

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci

**Studium polní atraktivity těkavých látek produkovaných houbami
asociovanými s lýkožroutem smrkovým.**

Diplomová práce

Autor: Matěj Trepáč

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

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Matěj Trepáč

Lesní inženýrství
Lesní inženýrství

Název práce

Studium polní atraktivity těkavých látek produkovaných houbami asociovanými s lýkožroutem smrkovým

Název anglicky

Field study of volatile compounds attractivity produced by *Ips typographus* associated fungi

Cíle práce

Populace lýkožrouta smrkového *Ips typographus* (L.) v České republice dosáhla v současné době epidemického stavu, což vede k masivní destrukci smrkových porostů. *Ips typographus* je úspěšným agresivním druhem také díky asociačnímu vztahu s patogenními ophiostomatoidními houbami rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Endoconidiophora*, které přenáší vně své kutikuly a inokuluje je do hostitelského smrku ztepilého. Houby poskytují broukům výživu a degradují obranu hostitele. Výzkumy odhalily, že tyto houby vypouštějí těkavé látky jako krátké fenolické molekuly, či deriváty terpenů a že brouky na vzdálenost několika centimetrů kultury hub přitahují.

Cílem této diplomové práce bude zjistit atrakci či anti-atrakci tří druhů hub v polním pokusu ve feromonových lapačích v kombinaci s feromonem. Výsledky potvrdí, či vyvrátí teorii, že houby asociované s lýkožroutem smrkovým se podílí i na chemické komunikaci brouků a jsou tedy důležitým agentem v agregaci brouků na hostitelském stromě.

Metodika

V laboratoři budou vyvinuty speciální odparníky tří druhů hub *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica* napěstovaných na agaru. Odpar těkavých látek bude modifikován počtem otvorů ve víčku. Odparníky hub ve stáří 3-6 dní budou ve dvou dávkách, nízké a vysoké umístěny ve feromonových lapačích typu Ecotrap v kombinaci se syntetickým feromonem lýkožrouta smrkového 2-methyl-3-buten-2-olem a cis-verbenolem. Odchycení brouci budou v časových intervalech sbírání a uskladňování pro vyhodnocení v etanolu. Odparníky v lapačích budou rotovány po diagonále a houby budou měněny za čerstvé. Odchyty brouků budou spočítány a brouci budou rozděleni dle pohlaví. Výsledky budou statisticky vyhodnoceny.

Doporučený rozsah práce

50 – 60 stran

Klíčová slova

lýkožrout smrkový, asociované houby, *Grosmannia europhoides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*

Doporučené zdroje informací

Kandasamy, D., Gershenson, J., Andersson, M. N., Hammerbacher, A. (2019). Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *The ISME Journal*. doi:10.1038/s41396-019-0390-3.

Kandasamy, D., Gershenson, J., Hammerbacher, A. 2016: Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 42, Pages 952-969.

Zhao, T., Ganji, S., Schiebe, Ch., Bohman, B., Winstein P., Krokene, P., Unelius, R., (2019) Convergent evolution of semiochemicals across Kingdoms: bark beetles and their fungal symbionts. *The ISME Journal*, open acces <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0370-7>

Předběžný termín obhajoby**Vedoucí práce**

Ing. Anna Jirošová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

Konzultant

Ing. Roman Modlinger, PhD.; Dineskumar Kandasamy, PhD.

Ing. Kateřina Beránková

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2020

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 3. 3. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 02. 06. 2020

Prohlášení

"Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium polní atraktivity těkavých látek produkovaných houbami asociovanými s lýkožroutem smrkovým“ vypracoval samostatně pod vedením Ing. Anny Jirošové, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

V Praze dne 15. června 2020

Podpis autora

Poděkování

Tato diplomová práce by nikdy nevznikla, kdyby za ní nestála práce několika skvělých lidí. Bez jejich pomoci, bych ani nevěděl, kde začít. Pro jejich úsilí, ochotu a čas, který mi věnovali, bych jim všech chtěl alespoň v těchto pár řádcích poděkovat, ač si zaslouží mnohem víc. Jako první bych chtěl poděkovat paní Ing. Anně Jirošové, Ph.D., která nade mnou držela ochrannou ruku, vedla mě po cestě jménem diplomová práce a vždy skvěle poradila. Velké díky bych chtěl věnovat Ing. Romanu Modlingerovi, Ph.D. za jeho úžasné statistické zpracování a Ing. Jaromíru Hradeckému, Ph.D. za analýzu výsledků na chromatogramu. Další, komu bych chtěl poděkovat, je Ing. Kateřina Beránková, která na mě byla při vzájemné spolupráci milá a vždy mi velmi ochotně poradila. Jako poslední chci poděkovat své rodině, že mě podporovali a dodali síly k dokončení této práce. Děkuji.

Abstrakt

Lýkožrout smrkový se řadí mezi nejzávažnější škůdce na smrkových porostech. Za poslední roky se vlivem klimatických změn snížila obranyschopnost lesních porostů, škody způsobené l. smrkovým se několikanásobně zvětšily a v současné době došlo k celoevropské kůrovcové kalamitě. Proto se současný výzkum zaměřuje na vývoj obranných a ochranných opatření. Lýkožrout smrkový je agresivní druh kůrovce, jehož ekonomický význam je dán mimo jiné i jeho vztahem s asociovanými houbami, které přenášejí a inokuluje do napadených stromů.

Tato diplomová práce popisuje studium významu tří druhů asociovaných hub na chování lýkožrouta smrkového v polním pokusu. Experiment je založen na srovnání atraktivity mycelií tří druhů hub *Grosmannia europhoides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica* pro lýkožrouta smrkového. Těkavé látky, které houby emitují, byly identifikovány chemickou analýzou.

V rešeršní části tato práce shrnuje aktuální informace z odborné literatury o lýkožroutu smrkovém, jeho bionomii, způsobu vyhledávání hostitele, rozmnožování, hospodářském významu a kontrolních a obranných opatřeních. Další kapitola se věnuje houbám asociovaným s kůrovci a houbám, které žijí ve vzájemném vztahu přímo s l. smrkovým. Poslední část rešerše se věnuje chemické analýze těkavých látek.

Experimentální část popisuje chemickou analýzu těkavých látek produkovaných mycelií hub v návnadách použitých v polním pokusu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. V jednotlivých houbách bylo identifikováno několik látek s předpokládanou biologickou aktivitou. Polní pokus byl proveden ve smrkovém lese s feromonovými lapači, ve kterých byla testována přitažlivost návnad z mycelií hub v kombinaci s feromonem. Byly provedeny dvě série, houby pěstované na živném médiu a houby pěstované na živném médiu s přídavkem lýka smrku ztepilého, aby profil těkavých látek vzniklý metabolizováním média odpovídal přírodním podmínkám. Jako reference byly použity živné médium s feromonem a feromon samotný. První série byla provedena během jarního rojení l. smrkového a druhá série v červenci, během předpokládaného druhého rojení.

Během pokusu bylo odchyceno celkově v první sérii 14 095 brouků a v druhé sérii 15 037 brouků. V první sérii ukázala statistická analýza relativních odchytů signifikantně vyšší přitažlivost *Endoconidiophora polonica* v nízké dávce jak vůči odchytům na

samotný feromon, tak na živné médium v kombinaci s feromonem. Ve druhé sérii, kdy byly houby pěstované na živném médiu s přídavkem smrkového lýka, přitahovala signifikantně nejvíc *Grosmannia penicillata* ve vysoké dávce vůči živnému médiu s feromonem. Výsledky tohoto polního pokusu odpovídaly výsledkům z laboratorních behaviorálních testů, které provedl Kandasamy (2019). Závěrem je, že mycelia hub *Endoconidiophora polonica* a *Grosmannia penicillata* produkující specifický profil těkavých látek zvyšují atraktivitu feromonu a přitahují lýkožrouta smrkového na dlouhou vzdálenost v přírodních podmínkách.

Klíčová slova

lýkožrout smrkový, asociované houby, *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*

Abstract

The European spruce bark beetle belongs between the most severe pests on spruce woods. The health condition of the woods has been decreased which was influenced by climatic changes. The damage caused by European spruce bark beetle has grown many times and actually we can talk about bark beetle calamity across whole Europe. For this causes current research is focused on defensive and protective arrangements. The European spruce bark beetle is aggressive species of bark beetle and its economic meaning is also determined by its relationship with its associated fungi, which are transported and inoculated into the invaded trees by this beetle.

This thesis describes the study of the importance of three associated fungi to behaviour of the European spruce bark beetle during field experiment. This experiment is based on the comparison of mycelium attractiveness by three fungi species - *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata* and *Endoconidiophora polonica* for the European spruce bark beetle. The volatile compounds emitted by fungi were identified by chemical analysis.

This research summarizes actual information from the technical literature about the European spruce bark beetle, its biology, searching method of its host, reproduction, economic meaning and control and defensive arrangements. Next chapter is dedicated to the fungi associated to bark beetles generally and fungi associated with European spruce bark beetle specifically. Last part of the research is dedicated to chemical analysis of volatile compounds.

The experimental part describes the chemical analysis of volatile compounds produced by fungi mycelium in traps used during field experiment by gas chromatography with mass spectrometry. Several compounds were identified in each fungi species with assumed biological activity. The field experiment was placed into spruce forest with pheromone traps in which the attractiveness of fungi mycelium was tested in combination with pheromone. Two series were done, fungi grown on nutrient medium and fungi grown on nutrient medium with addition of the Norway spruce phloem to mimic natural profile of volatile compounds produced during nutrient medium metabolisms. The nutrient medium with pheromone and pheromone itself were used as a reference. First series were performed during the spring swarming of the European spruce bark beetle and second series during July, the expected second swarming.

During this field experiment 14 095 beetles were caught during the first series and 15 037 beetles during the second series. The statistical analysis of relative catches has shown significantly higher attractiveness of *Endoconidiophora polonica* in low dose towards catches on pheromone itself and also on nutrient medium with pheromone. During the second series fungi were grown on nutrient medium with addition of the Norway spruce phloem and high dose of *Grosmannia penicillata* was the most attractive towards the trap with nutrient medium and pheromone. The results of this field experiment confirm laboratory behavioral test made by Kandasamy (2019). Fungi mycelium of *Endoconidiophora polonica* and *Grosmannia penicillata* produce specific profile of volatile compounds which has increased the attractiveness of the pheromone and attract the European spruce bark beetle for long distance in natural conditions.

Key words

bark beetle, asociated fungus, *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata*, *Endoconidiophora polonica*

Obsah

1. Úvod	14
2. Cíl práce.....	16
3. Literární rešerše	17
3.1 Lýkožrout smrkový	17
3.1.1 Základní informace	17
3.1.2 Popis hlavních částí těla	17
3.1.3 Způsob komunikace a vyhledávání vhodného hostitele	19
3.1.4 Vývoj a rozmnožování	21
3.1.5 Hospodářský význam a historie	22
3.1.6 Současné rozšíření	24
3.1.7 Kontrola, obranná opatření a regulace	25
3.2 Houby asociované s kůrovci	26
3.2.1 Druhy kůrovců a jejich asociované houby.....	28
3.2.2 Látky produkované asociovanými houbami.....	30
3.3 Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie	32
3.3.1 Plynová chromatografie	32
3.3.2 Hmotnostní spektrometrie.....	33
3.3.3 SPME	33
4. Metodika.....	35
4.1 Metodika práce v laboratoři	35
4.2 Metodika měření a vyhodnocení látek, které houby emitují.....	35
4.3 Metodika práce v terénu.....	36
4.4 Metodika vyhodnocení odchytů v laboratoři	39
4.5 Metodika statistické analýzy	40
5. Výsledky.....	41
5.1 Analýza těkavých látek v návnadách z mycelií hub	41

5.2	Terénní pokus	41
6.	Diskuze	46
7.	Závěr	49
8.	Seznam literatury a použitých zdrojů	51
9.	Přílohy	57

Seznam tabulek, obrázků a grafů

Tabulky:

Tab. č. 1: Historický přehled kalamit způsobených I. smrkovým	24
Tab. č. 2: Hodnoty pro stanovení počtu odchyťových zařízení na letní období	25
Tab. č. 3: Přehled některých kůrovců a s nimi asociovaných hub	29
Tab. č. 4: Jednotlivé návnady do feromonových lapačů	37
Tab. č. 5: Schéma rotování jednotlivých návnad při první sérii rotací, houby pěstované na čistém agaru	38
Tab. č. 6: Schéma rotování jednotlivých návnad při druhé sérii rotací, houby pěstované na agaru s lýkem	38
Tab. č. 7: Legenda k tabulkám č. 8 a 9 a grafu s výsledky č. 2	42
Tab. č. 8: Celkové počty odchyťených brouků na houby pěstované na agaru	43
Tab. č. 9: Celkové počty odchyťených brouků na houby pěstované na agaru a floému	43
Tab. č. 10: Generalizovaný lineární model pro první sérii odchyťů	44
Tab. č. 11: Generalizovaný lineární model pro druhou sérii odchyťů	45
Tab. č. 12: Klimatické podmínky během 1. série rotací	48
Tab. č. 13: Klimatické podmínky během 2. série rotací	48

Obrázky:

Obr. č. 1: Lýkožrout smrkový, <i>Ips typhographus</i> (Linnaeus, 1758)	17
Obr. č. 2: Pohlavní rozlišovací znaky I. smrkového (Skuhřavý 2002)	18
Obr. č. 3: Průběh náletu I. smrkového na hostitelský strom (JAKUŠ, 2015)	19
Obr. č. 4: Cis-verbenol a 2-methyl-3-buten-2-ol	20
Obr. č. 5: Živné dřeviny I. smrkového v Evropě a Asii (Skuhřavý 2002)	21
Obr. č. 6: Pronotum a elytra I. smrkového (Walker 1995)	27
Obr. č. 7: Schéma plynového chromatografu	33
Obr. č. 8: Připravená houba <i>Endoconidiophora polonica</i> k umístění do lapače, lapač s návnadou	36

Obr. č. 9: Odchycený hmyz z feromonového lapače v PE lahvičce s etanolem.....	39
Obr. č. 10: Třídění a počítání hmyzu pod mikroskopem	39
Obr. č. 11: Analýza houbami produkováných těkavých látek na médiu z čistého agaru, Chromatogramy TIC a generované na specifických hmotách pro hledané látky.	41

Grafy:

Graf č. 1: Množství evidovaného kůrovcového dříví v ČR v tis. m ³	23
Graf č. 2: Relativní odchyt 1. smrkového na houby	44

Seznam použitých zkratk:

DI-SPME – Direct Immersing SPME

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

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

GC – plynová chromatografie (anglicky gas chromatography)

GCxGC – dvoudimenzionální plynová chromatografie

GC-MS – plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

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

HS-SPME – headspace SPME

m - hmotnost

MB – 2-methyl-3-buten-2-ol

MS – hmotnostní spektrometrie (anglicky mass spectrometry)

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

TIC – celkový iontový tok (anglicky Total Ion Current)

z – náboj

1. Úvod

Tato diplomová práce vznikla jako součást komplexního výzkumu Excelentního týmu pro mitigaci, Extemit – K, založeného na České zemědělské univerzitě. Výzkum je zaměřen na řešení aktuálních i budoucích problémů v lesních ekosystémech ČR způsobených klimatickou změnou a hledání vědeckých řešení ochrany lesů. Úkolem tohoto týmu je mimo jiné výzkum v oblasti interakce kůrovců a jehličnanů a ověření vztahu fyziologie stromu/kůrovec na úrovni stromu a krajiny.

Jedním z nejdiskutovanějších problémů lesního hospodářství současnosti je kůrovcová kalamita, její příčiny a následky. Pěstování stejnověkých smrkových monokultur na nevhodných stanovištích, tomuto problému výrazně napomáhá. S přispěním současným klimatických podmínek, kdy nadprůměrné teploty a nedostatek srážek oslabují stojící stromy, vzniká kritická situace s celorepublikovou působností. Takto vznikly ideální podmínky pro snadné přemnožení lýkožrouta smrkového, *Ips typographus* (Linnaeus, 1758), který je dle vyhlášky 101/1996 Sb., k zákonu č. 289/1995 Sb., o lesích, ve znění novely č. 236/2000 Sb. řazen mezi kalamitní škůdce. Obrovský dopad přemnožení l. smrkového lze vidět na roční statistice kůrovcového dříví, které v roce 2018 dosáhlo dvojnásobného množství oproti přechozímu roku a celkový objem kůrovcového dříví se vyšplhal na 12 milionů m³.

Kolonizace nového stromu l. smrkovým je vázána na chemickou komunikaci mezi jednotlivými brouky. Tento agresivní druh používá ke svolávání soudruhů potentní agregační feromon. Po dosažení určité hustoty brouků na kolonizovaném stromu se sníží jeho obranyschopnost a kolonizace je úspěšná.

Dalším důvodem, proč je tento druh úspěšný v kolonizaci hostitelských stromů, je jeho benefiční vztah se specifickými asociovanými houbami. Nejvýznamnější vztah vznikl mezi lýkožroutem a houbami rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis*, *Endoconidiophora* a *Entomocorticium* (DE BEER et al. 2014). Kůrovec v tomto vztahu vystupuje jako přenašeč. Spory hub přenáší vně své kutikuly a rozšiřuje je takto na nové hostitele. Houby se poté v požerku kůrovce rozmnožují a poskytují jim tak další živiny. Houby také hostitelský strom oslabují, snižují jeho obranyschopnost a mohou tudíž přispět až k celkovému úhynu hostitele. Vědecky bylo prokázáno, že houby emitují organické těkavé látky, na které kůrovci reagují a v laboratorním pokusu u nich vyvolávají změnu chování (KANDASAMY 2016). Proto jsme se v této diplomové práci rozhodli testovat význam tří druhů asociovaných hub v polním pokusu, abychom

studovali jejich vliv na chování lýkožrouta smrkového v jeho přirozeném prostředí a osvětlili tak otázku, zda látky emitované asociovanými houby hrají roli při vyhledávání hostitelského stromu.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je zjistit atrakci či anti-atrakci tří druhů hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým v polním pokusu ve feromonových lapačích v kombinaci s feromonem. Výsledky potvrdí, či vyvrátí teorii, že tyto houby se podílí i na chemické komunikaci brouků a jsou tedy důležitým prvkem v agregaci brouků na hostitelském stromě.

V literární rešerši je cílem seznámit se s danou problematikou a vyhledat informace a nové poznatky o konkrétních vztazích mezi jednotlivými kůrovci a jejich asociovanými houbami. V experimentální části budeme potvrzovat pomocí plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem složení látek, které asociované houby emitují. V rámci terénního pokusu cílíme na ověření účinnosti vytvořených návnad složených z vypěstovaných hub a agregčního feromonu ve feromonových lapačích. V terénu budou rotovány jednotlivé návnady v různých koncentracích a výsledná data budou statisticky vyhodnocena.

Pokud by byla ověřena teorie o zvýšené atraktivitě feromonových lapačů s houbami rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia* nebo *Endoconidiophora*, daly by se tyto poznatky využít v managementu lýkožrouta smrkového.

3. Literární rešerše

3.1 Lýkožrout smrkový

3.1.1 Základní informace

Lýkožrout smrkový, *Ips typhographus* (Linnaeus, 1758) patří do podčeledi kůrovcovitých, *Scotylinae*, což byla dříve samostatná čeleď řádu brouků, *Coleoptera*, dnes se však tato podčeleď řadí do čeledi nosatcovitých, *Curculionidae*.



Obr. č. 1: Lýkožrout smrkový, *Ips typhographus* (Linnaeus, 1758)

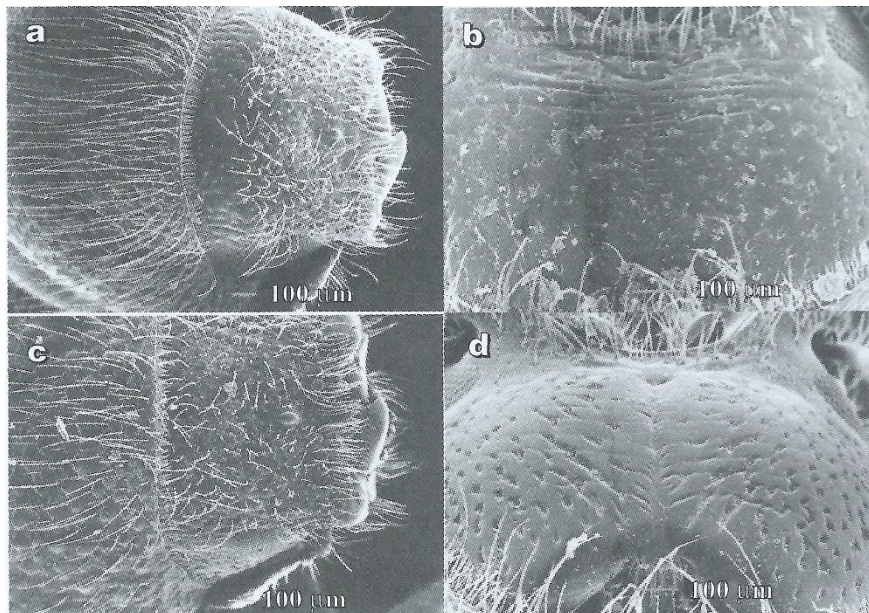
KŘÍSTEK & URBAN (2013) uvádí, že v České Republice se vyskytuje 104 druhů kůrovcovitých. Nosatcovití patří do řádu brouci, *Coleoptera*, třídy hmyz, *Insecta* a kmene členovců, *Anthropoda*. Jedná se o velmi rozšířenou skupinu živočichů, která tvoří přibližně 90 % všech živých organismů na planetě, přitom se předpokládá, že řada druhů hmyzu zůstává stále vědecky nepopsána (KŘÍSTEK & URBAN 2013). HUDEC et al. (2007) uvádí, že v ČR je 27 000 druhů hmyzu rozdělených do 24 řádů z celkových 30, které jsou dosud ve světě popsány.

3.1.2 Popis hlavních částí těla

Tělo lýkožrouta smrkového, *Ips typhographus* (Linnaeus, 1758) má nejčastěji válcovitý tvar, je lesklé, hnědočerné a dlouhé 4,2–5,5 mm (PFEFFER 1955). Krátce po vylihnutí jsou jedinci bílí, poté rychle žloutnou a po vykonání úživného žíru postupně tmavnou. Dospělí jedinci mohou být hnědí, mahagonově hnědí, hnědočerní, černí nebo šedočerní. Na stranách má téměř po celém obvodu zlatavé nebo žluté chloupky.

Hlava je složena z 6 tělních článků, které srostly a je v poměru k tělu docela velká, shora z velké části krytá štítem. Hlava nese zrakové orgány, kterými jsou jednoduché nebo složené oči. Na hlavě jsou dále usazena tykadla. Jedná se o párový smyslový orgán, který neslouží pouze k čichu a hmatu, ale také k vnímání zvuku. Dalším orgánem na hlavě je ústní ústrojí. Tvoří jej dle KŘÍSTKA & URBANA (2013)

párová kusadla a čelisti a nepárový horní a dolní pysk. Čelo je dalším poznávacím znakem k určení pohlaví. Samečci mají často čelo ploché, samičky vypouklé, viz obr. č. 2. Dalším znakem, podle kterého lze rozeznat pohlaví, je délka, hustota a rozmístění chloupků na čele (PFEFFER 1955), kdy samečci mají chloupky na čele řidší než samičky.



a,b – samice
c,d – samec

Obr. č. 2: Pohlavní rozlišovací znaky *L. smrkového* (Skuhrový 2002)

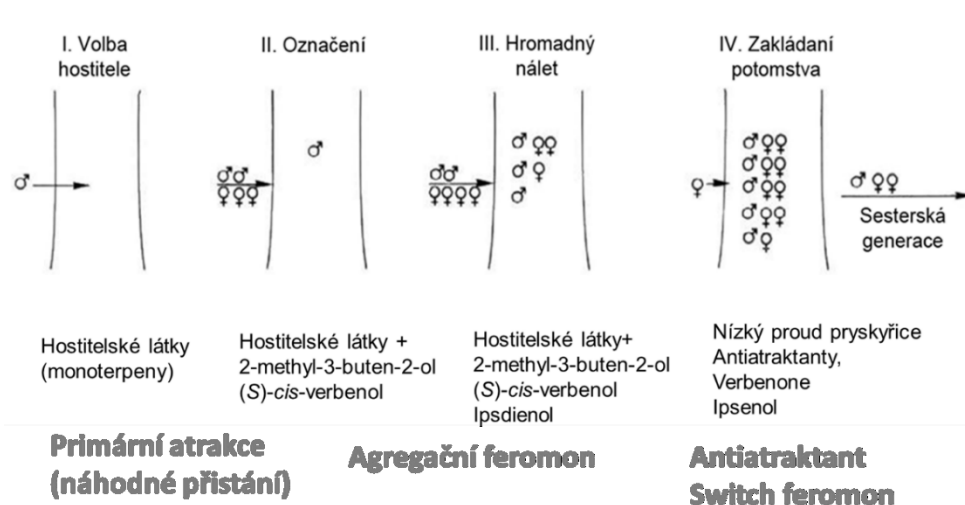
Hrud' je tvořena 3 tělními články, kterými jsou předohrud', středohrud' a zadohrud'. Podle stran hrud' rozdělujeme na tergum (hřbetní část), pleurae (boční část) a sternum (břišní část). Štít je dlouhý jako jedna třetina celého těla a je nejčastěji kulovitý, klenutý, krátce válcovitý, v některých místech vypouklý nebo ve středu plochý. *L. smrkový* má tři páry nohou a každý pár se upíná na jeden hrudní článek. Křídla původně vznikla jako vychlípenina pokožky, jsou blanitá a relativně dlouhá, málo žilnatá. Žilnatina křídlo vyživuje a zpevňuje (HUDEC et al. 2007). První pár křídel je přeměněn na krovky, které nemají žilnatinu a slouží k ochraně těla a aktivně se na letu nepodílí. Krovky přisedají tak, že splývají s okrajem štítu a dodávají tělu válcovitý tvar. Shora kryjí celý zadeček a hrud', jsou lesklé, zadní část je matná a prohloubená. Na hraně prohloubeniny vyrůstají 4 páry zubů. První shora je nejmenší, třetí největší a bývá knoflíkovitě zakončen, dle KRÍSTKA & URBANA (2013) především u samečků.

Zadeček je tvořen celkem 8 tělními články, kdy tergity jsou úplně kryty krovkami, výjimečně přes ně přečnívá konec osmého článku a sternity jsou volné, nezakryté, lysé či lehce ochmýřené a hustě tečkované. Na hraně mezi sedmým a koncovým osmým článkem ústí pohlavní ústrojí (KRÍSTEK & URBAN 2013).

3.1.3 Způsob komunikace a vyhledávání vhodného hostitele

Lýkožrout smrkový je považován nejčastěji za sekundárního škůdce. Při rojení se kůrovci snaží najít vhodný, nejčastěji nějak oslabený strom, ve kterém by se mohli spářit a vytvořit tak další pokolení. Jedná se často o vývraty, zlomy, polomy, jedince oslabené suchem či jiným primárním činitelem. Jen výjimečně si vyberou jedince zcela zdravého, k tomu dochází v případě přemnožení I. smrkového (MARTIKAINEN et al., 1999), kdy jsou oslabené stromy již plně kolonizovány. Při rojení dokáže I. smrkový uletět značnou vzdálenost, SKUHRAVÝ (2002) uvádí až 750 metrů v rámci porostu, na volném prostranství či nad korunami stromů se však může jednat až o několik kilometrů.

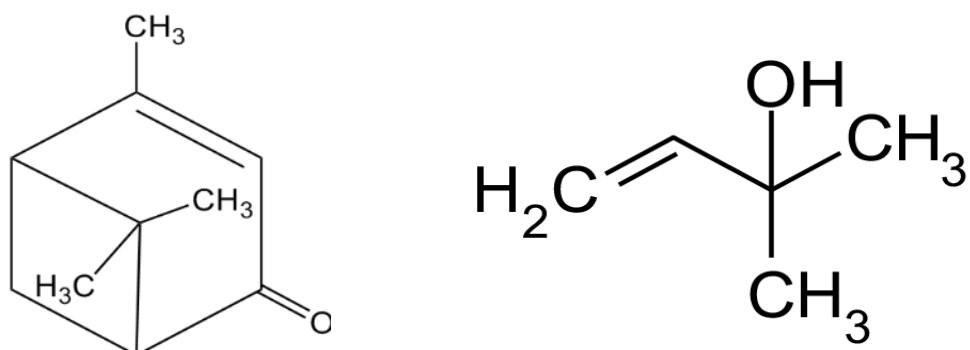
Výběr cílového hostitelského stromu probíhá podle dvou základních teorií. První teorií je aktivní výběr stromu, kdy sameček, tzv. pionýrský brouk, během období rojení hledá na dálku (long-range) primární atraktanty vhodného jedince za pomoci smyslových orgánů. Nejvýraznějším faktorem při tomto výběru jsou hlavní monoterpeny smrku, kdy nejatraktivnějším z nich je alfa-pinen (SKUHRAVÝ 2002), které jsou zároveň prekursory k produkci pohlavních agregačních feromonů I. smrkového, které vytváří i s pomocí symbiotických organizmů v zaživacím ústrojí. Lýkožrout smrkový je přitahován na stromy s koncentrací monoterperů v poměru 0,03 – 0,05 % (SKUHRAVÝ 2002). Druhou teorií je náhodný výběr. Dle této teorie dochází ve fázi rojení k náhodnému letu jednotlivých brouků, pionýrstí brouci sedají na různé stromy a až poté hodnotí jeho potenciál jako hostitelského stromu na základě chemických informací (close-range) (BYERS 1995).



Obr. č. 3: Průběh náletu I. smrkového na hostitelský strom (JAKUŠ, 2015)

Na výběr cílového hostitelského stromu má také dle JAKUŠE & BLAŽENECE (2015) vliv přítomnost nehostitelských dřevin v daném porostu, které produkují těkavé látky s negativním dopadem na l. smrkového a snižují tak atraktivitu dané lokality. Nejčastěji se jedná o krytosemenné listnaté stromy.

Po zavrtání pionýrského brouka začíná mezi lýkožrouty fáze vnitrodruhové chemické komunikace. Místo, kde se brouk zavrtal do kůry, prozrazují drtinky, drobné práškovité kupičky, které jsou patrné na kořenových náběžích. V případě, že pionýrský brouk úspěšně pronikne obranou stromu, začne produkovat pohlavní agregační feromony, které mají za cíl přilákat další samečky. Tyto feromony produkuje až dva dny po náletu na strom (BIRGERSSON et al. 1984). Takto zvýšený nápor strom nejčastěji nevydrží, nedokáže se mu ubránit a stává se vhodným jedincem na kolonizaci. CHRISTIANSEN (1985) uvádí, že k zahubení zdravého stromu je zapotřební 150 – 200 jedinců, WESLIEN a REGNANDER (1990) pak uvádí počet 400 – 1 000. Agregační feromony lákají zároveň samičky, které přilétají do vyhloubené snubní komůrky za účelem páření. Nejvýznamnějšími pohlavními agregačními feromony jsou cis-verbenol a 2-methyl-3-buten-2-ol. Dalšími složkami jsou dle starších prací trans-verbenol, ipsdienol, ipsenol a alfa-pinen (BAKKE et. al. 1977). Po výzkumu aktivity v polních pokusech bylo ovšem zjištěno, že agregační aktivitu mají pouze tři složky - 2-methyl-3-buten-2-ol, cis-verbenol, a v minoritním aktivním příspěvku ipsdienol (SCHLYTER et al. 1987). Tyto tři složky jsou součástí komerčních feromonových odparníků. Po dosažení určitého počtu a hustoty brouků začínají samečci vylučovat antiagregační feromony, které mají za cíl zastavit nálet dalších jedinců tak, aby na stromě zůstalo dostatek místa a potravy pro již nalétnuté brouky. Hlavní antiagregační feromon je verbenon (JAKUŠ & BLAŽENEC 2015). Průběh náletu je znázorněn na obr. č. 3.



Obr. č. 4: Cis-verbenol a 2-methyl-3-buten-2-ol

Poměr samečků a samic po vylíhnutí je přibližně 1 : 1, při páření je však běžné, že je poměr samečků k samicám 1 : 3 či ještě větší. Důvodem je velká úmrtnost samečků při prvotním závrtu do stromu a hledání první části matečné chodby, kdy se strom brání za pomoci pryskyřičných kanálků a zalití samečka.

3.1.4 Vývoj a rozmnožování

Lýkožrout smrkový se řadí mezi polyfágní druhy. Nejčastěji napadá smrk ztepilý, *Picea abies* ((Linnaeus, 1753) H. Karsten), ve výjimečných případech také borovici blatku, kleč, *Pinus mugo* (Turra, 1764), borovici lesní, *Pinus sylvestris* (Linnaeus, 1753), nebo modřín opadavý, *Larix decidua* (Miller, 1768) (KŘÍSTEK 2002). L. smrkový napadá hostitelský strom nejčastěji v místě nástupu koruny. Vyšší části osidluje nejčastěji lýkožrout lesklý, *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus, 1761) a udávaným důvodem je hlavně tloušťka kůry. SKUHRAVÝ (2002) však uvádí, že obě části stromu vylučují jiný poměr a množství pěti monoterpenů – myrcen, *beta*-pinen, *beta*-phelandren- limonen a camphen – které mají právě na toto rozmístění vliv. Důležitý při výběru hostitelské dřeviny je také její zdravotní stav.



Obr. č. 5: Živné dřeviny l. smrkového v Evropě a Asii (Skuhravý 2002)

Vývojem a průběhem nové generace I. smrkového se zabývá fenologický model. Odvozuje vývoj brouků podle nejvýznamnějšího faktoru, kterým je teplota. Model se zabývá teplotou, při které jedinci přežívají, provádí žír, vyvíjí se v jednotlivých vývojových fázích, jaké je jejich teplotní optimum a jaké jsou krajní hodnoty nebo lze odvodit také doba rojení. Model je založen na tzv. stupňodních (degree-days - DD), což představuje sumu teplot přesahujících teplotu více než 8,3°C. Obecný model počítá se začátkem letové aktivity I. smrkového po naplnění 140 DD v období od 1. dubna. Úplný vývoj I. smrkového je pak ukončen po dosažení sumy 557 DD (KINDLMANN et. al. 2012).

Lýkožrout smrkový je polygamní, v jednom požerku nacházíme nejčastěji 2–3 samičky (KŘÍSTEK 2002). Zpravidla má za rok 2-3 generace za rok. Sameček vytváří snubní komůrku a vylučuje feromony. Za ním přilétají samičky, dochází k oplodnění a samičky začínají vyžírat matečné chodby, po stranách vykusuje drobné otvory, do kterých poté naklade vajíčko. Při vyžíráni matečných a larválních chodeb dochází k vytváření obrazců, tzv. požerků. Z požerků lze určit druh a vývojovou fázi. Denně samička naklade 1–2 vajíčka a ucpává je drtí (KŘÍSTEK & URBAN 2013). Samice naklade v jedné matečné chodbě celkově 20–50 vajíček (PFEFFER 1955). Celkový počet jedinců, kteří se dokáží vyvinout na jednom jediném stromu, je dle SKUHRAVÉHO (2002) 35 000 – 400 000 dospělých jedinců v dceřiné generaci.

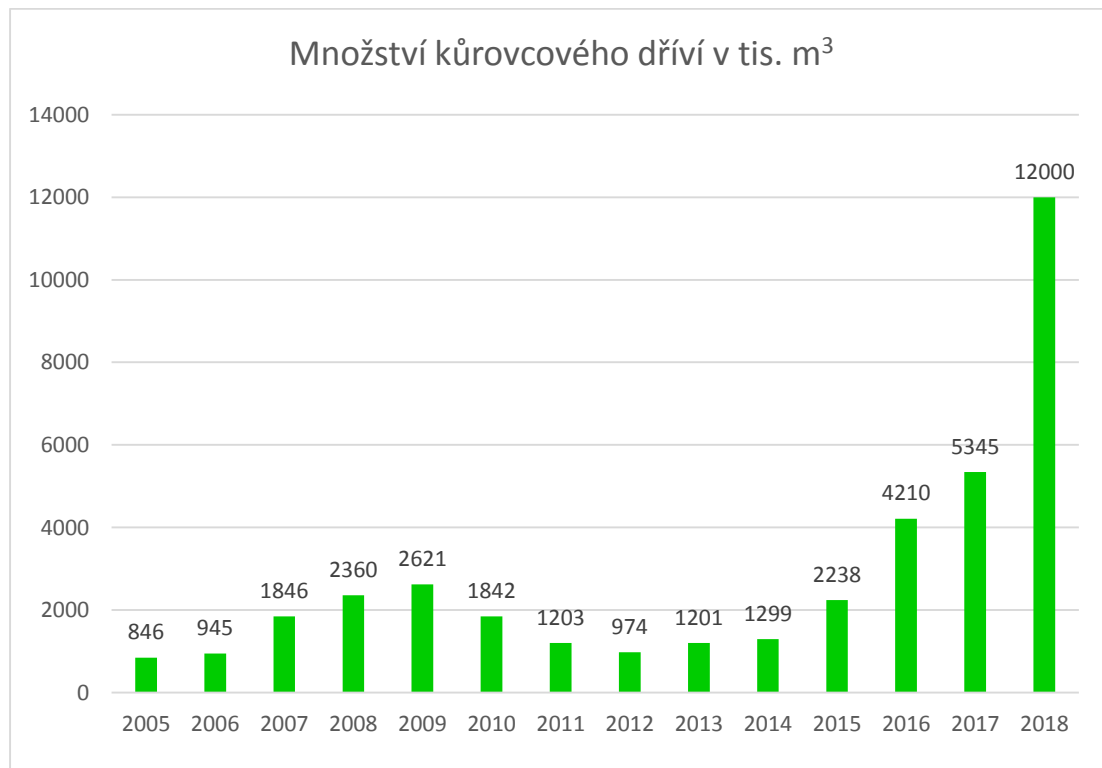
PFEFFER (1955) rozlišuje z hlediska potravy celkem čtyři skupiny larev. První skupina se žíví pouze pletivy vyšších rostlin (*Scolytus*). Druhá pletivy vyšších rostlin a přikrmuje se podhoubím některých hub, pokud se v lýku vyskytnou (*Ips*, *Tomicus*). Třetí skupina se žíví odumřelými částmi kůry, lýka a dřeva, které jsou prostoupené podhoubím např. *Lymanator coryli* (Perris, 1853). Čtvrtá skupina představuje druhy, které se žíví pouze podhoubím tzv. ambrosiových hub (*Xyloterus*, *Xyleborus*).

3.1.5 Hospodářský význam a historie

Z hospodářského hlediska je většina druhů kůrovců škodlivá, a to poměrně významně. Poškození vzniká během vývoje kůrovce hlavně po vylíhnutí v době žíru a následkem může být odumření části nebo celé rostliny. K poškození od kůrovců se přidává často i poškození druhotné, způsobené např. houbami, jejichž spory mohou přenášet samotní kůrovci. Někteří bělokazi a lýkohubi přenášejí spory houby *Ophiostoma ulmi*, která působí onemocnění jilmů zvané grafioza jilmů (KŘÍSTEK & URBAN 2013). Samičky přenášejí spory těchto hub ve speciálních orgánech zvaných

mycangia. Lýkožrout smrkový tyto speciální orgány nemá, ale přenáší asociované houby rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis*, *Endoconidiophora* a *Entomocorticium* (DE BEER et al. 2014) vně kutikuly a ve střevech. Nebezpečnější bývají rychle se množící druhy kůrovců, vyhledávající stromy již poškozené, či pokácené a neodkorněné, kdy právě větší množství tohoto atraktivního dříví může odstartovat jejich expanzivní vývoj. Nezachycení prvotních příznaků může vyústit v kůrovcovou kalamitu, která se poté těžko zastavuje.

ZPRÁVA O STAVU LESA A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY (2018), tzv. ZELENÁ ZPRÁVA, uvádí, že v roce 2018 došlo k navýšení kůrovcového dříví oproti roku 2017 o více než dvojnásobek a celkový objem dosáhl 12 milionů m³. Na tomto objemu se podílel z největší části právě l. smrkový, který spolu s lýkožroutem menším, *Ips amitinus* (Eichhoff, 1871), zapříčinil 80 % kůrovcového dříví z tohoto objemu. Zbýlý objem měl za příčinu lýkožrouta lesklého, *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836). V průměru pak hodnota kůrovcového dříví na jeden hektar dosahovala na 8,91 m³/ha, což je 20-ti násobek základního stavu, který je dle vyhlášky MZe č. 101/1996 Sb 0,2 m³ (ZELENÁ ZPRÁVA 2018). V následujícím grafu můžeme sledovat prudký nárůst kůrovcového dříví v posledních letech.



Graf č. 1: Množství evidovaného kůrovcového dříví v ČR v tis. m³

Z těchto dat vidíme, že l. smrkový je velmi závažným škůdcem, a to nejen na území ČR. Na rozdíl od některých škůdců se však nevyskytuje v pravidelných gradacích, ale jeho přemnožení se téměř vždy váže na nějakého primárního škodlivého činitele, ať už se jedná o vítr (ničivé orkány Kyril v roce 2007 a Emma v roce 2008), polomy vzniklé sněhem a námrazou, imise, kyselá dešť, či sucho a nedostatek srážek posledních let. Z historického hlediska nejsou kalamity l. smrkového ničím novým. V rámci areálu jeho výskytu evidujeme několik desítek rozsáhlých kalamit. Kalamity na území České republiky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Historický přehled kalamit způsobených l. smrkovým

Rok	Lokalita	Rozsah
1821	Jeseníky	
1833	Jeseníky	spolu s r. 1821 – 442 000 m ³
1834	Šumava	203 600 m ³
1840	Šumava	12 500 m ³
1841, 1843, 1847	Jeseníky	
1852, 1857	Jeseníky	slabý
1868 – 1878	Šumava a okolí	7 – 14 mil. m ³ ; 104 000 ha
1868 – 1878	Jeseníky	35 000 stromů
1917 – 1927	okrajové horské oblasti	300 000 m ³
1920 – 1922	Nové Hrady	22 000 m ³
1945 – 1950	horské oblasti	2 300 000 m ³
1966 – 1970	Krkonoše	1 360 000 m ³
1971 – 1975	Krušné hory	1 788 000 m ³
1976 – 1980	celé území	1 944 000 m ³
1982 – 1986	celé území	5 353 000 m ³
1991 – 1999	Morava, Čechy	6 700 000 m ³
1991 – 2001	Šumava	2 450 ha
2003 - 2010	celé území	9 700 000 m ³
2015 - současnost	celé území	

3.1.6 Současné rozšíření

Areál výskytu l. smrkového se rozkládá téměř po celé Eurasii a váže se především na monokultury smrku ztepilého. Severní hranice protíná Norsko, Švédsko a Finsko. Hranice dále postupuje na východ přes Rusko až k Sibiři a Číně. Na jihu se l. smrkový vyskytuje až na Balkáně, Bulharsku a severu Itálie. Západní hranicí areálu představují Pyreneje na hranici Španělska a Francie (KINDLMANN et. al., 2012). Ojedinele se můžeme s l. smrkovým také setkat v Irsku, Anglii, Albánii, Turecku.

V Japonsku na ostrově Hokkaidó evidujeme výskyt poddruhu l. smrkového – *Ips typographus japonica Nijima* (SKUHRAVÝ, 2002). Několik případů výskytu l. smrkového je známo také ze Severní Ameriky, zde se jednalo vždy o brouky z dovezeného dřeva.

3.1.7 Kontrola, obranná opatření a regulace

Obrana proti l. smrkovému spočívá především v důsledné preventivní a kontrolní činnosti. Podle vyhlášky 101/1996 Sb., k zákonu č. 289/1995 Sb., o lesích, ve znění novely č. 236/2000 Sb. je l. smrkový řazen mezi kalamitní škůdce. Vyhláška rovněž stanovuje základní, zvýšený a kalamitní stav

Kontrolu provádíme pochůzkami, využíváme lapáky, feromonové lapače a otrávené lapáky (ZAHRADNÍK 2007). Počet obranných opatření se stanovuje zvlášť pro jarní a letní rojení. Pro jarní rojení se stanoví jako 1/10 z objemu včas zpracovaného kůrovcového dříví v období od 1. 8. do 31. 3. plus 1 další opatření na každý započatý 1 m³ opuštěného kůrovcového dříví. Pro letní rojení se stanovuje dle tabulky č. 2.

Tab. č. 2: Hodnoty pro stanovení počtu odchyťových zařízení na letní období

Nálet	Lapák – počet závrtů/dm ²	Počet brouků chycených v lapačích nebo otrávených lapačích	Opatření s lapáky/lapači
slabý	méně než 0,5	do 1 000	odchyťová zařízení se mohou přemístit na vhodnější lokalitu
střední	0,5–1,0	1 000–4 000	počet odchyťových zařízení se nemění
silný	více než 1,0	více než 4 000	počet odchyťových zařízení se zvyšuje (za každý opuštěný strom, + jeden lapák/lapač)

Počet brouků regulují také různí predátoři, parazitoidi, paraziti, houbové entomopatogeny či viry. Mezi nejvýznamnější přirozené nepřátelé l. smrkového patří pestrokrovečník mravenčí, *Thanasimus formicarius* (Linnaeus, 1758), larvy dlouhošíjek, *Raphidioptera*, šplhaví ptáci, jako jsou datlovití, brhlíci či šoupálci (KŘÍSTEK 2002). Dalšími predátory jsou například pestrokrovečník větší, *Clerus mutillarius* (Fabricius, 1775), dospělci roupcovitých, *Asilidea*, larvy lupic rodu *Medetera*, a hnilenek rodu *Lonchaea*, některé druhy z čeledi drabčikovitých, *Staphylinidae*, a střeblíčků, *Carabidea*. Vliv predátorů na populaci kůrovce je však těžko hodnotitelný. Především z toho důvodu, že řada predátorů se neživí pouze jedním druhem potravy. Nejvyšší odhady se pohybují na mortalitě kůrovce ve výši 25 % (JAKUŠ & BLAŽENEC 2015).

L. smrkový je často napadán parazitoidy ve stadiu larvy či kukly, méně pak ve stadiu dospělce. Mezi nejvýznamnější parazitoidy řadíme lumčíka dutohlava, *Coeloides bostrichorum* (Giraud, 1872), lumčíka stromoliba, *Coeloides middendorffii* (Ratzeburg, 1848), kovověnku kůrovcovou, *Rhopalicus tutela* (Walker, 1836) a kovověnku kladélkatou, *Roptrocerus xylophagorum* (Ratzeburg, 1844). Mortalita larev kůrovců se v důsledku parazitace pohybuje v rozmezí 15-17 % (JAKUŠ & BLAŽENEC 2015).

Kůrovci mohou trpět i na choroby, které vytváří bakterie (*Aerobacter scolyti* (Pesson, 1955)), entomopatogenní houby (*Beauveria bassiana* ((Balsamo–Crivelli) Vuillemin, 1912) a *Paecilomyces farinosus* (Holmskjold, 1957)), výtrusovci (*Apicomplexa*, *Telosporidia* a *Haplosporidia*) a zvláště hmyzomorky (*Microspora*) (KŘÍSTEK & URBAN 2013).

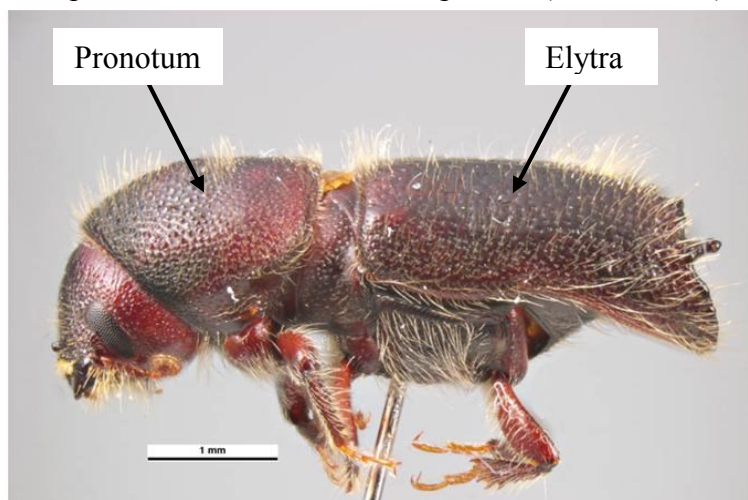
3.2 Houby asociované s kůrovci

Kůrovci na povrchu kutikuly a také uvnitř svého těla, např. ve střevech, přenášejí různé druhy organismů, hub a bakterií, s kterými žijí v určitém vztahu. S některými organismy žijí v mutualistickém vztahu, jiné druhy zase na kůrovcích parazitují nebo jim mohou způsobovat smrtelné choroby. Příkladem mutualismu mohou být houby rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis*, *Endoconidiophora* a *Entomocorticium* (DE BEER et al. 2014). Smrtelné mohou být naopak bakterie *Aerobacter scolyti*, nebo entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Paecilomyces farinosus* (KŘÍSTEK & URBAN 2013).

Vzájemný vztah mezi kůrovci a s nimi asociovanými houbami je velmi složitý a spletitý. Některé druhy hub jsou s kůrovci velmi blízce spjaté a výrazně ovlivňují jejich život. Brouk v tomto vztahu vystupuje jako přenašeč, vnáší spory hub do nového hostitelského stromu a tímto napomáhá k šíření hub. Někteří kůrovci přenášejí spory hub v mycangiích na štítu, *pronotum*, a na krovkách, *elytra* (VIIRI 1997), viz obr. č. 6. Mycangia jsou mikroskopické žláznaté prohlubně vyplněné olejovitými tekutinami. Jiné druhy je přenášejí v drobných jamkách a dírkách na hlavě, štítu a krovkách či dokonce ve střevech (FURNISSE et al. 1990). Spory hub jsou uvolňovány během zavrtávání brouka do kůry, kdy dochází ke zvýšené sekreci olejovitých látek. Přenašečem mohou být také roztoči, kteří žijí na povrchu kutikuly lýkožrouta (HULCR 2013).

V požitku kůrovců se nevyskytuje pouze jeden druh asociovaných hub, ale několik druhů najednou. Patogenní vliv na hostitelský strom mívá však jen málo z nich.

Jiné druhy se živí pouze odumřelou dřevní hmotou. U některých druhů kůrovců je houba, která je odpovědná za odumření stromu, pravděpodobně pro brouka zároveň škodlivá. Ostatní druhy přenášených hub však dokáží tyto vlivy odbourat, to je také zároveň důvod, proč kůrovci více druhů hub přenáší (HULCR 2013).



Obr. č. 6: *Pronotum a elytra l. smrkového* (Walker 1995)

Houby se po inokulaci do stromu rozmnožují v požerku kůrovce a poskytují tak broukům další živiny. Některé druhy kůrovců se ve fázi larvy, ale i dospělce živí jak lýkem stromu, tak podhoubím těchto hub. Houby také působí na hostitelský strom, a to tak, že jej oslabují, snižují jeho obranyschopnost a mohou tudíž přispět až k celkovému úhynu hostitele. Inokulované houby v napadeném stromu přerušují transport vody, protrhávají membrány mezi tracheidami, ucpávají cévy smůlou a produkují jedovaté izokumariny (HULCR 2013).

Rozmnožování hub většinou probíhá prvně v lýku, kde se rozrůstají rychlostí až 1 cm za den. Po obsazení lýka začínají napadat dřevo. Ve dřevě rychlost rozmnožování výrazně klesá a dosahuje 1 cm v řádu několika týdnů (HULCR 2013). Houby se z požerků kůrovců dostávají až do dřeně stromu, kde způsobují šedavé až černé zbarvení dřeva. (BENTZ 2006). *Ceratocystis polonica* způsobuje například modré zbarvení (KROKENE & SOLHEIM 2002).

Zvláštním způsobem se živí tzv. ambrosioví kůrovci. Těch je v současné době popsáno přibližně 3 400 druhů. Živí se výhradně plodnicemi a podhoubím asociovaných hub, které si „pěstují“ v hostitelském stromu. Požerky hloubí hluboko do dřeně a způsobují tak výrazné hospodářské škody. HULCR (2013) uvádí, že větší ekonomické škody v evropském dřevozpracujícím průmyslu způsobil dřevokaz čárkový (*Trypodendron lineatum*, Olivier 1775) než právě l. smrkový. Ambrosioví kůrovci již

navíc po mnoho generací dlouhé symbióze nejsou schopní přijímat jinou potravu, než právě plodnice a podhoubí těch hub a dřevní hmotu již nejsou schopní strávit.

Z oddělení vřeckovýtrusných hub, *Ascomycota*, žijí v symbióze s lýkožrouty houby rodu *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis* a *Endoconidiophora*. Z oddělení stopkovýtrusných hub, *Basidiomycota*, je to poté rod *Entomocorticium* (DE BEER et al. 2014). Tyto druhy hub jsou povětšinou saprofytické (rody *Ophiostoma*), jiné nekrofytické (rody *Grosmannia* a *Endoconidiophora*). Houby rodu *Endoconidiophora* mohou hostitelský strom výrazně oslabit nebo zcela zdravý strom dokonce zabít. Houba *Ceratocystis polonica* při rozšíření ve více požercích způsobí, že hostitel začne odumírat velmi rychle (HULCR 2013). Dle KROKENEHO & SOLHEIMA (2002) je úmrtnost dvouletých a čtyřletých smrkových sazenic při napadení pouze houbou *Ceratocystis polonica* 40 respektive 20%. Rody *Ophiostoma* a *Grosmannia* jsou oproti tomu velmi slabé patogeny.

3.2.1 Druhy kůrovců a jejich asociované houby

S kůrovci obecně je asociováno velké množství druhů hub. V tabulce č. 4 lze vidět jednotlivé druhy kůrovců, kteří se u nás často vyskytují, a některé jejich asociované houby. V zahraniční literatuře je mnoho informací o vzájemném vztahu kůrovců a hub, podrobnější výzkumy již však u některých druhů hub často chybí. Výčet druhů hub v tabulce č. 4 není konečný a kompletní, ale slouží jako ukázka velkého významu vztahu mezi kůrovci a houbami.

Lýkožrout smrkový je jedním z nejrozšířenějších a nejagresivnějších kůrovců nejen na světě, ale také u nás. Proto se na něj váže velké množství druhů hub a je tak žádoucí na něj zaměřit větší pozornost. V různých regionech Evropy se můžeme setkat s různými druhy hub, které se v požerku l. smrkového vyskytují. Příčinou může být rozdílná optimální teplota pro růst hub, adaptace na místní klima, hostitelovu chemii nebo vlhkost floému. Dle KANDASAMYHO (2016) nejčastěji najdeme u l. smrkového houby *Endoconidiophora polonica* (v oblastech Norska, Polska a Rakouska), *Ophiostoma bicolor*, *Ophiostoma ainoae*, *Ophiostoma piceae*, *Grosmannia penicillata* a *Grosmannia europheoides*. NÉVE REPE et. al. (2013) dále uvádí druhy *Grosmannia piceiperda* a *Ophiostoma brunneociliatum*. Dle FURNISSE et. at. (1990) přenáší také rod *Ceratocystis polonica*. Dále také uvádí, že l. smrkový nemá specializované struktury na přenos spor těchto hub, jako jsou např. mycangia, ale přenáší je vně své kutikuly popřípadě ve střevech.

Endoconidiophora polonica bývá často první houbou, která se v požerku I. smrkového objevuje. Pomáhá mu prolomit chemickou obranu stromu a zvyšuje šanci na úspěšnou kolonizaci. V průběhu vývoje potomstva se pak v požerku objevují další druhy hub, jako *O. bicolor*, *Grosmannia penicillata* nebo *Grosmannia europhioides* a výskyt houby *Endoconidiophora polonica* již není tak častý (SOLHEIM 1992).

Tab. č. 3: Přehled některých kůrovců a s nimi asociovaných hub

Ips typographus	<i>Ceratocystis polonica</i>	Pityogenes chalcographus	<i>Ceratocystiopsis minuta</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>		<i>Ceratocystis polonica</i>
	<i>Endoconidiophora polonica</i>		<i>G. pseudormiticum</i>
	<i>Graphium fimbriisporum</i>		<i>Geosmithia sp.</i>
	<i>Graphium pycnocephalum</i>		<i>Graphium fimbriisporum</i>
	<i>Graphium sp.</i>		<i>Grosmannia cucullata</i>
	<i>Grosmannia europhioides</i>		<i>Grosmannia piceiperda</i>
	<i>Grosmannia penicillata</i>		<i>Leptographium lundbergii</i>
	<i>Grosmannia piceiperda</i>		<i>O. araucariae</i>
	<i>Leptographium sp.</i>		<i>O. floccosum</i>
	<i>Mucor racemosus</i>		<i>O. fuscum</i>
	<i>O. penicillatum</i>		<i>O. neglectum</i>
	<i>O. piceaperdum</i>		<i>O. penicillatum</i>
	<i>O. serpens</i>		<i>O. piceae</i>
	<i>Ophiostoma ainoae</i>		<i>O. saponiodorum</i>
	<i>Ophiostoma bicolor</i>		<i>O. serpens</i>
	<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>		<i>O. stenoceras</i>
	<i>Ophiostoma minutum</i>		<i>O. tapionis</i>
	<i>Ophiostoma piceae</i>		<i>Ophiostoma ainoae</i>
<i>Pesotum sp.</i>	<i>Ophiostoma ainoae</i>		
			<i>Ophiostoma bicolor</i>
			<i>Ophiostoma cf. rectangulosporium</i>
			<i>Ophiostoma minus</i>
			<i>Pesotum sp</i>
Pityogenes bidentatus	<i>Geosmithia sp.</i>	Pityophotrus pityographus	<i>Geosmithia sp.</i>
	<i>Ophiostoma ainoae</i>		<i>Ophiostoma ainoae</i>
	<i>O. minus</i>		<i>Leptographium sp.</i>
	<i>Leptographium sp.</i>		
	<i>Ophiostoma canum</i>		
	<i>Ophiostoma piliferum</i>		
	<i>Ophiostoma cf. rectangulosporium</i>		
<i>O. brunneociliatum</i>			
<i>O. fl occosum</i>		Polygraphus poligraphus	<i>Geosmithia sp.</i>
Pityogenes quadridens	<i>Leptographium lundbergii</i>	Ips aminitus	<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>
	<i>Ophiostoma canum</i>		<i>Ceratocystiopsis cf. minuta</i>
	<i>O. piceae</i>		

3.2.2 Látky produkované asociovanými houbami

Houby emitují mnohé typy těkavých organických látek, které vyvolávají změny v chování kůrovců a v poslední době se objevují nové poznatky, které vliv těchto symbiontů a jimi produkováných látek potvrzují a zvyšují. V laboratorních testech byly zjištěny například deriváty terpenů, fenolické molekuly, alifatické alkoholy či jiné aromatické sloučeniny (KANDASAMY 2016). Některé z těchto sloučenin fungují jako atraktant, jiné zase jako antiatraktant. Ve vztahu houba – hmyz tedy mohou vystupovat v roli feromonu, kairomonu nebo alomonu. To, jaký bude mít vliv, také závisí na druhu houby, životní fázi brouků a hostitelském stromu. V případě atrakce by tyto sloučeniny mohly být využity v boji proti přemnoženými škůdcům (DE BEER et al. 2014).

Někteří predátoři a paraziti kůrovců také mohou reagovat na těkavé organické látky, emitované houbami, a takto snáze najít svou kořist (KANDASAMY 2016). Příkladem je parazitoidní vosička *Heydenia unica* (Cook, 1891), která využívá těkavé látky produkované houbou *Ophiostoma ips* (Rumbold, 1934) a dokáže tak najít hostitelské larvy lýkožrouta amerického, *Ips pini* (Say, 1826). *Ophiostoma ips* je houba asociovaná právě s l. americkým, se kterým žije v symbióze (BOONE et. al. 2008).

ZHAO et. al. (2019) uvádí, že symbiotické houby metabolizují fenoly a terpenoidy z hostitelského stromu a produkují těkavé látky, které působí na kůrovce podobně jako jejich agregační feromony. Nejčastěji se jedná o jednoduché alkoholy, acetáty a terpenoidy. *Grossmania penicillata* a *Grossmania europhioides*, asociované houby l. smrkového, produkují velké množství 2-methyl-3-buten-2-ol (MB), což je jedna ze základních složek jeho pohlavního agregačního feromonu (ZHAO et. al. 2015). Houby rodu *Endoconidiophora*, *Ophiostoma* a *Grossmannia* produkují také exobrevicomin, endo-brevicomin a (5*S*,7*S*)-*trans*-conophthorin, což jsou bicyklické ketony, složité sloučeniny, která hrají důležitou roli v chemické komunikaci několika druhů kůrovců. L. smrkový na elektro-antenogramu reaguje také na další těkavé látky, emitované těmito druhy hub, jedná se o *exo*-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane (*exo*-1,3-DMDBN) a *endo*-1,3-dimethyl-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonane (*endo*-1,3-DMDBN) (ZHAO et. al. 2019).

Produkce látek je závislá také na živném materiálu. Pokud jsou houby pěstovány na agaru, produkce některých látek klesá či úplně mizí. *Grossmania europhioides* pěstovaná na agaru produkuje *exo*-brevicomin a *trans*-conophthorin, avšak minimum *endo*-brevicomu a žádný 1,3-DMDBN. Výchozí prekurzory, ze kterých brouci a asociované houby produkují tyto látky, se také liší. Lýkohub *Dendroctonus ponderosae*

(Hopkins, 1902) produkuje *exo*-brevicomín z mononenasyčených palmitových kyselin, zatímco houby jej vytváří na médiu polynenasyčených linolových kyselin. (BECK et. al. 2012).

3.2.2.1 Jednotlivé látky produkované houbami a jejich charakteristika

Alifatické alkoholy jsou alkoholy s neuzavřenými molekulami, na které je navázána hydroxylová skupina –OH. Jedná se o alkoholy, které vznikají oxidací a dělením polynenasyčených mastných kyselin. Alifatické alkoholy mají přímý uhlíkový řetězec. Nejznámějším zástupcem alifatických alkoholů je etanol. Z alifatických alkoholů reagují kůrovci především na 1-hexanol, který produkují houby rodu *G. europhoides*, *O. bicolor*, *O. piceae* či *O. minus* (KANDASAMY 2016).

1-Hexanol je jedna z těkavých látek, které produkují zelené listy- tzv. green leaf volatiles (GLVs). 1-Hexanol působí na l. smrkového jako repelent, především ve směsi s dalšími dvěma GLVs - (Z)-3-hexen-1-ol a (E)-2-hexen-1-ol (ZHANG et. al. 1999).

Z alifatických alkoholů produkují asociované houby *O. piceae* a *O. minus* také například 1-Octanol a 1-Nonanol. Zatímco však není prozatím znám vliv na kůrovce, přitahují parazity kůrovců z kmene hlístic, *Nematoda* (Rudolphi, 1808) (KANDASAMY 2016).

Těkavé sloučeniny jsou sloučeniny, které se odpařují při běžných např. pokojových teplotách, což je způsobeno jejich nízkým bodem varu. Volatilní sloučeniny jsou velmi obsáhlé a variabilní.

Jednou z nejdůležitějších látek, které v této kategorii houby emitují je 2-Methyl-3-buten-2-ol. Jak již bylo zmíněno výše, houby rodu *Grossmania penicillata* a *Grossmania europhoides* produkují 2-methyl-3-buten-2-ol (MB). 2-Methyl-3-buten-2-ol je jednou z nejvýznamnějších látek v agregačních feromonech l. smrkového (ZHAO et. al. 2015).

Houby *G. penicillata*, *O. piceae* a *O. ips* produkují benzylalkohol (C₆H₅CH₂OH). Přirozeně jej můžeme často nalézt v ovoci či silicích rostlin. Reakce na benzylalkohol byla zjištěna u několika druhů kůrovců, kde působil jako antiagregant. U l. smrkového však žádná reakce zjištěna nebyla (ZHANG et. al. 2000).

Aromatický keton Acetophenone zase funguje jako antiagregant u *Dendroctonus brevicomis* (LeConte, 1876), u *Dendroctonus frontalis* (Zimmermann, 1868) snižuje atraktivitu feromonu, stejně jako u *Dendroctonus pseudotsugae*

(Hopkins, 1905). U *Dendroctonus ponderosae* a *Ips pini* vyvolává reakci na tykadlech (KANDASAMY 2016).

Terpeny jsou těkavé látky, které se skládají z dvou nebo více izoprenových jednotek. Nejčastěji jsou rostlinného původu a jsou obsaženy ve všech částech rostlin, také v pryskyřici. Důležitým typem terpenů jsou seskviterpeny, které obsahují 3 molekuly isoprenu a 15 molekul uhlíku. Oxidací právě těchto seskviterpenů vzniká geranylacetone. Ten produkují *E. polonica*, *G. clavigera* a *O. bicolor*. Na geranylacetone výrazně reaguje také l. smrkový, vliv na změnu chování a ekologii l. smrkového, stejně jako dalších druhů kůrovců, není zatím znám. Tesařici *Tetropium fuscum* (Fabricius, 1787) a *Tetropium cinnamopterum* (Kirby, 1837) však využívají geranylacetone jako prekurzor k tvorbě jejich agregačního feromonu – fuscumolu (MAYO et. al. 2013).

3.3 Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

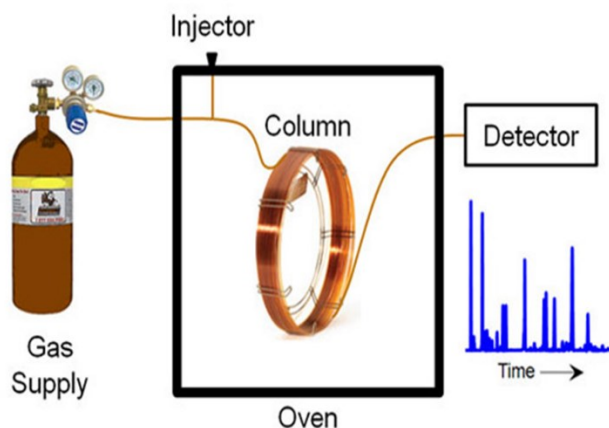
3.3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je proces, který umožňuje rozdělení směsi na jednotlivé složky a jejich identifikaci. Metoda je určena pro rozdělení směsi a identifikaci složek u látek do bodu varu 400 °C. Samotný chromatograf se skládá ze zdroje nosného plynu (tlaková láhev), čistícího zařízení, regulačního systému, dávkovače, kolony, stacionární fáze, náplně kolony, detektoru, vyhodnocovacího zařízení a termostatu. Základem je rozdělení směsi do dvou fází – nepohyblivé (stacionární) a pohyblivé (mobilní). Mobilní fází je nosný plyn, stacionární je umístěna v náplňové nebo kapilární koloně (KLOUDA 2013).

Analyzovaná směs je vstříknuta do injektoru a dochází k jejímu zplynění. Tento plyn je pomocí mobilní fáze unášen do chromatografické kolony. Kolona je uložena v programovatelném termostatu a dochází v ní k rozdělení směsi na jednotlivé složky. Ty jsou poté unášeny do detektoru různou rychlostí. Každou složku poté indikuje detektor a vyhodnocuje časový průběh a intenzitu signálu. Výsledkem je chromatogram v grafické podobě neboli celkový iontový tok (TIC), kde každý pík představuje jednu látku. Díky poloze píků lze pak jednotlivé látky identifikovat (ŠENOVSKÝ 2002).

V chromatogramu je na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x čas. Z teorie chromatografické separace vyplývá, že chromatografický pík má tvar

Gaussovy distribuce a je popsán třemi parametry: retenčním časem, výškou píku a šířkou píku (KROFTA 2001).



Obr. č. 7: Schéma plynového chromatografu

3.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS) je jednou z analyticko-chemických metod. Používá se k stanovení hmotnosti částic nebo určení složení směsi na základě separace iontů a jejich rozlišení podle poměru hmotnosti a náboje (m/z).

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou zdroj iontů, hmotnostní analyzátor a detektor. Spektrometr využívá metodu měření doby průletu jednotlivých iontů od zdroje k detektoru. Vzorek se po vložení do přístroje ionizuje pomocí iontového zdroje, ionty se v hmotnostním analyzátoru oddělují podle poměru m/z a následně putují k detektoru. Těžší ionty mají pomalejší rychlost a doba jejich průletu je tedy delší. Celý proces probíhá ve vakuu. (ŠENOVSKÝ 2010).

Pro komplexní analýzu plyných nebo kapalných směsí se využívá plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) (KLOUDA 2013).

3.3.3 SPME

SPME (solid-phase microextraction), neboli mikroextrakce tuhou fází je adsorpčně-desorpční technika, která je jednoduchá, rychlá, citlivá a není u ní zapotřebí hořlavých rozpouštědel. Využit se dá ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií (PAWLISZYN 1997).

SPME je tvořena držákem vlákna a vláknem. Křemenné vlákno je dlouhé 1 cm, je pokryto sorpčním materiálem a je ukryto v jehle. SPME lze provádět dvěma způsoby. Prvním jen DI-SPME (Direct Immersing SPME), kdy dochází k přímému ponoření vlákna do vzorku. Druhou metodou je HS-SPME (Headspace SPME), která extrahuje

látky z oblasti nad vzorkem v uzavřené nádobě. DI-SPME se využívá převážně u kapalin, HS-SPME u těkavých látek. U metody HS-SPME propíchne jehla septum vzorkovnice a z jehly se vysune vlákno. Po získání vzorku se vlákno opět zasune do jehly a vytáhne jehla ze vzorku. Následně je vlákno zavedeno do nástřikového prostoru GC, dochází k tepelné desorpci a následné analýze vzorku (ŠENOVSKÝ 2002).

Vliv na výslednou efektivitu metody SPME má výběr stacionární fáze (tloušťka vlákna – silnější vlákno je schopno zachytit více analytu, tenčí vlákno zajišťuje lepší desorpci), délka doby sorpce, zahřívání vzorku a způsob vzorkování (CHARVÁTOVÁ 2006).

4. Metodika

4.1 Metodika práce v laboratoři

Příprava v laboratoři spočívala v kultivaci hub *Grosmannia europhioides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica* v Petriho miskách na agaru pro první sérii, nebo na agaru s drceným lýkem smrku ztepilého které sloužily jako výživové médium, a jejich následné inkubaci v inkubátoru. Na jednotlivou rotaci bylo zapotřebí připravit 4 misky od každého druhu hub, 3 misky pro model s vysokou koncentrací a 1 miskou pro model s nízkou koncentrací. Celkem tedy 12 misek s houbami na každou rotaci.

Postup u kultivace jednotlivých druhů hub byl vždy stejný. Na agar, nebo směs agaru s lýkem, který byl připraven dle protokolu z KANDASAMY (2019), v připravené Petriho misce byla za pomoci sterilního skalpelu přenesena odříznutá část mycelia vypěstované houby, tato část byla vložena na agar překlopená o 180° myceliem dolů, aby došlo ke kontaktu s agarem a následnému rychlejšímu vývoji houby. Misky byly vždy uzavřeny, popsány a poté vloženy na 7 dní do inkubátoru, kde byla nastavena teplota 25°C. Před výjezdem do terénu bylo do víčka všech misek rozžhaveným drátem vytvořeno 30 děr a poté byla víčka přelepena izolepou.

Druhá série rotací se zakládala na stejné metodice. Při této rotaci byl do agaru navíc přidán floém smrku ztepilého, opět podle protokolu z KANDASAMY (2019), ten byl během přípravy agaru přimícháván ve formě prášku. S výslednou směsí se postupovalo při kultivaci hub stejně, jako při první rotaci.

4.2 Metodika měření a vyhodnocení látek, které houby emitují

Perforovaná Petriho miska s jednotlivým druhem houby na agaru byla ve stádiu 4 denního mycelia umístěna v exsikátoru o objemu 2 l. Po 30 minut se nechal vzduch v nádobě plně nasycit emitovanými těkavými látkami. Použitím metody Headspace SPME byly na vlákno sorbovány po dobu 10 min těkavé látky. SPME vlákno bylo desorbováno v nástřiku plynového chromatografu s hmotnostní detekcí. Po analýze vzorků, srovnání hmotnostních spekter s knihovnou NIST byly výsledky vyhodnoceny, a identifikované látky byly srovnány s předpokládaným profilem těkavých látek z hub uvedeným v KANDASAMY (2019).

K analýze získaných vzorků byl použit plynový chromatograf Agilent 7890B, vybavený kapilárními kolonami. Rxi-5: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. HP-5 MS-UI 30 m

x 0,25 mm x 0,25 µm. Nástřik při 20°C, vyhřáto rychlostí 8°C/s do teploty 275°C. Teplotní program pro 1D pec byl naprogramován na 40°C (1 min) s postupným zvyšováním o 10°C/min do 190°C a 20°C/min do 280°C. Nosným plynem bylo helium s konstantním průtokem 1 ml/min. Teplota transferline činila 280°C. Hmotnostní spektrometr byl nastaven na elektronovou ionizaci při 70 ev. Hmotnostní rozsah činil 35 – 500 m/z. Doba analýzy byla stanovena na 20 minut s akviziční rychlostí 10 spekter/s. Teplota iontového zdroje byla 250°C.

4.3 Metodika práce v terénu

Pro vlastní výzkum byla vybrána vhodná lokalita v blízkosti osady Klíče, která správně spadá pod blízkou obec Konojedy v okrese Praha-východ ve Středočeském kraji. Přesné souřadnice porostu jsou 49.93343N, 14.87704E. Jedná se o přibližně 120 metrů široké stanoviště s mírně svažitém terénem a porostní stěnou na západě. Převažující dřevinou je smrk ztepilý, který je doplňován jedlí bělokorou, *Abies alba* (Miller, 1768).

V lesním porostu se na určené pasece rozmístilo celkem 9 křížových feromonových lapačů typu Ecotrap ve vzdálenosti přibližně 30 metrů od nejbližší smrkové porostní stěny a ve vzájemném rozestupu 15 metrů. Lapače byly uchyceny na dvoumetrové, do země zatlučené, dřevěné hranoly do výšky 1,5 metru. Vzorový lapač je znázorněn na obr. č. 8.



Obr. č. 8: Připravená houba *Endoconidiophora polonica* k umístění do lapače, lapač s návnadou.

Při první sérii rotací byly do jednotlivých lapačů umísťovány návnady s předem napěstovanými a připravenými houbami na agaru v Petriho miskách, samotný agar, pohlavní agregační feromon 1. smrkového (2-methyl-3-buten-2-ol a cis-verbenol) a jeden lapač zůstal vždy prázdný. Všechny typy návnad jsou uvedeny v tabulce č. 5. Lapače s agarem a feromonem a prázdný lapač sloužily v tomto pokusu jako reference. Každá houba byla umísťována do dvou lapačů v různých koncentracích, toho bylo dosaženo tak, že v jednom lapači byla umístěna 1 Petriho miska s danou houbou a do dalšího lapače 3 misky. Návnady s mycelií 4 dny po inokulaci hub, byly aktivní v lapačích po 3dny, pak byly měněny za čerstvé návnady s houbami inokulovanými po 4 dny v laboratoři.

Do každého lapače byla umístěna jiná návnada a po každém sběru byly nově vytvořené a dovezené návnady rotovány po diagonále tak, aby během celého pokusu byla každá návnada v jednotlivých lapačích právě jednou. Toto schéma je znázorněno v tabulce č. 6. Z jednotlivých feromonových pastí byly brouci během každého sběru vždy umístěni zvlášť do PE lahviček s 95 % etanolem a lahvička byla popsána datem sběru, pořadím rotace a návnadou. Z hlediska vývoje hub a jimi emitovaných látek bylo nejvhodnější provádět rotace v intervalu 3-4 dní.

Během druhé série rotací byl postup naprosto totožný. Jediným rozdílem byl ten, že houby nebyly vypěstovány na čistém agaru, ale na směsi agaru s lýkem, viz metodika v laboratoři. Schéma rotací je uvedeno v tabulce č. 4.

Tab. č. 4: Jednotlivé návnady do feromonových lapačů

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

Tab. č. 5: Schéma rotování jednotlivých návnad při první sérii rotací, houby pěstované na čistém agaru

Číslo rotace	Datum rotace	Návnada v lapačích								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	25.4.	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2	26.4.	I	A	B	C	D	E	F	G	H
3	29.4.	H	I	A	B	C	D	E	F	G
4	2.5.	G	H	I	A	B	C	D	E	F
5	6.5.	F	G	H	I	A	B	C	D	E
6	9.5.	E	F	G	H	I	A	B	C	D
7	13.5.	D	E	F	G	H	I	A	B	C
8	21.5.	C	D	E	F	G	H	I	A	B
9	23.5.	B	C	D	E	F	G	H	I	A

Tab. č. 6: Schéma rotování jednotlivých návnad při druhé sérii rotací, houby pěstované na agaru s lýkem

Číslo rotace	Datum rotace	Návnada v lapačích								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	4.7.	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2	8.7.	I	A	B	C	D	E	F	G	H
3	12.7.	H	I	A	B	C	D	E	F	G
4	16.7.	G	H	I	A	B	C	D	E	F
5	19.7.	F	G	H	I	A	B	C	D	E
6	23.7.	E	F	G	H	I	A	B	C	D
7	26.7.	D	E	F	G	H	I	A	B	C
8	30.7.	C	D	E	F	G	H	I	A	B
9	2.8.	B	C	D	E	F	G	H	I	A



Obr. č. 9: Odchycený hmyz z feromonového lapače v PE lahvičce s etanolem

4.4 Metodika vyhodnocení odchyť v laboratoři

V laboratoři bylo zapotřebí obsah všech jednotlivých lahviček s odchyceným hmyzem postupně vytřídit. Cílovým broukem byl l. smrkový, do lapačů se však nachytl i další necílový hmyz a z toho důvodu bylo potřeba jej za pomoci mikroskopu, pinzety a Petriho misek vyseparovat. Nejčastějším druhem necílového hmyzu byl lýkožrout lesklý, *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus, 1761), dále se vyskytlo několik jedinců pestrokrovečníka mravenčího, *Thanasimus formicarius* (Linnaeus, 1758), a různé druhy pavouků, much či jiných brouků. Tento necílový hmyz byl uložen zvlášť do samostatné PE ampule s lihem a popsán stejným způsobem, jako lahvičky při sběru v terénu.

Po vytřídění l. smrkového od ostatního hmyzu byl v Petriho misce pomocí pinzety určen počet brouků l. smrkového v jednotlivých odchytech, výsledky zapsány do formuláře a po dokončení všech rotací byly všechny výsledky statisticky vyhodnoceny.



Obr. č. 10: Třídění a počítání hmyzu pod mikroskopem

4.5 Metodika statistické analýzy

Základním vyhodnocením získaných výsledků bylo srovnání absolutních počtů, a to jak pro jednotlivé rotace, tak pro celé série rotací. Následně byl vypočten relativní podíl odchytů jednotlivých návnad pro každou rotaci. Průměrný relativní podíl odchytů pro jednotlivé návnady byl poté srovnán v grafu 2 pro experiment s houbami pěstovanými na agaru a houbami pěstovanými na agaru s lýkem.

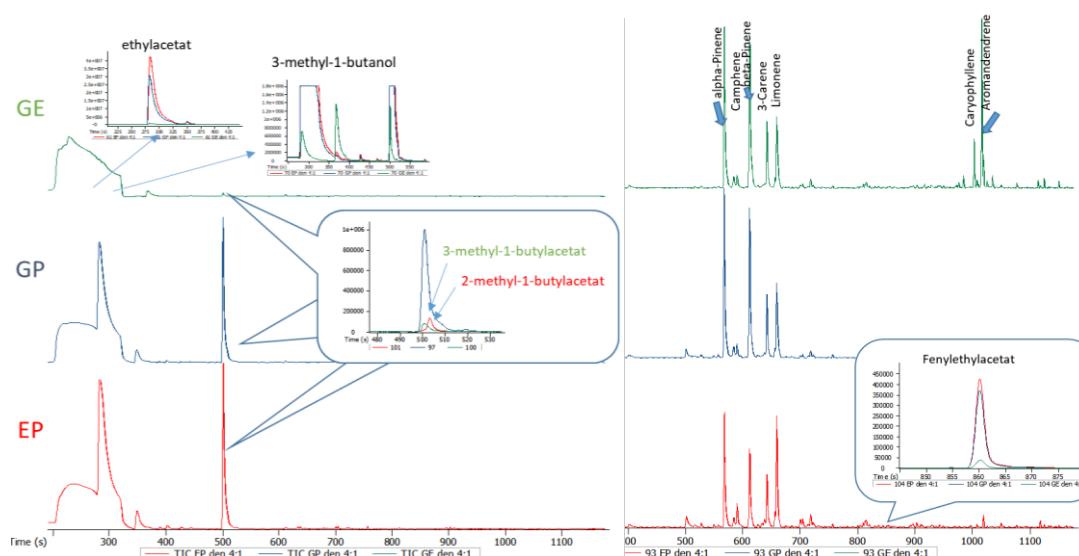
Porovnání aktivity jednotlivých hub mezi sebou a vůči návnadě s feromonem bylo statistickou analýzou s použitím generalizovaného lineárního modelu s negativně binomickým rozdělením. Pomocí analýzy rozptylu byla poté testována rozdílnost jednotlivých látek. Pomocí treatmentu kontrastů se porovnaly jednotlivé úrovně faktorů. V první variantě byl použit absolutní počet odchycených kůrovců jako závislá proměnná, v druhé variantě pak relativní počet odchycených lýkožroutů vztažený k jednotlivým odběrům v dané replikaci.

U první série rotací model 1 představuje porovnání absolutních odchytů brouků s odchycením na feromon, model 2 porovnání relativních počtů s feromonem a model 3 relativní počet brouků ve srovnání s odchycením na agar s feromonem. U druhé série je model 1 a model 2 vztažen k odchycení na agar s feromonem.

5. Výsledky

5.1 Analýza těkavých látek v návnadách z mycelií hub

TIC (Total ion current) chromatogramy z látek sorbovaných SPME technikou z 1 Petriho misky s jednotlivými houbami na agaru ukázali dominantní pík u všech testovaných druhů pro látky s nízkou molekulovou hmotností a dále pík s retenčním časem 500s, který měl velkou plochu u druhů *G. penicillata* a *E. polonica*. V tomto píku jsme identifikovali dvě látky - 3-methyl-1-butylacetát, 2-methyl-1-butylacetát. Dále jsme metodou cílové analýzy, kdy jsme z chromatogramů extrahovali hmoty specifické pro hledané látky, identifikovali sloučeniny, které Kandasamy (2019) určil jako aktivní. Určili jsme přítomnost ethylacetátu, fenylethylacetátu, 3-methyl-1-butanolu. Extrakcí hmoty 93 jsme určili profil emitovaných terpenických látek alpha-pinenu, beta-pinenu, camphene, 3-carene, limonene, caryophyllene a aromandendrene. Jednotlivé látky, které jsme zjistili pomocí metody GC-MS, jsou uvedeny na obrázku č. 11.



Obr. č. 11: Analýza houbami produkováných těkavých látek na médiu z čistého agaru, Chromatogramy TIC a generované na specifických hmotách pro hledané látky.

5.2 Terénní pokus

V průběhu terénního pokusu bylo na pokusné ploše odchyceno v připravených lapačích celkem 29 132 jedinců lýkožrouta smrkového. Během první série rotací bylo odchyceno 14 095 jedinců a v průběhu druhé série rotací 15 037 jedinců l. smrkového.

V první sérii rotací, kdy byl jako výživa hub použit pouze agar, byly jednotlivé absolutní odchvy do návnad s houbami větší než odchvy na agar s feromonem pouze

ve 3 případech – houba *G. penicillata* v nízké koncentraci, *E. polonica* v nízké koncentraci a *G. penicillata* ve vysoké koncentraci. Ve srovnání s odchytem pouze na feromon pak byly odchyty na návnady s houbami vždy větší kromě jednoho případu – *G. europheoides* v nízké koncentraci. Do prázdného kontrolního lapače se za celou dobu pokusu v první sérii rotací odchytily celkem 4 brouci, což lze připočítat náhodnému disperznímu letu a jejich nárazu do lapače.

Během druhé série rotací, v níž byla jako výživa použita směs agaru s floémem, se absolutní odchyty v jednotlivých návnadách lišili ještě méně. Vyšší odchyt, než na návnadu agaru s feromonem byl zaznamenán pouze ve dvou případech – u *G. penicillata* ve vysoké koncentraci a u *E. polonica* ve vysoké koncentraci. Oproti první sérii pak byl odchyt na návnadu pouze s feromonem celkově nejvyšší za celou druhou sérii a žádná návnada s houbou jej nepřevýšila. V prázdných lapačích bylo zaznamenáno během této série rotací celkem 5 jedinců l. smrkového.

Při srovnání pomocí průměru relativních odchytů návnady s houbami ve všech případech předčili, nebo se alespoň vyrovnaly návnadě s agarem a feromonem. Ve srovnání pouze s feromonem pak tuto návnadu u první série rotací výrazně předčily všechny návnady s houbami. U druhé série rotací však již pouze *Grosmannia penicillata* ve vysoké koncentraci. Největší podíl pak u první série měla návnada s nízkou koncentrací houby *Endoconidiophora polonica*. U druhé série již zmiňovaná *Grosmannia penicillata*.

Absolutní odchyty v jednotlivých sériích a návnadách jsou znázorněny v tabulce č. 8 a č. 9. Relativní odchyty celkem za jednotlivé návnady v první a druhé sérii jsou pak znázorněny v grafu č. 2.

Tab. č. 7: Legenda k tabulkám č. 8 a 9 a grafu s výsledky č. 2

Zkratka	Význam	Poznámka
Gp l + pher	Grosmannia penicillata + feromon	Nízká koncentrace
Ge l + pher	Grosmannia europheoides + feromon	Nízká koncentrace
Ep l + pher	Endoconidiophora polonica + feromon	Nízká koncentrace
Gp h + pher	Grosmannia penicillata + feromon	Vysoká koncentrace
Ge h + pher	Grosmannia europheoides + feromon	Vysoká koncentrace
Ep h + pher	Endoconidiophora polonica + feromon	Vysoká koncentrace
Agar+pher	Agar	Kontrolní prvek
Pher	Feromon	Kontrolní prvek
Prázdná	Bez návnady, prázdný lapač	Kontrolní prvek

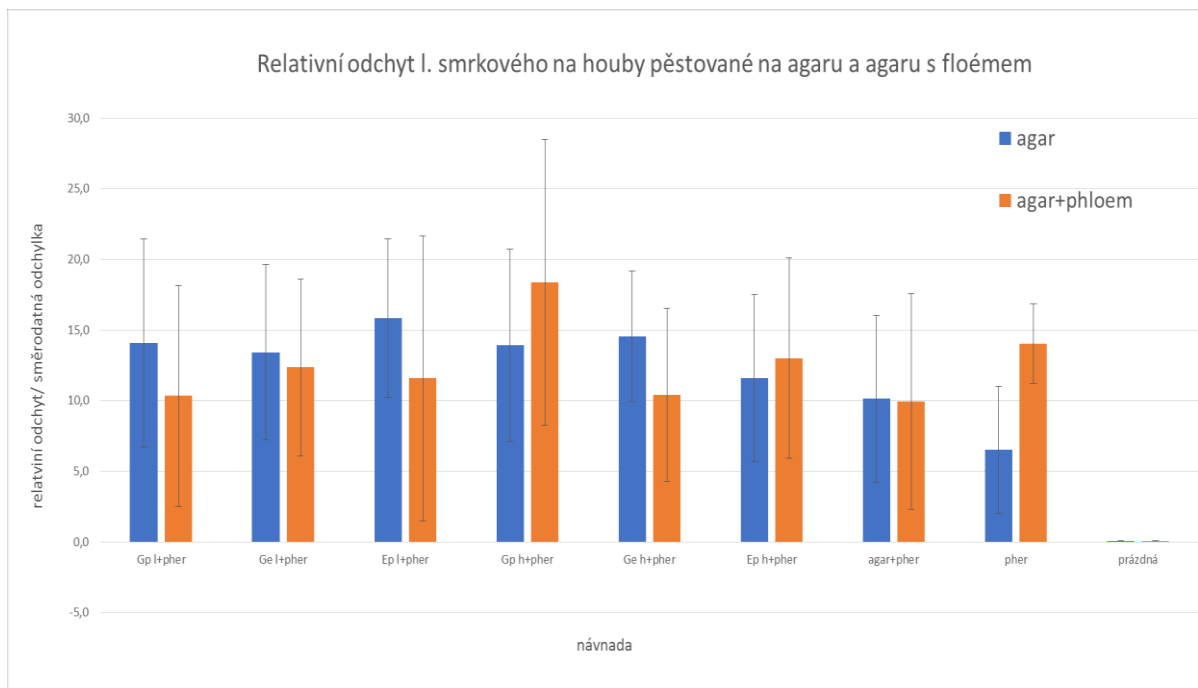
Tab. č. 8: Celkové počty odchycených brouků na houby pěstované na agaru

Tab. č. 9: Celkové počty odchycených brouků na houby pěstované na agaru a floému

Tabulka č. 8 je vlevo, tabulka č. 9 vpravo.

Replikace/ návnada	Celkové počty odchycených brouků na houby pěstované na agaru											Prázdna	Suma
	Gp l+pher	Ge l+pher	Ep l+pher	Gp h+pher	Ge h+pher	Ep h+pher	Agar+pher	Pher					
1	209	161	128	66	104	92	133	74			0	967	
2	387	131	137	195	180	200	158	117			0	1505	
3	6	2	1	1	1	0	3	6			2	22	
4	8	48	41	183	116	65	12	6			1	480	
5	10	14	18	13	15	3	3	6			0	82	
6	14	27	18	9	40	29	17	12			0	166	
7	13	12	15	11	6	2	1	3			0	63	
8	754	218	3074	1167	947	638	757	609			1	8165	
9	7	17	8	6	6	20	10	3			0	77	
10	464	214	179	164	326	252	683	286			0	2568	
Suma	1872	844	3619	1815	1741	1301	1777	1122			4	14095	

Replikace/ návnada	Celkové počty odchycených brouků na houby pěstované na agaru s floémem											Prázdna	Suma
	Gp l+pher	Ge l+pher	Ep l+pher	Gp h+pher	Ge h+pher	Ep h+pher	agar+pher	pher					
1	791	455	705	535	521	955	572	987			1	5522	
2	406	350	460	628	897	691	837	1018			0	5287	
3	43	217	335	508	188	290	310	232			4	2127	
4	5	23	39	33	13	22	30	27			0	192	
5	82	58	38	71	96	132	119	142			0	738	
6	58	44	31	88	53	75	30	37			0	416	
7	16	41	28	116	65	73	22	36			0	397	
8	35	59	56	60	14	17	3	51			0	295	
9	16	16	5	14	3	1	2	6			0	63	
Suma	1452	1263	1697	2053	1850	2256	1925	2536			5	15037	



Graf č. 2: Relativní odchyt *I. smrkového* na houby

Výsledky statistické analýzy pomocí generalizovaného lineárního modelu jsou uvedeny v tabulce číslo 10 pro první sérii rotací a v tabulce číslo 11 pro druhou sérii rotací. U první série můžeme pozorovat statistickou významnost ve všech modelech u houby *E. polonica* v nízké koncentraci. U druhé série rotací byly statisticky významné relativní odchyt u houby *G. penicillata* ve vysoké koncentraci.

Tab. č. 10: Generalizovaný lineární model pro první sérii odchytů

AGAR						
			absolut catches	relative catches		
			5.44e-08 ***	< 2.2e-16 ***		
dose	mean	sd	MODEL 1	MODEL 2	MODEL 3	
pher	124,00	204,23	x	x	0,0963	.
agar+pher	197,11	302,71	0,4968	0,096323	.	x
empty	0,22	0,44	1,20E-10 ***	0,994626	.	9,95E-01
Ep high	144,56	205,07	0,8221	0,030903 *	.	0,6155
Ep low	402,00	1 004,05	0,0846	0,000844 ***	.	0,0877
Ge high	193,33	301,09	0,515	0,002447 **	.	0,164
Ge low	93,56	87,53	0,6798	0,007004 **	.	0,2933
Gp high	201,56	370,72	0,4764	0,005268 **	.	0,2516
Gp low	207,33	271,79	0,4511	0,003956 **	.	0,215

Tab. č. 11: Generalizovaný lineární model pro druhou sérii odchytů

AGAR + PHLOEM				
			absolut catches	relative catches
			7.911e-08 ***	0.08401 .
<i>dose</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	MODEL 1	MODEL 2
agar+pher	213,89	301,78	x	x
pher	281,78	414,72	0,657	0,1313
empty	0,56	1,33	6,75E-15 ***	
Ep high	250,67	342,28	0,798	0,24221
Ep low	188,56	252,18	0,839	0,52365
Ge high	205,56	305,72	0,949	0,84937
Ge low	140,33	162,26	0,497	0,35209
Gp high	228,11	250,37	0,917	0,00559 **
Gp low	161,33	266,92	0,649	0,88625

6. Diskuze

Provedli jsme dvě série polních pokusů, s houbami pěstovanými na umělém živném médiu agaru a na médiu, které mimikovalo hostitelský strom agar s rozdrceným lýkem ze smrku ztepilého. Metodou GC-MS byly identifikované látky produkované 3 druhy asociovaných hub s l. smrkovým a lze konstatovat, že zjištěné látky odpovídají pokusu, které provedl KANDASAMY (2019). Jedinou látkou, která nebyla zjištěna byl fenyletanol. Důvodem různé koncentrace jednotlivých látek nebo jejich chybějící detekce může spočívat ve způsobu extrakce látek ze vzorku. Oproti metodice, uvedené v této práci, použil KANDASAMY (2019) dynamický head space z otevřené Petriho misky v nádobě o obsahu 1 litru. Zjištěn byl například také alpha-pinen, což je dle SKUHRAVÉHO (2002) hlavní monoterpen smrku. Dalšími látkami, které produkují asociované houby a jsou zároveň monoterpeny smrku, jsou beta-pinen, camphen a limonen. I to může být jeden z důvodů, proč jsou zkoumané houby pro l. smrkového atraktivnější.

KANDASAMY (2019) ve svém laboratorním pokusu zjistil, že l. smrkový z asociovaných hub nejvíce preferuje houbu *E. polonica*. Ve výběru mezi *E. polonica* a *G. penicillata* a mezi *E. polonica* a *G. europhioides* byly rozdíly statisticky nevýznamné, přesto bychom mohli usuzovat, že těkavé látky, které *E. polonica* produkuje, a to především acetáty mají největší atraktivitu.

Výsledky, získané v našem terénním pokusu, jsou velmi vyrovnané. U první série rotací se v absolutních i relativních číslech dostal na prvním místo lapač s feromonem s nízkou koncentrací houby *E. polonica*, a rovněž prokázaly statistickou významnost ve všech použitých modelech aplikovaného generalizovaného lineárního modelu. Ve vysoké koncentraci již však tolik atraktivní *E. polonica* v lapači nebyla, ve srovnání pomocí průměrných relativních odchytů se mezi houbami umístila až na posledním místě. Behaviorální aktivita tedy záleží na koncentraci těkavých látek emitovaných houbami, což odpovídá zjištění z laboratorního behaviorálního testu KANDASAMY (2019), kdy *E. polonica* byla signifikantně atraktivní pouze v ředění 10^{-7} , ve vyšších koncentracích naopak kůrovec odpuzovala.

Ve druhé sérii rotací na agaru s lýkem sice ve srovnání absolutních číslech u nízké i vysoké koncentrace projevovale nejvyšší odchty návnada s *E. polonica* ale po statistickém zpracování v modelu 2, kdy byly relativní odchty na návnady porovnávány s referencí samotného agaru s lýkem, se signifikantně vyšší odchty

projevily u *G. penicillata* ve vysoké koncentraci, což může být způsobeno schopností této houby přeměňovat složky lýka v atraktivní látky, a odpovídá výsledkům z behaviorálních pokusů KANDASAMY (2019.)

Rojení kůrovce je velmi závislé na klimatických podmínkách, nadmořské výšce a expozici daného stanoviště. Fenologický model počítá se začátkem rojení po naplnění 557 DD. Vhodné letové podmínky nastávají pro lýkožrouta smrkového po dosažení teploty 16°C Aktivní let pak probíhá v rozmezí 14 – 39°C. Optimum nastává při teplotě 22 – 26°C. Při teplotách nad 40°C nejsou brouci aktivní a při teplotě nad 50°C brouci hynou. (KINDLMANN et. al. 2012).

U první série rotací nastaly ideální letové podmínky u první a druhé rotace. To se projevilo i na výsledcích, kdy ve srovnání s ostatními dny, byla absolutní čísla vyšší. Výjimku představuje 8 a 10 rotace, které svými odchylkami překonaly i první a druhou rotaci. Vysoký odchyl u deváté rotace mohl být ovlivněn dlouhou dobou, po kterou byly návnady v terénu umístěny.

U druhé série rotací nastaly ideální podmínky mnohem častěji, protože terénní pokus se konal převážně v červenci. Kromě několika chladnějších dní ve třetině měsíce, ve srovnání se zbytkem měsíce, teploty byly vždy vyšší než 20°C. Nulové srážky a optimální teploty mohly zapříčinit vysoké odchylky během prvních tří rotací. Občasné srážky pak mohly způsobit nižší letovou aktivitu, a tudíž i nižší odchylky u posledních rotací.

Tab. č. 12: Klimatické podmínky během 1. série rotací

Číslo rotace	Datum rotace	Nejvyšší denní teplota v °C	Denní srážky v mm (7:00-19:00)	Číslo rotace	Datum rotace	Nejvyšší denní teplota v °C	Denní srážky v mm (7:00-19:00)
1	25.4.	24	0		10.5.	16	0,4
2	26.4.	26	0		11.5.	15	2,1
	27.4.	14	0,6		12.5.	10	1,5
	28.4.	12	0	7	13.5.	13	0
3	29.4.	15	0		14.5.	9	4,7
	30.4.	14	0		15.5.	6	2,2
	1.5.	16	0		16.5.	9	0
4	2.5.	19	0		17.5.	15	0
	3.5.	8	2,3		18.5.	19	0
	4.5.	12	2,4		19.5.	22	1,4
	5.5.	8	0,1		20.5.	15	6,2
5	6.5.	9	0,4	8, 9	21.5.	19	0
	7.5.	11	0		22.5.	12	6,0
	8.5.	16	0	10	23.5.	16	2,7
6	9.5.	17	0,5				

Tab. č. 13: Klimatické podmínky během 2. série rotací

Číslo rotace	Datum rotace	Nejvyšší denní teplota v °C	Denní srážky v mm (7:00-19:00)	Číslo rotace	Datum rotace	Nejvyšší denní teplota v °C	Denní srážky v mm (7:00-19:00)
1	4.7.	24	0	5	19.7.	23	1
	5.7.	25	0		20.7.	29	0
	6.7.	31	0		21.7.	24	7,6
	7.7.	18	0		22.7.	28	0
2	8.7.	19	0	6	23.7.	30	0
	9.7.	17	0		24.7.	31	0
	10.7.	21	0		25.7.	33	0
	11.7.	21	0	7	26.7.	33	0
3	12.7.	20	6,6		27.7.	28	3,7
	13.7.	17	3,4		28.7.	26	0
	14.7.	20	0,7		29.7.	26	1
	15.7.	20	0	8	30.7.	25	0
4	16.7.	21	0		31.7.	25	6
	17.7.	21	0		1.8.	24	0
	18.7.	25	0	9	2.8.	24	0

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zkoumání atraktivity těkavých látek, produkovaných asociovanými houbami s lýkožroutem smrkovým, v rámci polního pokusu a srovnání jejich atraktivity v kombinaci s feromonem I. smrkového. Konkrétně šlo o houby druhu *Grosmannia europfioides*, *Grosmannia penicillata* a *Endoconidiophora polonica*. Pomocí metody SPME byly v laboratoři absorbovány těkavé látky, které tyto houby produkují, aby byly následně pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí 9GC-MS analyzovány jejich jednotlivé složky.

Analýzou GC-MS byly potvrzeny látky, které uvádí KANDASAMY (2019) ve svých analýzách hub, u kterých testoval aktivitu v laboratorním behaviorálním testu. Identifikované látky jsou např. součástí pohlavního feromonu I. smrkového nebo také látky, které jsou důležité monoterpeny smrku ztepilého. Proto může přítomnost těchto asociovaných hub zvyšovat atraktivitu pro I. smrkového ať už v rámci lapačů nebo samotných stojících stromů.

Během jarního a letního rojení bylo ve dvou sériích umístěno 9 lapačů s různými návnadami na pasece v blízkosti porostní stěny smrku ztepilého. Bylo provedeno celkem 9 rotací v rámci každé série, kdy se návnady v lapačích vždy přemístily tak, aby byly právě jednou na každém místě. Po každé rotaci byly odchycení brouci umístěni do nádob s etanolem a následně v laboratoři jedinci I. smrkového vytříděni od necílového hmyzu a spočítáni. Následně byla provedena statistická analýza, která měla atraktivitu jednotlivých hub vyhodnotit.

Celkem bylo odchyceno během pokusu v první sérii 14 095 brouků a v druhé sérii 15 037 brouků. Dohromady tedy 29 132 jedinců I. smrkového. Statistickou analýzou bylo zjištěno, že statisticky nejvýznamnější odchvy, a tedy i nejatraktivnější byl pro lýkožrouta smrkového během první série rotací lapač s houbou *E. polonica* v nízké koncentraci (jedna miska s houbou). Během druhé série na agaru s lýkem byl pak nejatraktivnější lapač s houbou *G. penicillata* ve vysoké koncentraci (tři misky s houbou).

Vzhledem k současné kůrovcové kalamitě, která nabývá celoevropských rozměrů a škody se šplhají do desítek miliard Kč, i budoucímu předpokládanému vývoji jak klimatických podmínek, tak stavu lesa, je zapotřebí hledat jiná řešení v boji s tímto škůdcem nebo zefektivnit současná opatření. Použití látek, které tyto asociované houby emitují, by mohlo zvýšit atraktivitu průmyslově vyráběných návnad do lapačů. Ochrana

lesních porostů by mohla být v tomto účinnější. Další výzkum by se měl zabývat konkrétními látkami, které tyto houby emitují a maximálně zvyšují atraktivitu pastí, určených tomuto kalamitnímu škůdci.

8. Seznam literatury a použitých zdrojů

BAKKE, A.; FRÖYEN, P.; SKATTEBÖL, L. Field response to a new pheromonal compound isolated from *Ips typographus*. *Naturwissenschaften*. 1977, no. 64, s. 98-99. ISSN 1432-1904.

BECK, J. J.; MAHONEY, N. E.; COOK, D.; GEE, W. S. Generation of the volatile spiroketals conophthorin and chalcogran by fungal spores on polyunsaturated fatty acids common to almonds and pistachios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, no. 60, s. 11869-11876. ISSN 1520-5118.

BENTZ, B. J.; SIX, D. L. Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America*. 2006, no. 99, s. 189-194. ISSN 0013-8746.

BIRGERSSON, G.; SCHLYTER, F.; LOFQVIST, J.; BERGSTROM, G. Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology*. 1984, no. 10, s. 1029-1055. ISSN: 0098-0331.

BOONE, C. K.; SIX, D. L.; ZHENG, Y.; RAFFA, K. F. Parasitoids and dipteran predators exploit volatiles from microbial symbionts to locate bark beetles. *Environmental Entomology*. 2008, no. 37, s. 150-161. ISSN: 1938-2936.

BYERS, J. A. Host-tree chemistry affecting colonization in bark beetles. *Chemical ecology of insects*. 1995, no. 2, s. 154-213. ISBN 978-0412039614.

Česko, Ministerstvo Zemědělství. Vyhláška č. 101 ze dne 28. března 1996, kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor služebního odznaku a vzor průkazu lesní strážce. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 1996, částka 33, s. 1124. ISSN 1211-1244.

Česko, Ministerstvo Zemědělství. Vyhláška č. 236 ze dne 18. července 2000, kterou se mění vyhláška MZe č. 101/1996 Sb., kterou se stanoví podrobnosti o opatřeních k ochraně lesa a vzor odznaku a vzor průkazu lesní stráže. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2000, částka 72, s. 3424. ISSN 1211-1244.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*. 2014, no. 79, s. 187-219. ISBN: 978-94-91751-00-4.

FURNISS, M. M.; SOLHEIM, H.; CHRISTIANSEN, E. Transmission of Blue-Stain Fungi by *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) in Norway Spruce. *Annals of the Entomological Society of America*. 1990, no. 83, s. 712-716. ISSN 0013-8746.

HUDEC, K.; KOLIBÁČ, J.; LAŠTŮVKA, Z.; PEŇÁZ, M.; a kol. *Příroda České republiky*. 1. vyd. Praha: Academia, 2007. 439 s. ISBN 978-80-200-1569-3.

HULCR, J. Spojenecká armáda lýkožroutů a hub proti stromu. *Vesmír*. 2003/12, no. 82, s. 692. ISSN 1214-4029.

CHARVÁTOVÁ, M. *Využití metody SPME při analýze látek pocházejících z polymerů kontaminujících potravní řetězce* [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2006 [cit. 2020-13-02]. Dostupné z WWW: <<http://soubory.vfu.cz/fvhe/metoda-spme/>>.

CHRISTIANSEN E. *Ips/Ceratocystis*-infection of Norway spruce: what is a deadly dosage? *Angew. Ent.* 1985, no. 99, s. 6-11. ISSN 1439-0418.

JAKUŠ, R.; BLAŽENEC, M. *Princípy ochrany dospelých smrekových porastov pred podkôrnym hmyzom*. 1. vyd. Zvolen: Ústav ekológie lesa, Slovenská akadémia vied, 2015. 231 s. ISBN 9788089408214.

JANKOWIAK, R.; KOT, M. Ophiostomatoid fungi associated with bark beetles (coleoptera: scolytidae) colonizing branches of *pinus sylvestris* in southern poland. *Polish Botanical Journal*. 2011, no. 56, s. 287-293. ISSN: 2084-4352.

JANKOWIAK, R.; KOLAŘÍK, M.; BILAŃSKI, P. Association of Geosmithia fungi (Ascomycota: Hypocreales) with pine- and spruce-infesting bark beetles in Poland. *Fungal Ecology*. 2014, no. 11, s. 71-79. ISSN: 1754-5048.

KANDASAMY, D.; GERSHENZON, J.; HAMMERBACHER, A. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology*. 2016, no. 42, s. 952-969. ISSN 0098-0331.

KANDASAMY, D.; GERSHENZON, J.; ANDERSSON, M. N.; HAMMERBACHER, A. Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *The ISME Journal*. 2019, no. 13, s. 1788-1800. ISSN 1751-7370.

KINDLMANN, P.; MATĚJKA, K.; DOLEŽAL, P. *Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody*. Praha: Karolinum, 2012. 328 s. ISBN 978-80-246-2155-5.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

KROFTA, J. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. 6. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. s. 165. ISBN 80-7080-451-3.

KROKENE, P.; SOLHEIM, H. Assessing the virulence of four bark beetle-associated bluestain fungi using Norway spruce seedlings. *Plant Pathology*. 2002, no. 47, s. 537-540. ISSN 1365-3059.

KŘÍSTEK, J.; JANČAŘÍK, V.; MENTBERGER, J.; VOLNÝ, S. *Ochrana lesů a přírodního prostředí*. Písek: Matice lesnická, 2002. 386 s. ISBN 8086271-08-0.

KŘÍSTEK, J.; URBAN, J. *Lesnická entomologie*. 2. vyd. Praha: Academia, 2013. 445 s. ISBN 978-80-200-2237-0.

MARTIKAINEN, P.; SIITONEN, J.; KAILA, L.; PUNTTILA, P.; RAUH, J. Bark beetles (Coleoptera, Scolytidae) and associated beetle species in mature managed and old-growth boreal forests in southern Finland. *Forest Ecology and Management*. 1999, no. 116, s. 233-245. ISSN 0378-1127.

MAYO, P.; SILK, P.; CUSSON, M.; BELIVEAU, C. Steps in the Biosynthesis of Fuscumol in the Longhorn Beetles *Tetropium fuscum* (F.) and *Tetropium cinnamopterum* Kirby. *Journal of Chemical Ecology*. 2013, no. 39, s. 377-389. ISSN 0098-0331.

MUSIL, I.; HAMERNÍK J.; LEUGNEROVÁ G. *Lesnická dendrologie 1: jehličnaté dřeviny*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2002. 177 s. ISBN 8-213-0992-X.

NÉVE REPE, A.; KIRISITS, T.; PIŠKUR, B.; DE GROOT, M.; KUMP, B.; JURC, M. Ophiostomatoid fungi associated with three spruce-infesting bark beetles in Slovenia. *Annals of Forest Science*. 2013, no. 70, s. 717-727. ISSN 1286-4560.

NOVOTNÝ, D.; JANKOVSKÝ, L. Notes on mycobiota associated with *Ips typographus* from the Šumava Mts. (Czech Republic). *Czech mycology*. 2005, no. 57, s. 91-96. ISSN 1211-0981.

PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York: Wiley – VCH, Inc, 1997. 247 s. ISBN 0-471-19034-9.

PFEFFER, A. *Fauna ČSR. Svazek 6, Kůrovci – Scolytoidea (řád: Brouci – Coleoptera)*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1955. 324 s.

SCHLYTER, F.; G. BIRGERSONN, J. A.; BYERS, J.; LÖFQVIST, et al. Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates. *Journal of Chemical Ecology*, 1987, 13(4), 701-716. ISSN 0098-0331.

SKUHRAVÝ, V. *Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.) a jeho kalamity*. Praha: Agrospoj, 2002. 196 s. ISBN 80-7084-238-5.

SOLHEIM, H. Fungal succession in sapwood of Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*. *European Journal of Forest Pathology*. 1992, no. 22, s. 136-148. ISSN 1439-0329.

ŠENOVSKÝ, M. *Požární ochrana: sborník přednášek z mezinárodní konference*. Ostrava, Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě, 2002. s. 125-133. ISBN 80-86634-07-8.

ŠENOVSKÝ, M. *Požární ochrana: sborník přednášek z mezinárodní konference*. Ostrava, Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě, 2010. s. 276-280. ISBN 978-80-7385-087-6.

Ventusky [online]. [cit. 2020–2–4]. Dostupné z WWW: <<https://www.ventusky.com/>>.

VIIRI, H.; Fungal associates of the spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Col. Scolytidae) in relation to different trapping methods. *Journal of Applied Entomology*. 1997, no. 121, s. 529-533. ISSN: 1439-0418.

WESLIEN J.; REGNANDER J., Colonization densities and offspring production in the bark beetle *Ips typographus* (L.) in standing spruce trees. *Journal of Applied Entomology*. 2009, no. 109, s. 358-366. ISSN: 1439-0418.

ZAHRADNÍK, P. Lýkožrout lesklý *Pityogenes chalcographus* (L.). *Lesnická práce*. 2007, no. 4, s. I–IV. ISSN 0322-9254.

ZHANG, Q. H.; SCHLYTER, F.; ANDERSON, P. Green Leaf Volatiles Interrupt Pheromone Response of Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* *Journal of Chemical Ecology*. 1999, no. 25, s. 2847-2861. ISSN 0098-0331.

ZHANG, Q. H.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. Bark volatiles from nonhost angiosperm trees of spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae): Chemical and electrophysiological analysis. *Chemoecology*. 2000, no. 10, s. 69-80. ISSN 0937-7409.

ZHAO, T.; AXELSSON, K.; KROKENE, P.; BORG-KARLSON, A. K.. Fungal Symbionts of the Spruce Bark Beetle Synthesize the Beetle Aggregation Pheromone 2-Methyl-3-buten-2-ol. *Journal of Chemical Ecology*. 2015, no. 41, s. 848-852. ISSN 0098-0331.

ZHAO, T.; GANJI, S.; SCHIEBE, CH.; BOHMAN, B.; WEINSTEIN, P.; KROKENE, P.; BORG-KARLSON, A. K.; UNELIUS, C. K. Convergent evolution of semiochemicals across Kingdoms: bark beetles and their fungal symbionts. *The ISME Journal*. 2019, no. 13, s. 1535-1545. ISSN 1751-7370.

ZPRÁVA O STAVU LESA A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY 2018. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2016. 133 s. ISBN 978-80-7434-530-2.

9. Přílohy

Příloha č. 1: Výsledky chemické analýzy těkavých látek

