

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



**Stanovení těkavých látek a behaviorální aktivity u
návnad pro lýkožrouta smrkového vytvořených z jeho
asociovaných hub**

Diplomová práce

Autor: Bc. et Bc. Michaela Trojanová

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

© 2021 ČZU v Praze

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. et Bc. Michaela Trojanová

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Stanovení těkavých látek a behaviorální aktivity u návnad pro lýkožrouta smrkového vytvořených z jeho asociovaných hub.

Název anglicky

Volatile compounds determination and behavioral activity of baits made from European spruce bark beetle's associated fungi.

Cíle práce

Lýkožrout smrkový, *Ips typographus* (L.) je agresivní druh kůrovce orientovaný na smrky. Díky klimatickým změnám dochází v současnosti ve střední Evropě k jeho přemnožení s následným odumíráním smrkových porostů. Agresivita tohoto druhu je mimo jiné spojena s přenosem patogenních ophiostomatoidních hub rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora*, které inokuluje do hostitelských smrků.

Chemicko-ekologický vztah lýkožrouta smrkového s jeho asociovanými houbami je předmětem výzkumu, v němž bylo dokázáno, že houby s kůrovci komunikují prostřednictvím emitovaných těkavých látek.

Cílem této diplomové práce bude stanovit profil a kvantitu těkavých látek emitovaných speciálními odparníky připravenými z mycelií asociovaných hub *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*, a v polním pokusu otestovat jejich behaviorální aktivitu. Na základě výsledků bude diskutován chemicko-ekologický význam jednotlivých hub pro jejich přenašeče, lýkožrouta smrkového.

Metodika

V první fázi budou připraveny speciální odparníky z mycelií hub *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*, kdy budou houby pěstovány na živném médiu z agaru a z agaru smíšeného s lýkem hostitelského smrku ztepilého. V laboratorních pokusech, budou absorbovány těkavé látky z odparníků na sorbent a pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí bude stanoven jejich profil a kvantita. Takto definované odparníky budou testovány v polním pokusu ve feromonových lapačích v kombinaci s nízkou dávkou feromonu lýkožrouta smrkového. Na základě počtu odchycených brouků bude vyhodnocena atraktivita, či anti-atraktivita jednotlivých variant návnad pro lýkožrouta smrkového. Harmonogram: Jaro 2020- vývoj odparníků s mycelií hub, polní pokus, podzim 2020- stanovení odparu a identifikace látek z odparníků s mycelií v laboratoři. Zima/jaro 2021 -kompilace výsledků.

Doporučený rozsah práce

40-60

Klíčová slova

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

Doporučené zdroje informací

- BOONE, C. K.; SIX, D. L.; ZHENG, Y.; RAFFA, K. F. (2008) Parasitoids and dipteran predators exploit volatiles from microbial symbionts to locate bark beetles. *Environmental Entomology*, no. 37, s. 150-161. ISSN: 1938-2936.
- FURNISS, M. M.; SOLHEIM, H.; CHRISTIANSEN, E. (1990) Transmission of Blue-Stain Fungi by Ips typographus (Coleoptera: Scolytidae) in Norway Spruce. *Annals of the Entomological Society of America*. no. 83, s. 712-716. ISSN 0013-8746.
- KANDASAMY, D., GERSHENZON, J., ANDERSSON, M. N., HAMMERBACHER, A. (2019). Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (Ips typographus) with its fungal symbionts. *The ISME Journal*, no. 13(7) s. 1788-1800, doi:10.1038/s41396-019-0390-3.
- KANDASAMY, D., GERSHENZON, J., HAMMERBACHER, A. (2016): Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology*, no. 42, s. 952-969.
- KROKENE, P.; SOLHEIM, H. (2002) Assessing the virulence of four bark beetle-associated bluestain fungi using Norway spruce seedlings. *Plant Pathology*, no. 47, s. 537-540. ISSN 1365-3059.
- NOVOTNÝ, D.; JANKOVSKÝ, L. (2005) Notes on mycobiota associated with Ips typographus from the Šumava Mts. (Czech Republic). *Czech mycology*. no. 57, s. 91-96. ISSN 1211-0981.
- PAWLISZYN, J. (1997) Solid phase microextraction: theory and practice. New York: Wiley – VCH, Inc, 1997. 247 s. ISBN 0-471-19034-9.
- ZHAO, T.; AXELSSON, K.; KROKENE, P.; BORG-KARLSON, A. K. (2015) Fungal Symbionts of the Spruce Bark Beetle Synthesize the Beetle Aggregation Pheromone 2-Methyl-3-buten-2-ol. *Journal of Chemical Ecology*. no. 41, s. 848-852. ISSN 0098-0331.
-

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Ing. Roman Modlinger PhD.

Ing. Kateřina Beránková

Elektronicky schváleno dne 8. 7. 2020

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 18. 10. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 20. 04. 2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma "Stanovení těkavých látek a behaviorální aktivity u návnad pro lýkožrouta smrkového vytvořených z jeho asociovaných hub" vypracovala samostatně pod vedením Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

V Plzni dne 12. 4. 2021

Podpis autora

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Anně Jirošové, Ph.D., za odborné vedení práce, předání cenných zkušeností a zahrnutí do výzkumu Excelentního týmu pro mitigaci, Extemit – K.

Děkuji Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za výpomoc při chemických analýzách vzorků a Ing. Romanovi Modlingerovi, Ph.D. za statistické vyhodnocení výsledků.

Stanovení těkavých látek a behaviorální aktivity u návnad pro lýkožrouta smrkového vytvořených z jeho asociovaných hub

Abstrakt

Práce přináší ucelený pohled na problematiku chemicko-ekologického vztahu lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a jeho asociovaných hub v interakci se smrkem ztepilým (*Picea abies*). Lýkožrout smrkový přenáší a inokuluje patogenní houby rodu *Ophiostoma* spp., *Grosmannia* spp. a *Endoconidiophora* spp. do hostitelských smrků, kde jsou společně schopni snižovat obranyschopnost hostitele nebo dokonce způsobit odumření. Houby s kůrovci komunikují prostřednictvím emitovaných těkavých látek. Účinnost a behaviorální aktivita je testována pomocí kvantitativního polního pokusu pomocí speciálních odparníků připravených z mycelií asociovaných hub. Na základě provedeného polního pokusu jsou výsledky odchytů statisticky vyhodnoceny a provedenou chemickou analýzou je určen profil a kvantita emitovaných těkavých látek. Ověření atraktivity asociovaných hub a jejich behaviorálního vlivu na lýkožrouta smrkového vede k lepšímu pochopení složitého multitrofního systému a jejich chemicko-ekologického vztahu, který je v závěru práce diskutován.

Klíčová slova: *Ips typographus*, patogenní houby, emitované těkavé látky, chemicko-ekologický vztah, smrk ztepilý

Volatile compounds determination and behavioral activity of baits made from European spruce bark beetle's associated fungi

Summary

The thesis provides a comprehensive view of the chemical-ecological relationship between the European spruce bark beetle (*Ips typographus*) and its interaction with fungi associated with the Norway spruce (*Picea abies*). The bark beetle transmit and inoculate the pathogenic fungi of the genus *Ophiostoma* spp., *Grosmannia* spp. and *Endoconidiophora* spp. into the spruces hosts, where they are together able to reduce hosts defences or even cause their death. Fungi communicate with bark beetles through emitted volatile substances. The effectiveness and behavioural activity are tested by a quantitative field experiment using special evaporators prepared from mycelia of associated fungi. Based on the performed field experiment, the results from traps are statistically evaluated and the profile and quantity of emitted volatile substances are determined by the performed chemical analysis. Verification of the attractiveness of associated fungi and their behavioural effect on the European spruce bark beetle leads to a better understanding of the complex multi-trophic system and their chemical-ecological relationship, which is discussed at the end of the work.

Keywords: *Ips typographus*, pathogenic fungi, emitted volatile substances, chemical-ecological relationship, Norway spruce

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 13 |
| 2 | Cíl práce | 14 |
| 3 | Literární rešerše..... | 15 |
| 3.1 | Poznátky z biologie lýkožrouta smrkového | 15 |
| 3.1.1 | Stručná bionomie lýkožrouta smrkového | 15 |
| 3.1.2 | Současné rozšíření, hospodářský význam a ekonomické hledisko 1. smrkového..... | 16 |
| 3.2 | Chemická ekologie..... | 18 |
| 3.2.1 | Interakce organismů..... | 18 |
| 3.2.2 | Hostitelská dřevina | 19 |
| 3.2.3 | Komunikace, vyhledávání hostitele a jeho atraktivita | 20 |
| 3.3 | Asociované houby u kůrovců..... | 24 |
| 3.3.1 | Vztah asociovaných hub a brouka vůči hostitelské dřevině | 24 |
| 3.3.2 | Druhy asociovaných hub u kůrovců | 25 |
| 3.3.2 | Látky produkované houbami a jejich atraktivita pro kůrovce | 28 |
| 3.3.3 | Obranné látky smrku proti houbám | 30 |
| 3.4 | Způsoby určování a měření látek | 32 |
| 3.4.1 | Plynová chromatografie | 32 |
| 3.4.2 | Hmotnostní spektrometrie..... | 33 |
| 4 | Materiál a metodika..... | 35 |
| 4.1 | Metodika práce v terénu..... | 35 |
| 4.1.1 | Lokalita | 35 |
| 4.1.2 | Metodika odchyty a instalace | 36 |
| 4.1.3 | Systém aplikace návnad..... | 37 |
| 4.2 | Práce v laboratoři | 40 |
| 4.2.1 | Pěstování hub - tvorba návnad..... | 40 |
| 4.2.2 | Získávání a vyhodnocování těkavých látek z hub pomocí SPME a GC-MS | 42 |
| 4.2.3 | Kvantifikace a determinace odchyteného hmyzu | 43 |
| 4.3 | Metodika statistické analýzy | 44 |
| 5 | Výsledky | 46 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Stanovení těkavých látek emitovaných asociovanými houbami..... | 46 |
| 5.2 | Celkové odchyty brouků na jednotlivé návnady..... | 51 |
| 5.3 | Statistické porovnání odchytů na jednotlivé návnady v roce 2019 a 2020..... | 53 |
| 6 | Diskuze..... | 56 |
| 7 | Závěr | 62 |
| | Seznam literatury a použitých zdrojů..... | 64 |
| | Seznam příloh..... | 77 |
| | Příloha 1..... | 78 |

Seznam použitých zkratk

BVOC - biogenní těkavé organické sloučeniny

DI-SPME – Direct Immersing SPME

endo-1,3-DMDBN – endo-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane

EP – endoconidiophora polonica

exo-1,3-DMDBN – exo-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane

GC – plynová chromatografie (anglicky gas chromatography)

GCxGC – dvoudimenzionální plynová chromatografie

GC-MS – plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

GLVs – těkavé látky emitované zelenými listy (anglicky Green Leaves Volatiles)

GE – grosmannia europhioides

GP – grosmannia penicillata

HS-SPME - Headspace SPME

m - hmotnost

MB – 2-methyl-3-buten-2-ol

MS – hmotnostní spektrometrie (anglicky mass spectrometry)

MZe ČR - Ministerstvo zemědělství České republiky

SPME – mikroextrakce tuhou fází (anglicky solid-phase microextraction)

TIC – celkový iontový tok (anglicky Total Ion Current)

z – náboj

Seznam tabulek, obrázků a grafů

| | | |
|------------|---|----|
| Obrázek 1 | Lýkožrout smrkový (<i>Ips typographus</i>) | 15 |
| Obrázek 2 | a) vajíčko, b) larva, c) kukla, d) dospělec lýkožrouta smrkového | 16 |
| Obrázek 3 | Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v letech 2005 až 2019 (tis. m ³) | 18 |
| Obrázek 4 | Přibližná umístění sensil na tykadle obsahující čichové senzory (OSN) pro verbenon, cis-verbenol a cineol | 22 |
| Obrázek 5 | Methylbutenol | 23 |
| Obrázek 6 | Cis-verbenol | 23 |
| Obrázek 7 | Mističkový test k určení chování lýkožrouta smrkového vůči jednotlivým houbám | 27 |
| Obrázek 8 | Mističkový pokus | 30 |
| Obrázek 9 | Graf znázorňující výsledky mističkového pokusu | 30 |
| Obrázek 10 | Schéma plynového chromatografu (GC) | 33 |
| Obrázek 11 | Schéma hmotnostní spektrometrie | 34 |
| Obrázek 12 | Paseka pro terénní pokus ve vybrané lokalitě | 36 |
| Obrázek 13 | a) lapač typu Ecotrap, b) červeně-rozmístění dvou sekcí lapačů | 37 |
| Obrázek 14 | a) Návnada s houbou GE vypěstovanou na agaru, b) Kartellovy vialky připevněné na drátku s feromonem lýkožrouta smrkového | 38 |
| Obrázek 15 | Připevněné návnady z hub | 42 |
| Obrázek 16 | Získávání emitovaných látek z hub | 43 |
| Obrázek 17 | Počítání obsahu zkumavek na Petriho miskách | 44 |
| Obrázek 18 | Ilustrativní chromatogramy se záznamy vzorků všech tří druhů hub pátý den pěstování. Vizualizovány jsou selektivní hmoty pro izomery methylbutanolu, jeho acetáty a terpeny | 46 |
| Obrázek 19 | Výřez retenčního času chromatogramu z hub pěstovaných na agaru - caryophyllen emitovaný houbou GE. Sekviterpeny označené hvězdičkou nebyly detailněji identifikovány | 47 |
| Obrázek 20 | Výřez retenčního času chromatogramu z hub pěstovaných na agaru s floémem - caryophyllen u hub GE, GP a sekviterpeny označené hvězdičkou nebyly detailněji identifikovány | 48 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabulka 1 | Výčet jednotlivých návnad pro sekci 1; *směs agaru s floémem u sekce 2. | 39 |
| Tabulka 2 | Systém devíti replikací u obou sekcí | 40 |
| Tabulka 3 | Jednotlivé odchvyty na návnady z mycelií hub pěstovaných na agaru | 52 |
| Tabulka 4 | Jednotlivé odchvyty na návnady z mycelií hub pěstovaných na agaru s floémem..... | 52 |
| Tabulka 5 | Statistické vyhodnocení odchytů na agar..... | 54 |
| Tabulka 6 | Statistické vyhodnocení odchytů na agar s floémem..... | 55 |
| Graf 1 | Hodnoty emitovaných látek houbou <i>Endoconidiophora polonica</i> ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru. | 49 |
| Graf 2 | Hodnoty emitovaných látek houbou <i>Grosmannia penicillata</i> ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru..... | 49 |
| Graf 3 | Hodnoty emitovaných látek houbou <i>Grosmannia europioides</i> ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru | 49 |
| Graf 4 | Hodnota emitovaných látek houbou <i>Endoconidiophora polonica</i> ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru s floémem. | 50 |
| Graf 5 | Hodnoty emitovaných látek houbou <i>Grosmannia penicillata</i> ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru s floémem..... | 50 |
| Graf 6 | Množství emitovaných látek houbou <i>Grosmannia europioides</i> ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru s floémem | 51 |
| Graf 7 | Relativní počet odchycených lýkožroutů smrkových na jednotlivé látky během let 2019 a 2020, v pokusu s agarem..... | 53 |
| Graf 8 | Relativní počet odchycených lýkožroutů smrkových na jednotlivé látky během let 2019 a 2020, v pokusu s floémem. | 55 |

1 Úvod

Zaujalo mne téma možného vzájemného ovlivňování lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a jeho asociovaných hub v interakci s jeho hlavní hostitelskou dřevinou smrkem ztepilým (*Picea abies*). Významný vztah mezi lýkožroutem smrkovým a houbami rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora* byl vědecky prokázán laboratorními pokusy, kdy lýkožrout reaguje změnou chování na organické těkavé látky, které houby emitují (Kandasamy et al. 2016). Mimo jiné houby snižují obranyschopnost hostitelského stromu, tím přispívají k snazší kolonizaci lýkožroutem a k jeho následnému odumření, což je v dnešní době kůrovcových kalamit aktuální téma.

Vzhledem k probíhajícímu komplexnímu výzkumu Excelentního týmu pro mitigaci, Extemit – K, založenému na České zemědělské univerzitě, který se mimo jiné zabývá interakcí kůrovců a jehličnanů, jsem využila možnost zpracovat diplomovou práci jako jeho součást. Hlavním tématem práce je ověření vlivu tří druhů asociovaných hub v polním pokusu na chování lýkožrouta smrkového v jeho přirozeném prostředí a zároveň ověřit význam emitovaných těkavých látek asociovanými houbami při vyhledávání hostitele. Pochopení chemicko-ekologického vztahu lýkožrouta a hub, který spolu s hostitelskou dřevinou tvoří složitý multitrofní systém, může být odpovědí na otázku ochrany lesů při řešení aktuálních i budoucích problémů s přemnožením lýkožrouta smrkového nejen v našich lesních ekosystémech.

2 Cíl práce

Diplomová práce je zaměřena na potvrzení či vyvrácení atraktivity tří druhů ophiostomatoidních hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*), který je inokuluje do hostitelských smrků. Předmětem výzkumu je chemicko-ekologický vztah lýkožrouta smrkového a jeho asociovaných hub rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora*, komunikujících s kůrovci prostřednictvím emitovaných těkavých látek. Hlavním cílem výzkumu je stanovení emitovaných těkavých látek hub a otestování jejich behaviorální aktivity v polním pokusu pomocí speciálních odparníků.

Dílčí cíle mají jako celek porovnat výsledky odchytů a zhodnotit je v chemicko-ekologickém vztahu jednotlivých hub a jejich přenašeče, lýkožrouta smrkového.

Dílčí cíl 1 Analyzovat vzorek emitovaných těkavých látek hub a pomocí plynového chromatografu s hmotnostní spektrometrií stanovit jejich profil a kvantitu.

Dílčí cíl 2 V polním pokusu ověřit účinnost a behaviorální aktivitu hub pomocí speciálně vytvořených návnad s jejich myceliem ve feromonových lapačích podle stanoveného replikačního schématu.

- **Výzkumná otázka 1** - Je při odchytu lýkožrouta smrkového aktivita hub *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia europhioides* a *Grosmannia penicillata* rozdílná?

Dílčí cíl 3 Statisticky porovnat atraktivitu jednotlivých návnad pro lýkožrouta smrkového.

- **Výzkumná otázka 2** - Jakou roli mají těkavé látky z hub na odchyt lýkožrouta smrkového?
- **Výzkumná otázka 3** - Jaký je odchyt lýkožrouta smrkového na různé koncentrace hub?

Dílčí cíl 4 Vyhodnotit chemicko-ekologický význam jednotlivých hub pro lýkožrouta smrkového.

3 Literární rešerše

3.1 Poznatky z biologie lýkožrouta smrkového

3.1.1 Stručná bionomie lýkožrouta smrkového

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je řazen do čeledi nosatcovitých (Curculionidae) a podčeledi kůrovcovitých (Scolytinae), která byla dříve jako samostatná čeleď přerazena na základě podobnosti preimaginálních stadií do podčeledi nosatcovitých (Curculionidae) (Obrázek 1). Nosatcovití patří do řádu brouci (Coleoptera), třídy hmyz (Insecta) a kmene členovců (Arthropoda) (Knížek, Beaver 2004). Kůrovcovitých se v rámci České Republiky vyskytuje 104 druhů (Křístek a Urban 2013).



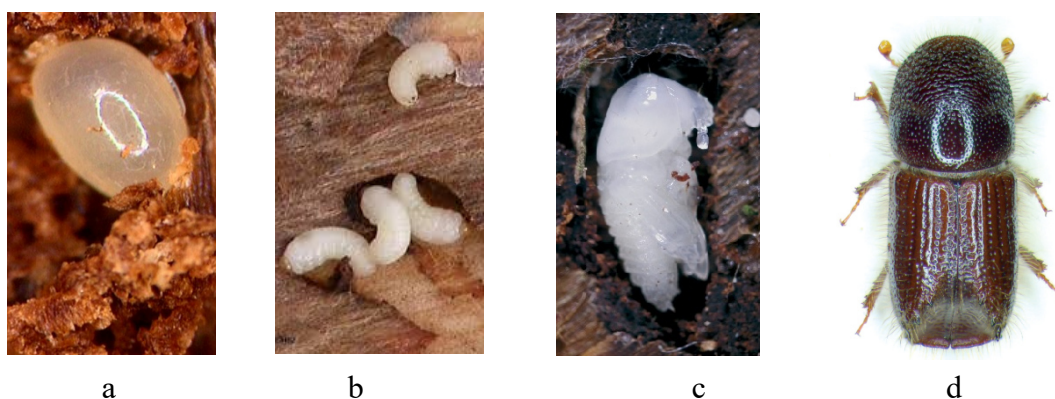
Obrázek 1 Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) (Zdroj: <https://deti.vls.cz/>)

Tělo lýkožrouta smrkového má válcovitý tvar o velikosti 4,5 - 5,5 mm s velkým štítem a kratšími krovkami, které jsou v zadní části vyhloubené. Vyhloubení je matné a na okrajích vyrůstají čtyři páry zoubků, třetí shora je největší a bývá knoflíkovitě zakončen. Barevné varianty se vyskytují od hnědé, hnědočerné, šedočerné až černé. Obvod těla je lemovaný zlatavými chloupky. Hlava s velkým štítem nese ústní ústrojí a smyslové orgány, z nichž je nejvýznamnější párový smyslový orgán v podobě tykadel, které lýkožrout využívá k hmatu, čichu i vnímání zvuku. Hrud' a zadeček jsou tvořeny

několika tělními články, na hrudi se upínají 3 páry nohou a 2 páry křídel. (Pfeffer 1955; Křístek a Urban 2013).

Lýkožrout smrkový se vyvíjí stejně jako ostatní druhy hmyzu přes stádium vajíčka, larvy, kukly a dospěléce, tzn. s proměnou dokonalou (Obrázek 2). Vývoj jedné generace lýkožrouta smrkového trvá v našich podmínkách od založení požerku po ukončení zralostního žíru nových dospělců 6 – 10 týdnů.

Je polygamní, sameček oplodňuje zpravidla 1 - 3 samičky a mívá dvě generace za rok, za příznivých povětrnostních podmínek i tři generace. Po překonání obranyschopnosti napadeného stromu produkují samečci agregační feromony, kterými vyvolávají hromadný nálet a lákají samičky. V průběhu vývoje nových jedinců se larvy i nově vylíhnutí brouci živí pletivy vyšších rostlin a podhoubím některých symiotických hub (Pfeffer 1955; Zahradník, Knížek 2000).



Obrázek 2 a) vajíčko, b) larva, c) kukla, d) dospělec lýkožrouta smrkového

(Zdroj: www.biolib.cz)

3.1.2 Současné rozšíření, hospodářský význam a ekonomické hledisko lýkožrouta smrkového

Areál výskytu lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) zaujímá značnou část palearktické oblasti a váže se zejména na monokultury smrku ztepilého (*Picea abies*). Zasahuje od Pyrenejí po Japonsko, severní hranice výskytu prochází v Evropě Laponskem, jižní hranice severním Řeckem, Itálií a Tureckem. Výjimkou je Makedonie, kde nebyl výskyt zjištěn vůbec důsledkem zastoupení smrkových porostů ve výši pouhého 1 % lesní plochy. V Asii tvoří severní hranici oblast arktické tundry

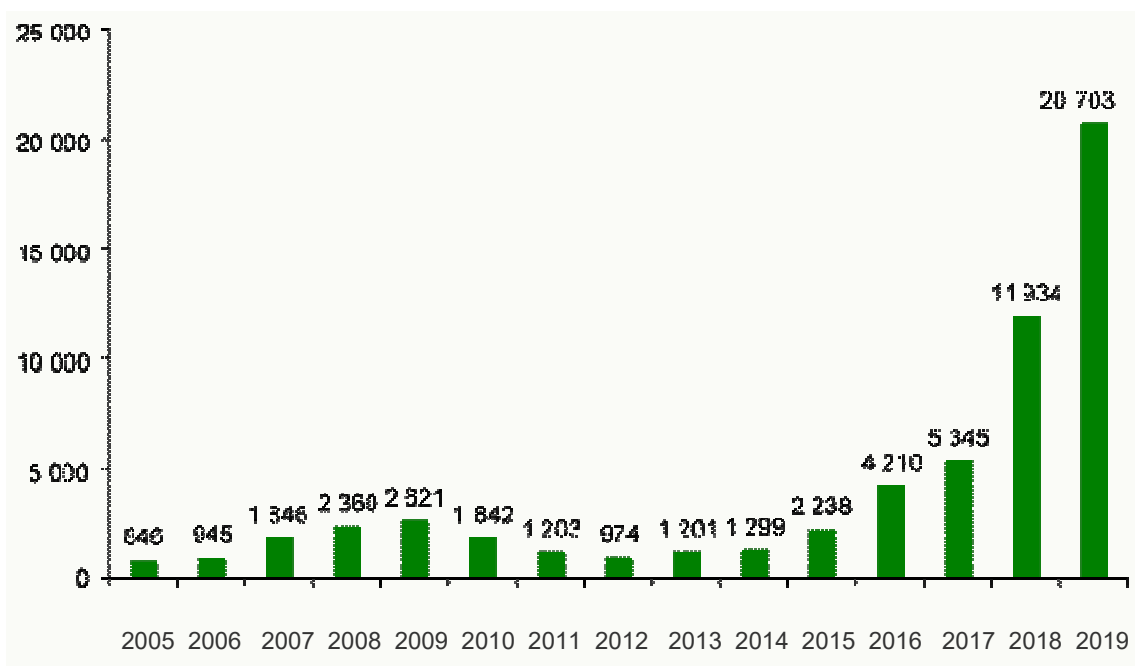
mezi 68 – 69° severní šířky, jižní pak protíná severní Kazachstán, Mongolsko a Čínu (Skuhravý 2002).

Z hlediska hospodářského významu je lýkožrout smrkový ve smyslu vyhlášky MZe ČR č. 101/1996 Sb., v platném znění, v § 3 klasifikován jako kalamitní škůdce a je označován za nejvýznamnějšího podkorního škůdce celé Evropy (Vyhláška č. 101/1996 Sb.) Přestože je typickým sekundárním škůdcem, který napadá čerstvě odumřelé dříví (polomy, vývraty, dřevo z těžby), napadá při přemnožení i zcela zdravé stromy. Druhotné poškození od kůrovců mohou způsobovat i houby, jejichž spory mohou přenášet na povrchu svého těla nebo ve střevech. Přítomnost hub způsobuje modrání dříví, což je považováno za jeho znehodnocení, avšak někteří zpracovatelé dříví tohoto využívají ve prospěch svých výrobků v ohledu na jedinečné barevné kresby dřeva. Symbiotické soužití lýkožrouta smrkového a hub bylo zjištěno například u rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Endoconidiophora* a dalších hub (Kandasamy et al. 2016), o čemž dále pojednává kapitola 3.3.2 Druhy asociovaných hub u kůrovců.

Přemnožení lýkožrouta smrkového a následné kalamitní stavy v původních lesích střední Evropy jsou známé již od 17. století. Ve 20. století mu však poskytly příhodné podmínky pro svůj rozvoj zejména smrkové monokultury, které na mnoha místech nahrazují původní smíšené lesy (Skuhravý 2002). V roce 2019 bylo v České republice evidováno 20,7 mil. m³ vytěženého smrkového kůrovcového dříví. Ve srovnání s rokem 2018 (cca 12 mil m³) představuje tato výše nárůst o více než 70 %. Jde o dříví napadené lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*), který je obvykle doprovázen lýkožroutem lesklým (*Pityogenes chalcographus*) a v některých oblastech i lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*). Další stojící, do konce roku nezpracované kůrovcové stromy a souše napadené lýkožrouty v roce 2019 představují přibližně 5–10 mil. m³. V přepočtu vykazuje evidované kůrovcové dříví v průměru alarmujících cca 15,9 m³/ha smrkových porostů, což je přibližně osmdesátinásobné překročení určeného základního stavu 0,20 m³/ha podle vyhlášky MZe č. 101/1996 Sb., ve znění pozdějších předpisů (Vyhláška č. 101/1996 Sb.). Z dlouhodobého hlediska je celková sumarizace vykázaného kůrovcového dříví v roce 2019 na rekordní výši, které nebylo dosud na území České republiky dosaženo (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky 2018) (Obrázek 3).

Z ekonomického hlediska mají kůrovcové kalamity velký dopad na ceny dříví. Vývoj průměrných cen klesá následkem výrazně vyšší nabídky majitelů lesů nad

poptávkou zpracovatelů surového jehličnatého dříví na tuzemském trhu. Průměrný hospodářský výsledek všech vlastníků lesů (státních, obecních a soukromých) v roce 2019 činil 651 Kč/ha lesa. Oproti roku 2018 se snížil o 129 Kč/ha, oproti roku 2017 se snížil o 2 060 Kč/ha (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky 2018).



Obrázek 3 Evidovaný objem smrkového kůrovcového dříví vytěženého v letech 2005 až 2019 (tis. m³) (Zdroj: VHMÚ)

3.2 Chemická ekologie

3.2.1 Interakce organismů

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) je největší biotický škůdce smrku ztepilého (*Picea abies*), který spolu se symbiotickými ophiostomatoidními houbami snižuje jeho obranyschopnost. Jedná se o složitý multitrofní systém, který zahrnuje poznatky o jejich chemické ekologii a behaviorální aktivitě (Adams et al. 2013; McDowell et al. 2008)

Lýkožrout smrkový je jeden z mála druhů kůrovců na světě, který díky rychlému vzrůstu své populace může vést k rozsáhlému odumírání smrkových lesů v Evropě. Jejich odolnost a funkčnost je stále více ohrožována jeho hromadnými útoky. Navíc

fyziologicky oslabené porosty, které jsou dlouhodobě zatížené stresem, produkují a uvolňují do atmosféry směsi látek, které jsou odlišné od stromů v dobrém zdravotním stavu a zároveň jsou atraktivní pro kůrovce (Skuhřavý 2002). Obranný systém, který reaguje na jednotlivé atakující brouky, je energeticky velmi náročný a strom je schopen krýt tuto potřebu energie pouze omezenou dobu. Obranschopnost stromů tedy překonává lýkožrout smrkový hromadným náletem, který koordinuje pomocí agregačního feromonu (Raffa, Berryman 1983). Pro úspěšné zdolání stromu je potřebný určitý počet jedinců. Podle stanoveného hustotně závislého prahu úspěšného napadení se tento počet pohybuje v evropských podmínkách mezi 300 - 850 jedinci (Lieutier 2004). Navíc u starších zralých smrků výrazně klesá koncentrace okysličeného monoterpenu trans-4-thujanol, který vykazuje repelentní účinky na obě pohlaví lýkožrouta smrkového. Zároveň stromy staré, poškozené, stresované suchem či jedinci s tenkou borkou nebo napadení jiným patogenem jsou považovány za méně odolné vůči napadení (Baier 1996; Lieutier 2004; Wermelinger 2004). Naopak stromy, které úspěšně obstály napadení lýkožroutů, jsou odolnější vůči dalším jejich útokům. Tato schopnost se označuje jako sekundární rezistence. Jedním ze způsobů oslabování obranného systému stromu je právě inokulace asociovaných hub, zejména rodu *Ophiostoma* (Christiansen et al. 1987), kterými se tato diplomová práce zabývá.

3.2.2 Hostitelská dřevina

Hlavní hostitelskou dřevinou lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a jeho asociovaných hub je smrk ztepilý (*Picea abies*). Jehličnaté stromy si vytvořily proti fyziologickému a chemickému průniku patogenů efektivní obranný systém, který je odpuzuje nebo dokonce zabíjí. Jedná se o konstitutivní a indukovaný obranný mechanismus (Bonello, P., Gordon, T.R., et al. 2006).

Konstitutivní obrana neboli primární obrana, je první obranná linie přítomna ve tkáních již před kolonizací stromu herbivory nebo patogeny. Hlavní složkou je pryskyřice, která obsahuje terpenické látky tvořené buňkami pryskyřičných struktur v jehlicích, dřevě a kůře (Franceschi et al. 2005). Tyto struktury (buňky, měchýřky a kanálky) hromadí toxickou pryskyřici pod tlakem, která se uvolní, jakmile cizí organismus napadne strom a dojde k jeho zalití. Rovněž má repelentní účinky (Berryman 1972). Významnou součástí pryskyřice jsou izoprenoidy, které lze rozdělit

podle počtu izoprenových jednotek v molekule na hemiterpeny (C5), monoterpeny (C10), seskviterpeny (C15) a diterpeny (C20) atd. Pryskyřice obsahuje mimo jiné i monoterpenické látky toxické pro herbivory, jako je například pinosylvin nebo alpha-pinene, kterými tak zvyšuje obranyschopnost stromu. (Heil et al. 2007).

K indukované obraně získává strom energii ze svých zásobních látek. U jehličnanů je tento druh obrany rozmanitý a zahrnuje posílení již existujících mechanismů i tvorbu nových struktur a metabolitů (bílkoviny, ligniny), které mají vzájemnou působnost s herbivory či patogeny (Franceschi et al. 2005). Na rozdíl od konstitutivní obrany se indukční obrana rozvíjí postupně až po invazi a poškození stromu. V průběhu poškození se vytvoří jizva izolující reakční zónu s agresorem od zbytku stromu a později dochází v místě nad a pod poškozením k tvorbě traumatických pryskyřičných kanálků z kambiálních buněk a tím k tvorbě nové pryskyřice. Indukovaná obrana je podobně jako konstitutivní podmíněna geneticky. Míra jejího rozvoje je závislá na velikosti poškození, fyziologii a kondici napadeného jedince (Kalinová a spol. 2011).

Dalším obranným mechanismem je uvolňování biogenních těkavých organických sloučenin (BVOC), mezi které patří i těkavé hormony rostlin methyljasmonát, methylsalicylát a ethylen, které stresované rostliny produkují. Stimulují v nich expresi „obranných“ genů jako odpověď na napadení herbivorem či patogenem a zároveň jsou uvolňovány do vzduchu, jako významný komunikační signál (Li et al. 2002; Baldwin et al. 2006). Vlivem stresových faktorů se mohou měnit poměry koncentrací BVOC v závislosti na intenzitě stresu (Tingey 1980).

3.2.3 Komunikace, vyhledávání hostitele a jeho atraktivita

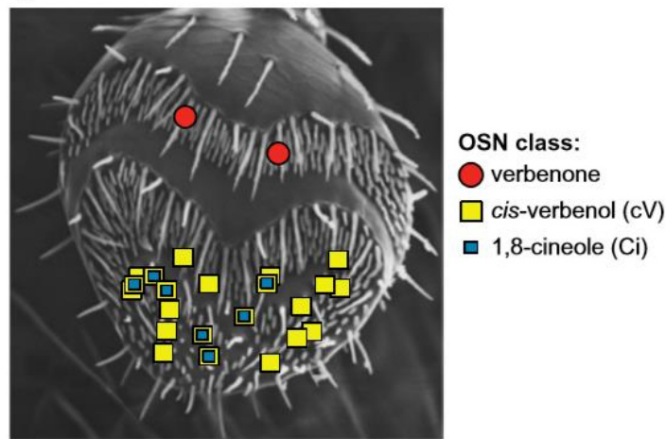
Dorozumívací prostředky hmyzu jsou signály fyzikální povahy - zvukové, zrakové, hmatové, elektromagnetické a především chemické. Pro chemickou komunikaci využívá hmyz čichové a chuťové smysly pro rozpoznání látek rozptýlených ve vzduchu nebo ve vodě. Těkavé chemické látky využívané k dorozumívání hmyzu se souborně nazývají semiochemikálie a jsou vnímány čichovými receptory umístěnými na tykadlech. Dělí se na feromony - látky pro vnitrodruhovou komunikaci a na allomony - látky pro mezidruhovou komunikaci (Nascimento et al. 1996).

Nejrozšířenější hypotéza o způsobu výběru stromu kůrovcem je teorie

chemorecepce (Skuhravý 2002). Pokud si brouci vybírají stromy podle síly jejich obranyschopnosti, lze očekávat, že fyzicky slabší či stresované stromy, které nejsou schopny produkovat dostatečné množství obranných látek (pryskyřice), jim umožní po napadení stromu produkci agregačního feromonu a tím následnou hromadnou kolonizaci (Byers 2004). Lýkožrout smrkový se při rojení snaží najít vhodný strom pro páření a vznik další generace. Nejčastěji se jedná o oslabený strom, vývraty či polomy nebo jedince oslabené suchem. Zároveň je ale považován za agresivní druh kůrovců, který může napadat i zdravé stojící stromy (Wainhouse 2008), k čemuž dochází v případech jeho přemnožení, kdy jsou oslabené stromy již kolonizovány (Martikainen et al. 1999).

Způsob výběru hostitelského stromu lýkožroutem smrkovým není vědecky jednotně určen, avšak probíhá podle dvou teorií. Obecně je přijímána teorie, že tzv. pionýrství brouci jsou během období rojení lákáni na dálku primárními atraktanty hostitelského stromu (Wermelinger 2004), které mohou být ještě podporovány těkavými látkami uvolňovanými symbiotickými houbami (Kandasamy et al. 2016). Tyto chemické látky lýkožrout rozezná pomocí smyslových orgánů (Wermelinger 2004). Čichové receptory umístěné na tykadlech sloužící k vnitrodruhové (feromony) i mezidruhové komunikaci (allomony) dokáží reagovat na těkavé chemické látky a tím se dorozumívají. Bylo zjištěno, že na jednotlivých "chlupcích" tykadel lýkožrouta smrkového se nachází široká škála neuronů, díky kterým je schopen reagovat například na cis-verbenol, verbenon či myrcen (Andersson et al. 2009; Schiebe et al. 2012) (Obrázek 4).

Další studie Kandasamyho (2019) uvádí také reakce lýkožrouta smrkového na fungální těkavé látky typu 2-fenyletanol a geranyl aceton (Tømmerås 1985).



Obrázek 4 Přibližná umístění sensil na tykadle obsahující čichové senzoričné neurony (OSN) pro verbenon, cis-verbenol a cineol

(Zdroj: Raffa et al. 2016)

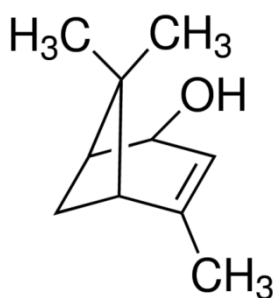
Nejvýraznější roli při tomto výběru hraje monoterpen smrku alfa-pinen. Navíc vylučování jiných poměrů a množství pěti monoterpenů ve své vyšší a nižší části kmene určuje místo napadení hostitelské dřeviny. Lýkožrouta smrkového přitahují na strom monoterpeny v koncentraci 0,03 - 0,05 % (Skuhravý 2002). Druhou teorií je náhodné vyhledání stromu v prostoru. Pionýrství brouci tedy při rojení sedají náhodně na různé stromy a až poté hodnotí jejich potenciál coby hostitelský strom na základě chemických informací, což bylo pomocí zpřesněných počítačových simulací dokázáno (Byers 1996).

Po zavrtání pod kůru sameček vytváří během 2–4 dnů snubní komůrku (Pfeffer 1954). Po úspěšném překonání obrany stromu brouk konzumuje při tvorbě snubní komůrky lýko. Zažívání brouka je opatřeno mikroorganismy, které pomáhají při trávení celulózy, hemicelulózy apod. a současně přeměňují alfa-pinen obsažený v lýku na složitější sloučeniny. Tyto sloučeniny posléze působí jako agregační feromon, který je do okolí uvolňován pomocí trusu brouka. Ten je vytlačován ve formě hnědých drtinek vstupním otvorem mimo požereky, jenž jsou patrné na kořenových náběžích stromu. Na tento agregační feromon reagují obě pohlaví. Přilákání samečci působí na strom velkým náporům, kterému se nedokáže ubránit a následně podlehně kolonizaci. Zároveň inokulují hostitele asociovanými houbami.

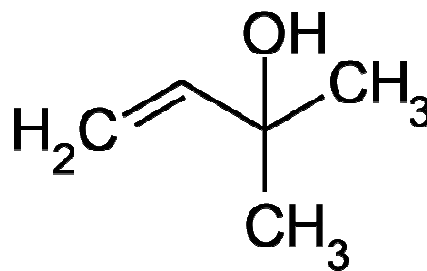
Hlavními složkami samčího feromonu jsou methylbutenol (Obrázek 5) a cis-verbenol (Obrázek 6). Methylbutenol je produkován nezávisle na hostitelském stromu, biosyntéza cis-verbenolu závisí na hladině alfa-pinenu v kůře. Během napadení stromu

kůrovcem je z pryskyřičných kanálek stále produkován alfa-pinen, který může lákat další brouky v synergii s nízkým množstvím feromonů (Erbilgin et al. 2007). Proto je alfa-pinen významnou sloučeninou pro hromadný útok brouků a produkci semiochemikálií (Birgersson et al. 1984, Schlyter et al. 1987)

Při tvorbě matečných chodeb samice vytlačuje trus se zbytky lýka do prostoru snubní komůrky a samec je vyhazuje z požerku ven závrtočným otvorem. Tímto způsobem se do okolí uvolňuje i samičí feromon, jehož hlavními složkami jsou ipsenol a ipsdienol. Pokud je dosaženo vyšší koncentrace ipsenolu a ipsdienolu než cis-verbenolu, je tím zajištěno omezení dalších náletů sameček a samic na hostitelskou dřevinu pro zachování dostatku potravy a místa v rámci již přítomného množství brouků. Další antiagregační látkou je verbenon. Jedná se o metabolický produkt, který vzniká prostřednictvím činnosti asociovaných mikroorganismů z monoterpenů smrku (Wainhouse 2008). Jeho zvýšená emise podporuje úspěšné založení hub v hostitelské dřevině. Zároveň působí jako antiatraktant v samotných diferentních dávkách nebo současně s nehostitelskými těkavými látkami a také proti účinkům agregačních feromonů (Cale et al. 2019; Bakke 1981; Zhang, Schlyter 2003; Binyameen et al. 2014, Lindgren, Miller 2019).



Obrázek 5 Methylbutenol
(Zdroj: www.wikipedia.org)



Obrázek 6 Cis-verbenol
(Zdroj: www.sigmaaldrich.com)

3.3 Asociované houby u kůrovců

3.3.1 Vztah asociovaných hub a brouka vůči hostitelské dřevině

Vztah mezi kůrovci a s nimi asociovanými houbami není zdaleka jednoznačný. S některými druhy hub mají úzký symbiotický vztah ovlivňující jejich život například v podobě zlepšení výživy, ale také mohou mít na brouka negativní dopad přitahováním jeho predátorů a parazitů. Brouk plní funkci přenašeče, kdy napomáhá šíření hub pomocí zanášení jejich spor do hostitelského stromu při zavrtávání do kůry a houby jsou nápomocné při zdolávání obranných mechanismů hostitele nebo poskytují broukům potravu. Spory hub přenášejí v mycangiích, což jsou specializované struktury pro tento účel v podobě mikroskopických žlaznatých prohlubní vyplněných olejovitou tekutinou. Mycangia jsou umístěná na štítu (pronotum) nebo na krovkách (elytra). Naopak Furnisse et al. (1990) uvádí, že lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) žádná mycangia nemá a spory hub přenáší na své kutikule nebo ve střevech. Dalším přenašečem mohou být roztoči žijící na povrchu kutikuly lýkožrouta (Viiri 1997; Kandasamy et al. 2016).

Jedním z předpokladů je, že si lýkožrouti vybírají hostitelskou dřevinu na základě chemických stimulů působících na krátké vzdálenosti. Takovou navigaci k vhodným hostitelům mohou způsobovat těkavé látky uvolňované symbiotickými houbami. Stále více důkazů naznačuje, že houbové symbionty kůrovců mají více rolí v jejich životním cyklu než ochromení obrany stromů nebo poskytování výživy brouků. Například ophiostomatoidní houby by mohly sloužit jako zdroj semiochemikálií a tím ovlivňovat chování stejných nebo různorodých druhů kůrovců (Kandasamy et al. 2016). Houbové symbionty dokáží měnit hostitelské tkáně metabolizováním obranných sloučenin hostitelských dřevin, čímž snižují toxicitu terpenů a fenolů pro kůrovce i houby. Díky této schopnosti jsou považovány za podporovatele útoku kůrovců na hostitelské dřeviny, kterými jsou schopni docílit jeho odumření (Christiansen et al. 1987; Krokene 2015; Krokene et al. 2001; Lieutier et al. 2009; Rafa et al. 2015).

Rozmnožování hub většinou probíhá prvně v lýku, kde jejich rozrůstání dosahuje rychlosti až 1 cm za den. Po obsazení lýka začínají napadat dřevo, ve kterém rychlost rozmnožování naopak výrazně klesá a dosahuje 1 cm v řádu několika týdnů (Hulcr 2013). Houby samotné však nejsou schopné proniknout do vnější tuhé kůry stromu, ale po úspěšném “naočkování” do floému hostitele prostřednictvím kůrovce,

spouští rozsáhlé hypersenzitivní reakce kolem místa infekce a akumulují specializované metabolity, které vedou k nekrotám floémových tkání. (Berryman 1972; Erbilgin et al. 2006; Franceschi et al. 2005; Lieutier et al. 2009; Zhao et al. 2011). Zároveň mohou houby vyčerpávat rezervy stromů, například lipidy, které jsou nezbytné k syntéze indukovatelných obranných látek proti útočníkům (Lahr, Krokene 2013). Tímto způsobem mohou houby žít a prospívat z uložených zdrojů stromů a následně tím snižovat jeho obranyschopnost a bránit vzniku sekundární rezistence proti patogenům. Po úspěšné kolonizaci floému a bělového dřeva mohou způsobovat svým tmavým myceliem rozsáhlé modrošedé až načernalé zbarvení dřeva a zároveň jím poskytovat živiny pro larvy i vylíhnuté brouky. Symbiotické houby totiž koncentrují dusík a fosfor, čímž dokáží uspokojit nutriční požadavky larev i vylíhnutých brouků. (Six 2019; Six, Elser 2020). Zároveň dodávají základní živiny důležité pro oogenezi a vývoj larev, jako jsou vitamíny, aminokyseliny, ergosterol a houbový sterol, které se ve floému vyskytují v minimálních koncentracích nebo dokonce úplně chybí (Bentz, Six 2006; Davis et al. 2019).

Zapojením symbiotických interakcí s houbami, které detoxikují obranné sloučeniny stromů, se kůrovci přizpůsobili jejich obraně a jsou společně schopni kolonizovat i zdravé stromy (Lindgren, Rafa 2013).

3.3.2 Druhy asociovaných hub u kůrovců

V požercích lýkožroutů se vyskytuje několik druhů asociovaných hub najednou, ale jen některé mají patogenní vliv na hostitelskou dřevinu. V symbióze s lýkožrouty žijí nejvíce houby vřeckovýtrusné (Ascomycota) i stopkovýtrusné (Basidiomycota). Z oddělení vřeckovýtrusných hub jsou to houby rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis* a *Endoconidiophora* a z oddělení stopkovýtrusných pak rod *Entomocorticium* (De Beer et al. 2014).

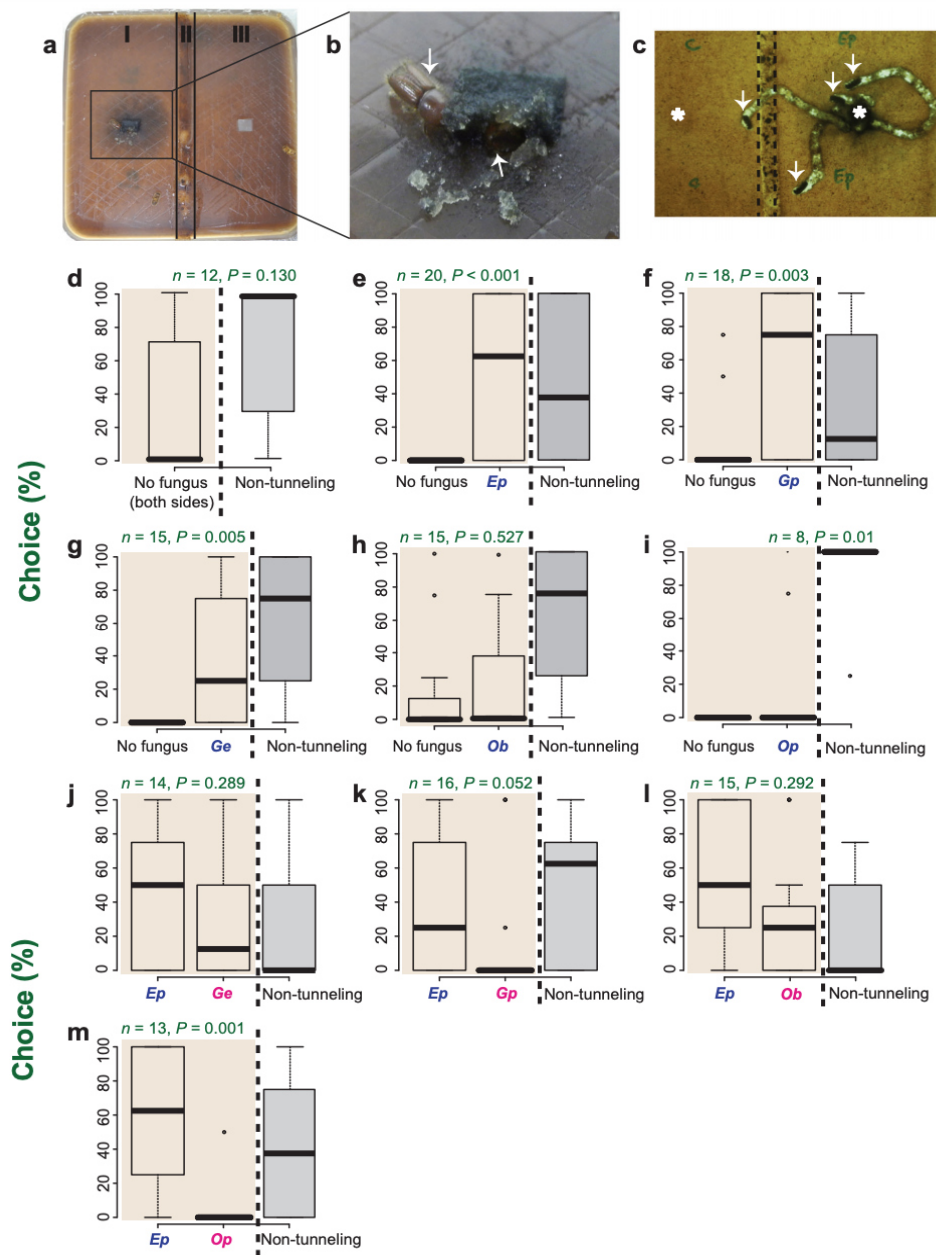
Nejrozšířenějším a nejagresivnějším kůrovcem nejen ve světě, ale i u nás, je lýkožrout smrkový (*Ips typographus*). Váže se na něj velké množství druhů hub a v každé části Evropy se můžeme setkat s různými druhy vyskytujícími se v jeho požercích. Jednotlivé druhy hub mají rozdílné adaptační schopnosti na prostředí, ve kterém žijí, proto se na jejich výskytu může podílet místní klima, rozdílné optimální teploty pro jejich růst nebo vlhkost floému (Kandasamy et al. 2016).

U lýkožrouta smrkového lze houbovou komunitu rozdělit do dvou skupin dle teplotního optima. Nejčastějšími symbionty jsou houby *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia penicillata*, *Grosmannia europhioides* patřící mezi houby snášející chlad. Jejich optimální teplota je mezi 20-23 °C. Oproti tomu se symbiont *Ophiostoma bicolor* řadí mezi houby tolerující teplo až kolem 30 °C (Solheim 1991). Rozdílné tolerance teplot vysvětlují různorodé složení houbových společenstev podle výskytu v teplejších nebo chladnějších oblastech. Jiné houby jako například *Ophiostoma piceae* jsou ve spojení s lýkožroutem smrkovým nalezeny příležitostně a jsou považovány za sekundární symbionty (Kandasamy et al. 2016). Další možné druhy jsou například *Grosmannia piceiperda* a *Ophiostoma brunneociliatum* (Néve Repe et al. 2013).

Endoconidiophora polonica, dříve známá jako *Ceratocystis polonica* (De Beer et al. 2014), je nejvíce virulentní modře zbarvená houba, která se často objevuje v poškození lýkožrouta smrkového jako první (Krokene, Solheim 1998). Houby rodu *Endoconidiophora* mohou výrazně oslabit zcela zdravý hostitelský strom nebo způsobit dokonce jeho odumření. Rody hub *Ophiostoma* a *Grosmannia* nejsou ve srovnání s houbou *Endoconidiophora polonica* tak silné patogeny.

Asociace kůrovců s houbovými ektosymbionty byla sledována již v roce 1936 (Schmidberger 1936), ale nebylo jasné, na základě čeho se symbióza udržuje. Kandasamy et al. (2019) provedl test chování k určení, zda lýkožrout smrkový opravdu může rozlišovat jednotlivé houby. Test probíhal pomocí čtvercové Petriho misky plněné agarem (Obrázek 7 a - c), která byla rozdělena na kolonizovanou stranu houbami (I) a na stranu bez hub (III) oddělenou 1 cm širokým pruhem agarů obsahujícím hygromycin (II). Do takto připravené misky byli vpuštěni 4 dospělí brouci a bylo pozorováno, kterou stranu upřednostní pro zralostní žír. Strana bez přítomnosti hub nevyvolávala v broucích potřebu zralostního žíru, avšak na straně s přítomností hub započali ihned zralostní žír na houbových zátkách nebo na vedlejším myceliu, kterým bylo médium naočkováno (Obrázek 7 b, c). Tento obrázek také znázorňuje zvětšený pohled na Petriho misku zdola 6 hodin po přidání kůrovce. Hvězdičky (*) udávají umístění agarových zátek používaných k naočkování média plísní a bez plísně (kontrola), a šipky udávají tunelování brouků. Ze všech testovaných hub byly nejatraktivnější *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* (Obrázek 7 e - g) ve srovnání s nekolonizovanou kontrolní stranou. Pouze v testu s *Ophiostoma piceae* se brouci jasně vyhýbali této houbě a zralostní žír neprováděli (Obrázek 7 i), což naznačuje

její antagonistický účinek. Test prokázal, že přítomnost hub *Ophiostoma bicolor*, *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europioides* společně s *Endoconidiophora polonica* vede k lehce vyššímu žíru (Obrázek 7 j - l), ale jako nejvýznamnější se prokázala společná účast hub *Endoconidiophora polonica* a *Ophiostoma piceae*, která odhalila nejvyšší preferenci této směsi pro započetí zralostního žíru (Obrázek 7 m). Zkoušky s každou kombinací hub byly opakovány 8-20krát. Šipky označují kůrovce, kteří začali tunelovat vedle plísňových agarových zátek (Kandasamy et al. 2019).



Obrázek 7 Mističkový test k určení chování lýkožrouta smrkového vůči jednotlivým houbám (Zdroj: Kandasamy et al. 2019)

3.3.2 Látky produkované houbami a jejich atraktivita pro kůrovce

Mnoho vzájemných symbiotických vztahů je provázáno právě emitovanými chemikáliemi jednoho nebo obou partnerů (Kandasamy et al. 2019). Houby vyskytující se ve spojení s lýkožroutem smrkovým emitují těkavé organické sloučeniny, na které reaguje díky sensilám umístěných na tykadlech. Podle studií se tyto pachy hub zdají být částečně kódovány kombinačním mechanismem. Pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byly analyzovány těkavé látky hub, u kterých byly pozorovány silné preference lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), tzn. *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia penicillata*, *Grosmannia europioides*, *Ophiostoma bicolor* a *Ophiostoma piceae*.

Těkavý profil každého druhu houby byl jedinečný, ale všechny kromě *Ophiostoma bicolor* obsahovaly terpeny s velkými rozdíly mezi jednotlivými druhy. Mezi další hlavní sloučeniny emitované všemi druhy hub patří alkoholy C5 s rozvětveným řetězcem, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, což je strukturně podobné složce agregačního feromonu lýkožrouta smrkového 2-methyl-3-buten-2-olu, a aromatický alkohol 2-fenyletanol. Tyto látky emitovala nejméně *Endoconidiophora polonica*, ale emitovala navíc estery acetátu s 2-fenylacetátem. *Grosmannia penicillata*, *Grosmannia europioides* produkovaly ještě bicyklické seskviterpeny a karyofylenoxid, které jsou důležité při chemické komunikaci několika druhů kůrovců. (Kandasamy et al. 2019). Podle Zhao et al. (2015, 2019a) vede jejich studie k hypotéze, že houboví symbionti syntetizují feromonální sloučeniny lýkožroutů jako je 2-methyl-3-buten-2-ol, exo-brevicomín, end-brevicomín a trans-konofthorin, což naznačuje existenci vzájemných chemických komunikačních signálů mezi houbami a lýkožrouty. Dalšími emitovnými látkami hub, na které lýkožrout smrkový reaguje na elektro-antenogramu jsou exo-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane, (exo-1,3-DMDBN) a endo-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane (endo-1,3-DMDBN) (Zhao et. al. 2019b).

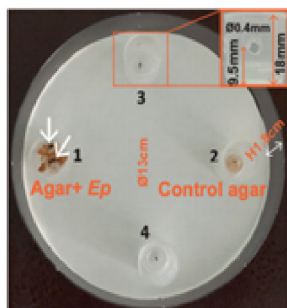
Zmínění houboví symbionti také produkují sloučeniny v podobě směsi alifatických aromatických alkoholů a jejich acetátových esterů, které lákají lýkožrouty ke konzumaci těchto vysoce nutričních hub v období zralostního žíru. Následně sehrávají brouci po vyrojení roli přenašeče a spory hub rozptýlí na nové hostitelské dřeviny ve svých střevech nebo na kutikulách (Kandasamy et al. 2019, 2016). Mezi alifatické alkoholy patří také 1-Hexanol, což je jedna z těkavých látek hub rodu

Grosmannia europhioides. Zároveň tuto těkavou látku produkují i zelené listy - tzv. green leaf volatiles (GLVs), přičemž ve směsi s (Z)-3-hexen-1-ol a (E)-2-hexen-1-ol působí na lýkožrouta smrkového jako repelent (Zhang et. al. 1999).

Další chemická vlastnost hub je tzv. “fungus egect”, což je schopnost snížení hladiny stilbenových glykosidů v okolí houbové inokulace (Brignolas et al. 1998; Viiri et al. 2001), kdy degradují fenolické glykosidy na aglykony a využívají je pro svůj metabolismus (Hammerbacher et al. 2013). Tato schopnost výrazně snižuje obranyschopnost smrku ztepilého, který i přes vysokou hladinu produkovaných stilbenů nakonec podlehne napadení patogenů (Brignolas et al. 1995; Schiebe et al. 2012).

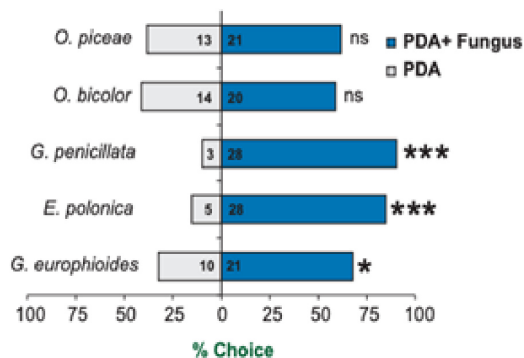
Jelikož lze interakce s výhodnými symbionty udržet právě pomocí chemických podnětů, prováděl Kandasamy (2019) testy chování lýkožrouta smrkového pro objasnění jeho schopnosti rozlišovat jednotlivé houby pomocí atraktivních těkavých látek. Elektrofyzilogické záznamy ze senzily na tykadle brouka pomohly určit, které těkavé látky ze získaného profilu hub byly broukem vnímány a výsledné směsi těkavých látek ze syntetických hub byly testovány na chování lýkožrouta smrkového v laboratoři. Test chování proběhl pomocí Petriho misek (průměr 13 cm), do kterých byly umístěny čtyři pasti v podobě kalíšků s vyvrtanými vstupními otvory tak, že po vstupu dovnitř se již brouk nemohl dostat zpět (Obrázek 8). Na tomto obrázku šipky ukazují pozice kůrovců. Do jedné pasti byl umístěn smrkový agar kolonizovaný čtyřdenní houbovou kulturou (Obrázek 8 - 1), do kontrolní pasti byl umístěn smrkový agar bez houby (Obrázek 8 - 2) a zbývající dvě pasti (Obrázek 8 - 3 a 4) zůstaly prázdné. Celá takto připravená past pro každou houbu byla umístěna do tmy při 25 °C, byly do ní vpuštěny vždy dva brouci a byla pozorována jejich behaviorální aktivita. Již v průběhu testu bylo zřejmé, že brouci ve většině případů směřovali k agaru kolonizovanému houbami. V prázdných pastech bez návnady nebyl zaznamenán žádný brouk. Vyhodnocení tohoto testu znázorňuje graf (Obrázek 9), který značí největší atraktivitu těkavých látek pocházejících ze tří druhů virulentních hub ve srovnání s prázdnou kontrolní pastí, tj. *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides*. Nejsilnější atraktivitu vyznačovala *Endoconidiophora polonica* a *Grosmannia penicillata*. Těkavé sloučeniny emitované z avirulentní *Ophiostoma piceae* a *Ophiostoma bicolor* brouky výrazně nepřitahovaly. Podle výsledků testu lze usuzovat, že lýkožrout smrkový může rozlišovat těkavé organické sloučeniny emitované houbami a využívat je tak i pro svou orientaci v porostech nebo ke zdolávání obranyschopnosti

hostitele. Modrá pole grafu znázorňují počet brouků přilákaných těkavými látkami z hub a bílá pole znázorňují počet brouků chycených na kontrolní agar bez hub. Čísla znamenají počty brouků chycených do jednotlivých pastí. Hvězdičky ukazují významný rozdíl mezi agarem kolonizovaným houbami a kontrolním agarem bez hub (Kandasamy et al. 2019).



Obrázek 8 Mističkový pokus

(Zdroj: Kandasamy et al. 2019)



Obrázek 9 Graf znázorňující výsledky mističkového pokusu

(Zdroj: Kandasamy et al. 2019)

3.3.3 Obranné látky smrku proti houbám

Přežití kolonizačních pokusů lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a následné zanesení symbiotických hub silně závisí na reakci hostitelské dřeviny. Studie, ve kterých byla experimentálně provedena inokulace ophiostomatoidními houbami a zároveň léčba methyljasmonátem (MeJA) odhalily, že obranné mechanismy stromů vyvolávají imunitní reakci v podobě změny anatomických a chemických vlastností živé kůry a dřeva. MeJA je organickou sloučeninou odvozené od rostlinného hormonu kyseliny jasmonové, která indukuje produkci obranných látek smrku ztepilého (Celedon a Bohlmann 2019). Současně spouští indukovanou obranu tvorbou traumatických pryskyřičných kanálků proti dalšímu napadení patogeny (Krokene 2015; Mageroy et al. 2020). Tato indukovaná obrana způsobuje hromadění toxických terpenů v napadených tkáních stromu, které snižují nebo dokonce zabraňují útokům lýkožrouta i růstu ophiostomatoidních hub (Erbilgin et al. 2006; Zeneli et al. 2006; Zhao et al. 2011a; Zhao et al. 2011b). Okysličené monoterpeny nahromaděné v kůře stromu po spuštění indukované obrany jsou signifikantní jako feromonové složky mnoha druhů kůrovců (Francke, Vité 1983; Schlyter et al. 1989).

Podmínky prostředí a genotyp stromů ovlivňuje složení terpenoidů v kůře smrku ztepilého (Schönwitz et al. 1990). Ve smrkovém floemu byla extrakcí monoterpenů uhlovodíků zjištěna variabilita v podílu jednotlivých sloučenin, která je nejspíš způsobená rozdílem ve stáří vzorovaných stromů. Jedná se o terpenoidní sloučeniny α -pinen (23-39 %), β -pinen (25-58 %), β -fenandren (5-19 %), limonen (1,5-4 %) a myrcen (1,6-3,4 %). V nízkomolekulární frakci převládá -3-karvon (0,6-1,1 %) a kamfen (0,2-1,1 %) (Baier et al. 2002; Borg-Karlson et al. 1993; Silvestrini et al. 2004).

Oproti monoterpenům se vyskytují ve smrkové kůře v mnohem menších frakcích sesquiterpeny jako je α -longipinen, β -farnesen a germakren D (Schiebe et al. 2012; Zeneli et al. 2006; Zhao et al. 2011b). Diterpeny (pryskyřičné kyseliny, uhlovodíky a alkoholy), jako je thunbergol, sandarakopimarát a abienol, jsou méně těkavé, ale mají úzkou spojitost s odolností stromů vůči lýkožroutům a jeho asociovaným houbám. (Zeneli et al. 2006; Zhao et al. 2011b). Výše koncentrace terpenů je závislá na stresu stromů způsobeným interakcí s lýkožrouty a houbovými symbionty. Zdravé stromy obsahují za normálních okolností okysličené monoterpeny ve stopovém množství, které se vlivem napadení lýkožroutem a inokulace hub postupně zvyšuje pomocí detoxikace uhlovodíků monoterpenů ve střevech brouků a symbiotickými houbami. (Kandasamy et al. 2016; Leufvén, Birgersson 1987; Petterson, Boland 2003; Schiebe et al. 2019). Schiebe et al. (2012) uvádí, že nárůst okysličeného monoterpenu 1,8-cineolu v kůře je nejsilnějším spouštěčem indukované obrany smrku ztepilého vedoucí k jeho vyšší odolnosti a přežití vůči přirozeným útokům lýkožrouta smrkového.

Jiné studie se zaměřily na úlohu fenolických sloučenin v obraně jehličnanů na interakce lýkožrouta a hub (Hammerbacher et al. 2019, 2014). Fenoly jsou uloženy v PP buňkách (Franceschi et al. 2005) a reakce na biotický útok způsobuje jejich syntetizaci na fenylalanin amoniakovou lyázu (Li et al. 2012). Ta je důležitým enzymem fenylpropanoidní dráhy a katalyzuje syntézu polyfenolických stilbenů a flavonoidů (Metsämuuronen, Sirén 2019). Ve smrkovém floému jsou převážně přítomny stilbenoidy, resveratrol a jeho glykosidy, astringin a isorhapontin, které mají antimykotický účinek (Evensen et al. 2000; Hammerbacher et al. 2011). Antimykotické účinky vykazují také flavan-3-oly a jejich metabolický prekurzor taxifolin (Hammerbacher et al. 2019). Aktivace flavonoidní dráhy, především syntéza proanthokyanidinů, jako jsou flavan-3-ol monomery (+)-katechin a (+)-galokatechin,

jakož i kondenzované trísloviny, patří ke zvýšené odolnosti stromů proti biotickým útokům. (Brignolas et al. 1998; Hammerbacher et al. 2014, 2018; Lieutier et al. 2003).

Podle dalších výzkumů je již zmíněný limonen a myrken spolu s α -3-karenem obzvláště toxický pro lýkožrouty a omezují jejich vývoj (Erbilgin et al. 2017; Everaerts et al. 1988; Wallin, Rafa 2002). Důležitou funkci projevili limonen v testech, kde dokonce inhiboval růst *Endoconidiophora polonica*, jedné z nejvýznamnějších asociovaných hub lýkožrouta smrkového (Novak et al. 2013).

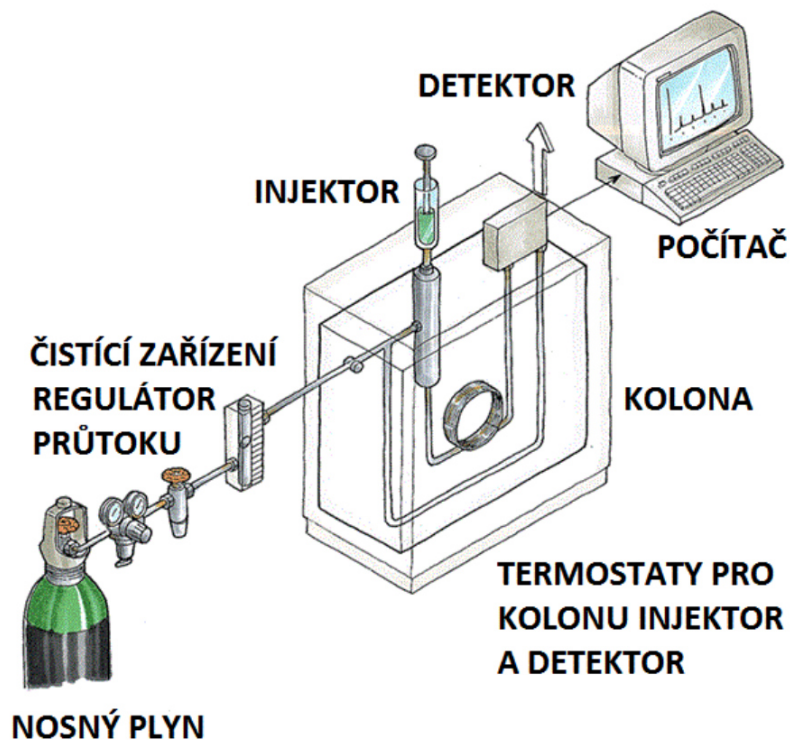
3.4 Způsoby určování a měření látek

3.4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas Chromatography - GC) je fyzikálně chemická metoda využívaná pro analýzu těkavých látek (Obrázek 10). Nejčastěji je v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS), která doplňuje možnost selektivní separace složitých směsí analytů a následně provede jejich identifikaci ze zaznamenaného hmotnostního spektra (viz kapitola 3.4.2 Hmotnostní spektrometrie). Využití GC je všestranné, používá se například ve farmaceutickém či chemickém průmyslu, ale i ke kontrole vody, ovzduší nebo půdy na přítomnost pesticidů (Smolková et. al. 1976). Výhody této techniky je malé potřebné množství vzorku určené k analýze a jeho jednoduché a rychlé zpracování vedoucí k určení těkavých látek.

Základním principem chromatografie je rozdělování směsí mezi stacionární a mobilní fázi. Mobilní fázi zajišťuje nosný plyn v tlakové láhvi, nejčastěji vodík, argon, dusík nebo helium, který je pomocí čistícího zařízení zbaven nežádoucích plynů, vlhkosti a nečistot. Po vstříknutí směsi do injektoru, ve kterém dojde k jejímu zplynění, unáší nosný plyn vzorek kolonou optimálním průtokem pro co nejlepší rozdělení látek, což zajišťuje elektronický regulátor průtoku. Kolona je součástí GC, ve které probíhá separace složek a zajišťuje stacionární fázi. Čím více je určitá složka směsi ve stacionární fázi zachycována, tím více je zpomalován její průchod kolonou. Koloně dodává programovatelný termostat dostatečně vysokou teplotu pro udržení látky v plynném stavu. Jednotlivé složky směsi jsou poté unášeny do detektoru, kde je vyhodnocen jejich časový průběh a intenzita signálu, která je počítačem zaznamenána v podobě chromatogramu (Klouda 2003; Opekar 2005; Štulík 2004). Chromatogram je

tvořen osami vyjadřující závislost signálu (y) na čase nebo objemu (x). Chromatografický pík má tvar Gaussovy distribuce a je popsán retenčním časem, výškou a šířkou píku (Krofta 2001).



Obrázek 10 Schéma plynového chromatografu (GC)

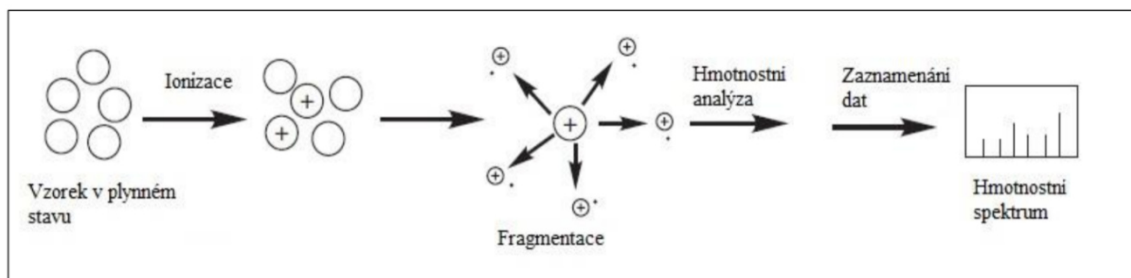
(Zdroj: www.chemicke-listy.cz)

3.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Jako detektor GC nejčastěji slouží již zmíněná hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS). Je jednou z chemicko-analytických metod a využívá se ke stanovení hmotnosti částic nebo určení složení směsi pomocí jejich převedení na kladné a záporné ionty. Následně rozlišuje jejich poměr hmotnosti a náboje (m/z). Výsledkem MS je stopová analýza organických látek a jejich struktura. Důležitými částmi hmotnostního spektrometru jsou zdroj iontů, hmotnostní analyzátor, vakuový systém a detektor (Obrázek 11).

Iontový zdroj slouží k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu následkem fragmentární reakce. Vzniká tím převedení analyzované látky do ionizovaného stavu a možnost rozdělit směs iontů podle poměrů hmotnosti ku náboji (m/z) pomocí

hmotnostního analyzátoru. Principem spektrometru je měření doby průletu jednotlivých iontů od zdroje k detektoru. Pomalejší rychlost a delší doba průletu mají těžší ionty. Ionty jsou po průchodu hmotnostním analyzátozem směřovány na detektor, který převádí analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů do počítače, kde je pomocí programu zpracován do podoby hmotnostních spekter (Klouda 2003; Opekar 2005; Štulík 2004).



Obrázek 11 Schéma hmotnostní spektrometrie

(Zdroj: Dass, 2007)

4 Materiál a metodika

4.1 Metodika práce v terénu

Pro tuto diplomovou práci byl zvolen kvantitativní výzkum, jehož matematické údaje lze statisticky vyhodnotit. Tento výzkum je typický vysokou reliabilitou (= spolehlivostí), ale nízkou validitou (= platností). Výsledky jsou vždy objektivní a přesné. V našem případě byl kvantitativní výzkum proveden prostřednictvím polního pokusu, při kterém probíhaly odchyty jedinců lýkožrouta smrkového do lapačů na návnady vytvořené z mycelií jeho asociovaných hub pěstovaných na dvou druzích živného média. Získávání dat probíhalo sběrem odchyť z rozmístěných lapačů do dvou sekcí, do kterých byly návnady umísťované podle zvoleného systému replikací. Výzkum probíhal jako součást projektu Excelentního týmu pro mitigaci, Extemit – K, založeného na České zemědělské univerzitě, v období 18. 5. 2020 - 1. 6. 2020. Výstupem je porovnání výsledků a statistické vyhodnocení výzkumů z diplomové práce Matěje Trepáče (2019) na téma “Studium polní atraktivity těkavých látek produkovaných houbami asociovanými s lýkožroutem smrkovým” a polním pokusem provedeným v roce 2020.

4.1.1 Lokalita

Pro zopakování terénního pokusu, který proběhl v roce 2019 (Trepáč 2019), byla vybrána stejná lokalita, na které se aplikovala odchyťová zařízení. Nachází se na pozemcích školního lesního podniku Kostelec nad Černými lesy v blízkosti obce Klíče spadající pod obec s pověřeným obecním úřadem Konojedy v okrese Praha-východ ve Středočeském kraji. Jedná se o dvě sousední paseky (49,93343N; 14,87704E a 49,93252N; 14,87864E, 624E9), přibližně 150 m dlouhé a 200 m široké v mírně svažitém terénu po těžbě kůrovcového dříví z roku 2017 – 2019 (Obrázek 12).



Obrázek 12 Paseka pro terénní pokus ve vybrané lokalitě

(Zdroj: www.mapy.cz, upraveno)

Na severo-východní straně paseky se rozprostírá porostní stěna, která je tvořena převážně smrkem ztepilým (*Picea abies*) a ojediněle modřínem opadavým (*Larix decidua*) a jedlí bělokorou (*Abies alba*). Terénní pokus probíhal za proměnlivých meteorologických podmínek od 18. 5. 2020 do 1. 6. 2020, kdy bylo provedeno celkem devět replikací.

4.1.2 Metodika odchytu a instalace

Na zmíněné pasece bylo rozmístěno celkem osmnáct křížových feromonových lapačů typu Ecotrap (Obrázek 13a) do dvou sekcí po devíti lapačích (Obrázek 14b). Jednotlivá stanoviště lapačů byla umístěna v řadě podél porostní stěny ve vzdálenosti cca 30 m od jejího okraje a v rozestupu 15 m. Sekce byly sice umístěné na stejné pasece, ale byly odděleny od sebe shlukem několika vzrostlých modřínů s podrostem. Lapače byly instalovány vždy na dva dřevěné, do země zatlučené hranoly do výšky 1,5 m a připevněny vázacím drátem.



a

b

Obrázek 13 a) lapač typu Ecotrap

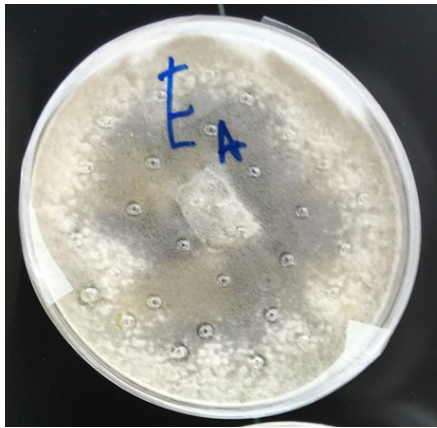
(Zdroj: vlastní)

b) červeně - rozmístění dvou sekcí lapačů

(Zdroj: www.mapy.cz, upraveno)

4.1.3 Systém aplikace návnad

Do jednotlivých lapačů byly aplikovány návnady připravené v laboratoři z hub *Grosmannia europhioides* (GE), *Grosmannia penicillata* (GP) a *Endoconidiophora polonica* (EP) (viz kapitola 4.2.1 Tvorba návnad). Pro jednu sekci byly vytvořeny tři typy návnad. První typ byl z předem napěstovaných hub na agaru v Petriho miskách (Obrázek 14a) spolu s agregačním feromonem lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), druhý typ byl samotný agar v Petriho miskách s agregačním feromonem (A+F), a třetí typ byl samotný feromon lýkožrouta smrkového (F), který tvoří 2-methyl-3-buten-2ol a cis-verbenol v Kartellových vialkách připevněných na drátku (Obrázek 14b). Pro druhou sekci tvořily návnady také tři typy, a to předem napěstované houby na směsi agaru s floémem v Petriho miskách s agregačním feromonem, samotná směs agaru s floémem v Petriho miskách a opět již zmíněný samotný agregační feromon lýkožrouta smrkového.



a



b

Obrázek 14 a) Návnada s houbou *Grosmannia europioides* vypěstovanou na agaru
b) Kartellovy vialky připevněné na drátku s feromonem lýkožrouta
smrkového (Zdroj: vlastní)

U obou sekcí byl vždy ponechán jeden lapač prázdný (Blanc), který měl funkci kontrolního prvku stejně jako lapač se samotným agarem (či směsí agaru s floémem v případě druhé sekce) doplněný agregačním feromonem a lapač se samotným feromonem. Každá houba byla umístována do lapačů s různě vysokou koncentrací. Vysokou koncentraci tvořily tři Petriho misky a nízkou koncentraci jedna Petriho miska s danou houbou. Výčet jednotlivých návnad znázorňuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Výčet jednotlivých návnad pro sekci 1; *směs agaru s floémem u sekce 2.

| Lapač | Návnada | Označení | Poznámka |
|-------|-------------------------------------|----------|--------------------|
| 1 | Grosmannia penicillata + feromon | A | Nízká koncentrace |
| 2 | Grosmannia europhioides + feromon | B | Nízká koncentrace |
| 3 | Endoconidiophora polonica + feromon | C | Nízká koncentrace |
| 4 | Grosmannia penicillata + feromon | D | Vysoká koncentrace |
| 5 | Grosmannia europhioides + feromon | E | Vysoká koncentrace |
| 6 | Endoconidiophora polonica + feromon | F | Vysoká koncentrace |
| 7 | Agar* | G | Kontrolní prvek |
| 8 | Feromon | H | Kontrolní prvek |
| 9 | Bez návnady, prázdný lapač | I | Kontrolní prvek |

(Zdroj: vlastní)

Pro terénní pokus byl sestaven systém devíti replikací pro každou sekci (Tabulka 2). Každý typ návnady byl označen svými písmeny A - I a každý lapač číslicemi 1 - 9. V první sekci bylo ke všem návnadám připsáno písmeno "A" značící médium agar a u druhé sekce písmeno "F" značící médium floém. Do každého lapače byl umístěn určitý typ návnady vždy jen jednou a při další replikaci byl o jednu pozici posunutý. Tím bylo zajištěno postupné působení každé návnady na všech devíti stanovištích. Vzhledem k trvanlivosti hub byly návnady obměňovány nejdéle po 4 dnech.

Tabulka 2 Systém devíti replikací u obou sekcí

| Číslo replikace | Datum replikace | Návnada v lapačích | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | 18. 5. | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| 2 | 18. 5. | I | A | B | C | D | E | F | G | H |
| 3 | 18. 5. | H | I | A | B | C | D | E | F | G |
| 4 | 22. 5. | G | H | I | A | B | C | D | E | F |
| 5 | 22. 5. | F | G | H | I | A | B | C | D | E |
| 6 | 25. 5. | E | F | G | H | I | A | B | C | D |
| 7 | 27. 5. | D | E | F | G | H | I | A | B | C |
| 8 | 29. 5. | C | D | E | F | G | H | I | A | B |
| 9 | 1. 6. | B | C | D | E | F | G | H | I | A |

(Zdroj: vlastní)

Před každou novou replikací byly odchycení brouci z jednotlivých lapačů umístěni do plastových zkumavek s obsahem 95% etanolu. Zkumavky byly popsány datem sběru, typem návnady, číslem stanoviště, pořadím replikace a uskladněni k pozdějšímu roztrídění a spočítání v laboratoři.

4.2 Práce v laboratoři

4.2.1 Pěstování hub - tvorba návnad

Práce v laboratoři spočívala především v přípravě živného média pro kultivaci hub a samotné kultivování hub. Houby *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica* byly pravidelně dvakrát v týdnu inokulovány na čerstvě připravený agar v Petriho miskách, který sloužil jako výživové médium, a následně byly inkubovány v inkubátoru pro podporu růstu mycelia hub na agaru. Pro každý jeden výjezd do terénu, kdy byly návnady s houbami zavěšeny do lapačů, a byla provedena jejich rotace mezi lapači, bylo zapotřebí připravit 13 misek, z nichž jedna neobsahovala mycelium houby. Od každého druhu houby byly připraveny 4 misky, z

toho 3 misky pro vysokou dávku a 1 miska pro nízkou dávku. Mycelia hub *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica* byla poskytnuta doktorem Dineshkumar Kandasamy (Jena Max Planck institute).

Návnady z hub byly vyrobeny tak, že živá mycelia houby byla naočkována na dva typy živného média. Jedním médiem byl agar a druhým směs obsahující agar a rozmělněný floém ze smrku ztepilého.

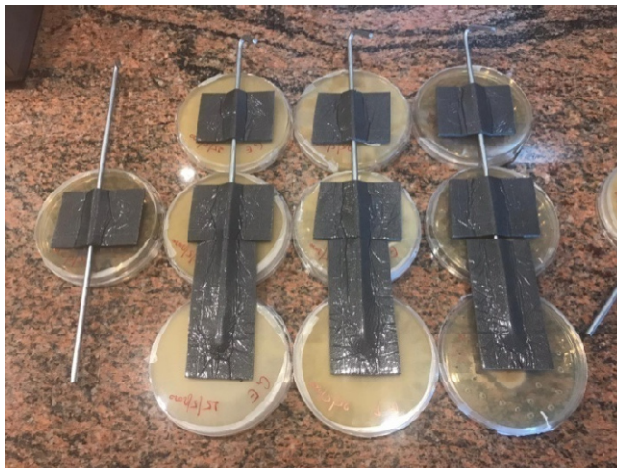
Médium obsahující pouze agar bylo připravováno za sterilních podmínek dle postupu Kandasamy et al. (2019) s použitím 4% potato dextrose agar (PDA) (Sigma Aldrich). Hotový agar byl rozlity do Petriho misek o průměru 9 cm v 2 cm vrstvě (cca 30 ml agaru).

Médium obsahující agar a floém ze smrku bylo připraveno obdobně, akorát do PDA byl přidán rozmělněný floém smrku ztepilého. Poměr floému a agaru byl 7 % : 4 % opět dle postupu Kandasamy et al. (2019). Hotový agar byl rozlity do Petriho misek o průměru 9 cm v 2 cm vrstvě (cca 30 ml agaru). Floém pro přípravu média byl získán v květnu roku 2020 z cca 80 let starého, zdravého stromu smrku ztepilého ze Školního arboreta v Kostelci nad Černými lesy. Floém byl odebírán těsně před přípravou agaru jako živného média, a v době, kdy se s ním nepracovalo, byl uložen v tekutém dusíku, aby nedošlo k jeho oxidaci.

Na takto připravená média byla za pomoci sterilního skalpelu inokulována mycelia jednotlivých hub, misky byly zalepeny parafilmem (netoxickou folií), popsány a poté byly s naočkováným médiem přeneseny do inkubátoru, kde byly pěstovány po dobu čtyř dnů při teplotě (25 - 28°C). Po čtyřech dnech růstu mycelia bylo do víčka plastové misky vytvořeno za pomoci sterilizovaného, rozžhaveného drátu 30 děr o průměru 2 mm, a tyto otvory byly přelepeny těsnící izolepou. Takto připravené houbové návnady byly uchovávány v chladicím boxu, aby mohly být převezeny do terénu.

Pro samotný experiment byly tyto houbové odparníky použity ve vysoké a nízké dávce. Vysoká dávka se skládala ze tří perforovaných Petriho misek obsahující mycelia houby. Nízká dávka se skládala z jedné perforované Petriho misky obsahující mycelium houby. Obě dávky byly použity v kombinaci s agregačním feromonem lýkožrouta smrkového. Též byla použita jedna miska obsahující pouze agar resp. agar + floém bez mycelia houby.

Misky byly zadní stranou připevněny na pevný drát pomocí lepenky tak, aby byla přední proděravěná strana volná a mohla emitovat houbové látky (Obrázek 15). Takto připravené návnady byly zavěšeny na lapače podle daného systému replikací.



Obrázek 15 Připevněné návnady z hub

(Zdroj: vlastní)

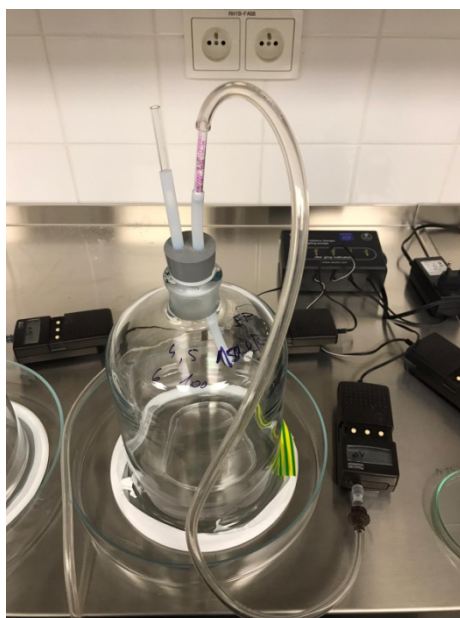
4.2.2 Získávání a vyhodnocování těkavých látek z hub pomocí SPME a GC-MS

Jednotlivé druhy hub pěstované na agaru či na agaru s floémem v perforované Petriho misce byly umístěny do sběrného skleněného zvonu o objemu 5 litrů (Obrázek 16). Do sběrného zvonu byl čerpán vzduch, který byl nosným médiem pro emitované těkavé látky z hub na adsorbent Tenax naplněný ve skleněné jímací kolonce, který má ve vnitřním prostoru kovovou jehlu s křemenným vláknem a modifikovaným povrchem. Průtok vzduchu ze zvonu a jímání těkavých látek na kolonku s adsorbentem zajišťovala elektrická pumpička o průtoku vzduchu 100 ml/h. Z adsorbentu byly poté látky extrahovány pomocí rozpouštědla hexan. Proplach byl proveden 5x po 200 mikrolitrech hexanu. Na vstupním otvoru do skleněného zvonu byla instalována filtrační kolonka, která filtrovala vstupující vzduch od látek z pozadí.

Získané vzorky byly analyzovány na plynovém chromatografu Agilent 7890B, vybavený kapilárními kolonami. Rxi-5Sil: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Nástřik při 20°C, vyhřáto rychlostí 8°C/s do teploty 275°C. Teplotní program pro 1D pec byl naprogramován na 40°C (2 min) s postupným zvyšováním o 5°C/min do 120°C, 10°C/min do 200°C. a 20°C/min do 280°C. Funkci nosného plynu zajistilo helium s konstantním průtokem 1 ml/min. Teplota transferline byla 280°C. Hmotnostní

spektrometr byl nastaven na elektronovou ionizaci při 70 ev. Hmotnostní rozsah činil 35 – 500 m/z. Doba analýzy byla stanovena na 32 minut s akvizicí rychlostí 10 spekter/s. Teplota iontového zdroje byla 250°C.

Chromatogramy byly zpracovány softwarem Chromatof od firmy Leco, který pracuje s dekonvolucí (rozkrytím píků, které se neseaprovaly). Látky byly identifikovány díky shodě hmotnostních spekter s knihovnou NIST 11, a po srovnání retenčních časů se standardy. Kvantita šesti hlavních látek 3-methyl-1-butanol; 2-methyl-1-butanol; 3-methyl-1-butylacetat; 2-methyl-1-butylacetat; fenyletanol a octová kyselina, 2-fenylethylacetát byla určena po konstrukci kalibračních křivek pro každou látku v rozmezí koncentrací očekávaných v houbové emisi. Veškeré analytické výstupy v podobě grafů a obrázků byly zpracované ve spolupráci s Ing. Hradeckým, Ph.D.



Obrázek 16 Získávání emitovaných látek z hub

(Zdroj: vlastní)

4.2.3 Kvantifikace a determinace odchyceného hmyzu

Obsah všech jednotlivých popsaných zkumavek z odchyceným hmyzem byl potřeba pro určení výsledků pokusu roztržít a spočítat. Spolu s cílovým broukem lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) se nachytaly i jiné druhy hmyzu, které bylo zapotřebí vyseparovat. Z každé zkumavky byl vyjmutý obsah rozprostřen na Petriho miskách a pomocí pinzety roztržiděn a spočítán (Obrázek 17). Necílový hmyz byl uložen do samostatných plastových ampulí s 95% etanolem a připevněn na zkumavku s

vytříděným počtem lýkožroutů smrkových z odpovídajícího stanoviště a replikace. Nejčastějším druhem necílového hmyzu byl pestrokrovečník mravenčí (*Thanasimus formicarius*), lýkožrout menší (*Ips amitinus*) a lýkožrout severský (*Ips duplikatus*) a různé druhy much, pavouků a brouků.

Výsledné součty cílového i necílového hmyzu byly zaznamenány do tabulky, které byly vyhodnoceny statistickým způsobem.



Obrázek 17 Počítání obsahu zkumavek na Petriho miskách

(Zdroj: vlastní)

4.3 Metodika statistické analýzy

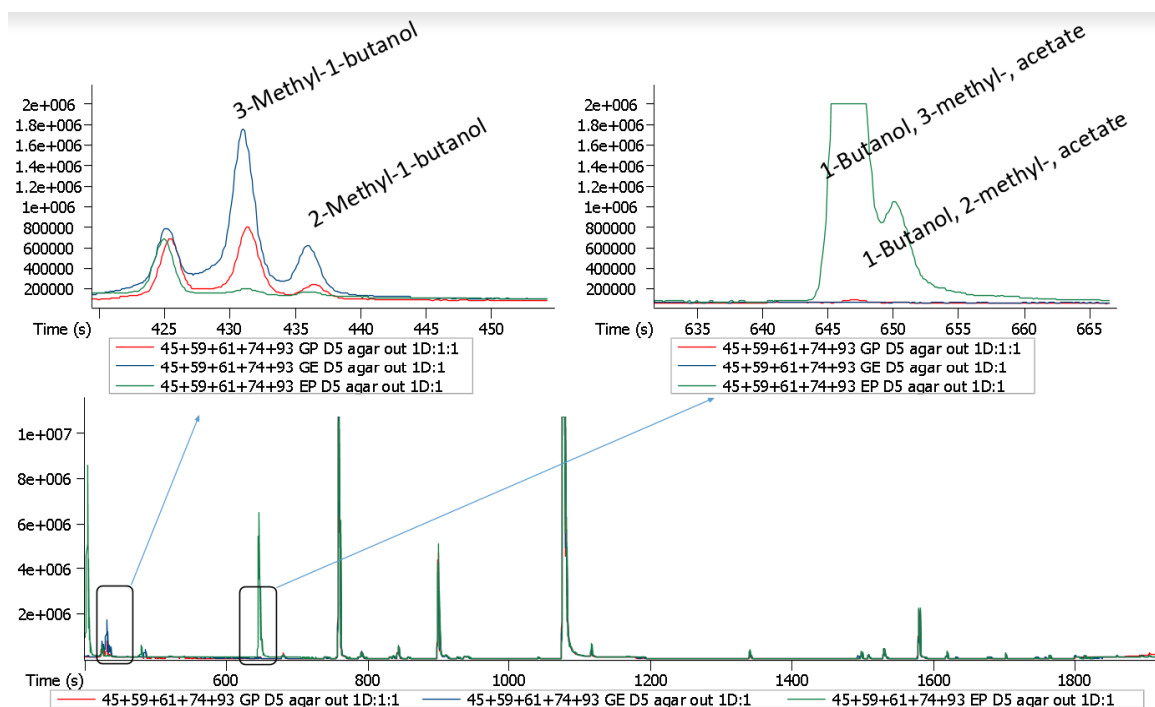
K vyhodnocení vlivu jednotlivých látek na odchyt lýkožrouta smrkového byl vytvořen lineární regresní model. Jako závisle proměnná byl použit relativní počet odchycených dospělců zaznamenaný v dané periodě na konkrétní variantu. Nezávislé proměnné byly rok odchyty, varianta látky a jejich interakce. Kvalita a vhodnost modelu byla posuzována pomocí diagnostických grafů reziduí proti predikovaným hodnotám a jednotlivým proměnným. Statistická významnost faktorů byla poté posuzována analýzou rozptylu a k porovnání významnosti jednotlivých úrovní faktoru byla použita „varianta“ kontrastů (Crawley 2013), kde jako kontrolní (srovnávací) byla

nastavena prázdna varianta s médiem použitým u všetch ďalších variant. Nulová hypotéza o nevýznamnosti faktoru bola zamietaná na obvyklej hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Pro statistické analýzy bol použit software R verze 4.0.2 (R CORE TEAM 2020). Veškeré statistické výstupní grafy a tabulky byly zpracované ve spolupráci s Ing. Modlingerem, Ph.D.

5 Výsledky

5.1 Stanovení těkavých látek emitovaných asociovanými houbami

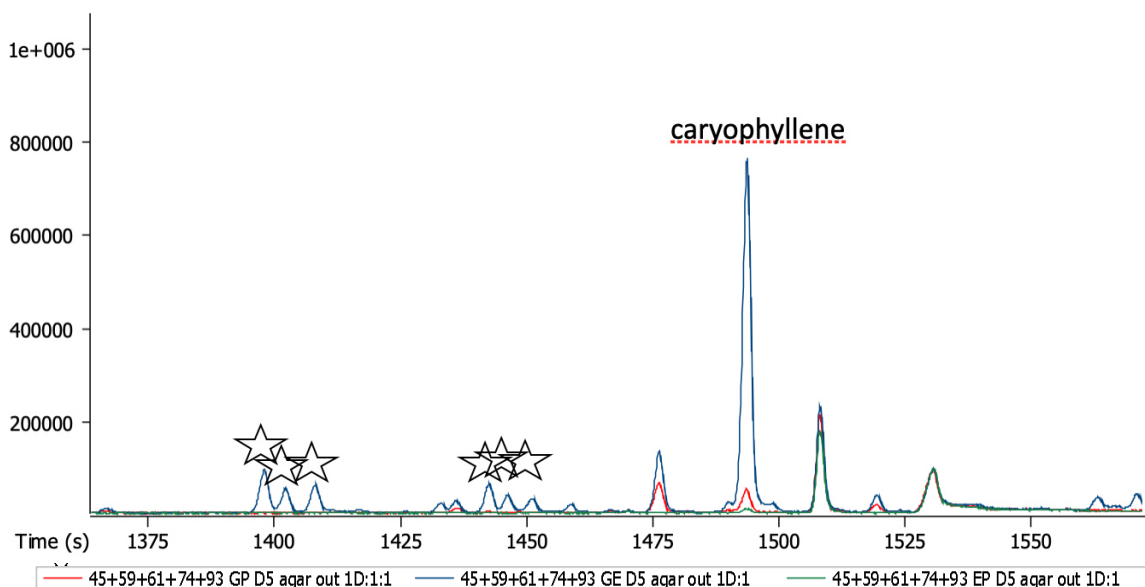
Pomocí metody GC/MS proběhla analýza těkavých látek emitovaných jednotlivými druhy studovaných hub. Odparníky s mycelií hub na agaru emitovaly směs látek, z nichž nejvýznamnější cílové látky jsou v chromatogramech na Obrázku 18.



Obrázek 18 Ilustrativní chromatogramy se záznamy vzorků všech tří druhů hub pátý den pěstování. Vizualizovány jsou selektivní hmoty pro izomery methyl butanolu, jeho acetáty a terpeny.

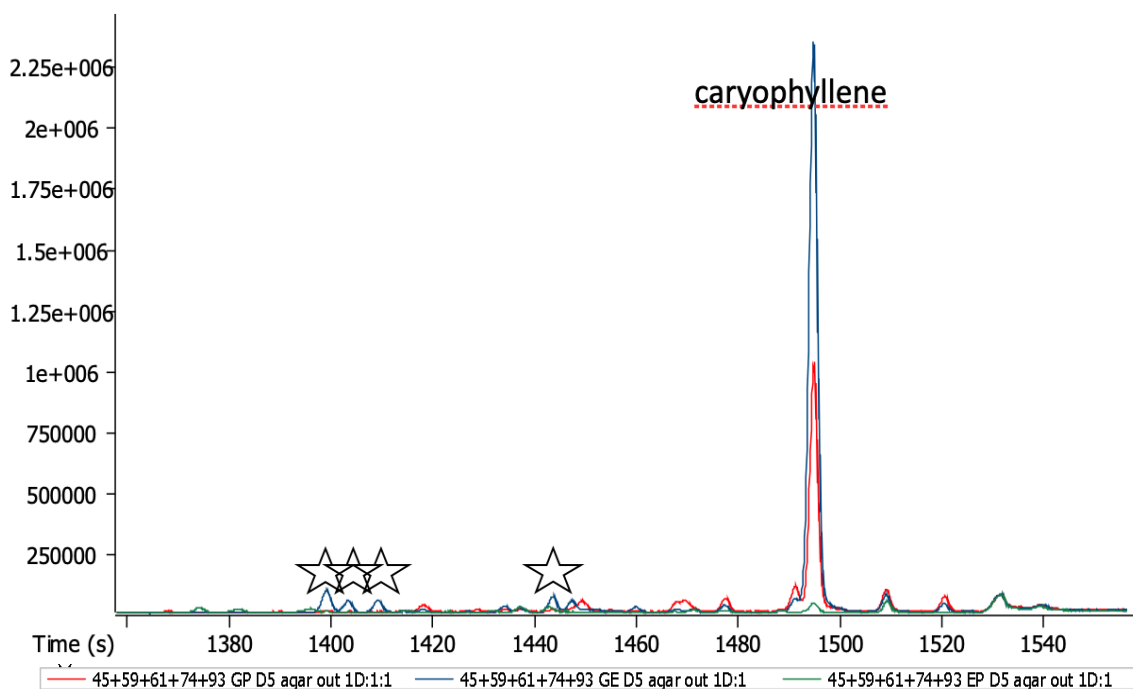
Na chromatogramu jsou u všech testovaných druhů na agaru dominantní píky, které označují identifikaci emitovaných látek. V píku v retenčním čase 450 s byly identifikovány 3-methyl-1-butanol a 2-methyl-1-butanol s velkou plochou u druhů hub *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides*. V dalším významném píku s retenčním časem 650 s byly identifikovány 3-methyl-1-butylacetát a 2-methyl-1-butylacetát z výraznou plochou u houby *Endoconidiophora polonika*. Vedle cílových analytů, byla dále detekována řada terpenických sloučenin. Nízkovroucí terpeny byly přítomny v extraktu z výstupního filtru a detekovány v obdobném množství i na

vstupním filtru. Tento fakt neumožňuje určit, zda se jedná o produkty metabolismu hub nebo kontaminaci z laboratorního prostředí. Na druhou stranu výševroucí sloučeniny jako například karyofylen se v extraktu vstupního filtru nevyskytovaly, a v případě hub se vyskytovaly nejvíce u houby *Grosmannia europhioides* (Obrázek 19).



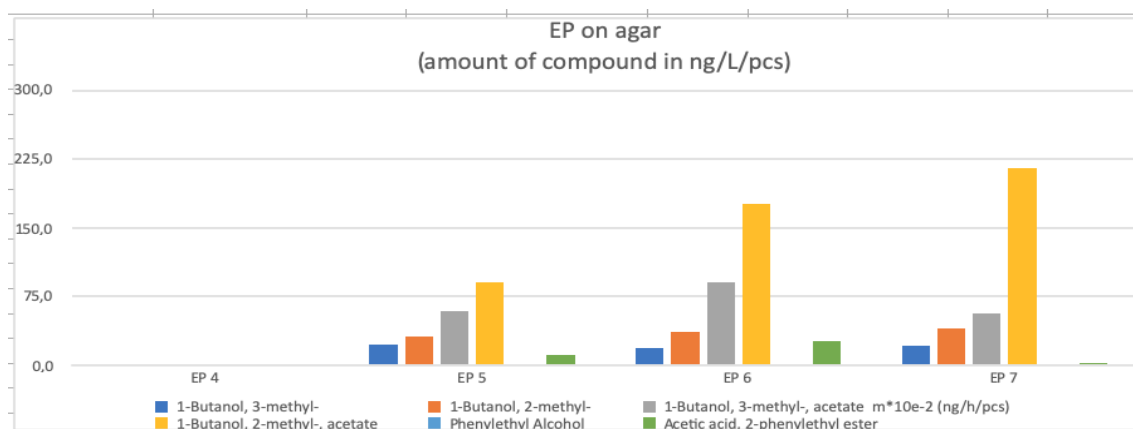
Obrázek 19 Výřez retenčního času chromatogramu z hub pěstovaných na agaru - caryophyllen emitovaný houbou GE. Sekviterpeny označené hvězdičkou nebyly detailněji identifikovány.

V případě agaru s floémem byly látky identifikovány stejným způsobem a porovnány taktéž přeložením chromatogramů všech třech hub pátý den od zahájení jejich pěstování (Obrázek 20). Odezvy cílových analytů i terpenických sloučenin, vykazují obdobný profil jako v případě hub pěstovaných na agaru včetně seskviterpenů v houbě *Grosmannia europhioides* a ve větší koncentraci i u houby *Grosmannia penicillata*.

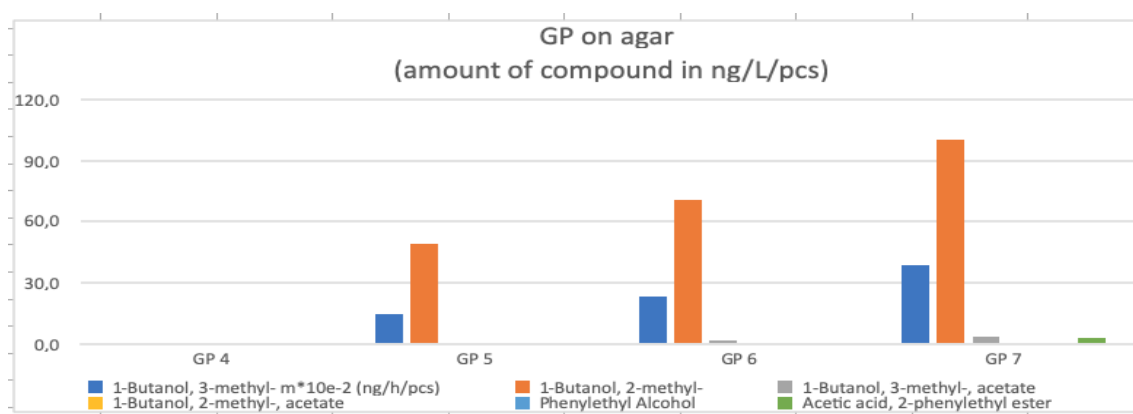


Obrázek 20 Výřez retenčního času chromatogramu z hub pěstovaných na agaru s floémem - caryophyllen u hub GE, GP a sekviterpeny označené hvězdičkou nebyly detailněji identifikovány.

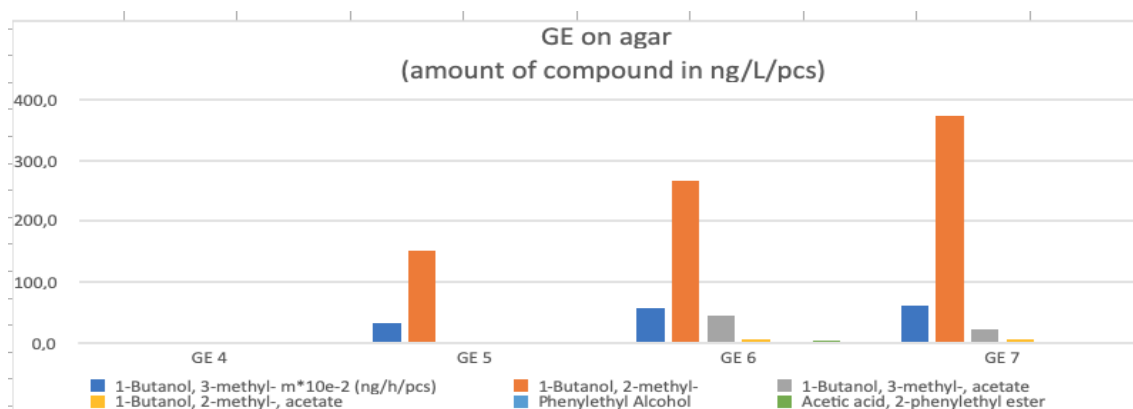
Ve všech vzorcích jsme určili přítomnost 3-methyl-1-butanol; 2-methyl-1-butanol; 3-methyl-1-butylacetat; 2-methyl-1-butylacetat; fenyletanol a octová kyselina, 2-fenylethylacetát. Hodnoty vykázaných látek se měnily vzhledem k druhům hub, jejich stáří v době testování a živnému médiu, na kterém byly pěstovány, což je znázorněné v následujících grafech 1 - 3 pro agar a 4 - 6 pro floém. Detailní množství identifikovaných látek obsahuje tabulka v Příloze 1.



Graf 1 Hodnoty emitovaných látek houbou *Endoconidiophora polonica* ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru.

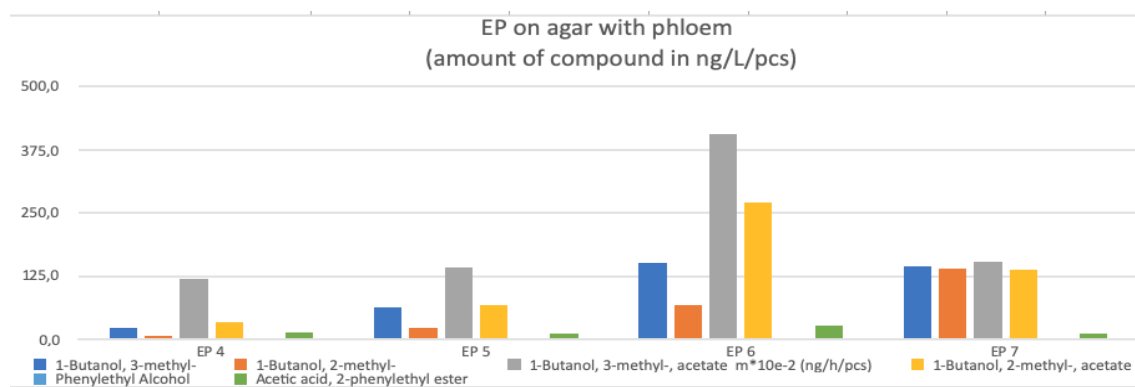


Graf 2 Hodnoty emitovaných látek houbou *Grosmannia penicillata* ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru.

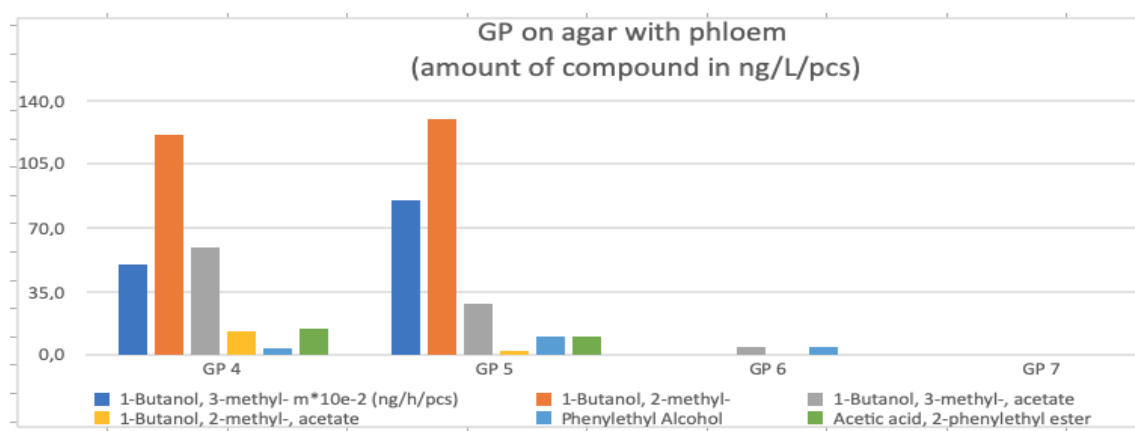


Graf 3 Hodnoty emitovaných látek houbou *Grosmannia europioides* ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru.

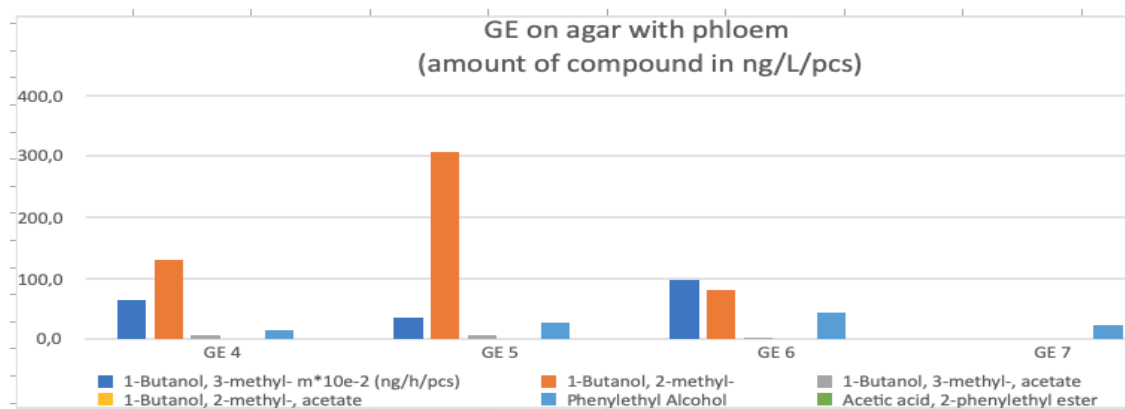
U houby *Endoconidiophora polonica* pěstované pouze na agaru byly nejvýznamnějšími látkami 2-methyl-1-butylacetat méně významný byl 3-methyl-1-butylacetat (Graf 1). Houba *Grosmannia penicillata* (Graf 2) a *Grosmannia europhioides* (Graf 3) pěstované na agaru emitovaly nejvíce 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol. Ostatní látky nevykazovaly příliš významné množství.



Graf 4 Hodnota emitovaných látek houbou *Endoconidiophora polonica* ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru s floémem.



Graf 5 Hodnoty emitovaných látek houbou *Grosmannia penicillata* ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru s floémem.



Graf 6 Množství emitovaných látek houbou *Grosmannia europhiodes* ve stáří 4 - 7 dnů pěstované na agaru s floémem.

Houby pěstované na agaru s floémem vykazovaly produkci látek již v mladších stádiích, přičemž u houby *Endoconidiophora polonica* byl nejvýznamnější 3-methyl-1-butanol, v menším množství pak 2-methyl-1-butylacetat a 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol. (Graf 4). U houby *Grosmannia penicillata* (Graf 5) a *Grosmannia europhiodes* (Graf 6) pěstované na agaru s floémem bylo největší množství látek 2-methyl-1-butylacetat a 3-methyl-1-butanol. Ostatní identifikované látky byly ve většině případů produkovány ve vyšším množství oproti agaru.

5.2 Celkové odchvy brouků na jednotlivé návnady

Během terénního pokusu bylo na vybrané lokalitě odchyceno v instalovaných lapačích celkem 14 890 jedinců lýkožrouta smrkového. V první sekci bylo odchyceno 4889 jedinců na houby pěstované na agaru a v druhé sekci 10 001 jedinců na houby pěstované na agaru s floémem. Do kontrolního prázdného lapače se během celého pokusu chytlo 7 jedinců v první a 13 jedinců v druhé sekci. Celkové odchvy na jednotlivé návnady z mycelií hub znázorňují Tabulky 3 a 4.

Tabulka 3 Jednotlivé odchyty na návnady z mycelií hub pěstovaných na agaru

| Číslo replikace | Celkové počty odchycených brouků na houby pěstované na agaru | | | | | | | | | Suma |
|--------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|-------------|-------------|
| | GpL+fer | GeL+fer | EpL+fer | GpH+fer | EpH+fer | GeH+fer | AG+fer | feromon | prázd. past | |
| 1 | 45 | 57 | 127 | 74 | 81 | 91 | 131 | 93 | 2 | 702 |
| 2 | 61 | 48 | 103 | 68 | 57 | 78 | 119 | 87 | 0 | 623 |
| 3 | 55 | 50 | 76 | 62 | 50 | 86 | 110 | 102 | 0 | 594 |
| 4 | 78 | 87 | 98 | 101 | 90 | 102 | 73 | 78 | 0 | 711 |
| 5 | 58 | 68 | 107 | 96 | 89 | 88 | 55 | 78 | 3 | 647 |
| 6 | 28 | 29 | 55 | 51 | 53 | 50 | 28 | 31 | 0 | 331 |
| 7 | 24 | 47 | 45 | 36 | 35 | 66 | 24 | 38 | 2 | 324 |
| 8 | 43 | 44 | 80 | 67 | 89 | 80 | 34 | 44 | 0 | 489 |
| 9 | 60 | 39 | 57 | 84 | 103 | 89 | 30 | 42 | 0 | 513 |
| Suma | 452 | 469 | 748 | 639 | 647 | 730 | 604 | 600 | 7 | 4889 |

(Zdroj: vlastní)

Tabulka 4 Jednotlivé odchyty na návnady z mycelií hub pěstovaných na agaru s floémem

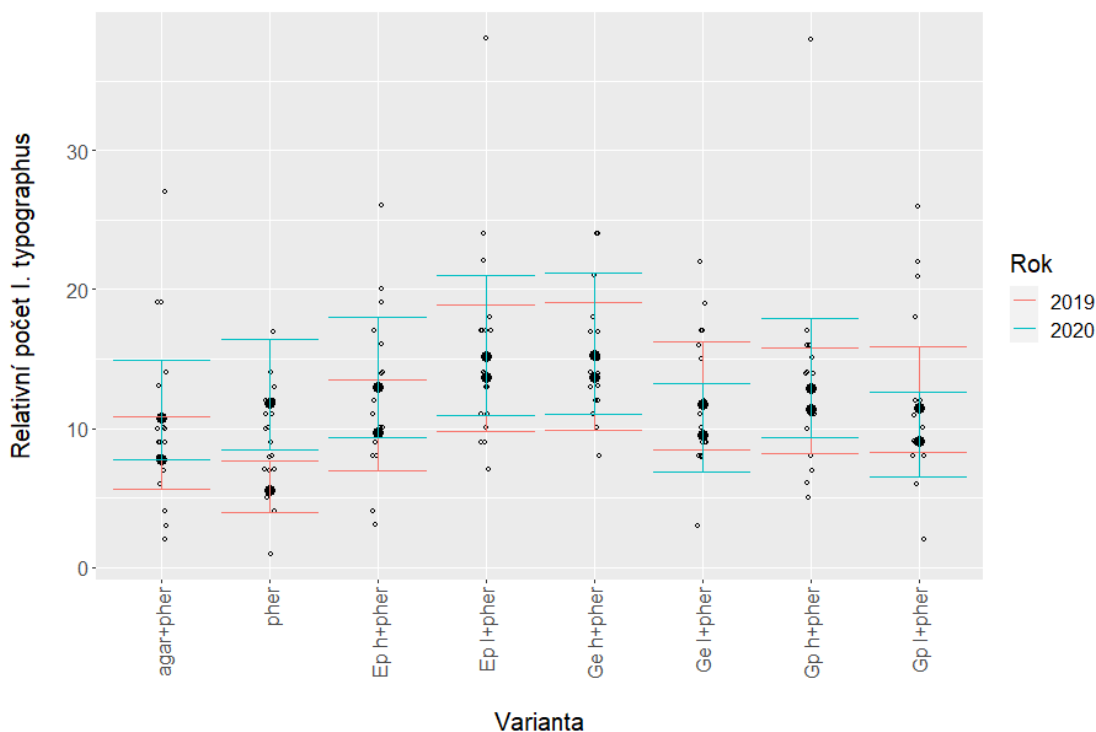
| Číslo replikace | Celkové počty odchycených brouků na houby pěstované na agaru s floémem | | | | | | | | | Suma |
|--------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|-------------|--------------|
| | GpL+fer | GeL+fer | EpL+fer | GpH+fer | EpH+fer | GeH+fer | AGPH +fer | feromon | prázd. past | |
| 1 | 62 | 68 | 106 | 107 | 269 | 172 | 299 | 177 | 7 | 1268 |
| 2 | 112 | 106 | 108 | 112 | 328 | 115 | 253 | 153 | 2 | 1291 |
| 3 | 80 | 71 | 120 | 115 | 274 | 132 | 242 | 143 | 0 | 1180 |
| 4 | 166 | 295 | 278 | 123 | 174 | 107 | 185 | 103 | 4 | 1439 |
| 5 | 199 | 207 | 280 | 191 | 194 | 88 | 168 | 93 | 0 | 1425 |
| 6 | 62 | 126 | 89 | 132 | 72 | 37 | 53 | 61 | 0 | 638 |
| 7 | 40 | 91 | 71 | 87 | 89 | 42 | 55 | 49 | 0 | 531 |
| 8 | 137 | 196 | 88 | 183 | 143 | 83 | 144 | 85 | 0 | 1067 |
| 9 | 163 | 218 | 168 | 152 | 167 | 66 | 187 | 77 | 0 | 1207 |
| Suma | 1021 | 1378 | 1308 | 1212 | 1710 | 842 | 1586 | 944 | 13 | 10001 |

(Zdroj: vlastní)

5.3 Statistické porovnání odchytů na jednotlivé návnady v roce 2019 a 2020

Celkový počet dospělců *Ips typographus* odchycených v roce 2019 a 2020 byl poměrně rozdílný 14 071 resp. 4 889. Avšak v relativním porovnání s médiem použitým u všech testovaných látek (agar + phloem) byl u některých látek zaznamenán stejný meziroční trend. V obou letech byly vyšší odchty u *Endoconidiophora polonica* s vysokou koncentrací; *Endoconidiophora polonica* s nízkou koncentrací, *Grosmannia europhioides* s vysokou koncentrací, *Grosmannia penicillata* s vysokou koncentrací, u *Endoconidiophora polonica* s nízkou koncentrací a *Grosmannia europhioides* s vysokou koncentrací byl tento rozdíl statisticky významný ($p < 0.05$).

U *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* dosahovala větší odchty vždy varianta s vyšším obsahem houby, v případě *Endoconidiophora polonica* měla vždy vyšší odchty nižší koncentrace houby. Ve výsledném modelu nebyl faktor Rok a interakce s faktorem Varianta na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky signifikantní (Graf 7, tabulka 5). Velké černé body v Grafu 7 představují modelem predikovanou střední hodnotu, příčné linie 95% interval spolehlivosti predikce, malé prázdné tečky pozorované hodnoty.

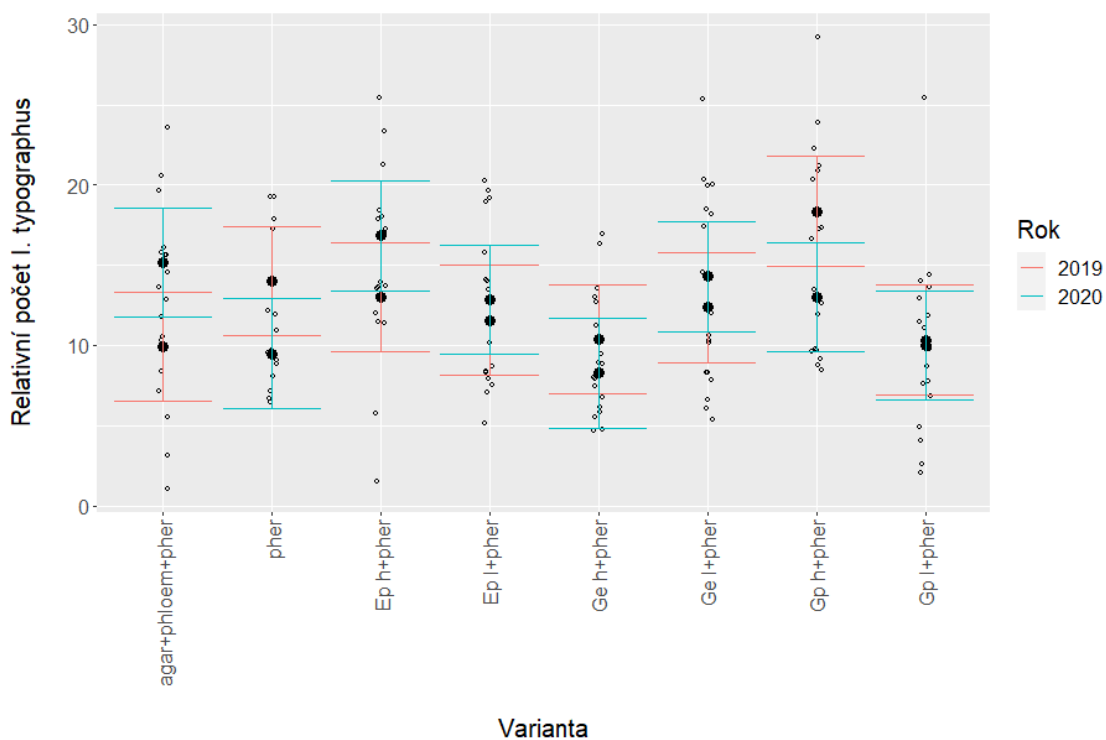


Graf 7 Relativní počet odchycených lýkožroutů smrkových na jednotlivé látky během let 2019 a 2020, v pokusu s agarem.

Tabulka 5 Statistické vyhodnocení odchytů na agar

| Agar | Stupeň volnosti | Součet čtverců odchylek | Průměrný čtverec odchylek | F kritérium | Významnost Pr(>F) |
|----------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|
| Varianta | 7 | 5,283 | 0,75465 | 2,9888 | 0,006137 ** |
| Rok | 1 | 0,908 | 0,90807 | 3,5965 | 0,060156 . |
| Varianta : Rok | 7 | 3,119 | 0,44558 | 1,7647 | 0,099902 . |
| Zbytková hod. | 128 | 32,319 | 0,25249 | | |

V případě pokusného uspořádání s floémem nebyl rozdíl v počtu jedinců odchycený v roce 2019 a 2020 natolik markantní jako u pokusu s agarem. V roce 2019 bylo celkově odchyceno 15 032 dospělců l. smrkového, v roce 2020 to bylo 10 001 jedinců. Avšak u některých variant byl zaznamenán velmi odlišný podíl odchycených brouků v jednotlivých letech. Interpretace výsledků je velmi ovlivněná faktem, že byl zjištěn významný meziroční rozdíl u kontrolní varianty ($p < 0.05$). Jediná z variant, která měla v obou letech konstantně vyšší počet odchycených jedinců, byla *Endoconidiophora polonica* s vysokou koncentrací, ovšem statisticky nebyl tento rozdíl významný (Graf 8, Tabulka 6). Velké černé body v Grafu 8 představují modelem predikovanou střední hodnotu, příčné linie 95% interval spolehlivost predikce, malé prázdné tečky pozorované hodnoty.



Graf 8 Relativní počet odchycených lýkožroutů smrkových na jednotlivé látky během let 2019 a 2020, v pokusu s floémem.

Tabulka 6 Statistické vyhodnocení odchytů na agar s floémem

| Floém | Stupeň volnosti | Součet čtverců odchylek | Průměrný čtverec odchylek | F kritérium | Významnost Pr(>F) |
|----------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|
| Varianta | 7 | 589,3 | 84,187 | 3,0844 | 0,004891 ** |
| Rok | 1 | 0,0 | 0,004 | 0,0002 | 0,990114 |
| Varianta : Rok | 7 | 455,2 | 65,030 | 2,3826 | 0,025310 * |
| Zbytková hod. | 128 | 3493,6 | 27,294 | | |

6 Diskuze

Diplomová práce se zabývá chemicko-ekologickým vztahem lýkožrouta smrkového a jeho asociovaných hub rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora*, komunikujících s kůrovci prostřednictvím emitovaných těkavých látek. Rešeršní část práce čerpá z dostupné literatury českých i zahraničních autorů. Jednotlivé kapitoly se zabývají nejen bionomií lýkožrouta smrkového, ale zejména i jeho interakcí s houbami i hostitelskou dřevinou. Důležitou součástí je popis asociovaných hub a jejich emitovaných látek, které používají ke komunikaci. Další kapitolou jsou způsoby a metody pro získávání těkavých látek z hub v laboratoři.

V metodické části je popsán postup získávání dat a způsob jejich zpracování. Interpretovaná data byla získána na základě kvantitativního výzkumu provedeného v polním pokusu pomocí odchyťů jedinců na návnady z asociovaných hub. Úspěšné odchyty na jednotlivé návnady byly zpracovány statistickou analýzou pomocí lineárního regresního modelu, kdy významnost faktorů byla poté posuzována analýzou rozptylu. Těkavé látky z hub byly analyzovány v laboratoři chemickými metodami.

Výsledky z polního pokusu byly porovnány s výsledky diplomové práce Matěje Trepáče (2019) na téma *Studium polní atraktivity těkavých látek produkovaných houbami asociovanými s lýkožroutem smrkovým*. Dále s dostupnou literaturou a výzkumy zabývajícími se stejnou či obdobnou problematikou.

Prvním dílčím cílem bylo *Analyzovat vzorek emitovaných těkavých látek hub a pomocí plynového chromatografu s hmotnostní spektrometrií stanovit jejich profil a kvantitu.*

Ke splnění cíle byla použita metoda tzv. dynamického headspace, tedy adsorbce těkavých látek na sorbent v protékajícím vzduchu k získání vzorku emitovaných těkavých látek hub a GC-MS pro stanovení jejich profilu a kvantity. Výstupem byly chromatogramy s identifikací látek jednotlivých hub v určitém dni odpovídajícímu stáří, kdy byly použity při polních odchytech a jejich pěstování vždy zvlášť na jednom druhu živného média. Jednotlivé chromatogramy z vybraného dne stáří hub pěstovaných na agaru byly přeloženy přes sebe a tím vznikl ucelený přehled identifikovaných látek u

všech třech hub na jednom výstupu (Obrázek 18). Stejným způsobem bylo postupováno s chromatogramy hub pěstovaných na floému.

Zmíněnými metodami byla určena u všech hub přítomnost látek 3-methyl-1-butanol; 2-methyl-1-butanol; 3-methyl-1-butylacetat; 2-methyl-1-butylacetat; fenyletanol a octová kyselina, 2-fenylethylacetát. Tyto emitované látky byly získávány z hub pěstovaných na samotném agaru a na agaru s floémem v rozmezí jejich stáří 4 - 7 dnů. Kvantifikace látek provedená metodou konstrukce kalibračních křivek, byla pro lepší přehled znázorněna pomocí grafů (Graf 1 - 6), kde je zřejmý vliv na výskyt jejich množství v rámci druhů hub, jejich stáří a živnému médiu, na kterém byly pěstovány. Dále byla detekována řada terpenických sloučenin, u kterých nebylo možné určit, zda se jedná o metabolity hub či kontaminaci z laboratorního prostředí při analýze vzorků. Nízkovroucí terpeny totiž byly přítomny v extraktu z vstupního filtru a zároveň bylo detekováno stejné množství i na výstupním filtru. Oproti výslednému profilu emitovaných výševroucích terpenických látek z roku 2019 (Trepáč 2019), kdy byly určeny látky alpha-pinen, beta-pinen, kamfen, 3-karen, limonen, karyofylen a aromandendren, byl v našem případě identifikovaný pouze karyofylen. Vyskytoval se pouze na výstupním filtru u houby *Grosmannia europhioides* v případě agaru a u *Grosmannia europhioides* a *Grosmannia penicillata* v případě floému. Výskyt pouze na výstupním filtru potvrzuje emisi látek z hub, nikoli kontaminaci z laboratorního prostředí.

Látky 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol, strukturně podobné složce agregačního feromonu lýkožrouta smrkového 2-methyl-3-buten-2-olu, podle Kandasamyho (2019) nejméně emitovala *Endoconidiophora polonica*, což potvrzují i výsledky naší analýzy těkavých látek. U houby *Endoconidiophora polonica* pěstované pouze na agaru byl nejvýznamnější látkou 2-methyl-1-butylacetat, jehož produkce nejvíce stoupala spolu se stářím houby od 5. do 7. dne. Méně významný byl 3-methyl-1-butylacetat, jehož produkce ale v 7. dni stáří houby již klesala. Obdobným způsobem se projevil 2-methyl-1-butanol u hub *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* pěstovaných na agaru. 3-methyl-1-butanol měl taktéž stoupající tendenci spolu se stářím houby, ale jeho množství produkce bylo nižší. Ostatní látky nevykazovaly příliš významné množství.

Houby pěstované na agaru s floémem vykazovaly oproti agaru produkci látek již od 4. dne stáří, přičemž u houby *Endoconidiophora polonica* byl nejvýznamnější

3-methyl-1-butylacetat se stoupající tendencí do 6. dne stáří houby a poté jeho produkce klesala. Obdobně se v menším množství projevil 2-methyl-1-butylacetat a 3-methyl-1-butanol. U hub *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* pěstovaných na agaru s floémem bylo největší množství látek 2-methyl-1-butylacetat a 3-methyl-1-butanol podobně jako při pěstování na samotném agaru, ale jejich produkce byla evidentní již 4. a 5. den s následnou klesající tendencí. Ostatní identifikované látky byly ve většině případů produkovány ve vyšším množství oproti agaru. To nasvědčuje faktu, že měly houby z agaru málo živin a proto rostly pomaleji a s menší intenzitou, kdežto ve floému jsou schopny růst rychlostí až 1cm za den (Hulcr 2013). Zároveň tohle zjištění potvrzuje výsledky prací níže uvedených autorů, které popisují spouštění rozsáhlých hypersenzitivních reakcí hub ihned po inokulaci do floému a současnou akumulaci metabolitů, které vedou k nekrotizaci jeho tkání (Berryman 1972; Erbilgin et al. 2006; Franceschi et al. 2005; Lieutier et al. 2009; Zhao et al. 2011). Z toho bychom mohli usuzovat, že právě houby pěstované na floému mají díky schopnosti rychlého růstu časnější vzestup chemické aktivity a tím i emitaci některých těkavých látek a následně po nekrotizaci floému naopak jejich dřívější pokles než houby pěstované na agaru.

Druhým dílčím cílem diplomové práce bylo *V polním pokusu ověřit účinnost a behaviorální aktivitu hub pomocí speciálně vytvořených návnad s jejich myceliem ve feromonových lapačích podle stanoveného replikačního schématu*. K tomuto dílčímu cíli byla formulována jedna výzkumná otázka.

Výzkumná otázka č. 1 - *Je při odchyту lýkožrouta smrkového aktivita hub *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia europhioides* a *Grosmannia penicillata* rozdílná?* K analýze výzkumné otázky byl použit kvantitativní výzkum rozdělený do dvou sekcí odchyťů.

V první sekci odchyťů, kde byl jako výživné médium hub použit pouze agar, bylo celkem odchyceno 4 889 jedinců lýkožrouta smrkového. Jednotlivé odchyty do těchto návnad s houbami byly větší než odchyty na agar s feromonem ve čtyřech případech. Vyšší atraktivitu projevila houba *Endoconidiophora polonica* v nízké i vysoké koncentraci a *Grosmannia penicillata* s *Grosmannia europhioides* ve vysoké koncentraci. Ve srovnání s odchyty pouze na feromon byly houbové odparníky vždy účinnější mimo *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* v nízkých

koncentracích. Do prázdných lapačů se chytlo pouze 7 jedinců, což lze považovat za náhodný náraz do lapače při disperzním letu. V druhé sekci odchyťů byl výživným médiem pro houby agar s floémem, na které bylo celkem odchyceno 10 001 jedinců lýkožrouta smrkového. Odchyty na jednotlivé návnady s houbami byly statisticky signifikantně opakovaně v obou letech větší než na agar s floémem a feromonem pouze v jednom případě a to u houby *Endoconidiophora polonica* ve vysoké koncentraci. Oproti samotnému feromonu ovšem prokázaly atraktivitu všechny houby v nízkých i vysokých koncentracích až na *Grosmania europioides* ve vysoké koncentraci. Do kontrolního prázdného lapače se během celého pokusu chytlo 13 jedinců, což se opět považuje za náhodný náraz při disperzním letu. Výsledky výzkumného pokusu znázorněné v tabulkách (Tabulka 3 a 4) odchyťů lýkožrouta smrkového na návnady z hub pěstovaných na agaru a floému jasně vyznačují rozdílnost jejich aktivity při odchycích, což potvrzuje i jejich behaviorální vliv na lýkožrouta smrkového.

Třetím dílčím cílem bylo *Statisticky porovnat atraktivitu či jednotlivé návnady pro lýkožrouta smrkového*. K tomuto dílčímu cíli byly formulovány dvě výzkumné otázky týkající se koncentrace hub a funkce jejich těkavých látek.

Výzkumná otázka č. 2 - *Jakou roli mají těkavé látky z hub na odchyt lýkožrouta smrkového?*

Těkavé látky z hub mají podle výsledků významnou roli při odchytu lýkožrouta smrkového, což odpovídá teorii, ve které Kandasamy et al. (2016) uvádí jejich funkci jako zdroj semiochemikálií ovlivňujících chování lýkožrouta. Role těkavých látek je vázaná na jejich koncentraci, podle které lýkožrouta lákají nebo naopak odpuzují. Z výsledků polního pokusu vyplývá, že z asociovaných hub je *Endoconidiophora polonica* nejvíce preferovaná lýkožroutem smrkovým, čímž ovlivňuje jeho behaviorální aktivitu. Tato zjištění konvenují s výsledky Kandasamyho et al. (2019) laboratorních mističkových pokusů, které dokládají, že asociovaná houba *Endoconidiophora polonica* je pro lýkožrouta nejvíce atraktivní především díky acetátům, které emituje. Zároveň udává, že behaviorální aktivita hub je závislá na koncentraci jejich emitovaných těkavých látek, což odpovídá výsledkům z jeho laboratorního behaviorálního testu, kdy byla *Endoconidiophora polonica* atraktivní pouze v ředění 10^{-7} a ve vyšších koncentracích kůrovce dokonce odpuzovala (Kandasamy et al. 2019). Tyto výsledky vcelku odpovídají odchytům provedeným v našem polním pokusu v rámci první sekce

(Tabulka 3), kde byly odparníky z hub pěstovaných na samotném agaru. Ovšem v sekci s agarem a floémem vykazovala dle odchyť (Tabulka 4) značnou atraktivitu *Endoconidiophora polonica* i ve vysoké koncentraci, což lze přisuzovat přítomnosti floému, který svými látkami může ovlivňovat růst hub a emitaci jejich těkavých látek. Nicméně výsledky z obou sekcí napovídají faktu, že je tato houba pro lýkožrouta jednou z nejvíce atraktivních asociovaných hub vykazující behaviorální aktivitu.

Výzkumná otázka č. 3 - *Jaký je odchyt lýkožrouta smrkového na různé koncentrace hub?*

Pro statistické porovnání odchyť na jednotlivé návnady z hub ve vysokých a nízkých koncentracích byly srovnány výsledky polního pokusu v roce 2019 (Trepáč 2019) a našeho polního pokusu z roku 2020. Celkový počet dospělců lýkožrouta smrkového odchycených v jednotlivých letech byl rozdílný. Tento fakt lze přisuzovat odlišným klimatickým podmínkám v průběhu pokusů, přestože byly prováděny na stejné lokalitě. V roce 2019 byly odchvy prováděny ve dvou sériích, přičemž první proběhla v průběhu dubna a května s použitím agaru jako živným médiem pro houby. Druhá série proběhla na stejném místě s použitím živného média agaru a floému v průběhu července a srpna (Trepáč 2019). Na houby pěstované na agaru bylo v roce 2019 odchyceno 14 095 jedinců, v roce 2020 jen 4 889. Výsledky odchyť na jednotlivé návnady z obou pokusů jsou i tak v poměru, až na výjimky, srovnatelné. V obou letech byly na agar vyšší odchvy u *Endoconidiophora polonica*, *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* ve vysoké koncentraci a *Endoconidiophora polonica* v nízké koncentraci. Vyšší odchvy u všech třech hub potvrzují výsledek práce Kandasamyho (2016), která jako jedna z prvních uvádí tyto druhy jako asociované houby ovlivňující behaviorální aktivitu lýkožrouta smrkového. U *Endoconidiophora polonica* v nízké koncentraci a *Grosmannia europhioides* ve vysoké koncentraci byl tento rozdíl i statisticky významný ($p < 0.05$). U *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europhioides* dosahovala větší odchyt vždy varianta s vyšším obsahem houby, v případě *Endoconidiophora polonica* měla vyšší odchyt vždy nižší koncentrace houby. Ve výsledném modelu nebyl faktor Rok a interakce s faktorem Varianta na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky signifikantní.

V případě druhé sekce s návnadami z hub pěstovaných na floému byl vyšší počet odchycených jedinců na návnadu z houby *Endoconidiophora polonica* ve vysoké koncentraci, ovšem statisticky nebyl tento rozdíl významný.

Čtvrtým dílčím cílem diplomové práce bylo *Vyhodnotit chemicko-ekologický význam jednotlivých hub pro lýkožrouta smrkového.*

Vcelku vysoká účinnost houbových návnad při odchycích potvrzuje Kandasamyho et al. (2016) teorii navigační podpory hub pomocí uvolněných těkavých látek při lákání lýkožrouta primárními atraktanty hostitelského stromu (Kandasamy et al. 2016). Z druhého pohledu lze chápat atraktivitu hub pro kůrovce jako nástroj na přenos svých spor na další hostitelský strom, do kterého spolu s ním po zavrtání do kůry snadno proniknou, čehož nejsou samy schopny (Franceschi et al. 2005). Vysoké počty odchytů na návnady z hub tak nasvědčují tomuto dalšímu významu hub ve vzájemném vztahu s lýkožroutem. Pro vyrovnaný symbiotický vztah na oplátku poskytují broukům i jejich larvám výživnou potravu a pomáhají při zdolávání obranyschopnosti stromu. Metabolizováním obranných sloučenin hostitelských dřevin snižují houboví symbionti toxicitu terpenů a fenolů pro kůrovce (Christiansen et al. 1987; Krokene 2015; Krokene et al. 2001; Lieutier et al. 2009; Rafa et al. 2015). Touto schopností výrazně podporují útoky kůrovců na jejich hostitelské dřeviny a společně mohou docílit jejího odumření. Chemicko-ekologický vztah lýkožrouta smrkového a jeho asociovaných hub je evidentní, ačkoli ještě neúplně rozklíčovaný. Čtvrtý dílčí cíl byl splněn částečně a je potřeba se tomuto tématu věnovat podrobněji v dalších výzkumných pracích.

Diplomová práce byla zaměřena na potvrzení či vyvrácení atraktivity asociovaných hub lýkožrouta smrkového. Pomocí dílčích cílů jsme došli k hlavnímu záměru práce, jehož **hlavním cílem** bylo *Stanovení emitovaných těkavých látek hub a otestování jejich behaviorální aktivity.* Z výsledků výzkumu a jednotlivých dílčích cílů vyplývá, že stanovené těkavé látky, které asociované houby emitují, působí na behaviorální aktivitu lýkožrouta smrkového. Stává se tak v závislosti na koncentraci těkavých látek, stáří hub a vzájemné interakci zúčastněných organismů.

Vzájemná interakce lýkožrouta smrkového a jeho asociovaných hub v návaznosti na složitý multitrofní systém skýtá ještě mnoho nepoznaného, ačkoliv již dosavadní výzkumy hodně dokázaly. V této práci bylo pro objasnění významu atraktivity hub pro lýkožrouta smrkového a ověření jejich behaviorální aktivity zvoleno mnoho cílů, kterých nelze dosáhnout na takové úrovni a statistické hladině významnosti, aby bylo možné všechny položené otázky jednoznačně zodpovědět. Práce nastolila řadu možností v prohlubování a poznávání tématu na dalších úrovních.

7 Závěr

Diplomová práce s názvem “Stanovení těkavých látek a behaviorální aktivity u návnad pro lýkožrouta smrkového vytvořených z jeho asociovaných hub” se po teoretické stránce věnuje chemicko-ekologickému vztahu lýkožrouta smrkového a jeho asociovaných hub. Zaměřuje se na atraktivitu hub rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora*, komunikujících s kůrovci prostřednictvím emitovaných těkavých látek.

V empirické části byly hodnoceny výsledky kvantitativního výzkumu provedeného polním pokusem pomocí odchytů lýkožrouta smrkového na návnady vytvořené z jeho asociovaných hub.

Hlavním cílem bylo stanovení emitovaných těkavých látek hub a otestování jejich behaviorální aktivity pro atrakci lýkožrouta smrkového v kombinaci s feromonem. Ve vztahu k hlavnímu cíli byly sestaveny čtyři dílčí cíle, pomocí kterých se zjišťoval profil emitovaných látek, jejich atraktivita a behaviorální aktivita ve vztahu k lýkožroutu smrkovému.

První dílčí cíl měl za úkol stanovit emitované látky hub, jejich profil a kvantitu. Na základě analýzy získaných vzorků z hub byl sestaven profil emitovaných látek a jejich kvantita. *Endoconidiophora polonica* nejvíce emituje acetáty, houby rodu *Grosmannia* více alkoholu. Houby pěstované na agaru emitují látky později než na floému. Druhý dílčí cíl ověřoval účinnost a behaviorální aktivitu hub pomocí speciálně vytvořených návnad z jejich mycelií pomocí lapačů v polním pokusu. Z výsledků odchytů lýkožrouta smrkového vyplývá účinnost návnad a jejich vliv na behaviorální aktivitu lýkožrouta smrkového, kdy bylo v případě agaru chyceno nejvíce brouků na *Endoconidiophora polonica* v nízké koncentraci a v případě floému na *Endoconidiophora polonica* ve vysoké koncentraci. Třetí dílčí cíl měl za úkol statisticky porovnat atraktivitu jednotlivých návnad pro lýkožrouta smrkového. Pomocí lineárního regresního modelu a následné analýzy rozptylu byly statisticky vyhodnoceny nejvýznamnější návnady a meziročně porovnány v obdobných polních pokusech. Statisticky významný byl v případě agaru v obou letech odchyt na *Endoconidiophora polonica* v nízké i vysoké koncentraci *Grosmannia europioides* a *penicillata* ve vysoké koncentraci. V případě floému byl nejvyšší odchyt na *Endoconidiophora polonica* ve

vysoké koncentraci, ale nebyl statisticky signifikantní. Čtvrtý dílčí cíl hodnotí chemicko-ekologický význam jednotlivých hub pro lýkožrouta smrkového, ze kterého vyplývá významná existence atraktivity asociovaných hub pro lýkožrouta smrkového. Největší význam vztahu spočívá v navigační podpoře hub pomocí uvolněných těkavých látek při lákání lýkožrouta primárními atraktanty hostitelského stromu a poskytnutí mycelií hub jako stravy pro larvy i brouky. Zároveň využívají houby lýkožrouta smrkového jako nástroj na přenos svých spor na další hostitele.

V rámci diplomové práce byly stanovené cíle splněny, ale zdaleka nebylo dosaženo jejich významného poznání, které by v mnohém osvětlilo spoustu prozatím nezodpovězených otázek. Vzhledem k aktuálnosti a závažnosti tohoto tématu je zapotřebí věnovat mnoho dalšího úsilí do hlubšího porozumění. Tato práce nastolila mnoho podnětů pro další výzkumy vedoucí k rozklíčování složitých přírodních vztahů a budoucímu souladu s přírodou.

Seznam literatury a použitých zdrojů

1. Adams H. D., Germino M. J., Breshears D. D., Barron-Gaford G. A., Guardiola-Claramonte M., Zou C. B., Huxman T. E. 2013. *Nonstructural leaf carbohydrate dynamics of Pinus edulis during droughtinduced tree mortality reveal role for carbon metabolism in mortality mechanism*. New Phytol [online] 197:1142–1151 pg. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.12102>.
2. Andersson, M. N., Larsson, M. C., Schlyter, F. 2009. *Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle Ips typographus: Single-cell responses to ecologically relevant odors*. Journal of Insect Physiology. [online] 55(6), 556-567 pg. [cit. 2020-11-04] DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.01.018. ISSN 00221910. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19233334/>.
3. Baier, P. 1996. *Defense reaction of Norway spruce (Picea abies Karst.) to controlled attacks of Ips typographus*. (Col., Scolytidae) in relation to tree parameter. Journal of Applied Entomology, [online] 120 (10): 587–593 pg. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1996.tb01656.x>.
4. Baier, P., Führer, E., Kirisits, T., Rosner, S. 2002. *Defence reactions of Norway spruce against bark beetles and the associated fungus Ceratocystis polonica in secondary pure and mixed species stands*. Forest Ecol Manag [online] 159:73–86 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00711-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00711-3).
5. Bakke, A. 1981. *Inhibition of the response in Ips typographus to the aggregation pheromone; field evaluation of verbenone and ipsenol*. Z Angew Entomol [online] 92:172–177. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1981.tb01666.x>.
6. Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Dahl, C. C., Preston, C. A. 2006. *Volatile signaling in plant–plant interactions: ‘Talking trees’ in the genomics era*. Science. [online] 311, 812–815 (2006) [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://science.sciencemag.org/content/311/5762/812>.
7. Bentz, B., Six, D.L. 2006. *Ergosterol content of fungi associated with Dendroctonus ponderosae and Dendroctonus rufpennis (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae)*. Ann Entomol Soc Am [online] 99:189– 194 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)099\[0189:ECOFA W\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)099[0189:ECOFA W]2.0.CO;2).

8. Berryman, A. A. 1972. *Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations*. *BioScience*. [online] 22, 598-602 (1972). [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://academic.oup.com/bioscience/article/22/12/724/399401>.
9. Binyameen, M., Jankuvová, J., Blaženec, M. et al. 2014. *Co-localization of insect olfactory sensory cells improves the discrimination of closely separated odour sources*. *Funct Ecol* [online] 28:1216–1223pg. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12252>.
10. Birgersson, G., Schlyter, F., Lofqvist, J., Bergstrom, G. 1984. *Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle Ips typographus from different attack phases*. *Journal of Chemical Ecology*. [online] 1984, no10, 1029-1055 pg. ISSN 0098-0331. [cit. 2020-04-18] Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00987511>.
11. Bonello, P., Gordon, T. R., Herms, D. A., Wood, D. L., Erbilgin, N. 2006. *Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: A novel hypothesis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online] 68, 95-104 pg. (2006). [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2009.03127.x>.
12. Borg-Karlson, A.K., Lindström, M., Norin, T., Persson, M., Valterová, I. 1993. *Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in different tissues of Norway spruce, Picea abies (L) Karst. A multi-dimensional gas chromatography study*. *Acta Chem Scand* [online] 47:138–144 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.47-0138>.
13. Brignolas, F., Lacroix, B., Lieutier, F. et al 1995. *Induced responses in phenolic metabolism in two Norway spruce clones after wounding and inoculations with Ophiostoma polonicum, a bark beetle-associated fungus*. *Plant Physiol* [online] 109:821–827 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.821>.
14. Byers, J. A. 1996. *An encounter model of bark beetle populations searching at random for susceptible host trees*. *Ecological Modelling*. [online] 91 (1–3): s. 57–66. [cit. 2020-10-10] Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(95\)00166-2](https://doi.org/10.1016/0304-3800(95)00166-2).
15. Byers, J. A. 2004. *Chemical ecology of bark beetles*. In: Lieutier F., Keith D. R., Battisti A., Grégoire J. C., Evans H. F. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. 1. vyd. Dodrecht-Boston-London: Kluwer Academic Publishers, [online] 89–134 pg. [cit. 2020-10-10] Dostupné z: <https://www.chemical-ecology.net/pdf/Byers1989a.pdf>.

16. Cale, J.A., Ding, R., Wang, F., Rajabzadeh, R., Erbilgin, N. 2019. *Ophiostomatoid fungi can emit the bark beetle pheromone verbenone and other semiochemicals in media amended with various pine chemicals and beetle-released compounds*. Fungal Ecol [online] 39:285– 295 pg. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.01.003>.
17. Celedon, J.M., Bohlmann, J. 2019. *Oleoresin defenses in conifers: chemical diversity, terpene synthases and limitations of oleoresin defense under climate change*. New Phytol [online] 224:1444–1463 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.15984>.
18. Crawley, M. 2013. *The R Book*, 2st. ed. John Wiley & Sons. New York, USA, 2013, 1051 s. ISBN 978-0-470-97392-9.
19. Česko, Ministerstvo Zemědělství. Vyhláška č. 101 ze dne 28. března 1996, kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor služebního odznaku a vzor průkazu lesní strážce. In: Sběrka zákonů České republiky. 1996, částka 33, s. 1124. ISSN 1211-1244.
20. Česko, Ministerstvo Zemědělství. Vyhláška č. 236 ze dne 18. července 2000, kterou se mění vyhláška MZe č. 101/1996 Sb., kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor odznaku a vzor průkazu lesní strážce. In: Sběrka zákonů České republiky. 2000, částka 72, s. 3424. ISSN 1211-1244.
21. Davis, T.S., Stewart, J.E., Mann, A., Bradley, C., Hofstetter, R. 2019. *Evidence for multiple ecological roles of Leptographium abietinum, a symbiotic fungus associated with the North American spruce beetle*. Fungal Ecol [online] 38:62–70 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.04.008>.
22. De Beer, Z.W.; Duong, T.A.; Barnes, I.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2014. *Redefining Ceratocystis and allied genera*. Studies in Mycology. 2014, no. 79, s. 187- 219. ISBN: 978-94-91751-00-4.
23. Erbilgin N., Krokene P., Christiansen E., Zeneli G., Gershenson J. 2006. *Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (Picea abies) and reduces host colonization by the bark beetle Ips typographus*. Oecologia [online] 148: 426–436. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0394-3>.
24. Erbilgin, N., Cale, J.A., Hussain, A., Ishangulyyeva, G., Klutsch, J.G., Najjar, A., Zhao, S. 2017. *Weathering the storm: how lodgepole pine trees survive mountain pine beetle outbreaks*. Oecologia [online] 184:469–478 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3865-9>.

25. Eriksson, M.; Valterova, I.; Borg-Karlson, A.K. 2000. *Comparison of headspace techniques for sampling volatile natural products in a dynamic system*, Zeitschrift Fur Naturforschung - Journal of Biosciences [online] 55:3-4, 180-188 pg. (2000) [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/znc-2000-3-408>.
26. Evensen, P.C., Solheim, H., Høiland, K., Stenersen, J. 2000. *Induced resistance of Norway spruce, variation of phenolic compounds and their effects on fungal pathogens*. For Pathol [online] 30:97–108 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2000.00189.x>.
27. Everaerts, C., Grégoire, J.C., Merlin, J. 1988. *The toxicity of Norway spruce monoterpenes to two bark beetle species and their associates*. In: Mattson WJ, Levieux J, Bernard-Dagan C (eds) Mechanisms of woody plant defences against insects. Search for pattern. Springer, Berlin, [online] 335–344 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3828-7_23.
28. Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T. 2005. *Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests*. New Phytologist. [online] 167:2, 353–375 (2005). [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x>.
29. Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T. 2005. *Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests*. New Phytol [online] 167:353–375 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x>.
30. Francke, W., Vité, J.P. 1983. *Oxygenated terpenes in pheromone systems of bark beetles*. J Appl Entomol [online] 96:146–156 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1983.tb03655.x>.
31. Furniss, M. M., Solheim, H., Christiansen, E. 1990. *Transmission of Blue-Stain Fungi by Ips typographus (Coleoptera: Scolytidae) in Norway Spruce*. Annals of the Entomological Society of America. [online] 1990, no. 83, s. 712-716. ISSN 0013-8746. [cit. 2020-09-07] Dostupné z: https://www.academia.edu/25277305/Transmission_of_blue_stain_fungi_by_Ips_typographus_Coleoptera_Scolytidae_in_Norway_spruce.
32. Hammerbacher, A., Kandasamy, D., Ullah, C., Schmidt, A., Wright, L.P., Gershenzon, J. 2019. *Flavanone-3-Hydroxylase plays an important role in the biosynthesis of spruce phenolic defenses against bark beetles and their fungal*

- associates*. Front Plant Sci [online] 10:208 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00208>.
33. Hammerbacher, A., Paetz, C., Wright, L.P. et al. 2014. *Flavan-3-ols in Norway spruce: biosynthesis, accumulation, and function in response to attack by the bark beetle-associated fungus Ceratocystis polonica*. Plant Physiol [online] 164:2107–2122. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.113.232389>.
 34. Hammerbacher, A., Ralph, S.G., Bohlmann, J., Fenning, T.M., Gershenzon, J., Schmidt, A. 2011. *Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection*. Plant Physiol [online] 157:876–890 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.111.181420>.
 35. Heil, M., Silva Bueno, J. C. 2007. *Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. [online] 104, 5467– 5472 pg. (2007). [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/104/13/5467>.
 36. Hulcr, J. 2013. *Spojenecká armáda lýkožroutů a hub proti stromu*. Vesmír. [online] 2003/12, no. 82, s. 692. ISSN 1214-4029. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2003/cislo-12/kurovci-milacci-evoluce.html>.
 37. Christiansen, E., Warning R. H., Berryman A. A. 1987. *Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationships*. Forest Ecology and Management, [online] 22 (1–2): 89–106 pg. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1018&context=barkbeetles>.
 38. Kalinová, B., Břízová, R., Mašánková, K., Zajíčková, L., Nádraská, M. 2011. *Biotic risks and climate change in forests*. Freiburg Self-publishing FVA. [online] 2011. [cit. 2020-06-03] Dostupné z: https://www.fva-bw.de/fileadmin/publikationen/fff_bericht/fff_h_89.pdf.
 39. Kandasamy, D., Gershenzon, J., Andersson, M. N., Hammerbacher, A. 2019. *Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (Ips typographus) with its fungal symbionts*. The ISME Journal. [online] 2019, no. 13, 1788-1800 pg. ISSN 1751-7370. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41396-019-0390-3>.

40. Kandasamy, D., Gershenzon, J., Hammerbacher, A. 2016. *Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control*. Journal of Chemical Ecology. [online] 2016, no. 42, 952-969 pg. ISSN 0098-0331. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-016-0768-x>.
41. Klouda, P. 2003. *Moderní analytické metody*. Vyd. 2., upravené a doplněné. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
42. Knížek M., Beaver R. 2004. Systematics of bark and ambrosia beetle. In: Lieutier F., Keith D. R., Battisti A., Grégorie J. C., Evans H.F. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. 1. vyd. Dodrecht-Boston-London: Kluwer Academic Publishers, 41-54 pg. ISBN 978-1-4020-2241-8 (e-book).
43. Krofta, J. 2001. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. 6. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. s. 165. ISBN 80-7080-451-3.
44. Krokene P. 2015. *Conifer defense and resistance to bark beetles*. In: Vega FE, Hofstetter R (eds) *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*. Academic Press, Cambridge. [online] 177–207. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124171565000058?via%3Dihub>.
45. Krokene P., Solheim H., Christiansen E. 2001. *Induction of disease resistance in Norway spruce (Picea abies) by necrotizing fungi*. Plant Pathol. [online] 50:230–233 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00559.x>.
46. Krokene, P.; Solheim, H., 1998. *Phytopathogenicity of four bluestain fungi associated with aggressive and non-aggressive bark beetles*. Phytopathology [online] 88, 39-44 pg. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1998.88.1.39>.
47. Křístek, J., Urban, J. 2013. *Lesnická entomologie*. 2. vyd. Praha: Academia, 2013. 445 s. ISBN 978-80-200-2237-0.
48. Lahr E. C., Krokene P. 2013. *Conifer stored resources and resistance to a fungus associated with the spruce bark beetle Ips typographus*. PLoS One [online] 8: e72405. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072405>.
49. Leufvén, A., Birgersson, G. 1987. *Quantitative variation of different monoterpenes around galleries of Ips typographus (Coleoptera:Scolytidae)*

- attacking Norway spruce*. Can J Bot [online] 65:1038–1044 pg. [cit. 2020-08-07]
Dostupné z: <https://doi.org/10.1139/b87-144>.
50. Li, L., Li, C.Y., Lee, G. I., Howe, G. A. 2002. *Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. [online]99, 6416–6421(2002) [cit. 2020-11-08] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122963/>.
 51. Li, S.H., Nagy, N.E., Hammerbacher, A., Krokene, P., Niu, X.M., Gershenzon, J., Schneider, B. 2012. *Localization of phenolics in phloem parenchyma cells of Norway spruce (Picea abies)*. ChemBioChem [online] 13 : 2707–2713 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbic.201200547>.
 52. Lieutier F., Yart A., Salle A. 2009. *Stimulation of tree defenses by ophiostomatoid fungi can explain attack success of bark beetles on conifers*. Ann For Sci [online] 66:801. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/forest/2009066>.
 53. Lieutier, F. 2004. *Host resistance to bark beetles and its variations*. In: Lieutier F., Keith D. R., Battisti A., Grégoire J. C., Evans H. F. Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. 1. vyd. Dodrecht-Boston-London: Kluwer Academic Publishers, s. 135–180. ISBN 978-1-4020-2241-8.
 54. Lieutier, F., Brignolas, F., Sauvard, D., Yart, A., Galet, C., Brunet, M., Van de Sype, H. 2003. *Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of Picea abies and relationship to a bark beetle-associated fungus*. Tree Physiol [online] 23:247–256 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/treephys/23.4.247>.
 55. Lindgren, B.S., Miller, D.R. 2019. *Effect of verbenone on five species of bark beetles (Coleoptera:Scolytidae) in lodgepole pine forests*. Environ Entomol [online] 31:759–765 pg. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.5.759>.
 56. Lindgren, B.S., Rafa, K.F. 2013. *Evolution of tree killing in bark beetles (Coleoptera: Curculionidae): trade-offs between the maddening crowds and a sticky situation*. Can Entomol [online] 145:471– 495 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.4039/tce.2013.27>.
 57. Mageroy, M.H., Wilkinson, S.W., Tengs, T. et al. 2020. *Molecular underpinnings of methyl jasmonate-induced resistance in Norway spruce*. Plant Cell Environ.

- [online] [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pce.13774>.
58. Martikainen, P., Siitonen, J., Kaila, L., Punttila, P., Rauh, J. 1999. *Bark beetles (Coleoptera, Scolytidae) a associated beetle species in mature managed a old-growth boreal forests in southern Finla*. Forest Ecology a Management. [online] 1999, no. 116, 233- 245 pg. [cit. 2020-11-04] ISSN 0378-1127. Dostupné z: https://www.academia.edu/34317567/Bark_beetles_Coleoptera_Scolytidae_and_a_sassociated_beetle_species_in_mature_managed_and_old_growth_boreal_forests_in_southern_Finland.
59. McDowell, N., Pockman, W.T., Allen, C. D. et al. 2008. *Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?* New Phytol [online] 178:719– 739 pg. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x>.
60. Metsämuuronen, S., Sirén, H. 2019. *Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce*. Phytochem Rev [online] 18:623–664 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09630-2>.
61. Nascimento, R. R., Morgan E. D. 1996. *Chemicals involved in the comunication systém of social insect: Their source and methods of isolation and identification, with special emphasis on ants*. Química Nova. [online]19, 156-165 (1996) [cit. 2020-10-10] Dostupné z: http://static.sites.s bq.org.br/quimicanova.s bq.org.br/pdf/Vol19No2_156_v19_n2_10.pdf.
62. Néve Repe, A.; Kirisits, T.; Piškur, B.; De Groot, M.; Kump, B.; Jurc, M. 2013. *Ophiostomatoid fungi associated with three spruce-infesting bark beetles in Slovenia*. Annals of Forest Science. [online] 2013, no. 70, pg. 717-727. ISSN 1286-4560. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01201512/document>.
63. Novak, M., Urbanek Krajnc, A., Lah, L. et al. 2013. *Low-density Ceratocystis polonica inoculation of Norway spruce (Picea abies) triggers accumulation of monoterpenes with antifungal properties*. Eur J For Res [online] 133:573–583. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0772-4>.
64. Opekar, F., et al. 2005. *Základní analytická chemie*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005. 202 s. ISBN 80-246-0553-8.

65. Pawliszyn, J. 1997. *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York: Wiley – VCH, Inc, 1997. 247 s. ISBN 0-471-19034-9.
66. Petterson, E.M., Boland, W. 2003. *Potential parasitoid attractants, volatile composition throughout a bark beetle attack*. Chemoecology [online] 13:27–37 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s000490300003>.
67. Pfeffer A. 1954. *Kůrovec lýkožrout smrkový a boj proti němu*. 2. vyd. Praha: SZN, 46 s.
68. Pfeffer A. 1955. *Fauna ČSR, svazek 6. Kůrovci – Scolytoidea*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství ČSAV, [online] 324 pg. [cit. 2020-04-18] Dostupné z: <http://kramerius4.nkp.cz/search/i.jsp?pid=uuid:40e9f6e0-58c6-11e2-a66b-005056827e52>.
69. R CORE TEAM. 2020. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.[online] [cit. 2021-02-18] Dostupné z: <https://www.R-project.org/>.
70. Rafa K. F., Grégoire J. C., Lindgren B. S. 2015. *Natural history and ecology of bark beetles*. In: Vega F. E., Hofstetter R. W. (eds) *Bark beetles Biology and ecology of native and invasive species*. Academic Press, Cambridge, pp 1–40 pg. ISBN 978-0-12-417156-5.
71. Raffa, K. F., Andersson, M. N., Schlyter, F. 2016. *Host Selection by Bark Beetles*. Pine Bark Beetles [online]. Elsevier, 2016, s. 1-74 [cit. 2020-12-03]. *Advances in Insect Physiology*. DOI: 10.1016/bs.aiip.2016.02.001. ISBN 9780128027233. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065280616300029>.
72. Raffa, K. F., Berryman A. A. 1983. *The role of host plant resistance in the colonization behavior and ecology of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae)*. *Ecological Monographs*, [online] 53 (1): 27–49 pg. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/1942586?seq=1>.
73. Schiebe C., Unelius C. R., Ganji S., Binyameen M., Birgersson G., Schlyter F. 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*. *J Chem Ecol* [online] 45:474–489 pg. [cit. 2020-04-18] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01070-8>.
74. Schiebe, C., Hammerbacher, A., Birgersson, G., et al. 2012. *Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle*. *Oecologia* [online] 2012, 170(1), 183-198 pg.

[cit. 2020-06-03] DOI: 10.1007/s00442-012-2298-8. ISSN 0029-8549. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00442-012-2298-8>.

75. Schlyter F., Anderbrant O. 1989. *Mass attack of trees by Ips typographus induced by sex-specific pheromone: a model of attack dynamics*. Holarctic Ecology, [online] 12 (4): 415–426 pg. [cit. 2020-04-18] Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/3682050?seq=1>.
76. Schlyter, F., G. Birgersson, J. A., Byers, J., Lofqvist et al. 1987. *Field response of spruce bark beetle, Ips typographus, to aggregation pheromone candidates*. Journal of Chemical Ecology, [online] 1987, 13(4), 701-716 pg. ISSN 0098-0331. [cit. 2020-04-18] Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24302039/>.
77. Schmidberger, J. 1836. *Naturgeschichte des apfelborkenkäfers apate dispar*. Beitr Zur Obs und Zur Nat der Den Obs schädlichen Insekt. [online] 1836;4:213–30 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41396-019-0390-3?platform=hootsuite>.
78. Schönwitz, R., Kloos, M., Merk, L., Ziegler, H. 1990. *Patterns of monoterpenes stored in the needles of Picea abies (L) Karst from several locations in mountainous regions of southern Germany*. [online] Trees 4:27–33 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00226237>.
79. Silvestrini, E., Michelozzi, M., Skroppa, T., Brancaleoni, E., Ciccio, P. 2004. *Characterisation of different clones of Picea abies (L.) Karst using head-space sampling of cortical tissues combined with enantioselective capillary gas chromatography for the separation of chiral and non-chiral monoterpenes*. J Chromatogr A [online] 1034:183–189 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.001>.
80. Six, D.L. 2019. *A major symbiont shift supports a major niche shift in a clade of tree-killing bark beetles*. Ecol Entomol [online] 45:190–201 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/een.12786>.
81. Six, D.L., Elser, J. J. 2020. *Mutualism is not restricted to tree-killing bark beetles and fungi: the ecological stoichiometry of secondary bark beetles, fungi, and a scavenger*. Ecol Entomol. [online] 45:190–201 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/een.12897>.
82. Skuhrový, V. 2002. *Lýkožrout smrkový Ips typographus a jeho kalamity*. Praha: Agropoj, 2002. 196 s. ISBN 80-7084-238-5.

83. Smolková, E., Pacáková, V., Feltl, L. 1976. *Plynová chromatografie – II.: Instrumentální část*. [s.l.]: Univerzita Karlova v Praze, 1976. 109 s.
84. Solheim, H. 1991. *Oxygen deficiency and spruce resin inhibition of growth of blue-stain fungi associated with Ips typographus*. Mycol Res [online] 95:1387–1392 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80390-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80390-0).
85. Šenovský, M. 2002. *Požární ochrana: sborník přednášek z mezinárodní konference*. Ostrava, Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě, 2002. s. 125-133. ISBN 80-86634-07-8.
86. Štulík, K.; a kolektiv. 2004. *Analytické separační metody*. Vyd. 1. Praha : Karolinum, 2004. 266 s. ISBN 80-246-0852-9.
87. Tingey, D. T., Manning, M., Grothaus, L. C., Burns, W. F. 1980. *Influence of light and temperature on monoterpene emission rates from slash pine*. Plant Physiology. [online] 65, 797–801 (1980) [cit. 2020-09-07] Dostupné z: <https://academic.oup.com/plphys/article-abstract/65/5/797/6077094?redirectedFrom=fulltext>.
88. Tømmerås B. Å. 1985. Specialization of the olfactory receptor cells in the bark beetle *Ips typographus* and its predator *Thanasimus formicarius* to bark beetle pheromones and host tree volatiles. J Comp Physiol A. [online] 1985. 157: 335–341. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00618123>.
89. Trepáč, M. Studium polní atraktivity těkavých látek produkovaných houbami asociovanými s lýkožroutem smrkovým. Praha, 2020. 57 s. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Ing. Anna Jirošová, Ph.D.
90. Viiri, H. 1997. *Fungal associates of the spruce bark beetle Ips typographus L. (Col. Scolytidae) in relation to different trapping methods*. Journal of Applied Entomology. [online] 1997, no. 121, s. 529-533. ISSN: 1439-0418. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01444.x>.
91. Wainhouse, D. 2008. *Ecological methods in forest pest management*. 2. vyd. Oxford: Oxford University Press, 228 pg. ISBN: 9780198505648.
92. Wallin, K.F., Rafa, K.F. 2002. *Prior encounters modulate subsequent choices in host acceptance behavior by the bark beetle Ips pini*. Entomol Exp Appl [online] 103:205–218 pg. [cit. 2020-08-07] Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2002.00975.x>.

93. Wermelinger, B. 2004. *Ecology and management of the spruce bark beetle Ips typographus – a review of recent research*. Forest Ecology and Management, [online] 202 (1–3): 67–82 pg. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378112704005353?via%3Dihub>.
94. Zahradník, P. 2005. *Základy ochrany lesa v praxi*. Jíloviště-Strnady: VÚLHM, 2005. ISBN 80-86461-61-0.
95. Zahradník, P. 2007. *Lýkožrout lesklý Pityogenes chalcographus*. Lesnická práce. [online] 2007, no. 4, s. I–IV. ISSN 0322-9254. [cit. 2020-04-18] Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2007/2007_lykozrout_leskly.pdf.
96. Zahradník, P., Knížek, M. 2000. *Lýkožrout smrkový Ips typographus*. Lesnická práce, [online] 79 (10): 1-8 s. [cit. 2020-11-04] ISSN 0322.9254. Dostupné z <https://docplayer.cz/15275897-Lykozrout-smrkovy-ips-typographus-l.html>.
97. Zeneli, G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T., Gershenson, J. 2006. *Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (Picea abies) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by Ceratocystis polonica, a bark beetle-associated fungus*. Tree Physiol [online] 26:977–988 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/treephys/26.8.977>.
98. Zhang, Q. H.; Schlyter, F.; Anderson, P. 1999. *Green Leaf Volatiles Interrupt Pheromone Response of Spruce Bark Beetle, Ips typographus*. Journal of Chemical Ecology. [online] 1999, no. 25, 2847-2861 pg. ISSN 0098-0331. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://www.sciencebase.gov/catalog/item/5053fb1de4b097cd4fcf9593>.
99. Zhang, Q.H., Schlyter, F. 2003. *Redundancy, synergism, and active inhibitory range of non-host volatiles in reducing pheromone attraction in European spruce bark beetle Ips typographus*. Oikos [online] 101:299–310 pg. [cit. 2020-07-19] Dostupné z: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.11159.5.x>.
100. Zhao T., Borg-Karlson A. K., Erbilgin N., Krokene P. 2011. *Host resistance elicited by methyl jasmonate reduces emission of aggregation pheromones by the spruce bark beetle, Ips typographus*. Oecologia [online] 167:691–699. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2017-x>.
101. Zhao, T., Axelsson, K., Krokene, P., Borg-Karlson, A.K. 2015. *Fungal symbionts of the spruce bark beetle synthesize the beetle aggregation pheromone 2-methyl-*

- 3-buten-2-ol*. J Chem Ecol [online] 41:848–852 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0617-3>.
102. Zhao, T., Borg-Karlson, A.K., Erbilgin, N., Krokene, P. 2011a. *Host resistance elicited by methyl jasmonate reduces emission of aggregation pheromones by the spruce bark beetle, Ips typographus*. Oecologia [online] 167:691–699 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2017-x>.
103. Zhao, T., Ganji, S., Schiebe, C. et al 2019a. *Convergent evolution of semiochemicals across kingdoms: bark beetles and their fungal symbionts*. ISME J [online] 13:1535–1545 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0370-7>.
104. Zhao, T., Kandasamy, D., Krokene, P., Chen, J., Gershenzon, J., Hammerbacher, A. 2019b. *Fungal associates of the tree-killing bark beetle, Ips typographus, vary in virulence, ability to degrade conifer phenolics and influence bark beetle tunneling behavior*. Fungal Ecol [online] 38:71–79 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.06.003>.
105. Zhao, T., Krokene, P., Hu, J. et al. 2011b. *Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner*. PLoS One [online] 6:e26649 pg. [cit. 2020-12-03] Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026649>.
106. *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky 2018*. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2016. 133 s. ISBN 978-80-7434-530-2.

Seznam příloh

| | |
|-----------|---|
| Příloha 1 | Detailní množství identifikovaných látek emitovaných houbami.....78 |
|-----------|---|

Příloha 1

| Flodini | | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate | | 1-Butanol, 2-methyl-, acetate | | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate | | | | | |
|---------------|---------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|-------|--------|--------|---------|
| sampling time | soaking speed | sampled volume | petri dish number | flush volume | flush volume | flush volume | flush volume | | | | |
| min | ml/min | l | pcs | ul | ul | ul | ul | | | | |
| 150 | 150 | 22,5 | 2 | 1000 | EP 4 | 22,3 | 200,4 | 6,1 | 54,71 | 1201,5 | 10813,1 |
| 150 | 150 | 22,5 | 2 | 1000 | EP 5 | 64,0 | 575,9 | 22,7 | 204,3 | 1418,5 | 12766,2 |
| 150 | 100 | 15 | 2 | 1000 | EP 6 | 152,0 | 512,3 | 68,5 | 410,8 | 4053,1 | 24318,5 |
| 120 | 100 | 12 | 2 | 1000 | EP 7 | 143,5 | 861,1 | 140,1 | 840,8 | 1536,8 | 9220,9 |
| 150 | 125 | 18,75 | 2 | 1000 | GE 4 | 634,9 | 4761,5 | 129,9 | 974,1 | 6,6 | 49,3 |
| 150 | 125 | 18,75 | 2 | 1000 | GE 5 | 362,0 | 2714,7 | 306,0 | 2294,8 | 6,1 | 45,9 |
| 150 | 110 | 16,5 | 2 | 1000 | GE 6 | 982,1 | 6481,8 | 81,7 | 539,5 | 3,2 | 21,4 |
| 120 | 110 | 13,2 | 2 | 1000 | GE 7 | 9,8 | 65,0 | 0,0 | 0,0 | 2,3 | 15,5 |
| 150 | 120 | 18 | 2 | 1000 | GP 4 | 501,2 | 3608,5 | 120,9 | 870,6 | 59,0 | 425,1 |
| 150 | 120 | 18 | 2 | 1000 | GP 5 | 847,9 | 6104,8 | 129,5 | 932,4 | 28,5 | 205,2 |
| 150 | 100 | 15 | 2 | 1000 | GP 6 | 7,3 | 43,6 | 0,0 | 0,0 | 4,2 | 25,4 |
| 120 | 100 | 12 | 2 | 1000 | GP 7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

| Flodini | | 1-Butanol, 2-methyl-, acetate | | Phenylethyl Alcohol | | Acetic acid, 2-phenylethyl ester | | | | | |
|---------------|---------------|-------------------------------|-------------------|---------------------|--------------|----------------------------------|--------------|------|-------|------|-------|
| sampling time | soaking speed | sampled volume | petri dish number | flush volume | flush volume | flush volume | flush volume | | | | |
| min | ml/min | l | pcs | ul | ul | ul | ul | | | | |
| 150 | 150 | 22,5 | 2 | 1000 | EP 4 | 34,9 | 313,8 | 0,0 | 0,0 | 14,5 | 130,9 |
| 150 | 150 | 22,5 | 2 | 1000 | EP 5 | 68,1 | 612,9 | 0,0 | 0,0 | 11,8 | 105,9 |
| 150 | 100 | 15 | 2 | 1000 | EP 6 | 271,9 | 1631,4 | 0,0 | 0,0 | 26,2 | 157,1 |
| 120 | 100 | 12 | 2 | 1000 | EP 7 | 138,6 | 831,9 | 0,0 | 0,0 | 12,0 | 71,8 |
| 150 | 125 | 18,75 | 2 | 1000 | GE 4 | 0,7 | 5,4 | 14,8 | 111,2 | | |
| 150 | 125 | 18,75 | 2 | 1000 | GE 5 | 0,9 | 6,5 | 27,9 | 209,4 | | |
| 150 | 110 | 16,5 | 2 | 1000 | GE 6 | 0,0 | 0,0 | 44,9 | 296,0 | | |
| 120 | 110 | 13,2 | 2 | 1000 | GE 7 | 0,0 | 0,0 | 22,4 | 147,6 | | |
| 150 | 120 | 18 | 2 | 1000 | GP 4 | 12,9 | 92,9 | 3,6 | 25,0 | 14,9 | 107,4 |
| 150 | 120 | 18 | 2 | 1000 | GP 5 | 2,8 | 19,9 | 10,0 | 74,0 | 10,0 | 71,8 |
| 150 | 100 | 15 | 2 | 1000 | GP 6 | 0,0 | 0,0 | 4,8 | 28,7 | 0,6 | 3,7 |
| 120 | 100 | 12 | 2 | 1000 | GP 7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

| Agar | | soaking speed | | sampled volume | | petri dish number | | flush volume | | 1-Butanol, 3-methyl- 45 ug/ml | | 1-Butanol, 2-methyl- 59 ug/ml | | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate 61 ug/ml | |
|----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|---|-------------------------|
| Sampling time min | soaking time min | soaking speed ml/min | sampled volume l | sampled volume l | petri dish number pcs | petri dish number pcs | flush volume ul | flush volume ul | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 23.1 | 138.8 | 31.8 | 190.6 | 590.0 | 3540.1 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 1 | 1000 | 19.0 | 114.1 | 36.4 | 218.2 | 901.6 | 5409.8 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 1 | 1000 | 21.9 | 131.5 | 40.4 | 242.4 | 564.3 | 3385.6 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 33.0 | 1986.2 | 150.7 | 904.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 575.3 | 3451.7 | 265.7 | 1594.1 | 44.0 | 264.1 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 603.5 | 3621.0 | 374.0 | 2213.7 | 21.4 | 128.6 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 149.0 | 893.7 | 49.4 | 295.7 | 0.9 | 5.3 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 233.0 | 1398.0 | 70.5 | 422.9 | 1.9 | 11.4 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 385.0 | 2310.0 | 100.2 | 601.0 | 3.3 | 19.7 | |

| Agar | | soaking speed | | sampled volume | | petri dish number | | flush volume | | 1-Butanol, 2-methyl-, acetate 74 ug/ml | | Phenylethyl Alcohol 92 ug/ml | | Acetic acid, 2-phenylethyl ester 104 ug/ml | |
|----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|---|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|---|-------------------------|
| Sampling time min | soaking time min | soaking speed ml/min | sampled volume l | sampled volume l | petri dish number pcs | petri dish number pcs | flush volume ul | flush volume ul | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! | m (ng/L/pcs) #DIV/0! |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 90.2 | 541.4 | 0.0 | 0.0 | 11.4 | 68.4 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 1 | 1000 | 176.4 | 1058.4 | 0.0 | 0.0 | 27.0 | 161.9 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 1 | 1000 | 215.7 | 1294.3 | 0.0 | 0.0 | 3.1 | 18.5 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 4.9 | 29.2 | 0.0 | 0.0 | 3.7 | 22.0 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 4.7 | 28.0 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 12.6 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 4.9 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 5.4 | |
| 9C | 100 | 100 | 100 | 100 | 9 | 9 | 2 | 1000 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.9 | 17.7 | |