

# Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

excelentní tým pro mitigaci



**Specializace kůrovců *Ips duplicatus* a *Ips typographus*  
k hostitelským vůním**

Diplomová práce

Autor: Jan Prchal

Vedoucí práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

2023

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Jan Prchal

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Specializace kůrovců *Ips duplicatus* a *Ips typographus* k hostitelským vůním**

Název anglicky

**Olfactory specialization of bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus* to host volatiles**

### Cíle práce

Kůrovci (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) vyhledávají hostitele pomocí čichových signálů. V současné době probíhá intenzivní výzkum čichové fyziologie kůrovce *Ips typographus*. U tohoto druhu víme mnoho o způsobu vnímání látek a jejich zpracování v mozku, které vytváří základ pro behaviorální reakce. Avšak způsob, jak *I. typographus* rozpozná hostitele, není znám. Abychom lépe pochopili, jaké čichové charakteristiky definují hostitele jako hostitele, zaměříme se na kůrovce, kteří kolonizují stejné stanoviště. Ačkoli tyto druhy sdílejí stejného hostitele, jejich preference s ohledem na jeho kvalitu se liší. To může být tím, že vnímají a zpracovávají rozdílné typy chemických látek smrkové vůně, ale přesto všechny druhy musí poznat správný druh. Abychom pochopili rozdílné chování kůrovců s ohledem na hostitele, je nutné definovat klíčové chemické látky, které hostitele charakterizují a látky, které kůrovci vnímají.

V navrhované diplomové práci chceme analyzovat vůně smrku různého stáří a různých částí s cílem zjistit, jak jsou vnímány dvěma druhy kůrovců, které smrk kolonizují, *I. typographus* a *I. duplicatus*.

Uvedené druhy v endemických fázích preferují oslabené stromy, ale při vyšších populačních hustotách preferují živé stromy. Dospělci obou druhů přezimují v kůře nebo v hrabance a na jaře vylétají a kolonizují hostitele. U obou druhů jsou to pionýrští samci, kteří hledají hostitele a hloubí podkorní snubní komůrky v lýku. V průběhu zahájení kolonizace samci emitují agregační feromony, aby přilákali další jedince obou pohlaví. Feromon *I. duplicatus* je dvousložková směs sestávající z racemického ipsdienolu a E-myrcenolu. Feromon *I. typographus* je také dvousložkový a je tvořen směsí – 2-methyl-3-butenolu a cis-verbenolu. Oba druhy jsou polygamičné, mají 1-3 generace ročně a larvy pod kůrou vyžirají podobné galerie. *I. typographus* častěji kolonizuje spodní části smrků, zatímco *I. duplicatus* se soustředí především na jejich horní části a velké větve nebo na stromy mladší. Na rozdíl od *I. typographus*, *I. duplicatus* zřídka kolonizuje vývraty a padlé stromy nebo lapáky (ležící i stojící). Tyto rozdíly v chování mohou souviset s odlišnou skladbou vůní emitovaných hostitelem, odlišnou citlivostí jejich čichových orgánů nebo rozdíly v jejich zpracování v mozku.

V plánované práci se chceme zaměřit na chemickou analýzu vůní smrku, čichových schopností kůrovců *I. typographus* a *I. duplicatus* a na srovnání spekter látek, které vnímají. Studie bude kombinovat klasické chemicko-ekologické techniky, jako je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a plynová chromatografie s biologickou (elektroantennografickou) detekcí (GC-EAD).

V práci budeme testovat následující hypotézy:

- 1) smrková vůně se liší v závislosti na stáří a části stromu
- 2) srovnávání kůrovci vnímají stejné látky

Výsledky mohou vést k identifikaci látek pro studované druhy doposud neznámých. Srovnání spekter těkavých látek, které kůrovci vnímají, umožní odpovědět na otázku, zda jsou pozorované preference pro kvalitu hostitele dané rozdílným spektrem emitovaných látek, rozdíly v jejich detekci čichovými orgány kůrovců nebo jejich zpracováním v mozku. Práce přispěje k poznání druhů, které jsou významnými škůdci a vytvoří základ pro další zkoumání základní fyziologie jejich čichových receptorů. Není vyloučeno, že studie přinese i poznatky využitelné v praxi.

#### **Metodika**

Metodicky bude práce založena na sběru těkavých látek smrků a jejich analýzách pomocí GC-FID, GC-MS a GC-EAD.

**Doporučený rozsah práce**

40-60

**Klíčová slova**

Ips typographus, Ips duplicatus, GC-EAD, GC-MS

**Doporučené zdroje informací**

- Andersson et al., 2009 Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single-cell responses to ecologically relevant odors. *Journal of Insect Physiology* 55 (2009) 556–567, doi:10.1016/j.jinsphys.2009.01.018
- Andersson 2021 Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Psyche* Volume 2012, Article ID 149572, 14 pages doi:10.1155/2012/149572
- Holuša and Grodsky, 2008. Occurrence of *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) on pines (*Pinus* sp.) in the Czech Republic. *Journal of Forest Science*, 2008, roč. 54, č. 5, s. 234 – 236. ISSN: 1212-4834
- Holuša J, Lubojacký J and Knížek M, 2010a. Distribution of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* in the Czech Republic: spreading in 1997-2009. *Phytoparasitica*, 38, 435–443.
- Jeger M. et al., Pest categorisation of *Ips duplicatus*. 2017. Scientific opinion EFSA Journal 2017;15(10):5040. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5040
- Kalinová et al., 2004 Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions* (2014) 8:305–316 DOI 10.1007/s11829-014-9310-7
- Lubojacký et al., 2018. Atraktivita stromových lapáků pro lýkožrouta severského. *Zprávy lesnického výzkumu* 63, 2018: 48-52.
- Olsson and Hanson 2013. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. Chapter 12 in Kazushige Touhara (ed.), *Pheromone Signaling: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1068, DOI 10.1007/978-1-62703-619-1\_11, © Springer Science+Business Media, LLC 2013
- Schiebe et al., 2012 Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia* (2012) 170:183–198 DOI 10.1007/s00442-012-2298-8
- Schiebe et al., 2019 Styrene, (+)-trans-(1R,4S,5S)-4-Thujanol and Oxygenated Monoterpenes Related to Host Stress Elicit Strong Electrophysiological Responses in the Bark Beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01070-8>

**Předběžný termín obhajoby**

2022/23 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

**Garantující pracoviště**

Excelentní tým pro mitigaci

**Konzultant**

Ing. Jaromír Hradecký, PhD

Elektronicky schváleno dne 1. 7. 2021

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 1. 12. 2021

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Děkan

V Praze dne 06. 09. 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Blanky Kalinové, CSc. Všechny použité informační zdroje jsem řádně citoval a zároveň je uvedl v seznamu použité literatury na konci práce.

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

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

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

V Praze dne .....

.....

Podpis autora

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval RNDr. Blance Kalinové, CSc. za velmi odbornou a ochotnou pomoc při vedení mé práce a zároveň za přátelský přístup. Ing. Jaromíru Hradeckému, PhD. za chemickou analýzu vzorků těkavých látek smrku a identifikaci přítomných látek. Dále děkuji Ing. Jaromíru Bláhovi za cenné rady, praktickou a odbornou pomoc při elektrofyziologických experimentech v laboratoři a Mayuri Kashinat Shewale za spolupráci při získávání vzorků extraktů těkavých látek smrku.

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

## Abstrakt

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je společně s lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*) největším škůdcem smrkových porostů v České republice a Evropě.

Přestože způsob kolonizace hostitele je u obou druhů velmi podobný, existují významné rozdíly. *Ips typographus* preferuje starší stromy a dolní části kmenů, *Ips duplicatus* napadá mladší stromy, případně horní části starších stromů a větve.

Lýkožrout smrkový při kolonizaci vytváří ohniska a je silně přitahován i popadanými stromy. Lýkožrout severský napadá dřeviny nepravidelně roztroušené v porostu a ležící dříví nenapadá.

Tyto rozdíly v chování mohou být způsobeny rozdílným složením těkavých látek produkovaných různými částmi stromu různého věku, nebo rozdílnou čichovou schopností, kdy oba druhy vnímají jiné typy látek. V úvahu také připadá možnost, že oba druhy vnímají stejné spektrum látek, liší se však odlišným zpracováním v mozku a následným vznikem jiných podnětů v chování.

Tato práce měla za úkol analyzovat složení těkavých látek různých částí různě starých smrků, identifikovat komponenty smrkové vůně, identifikovat čichově aktivní látky pro jednotlivé druhy a následně porovnat jejich čichové schopnosti.

Analýza vůní byla provedena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), čichově aktivní látky byly zjišťovány pomocí plynové chromatografie s biologickou (elektroantennografickou) detekcí (GC-EAD).

V analyzovaných smrkových vůních bylo nalezeno celkem 34 čichově aktivních látek, 17 z nich jsme dokázali jednoznačně identifikovat. Jsou to látky  $\alpha$ -pinen, kamfen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-karen, limonen,  $\beta$ -felandren, 1,8-cineol, terpinolen, camfor, pinokamfon, borneol, isopinokamfon, verbenon, bornylacetát, longifolen a trans-karyofylen. Jednotlivé směsi různých částí či různě starých smrků se vzájemně neliší skladbou látek (kvalitativně), ale různou koncentrací jednotlivých látek (kvantitativně). U látek  $\alpha$ -pinen, thujanol, kubenen, E- $\beta$ -farnesen a germakren D byly nalezeny rozdíly vnímání mezi studovanými druhy.

Zjištěné poznatky z této práce přispívají k odhalení smyslového vnímání kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Výsledky mohou být podkladem pro další výzkumy,

které se budou zabývat vlivem identifikovaných látek na chování studovaných druhů kůrovců.



## Abstrakt

Bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus* are economically important pest of spruce forests in the Czech republic and in Europe. Although the behavior of these species during host colonization is very similar, there are species specific differences in host preferences. *Ips typographus* prefers to attack older trees, mostly the lower part of the trunk, *Ips duplicatus* attacks younger trees or upper part of the old trees and their branches. *Ips typographus* creates focused infested areas within the forest and is highly attracted to fallen trees. *Ips duplicatus* on the other hand choose trees scattered in the forest and is not attracted at all to fallen trees. These differences in their behaviour can be driven by different composition of volatile compounds produced by different parts of the tree or of different age, or can be the result of different olfactory abilities of compared bark beetle species. There is also a possibility that both species recognize the same spectrum of compound, but they analyzed them differently in the brain, which then influence bark beetles behavior.

The aim of this work was to: I) analyze the composition of volatile compounds from different parts of spruce and of different ages, II) identify the olfactory active components of the spruce odor, and III) compare the olfactory abilities of both species.

Spruce volatiles were analyzed using gas chromatography with mass detection (GC-MS), olfactory active compounds were determined using gas chromatography with biological (electroantennographic) detection (GC-EAD), where bark beetle antenna served as a biological detector.

A total of 34 active compounds were found in analyzed spruce odors, 17 of them were chemically identified. These compounds are  $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene, myrcene, 3-carene, limonene,  $\beta$ -phellandrene, 1,8-cineole, terpinolene, camphor, pinocamphone, borneol, isopinocamphone, verbenone, bornylacetate, longifolene and trans-caryophyllene. Between odours obtained from spruce of different age or of different parts were no differences in qualitative composition, only quantitative changes in their concentrations were found. Differences in antennal perception between the two studied species were found for compounds  $\alpha$ -pinene, sabinene hydrate, cubebene, E- $\beta$ -farnesene and germacrene D.

The results from this work expand our understanding about the olfactory perception of bark beetles *I. typographus* and *I. duplicatus*. The results in this master thesis represent a basis for further research to understand, how olfactory active compounds affect the behavior of studied species.

## **Klíčová slova**

*Ips typographus*, *Ips duplicatus*, GC-EAD, GC-MS, *Picea abies*, čichová specializace

## **Key words**

*Ips typographus*, *Ips duplicatus*, GC-EAD, GC-MS, *Picea abies*, olfactory specialization

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce .....	3
3. Literární rešerše.....	4
3.1 <i>Ips typographus</i> .....	4
3.2 <i>Ips duplicatus</i> .....	5
3.3 Taxonomie kůrovců .....	6
3.4 Fylogenetický rozdíl mezi <i>Ips typographus</i> a <i>Ips duplicatus</i> .....	7
3.5 Smyslové schopnosti kůrovců.....	7
3.6 Způsob kolonizace hostitele.....	10
4. Metodika .....	14
4.1 Používané přístroje.....	14
4.2 Chov brouků.....	18
4.3 Příprava vzorků – extrakce těkavých látek ze smrkové kůry rozpouštědlem pro GC - MS .....	20
4.4 Jímání smrkové vůně na adsorbent a následné vymytí rozpouštědlem.....	21
4.5 Zapojení tykadla.....	22
4.6 Prováděné experimenty .....	26
5. Výsledky .....	32
5.1 GC - MS analýza vzorků Headspace .....	32
5.2 GC - EAD analýza smrkové vůně.....	34
5.3 Identifikované látky ve smrkové směsi pro <i>Ips typographus</i> a <i>Ips duplicatus</i> .....	35
5.4 Testování látek pomocí standartů .....	37
5.5 Odlišnost smrkové vůně v závislosti na stáří a části stromu.....	38
5.6 Odlišnost složení vůní různých částí stromů a stromů různého stáří.....	42
5.7 Vnímají kůrovci stejné látky? .....	46
6. Diskuze.....	47
7. Závěr .....	50
8. Seznam použité literatury.....	52
9. Přílohy.....	59

# 1. Úvod

V České republice zaujímají lesy celkem 34,1 % její rozlohy. Přes 70 % lesních porostů jsou lesy jehličnaté (50 % smrkové a 16 % borové), 17 % tvoří lesy listnaté, z nichž 9 % tvoří lesy bukové a 7 % dubové.

Od roku 2015 sužuje smrkové monokultury silná kůrovcová kalamita. V roce 2020 bylo v ČR evidováno rekordních 21,9 mil. m<sup>3</sup> vytěženého kůrovcového dříví (Zelená správa 2020). Jedná se o dříví napadené převážně lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*), který je často doprovázen lýkožroutem lesklým (*Pityogenes chalcographus*) a lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*).

Lýkožrout smrkový (IT) je tradičně největší a nejsilnější škůdce smrkových porostů nejen u nás, ale i v Evropě. V poslední době se však ukazuje jako velký škůdce i lýkožrout severský (ID). První záznamy o jeho výskytu u nás se datují v první polovině 20. století. V současné době se vyskytuje na celém území ČR (Holuša a kol. 2006; Wermelinger a kol. 2020).

Chování obou druhů kůrovců je velmi podobné. Oba druhy přednostně kolonizují smrk. Při hledání hostitele jsou významné chemické informace zprostředkované chemickými smysly, především čichem. U obou druhů vyhledávají hostitele samci, kteří hloubí pod kůrou snubní komůrky. Během kolonizace hostitele samci produkují účinný agregační feromon, IT vytváří směs - cis-verbenolu a 2-metyl-3-buten-2-olu, zatímco ID vylučuje ipsdienol a E – myrcenol. U obou druhů láká agregační feromon obě pohlaví. Mezi srovnávanými druhy však také existují významné rozdíly v nárocích na hostitele. IT napadá starší stromy v dolní části kmene, ID kolonizuje mladší stromy a u starších přednostně napadá horní části stromu. IT vytváří v lesním porostu tzv. ohniska - nově kolonizované stromy jsou obvykle v těsné blízkosti původních již napadených dřevin. ID kolonizuje jednotlivé stromy, které jsou nepravidelně roztroušené v porostu. Zatímco IT je velmi přitahován tzv. lapáky (pokácené smrky), lýkožrout severský ležící dříví nenapadá (Holuša a kol. 2010). Pozorované rozdíly v preferenci srovnávaných druhů k různým částem různě starých smrků mohou být způsobeny buď tím, že různé části stromu produkují těkavé látky

různého složení, nebo tím, že porovnávané druhy kůrovců mají odlišné čichové vybavení tzn. vnímají jiné typy těkavých látek. Alternativně také mohou oba druhy vnímat stejné spektrum látek, ale v čichových centrech mozku mohou být stejné smyslové vstupy rozdílně interpretovány a tím mohou vznikat odlišné podklady pro pozorované chování.

Tato práce se zaměřuje na analýzu složení těkavých látek různých částí různě starých smrků (*Picea abies*) a na porovnání čichových schopností kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus*.

## 2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit:

- I) zda se liší složení vůní různých částí smrku a složení stromů různého stáří
- II) porovnat čichové schopnosti obou druhů kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus*

Srovnání spekter těkavých látek může ukázat, zda jsou preference kvality hostitele dané rozdílem ve složení těkavých látek, rozdíly v detekci čichovými orgány kůrovců nebo jejich rozdílným zpracováním v mozku. Práce přispěje k poznání studovaných druhů a vytvoří základ pro další zkoumání základní fyziologie a jejich čichových receptorů.

Opěrnými výsledky pro splnění cílů bude dále:

- A) identifikace hlavních komponent smrkové vůně
- B) identifikace čichově aktivních látek u *Ips typographus* a *Ips duplicatus*

Kombinací klasických chemicko - ekologických technik, jako je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), plynová chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (GC-FID) a plynová chromatografie s biologickou (elektroantennografickou) detekcí (GC-EAD), bude docíleno nastavených cílů.

### 3. Literární řešerše

#### 3.1 *Ips typographus*

*Ips typographus* je velice hojný euroasijský druh, jehož areál výskytu se rozprostírá od Japonska, velkou částí Sibíře skrze střední Evropu až k Pyrenejím. Z pohledu zeměpisné šířky je tento druh zaznamenán v severních tundrách a dosahuje až k horám balkánského poloostrova. Křístek, Urban (2013) uvádí, že původním biotopem lýkožrouta smrkového je horský smrkový les, kde se může vyskytovat až do 2000 m n. m. Díky hospodářské aktivitě se smrk rozšířil i do nepůvodních biotopů včetně nížin (Zahradník, Knížek 2007).

Lýkožrout smrkový dorůstá velikosti 4 - 5,5 mm. Dospělí brouk je lesklý tmavohnědě až černohnědě zbarvený s výrazným zlatavým ochlupením. Krovky jsou lesklé bez teček (Pfeffer 1989). Na zádi se vyskytují prohnuté krovky společně se čtyřmi zuby na každé straně. Z nichž třetí zub je největší (Schlyter, Cederholm 1981).

Pfeffer (1989) uvádí, že v průběhu jedné sezóny se dokáží v našich podmínkách vyvinout až tři generace. Požerek bývá jednoramenný až třiramenný. Samci na napadeném hostiteli *Picea abies* vytváří pod kůrou snubní komůrky. V průběhu této činnosti uvolňují do okolí agregační feromony, které lákají obě pohlaví. Základní složky tohoto feromonu jsou 2-metyl-3-buten-2-ol (MB) a *cis*-verbenol (cV) (Zahradník a kol. 1993). Samci se obvykle páří až se třemi samicemi. Oplozené samičky následně vytvářejí matečné chodby, rovnoběžné s osou stromu, kde nakladou až 60 vajíček. Po dvou týdnech se z vajíček líhnou apodní larvy, které vytvoří chodbičky kolmé k matečné chodbě. Během následujících dvou týdnů se larvy 3x svléknou a následně se zakuklí. Po 7 až 14 dnech se vylíhne bílý brouk, který pro dokončení vývoje potřebuje až tři týdny úživný žír (Zumr 1995). Během tohoto období brouk pohlavně dospívá, tělo se sklerotizuje a následně je brouk schopen vylétnout (Byers 2004; Křístek, Urban 2013). Poměr pohlaví nové generace je 1:1 (Wermelinger 2004). Při vyšších populačních hustotách rodičovská generace brouků vyletuje z původního hostitele a na nových stromech zakládá tzv. sesterské generace (Skuhřavý 2002; Zahradník 2004). Před výletem a zakládáním sesterských generací tito brouci potřebují další úživný žír, pomocí kterého obnoví své tukové zásoby



a letové svaly pro následné kolonizování nových stromů. Zimu brouci přečkávají ve svrchní vrstvě hrabanky v okolí napadeného stromu nebo přímo v kůře hostitele (Zumr 1995). Mnohdy přezimují některé larvy nebo kukly v mateřském stromě (Byers 2004; Wermelinger 2004; Kindlmann a kol. 2012).

Čichovým orgánem lýkožrouta jsou tykadla. Zahradník a kol. (2013) popisuje tykadla, která jsou žlutohnědá a zakončená paličkou, na kterých se vyskytují vlnkovité oblasti čichových senzil a oblasti bez nich. Toto specifické uspořádání smyslových oblastí na tykadlech se nazývá švy (Gries 2009).

### **3.2 *Ips duplicatus***

Původní rozšíření druhu *Ips duplicatus* se nachází v severních částech Evropy v přirozených oblastech jeho hostitele, smrku ztepilého. Toto území se rozprostírá od Švédska a Finska, pobaltské státy, Bělorusko, severské tajze napříč Ruskem až po ostrov Sachalin (Lekander a kol. 1997). V České republice byl zaznamenán v 70. letech 20. století. Od roku 1997 se u nás vyskytuje již po celém území (Pfeffer, Knížek 1995). Jeger a kol. (2017) uvádí, že se tento druh v Evropě šíří velice rychle a v současné době je jeho výskyt zaznamenán již v 15 evropských státech (Knížek, Holuša 2007; Holuša, Lubojacký, Knížek 2010).

Lýkožrout severský je v dospělosti 2,8 - 4,5 mm velký. Je lesklý, černohnědě nebo černě zbarvený. Na rozdíl od *Ips typographus* nemá krovky zakončené rovnoměrně rozmístěnými 4 páry zubů, ale prostřední dva páry zubů jsou oproti ostatním v těsné blízkosti. U samců je třetím pár zoubků největší s typickým rozšířením na jeho konci. Dalším poznávacím znakem druhu je tečkované mezirýží na krovkách (Knížek, Holuša 2007).

Požerek bývá z pravidla dvou až třiramenný a jeho tvar silně připomíná tvar požerku druhu *Ips typographus*, avšak je celkově menší. V našich podmínkách má *Ips duplicatus* dvě až tři generace. Třetí generace zakládá během velmi suchých a teplých sezónách. Snubní komůrku vytváří samci a lákají samičky pomocí specifického agregačního feromonu (Holuša a kol. 2012). Ten má na rozdíl od kůrovce smrkového odlišné složení, jeho základní složky jsou ipsdienol a E-myrcenol. Samci se páří zpravidla až se čtyřmi samicemi. Spárené samičky kladou do matečných chodbiček až 60 vajíček. Poté následuje obdobný cyklus vývoje, který můžeme

pozorovat u druhu *Ips typographus*. Délka samotného vývoje od založení požerku, až po ukončení úživného žíru trvá 6 - 8 týdnů (Grodzki 1999; Knížek, Holuša 2007; Křístek, Urban 2013).

*Ips duplicatus* přezimuje pouze jako dospělý brouk v hrabance či kůře (Mrkva 1994; Pfeffer, Knížek 1995; Holuša a kol. 2003). Tykadla jsou paličkovitá, žlutohnědé barvy. Palička tykadla má zřetelně zprohýbané švy, které se zřetelně liší od lýkožrouta smrkového.

Požerky IT a ID jsou často míšeny s požerky jiných druhů, především s požerky lýkožrouta lesklého (*Pityogenes chalcographus*), lýkožrouta menšího (*Ips amitinus*) a lýkohuba matného (*Polygraphus poligraphus*).

### 3.3 Taxonomie kůrovců

Taxonomické zařazení podle (Lobl, Smetana 2011).

Říše: Živočichové (Animalia)

Podříše: Mnohobuněční (Metazoa)

Kmen: Členovci (Arthropoda)

Podkmen: Vzdušnicovci (Tracheata)

Nadtřída: Šestinozí (Hexapoda)

Třída: Hmyz (Insecta)

Řád: Brouci (Coleoptera)

Podřád: Všežraví (Polyphaga)

Nadčeleď: Curculionidae

Čeleď: Nosatcovití (Curculionidae)

Podčeleď: Kůrovci (Scolytinae)

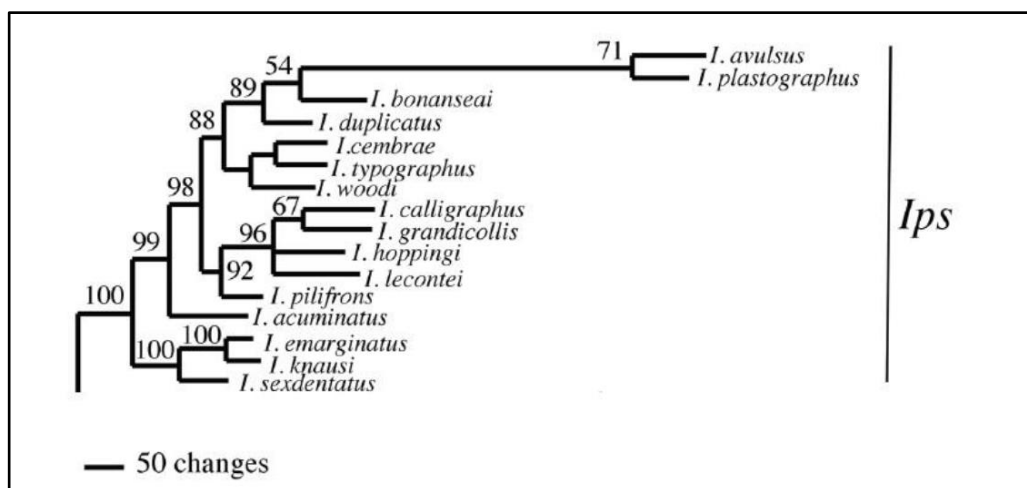
Rod: lýkožrout (*Ips*)

Celkem je do skupiny kůrovcovití řazeno na 5000 druhů. Na území České republiky se nachází celkem 106 zástupců (Zahradník a kol. 1993).

### 3.4 Fylogenetický rozdíl mezi *Ips typographus* a *Ips duplicatus*

Díky velkému množství bionomických a fenotypových podobností, jsou IT a ID velmi často navzájem zaměňováni. Oba druhy se však geneticky významně liší v jaderné i v mitochondriální DNA (Coganto 2013) (obrázek 1). Nejedná se tedy o blízce příbuzné druhy kůrovců (Lakatos a kol. 2007).

Zatímco genetická struktura IT je jednotná pro celý areál rozšíření, v rámci druhu ID byly objeveny dva hlavní haplotypy, evropský a asijský, které se od sebe liší 0,8 % sekvencí genů. Evropský a asijský haplotyp se také liší poměry hlavních feromonových komponent (ipsdienol a E-myrcenol) a přítomností třetí feromonové komponenty - amitinolu v asijské populaci (Lakatos a kol. 2007).



Obrázek 1: Analýza nukleotidů z 5 genu rodu *Ips*, vyjádřena pomocí fylogenetického stromu prokazující poměrně vzdálenou příbuznost druhů *Ips typographus* s *Ips duplicatus*. Zdroj: Cognato (2013).

### 3.5 Smyslové schopnosti kůrovců

Jak uvádí Myles (2002) mezi základní smysly hmyzu patří zrak, hmat, sluch, čich a chuť. Zrak, hmat a sluch vnímají fyzikální signály, jako jsou elektromagnetické vlnění, vibrace, tlak, a teplo. Čich a chuť vnímají chemické signály, jako jsou těžké látky, CO<sub>2</sub>, nebo látky rozpustné ve vodě (sladké, slané, kyselé a hořké podněty).

Zrak kůrovců je vyvinut slabě, v očích se nachází 100 - 240 omatidií a celkem dva typy barevných receptorů. Kůrovec používá zrak hlavně k orientaci v prostoru a při přistávání na kmen hostitele. V kombinaci s čichem nejspíše slouží i k výběru vhodného stromu ke kolonizaci (Byers 2004).

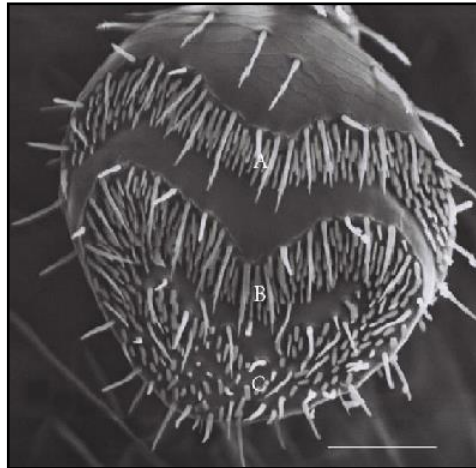
Hmat a sluch vnímají hmatové a vibrační signály. Kůrovci mají na celém povrchu těla stejně jako na tykadlech velké množství hmatových sensil. Tyto mechanoreceptory se patrně podílí i na vnímání akustických signálů, kterými se kůrovci pod kůrou dorozumívají. Akustické signály používají kůrovci při namlouvání (slouží jako podklad pro výběr sexuálního partnera) a jako prostředek regulující disperzi samic a larev pod kůrou a tím ovlivňují i samotnou podobu požitku např. počet chodeb a jejich rozložení (Chapman 1998).

Chemické smysly jsou chuť a čich.

Samotné chuťové signály jsou vnímány kontaktními chemoreceptory (Jánský, Novotný 1981). Čichem jsou vnímány těkavé látky, jako jsou hostitelské vůně nebo agregační či inhibiční feromony (Schlyter a kol. 1987).

Chuťové receptory jsou umístěny kolem kusadel, na nožičkách, na zadečku, nebo na tykadlech (Schlyter a kol. 1987). Tykadla jsou hlavním čichovým orgánem (Klutsch a kol. 2009). Na tykadlech se nacházejí morfologicky velmi rozmanité čichové senzily (Nowinská, Brožek 2017).

Nejčtenější jsou čichové senzily v podobě vlásků (sensila trichodea), které fungují jako orgány pro detekci feromonů, pro vnímání různých rostlinných vůní slouží senzily v podobě kratších a silnějších kolíků (sensila basiconica). Malé kolíky v jamkách (sensila coeloconica) se podílí na vnímání dusíkatých sloučenin (amoniak, aminy), kyselin a aromatických látek (Byers 2004). Všechny typy čichových senzil mají typicky perforovaný kutikulární povrch (Nowinská, Brožek 2017). Otvory (póry), o průměru 10 - 25 nm, pronikají těkavé látky do nitra senzil, kde reagují s čichovými receptory čichových receptorových neuronů (Byers 2004).



**Obrázek 2: Ventrální strana paličky tykadla. Oblasti označené A, B a C jsou zprohýbané pásy senzil, které obsahují čichové receptorové neurony - ORN. Zdroj: Andersson a kol. (2009).**

Různé typy čichových senzil obsahují různé typy čichových receptorových neuronů. Ty detekují těkavé látky (vůně) prostřednictvím čichových receptorů, které se nachází na neuronálních výběžcích uvnitř čichových senzil. Čichové receptory jsou velice citlivé a specifické. Každý čichový neuron je vybaven pouze jedním typem čichových receptorů. To znamená, že každý receptorový neuron dokáže vnímat jeden určitý set voňavých molekul (Andersson 2011). Při interakci čichového receptoru s molekulou vůně vzniká podráždění, které je provázeno změnou napětí mezi vnitřkem neuronu a jeho extracelulárním prostorem (změna tzv. membránového potenciálu neuronu) (Andersson a kol. 2009). V případě, že je podráždění dostatečně silné, čichový neuron generuje specifické elektrické signály (akční potenciály), které jsou vedeny neuronálními výběžky čichových neuronů ze senzil do mozkových čichových center. Zde jsou signály z různých neuronů analyzovány, integrovány a slouží jako podklad pro vznik specifické reakce na čichový podnět (Anderson 2011).

Změny elektrického potenciálu, které provází interakci vůně a čichových neuronů, lze zaznamenávat a následně vyhodnocovat elektrofyziologickými metodami. Čichové vnímání kůrovců je v poslední době velmi studováno. Pozornost je zaměřena především na IT. Čichové schopnosti jiných druhů jsou prozkoumány jenom okrajově.

U IT bylo doposud prozkoumáno celkem 150 čichových receptorových neuronů, které bylo možné rozdělit do 17ti různých skupin s ohledem na jejich citlivost k feromonům, hostitelským a nehostitelským těkavým látkám. Ze zkoumaného počtu čichových neuronů jich nejvíce reagovalo na hlavní složku agregačního feromonu,

*cis*-verbenol. Pro druhou složku agregačního feromonu, 2-metyl-3-buten-2-ol, bylo objeveno výrazně menší množství receptorových neuronů. Navzdory tomu, že tato složka je produkována ve větším množství. Dále byly objeveny silně specifické skupiny neuronů, které vnímají jednotlivé monoterpeny hostitelských jehličnanů a neurony, které jsou schopné vnímat nehostitelské rostlinné látky (Andersson 2011).

### 3.6 Způsob kolonizace hostitele

Oba druhy studovaných kůrovců (IT i ID) lze považovat za sekundární škůdce (Knížek, Holuša 2007). Způsob, jakým oba druhy napadají hostitele je podobný, ale každý druh má specifické zvláštnosti.

*Ips typographus* ke svému vývoji preferuje stromy starší 60 let na teplých osluněných stranách lesního porostu. Při běžné populační hustotě (endemická fáze) napadá popadané dříví, polomy nebo stromy, které jsou fyziologicky oslabené např. poškozené vichřicí, sněhem nebo nejčastěji stromy poškozené suchem. Plně zdravé dřeviny se pomocí pryskyřice dokáží ubránit kůrovcovým útokům. Změna situace však nastává, je-li populační hustota vysoká (epidemická fáze). Při této situaci dochází k nedostatku vhodných hostitelů a kůrovec tak napadá i zdravé stromy, které je schopen díky svému vysokému počtu usmrtit. Vznikají tak ohniska žíru. Díky agregačnímu feromonu 2-metyl-3-buten-2-ol (MB) a *cis*-verbenolu (cV) dokáže koncentrovat aktivitu velkého množství brouků na kolonizaci jednoho stromu, překonat jeho obranu a úspěšně založit novou generaci. Agregační feromony se vytvářejí ve střevě samců. Při samotném náletu lýkožrouta smrkového dochází nejprve k napadení spodní části stromu, postupně se napadení šíří i do vyšších částí. Naopak při napadení již ležícího stromu, samci kolonizují kmen po celé jeho délce (Zahradník, Knížek 2007). V případě, že se na napadeném stromě vyskytuje velký počet brouků, hrozí nedostatek potravy pro ideální vývoj nové generace. V takovém případě kůrovci přestávají tvořit agregační feromon a nově tvoří feromon anti-agregační (kombinace ipsenolu a verbenonu), který inhibuje atraktivitu napadeného stromu a způsobuje přesměrování přilákaných brouků na okolní stromy (Schlyter a kol. 1987; Paine a kol. 1997). Verbenon navíc napomáhá regulovat rovnoměrné rozptýlení kůrovců na kmeni stromů (Skuhřavý 2002). Není zcela přesně znám způsob, jak brouci poznají optimální populační hustotu. Pro přežití je správná populační hustota při kolonizaci hostitele velmi důležitá.

*Ips duplicatus* si vyhledává stojící roztroušené stromy v porostu. Při této taktice nevznikají ohniska žíru, a proto je složitější identifikovat napadení právě tímto druhem. Kolonizaci hostitele synchronizuje stejně jako IT agregačním feromonem, kterým je ipsdienol a E-myrcenol. Přílišnou koncentrací na jednom hostiteli reguluje feromonem anti-agregačním, kterým je podobně jako u IT směs verbenonu a ipsenolu. Na rozdíl od IT, ID nikdy neobsazuje ležící kmeny (lapáky, polomy). Takto poškozené dřevo napadá jen velmi zřídka. Složitý je i odchyt do samotných stojících lapáků (stojících stromů s přerušným lýkem). Při napadení hostitele je útok brouka soustředěn do horní (korunové) části stromu. Stáří napadených porostů se pohybuje v rozmezí 40 - 80 let. V horní části stromu si může ID prostorově konkurovat s kůrovcem *Pityogenes chalcographus* (Zahradník, Knížek 2007).

Schlyter a kol. (1992) soudí, že oba kůrovci ID a IT mají velmi dobrou vzájemnou komunikaci, jelikož vždy napadají jiné části kmene hostitele, důvodem jsou jejich rozdílné agregační feromony, které jsou vzájemně inhibiční a zabraňují napadení stejné části oběma druhy. Působení agregačního feromonu je u kůrovců podporováno uvolňujícími terpenickými látkami z rostlinných tkání, které se poškodí během hloubení snubních komůrek (Seybold, Bohlmann, Raffa 2000).

Při hloubení snubních komůrek pod kůrou hostitele kůrovci poškodí pryskyřičné kanálky, ze kterých se uvolňuje pryskyřice. V případě, že je strom v dobré kondici, tj. není poškozený a má dostatek vody, pryskyřice dosahuje síly tlaku až 1,5 MPa. Množství a tlak pryskyřice, tak dokáže pronikající brouky usmrtit. Složení a konzistence vyteklé pryskyřice se po vylití postupně chemicky mění. V procesu tvrdnutí pryskyřice se vypařují monoterpeny a seskviterpeny a následně krystalizují diterpeny. Během tohoto procesu vznikne tvrdá hmota, která tvoří tvrdou záplatu proti vniknutí dalších patogenů stromu. Proces hojení rány stromu pokračuje zapouzdřením buněk v okolí hojivým pletivem. Konečná fáze hojení nastává tvorbou nových struktur parenchymatických buněk. Pryskyřice však nepůsobí jen mechanicky zalitím útočících brouků, ale je i toxická pro dospělé a larvy. Kůrovec však dokáže některé z těchto toxických látek odbourávat, a dokonce je využívá ke svému prospěchu. Usuzuje se, že agregační feromony, jsou právě produkty detoxifikace. Například oxidací  $\alpha$  pinenu ve střevech lýkožrouta smrkového vzniká *cis*-verbenol, což je detoxikační produkt

a současně hlavní komponent agregičního feromonu IT (Jakuš, Holuša, Blaženec 2015).

Krokene, Solheim (1996) popisují, že IT i ID při kolonizaci hostitele přenáší různé patogeny, například houby, které napadají vodivá pletiva a tím tak snižovat vitalitu stromů blokadou transportu vody. Tím napomáhají při vyšších populačních hustotách kůrovců udolat i zdravé stromy. Známým houbovým patogenem je zejména rod *Ceratocystis* (Byers 2004).

Princip, jakým kůrovec dokáže najít vhodného hostitele ke kolonizaci je předmětem velké diskuze (Schlyter a kol. 1987; Byers a kol. 1990; Turčáni, Vakula 2008; Kalinová a kol. 2014). Jedna hypotéza tvrdí (Rudinský a kol. 1971; Tømmeras, Mustaparta 1987), že kůrovec vyhledává hostitele ke kolonizaci na základě na dálku působících čichových informací (tzv. primárních atraktantů). Tømmeras, Mustaparta (1987), také uvádí, že na tykadlech kůrovců *Ips typographus* se vyskytují specifické čichové receptory reagující na těkavé látky, které se uvolňují z kůry hostitelských stromů a které tak mohou být významným navigačním stimulem.

Alternativní hypotéza soudí, že kůrovec nalézá vhodného hostitele náhodným způsobem během svého disperzního letu po vylíhnutí. Tato hypotéza čerpá ze zjištění, že po vylíhnutí se jedinci lýkožrouta rozptylují do okolí v rádiu až 40 km a během svého letu několikrát odpočívají. Během těchto odpočinkových zastávek mohou kůrovci posoudit stav stromů, pomocí chemických informací při blízkém kontaktu, a tak vyhodnotit jejich potenciál ke kolonizaci.

Navzdory těmto nejasnostem je nesporné, že kůrovci *Ips typographus* jsou velmi bohatě vybaveni čichovými receptory. Tito kůrovci mají více než 73 typů čichových receptorů, a tím pádem jsou schopni vnímat velké spektrum vůní. Reakce byla u *Ips typographus* zjištěna na více než 30 sloučenin, mezi které patřily smrkové monoterpenové uhlovodíky ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen a delta-3-karen). Dále pak sloučeniny jako například myrcen, p-cymen, limonen, kafr či verbenon (Kalinová a kol. 2014).

Ačkoliv pozitivní reakce *Ips typographus* na hostitelské vůně jsou prozatím nepřesvědčivé, bylo zjištěno, že lýkožrout smrkový je silně odpuzován vůněmi nehostitelských rostlin, zvláště listnatých stromů zejména břízy a buky. Tyto nehostitelské látky, které jsou vylučovány z listů nebo kůry listnatých stromů,



tak působí repelentně. Čím větší je koncentrace těchto látek v daném prostředí, tím více se zvyšuje šance porostu, že nebude kůrovcem napaden. Nehostitelské látky negativně ovlivňují schopnost kůrovců vyhledávat hostitele a snižují účinnost agregáčního feromonu. Andersson a kol. (2011) pomocí feromonových lapačů zjistili, že vzdálenost mezi zdrojem feromonu a zdrojem nehostitelské vůně musí být menší, než jeden metr, aby nehostitelské látky snížily atraktivitu feromonu u *Ips typographus*.

Předpokládá se, že základní principy navigace k hostiteli, reakce na agregáční feromon a interference s nehostitelskými látkami jsou u ID podobné, jako byly popsány pro IT. Konkrétně ale není známo, které hostitelské látky ID vnímá, jakými typy a počty čichových neuronů je vybaven. Rovněž není znám důvod rozdílného způsobu kolonizace či rozdílné preference obou druhů pro specifické části jednotlivých stromů. Tyto rozdíly v chování mohou souviset s odlišnou skladbou vůní emitovaných hostitelem, odlišnou citlivostí jejich čichových orgánů nebo rozdíly v jejich zpracování v mozku (Byers 1988; Schlyter a kol. 1987; Turčáni, Vakula 2008; Schiebe a kol. 2015).

## 4. Metodika

Pro splnění všech cílů byla zvolena kombinace následujících technik:

### I. Získání smrkových voňavých vzorků.

- extrakce těkavých látek ze smrkové kůry rozpouštědlem
- zachytávání těkavých látek na adsorbent a následná extrakce rozpouštědlem

### II. Analýza těkavých látek smrku pomocí GC-MS, GC-FID a GC-EAD

- stanovení identity jednotlivých látek na základě MS spekter, KI indexů a tam, kde to bylo možné, srovnání se syntetickými standardy
- stanovení čichové aktivity jednotlivých látek u IT
- stanovení čichové aktivity jednotlivých látek u ID
- srovnání čichových schopností mezi druhy IT a ID

Fotografie nacházející se v této práci byly pořízeny autorem v únoru 2022.

### 4.1 Používané přístroje

Pro zpracování výsledků z experimentů jsme využívali plynovou chromatografii

s biologickou detekcí (GC - EAD), dále byla použita plynová chromatografie s hmotnostní (MS) detekcí. Pomocí GC - EAD byly rozděleny jednotlivé látky z používaných vzorků smrku a určeny jejich antenální aktivity. GC - MS byla použita k chemické identifikaci antenálně aktivních látek.

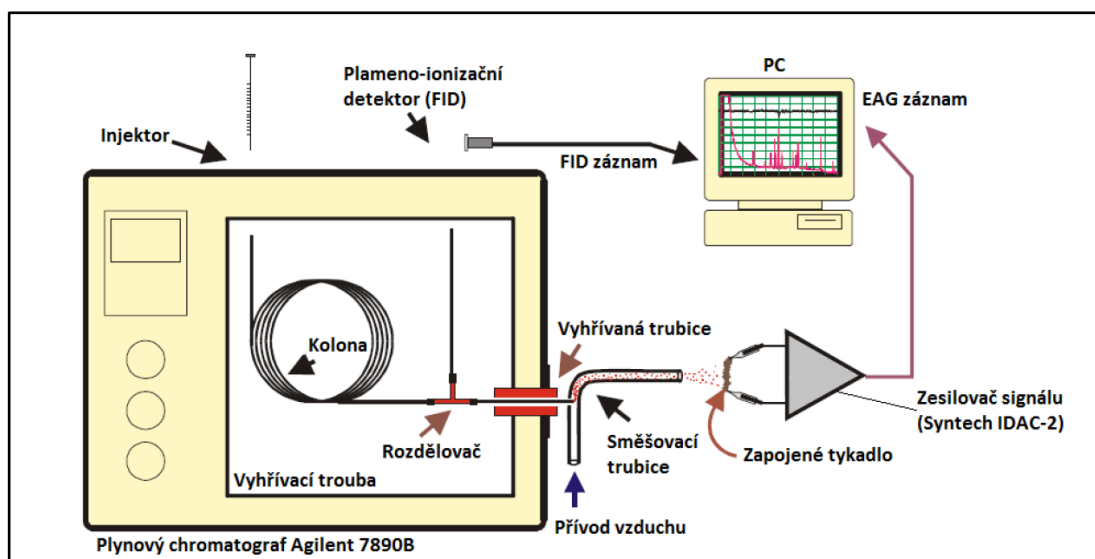
GC-MS kombinuje separaci látek na chromatografické koloně (vysvětleno níže) se specifickým tzv. hmotnostním detektorem (MS), který se používá na určení hmot volných molekul a jejich částí. MS detektor nejprve ionizuje látky (ionizace využívá proud elektronů) a poté slouží jako iontově optické zařízení, kdy z plynných směsí molekul a iontů separuje nabitě částice na základě jejich efektivních hmot ( $m/z$ ) a měří jejich intenzity. Podle vzájemných vztahů mezi molekulárními, fragmentačními ionty, a jejich intenzitami se provádí predikce totožnosti testovaných látek. Způsob ionizace udává charakter hmotového spektra, uspořádání iontů a způsob registrace

iontů a signál je zpracován specifickým akvizičním softwarem (Sparkman, Penton, Kitson 2011; Olsson, Hansson 2013).

V GC-MS experimentech byl využíván tzv. time-of-flight (TOF) MS detektor, který umožňuje měřit MS spektra rychle a ve vysokém hmotnostním rozsahu.

GC-EAD vznikla spojením dvou metod. Plynové chromatografie (GC) a elektroantennografické detekce (EAD). Princip plynové chromatografie (GC) umožňuje dělení a analýzu směsí těkavých látek. Dělení probíhá na chromatografické koloně (křemenná kapilára 0,23 mm tenká a až 30 m dlouhá, jejíž vnitřní povrch je pokryt speciální vrstvičkou, tzv. stacionární fází). Separace látek začíná po nástřiku do vyhřívaného injektoru, kde se látky zplyní a následně jsou unášeny nosným plynem (zpravidla helium či vodík) do kolony. Těkavé látky se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a poté se desorbují nosným plynem, který unáší látky směrem ke konci kolony a detektoru. Tento proces se neustále opakuje. Různé složky vzorků interagují se stacionární fází odlišně a to zapříčiňuje, že odlišné látky prochází kolonou různou rychlostí. Nakonec vychází jedna za druhou v závislosti na svých fyzikálně chemických vlastnostech a na parametrech teplotního programu, při kterém k separaci látek dochází.

GC-EAD (elektroantennografická detekce) je metoda, která zaznamená elektrické odpovědi tykadel na látky rozdělené pomocí GC. Tykadlo je tak využíváno jako biologický detektor (Myrick, Baker 2011). Klíčovou součástí GC-EAD je splitter (dělič), který umožňuje nasměrování analyzovaných látek do dvou ramen. Jedno rameno vede látky do proudu vzduchu nasměrovaném na tykadlo, druhé rameno do chromatografického detektoru (např. do tzv. plameno-ionizační detektoru, FID). FID zaznamenává retenční čas látky (čas nutný k průchodu dané látky od nástřiku k detektoru) a její kvantitu (Syntech 2004; Sparkman, Penton, Kitson 2011). Elektrické reakce tykadla na látky vycházející z GC jsou zaznamenávány dvěma elektrodami snímací a referenční. Snímací elektroda je připojena na špičku daného tykadla (oblast čichových sensil), referenční je propojena s hemolymfou tykadla nebo hlavy.



**Obrázek 3: Schéma zapojení plynové chromatografie s elektroantenografickou detekcí GC -EAD. Zdroj: Syntech (2004)**

Elektrody byly vyráběné ze skleněných trubiček (délka 10 cm, průměr 1,5 mm) pomocí vertikálního tahače elektrod (PC – 100, NARISHIGE) (viz. příloha 1) (Olsson, Hansson 2013). Zapojení tykadel mezi elektrody lze vidět na obrázku 8. Skleněné mikropipety byly naplněné Ringerovým roztokem a prostřednictvím Ag/AgCl drátků propojené s měřicí aparaturou (zesilovač a PC). Pokud z chromatografu vychází látka, kterou čichové receptory zaznamenají, tykadlo na ní reaguje změnou svého potenciálu. Signál z FID a EAD detektorů je od začátku záznamu (tj. od nástřiku vzorku na kolonu) souvisle registrován, digitalizován a veden do PC, kde je zobrazen a analyzován pomocí software Syntech GC/EAD32 (verze 4.6). Vznikne GC-EAD chromatogram (kdy se na ose y nacházejí odezvy obou detektorů a na ose x retenční čas). Každá látka vycházející z kolony je znázorněna svým FID chromatografickým píkem, který má tvar Gaussovy distribuce a jeho výška ukazuje množství dané látky. EAD odpovědi jsou charakterizovány změnou elektrického potenciálu, jehož velikost a průběh závisí na typu a koncentraci antenálně aktivní látky, resp. na typu a množství čichových receptorů na tykadle. Za daných chromatografických podmínek mají stejné látky shodný retenční čas (doba od nástřiku do průchodu látky detektorem) (Sparkman a kol. 2011; Olsson, Hansson 2013).



**Obrázek 4: Pracoviště pro vykonávání experimentů. Autor: Jan Prchal**

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

## 4.2 Chov brouků

Brouci, použiti k experimentům byly vychováni v laboratorních podmínkách. Prvotní generace *Ips typographus* pocházela ze Školního lesního podniku ČZU v Kostelci nad Černými lesy ve středních Čechách. Odtud byla dovezena z napadených stromů v nařezaných polenech. *Ips duplicatus* byl dopraven stejným způsobem z vojenského újezdu Libavá na severní Moravě. Dovezená nařezaná polena o délce 40 cm byla umístěna do chovných plastových boxů, které byly opatřeny větracím otvorem zakrytým sítkou a otvorem na odsávání vzduchu pro jeho cirkulaci. Takto připravené boxy byly umístěny v místnosti s řízeným teplotním a světelným režimem (25 °C teplota, vlhkost 60 %) a umístěny do izolátorů. První výletové otvory byly zpozorovány po třech dnech, následně došlo k oloupání polen a vybrání brouků entomologickou pinzetou. Pro založení nové generace bylo v plastovém boxu připraveno nenapadené čerstvé smrkové dřevo v podobě nařezaných polen (40 cm), které bylo dovezeno znovu ze Školního lesního podniku ČZU v Kostelci nad Černými lesy ve středních Čechách. Na takto připravená polena bylo přeneseno 80 - 100 jedinců dospělých brouků obou pohlaví. Vylíhlí brouci nové generace byli sbíráni a shromažďováni po dobu 10 dní. Poté bylo matečné poleno odkorněno a zbytek brouků byl manuálně vybrán. Z 80 - 100 brouků byla opětovně založena nová generace, zbytek byl uchován v plastové krabici s otvory s několika vrstvami plátů kůry. Po zažrání byl box s kůrou v lednici při teplotě 5 °C. Takto uchovávaní brouci byli následně odebráni na elektrofyziologické experimenty.



**Obrázek 5: Chov kůrovců v laboratoři v plastových boxech (25 C teplota, vlhkost 66 %). Polena jsou podložena papírovou utěrkou. Do boxů je přivedena hadice pro odťah vzduchu. Na víku boxu je vidět kulatý otvor zakrytý sítkou pro přívod vzduchu. Autor: Jan Prchal**

### 4.3 Příprava vzorků – extrakce těkavých látek ze smrkové kůry rozpouštědlem pro GC - MS

Ve školního lesním podniku ČZU v Kostelci nad Černými lesy byly pokáceny tři stromy stáří cca 120 let a tři stromy mladší cca 50 let. Z každého stromu byly přivezeny do laboratoře tři špalky o délce 40 cm ze spodní a horní části stromů každé kategorie. Celkem tedy bylo k dispozici 12 polen smrku.

Z každého špalku bylo vyraženo pomocí kladívka a speciálního kovového průbojníku vždy deset disků o průměru 8 - 10 mm (viz. obrázek 6). Disky se následně vložily do plastových vialek a po dobu dvou dnů byly uchovány v lednici s teplotou - 20 °C. Pro další zpracování se nožem odstranila kůra. Disky lýka byly následně rozkrájeny na drobné kousky, hluboce zmrazeny tekutým dusíkem a následně drceny v žulovém hmoždíři do formy prachu. Na analytické váze (RADWAG AS220.R2) bylo do skleněné vialky naváženo 200 mg tohoto prachu a přidáno 200 ml hexanu + ISTD (interní standart) 5 µl. Takto připravené vialky byly extrahovány po dobu 10 minut ve vodní lázni (Digital ultra sonic cleaner) při teplotě 30 °C. Po extrakci se směs přefiltrovala přes injekční filtr (Sterifix 0,2µm). Tímto krokem byly získány vyextrahované vzorky, které byly připraveny pro analýzu GC-MS. Vzorky byly uchovávány při teplotě - 20 °C do uskutečnění analýzy.

Celkem byly testovány čtyři kategorie extraktů po 10ti vzorcích. Jejich označení

- OL(1-10) = old low – spodní část starého stromu
- OU (1-10) = old up – vrchní část starého stromu
- YL(1-10) = old low – spodní část mladého stromu
- YU (1-10) = young up – vrchní část mladého stromu

Směsi byly analyzovány jak pomocí GC-EAD (alespoň 6x) a GC-MS (všechny vzorky). Za antenálně aktivní látky byly považovány ty látky, u kterých byla zaznamenána antenální reakce (odpověď) v daném místě alespoň 3x (tj. alespoň u 3 tykadel).





**Obrázek 6: Vyražené smrkové disky o průměru 8 - 10 mm, které byly následně okrájeny, hluboce zmrazeny, rozdrčeny a pomocí roztoku hexanu s interním standardem extrahovány. Autor: Jan Prchal**

#### **4.4 Jímání smrkové vůně na adsorbent a následné vymytí rozpouštědlem**

Smrkové vůně byly jímány ze stejných smrkových polen jako při extrakci vzorků, viz. výše. Tato polena byla zabalena do pečicí folie. Okraje folie byly utěsněny lepicí páskou tak, aby do prostoru kolem polen nevnikal vzduch. Následně bylo do pečicí folie vytvořeno několik průchodných otvorů, do kterých byly vsunuty skleněné trubičky obsahující adsorbent (30 mg HayeSep® Porous Polymer Adsorbent, 100-120 mesh, Sigma). Ke každému polenu bylo připojeno celkem pět filtrů, přes které vzduchové pumpičky (SKC AirChek XR5000), vysávaly přes filtry vzduch z okolí polen rychlostí 100 ml vzduchu za hodinu po dobu 24 hodin. Látky zachycené na adsorbentu byly následně vymyty pomocí 200 ml hexanu a uskladněny ve skleněných 2 ml vialkách při teplotě - 20 °C.



**Obrázek 7: Jímání smrkové vůně na adsorbent. V pravé části jsou vzduchové pumpičky, které vysávaly vzduch 24 hodin rychlostí 100 ml vzduchu za hodinu. V levé části je vidět samotné poleno ze kterého byla vůně jímána. Autor: Jan Prchal**

## 4.5 Zapojení tykadla

Aby brouci mohli správně reagovat na čichové podněty, byli cca 30 minut před zahájením experimentu vyndáni z lednice a následně byli uchováváni v Petriho misce. Během této doby se brouci aklimatizovali na teplotu okolo 20 °C. Abychom zabránili vysychání brouků, byl do Petriho misky vložen vlhký ubrousek. Pro GC-EAD experimenty bylo nejprve nutno zapojit tykadlo mezi dvě měřící skleněné elektrody (referenční a snímací elektrodu). Existuje několik způsobů snímání elektrické aktivity z tykadel: A) mezi elektrody je zapojeno pouze izolované tykadlo (obrázek 8), B) je zapojena izolovaná hlava s tykadly (příloha 4), C) zapojuje se tykadlo mechanicky fixovaného živého brouka (příloha 5).

Izolované tykadlo má poměrně omezenou životnost, tudíž i schopnost reagovat na čichové podněty. S postupem času jeho citlivost slábne, až odumře. Již v bakalářské práci (Prchal 2020) bylo zjištěno, že izolované tykadlo dokáže reagovat na čichové podněty po dobu v průměru cca 15 minut.

Živostnost tykadla s hlavou je delší, ale i tento preparát postupem času ztrácí citlivost. Bláha (2021) soudí, že nejlepší způsob zapojení pro získání stabilních odpovědí je mechanická fixace celého brouka a propojení imobilizovaného tykadla se snímací elektrodou, zatímco referenční elektroda je umístěna v hlavě. U tohoto zapojení dochází po zapojení k přechodným změnám citlivosti, ale postupně se citlivost tykadla stabilizuje a tykadlo reaguje dlouhodobě konstantně. Nevýhodou

tohoto zapojení je obtížná fixace brouka. I malé pohyby fixovaného brouka vyvolávají velké artefakty na elektrofyziologických záznamech.

Příloha 3 ukazuje souhrn poznatků výdrže tykadla tří způsobů zapojení z prací Prchal (2020) a Bláha (2021).

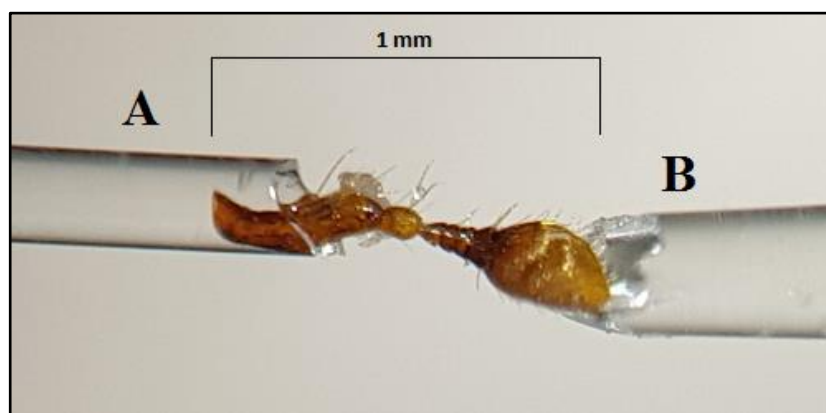
Izolované tykadlo má nejmenší odpor, tudíž i malé množství artefaktů a dobrý poměr signálu a šumu. Největší odpor má tykadlo zapojené s celým broukem. Neklidný stav EAD průběhu tykadla sťažuje a znehodnocuje jednotlivá měření.

V našich GC-EAD měření jsme využívali izolované tykadlo a přizpůsobili jsme dobu GC-EAD analýzy životnosti tykadla. Izolované tykadlo poskytovalo klidné záznamy s relativně malým počtem artefaktů a vzhledem k malému odporu preparátu také s dobrým poměrem mezi signálem a šumem.

Příloha 6 znázorňuje průběh EAD klidového stavu izolovaného tykadla při zapojení snímací elektrody ke špičce tykadla (A) a k bázi tykadla (B). Pokud je snímací elektroda připojena ke špičce nedochází ke vzniku významných artefaktů, výsledkem je dobrý poměr signál - šum.

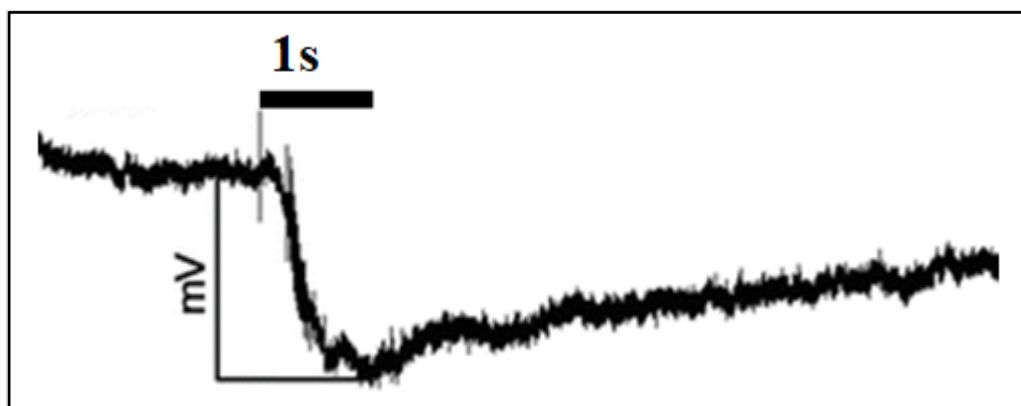
**Izolovaná tykadla** byla získávána následovně: chladem narkotizovaný brouk byl entomologickou pinzetou držen pod stereomikroskopem (zvětšení 20 - 30x) bříškem dolů. Následně mu byla skalpelem uříznuta hlava. Pomocí dvou pinzet bylo tykadlo odtrženo od hlavy. Samotné tykadlo se následně pod stereomikroskopickou kontrolou zapojilo v EAD zařízení mezi elektrody fixované v držácích mikromanipulátorů (NARISHIGE M325) s možností pohybu v osách x, y, z a stereomikroskopu (Nikon SMZ 18). Jak již bylo řečeno, tyto skleněné elektrody, byly vyrobeny vertikálním tahačem PC-100 (NARISHIGE) ze skleněných trubiček 10 cm dlouhých s průměrem 1,5 mm (viz. příloha 1 a 2). U elektrod bylo zapotřebí mírně ulomit hrot a naplnit je Ringerovým roztokem (12,2 g chloridu sodného (NaCl), 0,21 g chloridu draselného (KCl) a 0,20 g chloridu vápenatého (CaCl<sub>2</sub>) v 1 litru destilované vody. Ringerův roztok slouží k propojení tykadla a elektrody s předzesilovačem (10x, Syntech Universal Probe) a analogo-digitálním převodníkem (Syntech, IDAC-2). Propojení tykadla a elektrody předzesilovače je zprostředkováno přes stříbrné drátky, které jsou zanořeny do Ringerova roztoku elektrody. Hrot měřící elektrody byl namáčen ve vodivém gelu (Spectra 360 electrode gel, Parker),

který bránil vytékání Ringerova roztoku z elektrody po připojení k paličce tykadla. Referenční elektroda byla připojena na bázi tykadla. Správnost zapojení tykadla bylo detekováno zelenou diodou zesilovače. Při špatném zapojení svítila červená dioda.



**Obrázek 8** Konečné zapojení tykadla kůrovce mezi 2 skleněné mikroelektrody. Báze tykadla je propojena s referenční elektrodou A. Čichové senzily na paličce jsou propojeny se snímací elektrodou B. Autor: Jan Prchal

Během zapojování tykadel bylo třeba pracovat velmi opatrně tak, aby nedocházelo k poškození jemných čichových senzil na jeho povrchu. Celková doba od začátku přípravy tykadla po zahájení experimentů trvala dvě minuty.



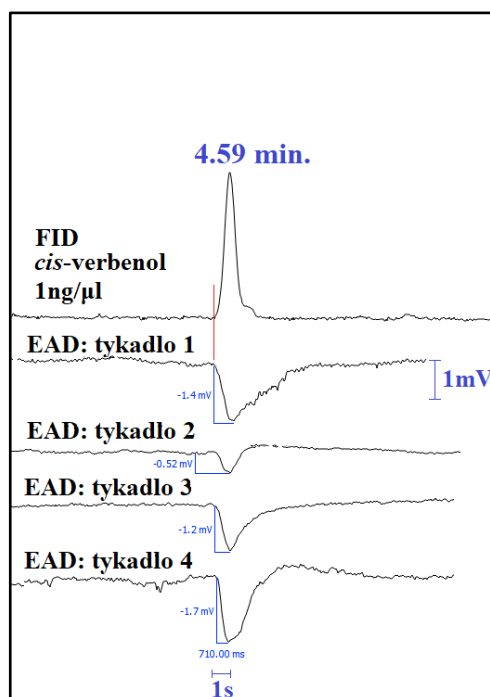
**Obrázek 9:** Ideální odpověď tykadla na stimulaci čichovým podnětem. Tykadlo na stimulaci reaguje depolarizací a následně se jeho potenciál pomalu vrací k počátečním hodnotám. Velikost amplitudy je uváděna v mV (úsečka v horní části záznamu udává dobu stimulace).

Tzv. odpověď tykadla na čichový podnět vzniká při expozici tykadla látkám, pro které jsou na tykadle receptory. Odpověď odráží změny potenciálu mezi referenční a měřící elektrodou. Typická tzv. elektroantenografická odpověď na čichový podnět

je znázorněna na obrázku 9 a je měřena v mV. Velikost odpovědi je závislá na koncentraci analyzované látky, jejím typu a citlivosti daného tykadla.

### Kontrola synchronizace retenčních časů FID a EAD

Při GC-EAD je nezbytně nutné, aby retenční chování EAD a FID signálu byla plně synchronizována. Kontrolu této synchronizace jsme prováděli pomocí látky, o které je známé, že vyvolává antenální odpovědi u studovaného druhu. Synchronizaci jsme testovali pomocí *cis*-Verbenolu, jednou ze dvou komponent agregačního feromomu IT. U některých testovacích měření docházelo k časovému posunu průběhu EAD vůči FID. To mělo za výsledek zpoždění grafických odpovědí (příloha 7), což by mohlo zkreslovat výsledky a mohlo by dojít k záměně odpovědí na daný pík. Řešením této situace byla manuální konfigurace časového posunu mezi FID a EAD signálu o -1 sekundu pomocí softwaru (Syntech GC-EAD), který jsme používali k vyhodnocování výsledků. Toto opatření srovnalo průběhy FID a EAD signálů do požadované časové souběžnosti (obrázek 10).



**Obrázek 10: Opravené zpoždění tykadla. Pro potvrzení antenálně aktivní látky je zapotřebí dosáhnout tří nezávislých odpovědí. Červená čára ukazuje správnou konfiguraci souběhu píku a odpovědi. Každé tykadlo je jiné a reaguje na stejný vjem rozdílně. Lze si všimnout rozdílných hodnot jednotlivých odpovědí i drobných rozdílů v průbězích antenálních odpovědí. Autor: Jan Prchal**

## 4.6 Prováděné experimenty

### 4.6.1 GC-MS analýza vzorků smrkových vůní získaných extrakcí kůry extrakcí hexanem a statistické zpracování metodou PCA - principal component analysis

Vzorky extraktů byly analyzovány jednorozměrnou chromatografií (GC) na dvou dimenzionálním chromatografu s hmotnostním detektorem (GCxGC-TOFMS) Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA). Chromatograf byl vybaven autosamplerem, umožňujícím nástřik kapalnou fází MPS (Gerstel, Germany) a dvěma křemíkovými kapilárními kolonami: Rxi-5MS 29,8 metrů s průměrem 0,25 milimetrů a silou vnitřního filmu 0,25 mikrometru (Agilent Technologies, USA) a BPX-50 1,29 metrů s průměrem 0,1 milimetru a silou vnitřního filmu 0,1 mikrometru (SGE, Australia). Sekundární kolona však nebyla pro analýzu použita. Nástřik vzorku do plynového chromatografu byl uskutečněn autosamplerem při teplotě 265 °C se splitovacím poměrem 1:3. Teplotní program první pece začínal na 40 °C po jednu minutu a poté se zvyšoval o 10 °C za minutu až do teploty 210 °C, od které se zvyšoval o 20 °C za minutu na konečnou hodnotu 320 °C, při níž vydržel sedm minut. Teplotní program druhé pece byl vždy o 40 °C vyšší. Jako nosný plyn se používalo helium s konstantní rychlostí průtoku 1 mililitr za minutu. Hmotnostní spektrometrický detektor s rychlým sběrem dat a s analyzátozem měření doby letu TOF Pegasus 4D (Leco Corporation, USA) byl nastaven na elektronovou ionizaci s energií -70 eV a teplotou 250 °C. Hmotnostní rozsah byl 35 – 500 m/z a akvizitní rychlost 10 spekter/s. Celá analýza jednoho vzorku trvala 30,5 minuty. Sběr a zpracování dat probíhalo přístrojovým softwarem LECO ChromaTOF verze 4.71 (Leco Corporation, USA).

V každém vzorku byly detekovány přítomné sloučeniny. Ty byly seřazeny na základě RT1, RT2 a MS spekter. Data z různých vzorků byla porovnána a pro další analýzu byly vybrány pouze sloučeniny přítomné ve většině vzorků. Celková data ze všech vzorků byla podrobena Principal Component Analysis, (PCA).

PCA je statistická metoda používaná ke snížení dimenzionality velkých souborů dat jejich transformací na menší soubory při zachování co největšího množství informací. V PCA analýze jsou látky seřazeny podle jejich podílu na variabilitě.

Pro zvýraznění rozdílů mezi vzorky byla následně provedena analýza částečné diskriminace nejmenších čtverců, tzv. PLS-DA (Partial Least Squares Discriminans Analysis).

#### **4.6.2 GC-EAD analýza smrkových vůní pro *Ips typographus* a *Ips duplicatus***

Pro analýzu antenálně aktivních látek se používala plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí (GC-EAD).

Analyzované vůně byly pomocí Autosampleru injikovány do GC. Autosampler provedl automatický nástřik měřeného roztoku o objemu 1 µl metodou splitless. Chromatografická kolona (Agilent 19091J-413: K01 HP-5), na níž byly prováděny experimenty, měla délku 30 m a průměr 0,25 µm. Tato kolona dále vedla do splitteru. Ten rozděloval proud plynů do dvou ramen v poměru 1:1. První rameno je vedeno mimo GC do směsné komůrky, kde se látky (eluát) vycházející z GC mísí s přiváděným proudem vzduchu a následně míří na zapojené tykadlo. Druhé rameno je propojeno do FID detektoru. Analýza probíhala v teplotním programu, který začínal na 30 °C, tuto hodnotu program udržoval jednu minutu, následně se teplota postupně zvyšovala 30 °C/min. až do 300 °C. Tuto teplotu program udržoval po dobu pěti minut. Poté byl celý systém zchlazen a uveden do počáteční teploty. Injektor měl teplotu 200 °C, detektor 250 °C. Celková doba analýzy trvala 10 minut.

Jako nosný plyn pro plynový Agilent 7890B (Agilent Technologies, USA) jsme používali helium (Merck, vysokotlaká bomba He 6.0) s průtokem 45,3 ml/min. Pro funkci detektoru byl zapotřebí vzduch (PEAK air generator), dusík (Merck, vysokotlaká bomba) a vodík vyráběný vodíkovým generátorem PEAK Scientific.

Zapojení izolovaného tykadla je popsáno v kapitole 6.5 - izolovaná tykadla. Takto zapojené tykadlo bylo před zahájením samotného měření umístěno k ústí směsné komory do proudu vlhčeného vzduchu. Po zapojení bylo nutné zjistit, zda zapojené tykadlo správně reaguje. K stimulaci byla použita Pasteurova pipeta, která byla naplněna kouskem kůry smrku (cca 1 x 0,5 cm). Pipeta byla připojena hadičkou ke generátoru vzduchu (CS-55, Syntech), který pomocí ovládacího pedálu vytvořil vzduchový pulz 0,5 s, kterým byla pipeta profouknuta a vzduch obohacený vůní byl přifouknut do proudu vzduchu směřujícího na tykadlo. V případě, že tykadlo

na tento stimul zareagovalo dostatečně silnou elektrickou odpovědí, byl zahájen měřicí pokus.

Pro eliminaci a minimalizaci rušivých elementů, ke kterým docházelo během analýz, byla během měření kolem zapojeného tykadla umístěna Faradayova klec (obrázek 4 – bod 8), vyrobená z kartonu obaleného hliníkovou folií. Toto stínění chránilo tykadlo před vnějšími elektrickými indukovanými jevy, statickou elektřinou a možnými vzduchovými proudy. Ve výsledcích se však přesto nacházely výchytky, které byly způsobeny vjemy, kterých jsme se snažili přecházet. Tyto vjemy jsou označovány jako artefakty měření.

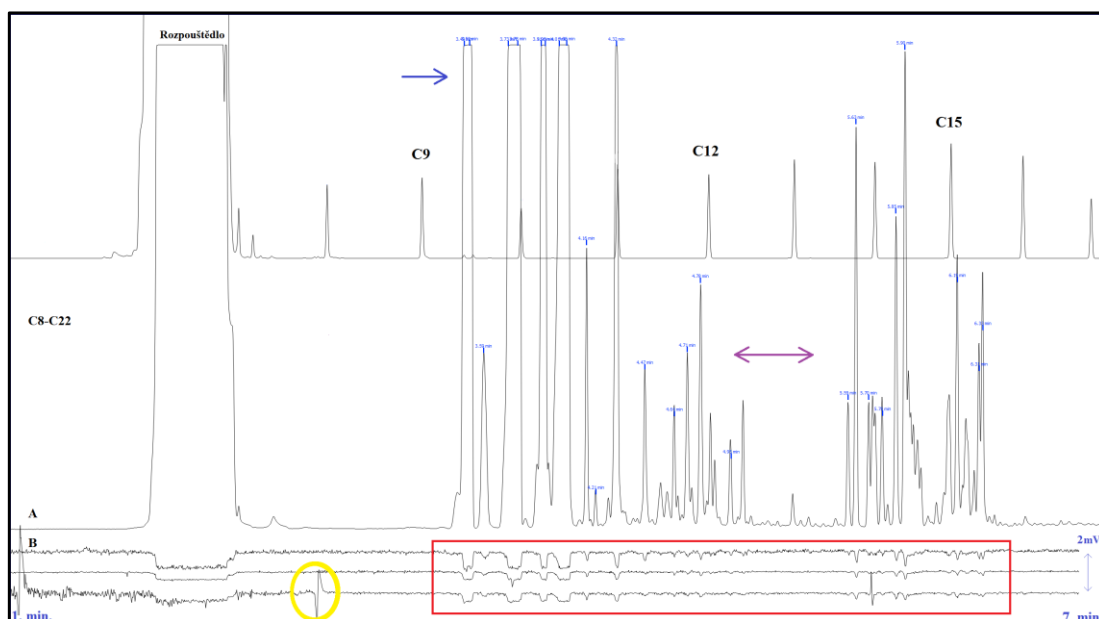
Výsledky byly vyhodnocovány pomocí software Syntech GC/EAD32 (verze 4.6).

Aktivní látky byly označeny retenčním časem (RT) a byly pro ně vypočítány retenční indexy (RI). RI neboli Kovatsův index (KI) je konstanta charakteristická pro danou látku, použitý typ kolony a zvolený teplotní program, která určuje velikost interakce látek se stacionární fází. Retenční indexy byly navrženy Kovátsem (1958) a vztahují retenční chování látek k řadě referenčních látek (nerozvětvené uhlovodíky).

$$RI = n \cdot 100 + 100 (\log RT \text{ látky} - \log RT_{,n}) / (\log RT_{,n+1} - \log RT_{,n})$$

(n = počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n-alkanu, Tr = vzorek retenčního času píku vzorku, Tr,n = retenční čas nejbližšího nižšího n-alkanu, Tr,n+1 = retenční čas nejbližšího vyššího n-alkanu).





**Obrázek 11: Příkladný záznam GC-EAD analýzy vzorku (OL1 - *Ips duplicatus*) s alkany C8-C22. V dolní části obrázku se nachází průběh A – FID záznam směsi starého stromu spodní části. Průběh B – EAD odpovědi tykadla na látky nacházející se ve směsi. V červeném označení se nachází odpovědi, které byly následně vyhodnocovány. Žluté označení znázorňuje rušivý vjem (artefakt), kterému se snažila zabránit sestavená Faradayova klec. Modrá šipka označuje velký pík, který obsahuje více než jednu látku. Fialová šipka označuje jednotlivé látky, které se nachází v analyzované směsi. Průběh alkanů C8-22 v horní části obrázku slouží pro určení KI. Obrázek znázorňuje výřez od první do sedmé minuty průběhu 10 minutové analýzy. Autor: Jan Prchal**

Obrázek 11 znázorňuje **ideální průběh GC-EAD analýzy**. Jedná se o analýzu vzorku OL1 (starý strom, spodní část) při testování druhu *Ips duplicatus*. Je možné si všimnout velkého množství píků v průběhu A (FID záznam). FID signál ukazuje, že smrková vůně obsahuje velké množství látek v různých koncentracích. Velké píky, tj. oblasti vysokých koncentrací látek, mohou obsahovat více látek s podobným retenčním chováním a různou EAD aktivitou. Tento jev zdůrazňuje modrá šipka v horní části obrázku. Průběhy B jsou EAD záznamy odpovědi snímaného tykadla. Žlutě je označen artefakt, v průběhu měření bylo cílem podobné artefakty eliminovat. Červeně označená sekce znázorňuje reakce tykadla na daný pík (antenálně aktivní látku). Fialová šipka vymezuje velké množství píku o rozdílných velikostech. Uhlovodíky C8-C22 zobrazené na horní části záznamu, slouží pro výpočet Kovatsových indexů jednotlivých látek, využívaných jako pomocný nástroj při identifikaci jednotlivých látek. Samotný průběh uhlovodíků je v příloze 8.

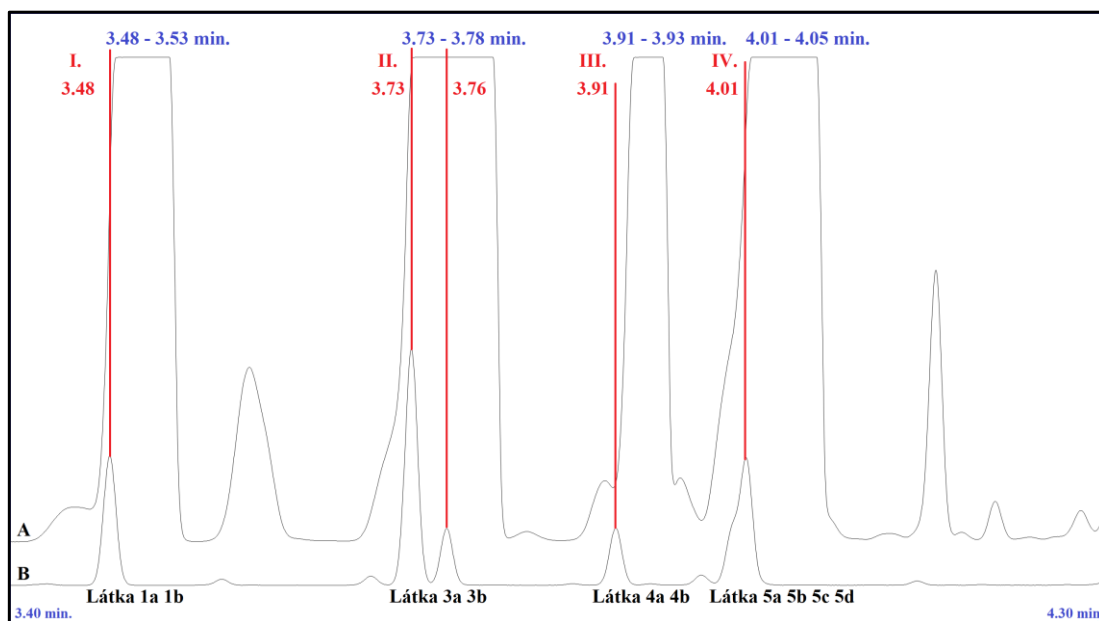
Po dokončení GC-EAD analýz jsme vyznačili EAD aktivní oblasti a provedli jsme srovnání GC-EAD analýz s využitím tykadel obou druhů *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. EAD oblasti byly charakterizovány pomocí RT a KI.

Celkem bylo vyznačeno 32 oblastí EAD aktivit (příloha 9 – 12). Vzorky, které jsme analyzovali pomocí GC-EAD byly dále podrobeny GC-MS analýze. V jednotlivých oblastech s EAD aktivitou byly předběžně identifikovány látky (na základě shody MS spekter mezi autentickými látkami a knihovnou MS spekter NIST a KI). Tyto látky jsou uvedeny v tabulce 1.

Oblasti 1, 3, 4 a 5, které v GC-EAD záznamech obsahovaly velké FID píky, byly GC-EAD analyzovány také při nižších koncentracích. Tyto analýzy ukázaly, že velké FID píky obsahují více látek dosahujících FID detektor téměř současně. Tam, kde to bylo možné, byla identita látek potvrzena srovnáním RT, KI a MS se syntetickými standardy. Látky, které byly takto identifikovány jsou vyznačeny v tabulce 1 zeleně.

Obrázek 11 (názorný průběh GC-EAD analýzy vzorku OL1 (starý strom, spodní část), ve kterém se vyskytují velké píky, označeny modrou šipkou (označené jako oblasti 1, 3, 4 a 5) obsahovaly více než jednu látku. Pomocí metody split byla směs OL1 nastříknuta v poměrovém množství 100:1. FID detektor pak zaznamenal menší koncentraci analyzované látky a došlo k vyobrazení jednotlivých píků v problematických lokalitách. Díky tomuto rozdílu jsme následně zjistili, kolik látek se nachází ve velkém píku.

Na obrázku 12 je vidět korekce látky 1a, 1b, 3a, 3b. Oblast Látky 4 a 5 byly identifikovány při nižších koncentracích.



**Obrázek 12: Identifikace velkých píků pomocí metody split 100:1. Analyzovaná látka OL1 (A) je srovnána s FID průběhem OL1 split 100:1 (B). I. - Identifikace velkého píku v RT 3,48 min. Bylo zjištěno, že ve velkém píku se nenachází více látek. II. - Ve velkém píku byly pomocí nižší koncentrace analyzované látky (split 100:1 - B) zjištěny dvě látky v RT 3.73 a 3.76 min. III. - Při porovnání s nižší koncentrací (split 100:1) byla zjištěna jedna látka v RT 3.91 min. Pomocí dalších analýz byl zjištěn výskyt většího počtu látek. IV. - Nalezení přítomné látky v RT 4.01 min. Výskyt dalších látek v této lokalitě byl zjištěn v dalších analýzách. Autor: Jan Prchal**

Vypočítané Kovatsovy indexy byly srovnávány s databází chemických látek (Adams 2007), kterou jsme používali k identifikaci látek.

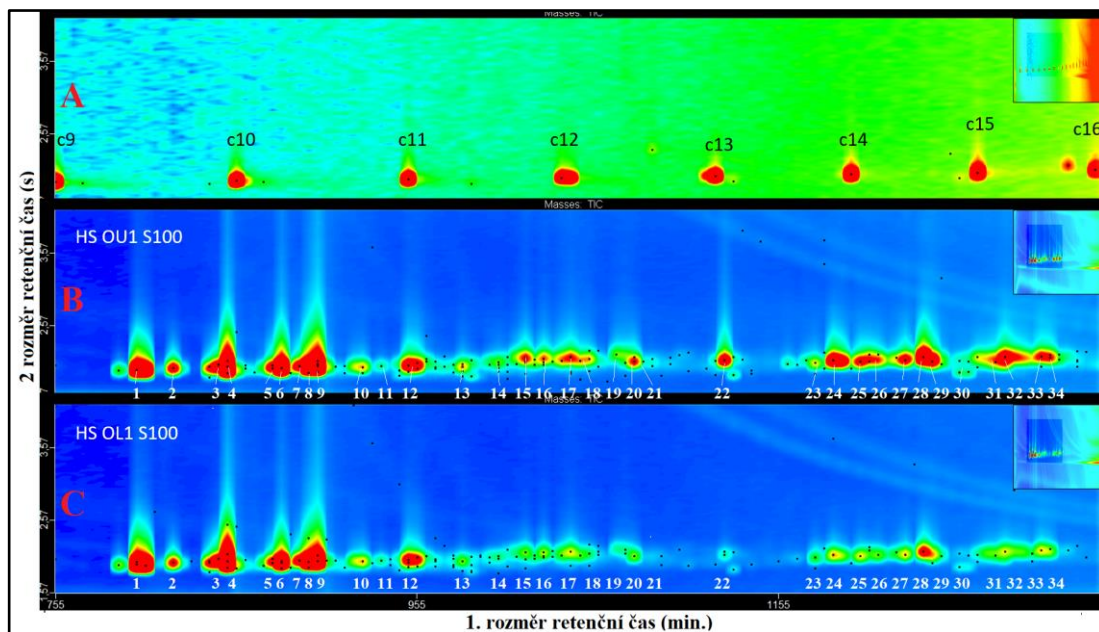
Abychom mohli prokázat, že se skutečně jedná o správně identifikované látky bylo zapotřebí provést GC analýzy jednotlivých standartů látek v koncentraci 10 ng/  $\mu$ l. Tato analýza probíhala identicky jako analýza směsí OL1, OU1, YU1 a YL3.

Výsledky těchto analýz byly následně porovnávány s FID průběhy analyzovaných směsí. Došlo tak ke grafickému potvrzení, že retenční čas standartu látky se plně shoduje s retenčním časem stejné látky obsažené v dříve analyzovaných směsí. Potvrzené látky jsou vyznačeny zeleně v tabulce 1.

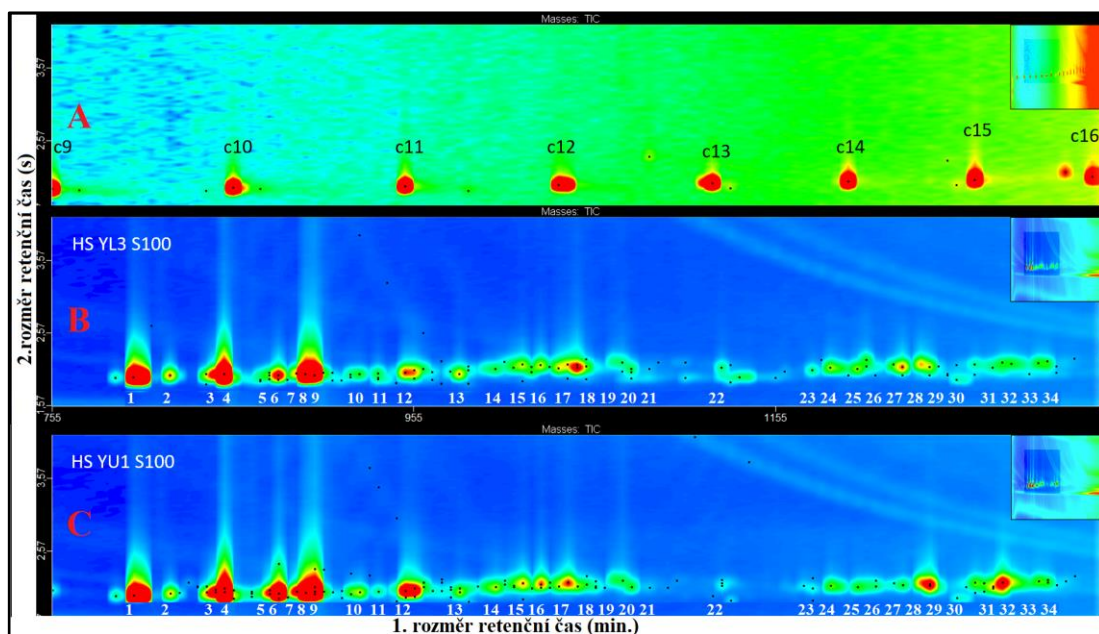
## 5. Výsledky

### 5.1 GC - MS analýza vzorků Headspace

Dvoudimenzionální analýza prokázala přítomnost celkem 34 látek. Jedná se o pomocné výsledky, které následně v kombinaci s grafickou kontrolou GC - EAD a výpočtu KI a RT byly dále identifikovány.



Obrázek 13: Dvoudimenzionální analýza vzorků. Obrázek znázorňuje 3 rozdílné analýzy. A záznam znázorňuje analýzu uhlovodíků c8 - c22. Prostřední B záznam ukazuje analýzu vůně smrku, vzorek HS OU1. Záznam C představuje analýzu vzorku HS OL1. Každá skvrna zobrazuje přítomnost určité látky. Každá látka je charakterizována 2. retenčními časy – RT v první dimenzi a RT v druhé dimenzi. Koncentrace látek je barevně kódovaná – modrá značí nejnižší koncentraci, červená koncentraci nejvyšší (podle toho látky 1, 3, 4 jsou přítomné ve velkých koncentracích, zatímco látky 13 - 21 ve velmi malých). Prostým vizuálním porovnáním skvrn v obou smrkových vzorcích vidíme, že se vzorky liší kvantitativně, ale ne kvalitativně (oba vzorky obsahují podobné látky). Autor: Jan Prchal



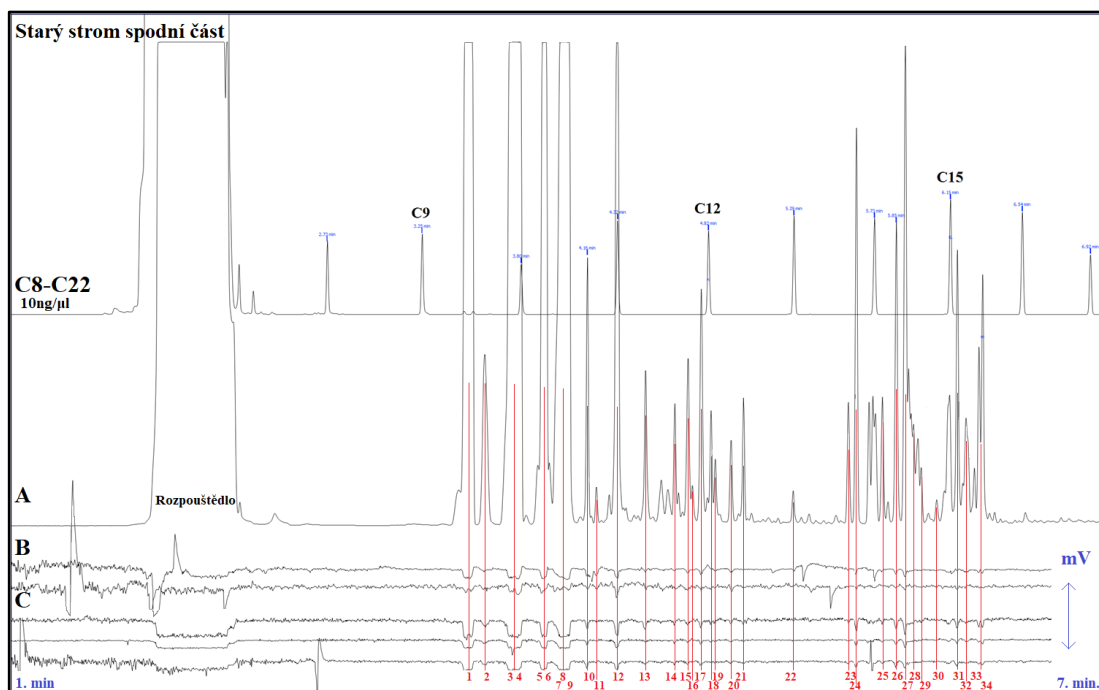
Obrázek 14: Dvourozměrná GC-MS analýza jiných smrkových vzorků. Červené skvrny zobrazují přítomnost určité látky. A obrázek zobrazuje uhlovodíky C8 - C22. B záznam - analýzu vzorku mladý strom spodní část, C - látky vzorku mladý strom vrchní část. Ostatní detaily viz popis obrázku 13. Autor: Jan Prchal

Každá látka je charakterizována dvěma retenčními časy v první a druhé dimenzi, koncentrace je jednotlivě kódována dle stupnice barevnosti, modrá barva značí nejnižší koncentraci, červená vyznačuje nejvyšší koncentraci. Na obrázku 13 je znázorněna dvoudimenzionální analýza vzorků HS OU1 - starý strom vrchní část a HS OL1 - starý strom spodní část. Je možné vidět, že vzorky se liší kvantitativně, nikoli kvalitativně, oba vzorky tak obsahují podobné látky.

Obrázek 14 znázorňuje analýzu vzorků HS YL3 - mladý strom spodní část a HS YU1 mladý strom vrchní část. Tento obrázek ukazuje stejný trend jako obrázek 13, a to kvantitativní rozdíl.

## 5.2 GC - EAD analýza smrkové vůně

Chromatografické analýzy GC-MS i GC-EAD ukázaly, jak jsou jednotlivé směsi složité. Velké množství skvrn v GC-MS a píků v GC-FID ukazuje velké množství látek. V oblastech výskytu mnoha látek jsme dokázali zaznamenat celkem 34 oblastí s EAD aktivitou. Jednotlivé směsi se mezi sebou liší koncentrací (velikostí) jednotlivých píků.



**Obrázek 15: GC-FID-EAD analýza směsi OL1 - starý strom spodní část. V horní části obrázku se nachází analýza uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží k výpočtu KI a také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn GC-FID průběh analyzované směsi (A), dva EAD záznamy pod sebou odpovědi tykadel IT (B) a tři EAD záznamy odpovědi tykadel druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní oblasti, které byly pozorovány. Aktivních látek v těchto oblastech bylo nalezeno celkem 34. V tabulce 1 jsou označená čísla přiřazena k jednotlivým látkám. V Příloze 13, 14 a 15 je možno vidět stejné vyznačení 34 aktivních látek ve směsích OU1, YU1 a YL3. Autor: Jan Prchal**

Látky, které jsou na obrázku 15 a v příloze 13, 14 a 15 označeny čísly, jsou zobrazeny v tabulce 1 v kapitole 7.3, kde jsou k jednotlivým číslům přiřazeny identifikované látky. Uvedené látky byly zjišťovány kombinací v GC - EAD analýzy, 2D GC - MS analýzy, výpočtu KI a RT.

### 5.3 Identifikované látky ve smrkové směsi pro *Ips typographus* a *Ips duplicatus*

Pomocí vzorce pro výpočet Kovatsových indexů byly vypočítány KI každého píku. Získané hodnoty KI byly porovnávány s KI uvedených v databázi rostlinných látek nacházejících se v jejich esenciálních olejích (Adams 2007).

Ve 32 vyznačených lokalitách bylo zjištěno celkem 34 antenálně aktivních látek. Kovatsův Index uvedený v literatuře se s námi vypočítaným KI zcela neztotožňuje (obvykle se mírně liší vzhledem k odlišnostem provedených GC-MS analýz). Pro určení pravděpodobnosti výskytu aktivní látky však postačuje, když jsou KI hodnoty podobné a retenční čas píku ve směsi a standartu se shoduje. V laboratoři jsme pomocí dostupných standardů identifikovali celkem 17 látek, které jsou vyznačeny zeleně v tabulce 1. Bíle označené látky nejsou potvrzené pomocí standardů, z důvodů jejich nedostupnosti. Látek, které nebyly potvrzeny syntetickými standardy je také 17.

Látky potvrzené syntetickými standardy jsou:  $\alpha$ -pinen, camfen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-karen, limonen,  $\beta$ -felandren, 1,8-cineol, terpinolen, kamfor, pinokamfon, borneol, isopinokamfon, verbenon, bornylacetát, longifolen a trans-karyofylen.

Látky, které jsme nedokázali potvrdit pomocí syntetických standardů, jsme navrhli podle jejich RT a podobnosti jejich hmotnostních spekter s knihovnými hmotnostních spekter. Jsou to tak látky, jejichž identita je pravděpodobná, ale není zcela jistá. Jedná se o látky:  $\alpha$ -felandren,  $\gamma$ -terpinen, trans-thujanol, trans-p-menta-2,8-dien-1-ol,  $\gamma$ -terpineol, myrtenol, metyltymoleter, kubeben a, longipinen a, cis karyofylen / 2,7 funebren,  $\alpha$  gurjunen, E- $\beta$ -farnesen,  $\gamma$ -muurolen, germakren D,  $\alpha$ -muurolen a  $\alpha$ -kadiden.

V retenčním čase 5,78 a 6,07 min. jsou v tabulce 1 uvedeny dvě látky. Jejich RT, KI i MS byly velmi podobné. Do doby jejich potvrzení tak můžeme uvažovat o jejich antenálně aktivním potenciálu jen omezeně. Jsou to látky cis karyofylen / 2,7 funebren (RT 5,78 min.) a karyofylen-9-epi -E / humulen (RT 6,07 min.)

Vypočtený Kovatsův Index v našich experimentech byl v průměru o 20 jednotek vyšší než KI uvedený v literatuře.



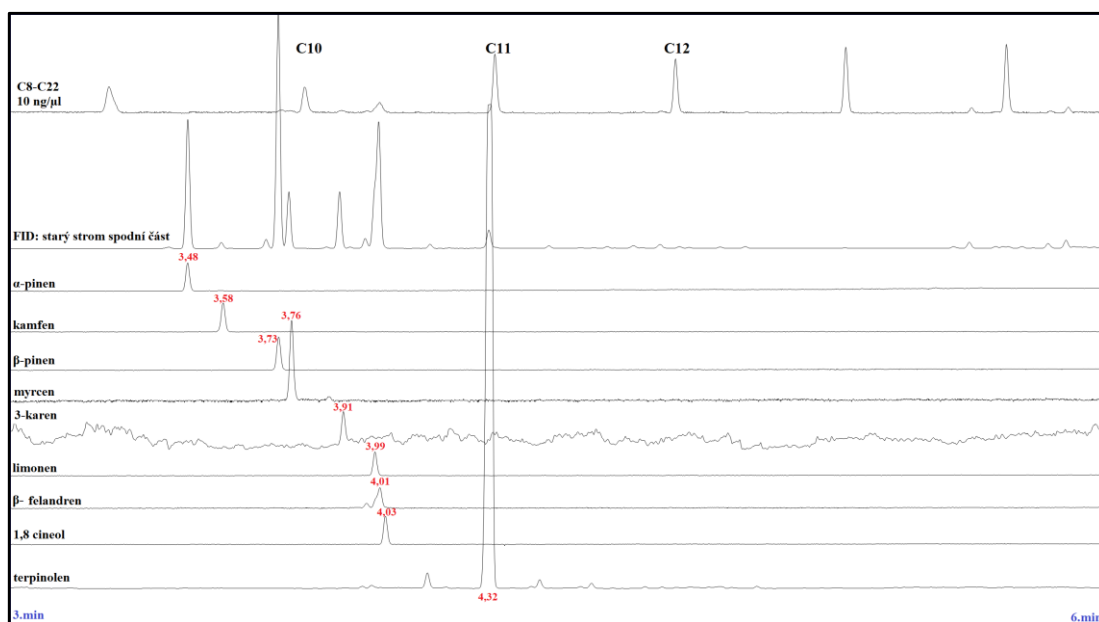
Z celkového počtu zjištěných látek, které vzbuzovaly antenální aktivitu jsme dokázali pomocí syntetických standardů s jistotou identifikovat 50 %.

Pořadí	RT (min.)	Látka	KI	KI LIT
1	3,48	$\alpha$ -pinen	945	932
2	3,58	kamfen	962	946
3	3,73	$\beta$ -pinen	988	874
4	3,76	myrcen	993	988
5	3,91	3-karen	1022	1008
6	3,93	$\alpha$ -felandren	1026	1002
7	3,99	limonen	1038	1024
8	4,01	$\beta$ -felandren	1041	1025
9	4,03	1,8 - cineol (eukalyptol)	1045	1026
10	4,15	$\gamma$ -terpinen	1068	1054
11	4,21	trans thujanol	1079	1065
12	4,32	terpinolen	1100	1086
13	4,48	trans-p-menta-2,8-dien-1-ol	1133	1119
14	4,64	kamfor	1165	1141
15	4,71	pinokamfon	1178	1158
16	4,74	borneol	1184	1160
17	4,78	isopinokamfon +	1192	1178
18	4,84	$\gamma$ -terpineol	1204	1199
19	4,86	myrtenol	1208	1195
20	4,95	verbenon	1228	1204
21	5,01	metyltymoleter	1241	1232
22	5,28	bornylacetát	1297	1287
23	5,59	kubeben $\alpha$	1369	1345
24	5,63	longipinen $\alpha$	1377	1350
25	5,78	cis karyofylen / 2,7 funebren	1412	1413-1425
26	5,86	$\alpha$ gurjunen	1431	1419
27	5,89	longifolen	1438	1407
28	5,93	trans-karyofylen	1448	1432
29	5,99	E- $\beta$ -farnesen	1462	1454
30	6,07	karyofylen-9-epi -E / humulen	1481	1464
31	6,19	$\gamma$ -muurolen	1510	1478
32	6,24	germakren D	1523	1484
33	6,31	$\alpha$ -muurolen	1541	1500
34	6,33	$\alpha$ -kadinen	1547	1537

Tabulka 1: Antenálně aktivní látky, které byly navrženy podle KI. Zeleně vyznačené látky jsou látky, které byly potvrzené pomocí standardu retenčním časem.



## 5.4 Testování látek pomocí standartů



Obrázek 16: Potvrzení látek  $\alpha$ -pinen, kamfen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-karen, limonen,  $\beta$ -felandren, 1,8 - cineol, terpinolen. Pro potvrzení dané látky se musí shodovat retenční čas píku antenálně aktivní látky a retenční čas píku jejího syntetického standardu. V horní části obrázku se nachází FID průběh uhlovodíků C8-C22. Ve středu obrázku a jeho spodní části se nachází FID průběhy jednotlivých standardů látek. Píky těchto látek jsou vyznačeny jejich retenčními časy. Obrázek je výřezem z celkové analýzy v rozmezí 3. - 6. minuty. Identifikaci dalších látek je možno vidět v příloze 16. Autor: Jan Prchal

Na obrázku 16 je znázorněna identifikace antenálně aktivních látek  $\alpha$ -pinen, kamfen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-karen, limonen,  $\beta$ -felandren, 1,8 - cineol, terpinolen. Retenční časy jednotlivých látek se shodují s retenčními časy standardů. Například v RT - 3,48 byl identifikován  $\alpha$ -pinen, ten se nachází ve velkém píku (oblast 1 na předcházejícím obrázku). Kamfen byl identifikován v RT 3,58 jako druhá aktivní látka v pořadí.  $\beta$ -pinen (RT 3.73) a myrcen (RT 3.76) spoluvytvářely oblast 3 (viz. přílohy 9 -12). V oblasti s RT 3.91 se potvrdila přítomnost pouze 3 - karenu. Tato látka se tak vyskytuje v silné koncentraci stejně jako  $\alpha$ -pinen. Oblast potenciálně EAD aktivních látek, která byla označena číslem 5 (viz. přílohy 9 - 12) obsahovala celkem tři látky: limonen (RT 3.99),  $\beta$ -felandren (RT 4.01) a 1,8-cineol (eukalyptol) s RT 4.03 min. U dalších identifikovaných EAD oblastí jsme potvrdili přítomnost jedné látky. Byly to terpinolen (RT 4.32), kamfor (RT 4.64), pinokamfon (RT 4.71), borneol (RT 4.74), isopinokamfon (RT 4.78), verbenon (RT 4.95), bornylacetát (RT 5.28), který má stejný retenční čas jako uhlovodík C13, longifolen (RT 5.89), trans-karyofylen (RT 5.93 min).

## 5.5 Odlišnost smrkové vůně v závislosti na stáří a části stromu

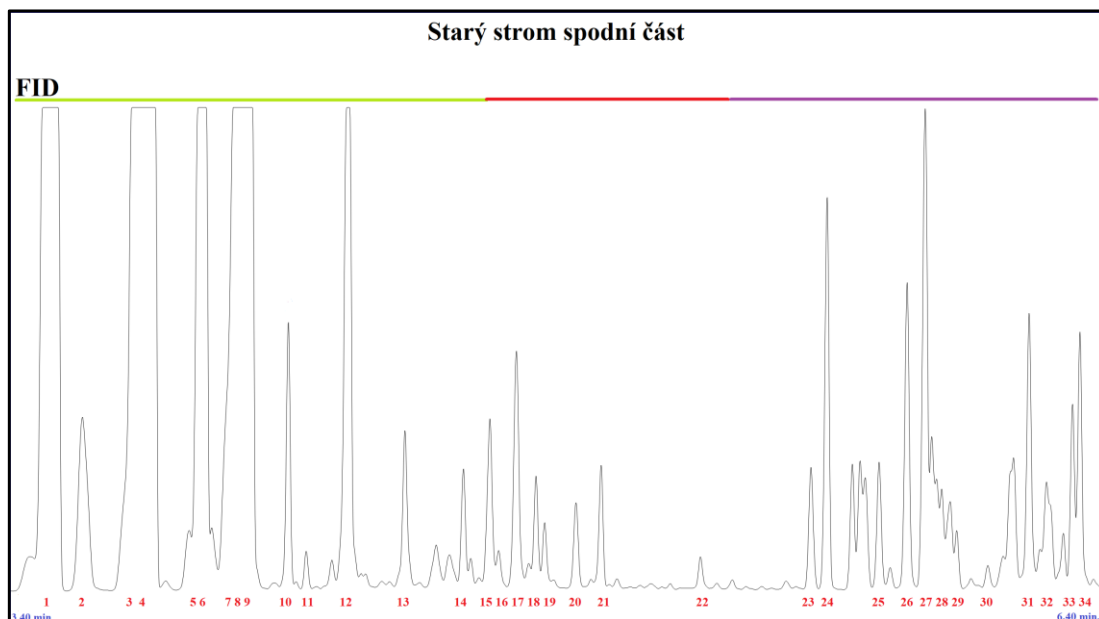
Jedna z hlavních otázek této diplomové práce byla, zda se jednotlivé vůně mezi sebou liší v závislosti na stáří stromů, ze kterého byly extrahovány a také, zda existuje rozdíl smrkové vůně získané z vrchní a spodní části stromu.

Pozorované rozdíly mohou být způsobeny mnoha faktory. Při jímání vůní z různých průměrů kmenů různých stromů je obtížné zajistit, aby kmeny měly stejnou plochu či váhu. Je tedy obtížné vzorky kvantifikovat. Proto jsme dělali extrakci, kde je koncentrace vůní vztažena na váhu disků. Pro relevantní statistické zpracování jsme pak z každé kategorie analyzovali 10 různých vzorků. Tím jsme vytvořili předpoklad pro to, abychom mohli relevantně vzorky porovnat.

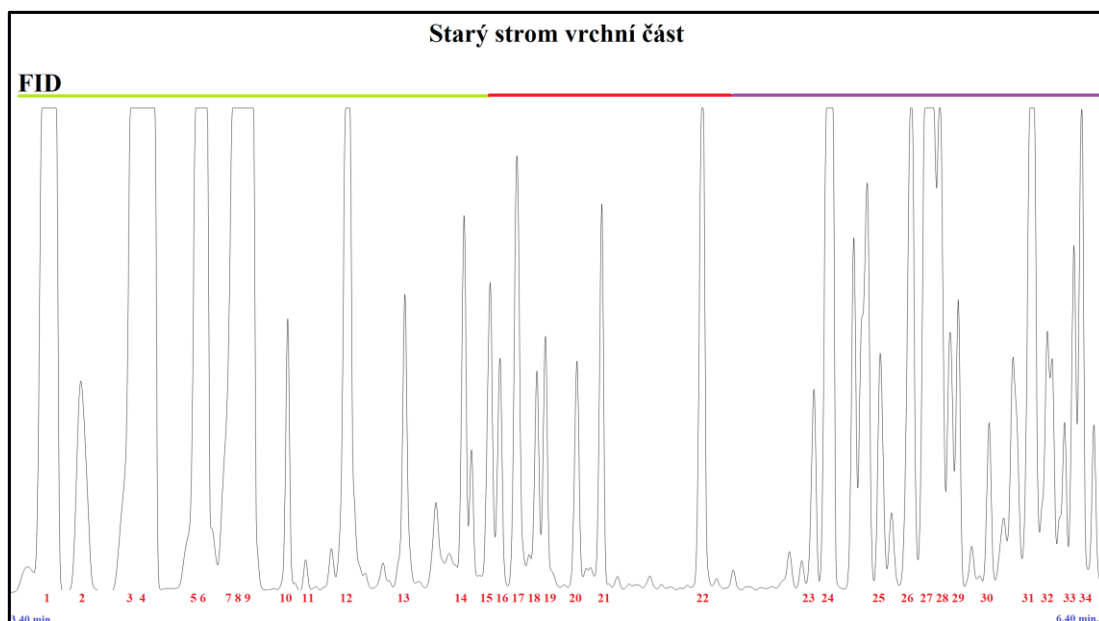
Jak je vidět na obrázcích 16, 17, 18 a 19, pro lepší orientaci jsou průběhy smrkových vůní rozděleny do tří barevných sekcí. Ve všech obrázcích je zelená sekce vyznačena v rozmezí RT 3,48 – 4,71 min. Červená čára vymezuje retenční čas od 4,71 – 5,28 min. a fialová čára je v rozmezí RT 5,28 – 6,33 min.

Při porovnání směsí starý strom spodní část – starý strom vrchní část (obrázek 16 a 17) můžeme vidět, velké nárůsty intenzity v červené a fialové sekci. V zelené sekci se látky mezi vzorky prakticky neliší. V této sekci dochází k jediné změně v celém srovnání, a to v retenčním čase 4,15 min. což je navrhovaná látka  $\gamma$ -terpinen (10). V červené a fialové sekci dochází k nárůstům všech látek u vrchní části. Největší nárůst koncentrace byl zaznamenán u látek RT: 4,48 - trans-p-menta-2,8-dien-1-ol (13), 4,78 - isopinokamfon (17), 4,95 - verbenon (20), 5,01 - metyltymoleter (21), 5,78 - cis karyofylen nebo 2,7 funebren (25), 6,07 - karyofylen-9-epi-E/humulen (30), 6,19 -  $\gamma$ -muurolen (31) a 6,33 -  $\alpha$ -kadinen (34).

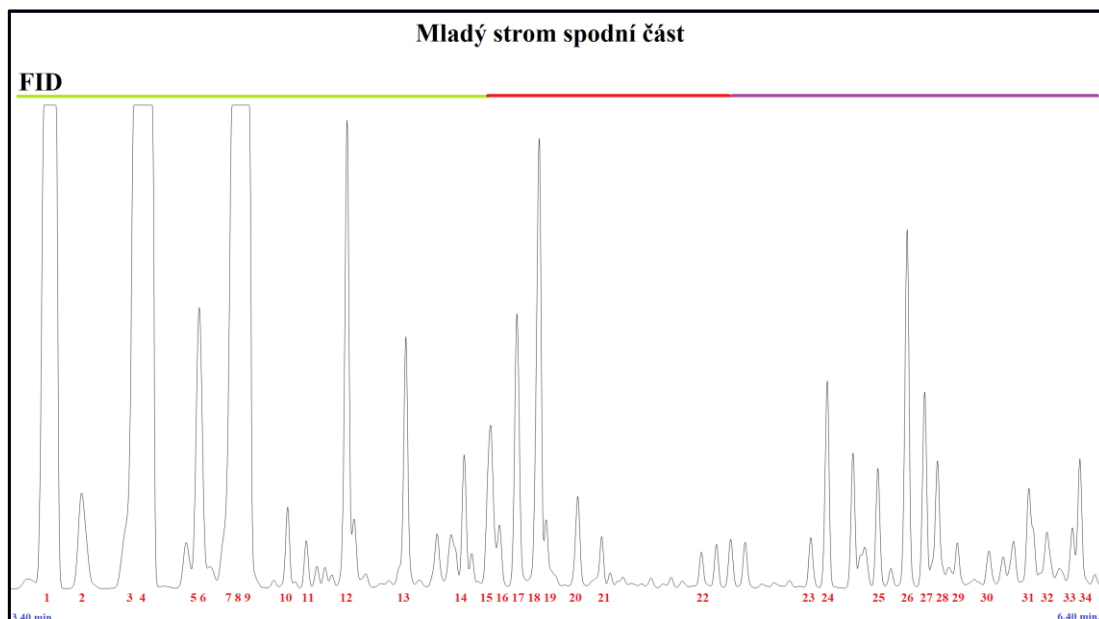
Z těchto látek byly v našich experimentech potvrzeny standartem isopinokamfon a verbenon v retenčním čase 4,78 a 4,95 min.



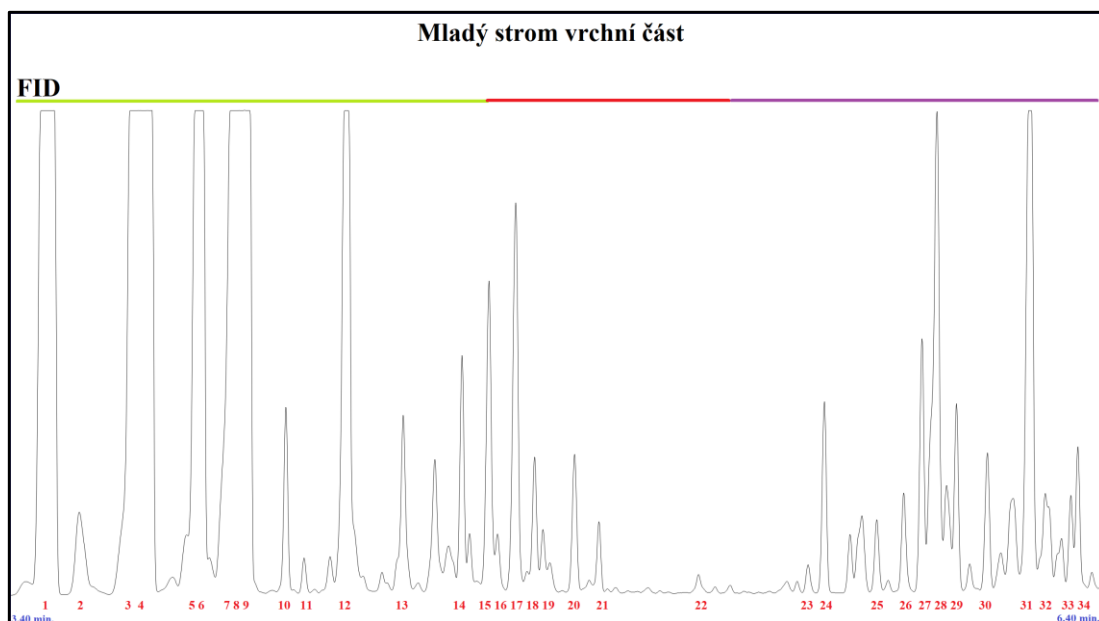
**Obrázek 16: FID průběh vzorku OL1. Barevně jsou vyznačeny sekce, pro snadnější porovnávání koncentrací látek mezi vzorky. Autor: Jan Prchal**



**Obrázek 17: FID průběh vzorku OU1. Barevně jsou vyznačeny sekce, pro snadnější porovnávání koncentrací látek mezi vzorky. Autor: Jan Prchal**



**Obrázek 18 FID průběh vzorku YL3. Barevně jsou vyznačeny sekce, pro snadnější porovnávání koncentrací látek mezi vzorky. Autor: Jan Prchal**



**Obrázek 19: FID průběh vzorku YU1. Barevně jsou vyznačeny sekce, pro snadnější porovnávání koncentrací látek mezi vzorky. Autor: Jan Prchal**

Porovnání rozdílů mezi směsí mladý strom spodní část - mladý strom vrchní část je zobrazeno na obrázku 18 a 19. Stejně jako v porovnání starého stromu nedochází mezi vzorky k výrazným rozdílům v zeleně vyznačené sekci. V červené sekci však dochází k mírnému poklesu koncentrace všech píků u vrchní části mladého stromu. Největší pokles byl zaznamenán u látek RT 4,48 - trans-p-menta-2,8-dien-1-ol (13) a 4,84 -  $\gamma$ -terpineol (18). Ve fialové sekci dochází k podobnému klesajícímu trendu v první polovině fialové sekce. V druhé části došlo k nárůstu všech látek, největší nárůst byl zaznamenán u látky RT 5,93 - trans-karyofylen (28) a 6,19 -  $\gamma$ -muurolen (31).

Z těchto látek jsme v našich experimentech potvrdili standardem trans-karyofylen v retenčním čase 5,93 min.

Srovnání vzorků ze stejných částí věkově rozdílných stromů starý strom spodní část – mladý strom spodní část ukazuje prokazatelný rozdíl koncentrací látek a to především ve fialové části vzorku. V zelené části je nejvýraznější změna koncentrací látek v retenčním čase 3,91 - 3-karen (5) a 3,93 -  $\alpha$ -felandren (6), tyto látky se vyskytují ve větší koncentraci ve starém stromě. V červené části dochází ve vzorku mladého stromu k velkému nárůstu látky v RT 4,84 min -  $\gamma$ -terpineol (18). Ve fialové části si můžeme povšimnout celkového poklesu koncentrací všech látek oproti vzorku z mladého stromu, přičemž největší pokles je zaznamenán u předpokládané látky longipinen (24) v RT 5,63 min.

Při srovnání vzorků odebraných z vrchní části starého a mladého stromu starý strom vrchní část – mladý strom vrchní část je zřejmé, že vzorek odebraný ze starého stromu obsahuje látky ve větší koncentraci, než je tomu ve vzorku z mladého stromu. Tento trend je patrný téměř v celém průběhu ve všech třech rozdělených sekcích (zelená, červená, fialová). K největším změnám dochází u látek v RT 5,01 - metyltymoleter (21), 5,28 - bornylacetát (22) a 6,33 -  $\alpha$ -kadiden (34).

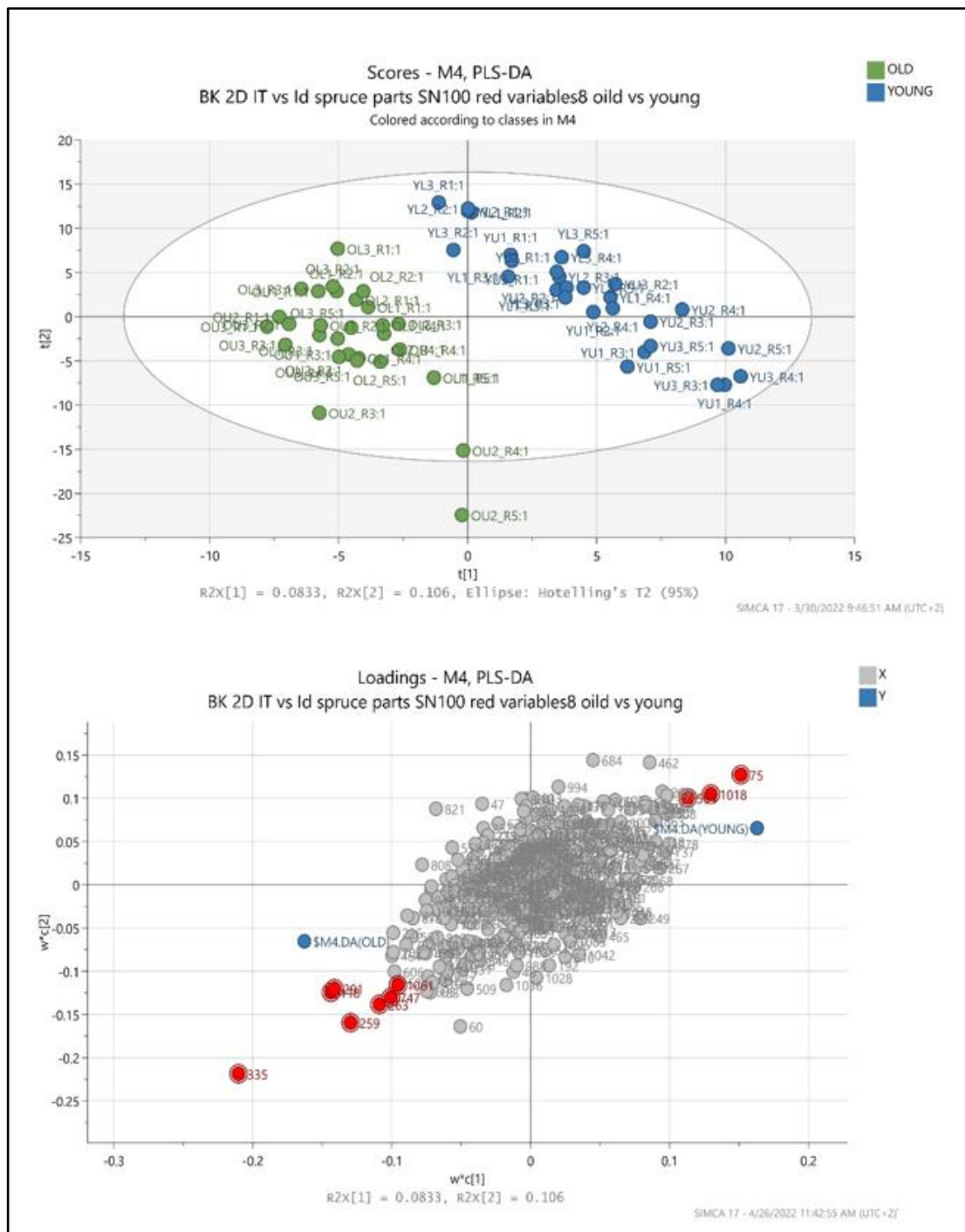
Celkově se vzorky neliší skladbou obsažených látek, ale různou koncentrací. Směs, která obsahuje látky v největších koncentracích je z vrchní části starého smrku. Naopak směs, která obsahuje látky v průměru s nejmenší koncentrací v porovnání s ostatními je vzorek získaný ze spodní části mladého smrku.

## 5.6 Odlišnost složení vůní různých částí stromů a stromů různého stáří

Provedené PCA a PLS-DA analýzy, které vyhodnocovaly přítomnost a množství všech látek ve směsích a porovnávaly jejich podobnost prokázaly významný rozdíl ve složení vůní získaných z mladších a starších stromů (obrázek 17). Modré značky v horní části obrázku 17 označují složení těkavých látek vzorků získaných z mladších stromů, zelené značky představují složení vůní starších stromů. Vidíme, že vůně srovnávaných kategorií se nepřekrývají, ale jsou od sebe významně odděleny. Navazující PLS-DA analýza (dolní graf obrázek 17) označuje látky, které se na rozdíly nejvíce podílely. Pravděpodobná chemická identita těchto látek je uvedena v zelené tabulce (obrázek 20, část A). Identitu těchto látek bude třeba potvrdit pomocí syntetických standardů.

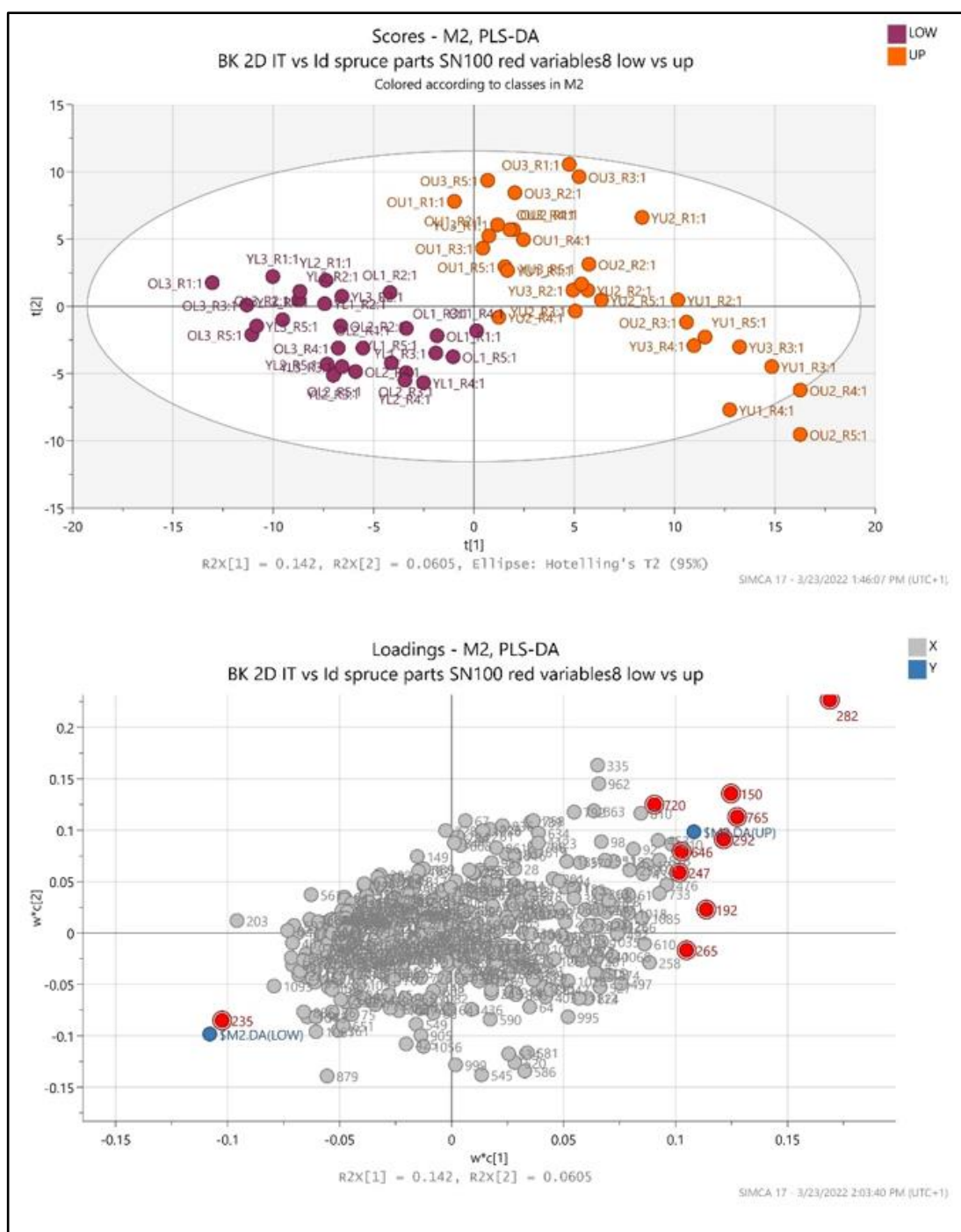
Podobně odlišné bylo složení vůní horních a dolních částí stromů (obrázek 19). PCA analýza, která porovnává přítomnost a koncentraci všech látek přítomných ve vzorcích dolních a horních částí stromů (obrázek 18 horní graf) ukazuje, že složení srovnávaných kategorií se významně liší (červené a fialové body se shlukují do výrazně odlišných oblastí). PLS-DA analýza (obrázek 19 dolní graf) zobrazuje čísla látek, které se na rozdílech nejvíce podílely. Jejich pravděpodobnostní identita je uvedena v tabulce (obrázku 20, část B). Také identita těchto látek bude muset být potvrzena syntetickými standardy.

Statistické srovnání starého a mladého stromu.



Obrázek 17: Grafy porovnávající přítomnost a množství látek v analyzovaných směsích. V horní části obrázku je vyobrazena PCA analýza, kde modré body označují složení jednotlivých vzorků vůně pocházející z mladších stromů. Modré body označují vzorky ze starších stromů. Spodní část obrázku zobrazuje graf, který představuje PLS DA analýzu. Na tomto grafu jsou uvedeny látky, které se na rozdílech nejvíce podílely. Tyto látky jsou uvedeny v tabulce na obrázku 20 - část A. Autor: Jan Prchal

Statistické srovnání spodní a vrchní části stromu.



Obrázek 18: Graf porovnávající přítomnost a množství látek v analyzovaných směsích. V horní části obrázku je vyobrazena PCA analýza, oranžové body označují složení jednotlivých vzorků vůni pocházejících z vrchní části stromů. Fialové body označují vzorky ze spodní části stromů. Spodní část obrázku zobrazuje graf, který představuje PLS DA analýzu. Na tomto grafu jsou uvedeny látky, které se na rozdílech nejvíce podílely. Tyto látky jsou uvedeny v tabulce na obrázku 20 - část B. Autor: Jan Prchal



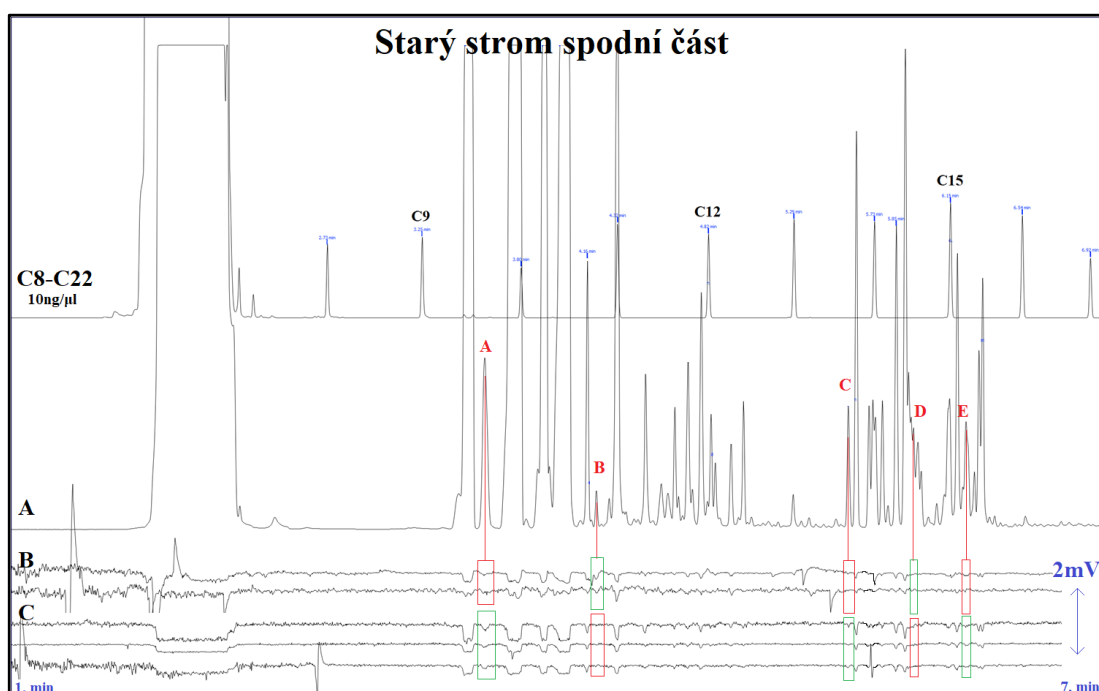
A		B	
Primární kód	Název	Primární kód	Název
335	bornylacetát	282	Citronellol
75	Furan, 2-pentyl-	150	4-Thujanol
118	1-8sineol (eukalyptol)	765	Abieta-7,13-dien
291	neznámá látka	292	Methylthymol
259	$\gamma$ -terpineol	192	cis-Verbenol
1018	neznámá látka	265	Myrtenol
263	estragol	720	Geranylinalool
594	pentadekanol	235	Analyt 307
	neznámá látka	646	neznámá látka
1061	neznámá látka	247	Terpinen-4-ol
		203	Camfenol

Obrázek 20: Pravděpodobná chemická identita látek nejvíce se podílejících na rozdílech v analyzovaných směsích. Část A značí seznam látek z analýzy vzorků ze starého a mladého stromu (obrázek 18 - spodní graf). Část B zobrazuje látky z analýzy vzorků spodní a vrchní části stromů (obrázek 19 - spodní graf). Identita uvedených látek musí být potvrzena v dalších experimentech syntetickými standardy.

## 5.7 Vnímají kůrovci stejné látky?

Tato diplomová práce si také kladla za cíl najít odpověď na otázku, zda porovnávané druhy kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus* vnímají stejné látky obsažené ve smrkové vůni.

Oba druhy kůrovce většinou vnímají stejné látky, které jsou obsaženy ve vůni smrků. Výjimkou je celkem 5 látek, na které kůrovci reagují rozdílně. Na obrázku 21 je znázorněn příkladný průběh OL1 - starý strom spodní část, u kterého bylo dosaženo nejkvalitnější měření.



Obrázek 21: Průběh vzorku OL1, rozdílné EAD reakce druhů *Ips duplicatus* a *Ips typographus*. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Detailní popis viz obr 15. Autor: Jan Prchal

Rozdíly mezi druhy *Ips duplicatus* a *Ips typographus* byly zaznamenány v RT A - 3,48 ( $\alpha$ -pinen), B - 4,21 min. (thujanol), C - 5,59 min. (kubeben  $\alpha$ ), D - 5,99 min. (E- $\beta$ -farnesen), E - 6,24 min. (germakren D). *Ips duplicatus* reagoval na látky A, C a E. U kůrovce *Ips typographus* byla zaznamenána odpověď u látek B a D.

V příloze 17, 18 a 19 lze porovnat zbylé záznamy (OU1, YL3, YU1) a rozdíly mezi ID - IT.

## 6. Diskuze

Ve smrkových směsích získaných extrakcí smrkových polen z horní a spodní části mladých a starých stromů bylo za pomoci plynové chromatografie zjištěno velké množství látek. Smrkové vůně jsou obecně velmi složité směsi, které obsahují několik desítek různých látek. Což ve své práci uvádí Verschut a kol. (2019), který dále popisuje, že tyto bohaté přirozeně vyskytující se směsi mohou obsahovat atraktivní i repelentní látky.

Celkem 34 látek dokázalo vyvolat antenální aktivitu tykadel kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Ze 34 aktivních látek jsme dokázali identifikovat jednotlivých 17 látek.

Identifikované látky nejsou nové a byly již dříve publikovány jako součást smrkových vůní. Mnohé z látek jsou součástí jiných rostlinných vůní. Příroda disponuje omezeným množstvím těkavých látek, a proto je dokáže různě kombinovat. Ve své práci Prchal (2020) prokázal v esenciálním oleji tymiánu (*Thymus vulgare*) přítomnost pro kůrovce *Ips typographus* antenálně aktivní látku  $\gamma$ -terpinen. Tato látka je přítomná také ve vůni smrků. Další experimenty prokázaly, že tato látka je vnímána vysoce citlivým specifickými čichovými neurony (Andersson 2012; Schiebe a kol. 2019).

Je zřejmé, že mnohé čichově aktivní látky u druhu *Ips typographus* byly již studovány. Z hlediska čichové fyziologie patří tento druh mezi nejprozkoumanější kůrovce. V předešlých pracích bylo nalezeno mnoho látek, které jsou antenálně aktivní. Látky, které byly identifikovány v této práci jako antenálně aktivní pro IT  $\alpha$ -pinen, camfen,  $\beta$ -pinen, myrcen, 3-karen, limonen a 1,8-cineol se shodují s látkami v pracích jiných autorů např. Andersson a kol. (2009); Andersson (2012); Kalinová a kol. (2014); Raffa a kol. (2016).

Pro mnoho identifikovaných látek jsou v současnosti známy i specifické čichové neurony. Výjimkou je kamfene, u kterého dosud ORN nalezen nebyl (Kalinová a kol. 2014).

Doposud žádná práce neprozkoumávala reakci tykadel vůči smrkovým hostitelským látkám u druhu *Ips duplicatus*. Nové poznatky přinesla práce Bláha

(2021) ten dokázal indentifikovat antenálně aktivní látky u kůrovce severního. Jedná se o látky:  $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\alpha$ -felandren, 3-karen, p-cymen, limonen, 1,8-cineol, linalool, isoborneol, isobornylacetát *trans*- $\gamma$ -bisabolen. Některé z těchto látek byly identifikovány i v této práci (viz. tabulka 1).

Byly nalezeny i aktivní nehostitelské látky (Zhang, Schlyter 2004). Stejně jako v této práci, Zhang a kol. (2017) zaznamenal antenální reakce na látky  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, limonen,  $\beta$ -felandren. Jeho práce našla antenální reakci i na látky p-cymen, která v naší práci potvrzena nebyla.

Tato práce ukazuje, že oba studované druhy vnímají shodně celkem 29 látek. V pěti případech reagovali kůrovci rozdílně. Jedná se o látky kamfen, thujanol, kubeben  $\alpha$ , E- $\beta$ -farnesen a germakren D.

*Ips typographus* reagoval na látky thujanol a E- $\beta$ -farnesene.

*Ips duplicatus* reagoval na látky kamfen, kubeben a germakren D.

Z porovnání obou druhů vyplývá, že mají podobné smyslové vybavení, a proto vnímají většinu hostitelských látek stejně, což je očekávané uvážíme-li, že mají společného hostitele smrk ztepilý. Usuzujme tedy, že jejich nestejný způsob při kolonizaci vychází z rozdílného zpracování dostupných vjemů v mozku.

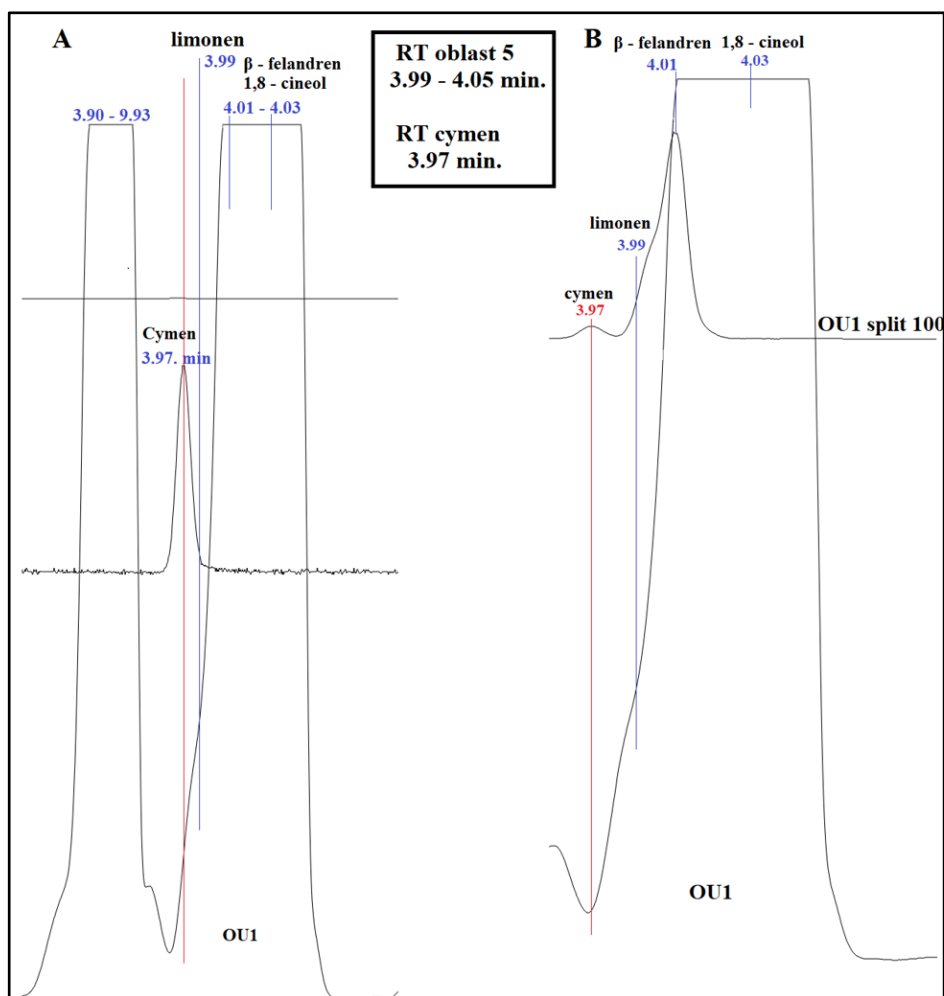
Některé čichové rozdílnosti mohou být podkladem pro jejich rozdílné preference při kolonizaci hostitele. (*Ips typographus* napadá spodní části dřevin, naproti tomu *Ips duplicatus* si vybírá vrchní části stromu (Holuša a kol. 2006; Knížek, Holuša (2007)). Bláha (2021) ve své práci zjistil rozdílnou citlivost tykadel obou druhů na některé hostitelské sloučeniny. Tato skutečnost podporuje teorii, že rozdíly vnímaných sloučenin mohou být ovlivněny i kvantitou jednotlivých látek ve směsi. Čichový smyslový orgán kůrovce může být ovlivněn vzájemným působením všech látek a daný kůrovec může v závislosti komplexnosti vůně vyhodnotit danou látku rozdílně. Pro jejich rozhodování tak mohou hrát roli i specifické poměry látek ve směsi (Raffa, Andersson, Schlyter 2016).

Při samotném vnímání a rozpoznávání jednotlivých směsí je důležitá nejen molekulární struktura jednotlivých komponent, ale důležité také je, jestli dané vůně stimulují tykadlo jednotlivě nebo všechny současně (Bruce a kol. 2015).

Velký význam má i doba expozice tykadla vůni a její intenzita. Je známo, že čichové orgány nejen hmyzu se velmi rychle adaptují (snižují svoji citlivost), pokud jsou vystaveny déletrvajícím působení intenzivních vůní.

Při identifikování (potvrzování) jednotlivých látek pomocí standardů došlo v zaznamenané EAD aktivní oblasti 5 (viz. příloha 9 - 12, tabulka 1 látky 7 - 9) k rozporu mezi získanými poznatky z laboratoře s dříve pozorovanými či publikovanými skutečnostmi. Prehal (2020) při studiu čichově aktivních látek přítomných v esenciálních olejích (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* a *Pimpinella anisum*) identifikoval antenálně aktivní látku cymen v retenčním čase 3,97 min.. Bláha (2021) ve své práci pozoroval retenční čas látky p-cymen v čase 3.99 min. Andersson a kol. (2009) ve své práci uvádí cymen jako antenálně aktivní látku a dokonce pro ni identifikoval specifický receptor.

Při samotné identifikaci látky cymen byl zaznamenán RT 3.97 min., mimo EAD aktivní oblast 5. To dokazuje obrázek 22 část A. Zde je vidět cymen, jako součást velkého píku, který obsahuje více látek. Při bližším zkoumání nižších koncentrací vzorku (pomocí splitu 100:1 - část B), je však vidět, že při snížení poměrů směsi, která byla nastříknuta (snížení koncentrace směsi) byl cymen lokalizován mimo velký pík a tudíž mimo oblast EAD 5. Cymen tak nebyl zahrnut do tabulky 1 antenálně aktivních látek. Oblast EAD 5 ukazuje složitost identifikace EAD aktivních látek.



Obrázek 22: Problematické identifikování jednotlivých látek. V levé části obrázku A - je zobrazen detail způsobu identifikace pomocí standardu látky cymen. Při porovnání bylo zjištěno, že se cymen nachází mimo pík, který byl zaznamenán jako lokalita, kde vznikla antenální odpověď. V píku v RT čase 3.99 - 4.03 byly zjištěny látky limonen,  $\beta$  - felandren a 1,8 cineol. V pravé části obrázku B - je zobrazená stejná situace, s rozdílem, že je zde vyobrazen k porovnání split 100:1 OU1, který zobrazuje podobu píku v menší koncentraci. Tudiž je lépe vidno složení píku. Autor: Jan Prchal

Studie nebyla zcela dokončena, v této práci jsme sice našli čichově aktivní látky a posléze je identifikovali, nicméně nebyla provedena kontrola, zda syntetické standardy těchto látek jsou opravdu antenálně aktivní. Přesto tato práce přináší nové poznatky, které budou základem pro další zkoumání studovaných druhů kůrovců *Ips typographus* a *Ips duplicatus*.

## 7. Závěr

V této diplomové práci byly ukázány výsledky experimentů, které se zabývaly analýzou a následnou identifikací antenálně aktivních čichových látek obsažených ve směsích, pocházejících z vrchní a spodní části starého a mladého stromu.

V pilotních experimentech byla metoda zapojení izolovaného tykadla určena jako nejefektivnější vzhledem k následujícím GC - EAD experimentům.

Celkem bylo identifikováno 34 antenálně aktivních látek, které se vyskytovaly ve všech čtyřech analyzovaných směsích. Pomocí výpočtů retenčních časů, Kovatsových indexů a analyzování syntetických standardů jsme dokázaly identifikovat 50 % z nich (17 látek). Jednotlivé směsi se mezi sebou neliší počtem látek. Odlišnost je však v koncentraci, kdy se směsi odlišují v závislosti na stáří a části stromu. Oba studované druhy kůrovců vnímají stejně 29 látek z celkového počtu 34 nalezených. Rozdíly byly rozpoznány u pěti látek camphene, cubebene, germacrene D (reaguje *Ips duplicatus*) a sabinene hydrate cis, E-b-farnesene (reaguje *Ips typographus*).

Zjištěné poznatky přispívají k odhalení smyslového vnímání studovaných druhů. Práce splnila předem stanovené cíle. Byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými směsích a rozdíly vnímání látek u studovaných kůrovců. Z analyzovaných směsích byly identifikovány antenálně aktivní látky. Tyto výsledky jsou podkladem pro další výzkumy, které se budou zabývat, zda jsou identifikované látky skutečně čichově aktivní.

## 8. Seznam použité literatury

- 1) ADAMS R.P., 2007: Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- 2) ANDERSSON M. N., LARSSON M. C., SHLYTER F., 2009: Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single - cell responses to ecologically relevant odors. *Journal of Insect Physiology* 55 (6): 556-567.
- 3) ANDERSSON M. N., 2011: Olfaction in the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* - Receptor, Neuron and Habitat. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.
- 4) ANDERSSON M., BINYAMEEN M., SADEK M., SCHLYTER F., 2011: Attraction Modulated by Spacing of Pheromone Components and Anti-attractants in a Bark Beetle and a Moth. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 37, 899-911.
- 5) ANDERSSON M., SCHLYTER F., HILL S., DEKKER T., 2012: What Reaches the Antenna? How to Calibrate Odor Flux and Ligand–Receptor Affinities. *Chemical senses*, vol. 37, 403-420.
- 6) BLÁHA J., 2020: Vnímají *I. duplicatus* a *I. typographus* stejné hostitelské vůně?. Fakulta dřevařská a lesnická. 67 s. (diplomová práce). Praha.
- 7) BRUCE T. J. A., ARADOTTIR G. I., SMART L. E., MARINT J. L., CALFIELD J. C., DOHERTY A., SPARKS C. A., WOODCOCK CH. M., BIRKETT M. A., NAPIER J. A., JONES H. D., PICKETT J. A., 2015: The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defence. *Scientific reports* 5. 2045-2322.
- 8) BYERS J. A., 1988: Host-tree chemistry affecting colonization in bark beetles. *Chemical Ecology of Insects* 2. Chapman and Hall, New York, 154-213.
- 9) BYERS J., SCHLYTER F., BIRGERSSON G., FRANCKE W., 1990: E-myrcenol in *Ips duplicatus*: An aggregation pheromone component new for bark beetles. *Experientia*, vol. 46, 1209-1211.
- 10) BYERS J., Chemical Ecology of Bark Beetles in a Complex Olfactory Landscape. In LIEUTIER F., DAY K., BATTISTI A., GRÉGOIRE J., EVANS H., 2004: *Bark*



*and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

11) COGNATO A., 2013: Molecular phylogeny and taxonomic review of *Premnobium* Browne, 1962 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, vol. 1, s. 1-12.

12) GRIES G., 2009: Zur Frage der Dispersion des Buchdruckers (*Ips typographus* L.). *Journal of Applied Entomology* 99 (1-5): 12-20.

13) GRODZKI W., 1999: Problematika výskytu lýkožroutaseverského *Ips duplicatus* (Sahlberg) (Coleoptera: Scolytidae) na území Polska. *Zpravodaj ochrany lesa* V:13-15.

14) HOLUŠA J., ZAHRADNÍK P., KNÍŽEK M., DRÁPELA K., 2003: Seasonal flight activity of the double spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) in Silesia (Czech Republic). *Biologia* 58, 935-941.

15) HOLUŠA J., VOIGTOVÁ P., KULA E., KŘÍSTEK Š., 2006: Výskyt lýkožrouta severského *Ips duplicatus* (Sahlberg) (Coleoptera: Scolytidae) na LS Bruntál LČR, s. p., v roce 2004 – 2005. *Zpravodaj ochrany lesa* 13: 1-46. Brno: Tisk Centrum s.r.o., 46 s. ISBN 80-86461-64-5.

16) HOLUŠA J., LUBOJACKÝ J., KNÍŽEK M., 2010: Distribution of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* in the Czech Republic: spreading in 1997–2009. *Phytoparasitica*, vol. 38, s. 435-443.

17) HOLUŠA J., LUKÁŠOVÁ K., LUBOJACKÝ J., 2012: Comparison of seasonal flight activity of *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. *Scientia Agriculturae Bohemica*, vol. 43, no. 3, s. 109-115.

18) CHAPMAN N. F., 1998: *The Insects. Structure and Function*. 4. vyd., Cambridge University Press, Cambridge.

19) JAKUŠ R., HOLUŠA J., BLAŽENEC M., 2015: *Principy ochrany dospělých smrkových porostů před podkorním hmyzem*. 1. vyd., Carter Reproplus, Praha.

20) JÁNSKÝ L., NOVOTNÝ I., 1981: *Fyziologie živočichů a člověka*. 1. vyd. Avicenum, Praha.

- 21) JEGER M., BRAGARD C., CAFFIER D., CANDRESSE T., CHATZIVASSILIOU E., DEHNEN-SCHMUTZ K., GILIOLI G., MIRET J., MACLEOD A., NAVARRO M., NIERE B., PARNELL S., POTTING R., RAFOSS T., ROSSI V., UREK G., VAN BRUGGEN A., VAN DER WERF W., WEST J., WINTER S., KERTÉSZ V., AUKHOJEE M., GRÉGORIE J., 2017: Pest categorisation of *Ips duplicatus*. EFSA Journal, vol. 15, no. 10, s. 1-25. ISSN: 1831-4732.
- 22) KALINOVÁ B., BŘÍZKOVÁ R., KNÍŽEK M., TURČÁNI M., HOSKOVEC M., 2014: Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. Arthropod-Plant Interactions 8: 305-316.
- 23) KOVÁTS E., 1958: Characterization of organic compounds by gas chromatography. Part 1. Retention indices of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. Helvetica Chimica Acta, vol. 41, 1915-1932.
- 24) KINDLMANN P., MATĚJKA K., DOLEŽAL P., 2012: Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody. Karolinum, 1. vyd., Praha.
- 25) KLUTSCH J. G., NEGRÓN J. F., COSTELLO S. L., RHOADES C. R., WEST D. R., POPP J., CAISSIE R., 2009: Stand characteristics and downed woody debris accumulations associated with a mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae* Hopkins) outbreak in Colorado. Forest Ecology management 258: 641-649.
- 26) KNÍŽEK M., HOLUŠA J., 2007: Lýkožrout severuský *Ips duplicatus* (Sahlberg). Lesnická práce, vol. 86, no. 4, s. 1-4 (příloha).
- 27) KROKENE P., SOLHEIM H., 1996: Fungal associates of five bark beetle species colonizing Norway spruce. Canadian Journal of Forest Research, vol. 26, s. 2115-2122.
- 28) KŘÍSTEK J., URBAN J., 2013: Lesnická entomologie. 2. vyd. upravené., Academia, Praha.
- 29) LAKATOS F., GRODZKI W., ZHANG Q., STAUFFER CH., 2007: Genetic comparison of *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) populations from Europe and Asia. Journal of Forest Research, vol. 12, s. 345-349.

- 30) LEKANDER B., 1977: The distribution of bark beetles in the Nordic Countries (Finland). Entomological Society of Finland 32, 102p.
- 31) LÖBL I., SMETANA A., 2011: Catalogue of Palaearctic Coleoptera. vol. 7., Apollo Books, Denmark.
- 32) MRKVA R., 1994: Lýkožrout severský (*Ips duplicatus* Sahlberg), nový významný škůdce smrku. Lesnická práce, 73: 35-37.
- 33) MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ, ©2022: Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020 (online) [cit. 2022.02.05], dostupné z <<https://www.uhul.cz/>>.
- 34) MYLES T., 2002: Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. Sociobiology 40: 243-255.
- 35) MYRICK A. J., BAKER T. C., 2011: Chopper - stabilized gas chromatography/electroantennography: Part I. Background, signal processing and example. Biosensors and Bioelectronics 31: 197-204.
- 36) NOWINSKÁ A., BROZEK J., 2017: Morphological study of the antennal sensilla in Gerromorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). Zoomorphology, vol. 136, s. 327-347.
- 37) OLSSON S. B., HANSSON B., 2013: Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. Methods in molecular biology (Clifton N. J.) 1068: 157-77.
- 38) PAINE T. D., RAFFA K. F., HARRINGTON T. C., 1997: Interactions Among Scolytid Bark Beetles, Their Associated Fungi, and Live Host Conifers. Annual Review of Entomology, 42:179-206.
- 39) PFFEFER A., 1989: Kůrovcovití Scolytidae a jádrohlodovití Platypodidae. 1. vyd., Academia, Praha.
- 40) PFEFFER A., KNÍŽEK M., 1995: Expanze lýkožrouta *Ips duplicatus* (Sahlberg) ze severské tajgy. Zpravodaj ochrany lesa 2: 8-11.

- 41) PRCHAL J., 2020: Identifikace antenálně aktivních látek esenciálních olejů *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, a *Thymus vulgaris* u kůrovce *Ips typographus*. Fakulta životního prostředí, Katedra ekologie. 64 s. (bakalářská práce). Praha.
- 42) RAFFA K., ANDERSSON M., SCHLYTER F., 2016: Host Selection by Bark Beetles: Playing the Odds in a High-Stakes Game. *Advances in Insect Physiology*, vol. 50, 1-74.
- 43) RUDINSKÝ J.A., NOVÁK V., ŠVIHRA P., 1971: Attraction of the bark beetle *Ips typographus* L. to terpenes and male produced pheromone. *Z. Angew. Entomol* 67. 179-188.
- 44) SEYBOLD S., BOHLMANN J., RAFFA K., 2000: Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis. *The Canadian Entomologist* 132: 697-753.
- 45) SCHIEBE CH., JANKUVOVÁ J., BINYAMEEN M., BLAŽENEC M., JAKUŠ R., SCHLYTER F., 2015: Attraction and feeding behaviours modulated by stress related oxygenated host compounds at natural doses in a bark beetle. 15 s.
- 46) SCHLYTER F.; CEDERHOLM I., 1981: Separation of the sexes of living spruce bark beetles, *Ips typographus* (L.), (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of applied Entomology*, vol. 92, s. 42-47. ISSN 0044-2240.
- 47) SCHLYTER F., BYERS J., LÖFQVIST J., 1987: Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: Density-Regulation Mechanisms in Bark Beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* 13: 1503-1523.
- 48) SCHLYTER F., BIRGERSSON G., BYERS J., BAKKE A., 1992: The aggregation pheromone of *Ips duplicatus* and its role in competitive interactions with *I. typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Chemoecology*, vol. 3, s. 103-112.
- 49) SKUHRAVÝ V., 2002: Lýkožrout smrkový a jeho kalamity. Agrospoj, Praha.
- 50) SPARKMAN O., PENTON Z. E., KITSON F. G., 2011: Gas - chromatography and mass spectrometry: a practical guide. 2. ed., Elsevier, Oxford.
- 51) SYNTECH., 2004: Electroantennography: a practical introduction. Kirchzarten, Germany, 29 s.

- 52) TØMMERAS B. A., MUSTAPARTA H., 1987: Chemoreception of host volatiles in the bark beetle *Ips typographus*. Journal of Comparative Physiology A Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology, vol. 5., 161.
- 53) TURČANI M., VAKULA J., 2008: The influence of irradiation on the behaviour a reproduction succes of eight toothed bark beetle (*Ips typographus* l., 1958). Journal of Forest Research, vol. 53, 31-37.
- 54) VERSCHUT T. A., CARLSSON M. A., HAMBÄCK P. A., 2019: Scaling the interactive effects of attractive and repellent odours for insect search behaviour. Scientific Reports 9, 15309.
- 55) WERMELINGER B., 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - A review of recent research. Forest Ecology and Management, 202 (1-3): 67-82.
- 56) WERMELINGER B., MATHIS D. S., KNÍŽEK M., FORSTER B., 2020: Tracking the spread of the northern bark beetle *Ips duplicatus* in Europe. Alpine Entomology 4, 179-184.
- 57) ZAHRADNÍK P., ŽĎÁREK J., LIŠKA J., 1993: Feromony hmyzu v ochraně lesa. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha.
- 58) ZAHRADNÍK, P.; KNÍŽEK M., 2007: Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.). Lesnická práce, vol. 86, no. 4, s. 1-8 (příloha).
- 59) ZUMR V., 1995: Lýkožrout smrkový-biologie, prevence a metody boje. 1. vyd., Matice Lesnická, Písek.
- 60) ZAHRADNÍK P., 2004: *Ochrana smrčín proti kůrovcům*. 1. vyd., Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.
- 61) ZHANG Q.-H., SCHLYTER F., 2004: Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. Agricultural and Forest Entomology, vol. 6, 1-19.
- 62) ZHANG Q.-H., SCHLYTER F., LIU G.-T., SHENG M.-L., BIRGERSSON G., 2007: Electrophysiological and Behavioral Responses of *Ips duplicatus* to

Aggregation Pheromone in Inner Mongolia, China: Amitinol as a Potential Pheromone Component. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 33, 1303-1315.

## 9. Přílohy

<i>Příloha 1: Vertikální tahač elektrod PC-100 (NARISHIGE). Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>61</i>
<i>Příloha 2: Skleněné elektrody, používané pro zapojení tykadla, vyrobené pomocí vertikálního tahače PC-100. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>61</i>
<i>Příloha 3: Výdrž tykadel po připojení mezi měřicí mikroelektrody. Modrá křivka znázorňuje zapojení izolovaného tykadla, červená celého brouka a zelená zapojení tykadla s hlavou. Tykadla byly stimulovány čerstvou kůrou (nařezanou v pasturově pipetě) 0,5 vteřinovými pulzy každé tři minuty. Odpovědi byly softwarem GC/EAD32 (Syntech, verze 4.6) zaznamenány a změřeny v milivoltech. Hodnoty byly následně zprůměrovány a znázorněny grafem v programu Excel (Microsoft Office). Největší výdrž má tykadlo se zapojením celého brouka a naopak nejmenší výdrž má izolované tykadlo. Graf je interakcí výsledků z prací Prchal (2020) a Bláha (2021). .....</i>	<i>62</i>
<i>Příloha 4: Zapojení hlavy kůrovce mezi 2 skleněné mikroelektrody. Snímací elektroda B je připojena ke špičce tykadla čichovými senzily. Referenční elektroda A je připojena do vnitra hlavy. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>62</i>
<i>Příloha 5: Připravený brouk k zapojení mezi 2 skleněné mikroelektrody. Brouk je zafixován v pipetovací špičce (3). Voskem je zafixována hlava a tykadlo brouka. Snímací elektroda je následně připojena ke špičce tykadla (2) a referenční elektroda je zapíchnuta do oka kůrovce (1). Zvětšeno 30 x. Zdroj: Bláha (2021). .....</i>	<i>63</i>
<i>Příloha 6: Rozdíl klidového průběhu záznamu při zapojení izolovaného tykadla k měřicí elektrodě přímo špičkou tykadla A, zapojení báze špičky tykadla k měřicí elektrodě B. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>63</i>
<i>Příloha 7: Grafické zpoždění odpovědi tykadla na stimulaci. Toto zpoždění by při složitějším měření způsobovalo chyby v indentifikaci. Správně by měli být obě červené čáry v souladu (jedna čára). Tyto čáry zvýrazňují začátek píku dané látky (průběh A) a začátek dané odpovědi (průběh B). Tento posun nastává při špatné konfiguraci vyhodnocovacího softwaru GC/EAD32 (Syntech, verze 4.6). Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>64</i>
<i>Příloha 8: Uhlovodíky C8-C22. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>64</i>
<i>Příloha 9: Průběh analyzovaného vzorku OL1. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny čísly. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkany C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>65</i>
<i>Příloha 10: Průběh analyzovaného vzorku OU1. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkany C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>65</i>

<i>Příloha 11: Průběh analyzovaného vzorku YL3. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkanly C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>66</i>
<i>Příloha 12: Průběh analyzovaného vzorku YU1. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkanly C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>66</i>
<i>Příloha 13: Analýza směsi OU1 - starý strom vrchní část. V horní části se nachází pomocný průběh uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn FID průběh analyzované směsi (A), EAD záznam tykadla IT (B) a EAD záznam tykadla druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní látky, které byly zjištěny ze 32 lokalit. Aktivních látek bylo označeno celkem 34. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>67</i>
<i>Příloha 14: Analýza směsi YL3 - mladý strom spodní část. V horní části se nachází pomocný průběh uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn FID průběh analyzované směsi (A), EAD záznam tykadla IT (B) a EAD záznam tykadla druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní látky, které byly zjištěny ze 32 lokalit. Aktivních látek bylo označeno celkem 34. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>67</i>
<i>Příloha 15: Analýza směsi YU1 - mladý strom vrchní část. V horní části se nachází pomocný průběh uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn FID průběh analyzované směsi (A), EAD záznam tykadla IT (B) a EAD záznam tykadla druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní látky, které byly zjištěny ze 32 lokalit. Aktivních látek bylo označeno celkem 34. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>68</i>
<i>Příloha 16: Potvrzení látek camphor, pinocamhone, borneol, isopinocamphone, verbenon, bornylacetat, longifolen a trans-caryophyllen. Obrázek je výřez v rozmezí 4.30 - 7.30 minut a je zobrazen ve zvětšení 10 mV. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>68</i>
<i>Příloha 17: Průběh vzorku OU1, rozdílné EAD reakce druhů Ips duplicatus a Ips typographus. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>69</i>
<i>Příloha 18: Průběh vzorku YL3, rozdílné EAD reakce druhů Ips duplicatus a Ips typographus. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>69</i>
<i>Příloha 19: Průběh vzorku YU1, rozdílné EAD reakce druhů Ips duplicatus a Ips typographus. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Autor: Jan Prchal .....</i>	<i>70</i>

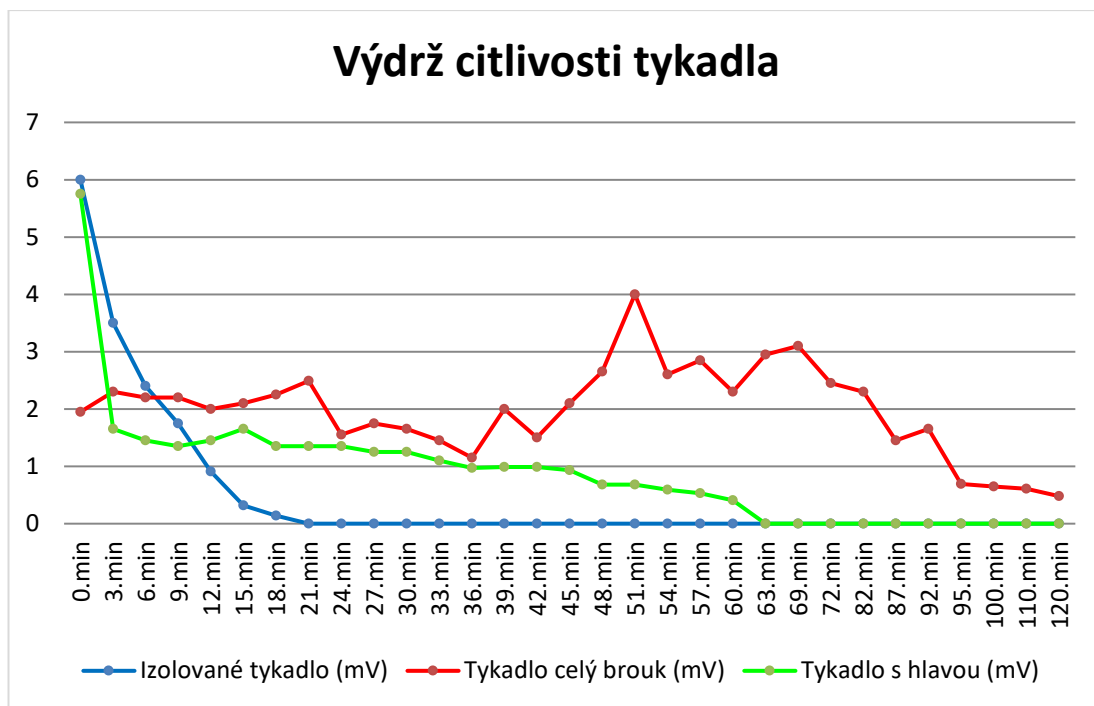




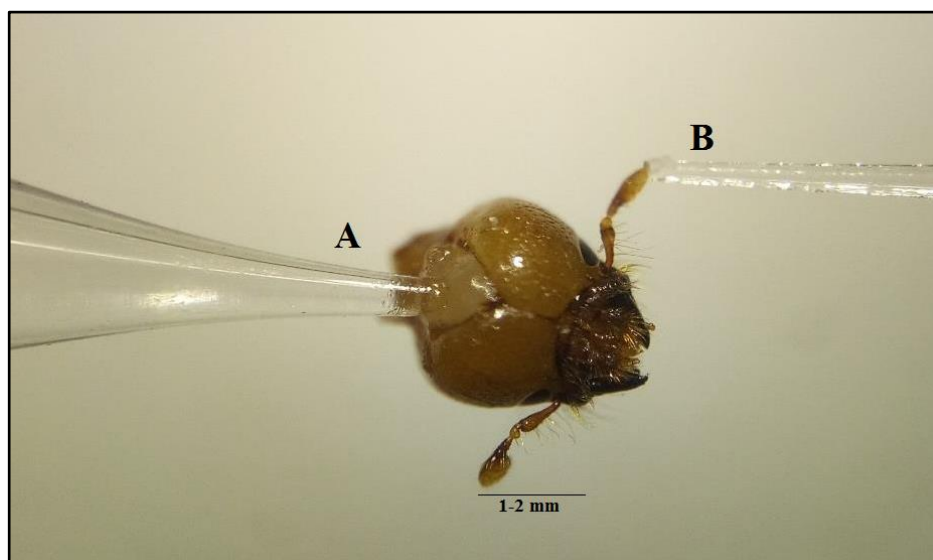
**Příloha 1: Vertikální tahač elektrod PC-100 (NARISHIGE). Autor: Jan Prchal**



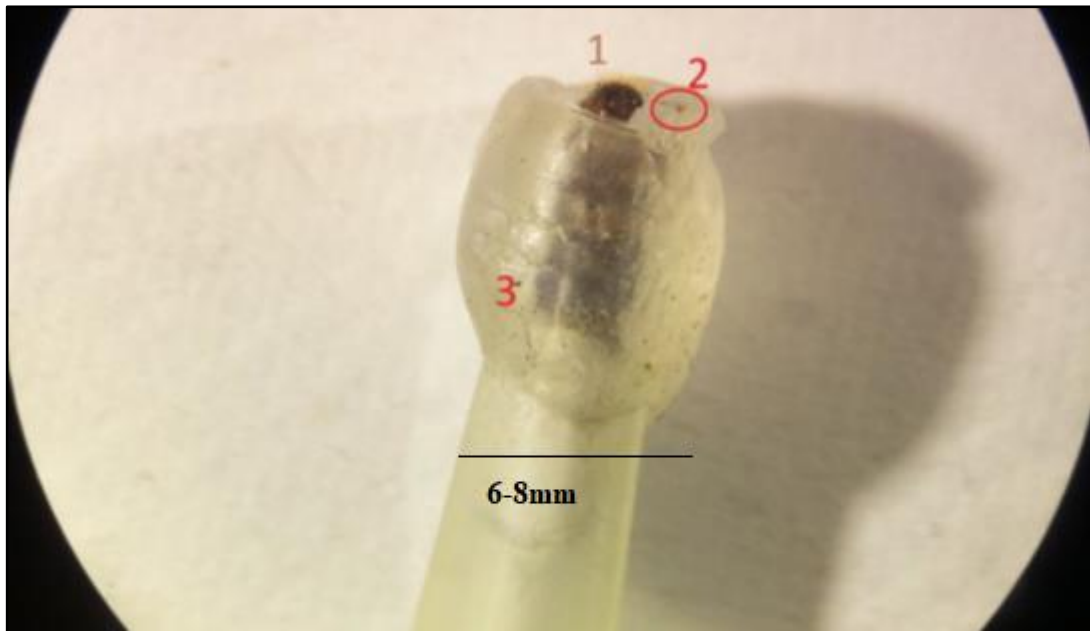
**Příloha 2: Skleněné elektrody, používané pro zapojení tykadla, vyrobené pomocí vertikálního tahače PC-100. Autor: Jan Prchal**



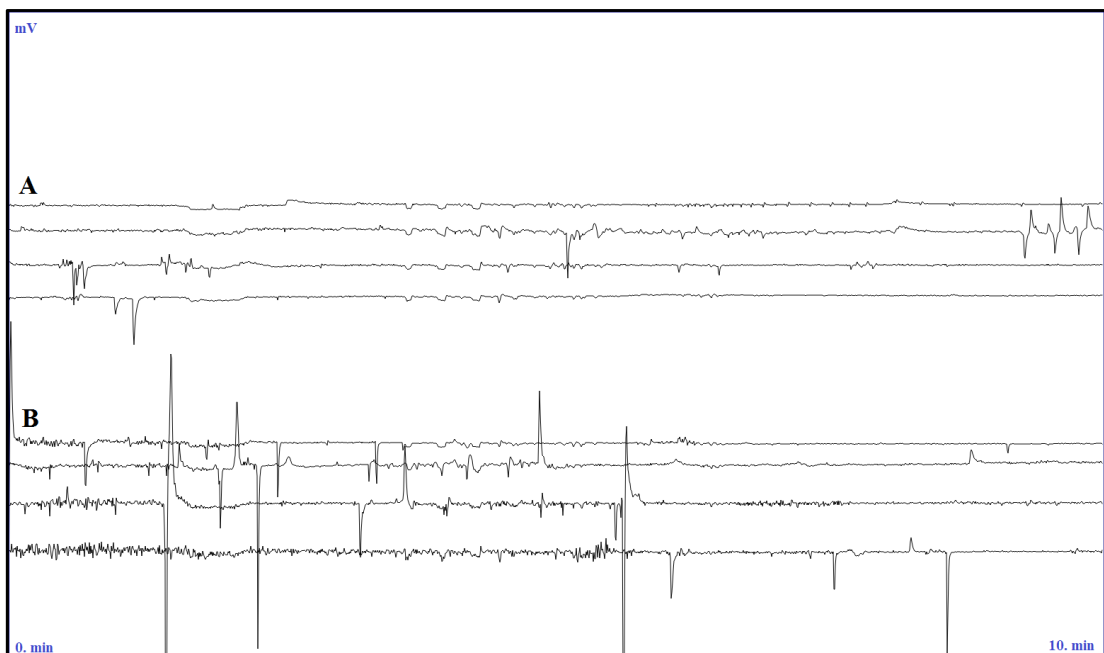
**Příloha 3: Výdrž tykadel po připojení mezi měřící mikroelektrody. Modrá křivka znázorňuje zapojení izolovaného tykadla, červená celého brouka a zelená zapojení tykadla s hlavou. Tykadla byly stimulovány čerstvou kůrou (nařezanou v pasturově pipetě) 0,5 vteřinovými pulzy každé tři minuty. Odpovědi byly softwarem GC/EAD32 (Syntech, verze 4.6) zaznamenány a změřeny v milivoltech. Hodnoty byly následně zprůměrovány a znázorněny grafem v programu Excel (Microsoft Office). Největší výdrž má tykadlo se zapojením celého brouka a naopak nejmenší výdrž má izolované tykadlo. Graf je interakcí výsledků z prací Prchal (2020) a Bláha (2021).**



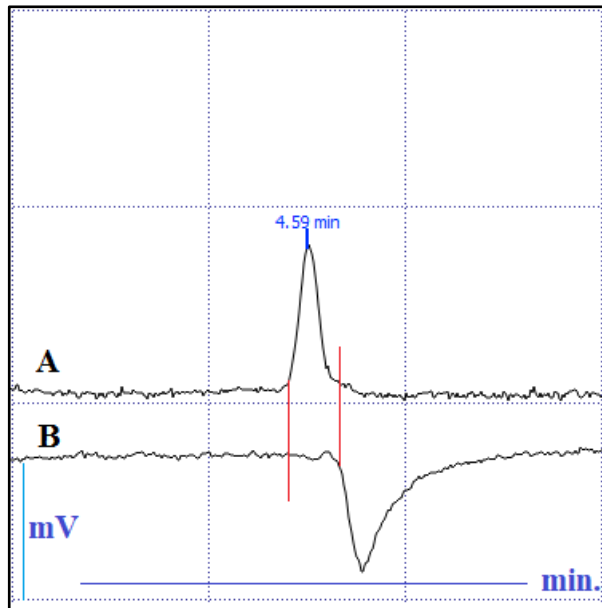
**Příloha 4: Zapojení hlavy kůrovce mezi 2 skleněné mikroelektrody. Snímací elektroda B je připojena ke špičce tykadla čichovými senzily. Referenční elektroda A je připojena do vnitra hlavy. Autor: Jan Prchal**



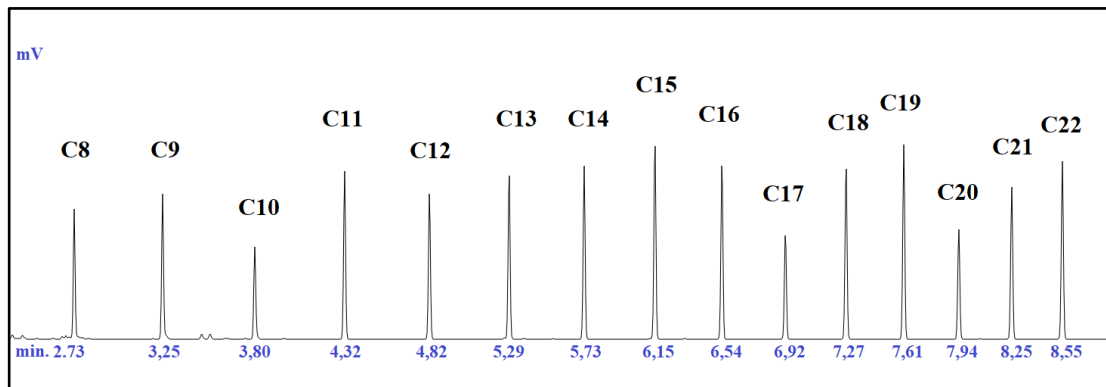
**Příloha 5: Připravený brouk k zapojení mezi 2 skleněné mikroelektrody. Brouk je zafixován v pipetovací špičce (3). Voskem je zafixována hlava a tykadlo brouka. Snímací elektroda je následně připojena ke špičce tykadla (2) a referenční elektroda je zapíchnuta do oka kůrovce (1). Zvětšeno 30 x. Zdroj: Bláha (2021).**



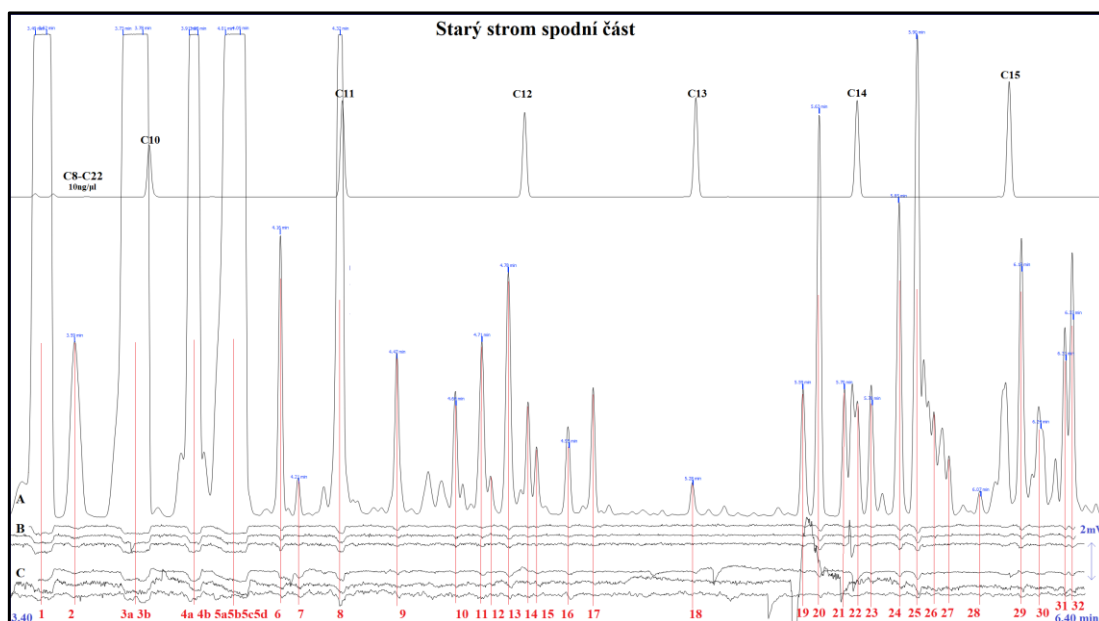
**Příloha 6: Rozdíl klidového průběhu záznamu při zapojení izolovaného tykadla k měřicí elektrodě přímo špičkou tykadla A, zapojení báze špičky tykadla k měřicí elektrodě B. Autor: Jan Prchal**



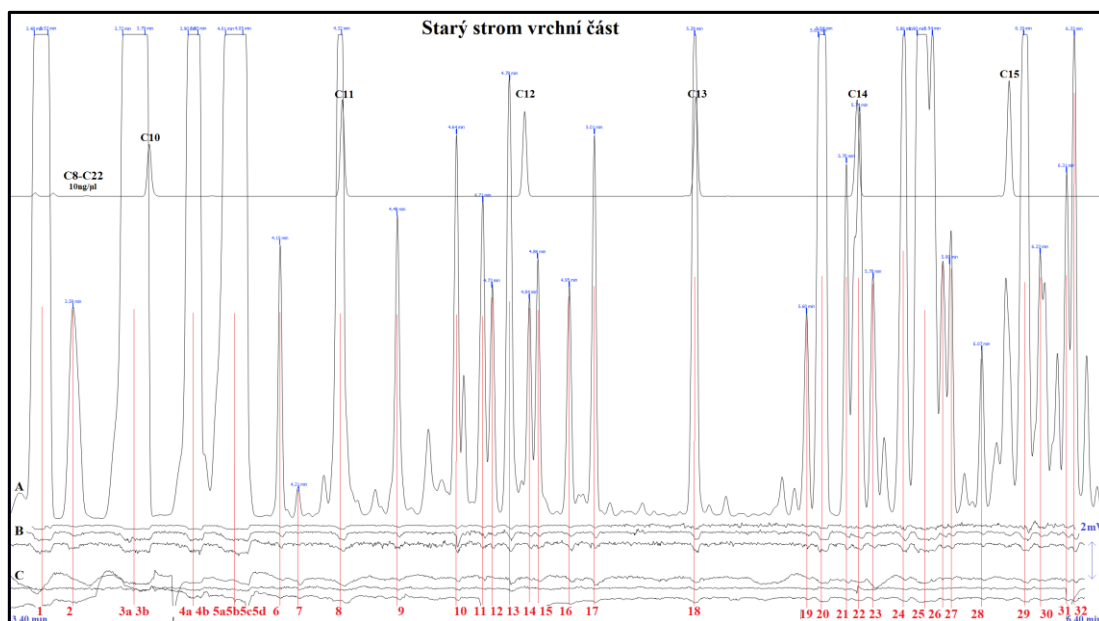
**Příloha 7: Grafické zpoždění odpovědi tykadla na stimulaci. Toto zpoždění by při složitějším měření způsobovalo chyby v indentifikaci. Správně by měli být obě červené čáry v souladu (jedna čára). Tyto čáry zvýrazňují začátek píku dané látky (průběh A) a začátek dané odpovědi (průběh B). Tento posun nastává při špatné konfiguraci vyhodnocovacího softwaru GC/EAD32 (Syntech, verze 4.6). Autor: Jan Prchal**



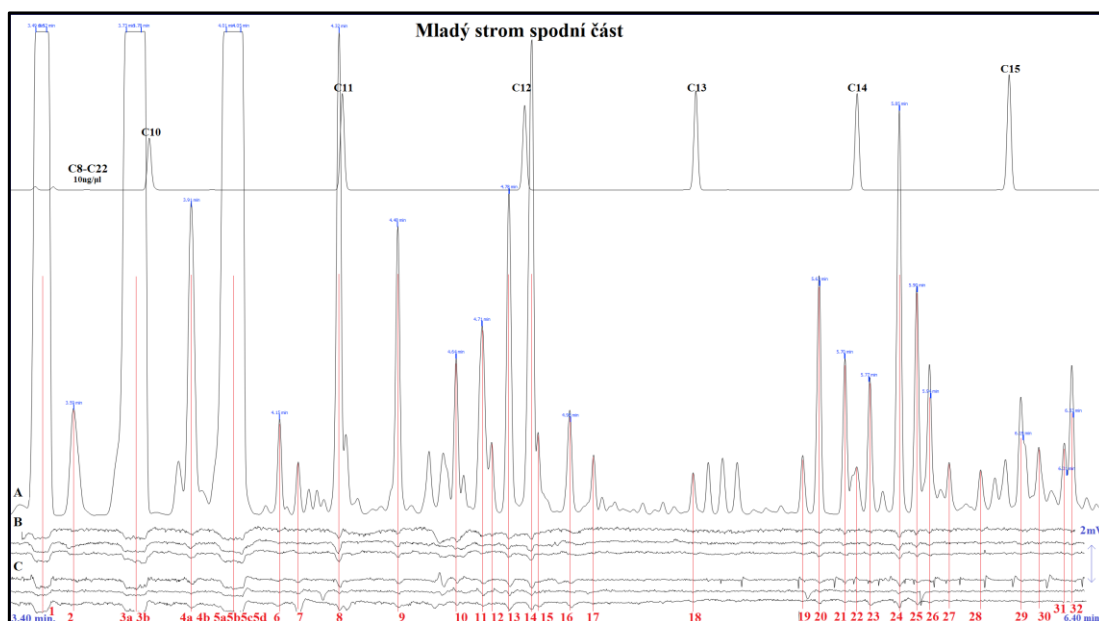
**Příloha 8: Uhlovodíky C8-C22. Autor: Jan Prchal**



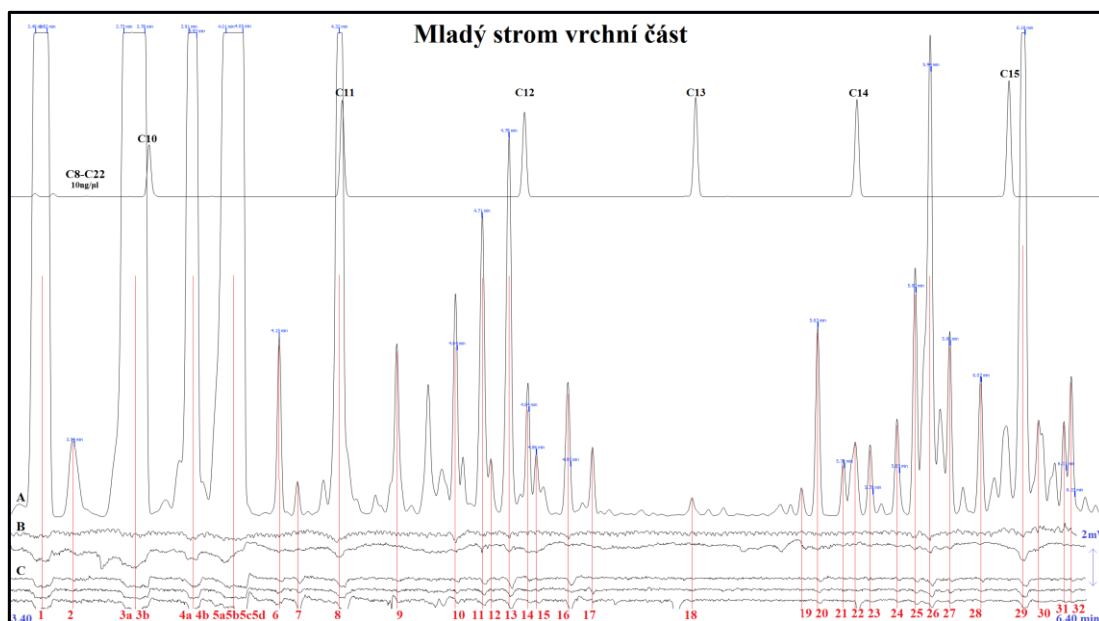
**Příloha 9: Průběh analyzovaného vzorku OL1. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny čísly. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkyany C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal**



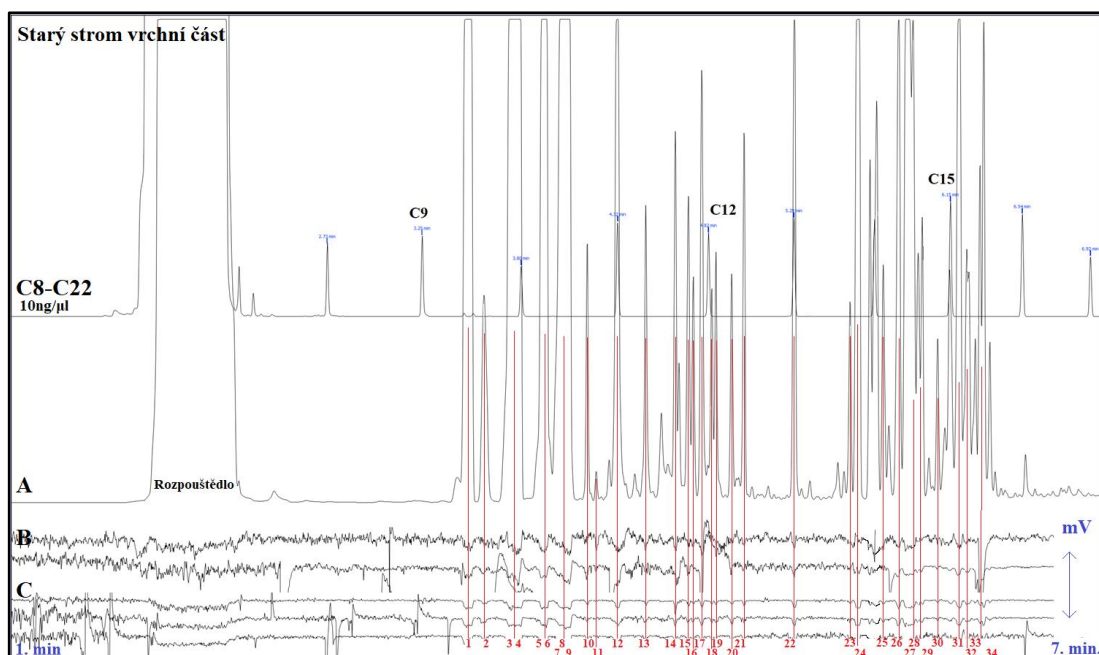
**Příloha 10: Průběh analyzovaného vzorku OU1. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny čísly. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkyany C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal**



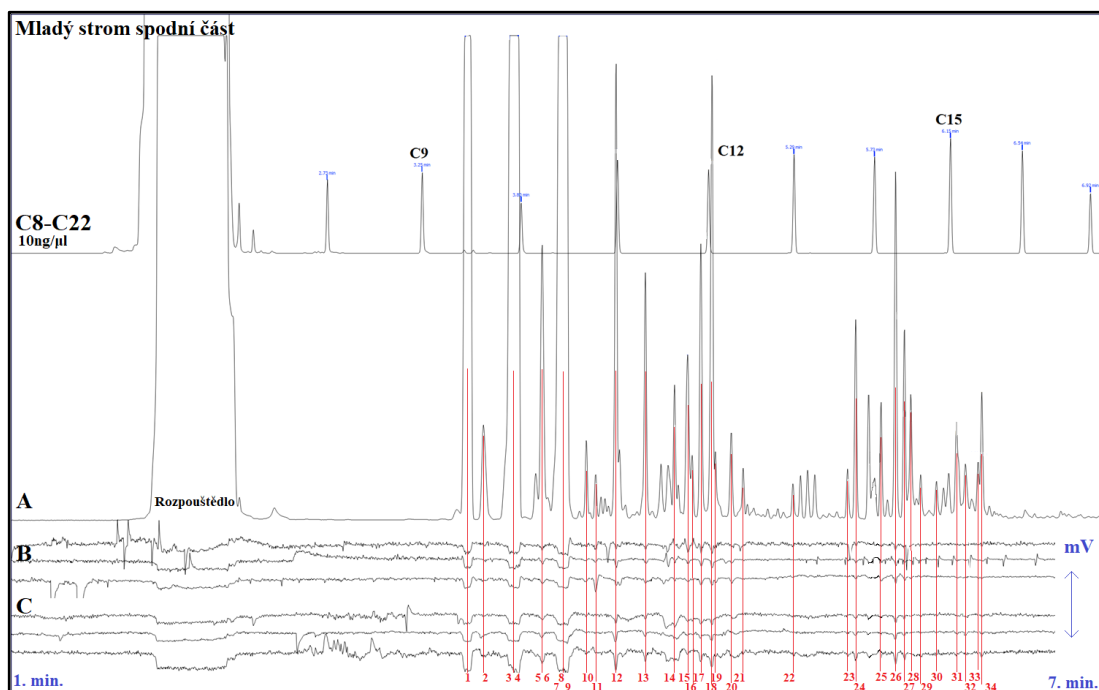
**Příloha 11: Průběh analyzovaného vzorku YL3. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkyany C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal**



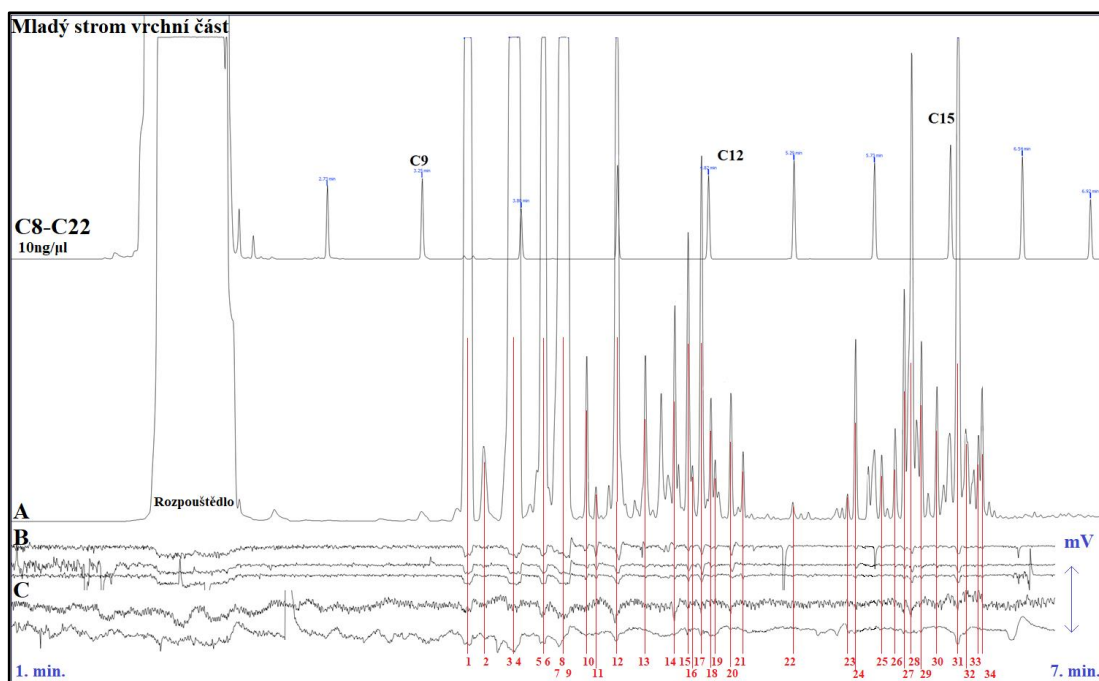
**Příloha 12: Průběh analyzovaného vzorku YU1. Lokality, kde byla zaznamenána aktivita byly označeny. Celkem bylo vyznačeno 32 lokalit. A - FID záznam analyzované směsi. B - EAD záznam tykadla IT. C - EAD záznam tykadla ID. V Horní části obrázku jsou znázorněny alkyany C8-C22 v koncentraci 10ng/μl. Obrázek je výřez z celkové doby 10 minutové analýzy v čase 3.40 - 6.40 min. Autor: Jan Prchal**



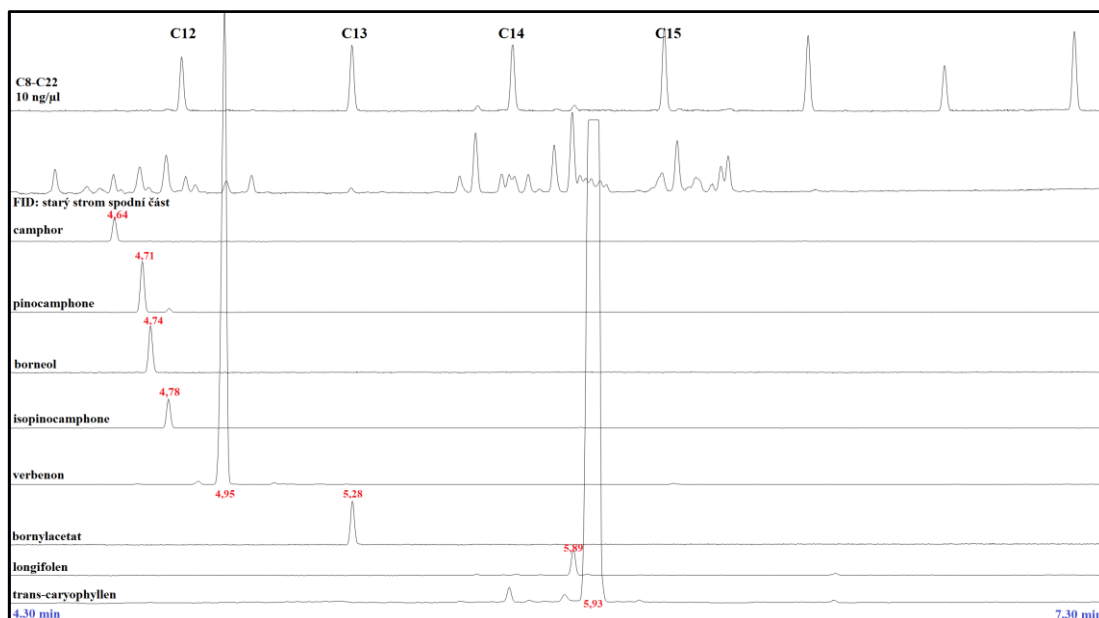
**Příloha 13: Analýza směsi OU1 - starý strom vrchní část.** V horní části se nachází pomocný průběh uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn FID průběh analyzované směsi (A), EAD záznam tykadla IT (B) a EAD záznam tykadla druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní látky, které byly zjištěny ze 32 lokalit. Aktivních látek bylo označeno celkem 34. Autor: Jan Prchal



**Příloha 14: Analýza směsi YL3 - mladý strom spodní část.** V horní části se nachází pomocný průběh uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn FID průběh analyzované směsi (A), EAD záznam tykadla IT (B) a EAD záznam tykadla druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní látky, které byly zjištěny ze 32 lokalit. Aktivních látek bylo označeno celkem 34. Autor: Jan Prchal

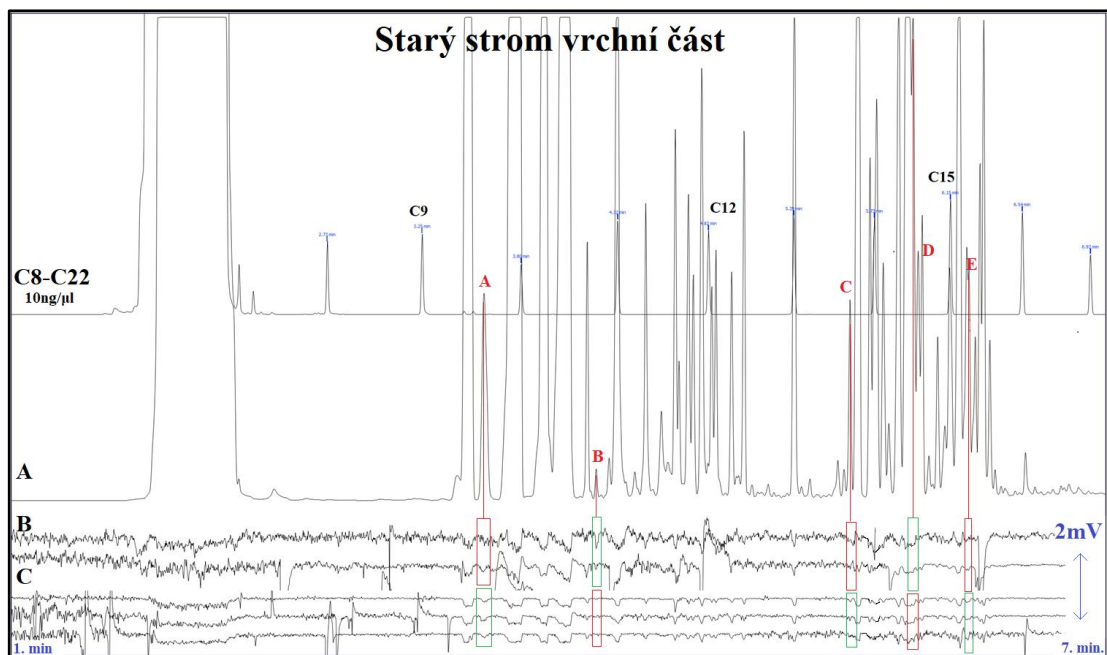


**Příloha 15: Analýza směsi YU1 - mladý strom vrchní část.** V horní části se nachází pomocný průběh uhlovodíků C8-C22, jejich průběhy slouží také k lepší orientaci v daném obrázku. V dolní části obrázku je znázorněn FID průběh analyzované směsi (A), EAD záznam tykadla IT (B) a EAD záznam tykadla druhu ID (C). Červeně jsou vyznačeny aktivní látky, které byly zjištěny ze 32 lokalit. Aktivních látek bylo označeno celkem 34. Autor: Jan Prchal

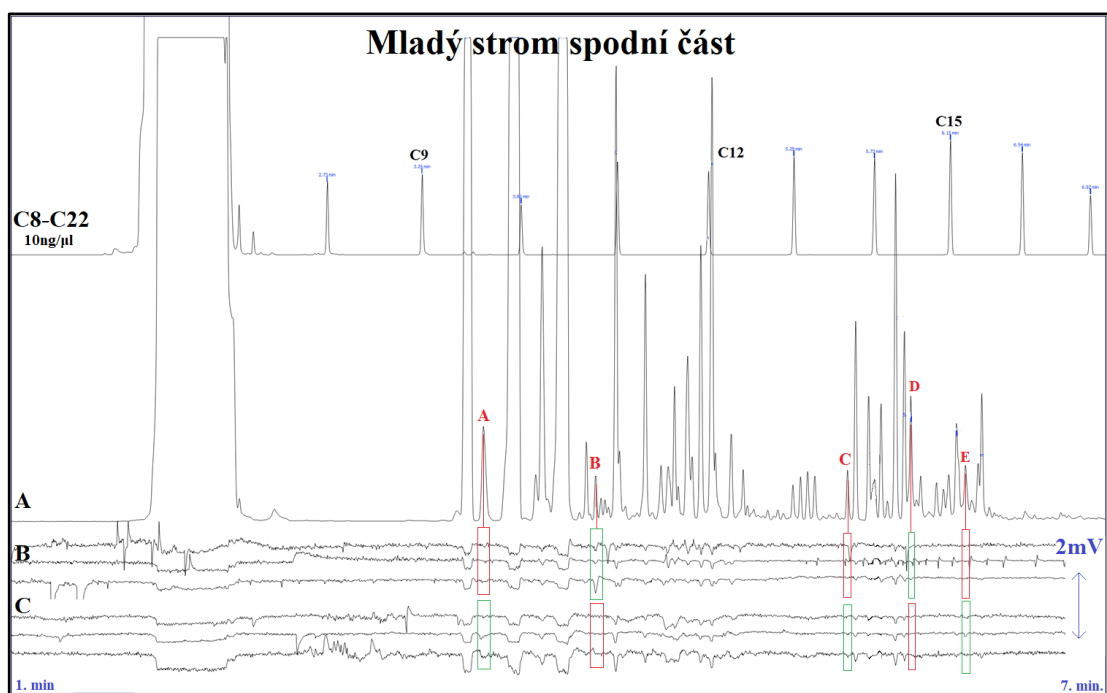


**Příloha 16: Potvrzení látek camphor, pinocamphone, borneol, isopinocamphone, verbenon, bornylacetat, longifolen a trans-caryophyllen.** Obrázek je výřez v rozmezí 4.30 - 7.30 minut a je zobrazen ve zvětšení 10 mV. Autor: Jan Prchal

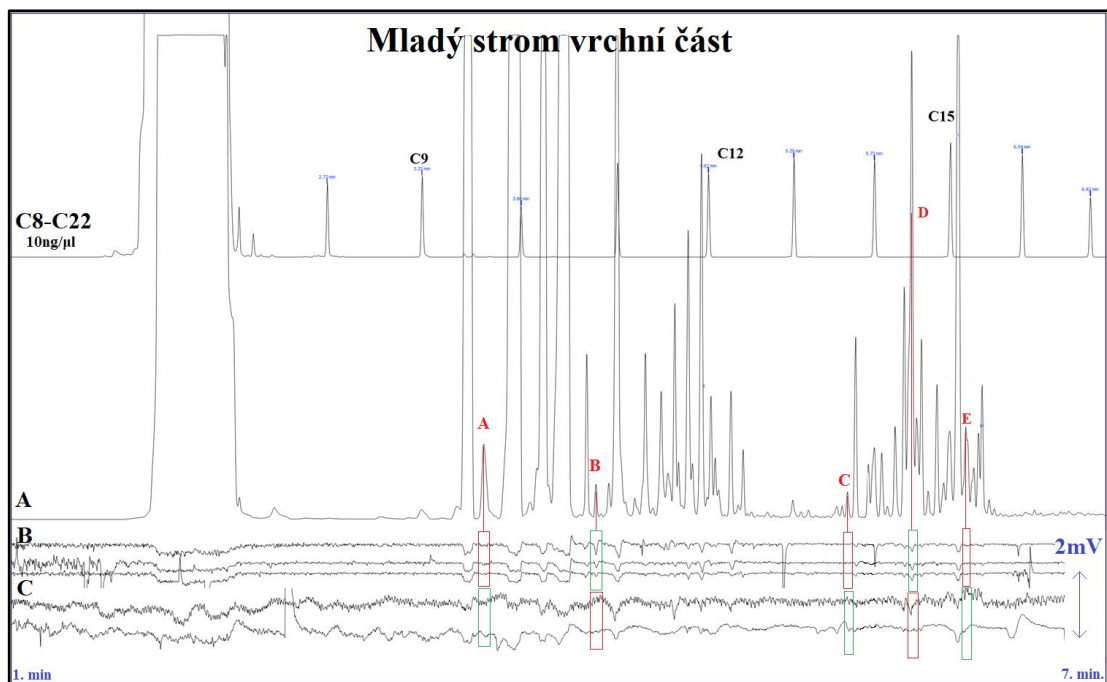




**Příloha 17: Průběh vzorku OU1, rozdílné EAD reakce druhů *Ips duplicatus* a *Ips typographus*. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Autor: Jan Prchal**



**Příloha 18: Průběh vzorku YL3, rozdílné EAD reakce druhů *Ips duplicatus* a *Ips typographus*. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Autor: Jan Prchal**



**Příloha 19: Průběh vzorku YU1, rozdílné EAD reakce druhů *Ips duplicatus* a *Ips typographus*. Zeleným rámečkem je vyznačena přítomnost reakce, červeným je zvýrazněna nulová reakce. Autor: Jan Prchal**