



Česká
zemědělská
univerzita
v Praze

**Sex-specifické rozdíly v citlivosti tykadel kůrovců *Ips
typographus* na trans-4-thujanol**

Fakulta lesnická a dřevařská, Česká zemědělská univerzita v Praze

Excelentní tým pro mitigaci

Autor: Michal Neugebauer

Vedoucí práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Autor práce:	Michal Neugebauer
Studijní program:	Lesnictví
Obor:	Lesnictví
Vedoucí práce:	RNDr. Blanka Kalinová, CSc.
Garantující pracoviště:	Excelentní tým pro mitigaci
Jazyk práce:	Čeština
Název práce:	Sex-specifické rozdíly v citlivosti tykadel kůrovců <i>Ips typographus</i> na trans-4-thujanol
Název anglicky:	Sex-specific differences in antennal sensitivity of <i>Ips typographus</i> to trans-4-thujanol
Cíle práce:	Nedávná rozsáhlá srovnávací analýza antenální aktivity <i>I. typographus</i> na též látky uvolňované smrkem za různých fyziologických podmínek odhalila několik nových velmi aktivních sloučenin, které jsou ve smrkových emanacích přítomny v relativně malém množství. Jednou z nich je (+) - trans-4-thujanol, látka, jehož koncentrace je výrazně vyšší u mladých stromů a snižuje se s jejich narůstajícím stářím. Údaje z terénních experimentů ukazují, že (+) trans-4-thujanol působí jako anti-atraktant, tj. snižuje atraktivitu agregačního feromonu kůrovců pro obě pohlaví. Samice se zdají být k působení (+) - trans-4-thujanol více citlivé než samci. Odlišná reakce samců a samic na (+) - trans-4-thujanol je překvapivá. Funkční (evoluční) důvod rozdílné reakce není jasný, ale můžeme například spekulovat, že pro samice může být (+) - trans-4-thujanol představovat informaci o nevhodnosti hostitelského stromu pro úspěšný vývoj potomstva. Thujanol je také součástí agregačního feromonu sympatrického druhu <i>Polygraphus poligraphus</i> a byl nalezen také u <i>Ips amitinus</i> . K objasnění způsobu, jakým (+) - trans-4-thujanol ovlivňuje chování <i>Ips typographus</i> , je potřeba nových experimentů. Navrhovaná práce je prvním z nich. Cílem práce je zjistit, zda u kůrovce <i>I. typographus</i> existují rozdíly v citlivosti tykadel mezi pohlavími k (+) - trans-4-thujanolu. Experimenty budou provedeny pomocí elektrofyziologického záznamu antenální aktivity (EAG). Účinnosti (+) - trans-4-thujanolu bude porovnána s dalšími známými anti-atraktanty jako je verbenon a 1,8-cineol.
Metodika:	Citlivost tykadel bude porovnávána pomocí záznamu elektrické aktivity (EAG) vyvolané čichovou stimulací Etapy práce: 1. V-VI.2021: literární rešerše 2. VI-VII. 2021: seznámení se s metodikami 3. VIII. - XII: experimenty - elektrofyziologická analýza 5. 1. - II. 2022 - Vyhodnocení a zpracování dat 7. II. - III 2022 - Sepsání a odevzdání práce
Doporučený rozsah práce:	30-40
Klíčová slova:	<i>Ips typographus</i> , EAG, trans-thujanol

Doporučené zdroje informací:

1. Blanka Kalinová, Radka Brizova, Milos Knížek, Marek Turčáni, Michal Hoskovec Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions* (2014) 8:305–316 DOI 10.1007/s11829-014-9310-7
2. Blazyte-Cereskiene, Laima, Apsegaite, Violeta, Radziute, Sandra, Mozuraitis, Raimondas, Buda, Vincas & Pečiulytė, Dalė. (2015). Electrophysiological and behavioural responses of *Ips typographus* (L.) to trans-4-thujanol—a host tree volatile compound. *Annals of Forest Science*. 73. 10.1007/s13595-015-0494-5.
3. Francke, Wittko & Dettner, Konrad. (2005). Chemical Signalling in Beetles. Chapter in *Topics in current chemistry*. 10.1007/b98316.
4. Christian Schiebe, Rikard Unelius, Suresh Ganji, Muhammad Binyameen, Göran Birgersson, Fredrik Schlyter 2019. Styrene, (+)-trans-(1R,4S,5S)-4-Thujanol and Oxygenated Monoterpenes Related to Host Stress Elicit Strong Electrophysiological Responses in the Bark Beetle *Ips typographus* *Journal of Chemical Ecology* (2019) 45:474–489 <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01070-8>
5. Jirošová et al., 2021. Anti-attractant activity of the host tree volatile (+)-trans-4-thujanol for European spruce bark beetle *Ips typographus*: Novel potency form females 2021. Submitted to *Pest Management Science*.
6. Kandasamy et al., 2019. Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *PMC6775991* 14. doi: 10.1038/s41396-019-0390-3
7. M. N. Andersson 2012 Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application, *Psyche* Volume 2012, Article ID 149572, 14 pages doi:10.1155/2012/149572
8. Raffa, K.F. Andersson M.N. and Schlyter, F. Host Selection by Bark Beetles: Playing the Odds in a High-Stakes Game. In: Claus Tittiger and Gary J. Blomquist, editors, *Advances in Insect Physiology*, Vol. 50, Oxford: Academic Press, 2016, pp. 1-74. ISBN: 978-0-12-802723-3

Předběžný termín obhajoby: 2021/22 LS - FLD

Konzultant: Ing. Jaromír Hradecký, PhD

Elektronicky schváleno: 18. 2. 2022
prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.
Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno: 1. 3. 2022
prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.
Děkan

Čestné prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem práci na téma Sex-specifické rozdíly v citlivosti tykadel kůrovců *Ips typographus* na *trans-4-thujanol* vypracoval sám pod vedením RNDr. Blanky Kalinové CSc. Veškerá literatura, ze které jsem čerpal je řádně citovaná v závěru práce.

Zároveň souhlasím, že s publikováním práce rovněž souhlasím s jejím uveřejněním v souladu se zákonem 111/1998 Sb. o vysokých školách a to bez ohledu na výsledek její obhajoby

V Praze dne:

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl velice poděkovat RNDr. Blance Kalinové CSs. za nekonečnou trpělivost při konzultacích bakalářské práce, za cenné informace, které mi k tématu poskytla a za ochotnou pomoc na cestě za finální podobou této práce. Ing. Jaromírovi Bláhovi bych chtěl poděkovat za praktickou pomoc při seznamování s laboratoří a obecnými postupy při měření stejně tak jako za poskytnutí lýkožroutů smrkových z jeho chovů. Ing. Jaromírovi Hradeckému PhD. bych chtěl poděkovat za pomoc v chemické laboratoří. Dále bych chtěl poděkovat fakultě za možnost studovat a provádět výzkum na její půdě. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, bez kterých by studium s takovýmto nasazením nebylo možné.

Abstrakt

V této práci proběhla analýza sex-specifických rozdílů vybraných chemických látek, pomocí elektrofyziologické metody zvané elektroantenogram (EAG). Měření proběhlo na lýkožroutu smrkovém (*Ips typographus*). Měření EAG odpovědi proběhlo u látky *trans*-4-thujanol a 1,8-cineol. Obě tyto látky řadíme mezi monoterpeny, které se přirozeně vyskytují u smrku ztepilého (*Picea abies*) v pryskyřici. V předcházejících experimentech bylo zjištěno, že mají tyto látky inhibiční efekt na atraktivitu dvousložkového agregačního feromonu. EAG pokusy odhalily, že jsou obě tyto látky tykadly lýkožrouta smrkového vnímány samci i samicemi. Hodnoty prahových koncentrací zkoumaných látek, které vyvolávaly první EAG odpovědi se mírně lišily pro obě pohlaví u *trans*-4-thujanolu, zatímco prahové odpovědi samců a samic pro 1,8-cineol byly podobné. S rostoucí koncentrací látek nad prahové hodnoty rostly rovněž EAG odpovědi. Saturační hodnoty (to je koncentrace, která již nevyvolává zvýšení EAG odpovědi v porovnání s předcházejícím stimulem) byly pozorovány pouze u samic reagujících na 1,8-cineol, který v porovnání s *trans*-4-thujanolem byl více tykadlově aktivní. Výsledky jsou diskutovány k inhibiční aktivitě studovaných látek na atraktivitu agregačního feromonu *Ips typographus* (*cis*-verbenol, 2-methyl-3-buten-2-ol)

Abstract

In this study we analyzed olfactory activity of *trans*-4-thujanol and 1,8-cineol. Two chemicals that were proved to have inhibitory effect on the attractiveness of aggregation pheromone in bark beetles (*Ips typographus*). In the study, we used electrophysiological technique called electroantennogram. EAG, to determine sex specific differences in olfactory perception (resp. In EAG reactions) to these two compounds. *Trans*-4-thujanol and 1,8-cineol are monoterpenes naturally present in the resin of norway spruce (*Picea abies*). Both chemicals elicited EAG responses in bark beetles antennae that were dependent on the dose. The analysis of EAG dose-responses curves revealed slightly different thresholds values for *trans*-4-thujanol for females than males. However the slope of EAG dose-response curves for both males and females were similar. The thresholds for EAG responses for 1,8-cineol were not significantly different for both males and females as well as slopes of EAG dose-response curves. The saturation value for EAG responses (concentration that does not elicit higher EAG response in comparison with the previous value) was found only for 1,8-cineol in females. The EAG response on both chemicals was growing with growing concentration. Our data show that that 1,8-cineol is EAG more active in comparison with *trans*-4-thujanol. The data are discussed in relation to their inhibitory activity on attractiveness of aggregation pheromone (*cis*-verbenol and 2-methyl-3-buten-2-ol).

Klíčová slova

EAG (elektroantenografie), lýkožrout smrkový (*Ips typographus*), *trans*-4-thujanol, 1,8-cineol, GC-FID (plynová chromatografie s plameno-ionizačním detektorem)

Key words

EAG (electroantennography), bark beetle (*Ips typographus*), *trans*-4-thujanol, 1,8-cineol, GC-FID (Gas coupled with photoionization detector)

Obsah

Úvod.....	14
Kůrovci.....	15
1.1 Taxonomie lýkožrouta smrkového.....	15
1.2 Kalamitní škůdci v České republice.....	15
1.3 Taxonomická determinace vybraných relevantních kůrovcových organismů.....	17
1.4 Způsob kolonizace hostitele u lýkožrouta smrkového.....	19
1.5 Možnost identifikace napadených jedinců smrku ztepilého.....	20
1.6 Obranná opatření proti kůrovcům.....	20
Chemická komunikace u kůrovců.....	23
2.1 Orientace kůrovců v prostředí.....	23
2.2 Čichový orgán kůrovců pro příjem látek.....	23
2.3. Významné chemické látky při chemické komunikaci.....	27
2.3.1 <i>Trans</i> -4-thujanol.....	29
2.3.2 1,8-cineol.....	30
2.4 Pryskyřice.....	32
Metodika.....	33
3. Teoretická část	
3.1 Obecné informace.....	33
3.2 Elektrody.....	35
3.3 Možnosti přípravy tykadel.....	35
3.4 Metoda stimulace.....	36
3.5 Plynový chromatograf (GC).....	37
3.6 Mass spektrometry.....	38
3.7 Elektrofyzilogický záznam z jednotlivých čichových senzil (Single-sensila recording = SSR).....	38

4. Praktická část	
4.1 Příprava látek.....	39
4.2 Příprava zásobníků pro měření.....	40
4.3 Výběr standardu.....	41
4.4 Příprava elektro-anteno grafu (EAG).....	42
4.5 Zkoumaní jedinci lýkožrouta smrkového.....	44
4.6 Příprava zkoumaného <i>Ips typographus</i> pro měření.....	45
4.7 Samotná stimulace kůrovce.....	46
4.8 Měřicí protokol.....	47
4.9 Vyhodnocovací software.....	48
4.10 Statistické vyhodnocení.....	48
Výsledky.....	50
5.1 Ověření čistoty látek.....	50
5.1.1 Ověření čistoty <i>trans</i> -4-thujanolu metodou GC-FID.....	50
5.1.2 Ověření čistoty 1,8-cineolu metodou GC- FID.....	51
5.2 Prahové hodnoty pro <i>trans</i> -4-thujanol a 1,8-cineol.....	52
5.3 Statistická analýza korelace mezi koncentrací látky a zvyšující se EAG odpovědi.....	57
5.4 Sex-specifické rozdíly.....	59
5.5 Rozdíly ve vnímání <i>trans</i> -4-thujanolu a 1,8-cineolu.....	61
Diskuse.....	64
Závěr.....	67
Seznam zdrojů.....	68
Přílohy.....	74

Seznam tabulek

Tabulka 1. GC-FID analýza čistoty trans-4-thujanolu.....	51
Tabulka 2. GC-FID analýza čistoty 1,8-cineolu.....	52
Tabulka 3. <i>Trans</i> -4-thujanol.....	53
Tabulka 4. 1,8-cineol.....	53

Seznam grafů

Graf 1 – výběr vhodného standardu.....	42
Graf 2 – Detail GC-MS analýzy <i>trans</i> -4-thujanolu	50
Graf 3 – Detail GC-MS analýzy <i>1,8-cineolu</i>	51
Graf 4. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro <i>trans</i> -4-thujanol – samci... 54	
Graf 5. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro <i>trans</i> -4-thujanol – samice..55	
Graf 6. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro 1,8-cineol – samci.....55	
Graf 7. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro 1,8-cineol – samice.....56	
Graf 8. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u <i>trans</i> -4-thujanolu – samci.....57	
Graf 9. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u <i>trans</i> -4-thujanolu – samice.....58	
Graf 10. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u 1,8-cineolu – samice.....58	
Graf 11. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u 1,8-cineolu – samci.....59	
Graf 12. Sex specifické rozdíly ve vnímání <i>trans</i> -4-thujanolu.....60	
Graf 13. Sex specifické rozdíly ve vnímání 1,8-cineolu.....60	
Graf 14. Rozdíly ve vnímání <i>trans</i> -4-thujanolu a 1,8-cineolu u samců.....62	
Graf 15. Rozdíly ve vnímání <i>trans</i> -4-thujanolu a 1,8-cineolu u samic.....62	

Seznam obrázků

Obrázek 1. Kůrovci v kontextu smrku ztepilého.....	18
Obrázek 2. Rozmístění senzil na tykadle.....	26
Obrázek 3. Strukturní vzorec <i>trans</i> -4-thujanolu.....	30
Obrázek 4. Strukturální vzorec 1,8-cineolu.....	31
Obrázek 5. GC-MS soustava pro měření čichových odpovědí.....	34
Obrázek 6. Propojení elektrody s předzesilovačem.....	35
Obrázek 7. Kompletní zásobníček s měřenou látkou.....	41
Obrázek 8. Elektroantenograf (EAG).....	43
Obrázek 9. Detail fixované hlavy lýkožrouta smrkového.....	46
Obrázek 10: Příklad vývoje EAG odpovědi s rostoucí koncentrací.....	47
Obrázek 11. Detail topící jednotky, převodníku a generátoru vzduchových pulzů.....	74
Obrázek 12. Vertikální teplotní tahač elektrod PC-100 Narishige	75
Obrázek 13. Zahřívací ústrojí pro skleněné vialky ThermoShaker, Biosan.....	76
Obrázek 14. Plynový chromatograf.....	77
Obrázek 15. Detail předzesilovače na EAG.....	78
Obrázek 16. Detail EAG překrytého Faradayovou klecí.....	78

Úvod

Na území České republiky byl v posledních letech zaznamenán trend změny klimatu. To s sebou nese řadu změn. Vyšší průměrné roční teploty v kombinaci s nerovnoměrnou distribucí srážek způsobují vysoušení podzemních vod. To je následně limitujícím faktorem pro celou řadu organismů. Největší dopad v našich podmínkách má tato souhra klimatických podmínek na smrk ztepilý (*Picea abies*). Smrk ztepilý je u nás nejzastoupenější dřevinou a má pro ekonomiku neopomenutelný hospodářský význam. Oslabení kondice smrku na stanovištích, kde by se přirozeně nevyskytoval, vede k ekonomickým ztrátám. Slabí jedinci totiž ztrácí schopnost odolávat biotickým činitelům (kůrovcům), kteří z této situace benefítují. Cílem této práce jsou lýkožrouti smrkoví (*Ips typographus*) a chemická komunikace na jejímž základě identifikují hostitelské stromy. Smrky vypouštějí do ovzduší celou řadu látek, které se kůrovci naučili přijímat a na jejich základě činit rozhodnutí o výběru jedince, který představuje dostatečné potravní možnosti a tudíž umožní úspěšnou reprodukci druhu. Tato práce je rovněž zaměřena na rozdíly ve vnímání mezi pohlavím u lýkožrouta smrkového, jelikož je strategie pro osidlování rozdílná pro samce a samice. Další snahou je zařadit relevanci *trans-4-thujanolu* v systému, porovnáním s látkou, jejíž behaviorální účinky jsou pro kůrovce již známy. Studie podobného zaměření by mohly mít vliv na integrovanou ochranu proti hmyzím škůdcům, jelikož bychom na základě užití látek, pro ně behaviorálně aktivních, mohli usměrňovat směr jejich migrace, a tak ovlivňovat jejich dynamiku. Tím bychom mohli ochránit porosty, pro nás, významných dřevin.

Kůrovci

1.1 Taxonomie lýkožrouta smrkového

Kůrovce řadíme do třídy *Insecta* (hmyz), podtřídy *Pterygota* (křídlatí), řád *Coleoptera* (brouci), podřád *Polyphaga* (všežraví), čeleď *Curculionidae* (nosatcovití), podčeleď *Scolytinae* (kůrovcovití), rod *Ips* (lýkožrout), druh *typographus* (smrkový)

1.2 Kalamitní škůdci v České republice

Kalamitní škůdce v České republice a postupy při jejich prevenci a asanaci blíže specifikuje vyhláška číslo 76/2018 Sb., která doplňuje nadřazený zákon o lesích (lesní zákon) 289/1995 Sb. Kalamitní stav je stav populační hustoty škůdce, při němž dochází ke vzniku hospodářsky významných škod na lesních porostech, ohrožení plnění funkcí lesa nebo rozvrácení lesních porostů. (76/2018 Sb.) Mezi kalamitní škůdce je řazena celá řada druhů. Patří sem například zástupci blanokřídlého hmyzu – ploskohřbetky z rodu *Cephalcia* a obaleč modřinový (*Zeiraphera griseana*), zástupci řádu motýlů – bekyně mniška (*Lymantria monacha*) a zástupci brouků – klikoroh borový (*Hylobius abietis*), lýkožrout smrkový (*Ips typographus*), lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) a lýkožrout lesklý (*Pityogenes chalkographus*). Všechny tyto organismy řadíme mezi kalamitní, protože jsou schopné způsobit holožír. Důležité je zmínit, že všechny tyto organismy parazitují na jehličnanech. Důvodem absence živočichů živících se na listnatých jedincích je ten, že zde nemají tak destruktivní účinky. Listnaté stromy jsou schopny výměny asimilačních orgánů během roku, takže to ve většině případech pouze zpomalí jejich dynamiku pro rok, kdy byly napadeny. Nejvýznamnějším kalamitním škůdcem u nás je rozhodně lýkožrout smrkový (*Ips typographus*).

Míra vlivu těchto škodlivých organismů je interpretována podílem nahodilé těžby v poměru k těžbě celkové, protože se do tohoto druhu těžby řadí i kůrovcem napadené dřevo (mimo zpracování živelného dřeva, jako třeba polomů způsobených větrem). Celková těžba za rok 2020 byla 35,75 milionů m³ dřeva, z čehož nahodilá představovalo 33,91 milionů m³. Důležitým ukazatelem je to, že jehličnatá těžba představovala 96,5 %, což odpovídá hodnotě 34,49 milionů m³ dřeva (Ministerstvo zemědělství, 2020). Tato hodnota reflektuje stav lesů v České republice, kdy z celkové plochy lesů jehličnany zaujímají 70,4 %. Z toho pouze smrk ztepilý (*Picea abies*) 48,8 %, což je výrazný pokles

oproti předchozím letům. (Ministerstvo zemědělství, 2020). Například v roce 2000 smrk rostl na 54,1 % z celkové rozlohy lesů. Jak z dat tedy patrně vyplývá, nejvíce relevantním hostitelem v našich podmínkách je pro kůrovce smrk ztepilý, a to z důvodu významného zastoupení, což s sebou nese vysoké ekonomické ztráty. Kombinace nižšího úhrnu srážek a vyšších průměrných teplot vedla k rychlému nárůstu populací podkorního hmyzu. Například v letech 2014 představovala nahodilá hmyzová těžba 1,13 mil. m³. Počátkem roku 2015 již tato hodnota byla dvojnásobná (2,31 mil. m³), což je období výraznější změny klimatu a od té doby hmyzová nahodilá těžba pouze stoupá. V roce 2020, což jsou nejaktuálnější data, tato hodnota představuje neuvěřitelných 26,24 mil. m³, což je oproti průměrným hodnotám mezi 1-2 mil. obrovský nárůst (Ministerstvo zemědělství, 2020).

Aktuální kůrovcová kalamita je způsobena celou řadou faktorů. Mezi nejvýznamnější patří klimatická změna. Na našem území je možné pozorovat konzistentní nárůst průměrných ročních teplot v kombinaci s mírným trendem poklesu ročního úhrnu srážek u kterých je navíc problém, že se jejich depozice začala koncentrovat do období vegetačního klidu. (ČHMU pro MŽP, 2020) Druhým podstatným faktorem je zavlečení smrku, který je zvyklý na horské podmínky (vyšší úhrny srážek, nižší teploty), do oblastí, kde tyto podmínky nenachází. Jedná se o oblasti planární – kolinní stupeň (volněji přeloženo nížiny – pahorkatiny). Zde je smrk ztepilý schopný enormních přírůstků, ale za cenu nízké stability porostů. Zahradník a knížek, 2007 uvádí, že vlivem vysoké teploty v nížinách je *Ips typographus* schopný vyvést 2 (v ojediněle teplých letech 3) generace potomstva a jak bude uvedeno v kapitole 1.4, počet napadených jedinců roste v exponenciální posloupnosti, tudíž dochází k extrémnímu množení. Dalším, pro smrky, nepříznivým faktorem je monokulturní způsob hospodaření, který v naší zemi doposud převládal. Jelikož byla hlavním cílem lesa produkce biomasy, která se následně dá zpeněžit, tak dnes máme porosty, které se skládají pouze z jednoho druhu dřeviny. V tomto případě smrku ztepilého. To s sebou samozřejmě nese možnost jednoduchého způsobu obživy pro jedince, kteří ho mají ve svém jídelníčku. „Monokulturní lesy představují pro kůrovce prostřené stoly“. Když se tedy dají všechny faktory dohromady, tak z toho vyplývá, že má kůrovec ideální podmínky pro páchání škod na porostech České republiky. Důležité je zmínit, že v přírodě to není tak, že by byl kůrovec spojený pouze se smrkem ztepilým. Většina nám známých stromů má svého kůrovce, ale problém je majoritní zastoupení stromů stejného druhu, což způsobilo namnožení populací, které tento druh hostitele zvládnou likvidovat. Na druhou stranu je důležité zmínit, že

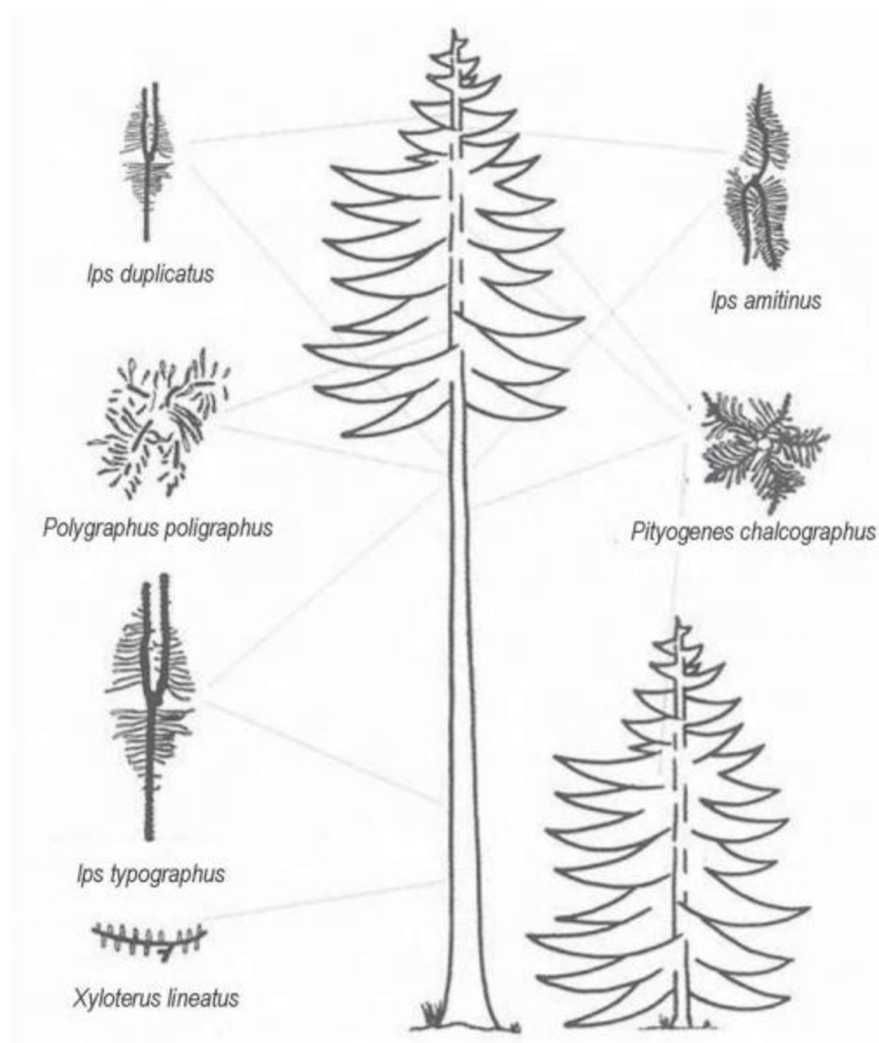
v přirozeně se vyvíjejícím lesním společenstvu má kůrovec nenahraditelnou funkci. Kůrovci byli v přírodě přítomni vždy a jejich primární role je napadání raněných či oslabených stromů. To se v přírodě často pojí s nějakou disturbancí. Disturbance je plošné narušení porostu na určitém území. V praxi si to můžeme představit jako větrnou kalamitu, což kůrovci zpřístupní velké množství zdrojů pro jeho obživu. Tento vztah je ale akceptovatelný, protože se většinou brouk omezil pouze na narušené porosty.

1.3 Taxonomická determinace vybraných relevantních kůrovcových organismů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, mezi kalamitní druhy kůrovců řadíme *Ips typographus*, *Ips duplicatus* a *Pityogenes chalcographus*, těm bude věnována pozornost v této kapitole, ale výčet druhů bude rozšířen ještě o *Ips amitinus*, *Polygraphus poligraphus* a *Pityophthorus pityographus* (lýkožrout menší, lýkohub matný a lýkožrout obecný), jelikož to jsou další z druhů, které se u nás běžně na smrku vyskytují. Správná a včasná determinace druhů je důležitá zejména při volbě obranných opatření. Určení druhu je možné dvěma základními způsoby. Podle požerků a podle morfologie brouka. Požerek je struktura, kterou kůrovec vytvoří pod kůrou. Jedná se o snubní komůrku, matečné chodbičky, vaječné důlky, larvální chodby a případně úživný žír. *Ips typographus* je z vyčtených druhů největší. Knížek a Zahradník, 2007 uvádí, že dospělec dosahuje délky 4-5,5 mm. Tomu jsou přizpůsobené i matečné chodbičky. Jedná se o rovné, delší struktury tunelovitého tvaru, kterých většinou ze snubní komůrky vede 2-3, což odpovídá počtu samic, se kterými se páří a jejich průměr je poměrně větší (ve srovnání s *Ips duplicatus*, s jehož požerky by se dal zaměnit). Na tykadlové paličce je viditelná vlnka. Na konci krovek má tento druh 4 výběžky, přičemž 3. zoubek vybíhá do tvaru srdíčka. *Ips duplicatus* má na konci krovek výběžky rovněž 4, ale 2. a 3. je na pohled srostlý, textura na tykadlové paličce je rovněž zvlněna a druh je výrazně menší. Dorůstá délky max 4 mm. Požerek vypadá podobně jako u lýkožrouta smrkového, liší se pouze v šířce matečných chodeb (Holuša a kol., 2006). *Ips amitinus* je druh, který má rovnou čárku na tykadlové paličce. Jeho požerek je již poněkud chaotičtější, matečné chodbičky jsou zvlněné, a tudíž se dají odlišit od předchozích druhů (Lubojacký, 2012). Požerek *Pityogenes chalcographus* připomíná tvar hvězdy, ale snubní komůrka nebude téměř nikdy vidět, protože ji tvoří téměř u povrchu kůry (nezasahuje do běle). Tento druh je na první pohled velmi malý, dorůstá cca 2,5 mm (Zahradník, 2007). *Pityophthorus*

pityographus dorůstá podobných rozměrů jako lýkožrout lesklý, ale dá se dobře rozlišit podle požerku, jelikož tento druh hloubí snubní komůrku hluboko, takže ji budeme moci na běli nalézt (Horák, 2005). Požerek druhu *Polygraphus poligraphus* je velmi chaotický, nelze v něm nalézt nějakou pravidelnou strukturu. Tento druh dorůstá rozměrů 1,8-3,5 mm (Knížek a Zahradník, 2004). Při hrubé orientaci může lesníkům pomoci část napadeného kmene. Zatímco lýkožrout smrkový napadá spíše část kmene od špičky stromu dolů (souvisí to s tím, že potřebuje dostatečně široké lýko vzhledem k jeho velikosti), lýkožrout severský hospodaří spíše v koruně stromu. V koruně zvládne operovat i lýkožrout menší, kterého ale lze poměrně snadno rozeznat podle požerků a morfologie. Lýkožrout lesklý naopak zvládne obhospodařovat i mladé lesní porosty vzhledem k jeho rozměrům. *Pityophthorus pityographus* (podle starší české nomenklatury haluzovec obecný) často operuje pouze ve větvích, případně na klestu.

Obrázek 1. Kůrovci v kontextu smrku ztepilého



Zdroj: *Zpravodaj ochrany lesa* [online]. LS Bruntál LČR, s. p.: Holuša J., Voigtová P., Kula E., Křístek Š, 2006 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: https://www.vulhm.cz/files/uploads/2019/12/2006_ZOL_13_IDu.pdf

1.4 Způsob kolonizace hostitele u lýkožrouta smrkového

Mezi primární hostitele lýkožrouta smrkového v našich podmínkách patří *Picea abies*. V Asii se tento druh soustředí na *Picea orientalis* a *Picea yezoensis*. Ojedinele se může vyskytovat i na borovici a jedli. (*Data sheets on quarantine pests Ips typographus*) U *Ips typographus* provádí kolonizaci hostitele samec. Tento vyhledá vhodného jedince (smrk ztepilý) na základě vnímání hostitelských látek (např. α -pinene) – chemická komunikace. (Saint Germain, a kol., 2007). Po dosednutí na kůru vyhledá vhodné místo, kde by se mohl prokousat do lýka. Když se mu to podaří a nebude zlikvidován ochrannými mechanismy smrku (zalit pryskyřicí), tak zde vykouše snubní komůrku. Lýko, které konzumuje, tak prochází jeho trávicím traktem a vychází v podobě drtinek. Ty obsahují agregační feromony, které se vytváří v trávicím traktu a malpighických trubcích uvnitř kůrovce (Ramakrishan a kol., 2022). Agregační feromon je složen ze dvou hlavních složek 2-methyl-3-buten-2-olu a *cis*-verbenolu (Bakke a kol., 1977b; Birgersson a kol., 1984; Schlyter a kol., 1987). Tyto následně lákají samičky, se kterými se bude moci pářit, ale evokují i kladný signál pro samce, kterým naznačuje, že se pionýrskému jedinci podařilo najít vhodného hostitele. Po dosažení maximální disponibilní kapacity hostitelského stromu kůrovci, začnou být do prostoru uvolňovány antiatraktanty, jako ipsenol a verbenon (Bakke, 1981; Schlyter, 1989), které do prostoru signalizují, že je již dosažena maximální kapacita hostitelského stromu. Poté, co se k samci přidá samička/y, tak začíná hloubit mateční chodbičku, která vede podélně s osou kmene. Při tomto procesu jsou drtinky vyhazovány ven náletovým závrttem. Samička je ve snubní komůrce oplodněna samečkem a vydává se naklást vajíčko do předem připraveného vaječného důlku. Vajíčka jsou kladena postupně v matečné chodbičce a na jednu samičku připadá až 60 kusů (Knížek a Zahradník, 2007). Vaječný důlek je následně překryt vrstvičkou drtinek, aby byla zvýšena šance jeho přežití. Po dokončení vývoje vajíčka vznikne larvička, která hloubí larvální chodbu (kolmo na matečnou chodbičku), čímž přijímá potravu a přibližuje se k vyvinutí do dospělého jedince. Celkem larvy prochází 3 instary (Knížek a Zahradník, 2007). Problémem této části vývoje je, že larvální chodby vznikají kolmo na matečnou chodbu, takže je přerušen rozvod asimilačních látek, který probíhá

v lýku, čímž hostitelský strom většinou zcela zahubí. Na konci 3. instaru larvy vytváří kukelní komůrku, kde dojde k poslednímu vývoji – kuklení. Následně vznikají první pohybliví brouci, kteří ještě před opuštěním hostitele provádí úživný žír, aby nabrali sílu. Nakonec strom opustí a vydají se hledat nové hostitele, aby zvětšili svou populaci.

1.5 Možnost identifikace napadených jedinců smrku ztepilého

Důležitým úkolem lesníka je vyhledání a asanace stromů, které obsahují kůrovce. Důležitého významu to nabývá hlavně kvůli tomu, že počet nově napadených jedinců roste v exponenciální řadě. Z jednoho zapomenutého stromu hrozí nebezpečí 7-10 dalším. Na kolonizaci nového jedince je potřeba cca 500-1500 imag, podle průměru stromu. Když vezmeme v potaz, že 1 samička zplodí 60 nových jedinců, tak při poměru 1:2 vznikne kolem 6000 nových jedinců z 1 zapomenutého stromu (přednáška z ochrany lesa, Holuša, 2022). Lokalizace napadených jedinců probíhá hlavně v období rojení, jarní – přelom dubna a května, letní – polovina června až konec srpna (Zahradník, Knížek, 2007). Odhalení kůrovci napadených jedinců smrku ztepilého vyžaduje praxi. Jsou zde jasné identifikátory, které nám kůrovce pomáhají odhalit. Mezi ně patří například přítomnost drtinek, závrtočných otvorů, enormní smolení poškozeného stromu, změna barvy asimilačního aparátu a v posledních fázích odlupčivost kůry (Lubojacký a kol., 2019). Alternativní metodou, která zatím nemá v našich podmínkách velké nasazení je lokalizace stromů za pomoci vycvičených psů. Tito jsou naučeni rozpoznávat složky agregačního feromonu kůrovců a díky tomu jsou schopni napadený strom nalézt (Johansson a kol., 2018). Náchylné jsou především porosty starší 60 let, kterým by měla být věnována důkladnější péče, ale v době, kdy je lýkožrout takto přemnožen můžou být poškozovány i porosty mladší. (Zahradník P., Geráková M., 2010)

1.6 Obranná opatření proti kůrovcům

Nejúčinnější ochranou porostů je včasná lokalizace napadeného jedince a jeho urychlená asanace. K chemickému ošetření používáme látky, které jsou povoleny Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělství (ÚKZUS), pro lesnictví doplněný Výzkumným ústavem lesního hospodářství a myslivost (VÚLHM). Do konce roku 2021 to byly přípravky s účinnou látkou α -cypermetrin, který je od roku 2022 zakázaný

z důvodu nežádoucího vlivu na okolní prostředí (eagri.cz – registr přípravků na ochranu rostlin, 2022). Jeden z hlavních problémů je ten, že použitím insekticidního přípravku hubíme rovněž přirozeně se vyskytující predátory nežádoucího druhu. Predátor lýkožrouta smrkového je například pestrokrovečník (*Thanasimus formicarius*, *Thanasimus femoralis*) (Zahradník, Knížek, 2007), predátorem lýkožrouta lesklého je například kornatec dlouhý (*Nemozoma elongatum*) (Zahradník, Zahradníková, 2020). Od roku 2022 je možné používat třeba lesnický přípravek Forester, který nese účinnou látku cypermetrin, která zatím nepatří mezi zakázané. (internetový portál ÚKZÚS – přípravky na ochranu rostlin) Účinná látka se následně ředí s nosičem a přidává se scolycid-C, který zlepšil odolnost proti přírodním podmínkám a ošetřené dřevo barevně odlišil pro přehlednost. Napadení porostů je možno předcházet. Vyhláška 76/2018 nám ukládá v povinnost rozmisťovat obranná opatření v souvislosti s velikostí populace kůrovce. Počty obranných opatření jsou určeny podle toho, je-li stav škodlivého organismu nízký, zvýšený nebo kalamitní (vyhláška 76/2018 Sb.). Základní stav je takový početní stav lýkožroutů, kdy objem kůrovcového dříví z předchozího roku v průměru nedosáhl 1 m³ na 5 ha smrkových porostů a nedošlo k vytvoření ohnisek výskytu lýkožrouta. Zvýšený stav je takový početní stav lýkožroutů, kdy objem kůrovcového dříví z předchozího roku v průměru dosáhl nebo překročil 1 m³ na 5 ha a zároveň nepřekročil 5 m³ na 5 ha smrkových porostů anebo došlo k vytvoření ohnisek výskytu lýkožrouta smrkového. Tento stav upozorňuje na možnost kalamitního přemnožení. Kalamitní stav je takový početní stav lýkožroutů, kdy objem kůrovcového dříví z předchozího roku v průměru dosáhl nebo překročil 5 m³ na 5 ha smrkových porostů, a který způsobuje rozsáhlá poškození lesních porostů na stěnách nebo vznik ohnisek uvnitř lesních porostů až plošné napadení lesních porostů. (Příloha číslo 2, vyhláška 76/2018 Sb.) Dříví je možné chránit i na skládkách. Například do konce roku 2022 se používaly plachty napuštěné α -cypermetrinem, které zahubily brouky, kteří by se pokusili z kmenů vylétnout. Tyto se nazývají storanet.

Vyhláška 76/2018 Sb. definuje obranné opatření. Těmito se v lese rozumí lapáky, lapače, otrávené trojnožky, aj. Lapák je kmen z pokáceného stromu, přes který je nejčastěji přehozený klest. Takovýto prvek přirozeně uvolňuje těkavé látky, které lákají hostitele, který k nim má vyvinuté smyslové ústrojí. Pokácený kmen musí být odvezen včas, předtím, nežli kůrvec vyletí. Lapák případně může být obohacen o kontaktní insekticid,

který by kůrovce zahubil. Problém nastává u *Ips duplicatus*, pro kterého lapáky nejsou dostatečně atraktivní a tudíž na ně nenalétá (Knížek a Holuša, 2007). Lapače jsou lapací zařízení, které vnaří kůrovce, nejčastěji prostřednictvím agregačních feromonů. V praxi jsou nejčastěji používané lapače typu Theysohn, Ecotrap nebo Multivit. Polapení jedinci v nádobce mohou být hubeni prostým zalitím vodou, lihem nebo jinou tekutinou. Problém nastává u *Ips amitinus*, pro kterého není dosud nalezena optimální kombinace atraktantů, tudíž není ideální způsob jeho lákání do lapačů (Lubojacký, 2012). Otrávené trojnožky fungují na principu kombinace lapačů a lapáků. Z dřeviny, která je cílovou pro škůdce, se vytvoří konstrukce tvaru A, obohatí se o odparník s feromonem lákajícím kůrovce a celý prvek se ošetří kontaktním insekticidem. Je důležité provádět evidenci početních stavů a zároveň určovat kůrovce do druhu. Ze stavu populace z předcházejícího roku je následně vyhodnoceno potřebné množství ochranných pomůcek.

Chemická komunikace u kůrovců

2.1 Orientace kůrovců v prostředí

Kůrovec při hledání nového hostitelského stromu musí učinit celou řadu rozhodnutí, na kterých závisí jeho reprodukční úspěšnost. Lýkožrout smrkový patří mezi polygamní druhy, což znamená, že hledání vhodného jedince k osídlení připadá samečkovi, tudíž jeho rozhodnutí z velké části ovlivní úspěch celé populace (Zahradník a Knížek, 2007; Kalinová a kol., 2014). Tito využívají k orientaci zrak, chuť a čich. Zrakové schopnosti těchto jedinců jsou na velice nízké úrovni, ve své podstatě jediné, co jim tento vjem umožní, je rozeznání siluety porostu a na bližší vzdálenost případně identifikovat jednotlivého hostitele (Byers, 1995). Nejpodstatnější ze zmíněných je rozhodně čich, pro který má tento organismus řadu adaptací. (viz. kapitola 2.2) Na uceleném chemickém obrazu o prostředí má zásluhu celá řada látek. Tyto můžeme rozdělit na látky neutrální, atraktanty a repelenty (Andersson, 2011). Atraktanty mohou být vylučovány hostitelem, brouky nebo symbiotickými houbami kůrovců a lákají lýkožrouty na místo, odkud se uvolňují. Repelenty, případně inhibitory vylučují nehostitelské druhy organismů. Těmi jsou pro lýkožrouty smrkové jehličnany (blíže specifikováno v kapitole 2.3). Kombinace atraktantů a inhibitorů podmiňuje další kroky, které brouk musí podniknout, aby lokalizoval vhodného hostitele a zajistil přežití druhu. Existují 2 základní teorie vysvětlující princip výběru hostitele u *Ips typographus*. 1. hovoří o tom, že samci provádí pionýrský let, při kterém brouk analyzuje hostitelské vůně (tzv. primární atraktanty). Soudí se, že složení a poměr těchto látek vypovídá o vitálním stavu hostitelského jedince. Na základě chemické komunikace je tedy možné lokalizovat organismus, který bude sloužit jako ideální zdroj obživy pro kůrovce. 2. teorie hovoří o tom, že nálet na nové stromy probíhá náhodně. Po přistání lýkožrouti vyhodnocují kvalitu stromu za pomoci chuťových i čichových signálů a buď se pokusí o kolonizaci nebo migrují za lepšími podmínkami (Andersson Martin, 2011). Uvádí se, že až 80 % jedinců pionýrských brouků zahyne. Některé studie poukazují na to, že se pravděpodobně jedná o kombinaci obou způsobů (Saint germain, 2007; Byers. 1995).

2.2 Čichový orgán kůrovců pro příjem látek

K příjmu signálů z prostředí slouží u kůrovců tykadla – latinsky antennae, která se skládají z mnoha částí. Tykadlo je na hlavě umístěno v tykadlové jamce, následuje první článek

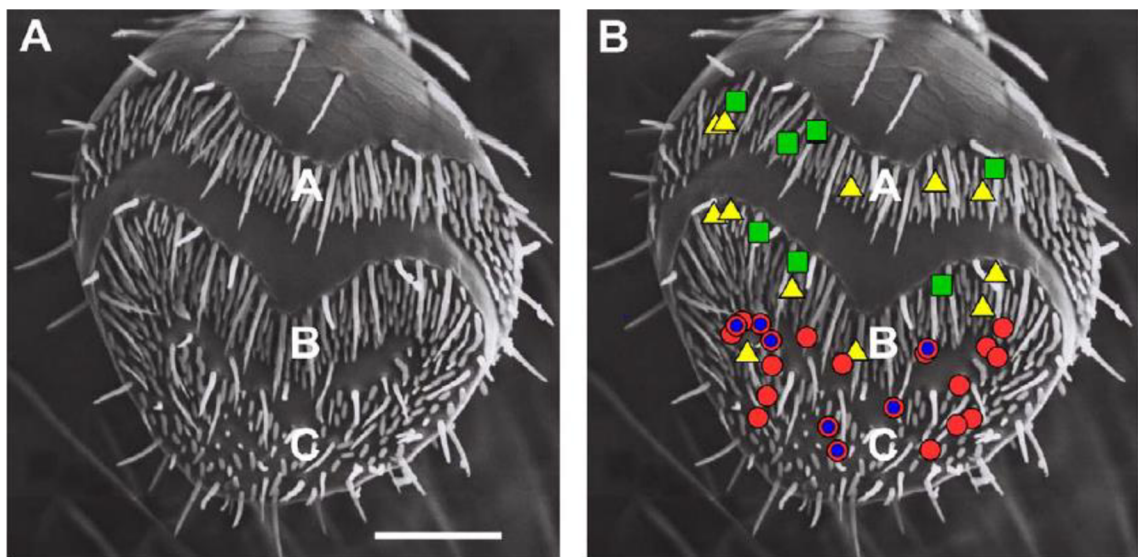
(pedicel), orgán pokračuje soustavou menších pohyblivých článků (flagelum) a je zakončeno tykadlovou paličkou (antenal club) (Hulcr a kol., 2015). Tykadlová palička je pokryta velkým množstvím senzil, které jsou schopny přijímat okolní signály. Tyto senzily se rovněž nacházejí i na zbytku celého těla. Významná je jejich koncentrace rovněž na palpách a u některého hmyzu na tarzách (Xia Shi a kol., 2021). Tykadlo je multimodální orgán, to znamená, že hostí senzily čichové a chuťové. Následně jsou zde mechanoreceptory, receptory pro CO₂ (Andersson, 2013)... Jednotlivé senzily jsou morfologicky velmi variabilní. Mezi hlavní útvary čichových senzil řadíme senzilu basiconicu, senzilu coleonicu a senzilu trichodeu. Dále existují senzily orientované na chuť jako například senzila chaetica, které jsou ve velké míře umístěny na dorzální straně tykadlové paličky (Nowińska a Brožek, 2017; Xia Shi a kol., 2021). Hlavní rozdíl mezi chemoreceptory a chuťovými receptory je průchod molekul okolních vůní. Zatímco princip chemoreceptorů spočívá v kutikulární perforaci drobnými póry na celém povrchu senzily, chuťové receptory mají pouze jednu perforaci na špičce. Pro chemickou komunikaci hmyzu je důležitá ventrální strana, jelikož právě zde se nacházejí receptory pro čich. Na tykadlové paličce si lze povšimnout okulárně spatřitelné dvojité vlnky, která vzniká díky uspořádání senzil na tykadle (Andersson, 2011). Zajímavostí je, že čichová čidla nejsou rozmístěna zcela náhodně. Dají se zde rozlišit 3 hlavní oblasti, přičemž je každá laděná na jiný typ látek. Na tykadlové paličce jsou různé neurony zastoupeny různě. Doposud byla nalezena jen část látek, které by byly těmito senzory vnímány. Andersson roku 2009, 2011 ve výzkumu uvedl, že ze 150 zkoumaných neuronů byly nalezeny látky pouze pro 106 neuronů. Čichových receptorových neuronů laděných na feromony je cca 42 %. Z celkového zkoumaného počtu senzil (45) bylo nalezeno 22 čichových receptorových neuronů vnímajících *cis*-verbenol. Překvapivě ale bylo nalezeno pouze malé množství neuronů, které by byly citlivé na druhý ze základních agregačních feromonů 2-methyl-3-buten-2-ol. Tento feromon aktivoval pouze 3 čichové receptorové neurony. Čichových receptorových neuronů zaměřených na hostitelské látky je cca 35 %. To znamená že bylo odhaleno 37 neuronů primárně reagujících na hostitelské látky. Největší počet těchto neuronů reaguje na alfa pinen a další terpenické látky, které jsou do prostředí uvolňovány hostitelskými organismy. Neuronů přijímajících nehostitelské látky je 23 %. To odpovídá 24 neuronům. Nehostitelské látky se rovněž označují jako GLV (z anglického green leaves volatiles = těkavé látky listnatých rostlin a stromů). Zajímavostí je, že *Ips typographus* má určité neurony vnímavé pro chalcogran a E-myrcenol, což jsou agregační feromony druhů *Ips chalcographus* a *Ips duplicatus*. To jim v praxi pomáhá

k optimálnímu rozšíření na rostlině a snížení konkurence o potravu (Andersson, 2009) (viz. obrázek 2.0). Jednotlivé čichové receptorové neurony se mohou lišit podle spektra látek, na které reagují. Podle šíře tohoto spektra je můžeme dělit na specialisty a generalisty (Ellisa a Hallem a John R. Carlson, 2006). Vysoce specializované čichové receptorové neurony, kterých je většina, reagují pouze na jednu určitou látku. Generalisté na druhou stranu vnímají široké spektrum. Umístění a kombinace neuronů v senzile má určitá pravidla a nejčastěji zde nacházíme 2-3 čichové receptorové neurony (Andersson, 2009). Například lze uvést kolokalizované čichové neurony s receptory pro *cis*-verbenol, což je jeden ze dvou základních komponentů agregačního feromonu pro *Ips typographus* (druhým je 2-methyl-3-buten-2-ol) a čichové neurony s receptory pro 1,8-cineol, což je látka přirozeně se vyskytující v pryskyřici stromů a pro kůrovce má inhibiční efekt (Andersson a kol., 2010). Kombinace těchto 2 neuronů v jedné senzile dává předpoklad pro vzájemné ovlivňování. Pokud bude aktivován čichový receptorový neuron pro 1,8-cineol, tak zároveň dojde k potlačení vnímání *cis*-verbenolu, čímž sníží jeho atraktivitu. Prokázání inhibičního efektu bylo ověřeno i v polních experimentech (Jirošová a kol., 2022).

Senzila je vláskovitý útvar, který ve své stěně obsahuje velké množství pórů. V ní se nachází čichový receptorový neuron, ze kterého ústí dendrity (Andersson, 2011). Na dendritech se nachází velké množství čichových receptorů, které jsou laděny vždy na jednu látku. Čichové receptory nesou na svých výběžcích čichové receptory bílkovinného původu, které jsou zabudovány v buněčné stěně (Andersson, 2013). Na receptory se po průchodu perforovanou stěnou senzily navazují molekuly vůně, což způsobí změnu konformace receptoru. To zapříčiní jeho zprůchodnění a začíná proces zvaný depolarizace, což je přechod iontů z extracelulárního do intracelulárního prostředí. To způsobí změnu elektrického potenciálu, který se v této fázi označuje jako potenciál receptorový. Ten lze měřit za pomoci elektrod elektroantenografu (Andersson, 2009). Tento jev se označuje jako transdukce, což znamená převod signálu chemického na elektrický. Po obsazení dostatečného množství receptorů na čichovém receptorovém neuronu je signál odváděn do centra vyšší instance. Po dosažení saturace receptorů dojde k vygenerování akčního potenciálu, který trvá pouze krátký časový interval (v řádu milisekund). Ten je přenášen prostřednictvím axonu, jelikož změna akčního potenciálu zapříčiní otevření iontových kanálků (sodíkových). Tělo axonu je izolováno fosfolipidovou myelinovou vrstvou (Andersson, 2011; Mentem, 2015). V ní se nachází

řada Schwannových buňek, které slouží soustavě ke snížení spotřeby ATP, jelikož je signál převáděn z buňky do buňky a nemusí tudíž překonávat žádný odpor (Wikipedia, 2022). V publikaci Anderssona, 2011 je uvedeno, že na konci axonu se nachází čichový lalok (Antennal lobe), kde se integrují akční potenciály ze všech senzíl. Každý čichový receptorový neuron má svou vlastní dráhu (axon), kterou se pojí s čichovým lalokem. Zde opět, po dosažení saturace akčních potenciálů, dochází k depolarizaci, dojde ke změně elektrického potenciálu a signál je převáděn prostřednictvím synapse, která je podrážděna sekretem, do míst vyšší instance. Jedná se o tykadlový roh (Antennal horn) a houbové těleso (mushroom body). Zde následně dochází k integraci čichových vjemů s vjemy z ostatních center, což tvoří ucelený obraz o prostředí, ve kterém se živočich nachází (Carrasco a kol., 2015). Z uvedeného tedy vyplývá, že orientace kůrovců je složitý proces, při kterém dochází k integraci vjemů z různých center a k utváření celkového obrazu dochází prostřednictvím centrální nervové soustavy.

Obrázek 2. Rozmístění senzíl na tykadle



Na obrázku je vidět vrchní strana tykadlové paličky, kde se nachází jednotlivé oblasti s různě laděnými senzíl. Na oblasti C jsou vidět převážně senzily orientované na feromony (červená kolečka *cis*-verbenol, modrá kolečka 1,8-cineol (nehostitelská látka) => kolokalizace). Oblast B je převážně laděná na hostitelské látky (žluté trojúhelníčky) a oblast A je laděná převážně na nehostitelské látky (zelené čtverečky) (Journal of Insect Physiology, 2009).

2.3 Významné chemické látky při chemické komunikaci

Látky, které jsou uvolňovány hostitelem do prostředí a následně ovlivňují chování jiného jedince se nazývají semiochemikálie. Tyto působí buď mezidruhově nebo vnitrodruhově. Mezi mezidruhové chemikálie patří kairomony, synomony a alomony (Agelopoulos a kol., 1999). Kairomony jsou látky, které lákají jednotlivce jiného druhu, synomony jsou látky, které lákají hostitele stejného druhu a alomony jsou ekvivalentem k látkám repelentním. Mezi vnitrodruhové semiochemikálie patří například feromony. Látky, které jsou kůrovci přijímány, Andersson (2009, 2011) rozděluje do 3 sekcí. První oddělení se označuje jako hostitelské volatilní látky. Volatilní je synonymum pro těkavý, což znamená, že jsou přítomny ve vzduchu. Tato skupina se přirozeně vyskytuje ve dřevinách, které jsou cílem pozornosti pro škůdce na ně vázané. Konkrétně se tyto látky vyskytují v pryskyřici. Dalo by se říct, že každá dřevina má určitou směs látek, kterou se dá odlišit od rostlin ostatních, což je důležitým faktorem převážně pro živočichy, kteří se nespolehají pouze na zrakové vjemy. Zároveň ale platí, že v základu mají naše jehličnaté dřeviny podobnou kombinaci těchto látek. Mezi základní hostitelské látky řadíme například alfa-pinen, myrcene, 3-carene anebo 1,8-cineol. (Andersson, 2012) Tyto látky jsou vnímány samci i samicemi. Do další skupiny patří látky, řadící se mezi nehostitelské. Tyto chemické prvky mají na kůrovce vliv repelentní. To znamená, že kůrovce naopak utvrzují o tom, že se v porostu vhodný jedinec k osídlení nenachází. Z toho také vyplývá teorie, že by zvýšení heterogenity porostu, tudíž zvýšení zastoupených druhů na ploše, mohlo pomoci v obraně proti kůrovcům. Jak již bylo zmíněno, tak kůrovci přijímají velké množství čichových signálů z prostředí, ve kterém se pohybují. Kdyby byla zvýšena druhová bohatost na stanovišti, tak by to způsobilo, že se zde bude nacházet široké spektrum čichových látek a jelikož se kůrovec orientuje převážně na základě svého čichu, tak by byla zvýšená šance, že ztratí zájem o takto rozrůzněný porost a tím bychom ho ochránili. Mezi nehostitelské látky patří například 1-hexanol, E2-hexanol, Z3-hexanol, 1-octen-3-ol, 3-octanol anebo *trans*-conophorin. (Andersson, 2012) Do poslední skupiny látek patří feromony. Tato skupina látek je extrémně důležitá a využívá se například u feromonových odparníků, které lákají cílový organismus. Využito je to například u lapačů – obranného opatření proti kůrovcům. Tato skupina se vyznačuje velice intenzivní odpovědí ze strany kůrovce, která následně silně podmiňuje jeho behaviorální chování. Jak již bylo uvedeno, hostitelského jedince vyhledává samec. Tento následně hloubí snubní komůrku a lýko, které přitom prochází

jeho trávicím traktem, slouží jako prekurzor pro výrobu feromonů. Ty jsou potom vázány na drtinky, které vyhazuje z komůrky. Tyto feromony následně lákají primárně samičky, vhodné pro spáření se samečkem, ale také samozřejmě další samečky, aby došlo k velké akumulaci kůrovců, díky čemuž jsou schopni překonat obranný mechanismus stromů. Zprvu jsou do prostředí uvolňovány agregační feromony, které ostatní jedince daného druhu přitahují. Mezi 2 základní řadíme *cis*-verbenol a 2-methyl-3-buten-2-ol. Poté, co dojde k maximální saturaci osídleného jedince, začíná převládat tvorba feromonů, které jsou pro ostatní jedince znamením o vyčerpání potenciálu hostitele. Mezi tyto řadíme například (+)-ipsdienol, (-)-ipsdienol, (-)-ipsenol, verbenon. (Andersson, 2012) Většina látek má chirální strukturu, což znamená, že hovoříme o enantiomerech. Takové látky mají sice strukturální i sumární vzorec stejný, uspořádání jednotlivých atomů je však odlišné. Toto hraje důležitou roli při chemické komunikaci, protože většina čichových receptorů je orientována právě na jeden specifický enantiomer. Říká se tomu diskriminace enantiomerů. (M. Stranden a kol., 2002)

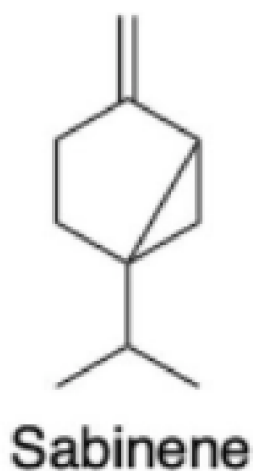
Látka sama o sobě ale není to poslední, z čeho si kůrvec vytváří celkový obrázek. Velice důležité je rovněž to, jaké množství látky se v prostředí nachází. U každého organismu jsou vymezeny určité prahové hodnoty. To znamená, že je minimální koncentrace látky, kterou je živočich schopný vnímat a na druhé straně je i maximální koncentrace látky, která je ještě relevantní. Existuje určitá koncentrace, která vyvolá maximální odpověď a následné zvyšování již na organismus nemá větší vliv. Tomu se říká hodnota saturace. Po nalezení hodnoty saturace je naopak časté pozorování poklesu odpovědi na látku o vyšší koncentraci, což je způsobeno adaptací tykadla na danou látku. A tyto hodnoty má každý druh unikátní, případně se mohou do určité míry lišit mezi jednotlivci. Jelikož hraje výrazný vliv koncentrace látky pro příjemce, tak lze ovlivnit behaviorální chování kůrovců pouhým upravením vzdálenostních poměrů mezi atraktanty a inhibitory (Andersson 2011). Například lze uvést, že verbenon odpuzuje kůrovce na větší vzdálenost, 1,8-cineol začíná inhibovat aktivitu kůrovců až na bližší vzdálenost. (Anna Jirošová a kol., 2022)

2.3.1 *Trans*-4-thujanol

Trans-4-thujanol je chemická látka, která se přirozeně vyskytuje v prostředí. Patří mezi základní látky, které tvoří esenciální olej u majoránky (*Origanum majorana*) (Novak a kol., 2000). Tato chemická látka patří do skupiny monoterpenů. To by mohlo v souvislosti s kůrovcem představovat potencionální problém pro symbiotickou houbu *Ceratocystis polonica*, kterou lýkožrout zavléká do hostitelského stromu, a ta mu následně pomáhá v překonávání ochranných mechanismů smrku (Novak a kol., 2014). Na základě dřívější studie této látky bylo učiněno několik důležitých poznatků. Bylo zjištěno, že smrk ztepilý, primární host lýkožrouta smrkového, přirozeně obsahuje tuto látku, tudíž se její přítomnost v prostředí pravděpodobně podílí na výběru hostitelského jedince kůrovcem. Přítomnost této látky v kůře byla zjištěna díky FID analýze (Čereškienė a kol., 2016). *Trans*-4-thujanol se typicky vyskytuje v mladých porostech a s přibývajícím věkem jeho koncentrace klesá. V konkrétních číslech je to v následujícím pořadí: desetileté smrkové porosty obsahují 3x větší koncentrace *trans*-4-thujanolu než-li porosty ve věku 40 let, 27x větší koncentrace než smrčiny ve věku 70-80 let a dokonce 200x větší koncentrace než porosty staré 120 let (Čereškienė a kol., 2016). Dále bylo zjištěno, že tato látka inhibuje atraktivitu feromonů. Tento výsledek byl ověřen v laboratorních podmínkách sledováním behaviorálních účinků *trans*-4-thujanolu na kůrovce (Čereškienė a kol., 2016). V přirozených podmínkách bylo zjištěno, že je chování ovlivněno v závislosti na množství aplikované látky. Zatímco malá koncentrace *trans*-4-thujanolu (0,1 mg látky odpařené za den) v kombinaci s vyšší dávkou dvousložkového agregančního feromonu (srovnatelnou s množstvím látky vypuštěnou od 1000 samců *Ips typographus*) nemá prokazatelný inhibiční účinek na lýkožrouta. Vyšší dávky *trans*-4-thujanolu (odpar látky za den = 10 mg) mají prokazatelně snižující efekt na atraktivitu feromonu pro kůrovce (Jirošová a kol., 2022). Novak a kol., 2014 Ve svém výzkumu přisuzují inhibiční působení thujanolu kvůli jeho fungicidním účinkům. Rovněž byly odhaleny sex-specifické rozdíly v počtu odchycených samců a samic, které by mohly reflektovat rozdíly v percepci látky mezi pohlavím ve vnímání *trans*-4-thujanolu u kůrovců (Čereškienė a kol., 2016). Bylo odhaleno, že expozice samiček vůči zkoumané látce vyvolává vyšší změnu elektrického napětí na tykadle než u samečků, z čehož vyplývá, že by tato látka mohla být důležitější pro samičky. Tyto hodnoty byly zjištěny prostřednictvím elektroantenografu (Čereškienė a kol., 2016). Pokusy v přirozených podmínkách rovněž hovoří o tom, že množství chycených samiček

v pastích bylo signifikantně nižší při užití vyšších koncentrací *trans*-4-thujanolu. *Trans*-4-thujanol je rovněž silným kairomonem, což znamená, že láká predátory lýkožrouta smrkového (Jirošová a kol., 2022). Čichový receptorový neuron, který je naladěný na *trans*-4-thujanol, je vysoce citlivý a specializovaný. Kromě *trans*-4-thujanolu obecně vnímá terciální monoterpenické látky (Schiebe, 2019). *Trans*-4-thujanol vzniká následovným způsobem: ze sabinenu vzniká sabinendiol, z něho sabinenketon a finálním produktem je samotný thujanol, který se vyskytuje v enantiospecifické formě *trans* a *cis*. (Schiebe, 2019). U smrku se tato látka vyskytuje v provedení 2 enantiomerů. (1R,4S)-(+)-*trans*-4 thujanol a (1R,4S)-(+)-*cis*-4-thujanol. U smrku ve většině případů převládá forma *trans*, a to v cca 97 % případech (Jirošová a kol., 2022).

Obrázek 3. Strukturální vzorec *trans*-4-thujanolu



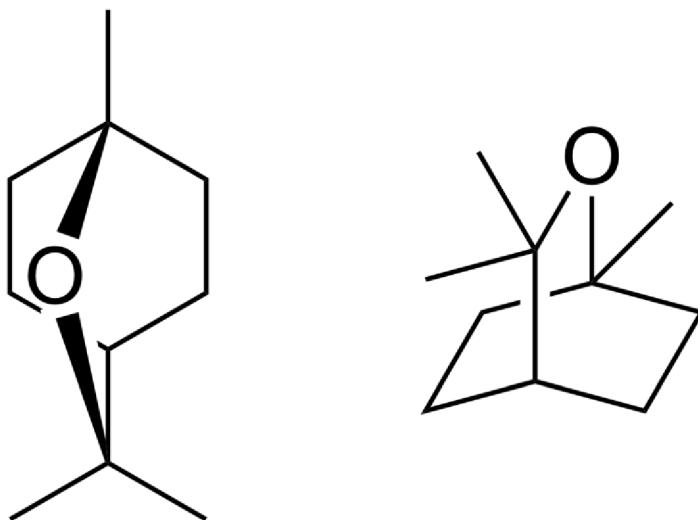
(Wikipedie, 2021)

2.3.2 1,8-cineol

1,8-cineol patří mezi monoterpenické látky. Přirozeně se vyskytuje v esenciálních olejích různých rostlin. Například v eukalyptovém oleji, v oleji z růží nebo oleji psídiá (Kovar a kol., 1987, Sadlon, 2010). Ve studiích bylo prokázáno, že má 1,8-cineol vliv i na řadu jiných organismů než pouze kůrovce. Například (Santos a kol., 2000) uvádí, že má cineol antidepresivní, protizánětlivé účinky v kombinaci s podporou lepšího spánku. Repelentní účinky této látky byly objeveny na řadě brouků, kteří působí škody na uskladněných

hospodářských plodinách (např. kukuřici). Jeden z vlivů, které 1,8-cineol na hmyz má je inhibiční efekt na vývoj vajíček, larev i kukel, což způsobuje snahu o vyhnutí se stanovištěm, ve kterých se 1,8-cineol vyskytuje (má repelentní účinek). Toto bylo prokázáno u pilouse černého (*Sitophilus granarius*) a u pilouse kukuřičného (*Sitophilus zeamais*) (Obeng-Ofori, 2009). U smrku se 1,8-cineol vyskytuje v pryskyřici, odkud se uvolňuje do prostředí. Vědecké studie prokázaly, že je u nenapadených stromů vyšší koncentrace cineolu v porovnání se stromy, které útok nepřežily (Schiebe a kol., 2012). Jeho inhibiční účinky byly prokázány u společných polních testů s dvousložkovým agregačním feromonem pro lýkožrouta smrkového (*cis*-verbenol a 2-methyl-3-buten-2-ol), kdy i malá koncentrace cineolu ovlivnila chování kůrovců a tím zachránila strom od podlehnutí masivnímu náletu (Andersson a kol, 2010). 1,8-cineol (synonymum eukalyptol) vzniká z geranyl pyrofosfátu. Přes pyrofosfátový zbytek (při reakci s vodou) vzniká chemická sloučenina terpinol ve formě *trans* i *cis*. A z ní vzniká jako finální produkt 1,8-cineol v obou enantiomerických formách (Croteau a kol, 1994).

Obrázek 4. Strukturální vzorec 1,8-cineolu



(Wikipedie, 2005)

2.4 Pryskyřice

Pryskyřice (smůla) je tekutina vyměšovaná stromy a dalšími rostlinami, převážně jehličnatými. Nachází se primárně v lýku a kůře smrku ztepilého. Sekundárně se může akumulovat i v xylému poté, co je organismus napaden patogenem (houbou, hmyzem...).

Smůlu rozlišujeme na konstitutivní, která se u stromu vyskytuje v klidových podmínkách a induktivní, která vzniká v reakci na podnět. Napadení patogenem indukuje tvorbu nových pryskyřičných kanálků a zároveň způsobuje zvýšení koncentrace monoterpenů a diterpenů. V kontrastu koncentrace seskviterpenů zůstává nezměněná (Diane Martin a kol., 2002; Martin, 2003). Pryskyřice slouží jako přirozený obranný mechanismus u rostlin. Ten je možný rozdělit na 2 složky. Mechanická funkce smůly slouží jako médium pro zalití chodbiček, které tvoří kůrovci při vstupu a následné disperzi. Rovněž prostřednictvím pryskyřice dochází k utěsnění vstupní brány pro další patogeny. Druhou vlastností smůly je retence diterpenických, monoterpenických a seskviterpenických látek, které jsou kůrovcem využívány pro orientaci v prostředí, ve kterém se nachází. Tyto látky jsou pro řadu živočichů toxické, vyznačují se antibakteriálními a fungicidními účinky. Lýkožrout smrkový je ale částečně rezistentní z důvodu dlouhé koevoluce se smrkem ztepilým. Zároveň je schopný tyto látky přetvářet na agregační feromony. Díky tomu snižuje jejich abundanci a zároveň agreguje další jedince svého druhu (Claude Everaerts, Jean-Claude Gregoire, and Joel Merlin, 1988). Mezi monoterpenické látky u smrku ztepilého patří například alfa-pinene, myrcen, sabinen, 1,8-cineol, limonen a další. Mezi seskviterpeny patří longifolen, beta-caryophyllen, alfa-humele a mezi diterpenty řadíme například abienol, abietic acid, palustric acid a další (Diane Martin a kol., 2002).

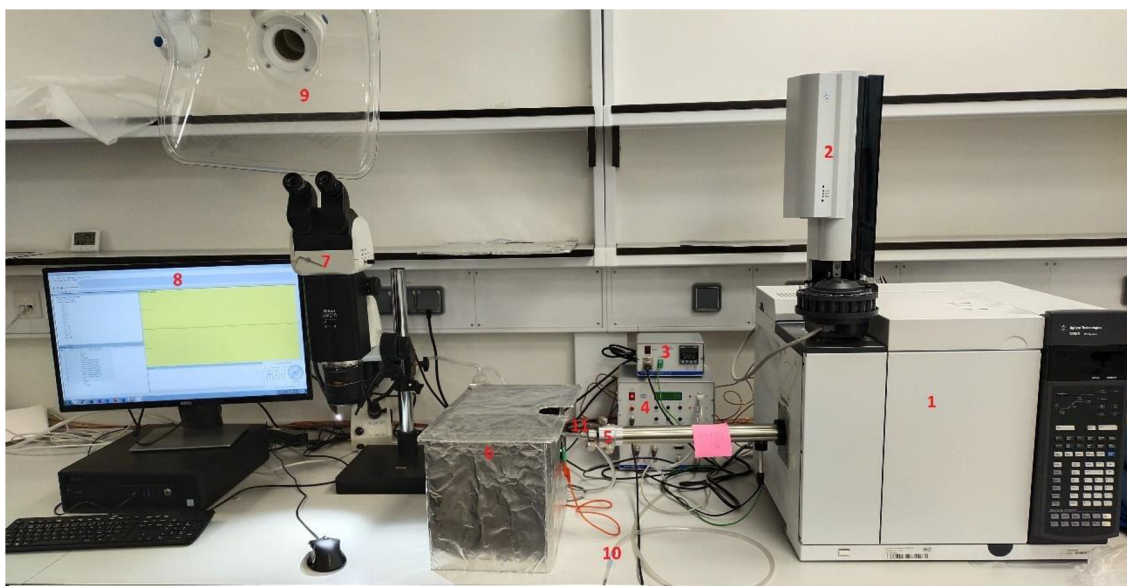
Metodika

3 Teoretická část

3.1 Obecné informace

Elektroantenografie je elektrofyziologická metoda, při níž dochází, za pomoci elektrod, k zaznamenávání změn elektrického potenciálu, jenž vzniká na tykadle po čichovém podráždění a odráží aktivitu čichových receptorových neuronů. Elektroantenografie byla poprvé použita k výzkumu čichu u hmyzu německým vědcem Schneiderem roku 1957, který si při svých experimentech povšiml, že dochází k určité změně napětí mezi bází a špičkou tykadla po vystavení těkavé látky (Schneider, 1957; Schneider et al., 1967). Čichové receptory si lze představit jako soustavu zdrojů a rezistorů, a z toho vyplývá, že základním principem, ze kterého tato metoda vychází, je Ohmův zákon, (Syntech, 2015) který se vyjadřuje vzorcem $I=U/R$. (George Ohm, 1787-1854) Změna napětí odráží souhrnnou aktivitu podrážděných čichových neuronů daným stimulem. Konkrétně EAG měří sumu receptorových potenciálů vznikajících v místě interakce stimulační látky s čichovým receptorovým neuronem. Důležitým kritériem je velikost odporu, který se dělí na 2 složky. Odpor na tykadle a odpor na zesilovači. Pro měření je důležité, aby byl větší odpor na zesilovači, což nám umožní zaznamenávat dostatečně velké odpovědi (Syntech, 2015). Elektroantenografické zařízení se skládá z tykadla (izolovaného nebo intaktního), dvou elektrod a zesilovače (do kterého je veden elektrický signál snímáný elektrodami). Zesilovač je zároveň analogo-digitálním převodníkem. Následně jsou digitalizovaná data vedena do počítačové jednotky, kde jsou ukládána a vyhodnocována za pomoci specifického softwaru značky Syntech. Záznam z měření může být ovlivněn vnějším elektromagnetickým polem, které vytváří okolní elektronické přístroje. Z tohoto důvodu se obvykle využívá odstíněné prostředí, kterého se dosáhne prostřednictvím Faradayovy klece (Michael Faraday, 1791-1867).

Obrázek 5. GC-MS soustava pro měření čichových odpovědí



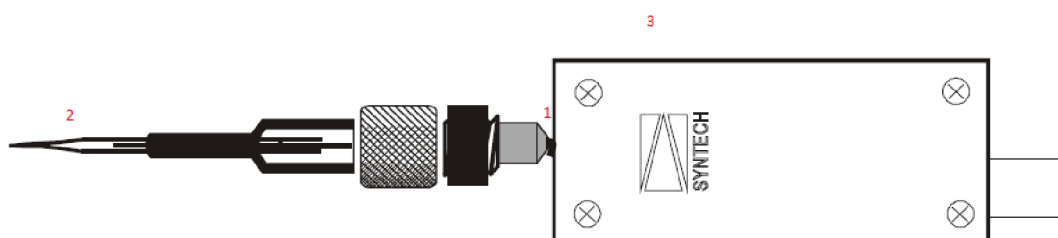
Obrázek 5 s kompletní sestavou měřicí aparatury. Jedná se o kompletní GC – EAG (plynová chromatografie s tykadlovou detekcí). 1 = plynový chromatograf (GC), 2 = automatický injektor, jehož prostřednictvím dochází k nanášení látky o objemu 1 ul do chromatografu, 3 = elektrické topení, které zahřívá ústí plynového chromatografu, 4 = analogo digitální převodník IDAC-2 Syntech + generátor vzduchových pulzů CS-55 Syntech, 5 = hrdlo trubice, která vede látky z plynového chromatografu, 6 = Faradayova klec (uvnitř Faradayovy klese se nachází EAG s připojeným tykadlem), 7 = mikroskop sloužící pro navedení měřicí elektrody na tykadlo, 8 = počítačová jednotka s vyhodnocovacím softwarem EAG-Pro, 9 = odsávací digestoř

Každý měřený antenální preparát má trochu odlišené podmínky. Brouci sami o sobě mohou být různě citliví k čichovým signálům. Na měření má také vliv celá řada dalších faktorů. Například se může jednat o vitalitu jedince. Stáří jedince rovněž hraje významnou roli. Tykadla starších exemplářů bývají méně citlivá. Dalším faktorem může být stáří samotného preparátu a způsob zhotovení preparátu. Pokud zafixujeme celého brouka, tak jsme schopni provádět delší měření než v případě, že fixujeme samotné tykadlo, jehož životnost je výrazně nižší. Podmínky okolního prostředí jsou dalším faktorem, který se podílí na kvalitě měření. Při vyšší teplotě a nižší vlhkosti dochází k rychlejšímu odumírání zkoumaného tykadla. A v neposlední řadě hraje roli i síla stimulu.

3.2 Elektrody

Důležitou součástí jsou elektrody. Ty slouží především ke zprostředkování kontaktu mezi tykadlem a zesilovačem, registračním a vyhodnocovacím zařízením, tzv. elektroantografem. Jako elektroda se nejčastěji využívají skleněné mikropipety plněné Ringerovým roztokem, které se propojují s předzesilovačem prostřednictvím stříbrných drátků (viz. obrázek 15). Ringerův roztok se používá kvůli zlepšení kontaktu mezi elektrodou a místem její aplikace. Důležité je dbát na to, aby se Ringerův roztok nerozlil u báze elektrody, což by celý obvod uzemnilo a nebylo by možné dosáhnout objektivního měření. Jedna elektroda slouží jako referenční a umísťuje se nejčastěji na bázi tykadla. Druhá elektroda se zavádí do kontaktu se senzily na tykadlové paličce.

Obrázek 6. Propojení elektrody s předzesilovačem



1 = zahnutí stříbrné elektrody, aby došlo k její aretaci, 2 = kapilární trubička naplněná Ringerovým roztokem, 3 = držák elektrody (Syntech, 2015)

3.3 Možnosti přípravy tykadel

Nejčastěji používané metody fixace jsou 3. Každá z nich s sebou nese jistá pozitiva, ale i negativa. Prvním způsobem fixace je samotné tykadlo. Hlavním úskalím této metody je krátká životnost. Jelikož je orgán izolován od zbytku těla, tak dochází k rychlému vysychání vzorku a měření je možné provádět pouze limitovanou časovou dobu (pro lýkožrouta smrkového se tato doba pohybuje okolo 30 minut, záleží na kvalitě zhotoveného preparátu). To, že je tykadlo odděleno od živého tvora, je ale rovněž výhodou, jelikož zde dojde k redukci elektrického odporu preparátu a tím dojde ke snížení šumu záznamu z EAG. Rovněž takto zhotovený preparát zamezí vyobrazení artefaktů,

kteře vznikají mechanickými pohyby ze strany zkoumaného živočicha. Dalším způsobem upevnění preparátu je jako celek. Zde dochází k elektroantenografickému záznamu z tykadla mechanicky zafixovaného jedince. Obvykle se využívá znehybnění hmyzu ve špičce pro automatické pipety, u které je mírně seříznut hrot, tak aby její rozměry odpovídaly velikosti zkoumaného jedince. Hmyz bývá ve špičce fixován prostřednictvím buničité vaty, která tlačí ze špičky ven hlavičku společně s tykadlem. Navzdory preciznosti při vytváření preparátu není vždy možné kompletně zamezit drobným pohybům hlavy a tykadla. Pozitiva a negativa u této metody jsou opakem metody předchozí. Zhotovený preparát je sice možné měřit déle, ale do výsledků vstupuje nevyžádaný ruch způsobený aktivitou živočicha. Přechodnou metodou fixace tykadla je možnost upevnění celé hlavy. Tato metoda představuje kompromis oproti již zmíněným. Preparát vydrží poměrně dlouhou dobu, jsou eliminovány pohyby živočicha a neopominutelnou výhodou je rovněž jednoduchost v přípravě preparátu. Jednotlivé metody se rovněž liší v kontaktu s referenční elektrodou. V případě samotného tykadla je umístěna na jeho bázi (tykadlo je do elektrody vsunuto). V případě celého hmyzu je nutné referenční elektrodu propojit s hemolymfou živého jedince, což se v případě kůrovců dělá nejnáze přes oko, které může sloužit jako vstupní brána. Zbylý povrch hlavy je silně sklerotizován, tudíž představuje velice pevnou strukturu. V případě hlavy se elektroda zavádí přímo v místě oddělení hlavy od pronota. Měřicí elektroda se ve všech případech fixuje na tykadlo.

3.4 Metoda stimulace

Na zkoumané tykadlo je přiváděn konstantní proud vlhčeného vzduchu. Vlhčený je kvůli tomu, aby tykadlo pomaleji sesychalo, čímž dochází k udržování dobré vitality zkoumaného hmyzu. Do tohoto proudu je možné aplikovat stimul vícero způsoby. Mezi nejjednodušší způsob patří stimulace pomocí takzvaného zásobníčku. Ten je tvořen skleněnou Pasteurovou pipetou (Louis Pasteur, 1822-1895). Do této je vložen filtrační papírek (1,5x1 cm), na který je aplikována těkavá látka. Ta je většinou rozředěna nějakým rozpouštědlem (např. hexan, parafinový olej). Takto zhotovený zásobníček je propojený se zařízením, které generuje vzduchový impuls (objem vzduchu profouknutý pipetou za časový interval). Ten je veden hadičkou do pipety, zde se obohatí o těkavou látku a je injektován do proudu vlhčeného vzduchu, který směřuje na fixované tykadlo. Na první

pohled jasnou výhodou tohoto způsobu stimulace je jednoduchost celého procesu aplikace látky, z čehož vychází levné pořizovací náklady. Druhým, o něco sofistikovanějším, způsobem stimulace tykadel, je propojení elektroantenografu s plynovým chromatografem (v praxi se používá zkratka GC-EAD = gas coupled-electroantennograph). Mezi hlavní výhody této metody patří možnost automatického nastříkání vzorku v námi zvolené sekvenci a zpětná kontrola z FID výstupu, což eliminuje zkreslení intenzity stimulů z důvodu rozdílných těkavostí látek, jelikož vše, co nanese prostřednictvím chromatografu doputuje až k tykadlu. U zásobníčků z Pasteurových pipet dochází k proměnlivosti koncentrace látky, právě kvůli její těkavosti.

3.5 Plynový chromatograf (GC)

Plynový chromatograf je analytické zařízení, které může být propojeno s elektroantenografem (viz. obrázek 14). Jedná se o troubu, která uvnitř obsahuje dutou kapilární trubičku = kolonu. Slouží pro separaci látek a zároveň ke kontrole čistoty nastříkovaných chemikálií. Samotný chromatograf uvnitř obsahuje dlouhou kapilární kolonu, která na svém povrchu obsahuje stacionární fázi. Látky se do kolony dostávají skrz automatický injektor, kde dochází k jejich zplynění a následně jsou unášeny nosným plynem (helium) do kolony. Jelikož látky reagují rozdílně se stacionární fází, dochází k jejich separaci. V případě kombinace GC-EAD je zkoumaná látka dopravována ke dvěma detektorům. První je detektor látek, například FID (flame ionization detector = plamenný ionizační detektor). Ten zaznamenává intenzitu a průběh každé látky, která jím prochází. V FID dochází k hoření díky vodíku z vodíkového generátoru, kyslíku a dusíku. Tímto plamenem prochází zkoumané látky. Signál, který vyzáří, je pohlcen kolektorem, odkud putuje do počítače. Druhý detektor je samotné tykadlo, upevněné v elektroantenografu, které zaznamenává průběh a intenzitu látek, pro které obsahuje receptory. U chromatografické kolony dochází k rozdělení eluátu pomocí splitteru do dvou ramen (tvar součástky Y). Polovina eluátu je tedy odvedena do FID a druhá polovina pokračuje z plynového chromatografu ven do vlhčeného proudu vzduchu a je unášena na tykadlo. Propojení součástek GC-EAD-FID je vhodným způsobem, jak zajistit měření čichové odpovědi z tykadla a zároveň měřit čistotu látky, která je na tykadlo přiváděna.

3.6 Mass spektrometry

U směsí látek, jejichž složení neznáme, je možné využít metodu hmotnostní detekce. Tato metoda spočívá v ionizaci nastříkovaného roztoku elektronovým paprskem. To způsobí přiřazení náboje každému iontu. Ty jsou následně zrychleny iontovým akcelerátorem. Dále se v soustavě nachází magnetické pole, které změní jejich dráhu v závislosti na jejich náboji a hmotnosti. Ionizované fragmenty následně dopadají na detektor a může dojít k jejich vyhodnocení (Khan academy, 2019). Tato součástka jde užít v kombinaci s plynovým chromatografem. V takovém případě se soustava označuje jako GC-MS (hmotnostní spektrometr v takové sestavě nahrazuje plamenný ionizační detektor [FID]).

3.7 Elektrofyzilogický záznam z jednotlivých čichových senzil (Single-sensila recording = SSR)

Další elektrofyzilogickou metodou je záznam aktivity čichových receptorových neuronů z jednotlivých senzil. Toto se označuje single-sensila recording (záznam z jednotlivých senzil). Oproti běžné elektroantenografii jde o sofistikovanější metodu. Výstupem měření je rovněž změna elektrického potenciálu na tykadle. Ale zatímco u EAG snímáme sumu receptorových potenciálů generovaných v čichových receptorových neuronech po stimulaci látkou, single-sensila recording vnímá akční potenciály generované přímo jednotlivými neurony. K tomuto typu snímání se používají wolframové elektrody s hrotem o průměru cca 1 mikron, které se zavádí k bázi zvolených senzil. K pozicování elektrod se využívá motorizovaný mikromanipulátor, který umožňuje pohyb v řádu mikrometrů.

Metodika

4 Praktická část

4.1 Příprava látek

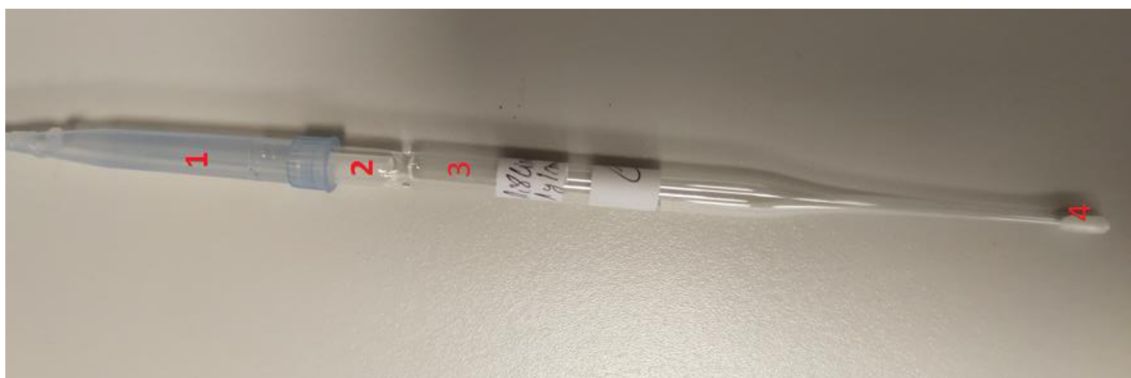
Čisté chemické látky byly pro tento výzkum poskytnuty Českou zemědělskou univerzitou v Praze. Konkrétně se jedná o alfa-pinen (čistota 97 %, Sigma-aldrich), 1,8-cineol (čistota 99 %, Acros organics) a *trans*-4-thujanol (čistota 83,8 %, Sigma-aldrich). Látky byly rozpouštěny v hexanu (čistota 99 %, Pestinorm) a v parafinovém oleji (VWR BDH chemical). Látky se rozpouští v hexanu kvůli pozdější analýze v plynovém chromatografu, díky čemuž jsme schopni určit čistotu rozředěné látky. Na tykadlo je žádoucí aplikovat pouze látku, kterou zkoumáme, abychom dostali nezkráslené výsledky. Plynový chromatograf (Agilent 7890B, Agilent Technologies, USA s kolonou Agilent 19091J-413: K01 HP-5 o délce 30 m, průměru 320 μm a síle vnitřního filmu 0,25 μm) využívá pro svůj provoz hélium, dusík a kyslík. Počáteční teplota chromatografu byla 30°C a postupně se zvyšovala (30°C/min) na teplotu 300°C, díky čemuž jsme schopni provést separaci látek podle retenčního času uvnitř kapiláry. Proud látek z plynového chromatografu je rozdělen na půl. Jedna část jde do ionizační plamenné detekce (FID = flame ionization detection) a druhá část proudu látek jde na tykadlo v elektroantennovém grafu (GC – EAD). Díky FID došlo k ověření čistoty rozředěných látek. Do plynového chromatografu se nastříkuje 1 μl látky rozpuštěné v hexanu. Pro samotné měření byly využity látky rozpuštěné v parafinovém oleji. Důvodem je zpomalení těkání látek ze zásobníčků, což snižuje rozdíly mezi různě volatilními látkami. Látky byly rozředěny v dekadických krocích, díky čemuž bude možné provést dose-response měření (měření v závislosti na množství látky). Nejnižší koncentrace byla 10 ng/ml (ekvivalentní hodnotou je 10 pg/ μl), o řád vyšší je 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml a nejvyšší koncentrací byl 1 g/ml. Ředění proběhlo ve skleněných vialkách (Agilent technologies, 2 ml). Za pomoci automatických pipet bylo do vialky umístěno 1000 μl zkoumané látky. Následně byl celý vzorek převážen na váze s přesností na mikrogramy. Přepočtem bylo stanoveno množství hexanu/parafinu, které společně s látkou dalo dohromady vzorek s koncentrací 1 g/ml. Vzorek byl důkladně promíchán automatickým promíchávačem (Vortex BV1000 BenchMixer). Z něj se následně odebralo 100 μl a přidalo 900 μl parafinového oleje a dostali jsme vzorek řádově o desetinu nižší (100 mg/ml). Takhle jsme postupovali až do hodnot 10 pg/ μl .

Trans-4-thujanol je krystalická látka v podobě vláken, což způsobuje problém při jeho rozpouštění v parafínovém oleji. (čím vyšší koncentrace *trans*-4-thujanolu v parafínovém oleji, tím obtížněji se rozpouští) Tento problém byl vyřešen zahříváním vialky (ThermoShaker, Biosan) (viz. obrázek 13). Přibližně po půl hodině o teplotě 80°C a občasném promíchání vialky došlo k rozpouštění 1 g/ml *trans*-4-thujanolu. Ostatní zmíněné látky se na fakultě vyskytují v kapalně formě, takže manipulaci s nimi neprovázely žádné komplikace. Takto zhotovené vzorky byly skladovány v lednici při teplotě 4°C.

4.2 Příprava zásobníků pro měření

Jako medium pro přenos látky k tykadlu kůrovce byly použity Pasteurovy pipety (délka 150 mm, Deltalab). Zásobníky jsme připravovali následovně. Do báze pipet byl vložen přeložený filtrační papír (1,5x1 cm, Whatman), na který bylo jednorázově naneseno 10 ul látky o určité koncentraci z předem připravených vialek o různých koncentracích. Přenos probíhal prostřednictvím automatických pipet (100-1000 ul; 10-100 ul, Thermo scientific). Po nanesení byly zásobníčky temperovány při pokojové teplotě a ponechány 30 minut v klidu, což zajistí, že se látka z filtračního papíru v pipetě rozmístí rovnoměrně. Na bázi pipety byl umístěn dutý plastový kužel, který byl utěsněn parafilmem (Bemis), což zamezí úniku látky do prostoru. Připravili jsme si zásobníček s *trans*-4-thujanolem, 1,8-cineolem, α -pinenem a kůrou. Na začátku každého měřicího dne byly vytvořeny nové zásobníčky. Každý zásobníček byl použit pro 4 měření, poté byla zhotovena nová sada. Při stimulaci byl zásobníček propojen hadičkou s generátorem vzduchových pulzů, který transportuje zkoumanou látku do proudu vlhčeného vzduchu. Tato směs následně putuje k tykadlu, umístěnému v elektroantografu. Průměr spojovacího komponentu byl upraven tak, aby odpovídal průměru trubičky tlačící vzduch a byl měněn pro každou látku, aby nedošlo ke kontaminaci. Byl zhotoven ve 3 provedeních, spojka pro standard (alfa-pinen, kůra), blank (vzduch, parafin) a zkoumanou látku. Spojovací část pro zkoumanou látku (*trans*-4-thujanol, 1,8-cineol) byla pro každé tykadlo vyměněna, aby bylo možné měřit nízké koncentrace látky a zároveň eliminovat nahromadění látky ve spojovacím článku.

Obrázek 7. Kompletní zásobníček s měřenou látkou

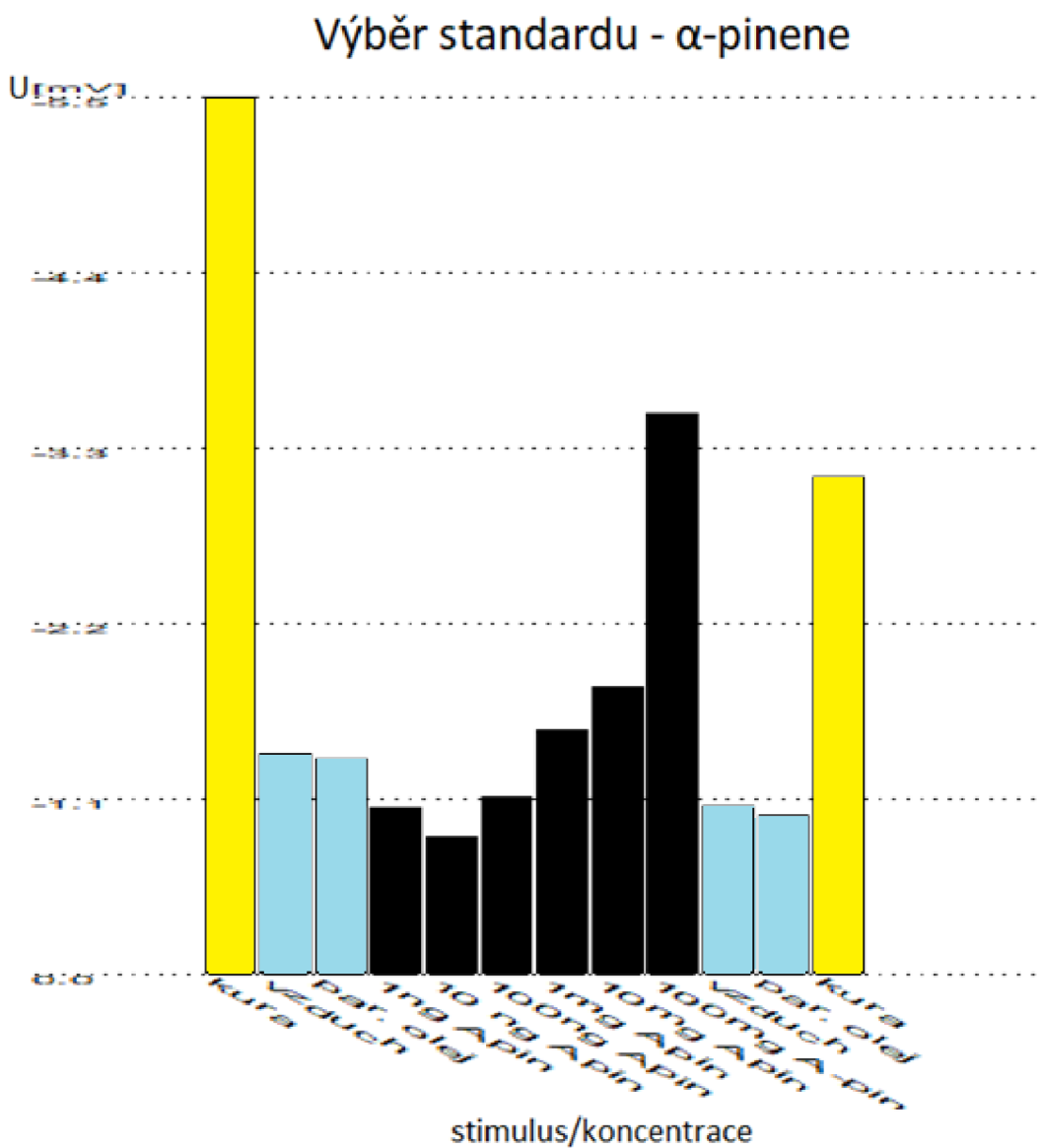


Obrázek 7 připraveného zásobníčku. 1 = plastový kužel zajištěný parafilmem proti úniku látky ze zásobníčku, 2 = filtrační papírek s nanesenou látkou, která je rozpuštěná v parafinovém oleji, 3 = tělo zásobníčku/ tělo Pasteurovy pipety, 4 konec zajištěný parafilmem proti úniku látky.

4.3 Výběr standardu

Standard je nutné zvolit, aby mohla být provedena standardizace měřených dat, což znamená, že se upraví výsledky podle změny citlivosti tykadla v průběhu měření (viz. kapitola 4.8). Rovněž je následně možné se standardem porovnávat odpovědi měřených látek. V tomto experimentu byly standardy zvoleny 2. Kůra, o které víme, že na ní kůrovci výborně reagují, jelikož přirozeně obsahuje řadu čichově atraktivních látek. Problém ale je, že obsahuje širokou paletu látek a je důležitý odběr kůry ve stejném místě stromu a používat ideálně stejně starý vzorek o stejných rozměrech. Kvůli těmto obtížnostem byla kůra používána pouze pro ověření vitality kůrovce a funkčnosti jeho zapojení. Druhým standardem byl zvolen alfa-pinén, o kterém je známo, že je kůrovcem vnímán a má na něj vliv, jelikož se přirozeně vyskytuje v pryskyřici hostitelského jedince a je pro něj atraktantem (významnou roli hraje koncentrace látky). Po měření odezvy kůrovcem bylo určeno, že ideální koncentrace této látky je 50 mg/ml (viz. graf 1). Koncentraci standardu je nutné zvolit v optimální hladině, aby odpověď byla dostatečně velká, ale zase ne příliš velká, aby netrvalo dlouhou dobu, než se tykadlo vrátí do homeostatického stavu.

Graf 1 – výběr vhodného standardu



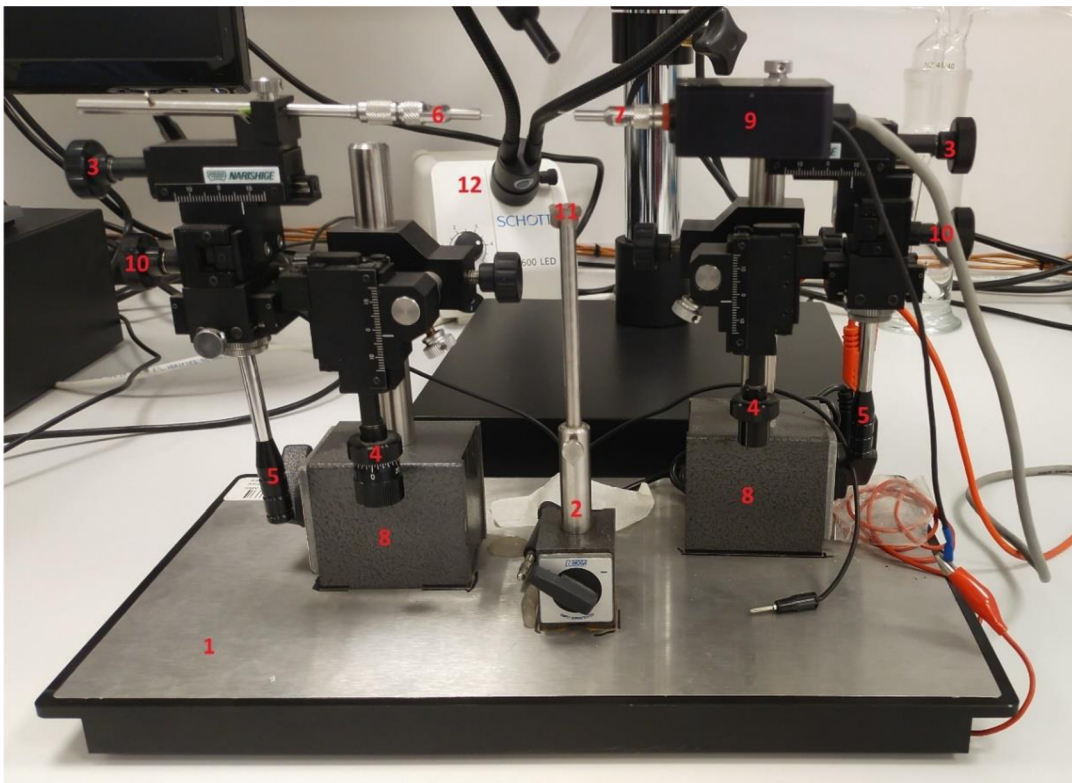
Z grafu 1 vyplývá, že se vhodná koncentrace α -pinenu nachází mezi hodnotami 10 mg/ml a 100 mg/ml. Jedná se tedy o vhodný kompromis mezi koncentrací vyvolávající nejvyšší odpověď při měření a koncentrací o řád nižší. Graf je v provedení colorcoated. Žlutě je označený standard, tyrkysové označení je pro stimulus, u kterého není očekávána čichová odpověď, černě je označena zkoumaná látka.

4.4 Příprava elektro-anteno grafu (EAG)

Příprava elektrod: skleněná trubička o průměru 1,5 mm, která je upravena na vertikálním elektrodovém tahači (PC-100 Narishige) (viz. obrázek 12). Tyto byly zahřáty na 65°C a plynulým pohybem v opačném směru rozděleny na 2 části. Díky zvýšené teplotě došlo

k vytvarování špiček na každé kapiláře. Následně jsou kapiláry upraveny tak, aby nimi mohl procházet Ringerův roztok (NaCl 12,2 g/l, KCl 0,21 g/l, CaCl_2 0,2 g/l v destilované vodě). Ten zajišťuje propojení měřicí aparatury prostřednictvím Ag drátků, které jsou v něm ponořeny, se zkoumaným tykadlem živočicha. Ringerův roztok je rovněž využit za účelem zlepšení kontaktu s elektrodami. Jedná se o dobře vodivou tekutinu, která zlepšuje kontakt elektrod s připojenými částmi organismu. Referenční elektroda se propojuje s tělesnou tekutinou zkoumaného subjektu a měřící elektroda se umísťuje na tykadlo. U měřící elektrody (připojené na tykadlo) je velice důležité, aby průměr špičky kapiláry co nejvíce kopíroval tykadlo. Pokud bude moc malý, tak bude obtížné propojení roztoku s tykadlem, pokud bude moc velký, tak tykadlo roztok zalije a nedostaneme správné odpovědi. Délka elektrod se upraví brusným hranolem. Měřící elektroda je připojena na předzesilovač (10x Syntech Universal Probe) a analogo-digitální převodník (IDAC-2, Syntech). Do takto připravené měřicí soustavy EAG následně umísťujeme, v našem případě, tykadlo kůrovce, na které přivádíme měřené látky, které jsou unášeny v proudu vlhčeného vzduchu. (Látky jsou přiváděny do proudu vlhčeného vzduchu generátorem vzduchových pulzů CS-55, Syntech) (viz. obrázek 11).

Obrázek 8. Elektroantenograf (EAG)



Obrázek 8 s detailním pohledem na elektroantograf 1 = magnetická deska, která nese zbylé součástky, 2 = magnetický stojan, který slouží k upevnění fixovaného kuželu s broukem (v případě fixace kůrovce jako celku), 3 = horizontální mikromanipulátor (ve směru k fixovanému tykadlu a od něj), 4 = vertikální mikromanipulátor, 5 = detailní manipulátor, který slouží k jemným pohybům, 6 = referenční elektroda, 7 = měřicí elektroda připojená na předzesilovač, 8 = magnet, který fixuje držáky s elektrodami, 9 = předzesilovač, 10 = horizontální mikromanipulátor, který slouží k pozicování elektrod do stran, 11 = vosk nanesený na špičce magnetického stojanu, ve kterém se upevňuje preparát, 12 = světelný zdroj

4.5 Zkoumaní jedinci lýkožrouta smrkového

Kůrovci byli z uměle založených chovů Ing. Jaromíra Bláhy. Vývoj probíhal v klimatizované místnosti o konstantní teplotě 25°C a 60% vlhkosti vzduchu, v utěsněných plastových boxech, ze kterých byl odváděn vzduch odsávající trubicí pro zlepšení jeho cirkulace. Po dokončení podkorního vývoje byla smrková polena odkorněna prostřednictvím nože a kůrovci extrahováni anatomickou pinzetou. Následně byli uskladněni zažraní v kůře v lednici při teplotě 4°C, což sníží jejich fyziologickou aktivitu a prodlouží jejich životnost. Za účelem zlepšení životních podmínek byla do perforovaných plastových dóz umístěna kůra a vlhčený filtrační papír. Pro konkrétní měření bylo vždy odebráno jen zlomkové množství brouků, abychom nesnižovali jejich vitalitu kvůli poměrně vysoké pokojové teplotě. Využit byl druh kůrovce – lýkožrout smrkový (*Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae, Ips typographus*). Determinace proběhla analýzou morfologických výběžků na zadní části krovek. Po nalezení 3. výběžku šipovitého/srdcovitého tvaru bylo určeno, že jde o lýkožrouta smrkového. Pohlaví u *Ips typographus* bylo nejprve rozděleno podle míry ochlupení hlavového štítu (crania), kdy samička má tuto oblast mnohem intenzivněji pokrytou (Styhler a Cederholm, 1981). Následně byly tělesné zbytky brouků uskladněny ve vialkách pro následnou pitvu. Potvrzení samečků proběhlo pod elektronovým mikroskopem (Olympus SZ61), kdy se jedinec umístí na filtrační papírek ventrální stranou dolů. Nehtem se přimáčkne v oblasti pronota, což způsobí odkrytí abdomenální části, kterou normálně překrývají sklerotizované krovky. Pinzetou se zajede skrz poslední zadečkový článek dovnitř. Následně je vytažen veškerý vnitřní obsah, ve kterém se hledá přítomnost sklerotizovaného penisu.

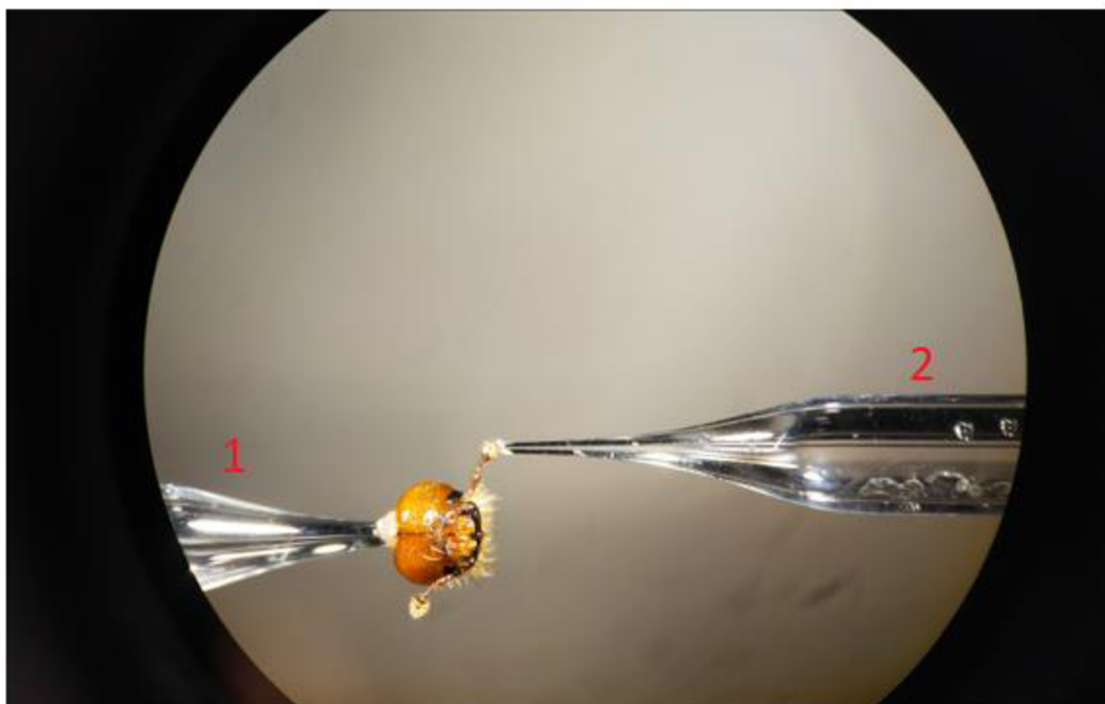
Poznámka: důležité je, aby uskladnění kůrovci byli odděleni od chemických látek. Důvodem je, že se měří i velmi malé koncentrace látek (10 pg/ul), tak aby si na látku při uskladnění nevybudovali resistenci.

4.6 Příprava zkoumaného *Ips typographus* pro měření

Pro zapojení kůrovců byly použity 2 metody. Při hledání standartu byl brouk fixován živý ve špičce pipety. Výhodou této metody je dlouhá vitalita jedince, což je vhodné pro rozsáhlé analýzy, jelikož jedinec odpovídá na látky i po 1,5 hodině. Nevýhodou je, zvláště u lýkožrouta smrkového, jeho velikost a síla. Tento konkrétní druh se velmi brání, a tak často dochází k odklonu tykadla od měřicí elektrody. Postup fixace je následovný. Brouk je vtlačen do špičky pipety, zafixován v ní je drobným ústřížkem papírového kapesníčku. Vršek pipetky je odříznut a brouk posunut tak, aby byl pevně zafixovaný a koukala pouze hlavička s tykadlem. Následně je nutné špendlíkovou špičkou zhotovit otvor v hlavě, kvůli propojení referenční elektrody s hemolymfou. Vhodnou vstupní bránou je oko, které není sklerotizováno jako zbytek hlavy. Vršek pipety je oblepen voskem (Erkogum, Erkodent), který je navalen na hlavu brouka. Tykadlo je velice pečlivě připlácnuo na vosk. Velice důležité je, aby byla do vosku nalepena spodní strana tykadlové paličky, kde se nachází pouze mechanoreceptory. Vrchní strana nese jednotlivé čichové sensily, které jsou pozorovatelné pod mikroskopem, případně se vrchní strana vyznačuje výraznou vlnkou, kde jsou uspořádány jednotlivé sensily do určitých oblastí podle látek, na které jsou citlivé. Na celé tykadlo, kromě paličky, je následně nahnuto vosk, aby došlo k jeho fixaci a zamezila se kůrovci možnost pohybu. Takto zhotovený preparát je následně vložen do elektroantenografu, kde dochází k zavedení elektrod pomocí mikromanipulátorů (Pod mikroskopem Nikon SMZ 18). Pro měření odpovědi na *trans*-4-thujanol byla zvolena metoda fixace hlavy s tykadlem. Při této metodě je kůrovci oddělena hlava prostřednictvím žiletky a špendlíku. Do hlavy je následně vsunuta kapilára s Ringerovým roztokem a celý preparát je umístěn na referenční elektrodu. Následně se, pomocí mikromanipulátorů, přisune měřicí elektroda k tykadlu. Tuto elektrodu je nutné umístit pečlivě na stranu, která obsahuje čichové sensily, abychom byli schopni získat odpovědi z EAG. Veškeré operace, související s přípravou kůrovce, probíhají pod stereomikroskopem se zvětšením 20-30x.

poznámka: Tykadlová palička je extrémně citlivá na vnější poškození. Například: pokud do paličky jemně udeříme špičkou špendlíku, tak dochází k neobjektivním výsledkům, případně až k nemožnosti měření změny elektrického potenciálu.

Obrázek 9. Detail fixované hlavy lýkožrouta smrkového



Obrázek 9. Detailní pohled pod mikroskopem na fixaci hlavy lýkožrouta smrkového 1 = referenční elektroda, 2 = měřicí elektroda.

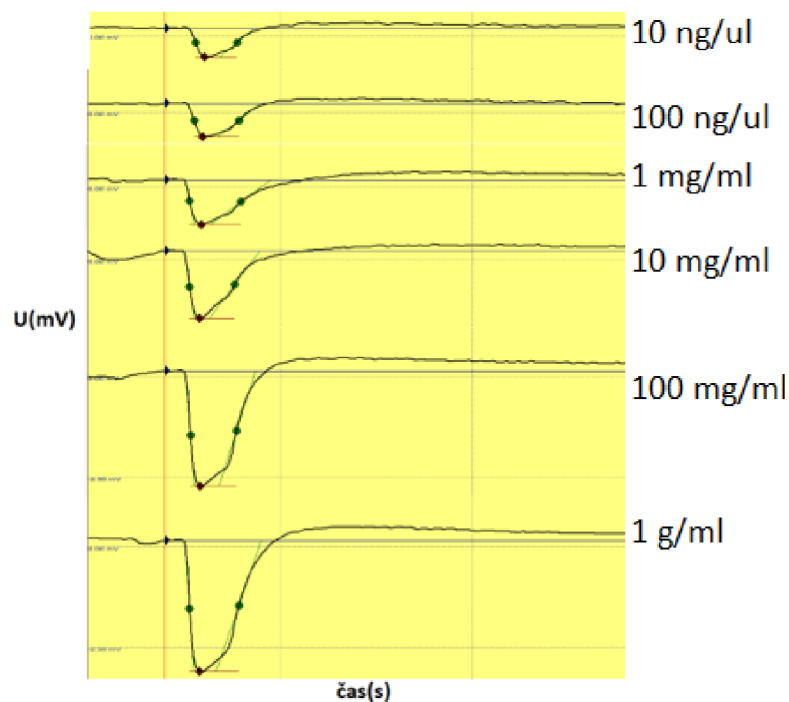
4.7 Samotná stimulace kůrovce

Zafixovaný kůrvec v elektroantenografu se následně manuálně přesune k ústí hrdla, které přivádí vlhčený vzduch, do kterého se přimíchává připravená látka, kterou máme v plánu měřit. Před měřením se ještě provede překrytí elektroantenografu Faradayovou klecí (viz. obrázek 16), která odhlučí okolní rušivé signály a díky které dosáhneme více vyrovnané křivky při následném vykreslení v počítačovém softwaru (viz. obrázek 10). V našem případě je klec tvořena prostou hliníkovou konstrukcí, s volným dnem a odnímatelnou střešou.

4.8 Měřicí protokol

Mezi jednotlivými stimulacemi byly určeny minutové intervaly. Důležité je dodržet jejich konzistentnost, kvůli následnému vyrovnání měřených pokusů (standardizace měření). Látka byla přimíchávána do proudu vzduchu ručně skrz pedál, který způsobil protlačení připraveného zásobníčku vzduchem a jeho následné přimísení do vlhčeného proudu vzduchu (vzduchový pulz iniciovaný zmáčknutím pedálu trvá 0,5 s). Samotný měřicí protokol potom vypadal následovně: Vzduch – parafinový olej – kůra – Alfa-pinen – *trans*-4-thujanol/1,8-cineol 10 pg/ul – jednotlivé zásobníčky s *trans*-4-thujanolem/1,8-cineolem zvyšující koncentraci o 1 řád – *trans*-4-thujanol/1,8-cineol 1 g/ml – vzduch – parafinový olej – kůra – alfa-pinen. Důvody takto sestaveného protokolu: standard na začátku a na konci nám umožnil pozorovat, jak se změnila citlivost tykadla v čase. Jelikož se jedná o mrtvý preparát, tak ztrácí postupně životnost. Díky standardům na začátku a konci následně můžeme standardizovat jednotlivá měření a výsledky jsou upraveny podle změny ve vnímavosti tykadla na standard, o kterém víme, jakou vyvolává odpověď. Vzduch a parafinový olej přidáváme, abychom viděli, jak velkou odezvu vyvolává mechanické podráždění tykadla. S těmito hodnotami následně srovnáváme nejnižší koncentrace zkoumané látky a díky tomu zjistíme prahovou hodnotu percepce této látky.

Obrázek 10. Příklad vývoje EAG odpovědi s rostoucí koncentrací



Poznámka: Důležité je postupovat od nejnižších koncentrací zkoumaných látek. Pokud bychom tykadlo vystavili extrémně koncentrovanému stimulu, tak by potom pravděpodobně nereagovalo na nízké koncentrace.

4.9 Vyhodnocovací software

Celá měřicí aparatura (EAG) je propojena s počítačovou jednotkou. Měření bylo zachyceno v programu EAGPRO. Tento program má výhodu v tom, že můžeme rovnou vidět základní statistické ukazatele a taktéž nám je tento program schopný vykreslit grafy. Odezva tykadla reprezentuje změnu elektrického potenciálu, která je vyjádřena v milivoltech. Pokud máme kůrovcový preparát vhodně fixován a odstranili jsme vliv okolních rušivých elementů prostřednictvím Faradayovy klece, tak v programu vidíme vyrovnanou přímkou s lineární tendencí. Po aplikování stimulu dochází k tomu, že se změni elektrické napětí mezi bází a špičkou tykadla a v programu je toto interpretováno vytvořením amplitudy (viz. obrázek 10). Délka zaznamenávání odpovídá deseti sekundám. První vteřinu a půl je přiváděn pouze vlhčený vzduch, následně se vykreslí případná změna elektrického potenciálu na tykadle díky aplikaci zkoumané látky, což trvá v závislosti na síle stimulu, jelikož se tykadlo musí vrátit do rovnovážného stavu. Následně měření probíhá dalších cca 7,5 vteřin, aby se zachytilo případné pozdější ovlivnění tykadla stimulem (celková délka záznamu odpovídá 10 sekundám). Do softwaru je možné nahrát předem připravenou tabulku stimulů. Důležité je brát zřetel na výskyt artefaktů, což jsou útvary, které s měřením nesouvisí. Většinou vznikají v důsledku zkratu elektroantenografu.

4.10 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byly využity softwarové programy Ms Excel a RStudio. Korelace dvou závislých veličin (koncentrace látky a velikost změny napětí) byla ověřena regresní analýzou v programu Excel. Spodní prahová hodnota, při které kůrovci danou látku vnímají, byla ověřena v programu RStudio za využití dvouparamterového t-testu v závislosti na síle předpokladů. Hodnota byla vypočítána pro každé pohlaví separátně. Zkoumaná látka byla porovnáována s odezvou na parafinový olej ze začátku měřícího protokolu, u kterého se předpokládá, že nevyvolá chemicky čichovou odpověď. Hypotéza

potvrzující sex specifické rozdíly (rozdíly ve vnímání konkrétní látky mezi pohlavím) byla ověřena dvouparametrovým t-testem. Rozdíly ve vnímání 1,8-cineolu a *trans*-4-thujanolu byly ověřeny dvouparametrovým t-testem. Test porovnával stejné pohlaví (*trans*-4-thujanol samec x 1,8- cineol samec). Hladina významnosti byla použita o hodnotě $\alpha = 0,05\%$. Jednotlivé grafy byly vyhodnoceny rovněž v programu Ms Excel.

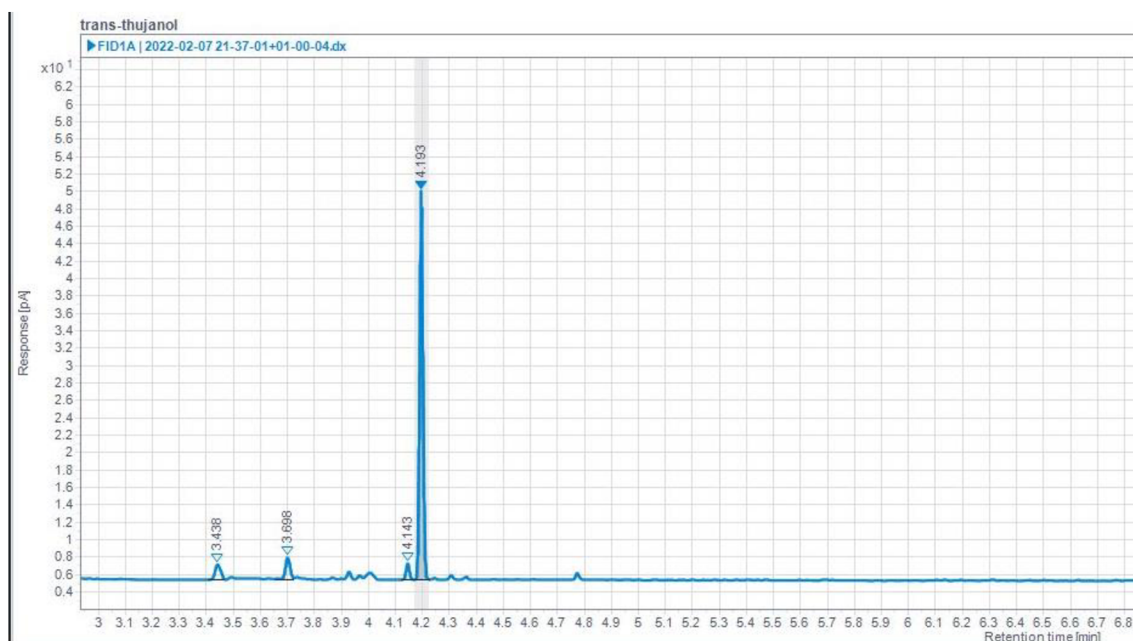
Výsledky

5.1 Ověření čistoty látek

5.1.1 Ověření čistoty *trans*-4-thujanolu metodou GC-FID

GC-FID analýza prokázala výskyt čtyř píků. Poměr jejich ploch odpovídá hodnotám 83,8:3,8:3:3,4. Pík samotného thujanolu zaujímá 83,8 procent z celkového povrchu píků. Ostatní viditelné spiky odpovídají určitému znečištění zhotoveného zásobníčku. Z toho vyplývá, že čistota námi používaného *trans*-4-thujanolu odpovídá 83,8 %. Plocha píku je 37,07 mm².

Graf 2 – Detail GC-MS analýzy *trans*-4-thujanolu



Graf 2 vyobrazuje grafické vyjádření čistoty *trans*-4-thujanolu. Šedivě označená látka je samotný thujanol. Na ose x je vyobrazený retenční čas (v minutách) – čas indikující, kdy došlo k registraci látky v FID. Látka byla zaznamenána v plameném-ionizačním detektoru v čase 4,17 min a doměřena byla v čase 4,23 min. Na ose y je velikost odpovědi, která je udávána v pikoampérech. Velikost odpovědi odpovídá přibližně 5,05 pA.

Tabulka 1. GC-FID analýza čistoty trans-4-thujanolu

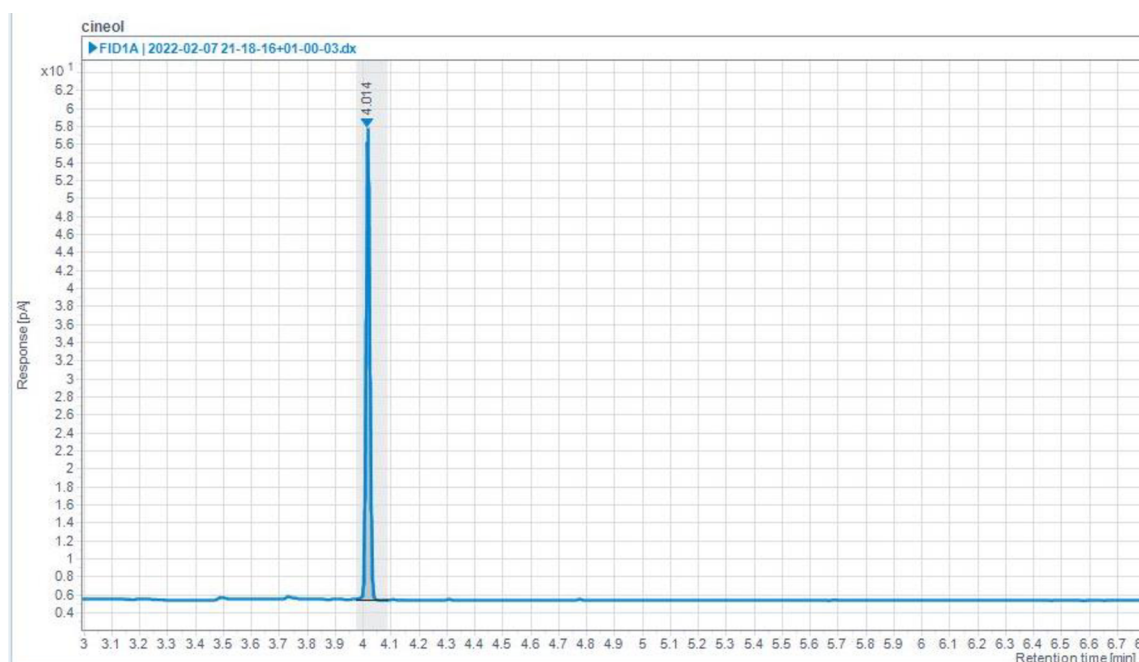
ID	jméno	Popis signálu	Retenční čas (min)	Area	Area (%)	Výška	Výška (%)	Začátek(min)	Konec(min)
1	thujanol	FID	3,438	2,532	5,722	1,781	3,492	3,406	3,467
2	thujanol	FID	3,698	2,965	6,701	2,541	4,981	3,653	3,721
3	thujanol	FID	4,143	1,68	3,797	1,995	3,911	4,12	4,17
4	thujanol	FID	4,193	37,071	83,780	44,692	87,61	4,17	4,227

Výsledky GC-FID analýzy. *Trans*-4-thujanol je označení zkoumané látky (výrobce Sigma-Aldrich) Plochy píků jsou vyjádřeny v mm², výška je vyjádřena rovněž v milimetrech.

5.1.2 Ověření čistoty 1,8-cineolu metodou GC-FID

GC-FID analýza pro 1,8-cineol obsahovala pouze 1 zaznamenaný pík. To znamená, že čistota 1,8-cineolu dosahuje téměř 100 %. Plocha tohoto píku je 48,651 mm².

Graf 3 – Detail GC-MS analýzy 1,8-cineolu



Graf 3 vyobrazuje grafické vyjádření čistoty 1,8-cineolu. Šedivě označená látka je samotný cineol. Na ose x je vyobrazený retenční čas (v minutách) – čas indukující, kdy došlo k zaznamenaní látky v FID. Látka byla registrována v plameném-ionizačním detektoru v čase 3,98 min a doměřena byla v čase 4,09 min. Na ose y je velikost odpovědi, která je udávána v pikoampérech. Velikost odpovědi odpovídá přibližně 5,8 pA.

Tabulka 2. GC-FID analýza čistoty 1,8-cineolu

ID	jméno	Popis signálu	Retenční čas (min)	Area	Area (%)	Výška	výška (%)	Začátek(min)	Konec(min)
1	1,8-cineol	FID	4,014	48,651	99	52,304	99	3,977	4,087

Výsledky GC-FID analýzy. 1,8-cineol je označení zkoumané látky (výrobce Sigma-Aldrich) Plochy píků jsou vyjádřeny v mm², výška je vyjádřena v mm.

5.2 Prahové hodnoty pro *trans*-4-thujanol a 1,8-cineol

Spodní prahové hodnoty byly rozděleny pro každou látku a každé pohlaví. Pro samce u *trans*-4-thujanolu vyšla jako první statisticky významná koncentrace 1 mg/ml. U samice byla tato hodnota nižší a bylo zjištěno, že jsou schopny vnímat látku již při koncentraci 100 ng/ul. U látky 1,8-cineol nebyl zjištěn rozdíl mezi prahovými hodnotami pro samce a samice. Koncentrace, která vyvolala statisticky významnou změnu elektrického potenciálu pro 1,8-cineol u samců byla 100 ng/ul. Samice byly schopné látku vnímat rovněž při koncentraci 100 ng/ul a více. Zároveň byla určena i saturační hodnota pro samice, a to při koncentraci 100 mg/ml 1,8-cineolu. Při zvyšující se koncentraci zde již nenarůstala odpověď a naopak byl zaznamenán pokles změny elektrického potenciálu.

Tabulka 3. *Trans*-4-thujanol

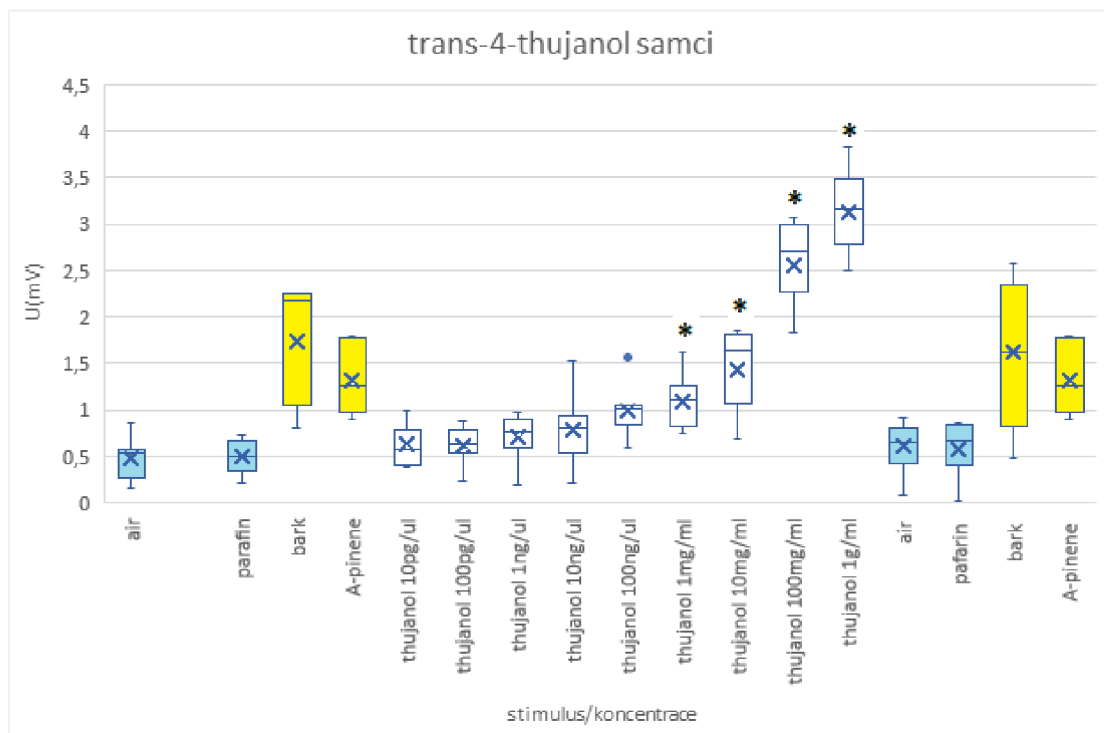
SAMCI	AVG	SM. ODCH	SAMICE	AVG	SM. ODCH
Vzduch	0,4853	0,247	Vzduch	0,3673	0,156
Parafínový olej	0,4950	0,176	Parafínový olej	0,3450	0,187
Kůra	1,7394	0,610	Kůra	1,3617	0,552
α -pinen	1,3253	0,350	α -pinen	1,2588	0,327
thujanol 10pg/ul	0,6253	0,236	thujanol 10pg/ul	0,6560	0,244
thujanol 100pg/ul	0,6153	0,223	thujanol 100pg/ul	0,6593	0,285
thujanol 1ng/ul	0,6993	0,284	thujanol 1ng/ul	0,6305	0,290
thujanol 10ng/ul	0,7927	0,425	thujanol 10ng/ul	0,6780	0,269
thujanol 100ng/ul	0,9876	0,318	thujanol 100ng/ul *	0,9880	0,371
thujanol 1mg/ml *	1,0916	0,318	thujanol 1mg/ml *	1,0707	0,395
thujanol 10mg/ml *	1,4379	0,433	thujanol 10mg/ml *	1,5460	0,410
thujanol 100mg/ml *	2,5644	0,317	thujanol 100mg/ml *	2,5113	0,651
thujanol 1g/ml *	3,1257	0,382	thujanol 1g/ml *	3,2205	0,601
Vzduch	0,6044	0,291	Vzduch	0,5680	0,263
Parafínový olej	0,5809	0,307	Parafínový olej	0,5538	0,272
Kůra	1,6173	0,806	Kůra	1,5633	0,464
α -pinen	1,3253	0,350	α -pinen	1,2360	0,338

Tabulka 4. 1,8-cineol

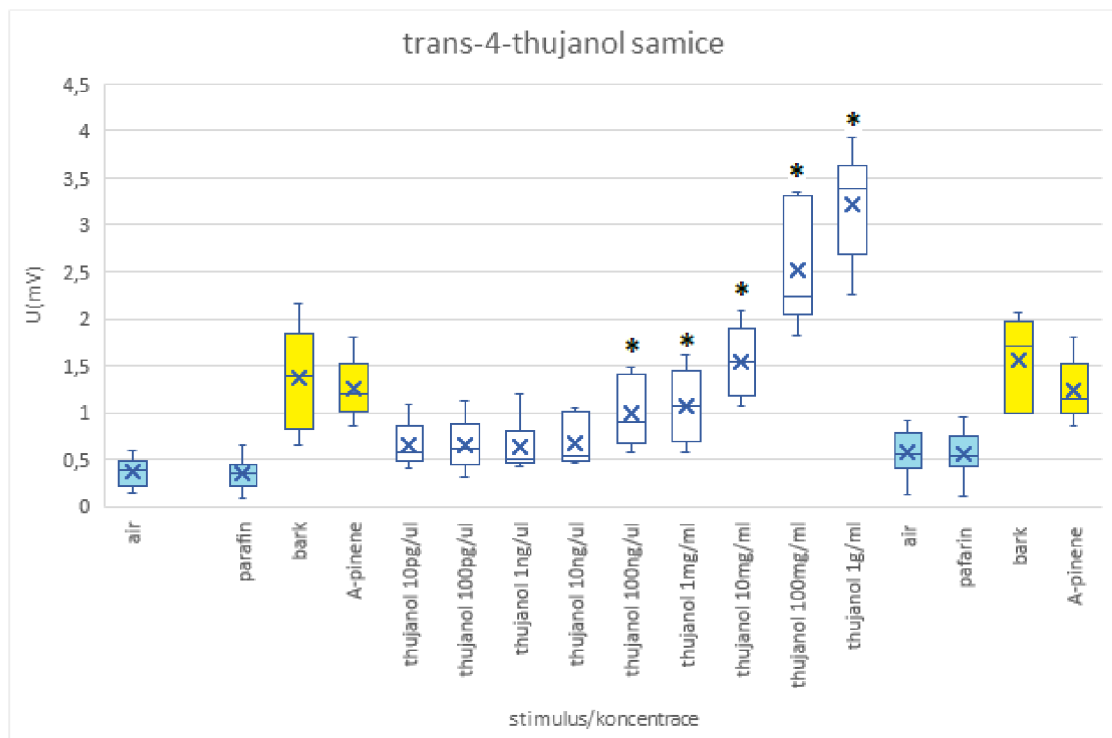
SAMCI	AVG	SM. ODCH	SAMICE	AVG	SM. ODCH
Vzduch	0,5650	0,463	Vzduch	0,9468	0,290
Parafínový olej	0,4602	0,247	Parafínový olej	1,1595	0,303
Kůra	3,5062	1,636	Kůra	3,8148	1,960
α -pinen	2,0462	0,630	α -pinen	2,7237	0,746
1,8-Cineol 10pg/ul	0,6883	0,318	1,8-Cineol 10pg/ul	1,2813	0,388
1,8-Cineol 100pg/ul	0,7443	0,281	1,8-Cineol 100pg/ul	1,4027	0,373
1,8-Cineol 1ng/ul	0,8628	0,575	1,8-Cineol 1ng/ul	1,5455	0,546
1,8-Cineol 10ng/ul	1,2268	0,647	1,8-Cineol 10ng/ul	1,7145	0,621
1,8-Cineol 100ng/ul *	1,5958	0,575	1,8-Cineol 100ng/ul *	2,3525	0,912
1,8-Cineol 1mg/ml *	2,2167	0,928	1,8-Cineol 1mg/ml *	2,6905	1,059
1,8-Cineol 10mg/ml *	2,6687	1,164	1,8-Cineol 10mg/ml *	3,2797	0,927
1,8-Cineol 100mg/ml *	3,3580	1,497	1,8-Cineol 100mg/ml *	3,7925	1,060
1,8-Cineol 1g/ml *	3,7632	1,694	1,8-Cineol 1g/ml *	3,5540	0,863
Vzduch	0,8352	0,403	Vzduch	1,2818	0,654
Parafínový olej	0,8425	0,363	Parafínový olej	1,4643	0,738
Kůra	2,7707	2,037	Kůra	3,4505	1,185
α -pinen	2,0462	0,630	α -pinen	2,7237	0,746

Tabulka 3 a tabulka 4 vyobrazují měřicí protokoly pro jednotlivé látky (průměrné EAG odpovědi uvedené v mV = AVG; směrodatné odchytky ze šesti měření uvedené v mV = SM. ODCH). Tabulky jsou rozděleny na EAG měření *trans*-4-thujanolu a 1,8-cineolu. Celkové počty měření *trans*-4-thujanol samec n = 6 měření, *trans*-4-thujanol samice n = 6 měření, 1,8-cineol samec n = 6 měření, 1,8-cineol samice n = 6 měření. Směrodatná odchytky vyjadřuje variabilitu u jednotlivých měření. Hodnoty, u kterých se nachází * jsou statisticky odlišné (dvouparametrový t-test, $\alpha = 0,05 \%$) od parafinového oleje, se kterým byly látky srovnány (1. parafinový olej z měřicího protokolu). Nejnižší koncentrace, u jednotlivých měření, kde se vyskytuje * je spodní prahová hodnota pro dané pohlaví. * vyjadřuje saturační koncentraci látky, po které se nadále odpověď na látku nezvyšuje. Hodnota saturace byla pozorována u 1,8-cineolu při koncentraci 100 mg/ml, pohlaví samice.

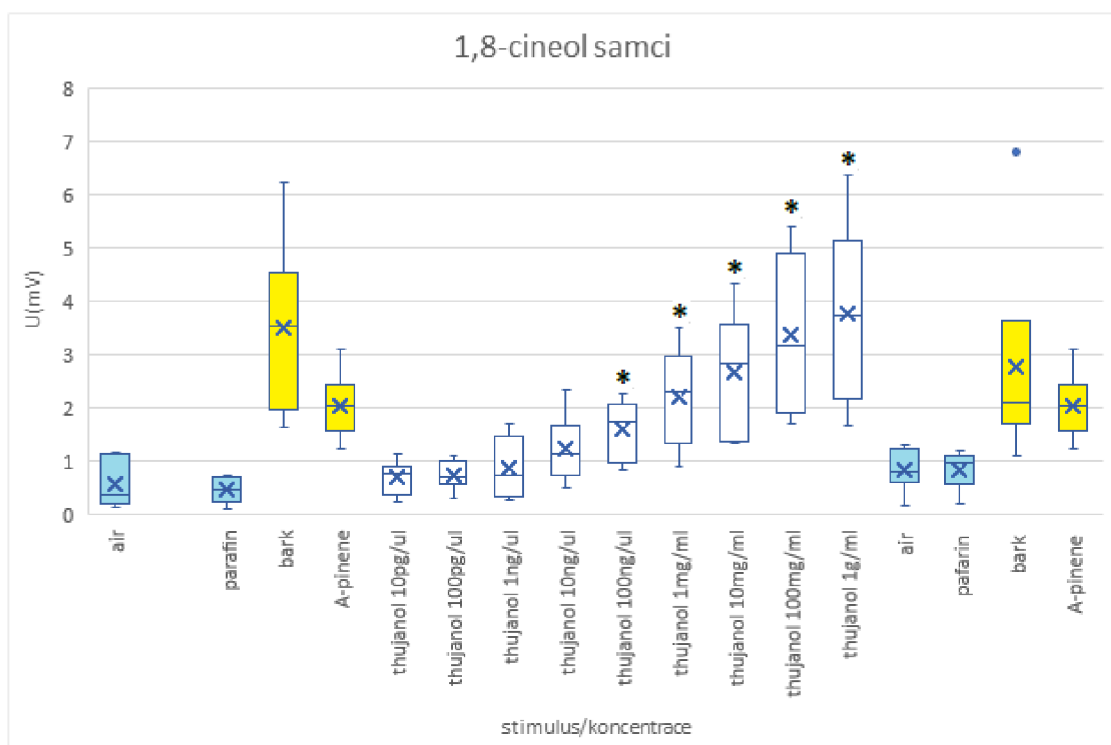
Graf 4. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro *trans*-4-thujanol – samci



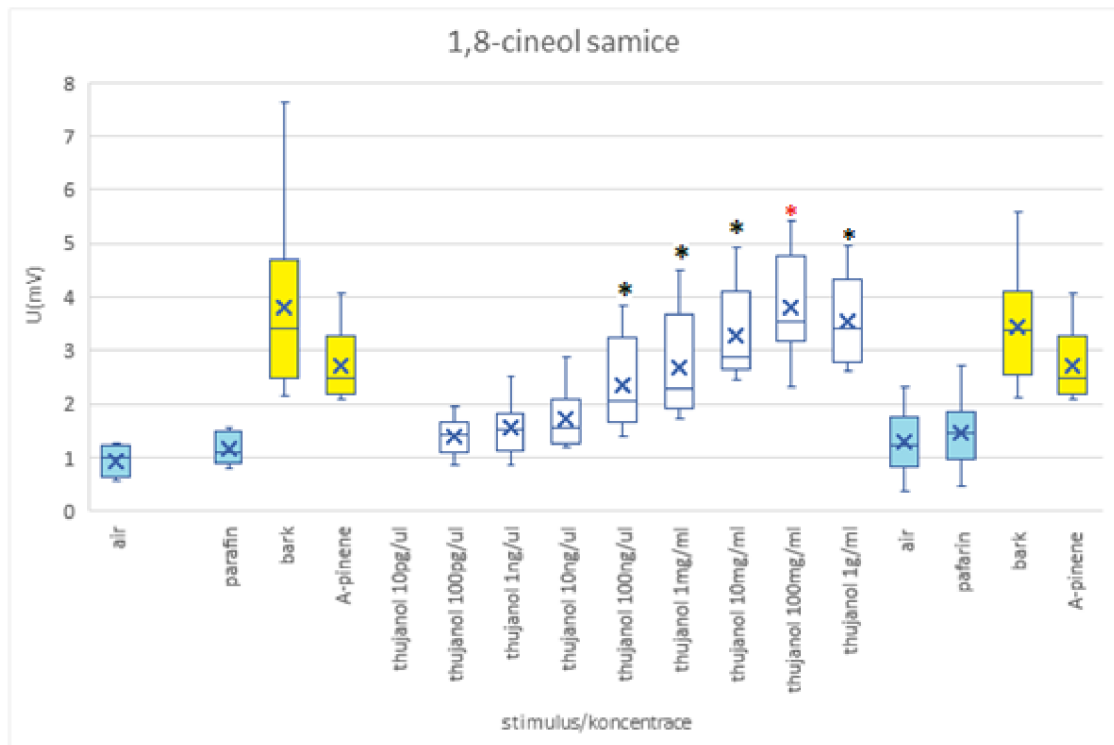
Graf 5. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro *trans*-4-thujanol - samice



Graf 6. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro 1,8-cineol – samci



Graf 7. Graf závislosti velikost EAG odpovědi na dávce pro 1,8-cineol - samice



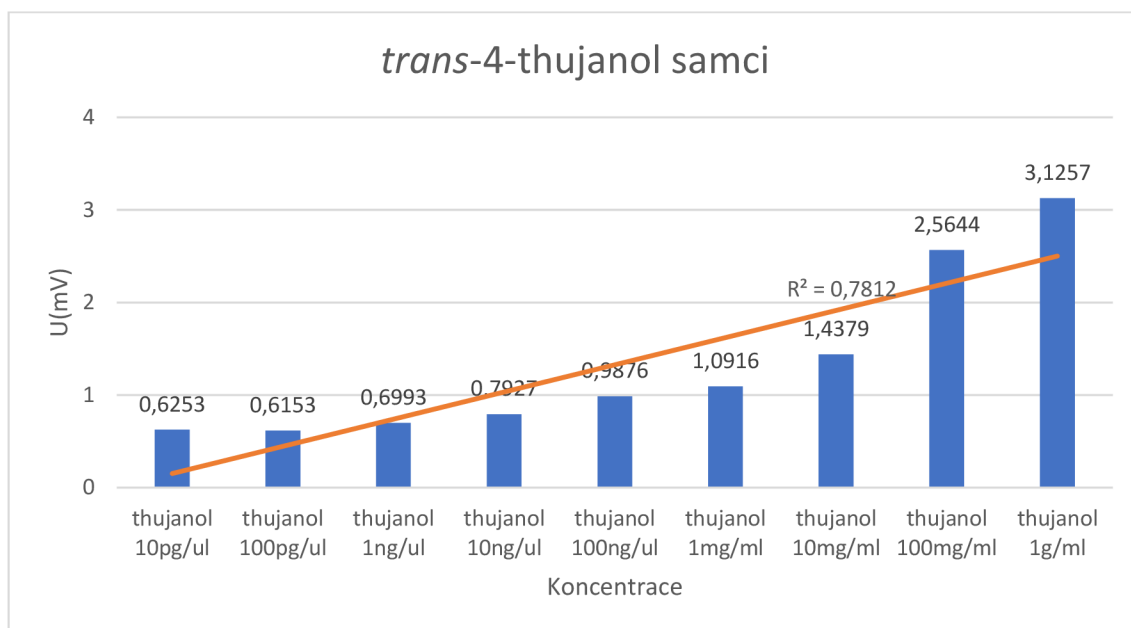
Graf 4, 5, 6 a 7 jsou grafickým vyjádřením tabulky 1 a tabulky 2. Vyjádření statisticky významného rozdílu (dvouparametrový t-test, $\alpha = 0,05$) mezi látkou o určité koncentraci a parafinovým olejem (počáteční stimulus parafinovým olejem) je vyobrazeno symbolem *. * vyjadřuje saturační hodnotu pro (100 mg/ml 1,8-cineolu – samičky). Na ose x je vyobrazený druh stimulu podle látky. Zkoumaná látka je na ose X rozdělena podle její koncentrace. Na ose y je vyobrazená velikost EAG odpovědi v milivoltech. Grafy jsou „color coated“, což znamená, že jsou jednotlivé druhy stimulu rozděleny barevně. Zásobníčky, u kterých se neočekává čichová EAG odpověď jsou tyrkysové, zásobníčky se standardy (α -pinen, kůra) jsou žluté a testovaná látka je vyobrazena bílou barvou.

Význam krabicového grafu: znak x označuje hodnotu aritmetického průměru, horizontální úsečka v boxu vyjadřuje hodnotu mediánu, vousy (vertikální úsečky) vyjadřují maximum a minimum ze statistického souboru, puntíky vyjadřují outlinery, což jsou hodnoty výrazně odlišné od zbylých měřených.

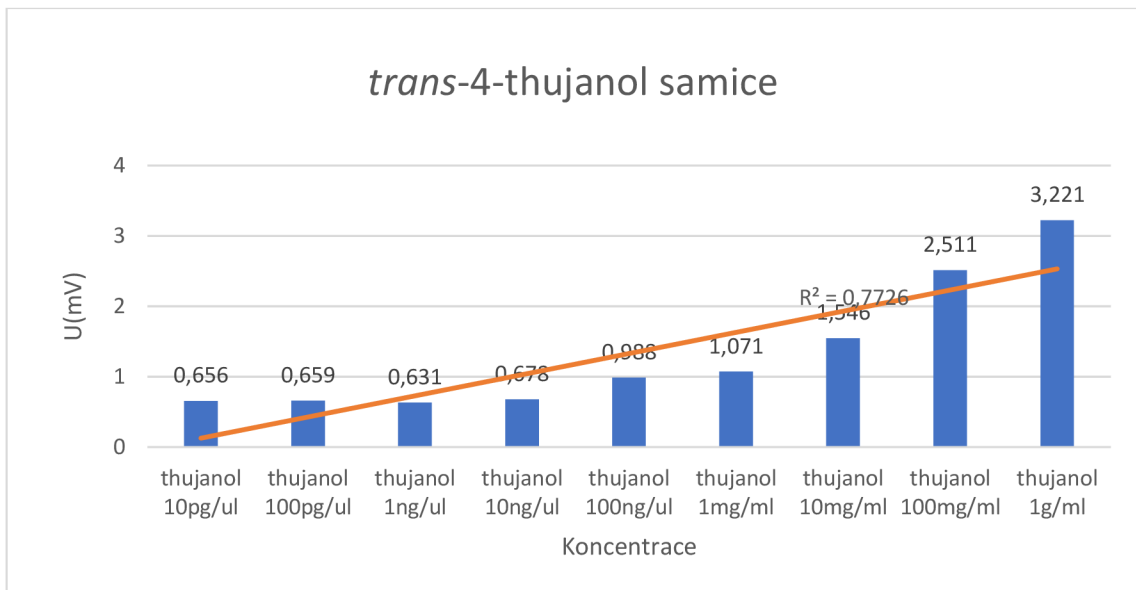
5.3 Statistická analýza korelace mezi koncentrací látky a zvyšující se EAG odpovědi

Statistická významnost byla zjišťována pomocí metody regresní analýzy. Statistická analýza byla provedena pro obě pohlaví pro *trans*-4-thujanol a 1,8-cineol zvlášť. Ve všech případech vyšší hodnota stimulace (množství nanesené látky na filtračním papírku) vyvolávala vyšší EAG odpověď. Byl zaznamenán pozitivní trend růstu. To znamená, že se zvyšující se koncentrací rostla rovněž velikost změny elektrického potenciálu po stimulaci tykadla danou látkou. Nejnižší závislost, ale stále velmi silná, byla změřena u *trans*-4-thujanolu vnímaného samicemi. Hodnota R^2 představuje hodnotu 0,77. Nejvyšší závislost byla zjištěna u samců, vnímajících látku 1,8-cineol. Zde regresní koeficient nabývá hodnoty $R = 0,95$. Pro *trans*-4-thujanol měřený na samcích hodnota představuje $R = 0,78$. A pro samice reagujících na 1,8-cineol $R = 0,94$.

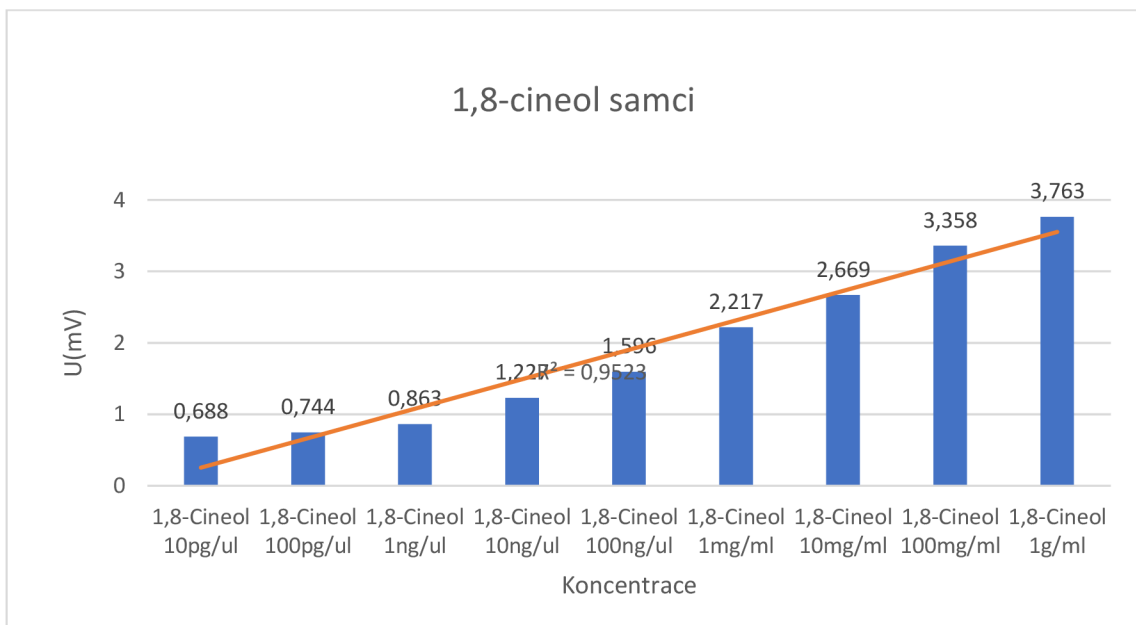
Graf 8. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u *trans*-4-thujanolu – samci



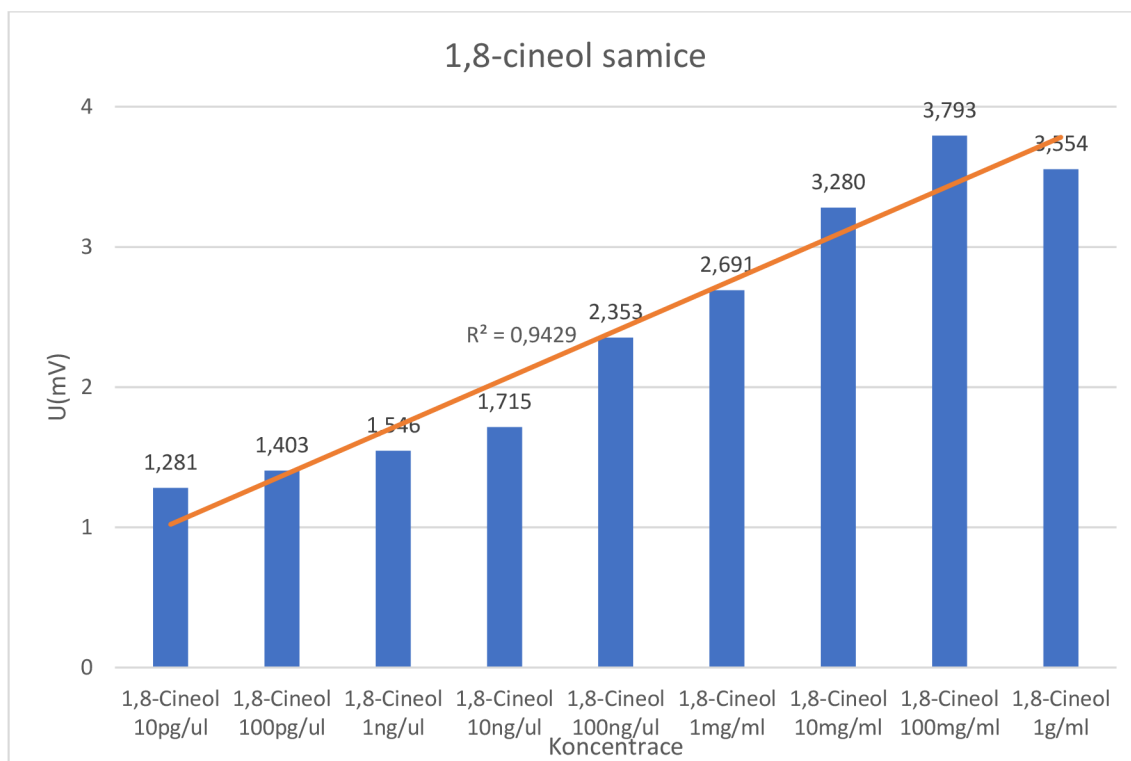
Graf 9. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u *trans*-4-thujanolu – samice



Graf 10. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u 1,8-cineolu – samice



Graf 11. Závislost mezi intenzitou stimulace a velikostí EAG odpovědi u 1,8-cineolu – samci

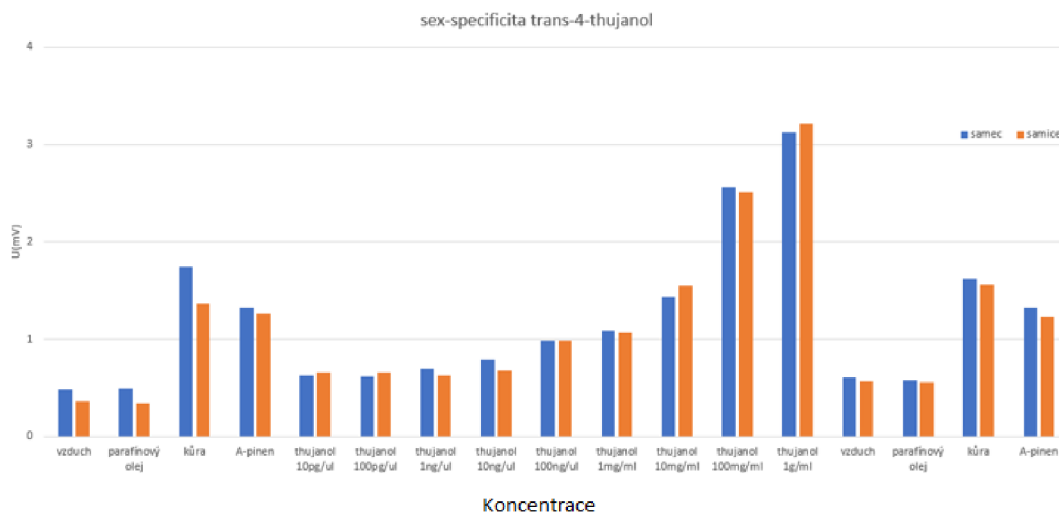


Graf 8, 9, 10 a 11 vyobrazuje regresní analýzu. Závislost je ověřována mezi jednotlivými látkami o různých koncentracích a velikostí odpovědi u tykadla. Hodnota R^2 vyjadřuje regresní koeficient. Ten nám vyjadřuje sílu závislosti (hodnoty -1;1. Kladné hodnoty ukazují rostoucí trend, záporné klesající trend. Čím vyšší je hodnota regresního koeficientu, tím je závislost silnější). Oranžová úsečka vyobrazuje tento trend graficky = regresní přímka. Grafy jsou rozděleny podle pohlaví a měřené látky. Na ose x jsou vyneseny jednotlivé koncentrace konkrétních látek a na ose y je vynesena velikost EAG odpovědi v milivoltech. Absolutní hodnoty EAG odpovědi jsou vyneseny nad každým příslušným sloupcem.

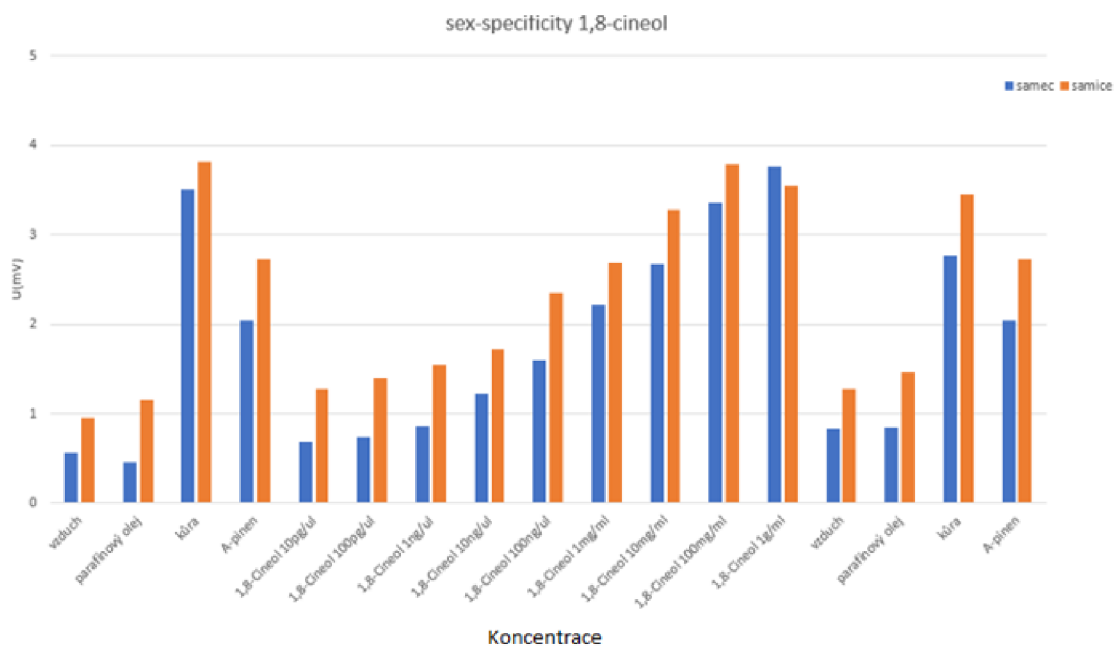
5.4 Sex-specifické rozdíly

Rozdíly ve vnímání látky o určité koncentraci rozdílným pohlavím byly vyhodnoceny prostřednictvím dvouparametrového t-testu. U *trans*-4-thujanolu ani u 1,8-cineolu nebyl prokázán statistický rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Graf 12. Sex specifické rozdíly ve vnímání *trans*-4-thujanolu



Graf 13. Sex specifické rozdíly ve vnímání 1,8-cineolu



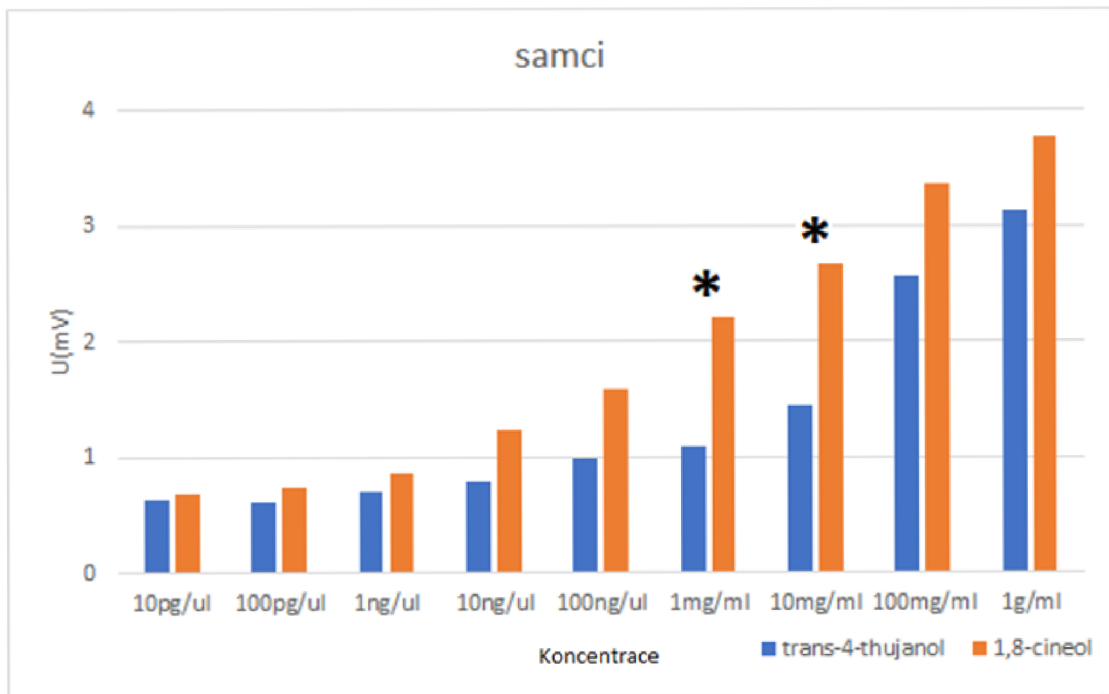
Graf 12 a graf 13 vyobrazují rozdíly ve vyvolaných čichových odpovědích mezi samci a samicemi. Modré sloupce představují měření provedených na samcích, oranžové sloupce

vyjadřují měření provedených na samicích. Symbol * vyjadřuje statisticky významný rozdíl ve vnímání mezi jednotlivými pohlavími (Mezi měřenými hodnotami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl). Hodnoty byly vyhodnoceny podle dvouparametrového t-testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05 \%$. Na ose x jsou vyneseny koncentrace konkrétních látek, na ose y je velikost EAG odpovědi v milivoltech.

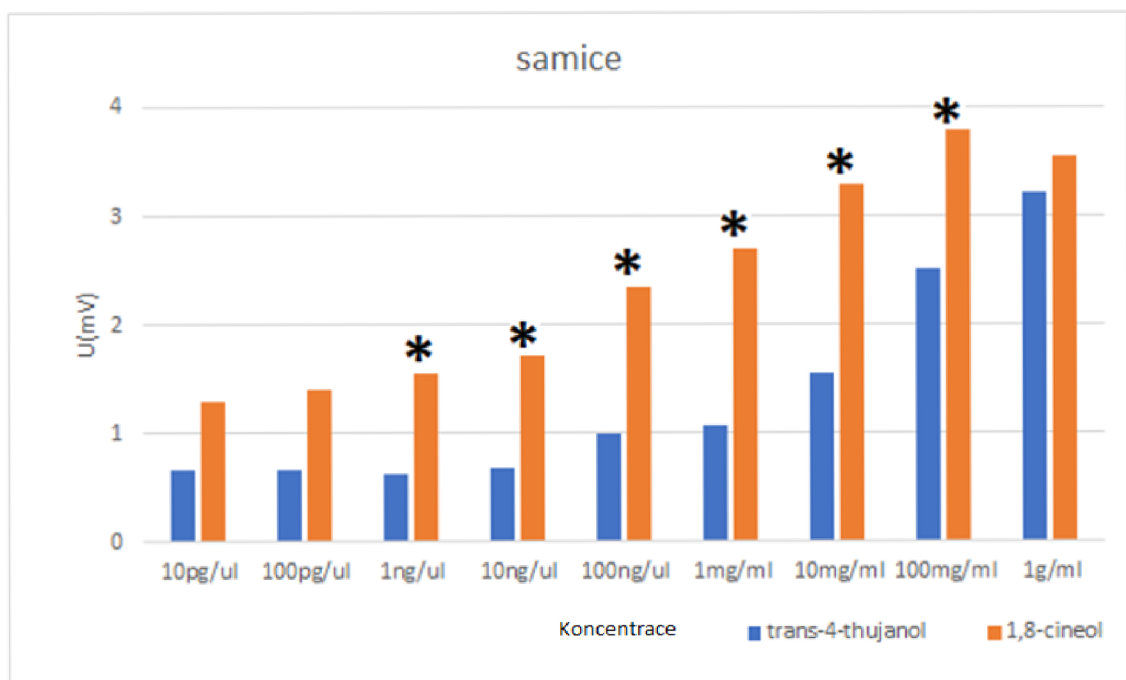
5.5 Rozdíly ve vnímání *trans*-4-thujanolu a 1,8-cineolu

Zjišťování rozdílu mezi jednotlivými látkami (*trans*-4-thujanolem a 1,8-cineolem) bylo vyhodnoceno dvouparametrovým t-testem. Rozdíl byl zjišťován pro každé pohlaví separátně. Pro samce byl rozdíl ve vnímání jednotlivých látek zjištěn u koncentrace 1 mg/ml a 10 mg/ml. Při těchto koncentracích jsou samci v laboratorních podmínkách více citliví na 1,8-cineol (1,8-cineol u nich vyvolá větší změnu receptorového potencionálu). Pro samice jsou rozdíly v citlivosti na látky výraznější. Samice jsou citlivější na 1,8-cineol v porovnání s *trans*-4-thujanolem při koncentracích 1 ng/ul, 10 ng/ul, 100 ng/ul, 1 mg/ml, 10 mg/ml 100 mg/ml. Opět u nich 1,8-cineol vyvolává vyšší EAG odpověď nežli *trans*-4-thujanol.

Graf 14. Rozdíly ve vnímání *trans*-4-thujanolu a 1,8-cineolu u samců



Graf 15. Rozdíly ve vnímání *trans*-4-thujanolu a 1,8-cineolu u samic



Na grafu 14 a 15 jsou látky rozděleny barevně (oranžová představuje 1,8-cineol, modrá představuje *trans*-4-thujanol). Grafy jsou rozděleny podle pohlaví. Statisticky významné rozdíly představuje symbol *. Statistická analýza byla provedena prostřednictvím dvouparametrového t-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05 \%$. Na ose x je uvedena koncentrace konkrétní látky na ose y je uvedena velikost EAG odpovědi v milivoltech.

Diskuse

Z výsledků je patrné, že v laboratorních podmínkách tykadla kůrovce *Ips typographus* reagují na *trans*-4-thujanol. Z toho plyne, že je tato látka čichovým systémem lýkožrouta smrkového vnímána a má tedy potenciál behaviorálně ovlivňovat jeho chování. Výzkum Jirošové a kol. z roku 2022 rovněž potvrdil, že po přidání *trans*-4-thujanolu k agregačnímu feromonu dojde ke snížení jeho atraktivity (ověřeno v polních podmínkách). To znamená, že látka v přírodě hraje významnou roli pro lýkožrouty smrkové při hledání vhodného hostitelského jedince. Kůrovci tato chemikálie v celkové směsi látek ve vzduchu evokuje přítomnost nevyhovujících porostů, které nejsou vhodnými kandidáty pro založení budoucí populace. Laima Blažytė-Čereškienė a kol., 2016 při měření v laboratorních podmínkách také odhalila, že je pro lýkožrouta smrkového *trans*-4-thujanol aktivním komponentem. Prahová hodnota je položena velice nízko, což znamená, že je kůrovec schopný látku vnímat při velice nízkých koncentracích. Zajímavé ale je, že prahová hodnota vnímání této látky nabývá nižších hodnot u samic (samice vnímají *trans*-4-thujanol při koncentraci 100 ng/ul; samci vnímají látku při koncentraci 1 mg/ml). Tento výsledek potvrzuje výsledky od Laima Blažytė-Čereškienė a kol., 2016., která rovněž uvádí, že jsou samice schopny vnímat látku při nižších koncentracích nežli samci. Jelikož je *Ips typographus* polygamní druh, tak hostitelského jedince vyhledává sameček, který následně láká samičky. Z toho důvodu je níže položená prahová hodnota *trans*-4-thujanolu u samiček zajímavou. Níže položená prahová hodnota pro tuto látku u samiček by mohla znamenat, že tato látka představuje pro samičky signál o nevhodnosti hostitele pro kladení vajíček. Protože se *trans*-4-thujanol nachází především u smrků mladšího věku, tak to může znamenat, že zde bude pouze úzká vrstva lýka. To je pro lýkožrouta smrkového nevhodné kvůli tomu, že je jeho tělo poměrně velké, a z toho důvodu jsou mladší porosty přenechávány menším druhům kůrovců jako například *Pityogenes chalcographus*. Lýkožrout smrkový dokonce přenechává korunové špičky smrků jiným jedincům právě z důvodu velkých rozměrů těla. *Trans*-4-thujanol řadíme mezi hostitelské látky repelentní povahy, z čehož vyplývá, že by měl více afektovat pionýrské kůrovce (samečky), protože právě ti osidlují nové stanoviště a tudíž by měli intenzivněji analyzovat hostitelské vůně. V kontrastu prahových hodnot je nutno zmínit, že nebyla nalezena hodnota saturace pro *trans*-4-thujanol. Hodnota saturace představuje koncentraci látky, při jejímž zvýšení nedojde ke zvýšení odpovědi. Změna receptorového potenciálu na tykadle se zvyšující

koncentrací látky nemění. Zůstává konstantní nebo se zvyšuje pouze minimálně. Rovněž může dojít k poklesu změny elektrického potenciálu mezi hodnotou saturace a koncentrací o řád vyšší z důvodu adaptace tykadla (viz. 1,8-cineol samičky). Nemožnost nalezení hodnoty saturace pro *trans*-4-thujanol spočívala v obtížnosti rozpouštění látky o vyšší koncentraci než 1 g/ml, jelikož se thujanol vyskytuje na naší fakultě, fakultě lesnické a dřevařské (Česká zemědělská univerzita v Praze) v pevném skupenství. Pevné skupenství této látky jde překonat pouze při vyšších teplotách. Laboratorními šetřeními bylo prokázáno, že *trans*-4-thujanol u kůrovců vyvolává slabší odpověď než 1,8-cineol. Toto tvrzení platí pouze u určitých koncentrací. Rovněž z měření vyplynulo, že samice vnímá 1,8-cineol (v porovnání s *trans*-4-thujanolem) intenzivněji nežli sameček (prokázáno u většího množství koncentrací). Z výsledků studie od Jirošové a kol., 2022 vyplynulo, že *trans*-4-thujanol a 1,8-cineol vyvolávají velice podobnou odezvu (při stejné koncentraci látek), což výsledky této práce nepotvrzují. Z výsledků této práce vyplývá, že je reakce na 1,8-cineol statisticky významnější než velikost odpovědi vyvolaných *trans*-4-thujanolem. Rozdíl ve vnímání mezi pohlavím u *trans*-4-thujanolu nebyl prokázán na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, ačkoliv bylo zjištěno, že samice jsou schopny vnímat látku již při koncentraci 100 ng/ul (na rozdíl od samečků 1 mg/ml). U měření elektroantenografických odpovědí u látky 1,8-cineol nebyl odhalen rozdíl u spodní prahové hodnoty. (u tykadla samce i samice byla významná odpověď zaznamenána již při koncentraci 100 ng/ul), což se neshoduje se závěrem práce od Jirošové a kol. z roku 2022, kde vyplynulo, že je 1,8-cineol efektivnější pro samečky nežli pro samičky. Nízko položená prahová hodnota pro 1,8-cineol může poukazovat na významnost této látky. Jedná se o chemikálii repelentní povahy, která dokáže již při nízkých koncentracích inhibovat atraktivitu lýkožrouta smrkového na dvousložkový agregační feromon. Tato látka rovněž kůrovcům značí, že se jedná o jedince nevhodného, kterému by se měli raději vyhnout, protože není ideálním kandidátem pro reprodukci (Andersson, 2009). Sex specifické rozdíly ve vnímání 1,8-cineolu rovněž nebyly nalezeny.

Problémem při ověřování sex specifických rozdílů pro obě látky je variabilita mezi odpověďmi každého zkoumaného subjektu. Stimulace látkou o stejné koncentraci vyvolá u různých jedinců různou odpověď v závislosti na jejich stáří, vitálním stavu, atd... Tuto nesrovnalost rovněž umocňuje standardizace dat, která úměrně upraví jednotlivá měření podle změny velikosti vyvolané čichové odpovědi na zvolený standard v průběhu měření.

To způsobí numerické upravení hodnot i pro parafinový olej, který by ale měl zůstat konstantní. Standardně se uvažuje pokles aktivity tykadla, takže velikost čichové odpovědi na α -pinen klesne. Standardizací dojde k vyrovnání velikosti odpovědi na α -pinen na začátku a na konci, čímž dojde rovněž ke zvýšení velikosti EAG odpovědi na parafinový olej, se kterým byly hodnoty porovnávány. Konkrétním příkladem je rozdíl ve vnímání parafinového oleje mezi pohlavím u protokolu pro 1,8-cineol (viz. graf 7). Změna elektrického potenciálu mezi pohlavím po stimulaci kontrolním zásobníčkem s parafinem představuje významný rozdíl, který by zde však být neměl – jedná se o látku, která pro kůrovce nemá význam, tudíž nedochází k aktivaci čichových receptorů a nemělo by docházet k vyvolání různě velké odpovědi. Poměr mezi měřenými látkami, případně různými koncentracemi, však zůstává směrodatný. Tudíž by měly být údaje o prahových hodnotách a dose responsivních křivkách správné. Pro obě látky (1,8-cineol a *trans*-4-thujanol) byla zaznamenána přímá závislost mezi zvyšující se dávkou a velikostí změny elektrického potenciálu na tykadle (vyvolané odpovědi). Silnější korelace mezi zvyšující se koncentrací zkoumané látky a velikostí vyvolané čichové odpovědi byla u 1,8-cineolu. To by mohlo znamenat, že větší koncentrace daných látek v perimetru tykadla kůrovce značí větší nevhodnost hostitelů na stanovišti, což potvrzují polní experimenty Jirošové a kol., 2022, kde bylo zjištěno, že s rostoucí dávkou *trans*-4-thujanolu dochází k silnější inhibici aktivity lýkožrouta smrkového na agregační feromon.

Jelikož bylo při testech použito pouze 6 jedinců od každého pohlaví pro konkrétní látku, tak výsledky můžou obsahovat určitou chybovost z důvodu malého měřeného statistického souboru dat. Tato chyba by se snižovala s přibývajícimi měřeními.

Jelikož se jednalo o laboratorní experimenty, nelze na jejich základě potvrdit behaviorální aktivitu pro kůrovce. Rovněž nelze určit význam látky pro konkrétní čichové receptorové neurony. Jelikož docházelo k přiložení elektrody na velkou část tykadla, a tudíž bylo do měření zaujato velké množství senzil. Kvůli možnému zaujetí většího počtu čichových receptorových neuronů naladěných ve prospěch jedné z měřených látek nelze určit konkrétní velikost odpovědi jedním čichovým receptorovým neuronem. Samotný poměr těchto senzil rovněž není rovnoměrný. Podle Anderssona a kol., 2009 se nachází na tykadle 7 čichových senzil naladěných na 1,8-cineol. Tyto se nachází především v distální oblasti tykadla. Počet čichových receptorových neuronů pro *trans*-4-thujanol není přesně známý.

Závěr

V této práci byly naplněny stanovené cíle. Bylo zjištěno, že *trans*-4-thujanol hraje neopominutelnou roli při čichové orientaci u kůrovce smrkového. Sex-specifické rozdíly vyplývající ze statické analýzy byly neprůkazné, ačkoliv bylo zjištěno, že je samice schopna vnímat *trans*-4-thujanol při velice nízkých koncentracích. Pro 1,8-cineol je trend jiný – samice i samci vnímají látku od koncentrace 100 ng/ul. Velikost vyvolané odpovědi je, podle předpokladů, úměrná koncentraci dané látky. *Trans*-4-thujanol je pro lýkožrouta smrkového velmi významnou látkou, avšak velikost vyvolaných odpovědí nedosahuje velikostem vyvolaných odpovědí u 1,8-cineolu. U 1,8-cineolu byly vyvolané odpovědi ve velkém množství případů statisticky významnější v porovnání s *trans*-4-thujanolem. Budoucí studie, které by mohly z této práce vycházet, by měly zaměřit svou pozornost na získávání odpovědí z konkrétních senzil, laděných na *trans*-4-thujanol. Behaviorální vliv této látky v kombinaci s jinými látkami z prostředí by měl být v budoucnu rovněž prověřen, jelikož kůrovci neprovádí rozhodnutí pouze s přihlédnutím na jednu konkrétní látku, ale vyhodnocují komplexní směsi látek, které se v prostředí nacházejí. To znamená, že látka sama o sobě nemusí mít v přírodě na zkoumaný organismus vliv.

Seznam příloh

Vyhláška 76/2018. *EAgri* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2018 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z:

https://eagri.cz/public/web/ws_content?contentKind=regulation&id=90183&name=76/2018

Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství 2020. *EAgri* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2021 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z:

https://eagri.cz/public/web/file/688968/Zprava_o_stavu_lesa_2020_web.pdf

Metodická příručka integrované ochrany rostlin pro lesní porosty. *VULHM* [online]. Marie Zahradníková & Petr Zahradník, 2019 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z:

https://www.vulhm.cz/files/uploads/2019/06/Seznam-PCHP-2019_5-FINAL-lq.pdf

ČHMU [online]. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z:

https://www.chmi.cz/files/portal/docs/meteo/ok/klimazmena/files/cc_chap10.pdf

Výskyt lýkožrouta severského (*Ips duplicatus* Sahlberg, 1836) (Coleoptera: Scolytidae) na LS Bruntál LČR, s. p., v roce 2004 – 2005. *Zpravodaj ochrany lesa* [online]. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jíloviště-Strnady: Jaroslav Holuša, Pavla Voigtová, Emanuel Kula, Štěpán Křístek, 2006 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z:

https://www.vulhm.cz/files/uploads/2019/12/2006_ZOL_13_IDu.pdf

Data Sheets on Quarantine Pests *Ips typographus* [online]. EU: CABI and EPPO [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://1library.net/document/yjmm196y-data-sheets-on-quarantine-pests-ips-typographus.html>

Data Sheets on Quarantine Pests *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology* [online]. Swedish University of Agricultural Sciences: Martin N. Andersson *, Mattias C. Larsson, Fredrik Schlyter, 2009 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-insect-physiology>

Mechanisms of Odor Coding in Coniferous Bark Beetles: From Neuron to Behavior and Application. *Ecological Interactions of Bark Beetles with Host Trees* [online]. Department of Biology, Lund University, 223 62 Lund, Sweden: Martin N. Andersson, 2012 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-insect-physiology>

ELECTROANTENNOGRAPHY a practical introduction [online]. Kirchzarten, Germany: Syntech, 2015 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: http://www.ockenfels-syntech.com/wp-content/uploads/EAGpract_man_fin

Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.). *Silvarium Lesní ochranná služba* [online]. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i: Petr Zahradník, Marie Geráková, 2010 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2010/2010_lykozrout.pdf

Schlyter F, Cederholm I (1981) Separation of the sexes of living spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae). *Z Angew Entomol* 92:42–47. doi:[10.1111/j.1439-0418.1981.tb01650.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1981.tb01650.x)

Novak J, Bitsch C, Langbehn J, Pank F, Skoula M, Gotsiou Y, Franz CM (2000) Ratios of *cis*- and *trans*-sabinene hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum* (Bentham) Vogel. *Biochem Syst Ecol* 28:697–704. doi:[10.1016/S0305-1978\(99\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00098-8)

Novak M, Krajnc AU, Lah L, Zupanec N, Kraševac N, Križman M, Bohlmann J, Komel R (2014) Low-density *Ceratocystis polonica* inoculation of Norway spruce (*Picea abies*) triggers accumulation of monoterpenes with antifungal properties. *Eur J For Res* 133:573–583. doi:[10.1007/s10342-013-0772-4](https://doi.org/10.1007/s10342-013-0772-4)

Blažytė-Čereškienė, L., Apšegaitė, V., Radžiūtė, S. et al. Electrophysiological and behavioural responses of *Ips typographus* (L.) to *trans*-4-thujanol—a host tree volatile compound. *Annals of Forest Science* **73**, 247–256 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0494-5>

Anti-attractant activity of (+)-*trans*-4-thujanol for Eurasian spruce bark beetle *Ips typographus*: Novel potency for females. *Pest Management Science* [online]. Anna Jirošová a kol., 2022 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6819?saml_referrer

Schlyter, F., Birgersson, G. & Leufvén, A. Inhibition of attraction to aggregation pheromone by verbenone and ipsenol. *J Chem Ecol* **15**, 2263–2277 (1989). <https://doi.org/10.1007/BF01014114>

Schiebe, C., Unelius, C.R., Ganji, S. et al. Styrene, (+)-*trans*-(1*R*,4*S*,5*S*)-4-Thujanol and Oxygenated Monoterpenes Related to Host Stress Elicit Strong Electrophysiological Responses in the Bark Beetle *Ips typographus*. *J Chem Ecol* **45**, 474–489 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01070-8>

Nowińska A, Brożek J. Morphological study of the antennal sensilla in Gerromorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Zoomorphology*. 2017;136(3):327-347. doi: 10.1007/s00435-017-0354-y. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28883684; PMCID: PMC5563518.

Andersson, Martin (2011). *Olfaction in the Spruce Bark Beetle, Ips typographus*. Diss. (sammanfattning/summary) Alnarp, Sweden : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, 1652-6880 ; 2011:4. <https://pub.epsilon.slu.se/2428/>

M. Stranden, A.-K. Borg-Karlson, H. Mustaparta, Receptor Neuron Discrimination of the Germacrene D Enantiomers in the Moth *Helicoverpa armigera*, *Chemical Senses*, Volume 27, Issue 2, February 2002, Pages 143-152, <https://doi.org/10.1093/chemse/27.2.143>

Elissa A. Hallem, John R. Carlson, Coding of Odors by a Receptor Repertoire, *Cell*, Volume 125, Issue 1, 2006, Pages 143-160, ISSN 0092-8674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.050>.

Andersson MN, Larsson MC, Schlyter F. Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: single-cell responses to ecologically relevant odors. *J Insect Physiol*. 2009 Jun;55(6):556-67. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.01.018. Epub 2009 Feb 21. PMID: 19233334.

Everaerts C., Grégoire JC., Merlin J. (1988) The Toxicity of Norway Spruce Monoterpenes to Two Bark Beetle Species and Their Associates. In: Mattson W.J., Leveux J., Bernard-Dagan C. (eds) *Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3828-7_23

Diane Martin, Dorothea Tholl, Jonathan Gershenzon, Jörg Bohlmann, Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems, *Plant Physiology*, Volume 129, Issue 3, July 2002, Pages 1003–1018, <https://doi.org/10.1104/pp.011001>

Bohlmann J, Croteau R. Diversity and variability of terpenoid defences in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (*Abies grandis*). *Novartis Found Symp*. 1999;223:132-45; discussion 146-9. doi: 10.1002/9780470515679.ch9. PMID: 10549552.

Blood levels of 1,8-cineol and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil. *FULL PAPERS* [online]. Kovar a kol., 1987 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: doi:10.1055/s-2006-962725.

Sadlon, Angela E., and Davis W. Lamson. "Immune-modifying and antimicrobial effects of eucalyptus oil and simple inhalation devices." *Alternative Medicine Review*, vol. 15, no. 1, Apr. 2010, pp. 33+. Gale Academic OneFile, link.gale.com/apps/doc/A225739691/AONE?u=anon~af3ee7fc&sid=googleScholar&xid=05ddc318. Accessed 2 Apr. 2022.

Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineol a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy research* [online]. Santos a kol., 2000 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200006\)14:4<240::AID-PTR573>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200006)14:4<240::AID-PTR573>3.0.CO;2-X)

Biological activity of 1,8 cineol, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *Journal of applied entomology* [online]. Obeng-Ofori a kol., 2009 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01399.x>

Biosynthesis of Monoterpenes: Partial Purification, Characterization, and Mechanism of Action of 1,8-Cineol Synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. R. Croteau, W.R. Alonso, A.E. Koepf, M.A. Johnson, 1994, Pages 184-192 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1101>.

Johansson, A., Birgersson, G. & Schlyter, F. Using synthetic semiochemicals to train canines to detect bark beetle-infested trees. *Annals of Forest Science* **76**, 58 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0841-z>

Lýkožrout menší *Ips amitinus* (Eichhoff, 1871). *Silvarium Lesní ochranná služba* [online]. Jan Lubojacký, 2012 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2012/2012_lykozrout_mensi.pdf

Lýkožrout lesklý *Pityogenes chalcographus* (L.). *Silvarium Lesní ochranná služba* [online]. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jíloviště-Strnady: Petr Zahradník, 2007 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2007/2007_lykozrout_leskly.pdf

Kůrovci na jehličnanech. *Silvarium Lesní ochranná služba* [online]. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jíloviště-Strnady: Petr Zahradník a Miloš Knižek, 2004 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2004/2004_kurovci.pdf

Saint-Germain, Michel & Buddle, Christopher & Drapeau, Pierre. (2007). Primary attraction and random landing in host-selection by wood-feeding insects: A matter of scale?. *Agricultural and Forest Entomology*. 9. 227 - 235. 10.1111/j.1461-9563.2007.00337.x.

An encounter rate model of bark beetle populations searching at random for susceptible host trees [online]. Alnarp, Sweden: John A. Byers, 1995 [cit. 2022-04-03].

Strukturní vzorec eukalyptolu [online]. 2005 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Eukalyptol#/media/Soubor:Eucalyptol.png>

Sabinene [online]. 2021 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Sabinene#/media/File:Sabinene_Biosynthesis.jpg

Kurovcoveinfo.cz: Lýkožrout smrkový - *Ips typographus* [online]. Lesní ochranná služba, Lesnická práce [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.kurovcoveinfo.cz/skudci/lykozrout-smrkovy>

Pityophthorus pityographus [online]. Česko, Sruby: Jakub Horák, 2005 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/image/id22767/>

LUBOJACKÝ, Jan, Miloš KNÍŽEK a Jan LIŠKA. Ochrana lesa před kůrovci na smrku pro menší lesní majetky. *Lesní ochranná služba* [online]. 2019 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2019/2019_LOS_1904%20letak_kurovec3.pdf

ZAHRADNÍK, Petr a Marie ZAHRADNÍKOVÁ. The relationships between *Pityogenes chalcographus* and *Nemosoma elongatum* in clear-cuts with different types of management. *Czech academy of agricultural sciences* [online]. 2020 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.17221/5/2018-PPS>

ZAHRADNÍK, Petr a Miloš KNÍŽEK. Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.). *Lesní ochranná služba* [online]. 2007 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: https://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2007/2007_lykozrout_smrkovy.pdf

KALINOVÁ, Blanka, Radka BŘÍZOVÁ, Miloš KNÍŽEK, Marek TURČÁNI a Michal HOSKOVEC. Volatiles from spruce trap-trees detected by *Ips typographus* bark beetles: chemical and electrophysiological analyses. *Arthropod-Plant Interactions* [online]. 2014 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:DOI 10.1007/s11829-014-9310-7

Byers, John. (1995). Host-Tree Chemistry Affecting Colonization in Bark Beetles. 10.1007/978-1-4615-1765-8_5.

ANDERSSON, Martin. *Olfaction in the Spruce Bark Beetle, Ips typographus* [online]. Alnarp, Sweden, 2011 [cit. 2022-04-09]. ISSN 1652-6880.

Hulcr, Jiri & Atkinson, Thomas & Cognato, Anthony & Jordal, Bjarte & Mckenna, Duane. (2015). Morphology, Taxonomy and Phylogenetics of Bark Beetles. 10.1016/B978-0-12-417156-5.00002-2.

SHI, Xia, Su-Fang ZHANG, Fu LIU, Zhen ZHANG, Fang-Ying XU, Shu-Yan YIN a Xiang-Bo KONG. *Sensilla on antennae and mouthparts of adult spruce bark beetle Ips typographus (Coleoptera: Curculionidae)* [online]. 2021 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1002/jemt.23704

Andersson MN, Grosse-Wilde E, Keeling CI, Bengtsson JM, Yuen MM, Li M, Hillbur Y, Bohlmann J, Hansson BS, Schlyter F. Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in the tree killing bark beetles, *Ips typographus* and *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). BMC Genomics. 2013 Mar 21;14:198. doi: 10.1186/1471-2164-14-198. PMID: 23517120; PMCID: PMC3610139.

Mentem [online]. 2015 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.mentem.cz/blog/neuron/>

Dendrite [online]. Wikipedia, 2022 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.mentem.cz/blog/neuron/>

AGELOPOULOS, Nicky, Michael A BIRKETT, Alas tair J HICK, et al. *Exploiting semiochemicals in insect control¹: Pesticide Science* [online]. Biological and Ecological Chemistry Department, IACR-Rothams ted, Harpenden, Herts ,AL5 2JQ UK, 1999 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199903\)55:3<225::AID-PS887>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199903)55:3<225::AID-PS887>3.0.CO;2-7)

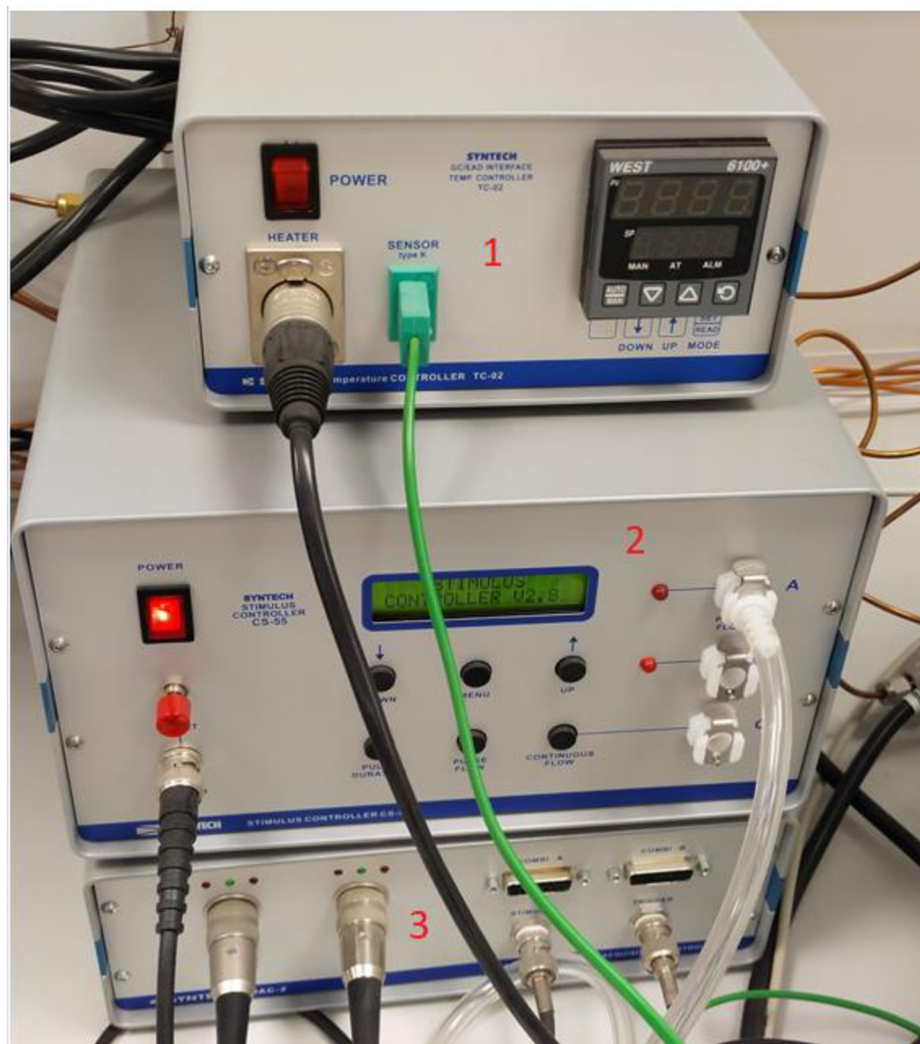
Mass spectrometry [online]. Khan academy, 2019 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-chemistry-beta/x2eef969c74e0d802:atomic-structure-and-properties/x2eef969c74e0d802:mass-spectrometry-of-elements/v/mass-spectrometry>

RAMAKRISHNAN, Rajarajan, Jaromír HRADECKÝ, Amit ROY, et al. Metabolomics and transcriptomics of pheromone biosynthesis in an aggressive forest pest *Ips typographus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2022 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103680

CARRASCO, David, Mattias C LARSSON a Peter ANDERSON. Insect host plant selection in complex environments. *Current Opinion in Insect Science* [online]. 2015, Pages 1-7 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.014

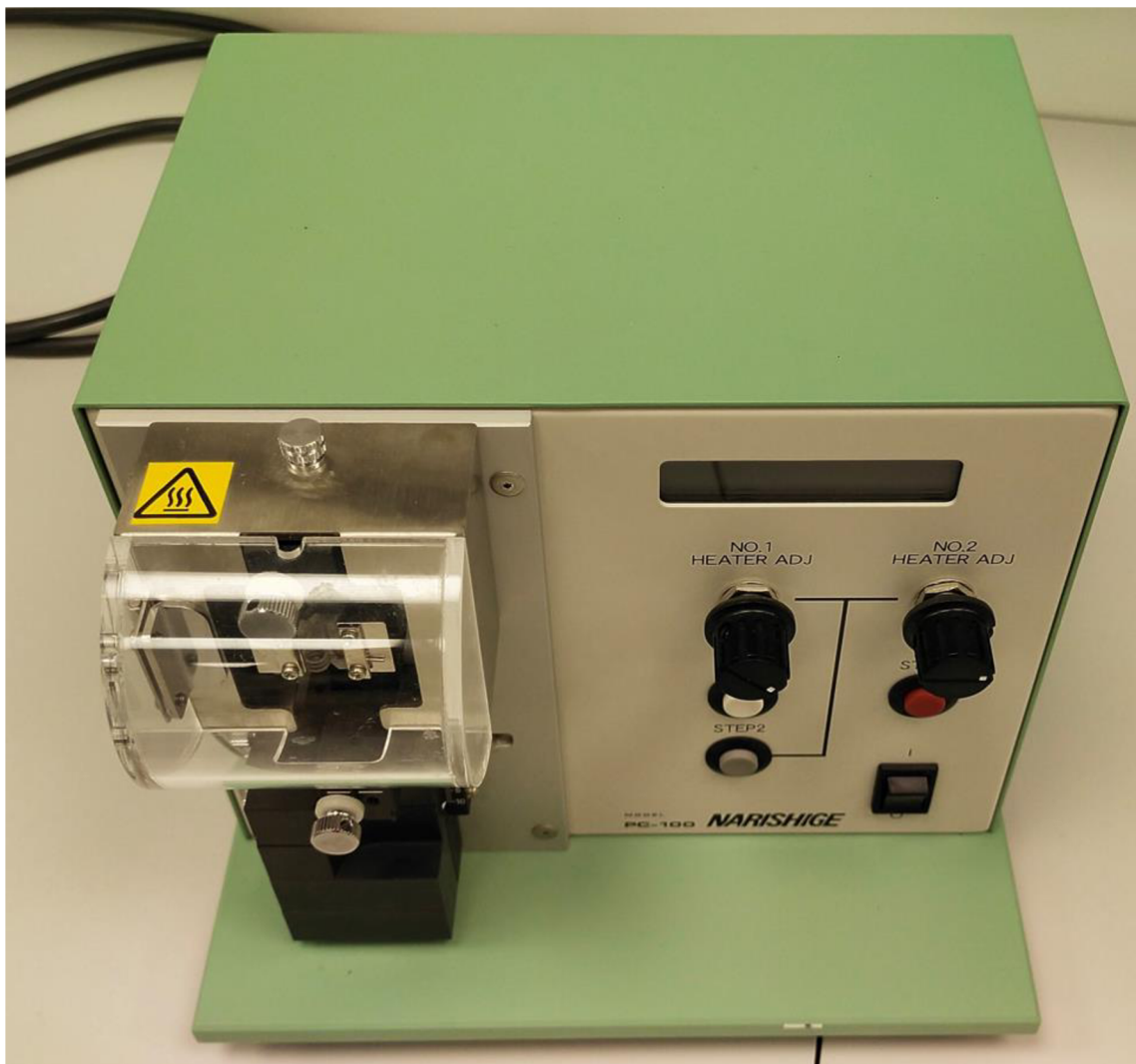
Přílohy

Obrázek 11. Detail topící jednotky, převodníku a generátoru vzduchových pulzů



Obrázek 11. Detail na 1 = elektrické vyhřívání ústí plynového chromatografu. 2 = analogo digitální převodník IDAC-2 Syntech. 3 = generátor vzduchových pulzů CS-55 Syntech

Obrázek 12. Vertikální teplotní tahač elektrod PC-100 Narishige



Obrázek 13. Zahřívací ústrojí pro skleněné vialky ThermoShaker, Biosan

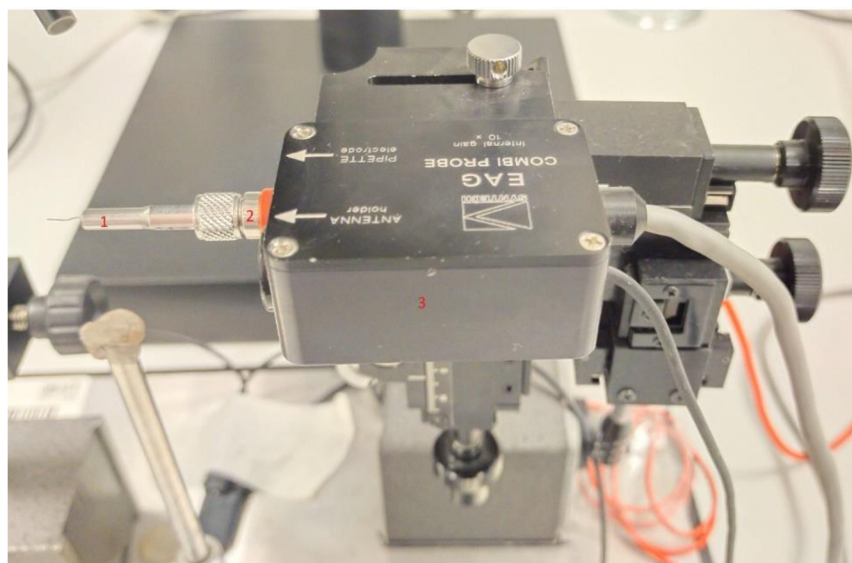


Obrázek 14. Plynový chromatograf



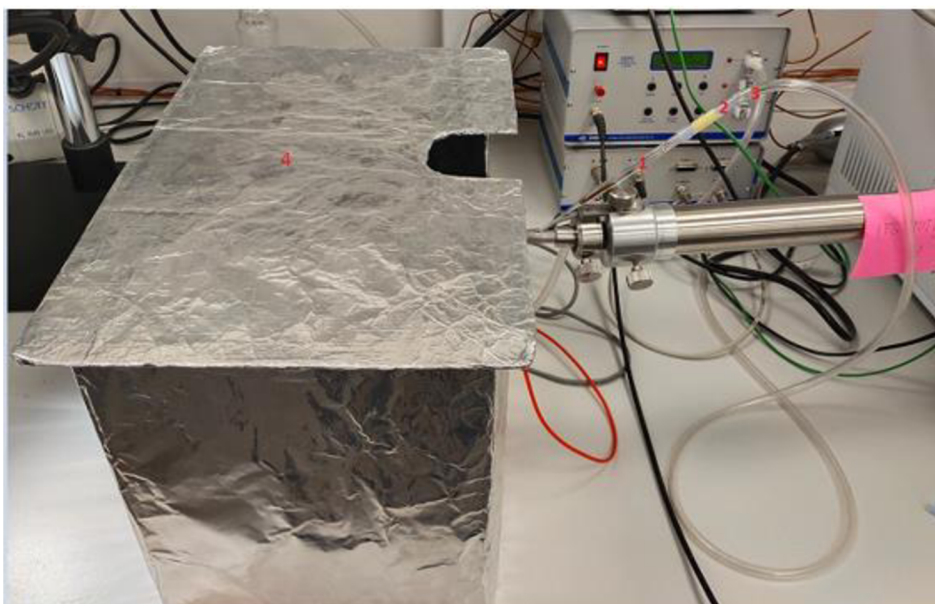
Obrázek 15. Detailní pohled na plynový chromatograf (1) s automatizovaným injektorem zkoumaných látek (2).

Obrázek 15. Detail předzesilovače na EAG



Obrázek 14. Detail předzesilovače na EAG zařízení. 1 = kapilární trubička naplněná Ringerovým roztokem. 2 = zahnutí stříbrné elektrody, aby došlo k její aretaci. 3 = předzesilovač, který slouží k fixaci měřící elektrody.

Obrázek 16. Detail EAG překrytého Faradayovou klecí



Obrázek 16. Detail EAG, který je obalený Faradayovou klecí při měření. 1 = Pasteurova pipeta/zásobník. 2 = spojovací kužel mezi Pasteurovou pipetou a hadičkou přivádějící vzduchové pulzy. 3 = hadička přivádějící vzduchové pulzy z generátoru vzduchových pulzů. 4 =

Elektroantenograf překrytý Faradayovou klecí za účelem odstranění okolních elektromagnetických rušivých signálů.