky lze pokládat za náhodný disperzní let, během něhož kůrovci narazili do lapače.

V pokusu byl největší počet brouků, především pak samic, odchycen do lapačů obsahující odparníky v kombinaci s feromonem nebo feromon samotný. Větší počet odchycených kůrovců může být způsoben tím, že pokus byl založen na začátku sezony, kdy brouci přezimující v zemi nebo kůře stromů vylétávají a hledají vhodné hostitele pro založení populace. Dá se říct, že období duben až červen je obecně pokládáno několika autory jako období s největším odchycem kůrovců.

U odparníků, které byly instalovány v kombinaci s feromonem byl zaznamenán sice statisticky ne-signifikantní, ale zřejmý trend nejvyššího odchytu na nejnižší dávku látek, což odpovídá behaviorálnímu pokusu, který provedl Kandasamy et al. (2019), zobrazeno v (Obr. č. 2f), kde testovali stejnou směs pro atrakci na krátkou vzdálenost.

Další velkou roli hraje teplota. U lýkožrouta smrkového je letová aktivita započata při 20 a více stupních Celsia. I v našem pokusu se teplota průměrně pohybovala v rozmezí 20-25 °C, což je ideální teplota pro létání kůrovce.

Nejmenší, respektive téměř nulový počet kůrovců byl odchycen do lapačů obsahující odparníky bez feromonu. Z toho vyplývá, že hlavní atrakční aktivitu má pro kůrovce stále feromon.

Poměr pohlaví byl ovšem stejný pro všechny tři dávky odparníků a nelišil se od odchytu na samotný feromon, což znamená, že směs nepřitahuje jedno pohlaví více nebo méně, a látky emitované houbami nehrají roli při sexuální atrakci.

Na odparníky bez feromonu se odchytilo celkově méně brouků. Slabý trend vyššího odchytu byl pozorován u silné dávky směsi testovaných látek. Tento fakt si lze vysvětlit tím, že alkoholy 3-methyl-1-butanol a 2-methyl-1-butanol jsou strukturními analogy feromonového alkoholu 2-methyl-3-buten-2-olu, na který brouk pravděpodobně reaguje, reagují na stejné čichové sensile. Ovšem odchty byly nízké, protože odpar těchto houbových alkoholů byl pouze 0,16 mg/den u každého odparníku, což v porovnání s feromonovým 2-methyl-3-buten-2-olem, u kterého se odpařovalo 50 mg/den, je velmi málo. Stejně jako Kandasamy et al. (2019) se domníváme, že roli v atrakci hrají acetáty, kterých stačí malé množství, naopak alkoholy lépe přitahují ve velkém množství.

• Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zda těkavé látky uvolňované z asociovaných hub lýkožrouta smrkového (3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethanol, 2-methyl-1-butyl acetát, 2-fenylethyl acetát) lákají samotné nebo modifikují jeho afinitu k feromonu.

Celkem bylo odchyceno do feromonových lapačů během jarního pokusu 3 514 ks lýkožrouta smrkového.

Největší počet odchycených brouků byl zaznamenán na směs mixu sloučenin z hub v kombinaci s feromonem oproti mixu sloučenin samotných bez feromonu. Samotná směs tedy byla pro kůrovce velmi mírně atraktivní, ale významné odchvy byly pozorovány pouze v kombinaci s feromonem.

Při porovnání atraktivity těchto směsí sloučenin s feromonem byla u kůrovců zaznamenána významná preference u nízké dávky mixu sloučenin v kombinaci s feromonem oproti feromonu samotnému, což potvrzuje hypotézu, že nízká dávka je pro kůrovce atraktivnější, protože je bližší jeho přirozenému prostředí na rozdíl od vysoké dávky, která pro něj může být repelentní.

Nejvyšší relativní odchvy byly zaznamenány na nejnižší dávku směsi sloučenin 0,1 mg/den a byly vyšší než na samotný feromon. Se zvyšující se dávkou směsi přidané k feromonu se relativní odchvy snižovaly.

Při porovnání odchytů kůrovců na samotnou směs sloučenin bez feromonu byla zjištěna velice nízká, až nulová atraktivita pro kůrovce. Tím bylo prokázáno, že pro kůrovce stále hraje významnou roli feromon a látky emitované houbami nejsou aktivnější. Odchyty v řádu jednotek brouků na nejvyšší dávku samotné směsi připisujeme strukturní analogii alkoholů s feromonovou složkou.

Také jsme potvrdili pozorování, že na jaře během jarního rojení je možné odchytit větší počet kůrovců než v pozdějším období, a že kůrovec začíná létat při 20 a více stupních Celsia.

Z celkového počtu odchycených kůrovců lýkožrouta smrkového bylo náhodným výběrem vybráno vždy z každé lahvičky s brouky 50 brouků, kterých bylo nakonec 1 595. Tito brouci byli vypitváni a pitvou bylo určeno 1 194 samic (75 %) a 401 samců (25 %). Poměr pohlaví v odchycích na látky z hub se nelišil od poměru pohlaví na feromon.

V případě dalšího výzkumu a optimalizace jednotlivých designů odparníků, látek a jejich koncentrací mohou být tyto látky velice nápomocné při managementu lýkožrouta smrkového pomocí feromonových lapačů.

Na závěr shrnujeme, že jsme našli směs levných, komerčně dostupných látek, které v kombinaci s feromonem zvyšují atraktivitu obou pohlaví kůrovce a předpokládáme, že při optimalizaci samotného složení a dávkování odparníků můžeme vylepšit účinnost feromonových lapačů, protože doposud není v literatuře mnoho záznamů o aktivních látkách, které by zvyšovaly přitažlivost na známou feromonovou směs lýkožrouta smrkového 2-methyl-3-buten-2-ol a *cis*-verbenol.

- Seznam literatury a použitých zdrojů

- Adams, A.S., Six, D.L. *Detection of host habitat by parasitoids using cues associated with mycangial fungi of the mountain pine beetle, Dendroctonus ponderosae*. Can Entomol. 2008, vol. 140, no. 1, s. 124–127.
- Andersson, M.N., Larsson, M.C., Blaženec, M., Jakuš, R., Zhang, Q.H., Schlyter, F. *Peripheral modulation of pheromone response by inhibitory host compound in a beetle*. J Exp Biol. 2010, vol. 213, no. 19, s. 3332–3339.
- Andersson, M.N., Larsson, M.C., Schlyter, F. *Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle Ips typographus: single-cell responses to ecologically relevant odors*. J Insect Physiol. 2009, vol. 55, no. 6, s. 556–567.
- Axelsson, K., Zendegi-Shiraz, A., Swedjemark, G., Borg-Karlson, A-K., Zhao, T. *Chemical defence responses of Norway spruce to two fungal pathogens*. Forest Pathology. 2020, vol. 50, no. 6, s. 12640.
- Bakke, A. *Using pheromones in the management of bark beetle outbreaks*. General technical report NE - U.S. Department of agriculture, forest service, Northeastern forest experiment station. 1991, vol. 153, s. 371–337.
- Bakke, A. *Spruce bark beetle, Ips typographus: Pheromone production and field response to synthetic pheromones*. Naturwissenschaften. 1976, vol. 63, no. 2, s. 92.
- Bentz, B.J., Six, D.L. *Ergosterol content of fungi associated with Dendroctonus ponderosae and Dendroctonus rufipennis (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae)*. Ann Entomol Soc Am. 2006, vol. 99, vol. 2, s. 189–194.
- Birgersson, G., Schlyter, F., Löfqvist, J., Bergström, G. *Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle Ips typographus from different attack phases*. J Chem Ecol. 1984, vol. 10, s. 1029–1055.
- Bleiker, K.P., Six, D.L. *Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: Potential implications of multiple associates on host population dynamics*. Environ Entomol. 2007, vol. 36, no. 6, s. 1384–1396.
- Bracewell, R.R., Six, D.L. *Experimental evidence of bark beetle adaptation to a fungal symbiont*. Ecol Evol. 2015, vol. 5, vol. 21, s. 5109–5119.
- Byers, J.A. *Chemical ecology of bark beetles*. Experientia. 1989, vol. 45, no. 3, s. 271–283.
- Cardoza, Y.J., Moser, J.C., Klepzig, K.D., Raffa, K.F. *Multipartite symbioses among fungi, mites, nematodes, and the spruce beetle, Dendroctonus rufipennis*. Environ Entomol. 2008, vol. 37, no. 4, s. 956–963.

- Cook, S.M., Khan, Z.R., Pickett, J.A. *The use of push-pull strategies in integrated pest management*. Annu Rev Entomol. 2006, vol. 52, no. 1, s. 375–400.
- Crawley, M. *The R Book, 2st. ed. John Wiley & Sons. New York, USA*. 2013, s. 1051. ISBN 978-0-470-97392-9.
- Danielsson, M., Lundén, K., Elfstrand, M., Hu, J., Zhao, T., Arnerup, J., Ihrmark, K., Swedjemark, G., Borg-Karlson, A.-K., Stenlid, J. *Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to Heterobasidion spp. infection*. BMC Plant Biology. 2011, vol. 11, no. 1, s. 154.
- De Beer, Z.W., Duong, T.A., Barnes, I., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. *Redefining Ceratocystis and allied genera*. Stud Mycol. 2014, vol. 79, s. 187–219.
- Drong, S. *Testování biologické aktivity vybraných látek pro lýkožrouta smrkového (Ips typographus) ve feromonových lapačích*. Diplomová práce. Praha. 2019, s. 70.
- Duelli, P., Zahradník, P., Knížek, M., Kalinová, B. *Migration in spruce bark beetles (Ips typographus L.) and the efficiency of pheromone traps*. J. Appl. Ent. 1997, vol. 121, no. 1-5, s. 297–303.
- Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T. *Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests*. New Phytologist. 2005, vol. 167, no. 2, s. 353–375.
- Goldhammer, D.S., Stephen, F.M., Paine, T.D. *The effect of the fungi Ceratocystis minor (Hedgcock) hunt, Ceratocystis minor (Hedgcock) hunt var. barrasii Taylor, and SJB 122 on reproduction of the southern pine beetle, Dendroctonus frontalis Zimmermann (Coleoptera: Scolytidae)*. Can Entomol. 1990, vol. 122, no. 3, s. 407–418.
- Hammerbacher, A., Schmidt, A., Wadke, N., Wright, L., Schneider, B., Brand, W.A., Fenning, T.M., Gershenzon, J., Paetz, C. *A common fungal associate of the spruce bark beetle metabolizes the stilbene defenses of Norway spruce*. Plant Physiol. 2013, vol. 162, no. 3, s. 1324–1336.
- Hofstetter, R.W., Klepzig, K.D., Moser, J.C., Ayres, M.P. *Seasonal dynamics of mites and fungi and their interaction with Southern pine beetle*. Environ Entomol. 2006b, vol. 35, no. 1, s. 22–30.
- Hulcr, J. *Spojenecká armáda lýkožroutů a hub proti stromu*. Vesmír. 2003, vol. 82, no. 12, s. 692–696. ISSN 1214-4029.
- Hulcr, J., Mann, R., Stelinski, L.L. *The scent of a partner: ambrosia beetles are attracted to volatiles from their fungal symbionts*. J Chem Ecol. 2011, vol. 37, no. 12, s. 1374–1377.

- Christiansen, E. *Ips/Ceratocystis-infection of Norway spruce: what is a deadly dosage?* Angew. Ent. 1985, vol. 99, no. 1-5, s. 6–11. ISSN 1439-0418.
- Jakuš, R., Blaženec, M. *Influence of proportion of (4S)-cis-verbenol in pheromone bait on Ips typographus (Col., Scolytidae) catch in pheromone trap barrier and in single traps.* J. Appl. Ent. 2002, vol. 126, no. 6, s. 306–311.
- Jakuš, R., Blaženec, M. *Princípy ochrany dospelých smrekových porastov před podkôrným hmyzom.* 1. vyd. Zvolen: Ústav ekológie lesa, Slovenská akadémia vied. 2015, s. 231. ISBN 9788089408214.
- Jakuš, R., Šimko, J. *The use of dispensers with different release rates at pheromone trap barriers for Ips typographus.* Anz. Scha'dlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz. 2000, vol. 73, no. 2, s. 33–36.
- Jankowiak, R., Kacprzyk, M., Mlynarczyk, M. *Diversity of ophiostomatoid fungi associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) colonizing branches of Norway spruce (Picea abies) in southern Poland.* Biologia. 2009, vol. 64, no. 6, s. 1170–1177.
- Jankowiak, R., Kolařík, M., Bilański, P. *Association of Geosmithia fungi (Ascomycota: Hypocreales) with pine-and spruce-infesting bark beetles in Poland.* Fungal Ecology. 2014, vol. 11, s. 71–79. ISSN: 1754-5048.
- Janson, E.M., Stireman, J.O. 3rd, Singer, M.S., Abbot, P. *Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification.* Evolution. 2008, vol. 62, no. 5, s. 997–1012.
- Juha, M., Lukášová, K., Holuša, J., Turčáni, M. *Netradiční způsoby boje s lýkožroutem smrkovým – Ips typographus (Coleoptera: Curculionidae).* Lesnický průvodce. 2012, vol. 3, s. 17.
- Kandasamy, D., Gershenzon, J., Andersson, M. N., Hammerbacher, A. *Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (Ips typographus) with its fungal symbionts.* The ISME Journal. 2019, vol. 13, no. 7, s. 1788–1800. ISSN: 1751-7370.
- Kandasamy, D., Gershenzon, J., Hammerbacher, A. *Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control.* Journal of Chemical Ecology. 2016, vol. 42, no. 9, s. 952–969. ISSN 0098-0331.
- Kindlmann, P., Matějka, K., Doležal, P. *Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody.* 1. vyd. Praha: Karolinum, 2012, s. 325. ISBN 978-80-246-2155-5
- Kirisits, T. *Fungi isolated from Picea abies infested by the bark beetle Ips typographus in the Białowieża forest in North-Eastern Poland.* For Pathol. 2010, vol. 40, no. 2, s. 100–110.

- Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava. 2003, s. 132. ISBN 80-86369-07-2.
- Kopper, B.J., Klepzig, K.D., Raffa, K.F. *Components of antagonism and mutualism in Ips pini–fungal interactions: relationship to a life history of colonizing highly stressed and dead trees*. Environ Entomol. 2004, vol. 33, no. 1, s. 28–34.
- Krokene, P., Solhheim, H. *Assessing the virulence of four bark beetle-associated bluestain fungi using Norway spruce seedlings*. Plant Pathol. 2002, vol. 47, no. 4, s. 537–540.
- Kusumoto, N., Zhao, T., Swedjemark, G., Borg-Karlson, A. *Antifungal properties of terpenoids from Picea abies against Heterobasidion parviporum*. Forest Pathology. 2014, vol. 44, no. 5, s. 353–361.
- Leufvén, A., Bergström, G., Falsen, E. *Interconversion of verbenols and verbenone by identified yeasts isolated from the spruce bark beetle Ips typographus*. J Chem Ecol. 1984, vol. 10, no. 9, s. 1349–1361.
- Leufvén, A., Birgersson, G. *Quantitative variation of different monoterpenes around galleries of Ips typographus (Coleoptera:Scolytidae) attacking Norway spruce*. Can J Bot. 1987, vol. 65, no. 5, s. 1038–1044.
- López-Goldar, X., Villari, C., Bonello, P., Borg-Karlson, A. K., Grivet, D., Zas, R., Sampedro, L. *Inducibility of plant secondary metabolites in the stem predicts genetic variation in resistance against a key insect herbivore in maritime pine*. Frontiers in Plant Science. 2014, vol. 133, s. 573–583.
- Lubojacký, J., Holuša, J. *Comparison of spruce bark beetle (Ips typographus) catches between treated trap logs and pheromone traps*. Šumarski list. 2011, vol. 135, no. 5–6, s. 233–242.
- Mayo, P., Silk, P., Cusson, M., Beliveau, C. *Steps in the biosynthesis of fuscumol in the longhorn beetles Tetropium fuscum (F.) and Tetropium cinnamopterum Kirby*. J Chem Ecol. 2013, vol. 39, no. 3, s. 377–389.
- Nakládál, O., Sova, J. *Comparison of two types of ECOLURE lure on Ips typographus (L.) (Coleoptera: Scolytidae)*. Journal of Forest Science. 2010, vol. 56, no. 12, s. 609–613.
- Netherer, S., Kandasamy, D., Jirošová, A. et al. *Interactions among Norway spruce, the bark beetle Ips typographus and its fungal symbionts in times of drought*. J Pest Sci. 2021, vol. 15, s. 22–37.
- Pettersson, E.M. *Volatile attractants for three pteromalid parasitoids attacking concealed spruce bark beetles*. Chemoecology. 2001, vol. 11, no. 2, s. 89–95.
- Pettersson, E.M., Boland, W. *Potential parasitoid attractants, volatile composition throughout a bark beetle attack*. Chemoecology. 2003, vol. 13, no. 1, s. 27–37.

- Pfeffer, A. *Fauna ČSR. Svazek 6, Kůrovci – Scolytinae (řád: Brouci – Coleoptera)*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd. 1955, s. 324.
- Robert, J. A., Madilao, L. L., White, R., Yanchuk, A., King, J., Bohlmann, J. *Terpenoid metabolite profiling in Sitka spruce identifies association of dehydroabietic acid, (+)-3-carene, and terpinolene with resistance against white pine weevil*. Botany-Botanique. 2010, vol. 88, no. 9, s. 810–820.
- R core team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020, available from WWW:<https://www.R-project.org/>
- Schiebe, C., Blaženec, M., Jakuš, R., Unelius, C.R., Schlyter, F. *Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges*. J Appl Entomol. 2011, vol. 135, no. 10, s. 726–737.
- Schiebe, C., Hammerbacher, A., Birgersson, G., Witzell, J., Brodelius, P. E., Gershenson, J., Schlyter, F. *Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle*. Oecologia. 2012, vol. 170, no. 1, s. 183–198.
- Schlyter, F., Birgersson, G., Byres, J.A., Lofqvist, J., Bergstrom, G. *Field response of spruce bark beetle, Ips typographus, to aggregation pheromone candidates*. J Chem Ecol. 1987, vol. 13, no. 4, s. 701–716.
- Schlyter, F., Byers, J.A., Löfqvist, J. *Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing – Density-regulation mechanisms in bark beetle Ips typographus*. Journal of Chemical Ecology. 1987, vol. 13, no. 6, s. 1503–1523.
- Six, D.L., Wingfield, M.J. *The role of phytopathogenicity in bark beetle–fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm*. Annu Rev Entomol. 2011, vol. 56, no. 1, s. 255–72.
- Skrøppa, T., Solheim, H., Hietala, A. *Variation in phloem resistance of Norway spruce clones and families to Heterobasidion parviporum and Ceratocystis polonica and its relationship to phenology and growth traits*. Scandinavian Journal of Forest Research. 2015, vol. 30, no. 2, s. 103–111.
- Skuhřavý, V. *Lýkožřout smrkový (Ips typographus L.) a jeho kalamity*. 1. vyd. Praha: Agrospoj. 2002, s. 196. ISBN 80-7084-238-5
- Solheim, H. *Fungal succession in sapwood of Norway spruce infested by the bark beetle Ips typographus*. Eur J For Pathol. 1992, vol. 22, no. 3, s. 136–148.

- Solheim, H., Krokene, P. *Growth and virulence of mountain pine beetle associated blue-stain fungi, Ophiostoma clavigerum and Ophiostoma montium*. Can J Bot. 1998, vol. 76, no. 4, s. 561–566.
- Sullivan, B.T., Berisford, C.W. *Semiochemicals from fungal associates of bark beetles may mediate host location behavior of parasitoids*. J Chem Ecol. 2004, vol. 30, no. 4, s. 703–717.
- Sun, Xl., Yang, Q.Y., Sweeney, J.D. et al. *A review: chemical ecology of Ips typographus (Coleoptera, Scolytidae)*. J. of For. Res. 2006, vol. 17, no. 1, s. 65–70.
- Viiri, H. *Fungal associates of the spruce bark beetle Ips typographus L. (Col. Scolytidae) in relation to different trapping methods*. Journal of Applied Entomology. 1997, vol. 121, no. 1-5, s. 529–533. ISSN: 1439-0418.
- Wadke, N., Kandasamy, D., Vogel, H., Lah, L., Wingfield, B.D., Paetz, C., Wright, L.P., Gershenzon, J., Hammerbacher, A. *The bark-beetle-associated fungus, Endoconidiophora polonica, utilizes the phenolic defense compounds of its host as a carbon source*. Plant Physiol. 2016, vol. 171, no. 2, s. 914–931.
- Wang, Y., Lim, L., Madilao, L., Lah, L., Bohlmann, J., Breuil, C. *Gene discovery for enzymes involved in limonene modification or utilization by the mountain pine beetle-associated pathogen Grosmannia clavigera*. Appl Environ Microbiol. 2014, vol. 80, no. 15, s. 4566–4576.
- Wermelinger, B. *Ecology and management of the spruce bark beetle Ips typographus – a review of recent research*. For Ecol Manag. 2004, vol. 202, no. 1-3, s. 67–82.
- Wood, D.L. *Selection and colonization of ponderosa pines by bark beetles*. In: van Emden HF (ed) *Insect/plant Relationships*. Royal Entomological Society Symposium No. 6. Blackwell Scientific Publications Oxford, England. 1972, vol. 6, s. 101–107.
- Zahradník, P., Zahradníková, M. 2014. *Evaluation of the efficacy duration of different types of pheromone dispensers to lure Ips typographus (L.) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)*. Journal of forest science. 2014, vol. 60, no. 11, s. 456–463.
- Zhang, Q-H., Schlyter, F. *Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles*. Agr For Entomol. 2004, vol. 6, no. 1, s. 1–20.
- Zhang, Q-H., Schlyter, F. *Redundancy, synergism, and active inhibitory range of non-host volatiles in reducing pheromone attraction in European spruce bark beetle Ips typographus*. Oikos. 2003, vol. 101, no. 2, s. 299–310.
- Zhang, Q-H., Schlyter, F., Anderson, P. *Green leaf volatiles interrupt pheromone response of spruce bark beetle, Ips typographus*. J Chem Ecol. 1999, vol. 25, no. 12, s. 2847–2861.

Zhao, T., Axelsson, K., Borg-Karlson, A.K. *Fungal symbionts of the spruce bark beetle synthesize the beetle aggregation pheromone 2-methyl-3-buten-2-ol*. J Chem Ecol. 2015, vol. 41, no. 9, s. 848–852.

Zhao, T., Kandasamy, D., Krokene, P., Chen, J., Gershenson, J., Hammerbacher, A. *Fungal associates of the tree-killing bark beetle, Ips typographus, vary in virulence, ability to degrade conifer phenolics and influence bark beetle tunneling behavior*. Fungal Ecol. 2019b, vol. 38, s. 71–79.

Zhao, T., Krokene, P., Hu, J., Christiansen, E., Björklund, N., Långström, B., Solheim, H., Borg-Karlson, A.K. *Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner*. PLoS One. 2011b, vol. 6, no. 10, s. 26649.

Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky 2019. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2020, s. 128. ISBN 978-80-7434-571-5.