

Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



**VLIV ENERGETICKÝCH REZERV NA ÚSPĚŠNOST
PŘEZIMOVÁNÍ A REPRODUKČNÍ POTENCIÁL
LÝKOŽROUTA SMRKOVÉHO (*Ips typographus* (L.))**

Magisterská diplomová práce

Bc. Eva Bartošová

2010

Vedoucí práce: RNDr. Petr Doležal, PhD.

Magisterská diplomová práce

Bartošová E., 2010: Vliv energetických rezerv na úspěšnost přezimování a reprodukční potenciál lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* (L.)). [The energetic state of the spruce bark beetle (*Ips typographus* (L.)): Implications for winter survival. Master Thesis, in Czech] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

The thesis deals with characterisation and changes of energetic status in the spruce bark beetle, *Ips typographus*, during pre-diapause, diapause and post-diapause quiescence. Since the possibilities of replenishing energy losses during overwintering are limited either by low temperature or by poor food quality, detailed knowledge of energetic status changes may help to predict the overwintering success of local populations with all the consequences for spring dispersal and reproduction.

Finanční podpora:

Výzkum byl podpořen projektem 522/08/P600 Grantové agentury České republiky a projektem číslo 28 v rámci programu Cíl 3 2007 – 2013 Česká republika – Svobodný stát Bavorsko.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....
Bartošová Eva

V Českých Budějovicích 5.1.2010

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Doležalovi, PhD. za odborné vedení této práce. Janu Okrouhlíkovi děkuji za cenné rady a připomínky během experimentální části a za pomoc při statistickém vyhodnocování výsledků. Děkuji všem, kteří mi pomohli slovem i skutkem.

OBSAH

1 ÚVOD	5
1.1 Lýkožrout smrkový – výskyt a hospodářský význam	5
1.2 Životní cyklus.....	5
1.3 Přezimování.....	9
1.4 Diapauza.....	10
1.5 Energetické rezervy	11
1.6 Cíl práce	12
2 MATERIÁL A METODY	13
2.1 Charakteristika sledovaných lokalit	13
2.2 Odběr, zpracování a uchování materiálu	13
2.3 Biochemická stanovení	13
2.3.1 Obsah lipidů v hemolymfě	14
2.3.2 Celkový obsah lipidů.....	15
2.3.3 Obsah bílkovin v hemolymfě	15
2.3.4 Celkový obsah bílkovin.....	16
2.3.4.1 Bílkoviny rozpustné ve vodě.....	16
2.3.4.2 Bílkoviny rozpustné v detergentu	17
2.3.5 Stanovení glykogenu	17
2.4 Vliv energetického stavu přezimující populace na plodnost samic během jarního rojení.....	18
2.5 Statistické vyhodnocení výsledků	19
3 VÝSLEDKY	20
4 DISKUZE.....	30
5 ZÁVĚR.....	33
6 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	34
7 PŘÍLOHY.....	38

1 ÚVOD

1.1 Lýkožrout smrkový – výskyt a hospodářský význam

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* (L.)) patří do řádu brouků (Coleoptera), čeledi nosatcovitých (Curculionidae). Je jedním ze šesti zástupců tohoto rodu u nás, přičemž na smrku se kromě něj objevují další dva druhy - lýkožrout menší, *Ips amitinus* (Eichhoff, 1871), a lýkožrout severský, *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836).

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* (L.)) představuje jednoho z nejzávažnějších škůdců smrkových monokultur ve většině evropských zemích (vyjma Velké Británie). Kalamitní přemnožení tohoto kůrovce je důsledkem narušení smrkových porostů abiotickými (sucho, větrné kalamity atd.) a civilizačními vlivy (výsadby smrkových monokultur, průmyslové emise). Původně se lýkožrout smrkový vyskytoval pouze v horských smrčinách, kde napadal staré, poškozené nebo oslabené stromy. Vlivem masové výsadby smrkových monokultur se z lýkožrouta smrkového stal typický sekundární škůdce, který v první řadě napadá čerstvě vytěžené smrkové dříví a polomy. Při přemnožení, když nenalézá dostatek potravy a vhodného materiálu pro založení potomstva, napadá i zdravé stromy. Významně je populační dynamika tohoto škůdce ovlivněna i počasím. Časný nástup jara a abnormálně teplé a suché léto urychluje vývoj lýkožroutů, zároveň však snižuje vitalitu stromů a tím i jejich obranyschopnost.

Zvýšené riziko přemnožení lýkožrouta smrkového je nejčastější ve smrkových porostech starších 60 let, a to především na osluněných porostních stěnách (Jakuš, 1998). Uvnitř porostu se vyskytuje v místech s nižším zakmeněním nebo při gradaci. Svůj vývoj uskutečňuje lýkožrout smrkový výhradně na smrku ztepilém (*Picea abies*), výjimečně však napadá i modřín opadavý (*Larix decidua*) a velmi vzácně borovici lesní (*Pinus sylvestris*) (Zumr, 1985, 1995).

1.2 Životní cyklus

Vajíčko lýkožrouta smrkového bývá oválného tvaru, lesklé, bílé, v průměru 0,6 – 1,0 mm dlouhé. Larva je beznohá, rohlíčkovitě zahnutá, bělavá, s hnědou silně chitinizovanou hlavou. Čerstvě vylíhlá larva je přibližně 2 mm dlouhá, v posledním třetím instaru měří 5 – 7

mm. Kukla bývá dlouhá 5 – 6 mm , je bílá, jsou na ní patrné všechny budoucí vnější orgány a na konci zadečku můžeme nalézt dva krátké trny. Dospělec je válcovitý, 4,0 - 5,5 mm dlouhý, černohnědý, lesklý. Po celém těle má dospělec dlouhé nažloutlé ochlupení. Samičky mívají ochlupení hustější a více uspořádané než samečkové.

Vývoj lýkožrouta smrkového je vázán na smrkové lýko, kam jsou brouci lákáni uvolňovanými látkami jako jsou např. pineny, kamfén, carén, limonen (Lindelöw et al., 1992). Lýkožrout smrkový má v našich podmínkách v nižších polohách nejčastěji dvě generace ročně, ve vyšších polohách jednu generaci. Při příznivém a teplém počasí však může mít o jednu generaci více.

Dospělí samci se začínají rojit dříve než samičky (Botterweg, 1982), nalétávají na stromy a vytvářejí pod kůrou snubní komůrku, produkují agregační feromony, jimiž lákají samice; obvykle připadají na jednoho samce dvě až tři samice. Po páření začínají samice hloubit vertikální matečné chodby, na jejichž stranách kladou vajíčka. Optimální hustota matečných chodeb je 500 chodeb na 1 metr² (Wermelinger, 2004). Za jeden den naklade samice jedno až dvě vajíčka, celková snůška činí 50 až 80 vajíček. Z vajíček se po 6-18 dnech líhnou larvy, jejichž vývoj může při optimálních podmínkách trvat 7 dní, v nepříznivých podmínkách až 50 dní. Larvy vytváří požerky kolmo na matečnou chodbu. Překříží-li se dvě larvální chodbičky, můžeme sledovat tzv. larvální kanibalismus. Na konci larvální chodby larvy vykusují kukelní komůrku, v níž probíhá metamorfóza; období kukly trvá průměrně 8 dní. Vylíhlí brouci jsou zpočátku bílí, postupně žloutnou a dále tmavnou a pohlavně dozrávají. Zrání pohlavních orgánů a vývoj létací svaloviny je u čerstvých brouků spojen s tzv. úživným či zralostním žírem, který může trvat dva a více týdnů (Doležal, 2002). Úživný žír prodělávají buď na stromě, kde se vylíhli, nebo na jiném náhradním stromě. Celkový vývoj od zavrtání samce až po ukončení úživného žíru trvá za normálních podmínek zpravidla 6-10 týdnů, minimální teplota pro optimální vývoj je 6-8,3 °C. Poměr pohlaví brouků nové generace je zhruba 1:1 (Wermelinger, 2004).

Jarní rojení začíná ve středních a nižších polohách obvykle na přelomu dubna a května, v horských oblastech začíná až o měsíc později v závislosti na průběhu teplot a nadmořské výšce. Letní rojení probíhá zhruba od poloviny června do počátku srpna. Případné třetí rojení následuje na přelomu srpna a září, avšak vývoj založené generace nebývá v daném roce dokončen. Sesterské rojení je pozorováno u všech generací a následuje 2 – 3 týdny po základním rojení. Touto problematikou se podrobně zabýval Martínek (1957). Při sesterském rojení dochází k přerojování samic na stejný nebo jiný strom, kde samice po regeneračním

žíru pokračují bez další kopulace v kladení vajíček. Sesterské rojení prodělavá kolem 10% samic. Kromě toho se vyskytuje i jiný typ přerojování – samička opětovně klade vajíčka po kopulaci s jiným samečkem při založení nového požerku klasického tvaru. Takový požerek se tedy výrazně neodlišuje od primárně založených požerků, avšak má pouze jednu matečnou chodbu a není přítomna snubní komůrka (Zumr, 1985, 1995).

Dospělí brouci jsou během jednoho dne schopni aktivně uletět vzdálenost až 750 m. Během rojení však překonávají i vzdálenosti kolem 8 km (Botterweg, 1982). Mnohem častěji létají pasivně pomocí větru (v horských podmínkách se uplatňují také vzestupné proudy), který je unáší třeba až několik desítek kilometrů. Jestliže je rychlost větru menší než 1 m/s, jsou brouci schopni aktivního letu i proti větru, který přináší čichovou feromonovou stopu (Zumr, 1985; Botterweg, 1982). Denní létací aktivita lýkožrouta smrkového je mezi 9. – 21. hodinou, při čemž nejvyšší aktivitu můžeme pozorovat v poledních a časných odpoledních hodinách. Optimální teplota vzduchu pro létání je 22-26°C. Teplota 16,5°C je již teplotou prahovou (Wermelinger, 2004).

Biologie

Minimální teplota pro vývoj	6 – 8,3°C
Minimální teplota pro kladení vajíček	11,4°C
Optimální teplota pro vývoj a kladení vajíček	29 – 30°C
Plodnost	až 80 vajíček/samička
Úmrtnost během přezimování	ca 50%
Optimální hustota rozmnožování	ca 500 matečných chodeb/ m ²
Optimální počet samic na 1 samečka	3
Minimální teplota pro létání	16,5°C
Optimální teplota pro létání	22 – 26°C
Hlavní denní doba létání	poledne, časně odpoledne
Minimální počet dnů s teplotou vyšší než 16,5°C pro úspěšné napadení nových stromů	3 – 4 dny za sebou
Vzdálenost aktivního letu	500 m

Rizika pro stromy

Stromy nejvíce ohrožené náletem stromy staré 70 – 100 let, na jižně nebo západně orientovaných osluněných místech; stromy napadené plísní

Rádus s vysokým rizikem napadení v okolí invaze 100 m

Gradace

Příčiny gradace větrné polomy, sucho, vysoké teploty
nejvyšší stupeň gradace v zónách polomu 2. – 3. léto po vichřici

Správa, snaha o záchranu

Optimální doba pro odklizení polomů mezi invazí a objevením první generace
Odhadovaný počet jedinců zachycených feromonovými lapači 3 – 10% populace
Účinnost lapáku oproti feromonovému lapači až 30x vyšší
Úmrtnost brouků při strojním odkorňování 93%

Tab. 1 – Souhrn praktických informací o biologii a rizikovosti lokálních populací lýkožrouta smrkového, jak byl publikován Wermelingerem (2004).

1.3 Přezimování

Hmyz si osvojil nejrůznější strategie, které mu umožňují přežívání nízkých teplot. Podle nich rozeznáváme druhy, které tolerují zmrznutí (freezing – tolerance) a u nichž dochází k rychlému zmrznutí mezibuněčných tekutin bez poškození buněčných struktur, a druhy vyhýbající se zmrznutí (freezing – avoidance), které využívají kryoprotektanty snižující teplotní bod, při kterém dochází k tuhnutí tělních tekutin (Kodrík, 2000). Kryoprotektanty jsou nejčastěji nízkomolekulární sacharidy a polyhydrické alkoholy (polyoly). U dospělců lýkožrouta smrkového byl popsán sacharido – polyolový systém, jehož složkami jsou např. glukóza, trehalóza, sorbitol aj. Dále se také uplatňují glycerol, fruktóza a další (Košťál, 2007).

Lýkožrouti nejčastěji přezimují ve stadiu dospělého, ve výjimečných případech mohou přezimovat i ve stadiu larvy třetího instaru, případně kukly (Zumr, 1985, 1995). Přezimující brouci se vyhýbají mokrému lýku, zimu přečkávají v malých dutinkách vytvořených v kůře stromu (Doležal a Sehnal, 2007). Někteří jedinci opouštějí strom, zvláště je-li lýko výrazně narušené předchozím žírem, a zimu přečkávají v hrabance (Zumr, 1985).

Zkracování délky dne a nízké noční teploty koncem léta jsou dva hlavní parametry, které indukují diapauzu (t.j. fyziologický stav, v němž dospělci přečkávají zimní období, viz dále) u lýkožrouta smrkového (Doležal a Sehnal, 2007). V laboratorních podmínkách vyvolalo zkrácení dne na zhruba 15 hodin (v našich zeměpisných šířkách odpovídá období poloviny srpna) zastavení reprodukce lýkožrouta smrkového (Schopf 1985, 1989). V terénu se koncem sezóny brouci rovněž přestávají rozmnožovat, avšak z odchytů ve feromonových lapačích je zřejmé, že za vhodných podmínek přeletují až do poloviny září. Tyto lety jsou ale spíše spojeny s vyhledáváním vhodných míst pro přezimování a prodělání regeneračního žíru než s dalším rozmnožováním a zakládáním nové generace. To je v souladu s pozorováním Faccoliho (2009).

Dospělí jedinci po nalezení vhodného habitatu pokračují v přípravách na přezimování. Přechod z prediapauzní do diapauzní fáze je spojen především s poklesem teplot po polovině září a na počátku října. Mortalita během přezimování je ovlivňována biotickými a abiotickými faktory. Při dlouhodobé teplotě – 10°C zimu nepřežije až 50% jedinců. Nezralá stádia jsou k úhynu vlivem nízkých teplot náchylnější než dospělí brouci (Annala, 1969; Wermelinger, 2004).

1.4 Diapauza

Teplota okolí a fotoperioda ovlivňují nejrůznější fyziologické děje u hmyzu a jsou důležitými faktory pro volbu hibernačních stavů jako je kviescence a diapauza (Kodrík, 2000). Oba tyto termíny spadají pod dormanci (Kodrík, 2000), což je označení pro jakýkoliv stav, kdy je potlačen vývoj jedince (Košťál, 2006).

Kviescenci můžeme popsat jako okamžitou odpověď na určitý limitující faktor, jehož hodnoty dosáhnou určitý kritický práh (Košťál, 2006). Výsledkem je zpomalení či zastavení vývoje (Kodrík, 2000). Po návratu k optimálním hodnotám limitujícího faktoru se obnoví všechny děje, které byly kviescencí ukončeny.

Naproti tomu diapauza je geneticky programovaný proces, který pomáhá hmyzu překlenout nepříznivé období a dovoluje mu obývat temperátní a polární oblasti (Košťál, 2006). Nevýhody diapauzy tkví ve snížení postdiapauzní fitness, přežívání a plodnosti, jež jsou spojeny s nejrůznějšími stresy během diapauzy, např. vysychání, teplotní šok nebo ubývání energetických rezerv (Hahn a Denlinger, 2007).

Délka diapauzy se pohybuje v řádech dnů až měsíců, záleží na druhu hmyzu (Kodrík, 2000). Diapauza se skládá z několika fází – pre-diapauza, diapauza a post-diapauza (Košťál, 2006), z nichž každá má své subfáze. Prediapauzní fáze je charakteristická pokračujícím vývojem a to i navzdory skutečnosti, že signály prostředí předznamenávající blížící se počátek nepříznivého období byly jedincem již zaznamenány a uloženy v jeho nervovém systému, kde pak poslouží jako stimul pro přepnutí mezi pokračováním ontogeneze a diapauzním vývojem. Tyto signály mohou být přímé nebo nepřímé. Upozorňují na blížící se změnu vnějšího prostředí a zajišťují, že diapauza bude indukována v předstihu před touto změnou. Nejčastější nepřímý signál je fotoperioda. Specifické receptory v mozku a složených očích hmyzu umožňují zachycení délky dne (Denlinger, 2002). Dalším nepřímým signálem, známým hlavně v tropech a dalších oblastech, kde nejsou změny fotoperiody významné, jsou změny složení potravy, např. přítomnost specifických fenolických látek a tříslovin na konci sezóny.

Charakteristickým jevem diapauzy u hmyzu je minimální či žádný příjem potravy, a tak je hmyz více či méně závislý na energetických rezervách získaných před nástupem do diapauzy (Hahn a Denlinger, 2007), které pokryjí metabolické potřeby během diapauzy a zároveň na konci diapauzy postačí k dokončení vývoje a obnovení aktivity. Většina hmyzu v průběhu diapauzy nepřijímá vůbec žádnou potravu, ale můžeme se setkat s tím, že některá

stádia (larva, dospělec) potravu přijímají, i když v malém množství. Nejdůležitějším zdrojem energie uplatňující se při diapauze u hmyzu jsou lipidy, ale nesmíme opomenout ani nelipidické látky, které jsou důležité pro určité druhy v určitých fázích diapauzy.

Diapauza nutně neznamená úplné přerušení vývoje. Mnoho metabolických drah jako např. anaboličké děje vedoucí k růstu a proliferaci buněk je během diapauzy suprimováno. Další děje jsou udržovány na redukované úrovni a některé jsou naopak up-regulované. Nejběžnějším up-regulovaným dějem je produkce kryoprotektantů (např. glycerol). Produkce protistresových látek, jako jsou např. výše zmíněné kryoprotektanty, se významně podílí při udržování metabolismu a využití metabolických rezerv během diapauzy (Hahn a Denlinger, 2007).

Vzhledem k tomu, že teploty vzduchu jsou zejména vlivem dopadajícího slunečního záření značně odlišné od teplot v lýku, se kterými jsou přezimující lýkožrouti přímo konfrontováni (Beier, 2007), není výjimkou, že diapauzní brouci přijímají během teplejších period potravu (Annala, 1969). Jinak je však pohybová aktivita omezena a charakteristickým znakem diapauzních dospělců je neschopnost letu způsobená atrofií létací svaloviny (Doležal a Sehnal, 2007). Diapauza je ukončena přibližně v polovině prosince a po tomto datu se lýkožrouti nacházejí ve stavu tzv. postdiapauzní kviescence, kdy je rozhodujícím stimulem k rojení nárůst teploty (Doležal a Sehnal, 2007). Významnou roli hraje zřejmě i délka dne, avšak literární údaje chybí. Fotoperiodu jsou však přezimující lýkožrouti zjevně schopni sledovat a reagovat na její změny i v tom případě, že povrch stromů a hrabanky je pokryt vrstvou sněhu (Führer a Chen, 1979).

1.5 Energetické rezervy

Mnoho zástupců hmyzu prožívá diapauzu ve stádiu nepřijímajícím potravu jako je stádium vajíčka, kukly či tzv. wandering larvy (Hahn a Denlinger, 2007), proto musí být všechny látky potřebné pro průběh diapauzy a postdiapauzní fáze nashromážděny v podobě energetických rezerv již před nástupem do diapauzy.

Tři nejdůležitější skupiny energetických rezerv jsou lipidy, sacharidy a proteiny. Hmyz ukládá lipidy ve formě triglyceridů, které získává buď přímo z potravu nebo syntézou ze sacharidů a aminokyselin. Molekuly triglyceridů jsou tvořeny jednou molekulou glycerolu

a třemi molekulami mastných kyselin na OH skupinách. Délka řetězců mastných kyselin v přirozeně se vyskytujících triglyceridech může být různá, nejčastější jsou však řetězce s 16, 18 nebo 20 atomy uhlíku (Vodrážka, 1996). Triglyceridy jsou syntetizovány a skladovány v tukovém tělese hmyzu a tvoří téměř 90% všech lipidů tukového tělesa (Arrese et al., 2006). Některé triglyceridy jsou uchovávány v metabolicky aktivních tkáních jako je např. hrudní létací svalstvo (Hahn a Denlinger, 2007). Z tukového tělesa jsou triglyceridy uvolňovány do hemolymfy v podobě diglyceridů a ty jsou po těle hmyzu přenášeny pomocí lipoforinu (Arrese et al., 2006).

Hlavní energetickou rezervou sacharidové povahy je u hmyzu glykogen. Glykogen je větvený polymer složený z mnoha molekul glukózy (až 120 000 molekul glukózy) (Vodrážka, 1996). Při nepříznivých podmínkách se glykogen uplatňuje jako substrát pro syntézu kryoprotektantů (Storey and Storey, 1990).

Některé druhy diapauzního hmyzu mají zvýšenou koncentraci aminokyselin, které se uplatňují při odolnosti proti chladu a vysychání (Hahn a Denlinger, 2007). Aminokyseliny jsou uchovávány ve formě proteinů, které jsou syntetizovány v tukovém tělese hmyzu (Haunerland, 1996). Před nástupem do diapauzy si hmyz akumuluje zásobní bílkoviny. Většina zásobních bílkovin patří do skupiny hexamerních bílkovin, které jsou evolučně příbuzné s hemocyaninem (Haunerland, 1996). Aminokyseliny obsažené v zásobních bílkovinách se podílejí na udržování metabolismu během diapauzy a v postdiapauze se uplatňují při vývoji a obnovení aktivity (Hahn a Denlinger, 2007).

1.6 Cíl práce

Energetický stav hmyzu na počátku diapauzy má rozhodující vliv nejen na úspěšnost přezimování, ale vzhledem ke snížené možnosti příjmu potravy během zimy i na postdiapauzní fitness a z ní plynoucí reprodukční a disperzní potenciál lokálních populací. Cílem této práce bylo průběžně sledovat energetický stav přezimujících lýkožroutů a zjistit, zda je možné na základě jeho charakteristiky predikovat reprodukční úspěšnost přezimující populace lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* (L.)) v časně jarních měsících.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Charakteristika sledovaných lokalit

Dospělci byli sbíráni v měsíčních intervalech na dvou lokalitách lišících se nadmořskou výškou – Kubova Huť (1100 m.n.m.) a Hluboká (350 m.n.m.) z feromonových lapačů a lapáků. Smrkový porost na obou lokalitách byl na jižně orientovaných svazích, se stupněm zakmenění 8 a stářím porostu 80 let.

Na obou lokalitách byly na okraji lesa rozmístěny 3 feromonové lapače (typ Theyssohn šterbinový, návnada Ecolure IT, Fytofarm CZ, Mělník, ČR) a 3 až 5 lapáků (první a druhé generace dle ČSN, v případě potřeby byly přikáceny další lapáky) a probíhalo celoroční měření teploty vzduchu na slunci a ve stínu.

2.2 Odběr, zpracování a uchovávání materiálu

Lýkožrouti byli z feromonových lapačů odebíráni od května 2008 do září 2008. Do laboratoře byli přepravováni v autoledničce naplněné ledem, po transportu byli ihned uloženi do mrazáku a až do zpracování uchovávaní při -80°C . V zimních měsících byly na lokalitách ponechány lapáky (resp. výřezy), ty byly do laboratoře transportovány v chladu, ihned po dovezení odkorněny a získaní nepoškození kůrovci uloženi do -80°C .

Před vlastním zpracováním byli brouci váženi na analytických vahách (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Japan), přičemž určována byla čerstvá a suchá hmotnost (postup sušení viz. níže). Při pitvě bylo určováno pohlaví a stáří brouka dle metodiky popsané například v práci Merkera a Wildové (1954); případně Schopfa (1989). Všechny odstíny od světle žluté až po hnědou byly klasifikovány jako mladý brouk, hnědočerné zbarvení jako starý rodičovský brouk. Tato klasifikace byla ověřena stavem pohlavních orgánů.

2.3 Biochemická stanovení

V experimentech byly stanovovány obsahy energetických rezerv dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* (L.)).

U brouků byly zjišťovány následující parametry: obsah lipidů v hemolymfě, celkový obsah lipidů v 1 jedinci, obsah bílkovin v hemolymfě, celkový obsah bílkovin (v 1 jedinci) rozpustných ve vodě či detergentu a obsah glykogenu. Z každého sběru a lokality bylo vždy analyzováno deset jedinců.

2.3.1 Obsah lipidů v hemolymfě

Pro odběr hemolymfy byla vzhledem k tělesným rozměrům lýkožroutů využita metodika popsaná např. v práci Kaufmanna a Browna (2008). Dospělci lýkožrouta smrkového byli nejdříve zváženi na analytických vahách, poté byla provedena pitva v chladu ve fyziologickém Ringerově roztoku pro hmyz (složení: 9g NaCl, 0,2g KCl, 0,27g CaCl₂·2H₂O, 4g glukózy. Pomocí NaHCO₃ bylo pH nastaveno na 7,2 a roztok doplněn destilovanou vodou do 1000 ml). Byly odstraněny krovky a abdominální tergity, po dobu 10 minut byli jedinci ponecháni v 15 µl fyziologického roztoku, do něhož mohla volně vytékat hemolymfa, poté bylo odsáto 10 µl takto vzniklé směsi, centrifugováno (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, Germany) po dobu 10 min. a při 10 000 ot./min. a použito pro analýzu.

Obsah lipidů v hemolymfě byl stanovován pomocí sulfofosfovanilínového testu (Zöllner a Kirsch (1962), modifikace dle Holwerdy et al. (1977)). Sulfofosfovanilínový test je založen na reakci dvojných vazeb, které se vyskytují v lipidech hmyzu. Lipidické sloučeniny odštěpují v prostředí silných kyselin mastné kyseliny, jejichž dvojně vazby pak reagují s vanilinem za vzniku barevných sloučenin.

Standardy byly připraveny z 10 mM zásobního roztoku kyseliny olejové (Mr=282,5), zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 2,823 mg kyseliny olejové v 1 ml hexanu. Standardy byly připraveny podle následující tabulky:

µl zásobního roztoku	µg kyseliny olejové
0 (Blank)	0
2	5,650
5	14,126
10	28,250
20	56,500
50	113,000

Do skleněných zkumavek s 10 µl směsi hemolymfa-fyziologický roztok bylo přidáno po 200 µl koncentrované kyseliny sírové, zkumavky byly povařeny 10 minut ve vodní lázni. Po vychladnutí bylo do zkumavek přidáno po 1 ml vanilinu, obsah ve zkumavkách byl řádně zamíchán na vortexu a zkumavky byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut, kdy se postupně roztok ve zkumavkách zabarvil do odstínů růžové barvy. Zabarvení bylo měřeno spektrofotometrem (Spectra MAX 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) při vlnové délce 546 nm. Jako kalibrační křivka byla použita křivka kyseliny olejové.

2.3.2 Celkový obsah lipidů

Stanovení celkového obsahu lipidů probíhala s pomocí sulfofosfovanilínové assaye (viz. 3.3.1), postupem dle Botterwega (1982).

Zvážení brouci byli sušeni po dobu 15 hod. při teplotě 55°C a zvážena sušina. Vzorky byly homogenizovány pomocí ručního plastového homogenizátoru, poté k nim byly přidány 2 ml koncentrované kyseliny sírové a zkumavky byly vařeny po dobu 10 minut. 25 µl vychladlé uvařené směsi bylo napipetováno do nových zkumavek, přidán 1 ml vanilínu a zkumavky byly ponechány stát 30 minut. Během této doby se vyvinulo růžové zabarvení, jehož intenzita odpovídala množství lipidů ve vzorcích a byla měřena spektrofotometrem při vlnové délce 546 nm. Jako kalibrační křivka byla použita křivka kyseliny olejové.

2.3.3 Obsah bílkovin v hemolymfě

Pro odběr hemolymfy byla využita stejná metodika jako je popsána v odstavci 3.3.1. Po zvážení byly broukům odpreparovány krovky a abdominální tergity, v mikrozkušavkách k nim bylo přidáno 15 µl fyziologického roztoku, do kterého se uvolňovala hemolymfa. Po 10 minutách bylo do nových mikrozkušavek odebráno 10 µl směsi fyz. roztok-hemolymfa, před vlastní analýzou byly vzorky centrifugovány – 10 min., 10 000 ot./min.

Při stanovení bílkovin byl využit komerčně dostupný BCA Kit (SIGMA – Aldrich, Saint Luis, MO, USA). BCA metoda byla popsána Simpsonem a Willams-Smithem (1975), modifikována Stoscheckem (1990). BCA metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové. Principem metody je reakce peptidové vazby s měďnatými ionty za alkalických podmínek.

Měďnaté ionty se redukují na měďné ionty, které jsou komplexovány sodnými solemi kyseliny bicinchoninové. Komplexace měďných iontů se projeví fialovým zabarvením.

BCA metoda:

Reagencie: reagent A – BCA roztok (sodium bicinchoninate)

reagent B – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Jako standardy byly použity roztoky BSA (bovine serum) o různých koncentracích.

Smícháním reagensů A a B v poměru A:B=50:1 byla připravena pracovní směs (reagencie C).

Zásobní roztok o koncentraci 4 mg/ml byl získán rozpuštěním 4 mg BSA v 1 ml vody.

Standardy jsme připravili dvojkovým ředěním v rozmezí 0 – 32 μg /jamka.

Do každé jamky na mikrotitrační destičce byly napipetovány 4 μl vzorku (směs fyz. roztok-hemolymfa) a 200 μl reagensie C. Absorbance vzorků byla stanovena na spektrofotometru (Sunrise Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 562 nm. Podle kalibrační křivky byly dopočítány koncentrace proteinů ve vzorcích.

2.3.4 Celkový obsah bílkovin

Celkový obsah bílkovin byl stanovován rovněž BCA metodou (viz odstavec 3.3.3).

Zvážení brouci byli homogenizováni pomocí plastového homogenizátoru v 200 μl 0,1 M Tris-HCl (pH=8) a centrifugováni 10 minut při 14 000 ot./min. a 4°C. Odebraný supernatant byl použit pro stanovení ve vodě rozpustných proteinů, z pelety byl zjišťován obsah proteinů rozpustných v detergentu.

Příprava Tris-HCl: Bylo naváženo 1,211 g TRISu ($M_r = 121,1$) a doplněno vodou do 100 ml, tím byl získán TRIS o koncentraci 0,1 M. Pomocí 1 M HCl bylo nastaveno pH na hodnotu 8.

2.3.4.1 Bílkoviny rozpustné ve vodě

Do zkumavek bylo napipetováno 5 μl supernatantu a 45 μl vody. Byly připraveny standardy a do všech zkumavek bylo přidáno 1 ml reagensie C (viz odstavec 3.3.3), zkumavky byly zamíchány a ponechány inkubovat 30 minut při teplotě 60°C. Po krátkém zchlazení byla měřena absorbance při 562 nm, byla vytvořena kalibrační křivka, podle níž byly dopočítány koncentrace ve vodě rozpustných proteinů ve vzorcích.

2.3.4.2 Bílkoviny rozpustné v detergentu

Peleta byla rehomogenizována v 200 µl 50 mM Tris-HCl s přidavkem 1% Triton X a vzorky byly centrifugovány 10 minut při 14 000 ot./min. Do zkumavek bylo napipetováno 5 µl vzniklého supernatantu a 45 µl vody. Byly připraveny standardy a do všech zkumavek bylo přidáno 1 ml reagensie C (viz odstavec 3.3.3), zkumavky byly zamíchány a ponechány inkubovat 30 minut při teplotě 60°C. Po krátkém zchladnutí byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm, byla vytvořena kalibrační křivka a dopočítány koncentrace v detergentu rozpustných proteinů ve vzorcích.

2.3.5 Stanovení glykogenu

Pro stanovení obsahu glykogenu byla použita metoda popsaná Goodem et al. (1933).

Nejprve byla zjištěna čerstvá hmotnost brouků a ti poté přeneseni do mikrozkušavek s 400 µl 70% ethanolu, homogenizováni pomocí ručního plastového homogenizátoru a centrifugováni při 13 000 ot./min po dobu 10 min v pokojové teplotě. Byl odsán supernatant a peleta rehomogenizována ve 400 µl 70% ethanolu a centrifugována při 13 000 ot./min po dobu 10 min při pokojové teplotě. Byl odsán supernatant a zbylý ethanol odstraněn sušením po dobu 15 min při 55°C. Ke vzorkům bylo přidáno 200 µl destilované vody a peleta důkladně homogenizována. Poté bylo přidáno 1,1 ml 30% KOH, zkumavky zamíchány, důkladně uzavřeny a vloženy na 30 min. do vodní lázně o teplotě 95°C. Vzorky byly zchlazeny, centrifugovány při 8000 ot./min po dobu 10 min v pokojové teplotě. Do nových zkumavek bylo napipetováno 250 µl infranatantu, přidáno 125 µl 10% Na₂SO₄ a 750 µl 99,8% ethanolu a vzorky zamíchány na vortexu.

Přes noc byly zkumavky ponechány na ledu, poté dvakrát zamíchány v intervalu 20 min. Vzorky byly centrifugovány při 13 000 ot./min po dobu 10 min ve 4°C, odstraněn supernatant. Poté bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu, vzorky řádně promíchány a centrifugovány při 13 000 ot./min., 3 min., 4°C, potom byl znovu odstraněn supernatant. Následovalo opakování předchozího kroku. Peleta byla sušena 15 min. při teplotě 55°C a rozpuštěna v 500 µl destilované vody. Ze zásobního roztoku, který byl získán rozpuštěním 80 mg glukózy ve 100 ml vody, byly připraveny standardy podle následující tabulky:

množství vody (μl)	množství zásobního roztoku (μl)	množství glykogenu v ekv. glukózy ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)
100	0	0 (Blank)
93,7	6,3	5
87,5	12,5	10
75	25	20
50	50	40
0	100	80

Kyselá hydrolýza

100 μl rozpuštěné pelety bylo napipetováno do skleněných zkumavek a do nich bylo přidáno 500 μl destilované vody a zamícháno, poté 200 μl fenolu a zamícháno, do každé zkumavky byl rychle přidán 1 ml koncentrované kyseliny sírové, zkumavky ihned zamíchány na vortexu a ponechány 5 min. při pokojové teplotě. Vzorky byly přeneseny na 20 min. do vodní lázně vyhřáté na 95°C, poté ochlazovány 30 min. při pokojové teplotě a následně měřena absorbance při 490 nm. Byla vytvořena kalibrační křivka, podle níž byly dopočítány koncentrace glykogenu ve vzorcích.

2.4 Vliv energetického stavu přezimující populace na plodnost samic během jarního rojení

Čerstvé smrkové výřezy o délce 50 cm a průměru 25 cm byly uloženy do chovných klecí velikosti 55 x 50 x 50 cm (výška x šířka x délka). Ty byly umístěny v insektáriu ve stálé teplotě 20°C a fotoperiodě 14:10 hodin (foto: skotofáze). Do každé z chovných klecí bylo přidáno 50 brouků jarního rojení, kteří čerstvě nalétli do feromonových lapačů na následujících lokalitách:

Kubova Huť – uvnitř porostu, stín

Kubova Huť – okraj lesa, slunce

Včelná pod Boubínem – uvnitř porostu, stín

Včelná pod Boubínem – okraj lesa, slunce

Lokalita Včelná pod Boubínem odpovídá svou charakteristikou (stáří porostu, orientace) lokalitám Kubova Huť a Hluboká nad Vltavou, nadmořská výška je 600 m n. m.

Výřezy byly každé dva dny vlhčeny vodou. Po 5 týdnech byly výřezy rozebrány a zjištěny počty brouků nalétlých do výřezů, počet kladoucích samic, nakladených vajíček a larválních galerií.

Na výše zmíněných lokalitách běželo současně sledování plodnosti samic jarního rojení v terénních podmínkách. Na čerstvě nalétlých lapácích byly sčítány počty vajíček nakladených jednou samicí.

2.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Grafické zpracování kalibračních křivek a výpočty koncentrací lipidů, glykogenu a bílkovin byly prováděny v programu GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programech STATISTICA verze 7.2 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) a R verze 2.10.1. Před vlastním hodnocením bylo pomocí vnesení dat zjišťováno jejich rozdělení (distribuce).

Hodnocení dat s normálním rozdělením

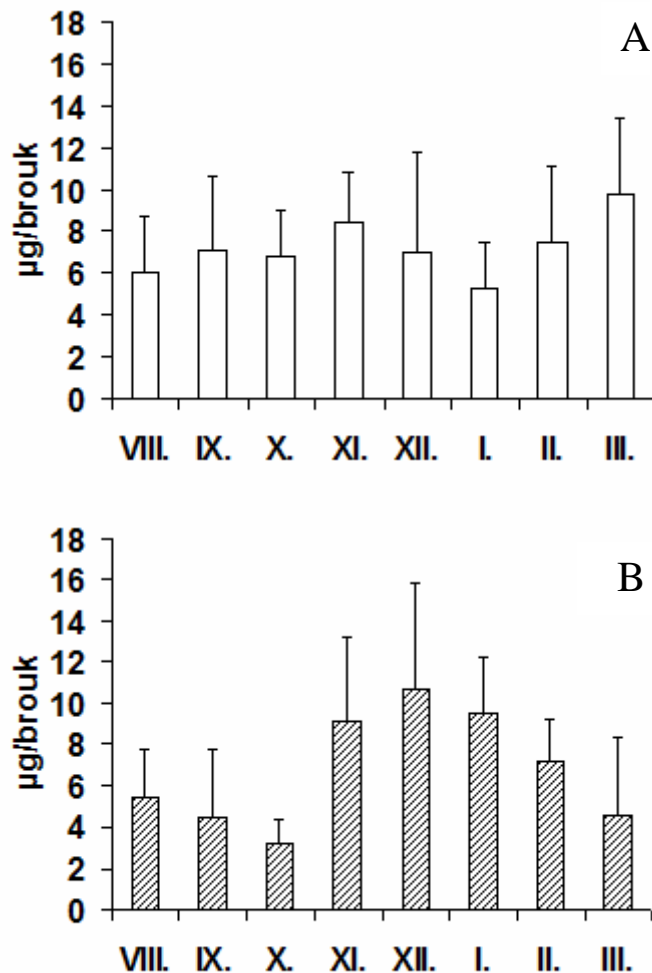
Pro hodnocení dat s normálním rozdělením byl použit program STATISTICA verze 7.2. Data byly hodnoceny metodou vícecestné analýzy variance (MANOVA). Byly přidávány faktory *lokalita* a *datum sběru* a jako kovariáta byla zadána *hmotnost* kůrovce. Rozdílnost jednotlivých měření byla hodnocena pomocí post-hoc testu Tukey HSD.

Hodnocení dat s poissonovým rozdělením

Tato data byla hodnocena metodou GLM v programu R. Nulový model byl postupně rozšiřován o faktory *datum*, *lokalita* a *hmotnost* a účelnost vzniklého modelu byla hodnocena pomocí poklesu AIC (Akaike informační kritérium, v tom smyslu, jakém ho program R nazývá Cp; v experimentálních výsledcích uvádím pro přehlednost hodnoty Cp pod názvem AIC). Pravděpodobnost vlivu faktoru byla určena pomocí χ^2 testu oproti jednoduššímu modelu.

3 VÝSLEDKY

3.1 Obsah lipidů v hemolymfě



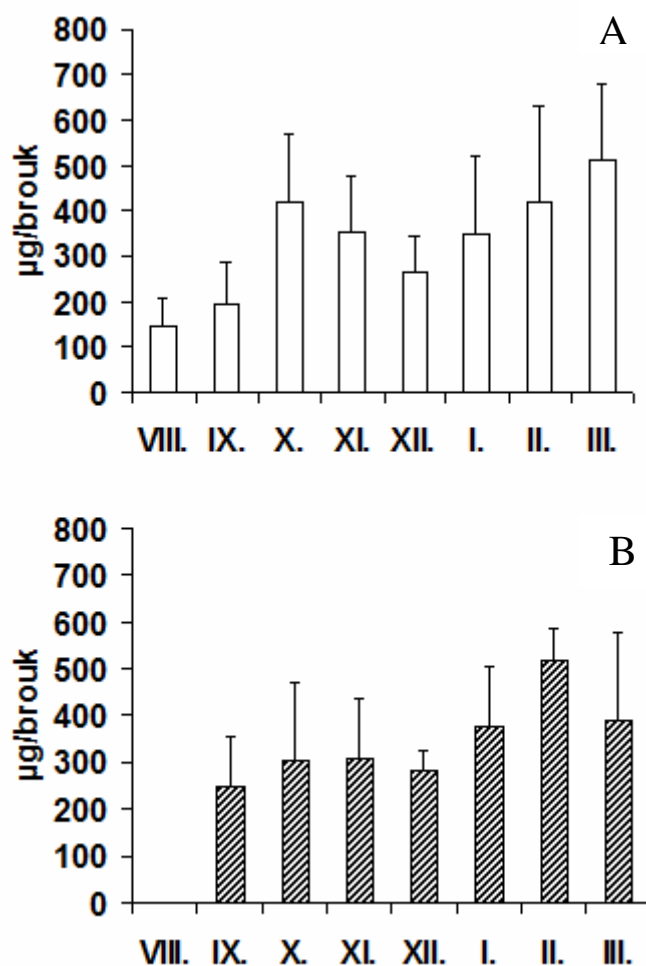
Obrázek 1 Obsah lipidů v hemolymfě dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) z lokalit Kubova Hut' (graf A) a Hluboká (graf B). Brouci byli odebráni v měsíčních intervalech od srpna 2008 do března 2009. Sloupce znázorňují průměrný obsah lipidů v µg/jedince na ekvivalent hemolymfy. Vyneseny jsou průměr (n=10) a směrodatné odchylky.

Je patrné, že trend změn obsahu lipidů v hemolymfě je na zkoumaných lokalitách odlišný. Minimální obsah lipidů v hemolymfě brouků z lokality Kubova Hut' byl $5,29 \pm 2,26$ µg/brouk v lednu, což zhruba odpovídá hodnotě ze srpna ($6,03 \pm 2,68$ µg/brouk). Naopak nejvyšší množství lipidů v hemolymfě bylo detekováno u lýkožroutů z března ($9,8 \pm 3,65$

μg/brouk) (Obr. 3, graf A). Na grafu B jsou rozdíly výraznější, avšak trend na konci zimy je opačný než na lokalitě Kubova Huť. Zatímco na Kubově Huti byly v březnu zaznamenány maximální množství lipidů v hemolymfě (Obr. 3, Graf A), na lokalitě Hluboká byla březnová hodnota druhá nejnižší (4,49±3,80 μg/brouka) po říjnové (3,18±1,21 μg/brouk).

Distribuce dat je poissonova typu. Statistické hodnocení prokázalo, že oproti nulovému modelu (AIC=213,37) má významný vliv faktor *datum* (AIC=199,45 ; p<0,0002). Nevýznamné jsou naopak faktory *lokalita* (AIC=214,11 ; p<0,26) a *hmotnost* (AIC=215,36 ; p<0,91).

3.2 Celkový obsah lipidů

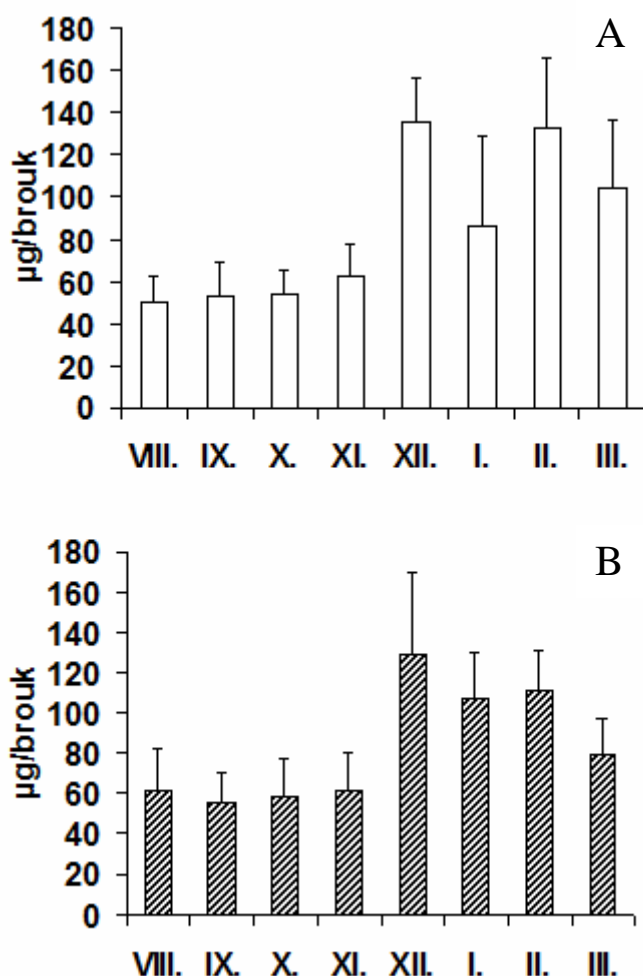


Obrázek 2 Celkový obsah lipidů u dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) z lokalit Kubova Huť (graf A) a Hluboká (graf B). Brouci odebráni v měsíčních intervalech od srpna 2008 do března 2009. Sloupce znázorňují průměrný obsah celkových lipidů v 1 jedinci v μg/jedince. Sloupce jsou vyneseny průměry (n=10), úsečkami směrodatné odchylky.

Průměrné množství celkových lipidů na lokalitě Kubova Huť (Obr. 2, graf A) vzrůstá od srpna z $144,45 \pm 6,04$ $\mu\text{g/jedinec}$ na $418,50 \pm 150,38$ $\mu\text{g/jedinec}$ v říjnu, následuje pokles do prosince ($263,43 \pm 79,78$ $\mu\text{g/jedinec}$) a opětovný nárůst na maximální hodnoty v březnu ($513,70 \pm 168,14$ $\mu\text{g/jedinec}$). Průběh celkového obsahu lipidů na lokalitě Hluboká (Obr. 2, graf B) je podobný, ovšem zkreslený absencí dat ze srpna. Nejnížší hodnoty byly naměřeny v září ($245,66 \pm 108,47$ $\mu\text{g/jedinec}$) a prosinci ($280,94 \pm 46,98$ $\mu\text{g/jedinec}$), s nárůstem v říjnu ($304,82 \pm 165,88$ $\mu\text{g/jedinec}$) a listopadu ($306,33 \pm 128,06$ $\mu\text{g/jedinec}$). Nejvyšší hodnota byla naměřena u lýkožroutů z února ($517,59 \pm 69,12$ $\mu\text{g/jedinec}$).

Rozložení dat je poissonova typu. Z faktorů *datum*, *lokalita* a *hmotnost* mají oproti nulovému modelu (AIC=165,74) vliv faktory *datum* (AIC=126,86 ; $p < 3,92 \cdot 10^{-9}$) a *lokalita* (AIC=133,84 ; $p < 1,37 \cdot 10^{-9}$). Nebyl prokázán vliv faktoru *hmotnost* (AIC=164,99 ; $p < 0,09$).

3.3 Obsah bílkovin v hemolymfě



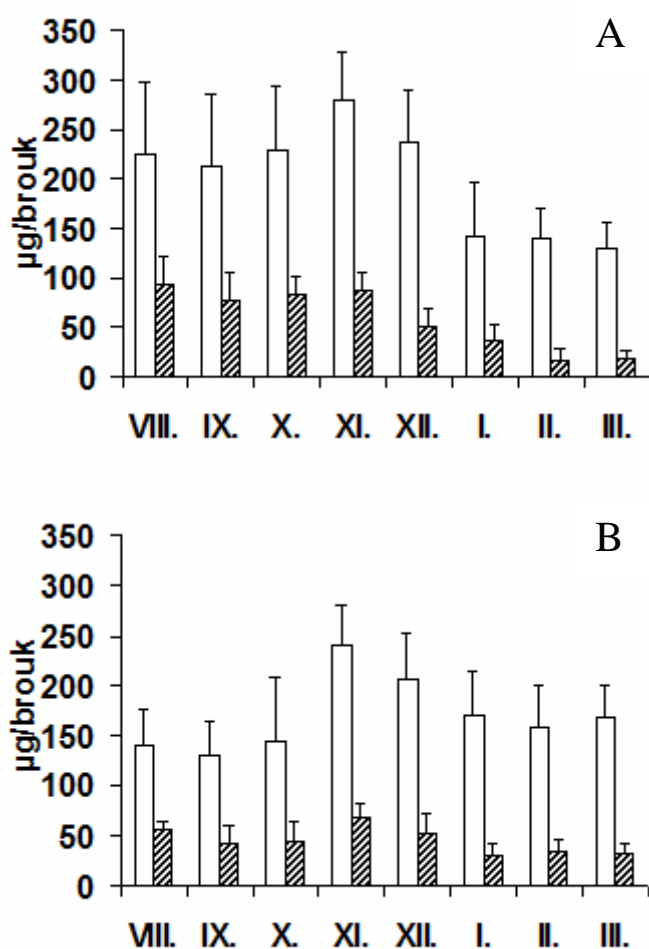
Obrázek 3 Obsah bílkovin v hemolymfě u dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) z lokalit Kubova Huť (graf A) a Hluboká (graf B). Brouci byli odebíráni v měsíčních intervalech od srpna 2008 do března 2009. Sloupce znázorňují průměrný obsah bílkovin v hemolymfě v µg/jedinec na ekvivalent hemolymfy. Sloupce jsou vyneseny průměry (n=10), úsečkami směrodatné odchylky.

Na lokalitě Kubova Huť (Obr. 3, graf A) lze zaznamenat nárůst z minimální hodnoty v srpnu ($50,27 \pm 12,33$ µg/jedinec) na hodnotu maximální ($135,53 \pm 21,33$ µg/jedinec), která byla naměřena u lýkožroutů z prosince. V lednu následuje pokles na $86,10 \pm 42,68$ µg/jedinec, který je vystřídán nárůstem v únoru ($132,01 \pm 34,06$ µg/jedinec), což se blíží maximální hodnotě z prosince. Na lokalitě Hluboká (Obr. 3, graf B) je trend obdobný. Od srpna do listopadu jsou hodnoty téměř stejné ($55,25 - 60,88$ µg/jedinec). U lýkožroutů z prosince byla, stejně jako na Kubově Huti, naměřena maximální hodnota ($128,96 \pm 40,77$ µg/jedinec). Po

lednu a únoru, kdy jsou hodnoty téměř totožné (107,10 – 111,29 $\mu\text{g}/\text{jedinec}$), následuje pokles.

Distribuce dat je typu poisson. Od nulového modelu (AIC=243,89) se významně liší faktor *datum* (AIC=125,54 ; $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$). Nebyl prokázán vliv faktorů *hmotnost* (AIC=244,81 ; $p < 0,30$) a *lokalita* (AIC=245,76 ; $p < 0,72$).

3.4 Celkový obsah bílkovin



Obrázek 4 Celkový obsah bílkovin rozpustných ve vodě a detergentu u dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) z lokalit Kubova Huť (graf A; bílkoviny rozpustné ve vodě – obrys, bílkoviny rozpustné v detergentu - šrafovaně) a Hluboká (graf B; bílkoviny rozpustné ve vodě – obrys, bílkoviny rozpustné v detergentu - šrafovaně). Brouci byli odebráni v měsíčních intervalech od srpna 2008 do března 2009. Sloupce znázorňují průměrný celkový obsah bílkovin v $\mu\text{g}/\text{jedinec}$. Sloupce jsou vyneseny průměry ($n=10$), úsečkami směrodatné odchylky.

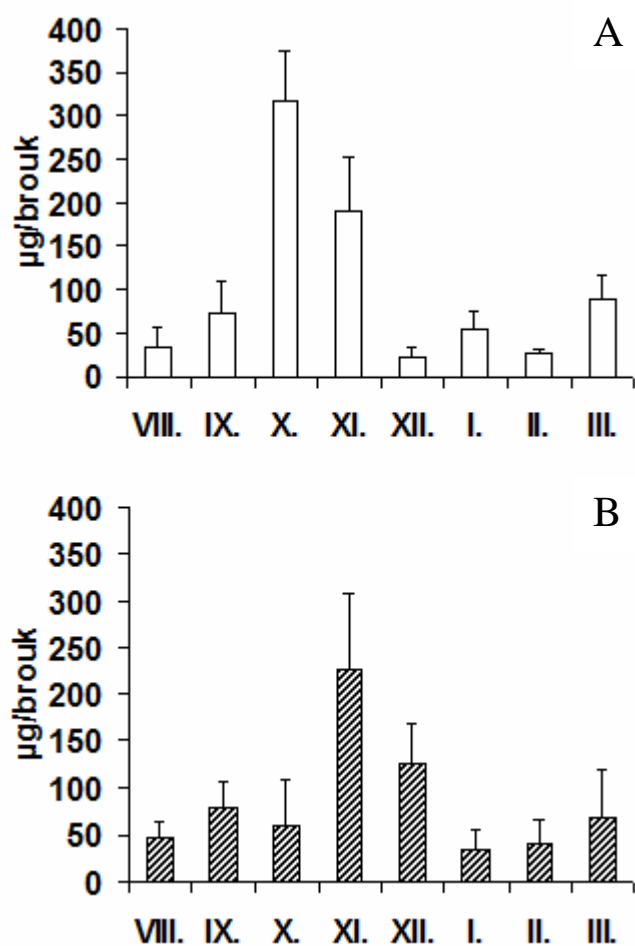
Obr. 4, graf A ukazuje průběh obsahu celkových bílkovin na lokalitě Kubova Huť. Obrysem jsou znázorněny bílkoviny rozpustné ve vodě, šrafovaně bílkoviny rozpustné v detergentu. Od září ($213,50 \pm 71,83 \mu\text{g/jedinec}$) do listopadu hodnoty bílkovin rozpustných ve vodě pozvolně narůstají na maximální hodnotu ($278,59 \pm 48,76 \mu\text{g/jedinec}$). Od prosince se hladiny snižují, v březnu byla zjištěna minimální hodnota ($129,77 \pm 26,73 \mu\text{g/jedinec}$). Šrafovaně jsou na Obr. 4, graf A zobrazeny hodnoty bílkovin rozpustných v detergentu u lýkožroutů z lokality Kubova Huť. Od srpna do listopadu se hladiny bílkovin pohybují v rozmezí $77,46 - 92,93 \mu\text{g/jedinec}$. Od prosince do března dochází v porovnání s předcházejícími měsíci k poklesu, hodnoty jsou přibližně 2,7krát nižší. Průběh dat na lokalitě Hluboká je obdobný (Obr. 4, graf B). Obrysem je znázorněn celkový obsah bílkovin rozpustných ve vodě. Průběh je velmi podobný jako na lokalitě Kubova Huť, rozdíl je pouze v jednotlivých hodnotách, které jsou průměrně o 29,22 jednotek nižší. Obsah bílkovin rozpustných v detergentu (Obr. 4, graf B, šrafovaně) je průměrně o 13,41 jednotek nižší než na lokalitě Kubova Huť.

Data mají normální rozdělení, vyhodnocována byla dvoucestnou ANOVOU. U celkového obsahu bílkovin rozpustných ve vodě se získaná data významně liší dle *data* sběru ($p < 1 \cdot 10^{-9}$; $F(7,143)=11,00$) i podle *lokality* ($p < 0,001$; $F(1,143)=11,24$). Průkazná je interakce obou uvedených faktorů ($p < 1 \cdot 10^{-4}$; $F(7,143)=4,96$). Bez započítání efektu lokality je obsah bílkovin nejvyšší v měsíci listopad a průkazně se liší od všech dat kromě měsíce prosinec ($p < 0,001$). Obsah celkových bílkovin rozpustných ve vodě je vyšší ($p < 0,001$) na Kubově Huti (průměrně $199,32 \mu\text{g/jedinec}$) než na Hluboké ($170,10 \mu\text{g/jedinec}$). Na lokalitě Kubova Huť je patrný nárůst průměrného obsahu bílkovin od září do listopadu, po kterém dochází k poklesu, statisticky významný je zejména rozdíl listopadu oproti lednu, únoru a březnu ($p < 0,0005$). Obdobný trend je vidět i na Hluboké s tím rozdílem, že je průkazný rozdíl mezi listopadem a srpnem zářím a říjnem ($p < 0,005$) a mezi listopadem a únorem ($p < 0,05$).

Data celkového obsahu bílkovin rozpustných v detergentu se významně liší dle *data* sběru ($p < 4,2 \cdot 10^{-19}$; $F(7,138)=21,06$) a podle *lokality* ($p < 0,0003$; $F(1,138)=13,69$). Průkazná je interakce obou uvedených faktorů ($p < 5,12 \cdot 10^{-8}$; $F(7,138)=7,87$). Obsah bílkovin dosahuje na lokalitě Kubova Huť maximálních hodnot v měsících srpen ($92,93 \pm 28,98 \mu\text{g/jedinec}$) a listopad ($87,48 \pm 17,72 \mu\text{g/jedinec}$) a významně se liší od měsíců leden, únor a březen ($p < 0,002$). Na Hluboké byla nejvyšší hodnota naměřena v listopadu ($67,63 \pm 13,34 \mu\text{g/jedinec}$) a významně se liší od měsíců leden a únor ($p < 0,02$).

Při porovnání množství bílkovin rozpustných ve vodě vůči bílkovinám rozpustných v detergentu je zřejmé, že na lokalitě Kubova Huť je průměrné množství bílkovin rozpustných ve vodě přibližně 3,5 krát vyšší než průměrné množství bílkovin rozpustných v detergentu. Na lokalitě Hluboká můžeme pozorovat přibližně 3,8 krát vyšší průměrné množství bílkovin rozpustných ve vodě než bílkovin rozpustných v detergentu.

3.5 Obsah glykogenu



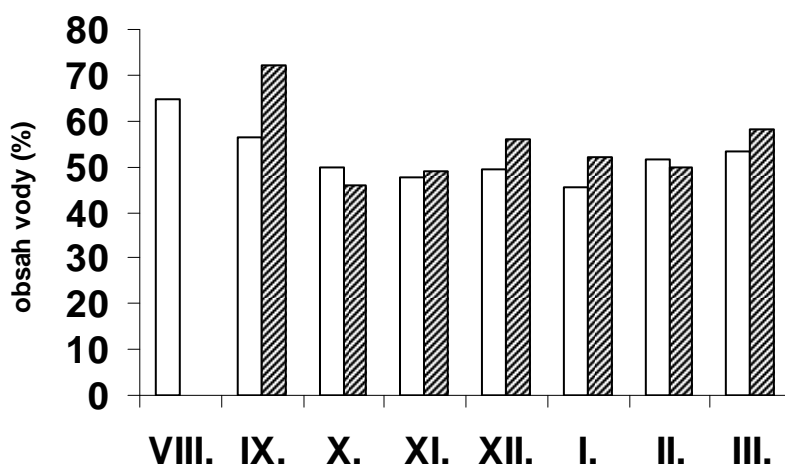
Obrázek 5 Obsah glykogenu u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) z lokalit Kubova Huť (graf A) a Hluboká (graf B). Brouci byli odebíráni v měsíčních intervalech od srpna 2008 do března 2009. Sloupce znázorňují průměrný obsah glykogenu v µg/jedince. Sloupce jsou vyneseny průměry (n=10), úsečkami směrodatné odchylky.

Od měsíce září docházelo na obou lokalitách k nárůstu množství glykogenu. Maximální hodnoty obsahu glykogenu bylo na lokalitě Kubova Huť (Obr. 5, graf A) dosaženo v měsíci říjen (317,8 µg/jedinec). Naproti tomu na lokalitě Hluboká (Obr. 5, graf B) bylo maxima dosaženo o měsíc později (228,0 µg/jedinec). Po dosažení maxima dochází na obou lokalitách ke snižování množství glykogenu, přičemž minimální hodnota množství glykogenu byla na lokalitě Kubova Huť v měsíci prosinec (22,4 µg/jedinec) a na lokalitě Hluboká o měsíc později, tzn. v měsíci leden (33,4 µg/jedinec). V časných jarních měsících docházelo na obou lokalitách k mírnému zvyšování množství glykogenu.

Distribuce dat je poissonova typu. Statistické hodnocení prokázalo, že oproti nulovému modelu (AIC=878,83) se významně liší faktory *datum* (AIC=426,85 ; $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$) a *lokalita* (AIC=870,90 ; $p < 0,002$). Průkazná je i interakce faktorů *datum* a *lokalita* (AIC=217,75 ; $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$). Vliv faktoru *hmotnost* (AIC=880,00 ; $p < 0,36$) nebyl prokázán.

3.6 Obsah vody

Při stanovování celkového obsahu lipidů byla zjišťována čerstvá a suchá hmotnost lýkožroutů. Z těchto hodnot lze vypočítat průměrný obsah vody v jedincích.



Obrázek 6 Průměrný obsah vody u dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) z lokalit Kubova Huť (obrys) a Hluboká (šrafovaně). Brouci byli odebráni v měsíčních intervalech od srpna 2008 do března 2009. Vynesen průměr deseti hodnot.

Obsah vody v dospělých lýkožrouta smrkového je na obou lokalitách velmi podobný (Obr. 6). Na Kubově Huti jsou hodnoty od září do března velmi podobné. Průměrné hodnoty obsahu vody v lýkožroutech jsou 52,4 % na Kubově Huti a 54,7 % na Hluboké. Výjimku tvoří

hodnota ze září na Hluboké, kde je rozdíl mezi lokalitami největší (15,4 %), avšak data jsou zkreslená absencí srpnových dat na Hluboké.

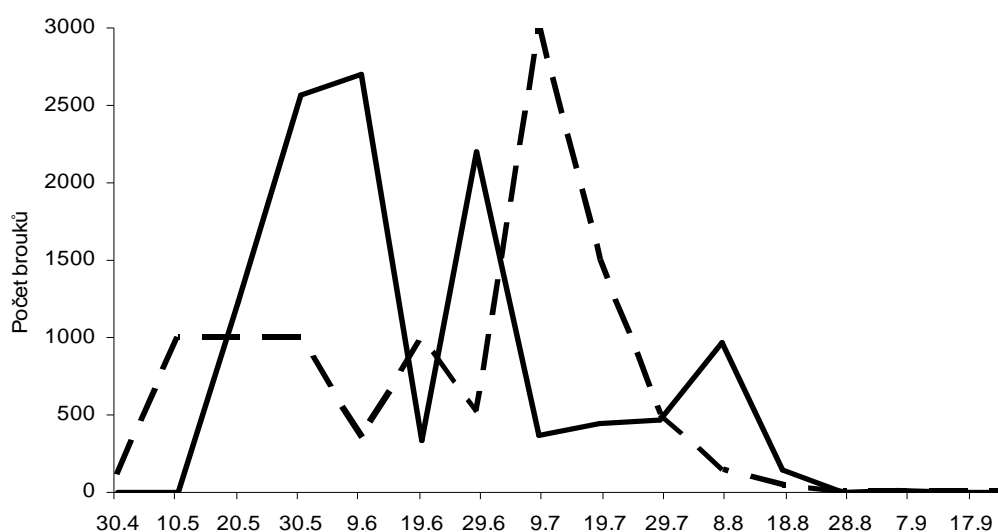
3.7 Vliv energetického stavu přezimující populace na plodnost samic během jarního rojení

LOKALITA	LABORATORŮ	TERÉN
<i>Kubova Huť, stín</i>	19,3	51,6
<i>Kubova Huť, slunce</i>	9,5	48,8
<i>Včelná, stín</i>	3,8	50,7
<i>Včelná, slunce</i>	5,5	51,9
PRŮMĚR	9,5	50,7

Tab. 2 Průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí v laboratorních a terénních podmínkách

Ze získaných dat vyplývá, že samice v terénních podmínkách nakladly průměrně o 41,2 vajíček/samice více než samice v laboratorních podmínkách. Data mají normální rozdělení. Statistické hodnocení neprokázalo vliv *lokality* ($p < 0,66$; $F(1,60) = 0,20$) ani toho, zda byly lapáky umístěny na slunci či ve stínu ($p < 0,75$; $F(1,60) = 0,10$).

3.8 Odchyty z feromonových lapačů



Obrázek 7 Průběh rojení na lokalitách Kubova Huť (souvislá čára) a Hluboká (čárkovaně) během roku 2008 vyjádřený jako počet brouků odchytených ve feromonových lapačích. Data jsou průměrem ze tří feromonových lapačů.

Na lokalitě Hluboká začalo jarní rojení přezimující generace počátkem května (Obr. 7, čárkovaně). Do konce května bylo do 1 lapače odchyteno přibližně 1000 brouků. Následovalo sesterské přerojení v polovině června. 1. generace začala vyletovat koncem června a vrcholu bylo dosaženo v polovině července kdy množství odchytených lýkožroutů dosáhlo až k 3000 broukům na lapač. 2. generace založena těmito brouky dokončila kompletně svůj vývoj v poslední srpnové dekádě, avšak k hromadnému výletu v sezóně 2008 již nedošlo. Na Kubově Huti (Obr. 7, souvislá čára) začali lýkožrouti vylétávat přibližně o 14 dní později než na Hluboké, avšak počty rojících se brouků byly více než dvojnásobné. 1. generace dokončila vývoj v červenci a vyletovat začala v první srpnové dekádě. 2. dceřiná generace založena těmito brouky se koncem sezóny nacházela ve stadiu larev a stádia dospělců brouci dosáhli postupně až v říjnu a listopadu.

3.9 Měření teplot

Na zkoumaných lokalitách byla v průběhu 12 měsíců měřena teplota vzduchu na slunci a teplota vzduchu ve stínu. Průběhy teplot na jednotlivých lokalitách jsou znázorněny na Obr. 8 – Obr. 11.

DISKUZE

Pro stanovení obsahu lipidů a proteinů v hemolymfě byla vzhledem k tělesným rozměrům lýkožrouta smrkového použita metodika odběru hemolymfy, která byla popsána např. Kaufmannem a Brownem (2008), kteří ji použili pro odběr hemolymfy u komára *Anopheles gambiae*. Tato metoda je však nepřesná v určení objemu hemolymfy, která se uvolní do fyziologického roztoku. Navíc brouci mohou mít vlivem desikace odlišné množství hemolymfy. S tím souvisí poměrně vysoké směrodatné odchylky u stanovení obsahu látek v hemolymfě.

Glykogen slouží jako substrát pro produkci kryoprotektantů (Storey and Storey, 1990). Na lokalitě Hluboká byly nárůst i snižování hladiny glykogenu v porovnání s lokalitou Kubova Huť posunuty zhruba o měsíc, na Kubově Huti byla maximální hladina glykogenu v říjnu, na Hluboké v listopadu. Lokality mají rozdílnou nadmořskou výšku a tudíž jsme předpokládali, že posun bude způsoben odlišnými teplotami, avšak grafy teplot neukazují významné rozdíly mezi lokalitami, ba naopak – v průběhu října a listopadu se teploty na obou lokalitách pohybovaly v rozmezí -5 až $+20^{\circ}\text{C}$. Částečně je možné tento fakt vysvětlit tím, že izolační vlastnosti sněhového pokryvu na lokalitě Kubova Huť vyrovnaly rozdíl v nadmořských výškách. Lze rovněž uvažovat o tom, že na lokalitě Kubova Huť se brouci s nízkými teplotami, které sloužily jako signál k akumulaci glykogenu, setkali dříve, vlivem pozdní instalace dataloggeru však teplotní údaje pro rok 2008 chybí. Nárůst hladiny glykogenu v časně jarních měsících můžeme vysvětlit jako doplnění ztrát během přezimování žírem na jaře, kdy už jsou teploty příznivé.

Khansen et al. (1980) zjišťoval u lýkožrouta smrkového energetický stav během roku. V experimentech stanovil, že obsah glykogenu se během podzimu zvyšuje. Maximální hodnoty naměřil na konci listopadu, poté se hladiny glykogenu výrazně snížily. Jeho výsledky se shodují s trendem našich dat naměřených na Hluboké.

S glykogenem je spojen i nárůst obsahu celkových lipidů. Sacharidy jsou možným substrátem pro syntézu lipidů (Vodrážka, 1996). Na lokalitě Kubova Huť se od srpna do října postupně zvyšoval obsah glykogenu, stejný trend je viditelný i u obsahu lipidů. Naše výsledky

naznačují, že glykogen slouží jako prekurzor nejen pro syntézu kryoprotektivních látek ale také syntézu lipidů.

Botterweg (1982) zjistil, že jedinci lýkožrouta smrkového během přezimování ztratí 40 – 50 % svých celkových lipidů. Naše data nejsou v souladu s jeho pozorováním – na lokalitě Kubova Huť se v časně jarním období zvyšovalo množství celkových lipidů i lipidů v hemolymfě, což lze chápat jako akumulaci energie pro létací svalstvo a následnou přípravu na rojení, protože lipidy jsou nejvhodnějším zdrojem energie pro let (Kodrík, 2000). Důvodem pro výše popsané rozdíly může být i teplotní odlišnost sezón, případně načasování sběru vzhledem k regeneračnímu žíru.

Při zjišťování plodnosti laboratorním experimentem byli z feromonových lapačů v dubnu 2009 odebráni brouci prvního jarního rojení, kteří nestihli prodělat regenerační žír, a jejich fyziologický stav a hladina energetických rezerv se lišily od brouků, kteří o týden později naletovali do lapáku a jejichž plodnost v terénu byla zjišťována až po dalších třech týdnech. Tomu napovídá i to, že v laboratorních podmínkách začalo klást jen 41,8 % zavrtaných brouků. Zbytek jedinců pod kůrou zřejmě prodělával regenerační žír. Vzhledem k tomu, že u druhu lýkožrout smrkový je jedinou spolehlivou metodou určení pohlaví pitva a pokusní jedinci nebyli tříděni dle pohlaví, je možné, že v použitém materiálu převažovali samci. Samice v laboratorních podmínkách nakladly v průměru o 41,2 vajíček/samice méně než samice v terénu. To lze vysvětlit nižší fitness samic odebraných z feromonových lapačů umístěných na osluněných místech. Lýkožrouti jsou ve feromonových lapačích vystaveni intenzivnímu vysychání, navíc investují velké množství energie do snahy z lapače uniknout a nemají možnost přijímat potravu. Při pokusech v insektáriu nalétlo do výřezů průměrně 28 % pokusných jedinců, vysvětlením může být rovněž jejich výše popsaný horší fyziologický stav. Samice v terénu nakladly průměrně 50,7 vajíček/samice, což je v souladu s prací Wermelíngera (2004), ten uvádí, že jedna samice v průměru naklade 50-80 vajíček.

Průběh rojení byl na zkoumaných lokalitách odlišný. Na lokalitě Hluboká začali brouci vylétávat přibližně o 14 dní dříve než na Kubově Huti a to pravděpodobně kvůli rozdílným klimatickým podmínkám, ale teplotní údaje z období rojení na lokalitách chybí. Doba vývoje jedné generace trvala na obou lokalitách přibližně 6 týdnů, což odpovídá literárním údajům (Zumr, 1985, 1995). Naše data potvrzují literární údaje, dle nichž má

lýkožrout smrkový v nižších nadmořských polohách 2 generace ročně, ve vyšších obvykle jen 1 dokončenou generaci ročně (Zumr, 1985, 1995).

Vysoké směrodatné odchylky některých výsledků jsou zřejmě způsobeny nehomogenním složením přezimující populace, případně odlišnou distribucí brouků kolem kmene (osluněná vs. neosluněná část výřezu). Na osluněné části výřezu se brouci často setkávají s letálními a subletálními teplotami, zatímco na stíněné části je teplota lýka blízká teplotě vzduchu. Teplotní grafy ukazují, že maximální teploty na slunci v srpnu 2009 jsou na Hluboké přibližně o 10°C vyšší než teploty měřené ve stínu. Na Kubově Huti jsou rozdíly teplot významnější, v témže měsíci byl rozdíl maximálních teplot na slunci a ve stínu přibližně 20°C. Vliv dopadajícího slunečního záření na teploty lýka byl podrobně rozebírán např. v práci Beiera et al. (2007).

V období od října 2008 do srpna 2009 byla průměrná teplota na Hluboké přibližně o 5,5°C vyšší než na Kubově Huti. U pěti ze šesti zkoumaných parametrů (kromě celkových lipidů) byly na lokalitě Kubova Hut' zjištěny vyšší průměrné hodnoty zkoumaných látek, což ukazuje na významný vliv teploty jako signálu k akumulaci energetických rezerv.

5 ZÁVĚR

Lýkožrout smrkový je významným hospodářským škůdcem smrkových porostů, na jehož potlačení a zmírnění jím způsobených škod jsou každoročně vynakládány nemalé finanční prostředky. Výzkumu tohoto druhu je proto věnována značná pozornost, přičemž primárním cílem je zvýšení efektivity stávajících ochranných opatření. V minulosti se fyziologií a diapauzou lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) zabývalo jen velmi málo autorů a je proto obtížné získat základní informace, na kterých by bylo možné stavět či porovnat a zobecnit získané výsledky. Cílem této práce bylo pokusit se pomocí hladin energetických rezerv o charakteristiku změn během přezimování lokálních populací a rozšířit stávající literární údaje. Výsledky zahrnují pouze jednorochní sledování a pro formulaci obecnějších závěrů by bylo třeba sledování prodloužit na více než dvě sezóny a do hodnocení zahrnout i meziroční rozdíly, ale i přesto lze považovat některá data za zajímavá, zejména změny obsahu glykogenu, jehož množství je korelováno s průběhem teplot a obsahem celkových lipidů. Užitečné jsou i výsledky experimentů s plodností v inokulturu a terénu.

6 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Annala E. (1969): Influence of temperature upon the development and voltinism of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). Ann. Zool. Fenn. 6: 161 - 208.

Beier P., Pennerstorfer J., Schopf A. (2007): PHENIPS – A comprehensive phenology model of *Ips typographus* (L.) (Col.; Scolitinae) as a tool for hazard rating of bark beetle infestation. For. Ecol. Manag. 249: 171 – 186.

Botterweg P.F. (1982): Dispersal and flight behaviour of the spruce bark beetle *Ips typographus* in relation to sex, size and fat content. J. Appl. Ent. 94: 466 – 489.

Denlinger D.L. (2002): Regulation of diapause. Ann. Rev. Entomol. 47: 93 – 122.

Doležal P. (2002): Diapauza u lýkožrouta smrkového *Ips typographus* (L.), Biologická fakulta JU, Magisterská diplomová práce, 51 pp.

Doležal P., Sehnal F. (2007): Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. J. Appl. Entomol. 131(3): 165 – 173.

Faccoli M. (2009): Effect of weather on *Ips typographus* (Coleoptera; Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the southeastern Alps. Environmental Entomology 38 (2): 307 – 316.

Führer E., Chen Z.Y. (1979): Zum Einfluss von Photoperiode und Temperatur auf die Entwicklung des Kupferstechers *Pityogenes chalcographus* L. Forstw. Cbl. 98: 87 - 91.

Good C.A., Kramer H., Somogyi M. (1933): The determination of glycogen. J. Biol. Chemistry 100: 485 – 491

Hahn, D.A., Denlinger, D.L. (2007): Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. J. Ins. Phys. 53: 760 – 773

Hauerland N.H. (1996): Insect storage proteins: Gene families and receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 755 - 765

Holwerda D.A., Doorn J.V., Beenackers A.M.T. (1977): Characterization of the adipokinetic and hyperglycaemic substances from the locust corpus cardiacum. *Insect Biochemistry* 7(2):151 – 157.

Jakuš, R. (1998): Types of bark beetle (Coleoptera: Scolytidae) infestation in spruce forest stands affected by air pollution, bark beetle outbreak and honey fungus (*Armillaria mellea*). *Anz. Schädl. kd. Pflanzenschutz Umweltschutz* 71: 41–49.

Kaufmann Ch., Brown M.R. (2008): Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J.Ins. Phys.* 54: 367 – 377.

Khansen T.E., Viik M.O., Luik A.K. (1980): Biochemical changes and cold hardiness in hibernating beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Ipsidae). *Entomol. Obozr.* 59 (2): 249-253.

Kodřík Dalibor (2000): Fyziologie hmyzu. Učební texty. Entomologický ústav AV ČR a Biologická fakulta, JČU v Českých Budějovicích, 217p.

Košťál V. (2006): Eco-physiological phases of insect diapause. *J. Ins. Physiol.* 52: 113 – 127.

Košťál V. (2007): Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *J. Ins. Physiol.* 53: 580–586.

Lindelöw A., Risberg B., Sjödin K. (1992): Attraction during flight of scolytids and other bark- and wood-dwelling beetles to volatiles from fresh and stored spruce wood. *Can. J. For. Res.* 22: 224 – 228.

Martínek V. (1957): K otázce zakládání tzv. sesterského pokolení u kůrovce *Ips typographus* L. v horské a chlumní oblasti. *Sborník československé akademie zemědělských věd – Lesnictví* 3 (10): 687 – 722.

Merker E., Wild M. (1954): Das Reifen der Geschlechtsdrüsen bei dem grossen Fichtenborkenkäfer und sein Einfluss auf das Verhalten der Tiere. Beitr. Entomol. 4: 451-468.

Passonneau J. V., Lauderdale V. R. (1974): A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. Analytical Biochemistry, 60(2): 405 – 412.

Schopf A. (1985): Zum Einfluss der Photoperiode auf die Entwicklung und Kältresistenz des Buchdruckers, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae). Anz. Schädlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz 58: 73 - 75.

Schopf A. (1989): Die Wirkung der Photoperiode auf die Induktion der Imaginaldiapause von *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae). J. Appl. Ent. 107: 275 - 288.

Simpson E.R., Williams – Smith D.L. (1975): Effect of calcium(ion) uptake by rat adrenal mitochondrial on pregnenolone formation and spectral properties of cytochrome *P*-450. Biochemica and Biophysica Acta 404 (2): 309 – 320.

Storey K.B., Storey J.M. (1990): Biochemistry of cryoprotectants. In: Lee R.E., Denlinger D.L. (Eds.), Insects at low temperature. Chapman & Hall Press, New York, pp. 64-93

Stoscheck C. (1990): Quantification of Protein. Methods in Enzymology, 182:50-68.

Vodrážka Z. (1996): Biochemie, 2. vyd., Academia

Zöllner N., Kirsch K. (1962): Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin 135(6): 545 – 561.

Zumr V. (1982): Hibernation of spruce bark beetle *Ips typographus* (Col.; Scolytidae) in soil litter in natural and cultivated picea stands. Acta Entomol. Bohemoslov. 79(3): 161 – 166.

Zumr V. (1985): Biologie a ekologie lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a ochrana proti němu – Academia; 124 p., Praha.

Zumr V. (1995): Lýkožrout smrkový – biologie, prevence a metody boje – Matice lesnická;
132 p., Praha.

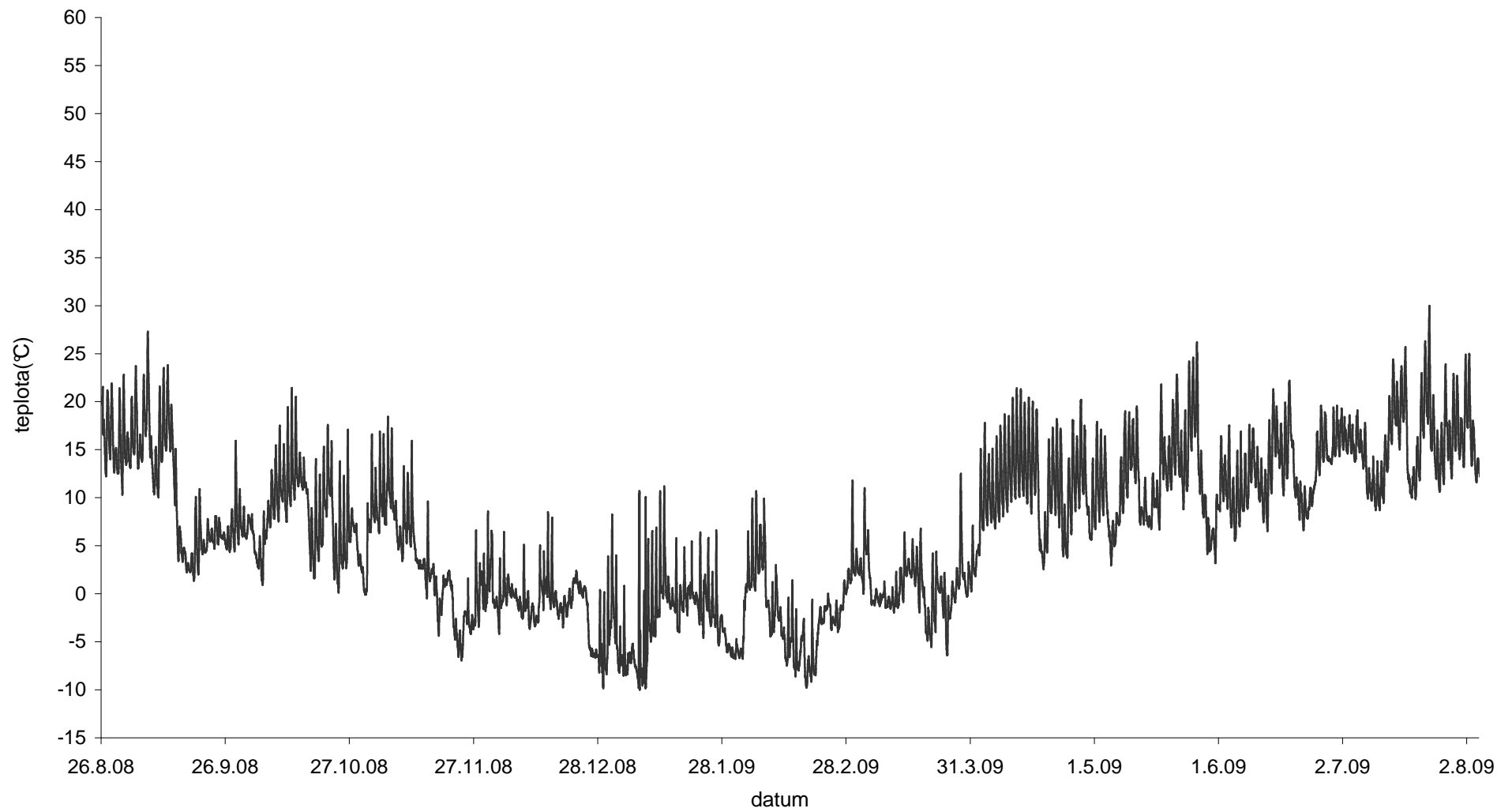
7 PŘÍLOHY

Obr. 8 Průběh teplot vzduchu ve stínu na lokalitě Kubova Hut'

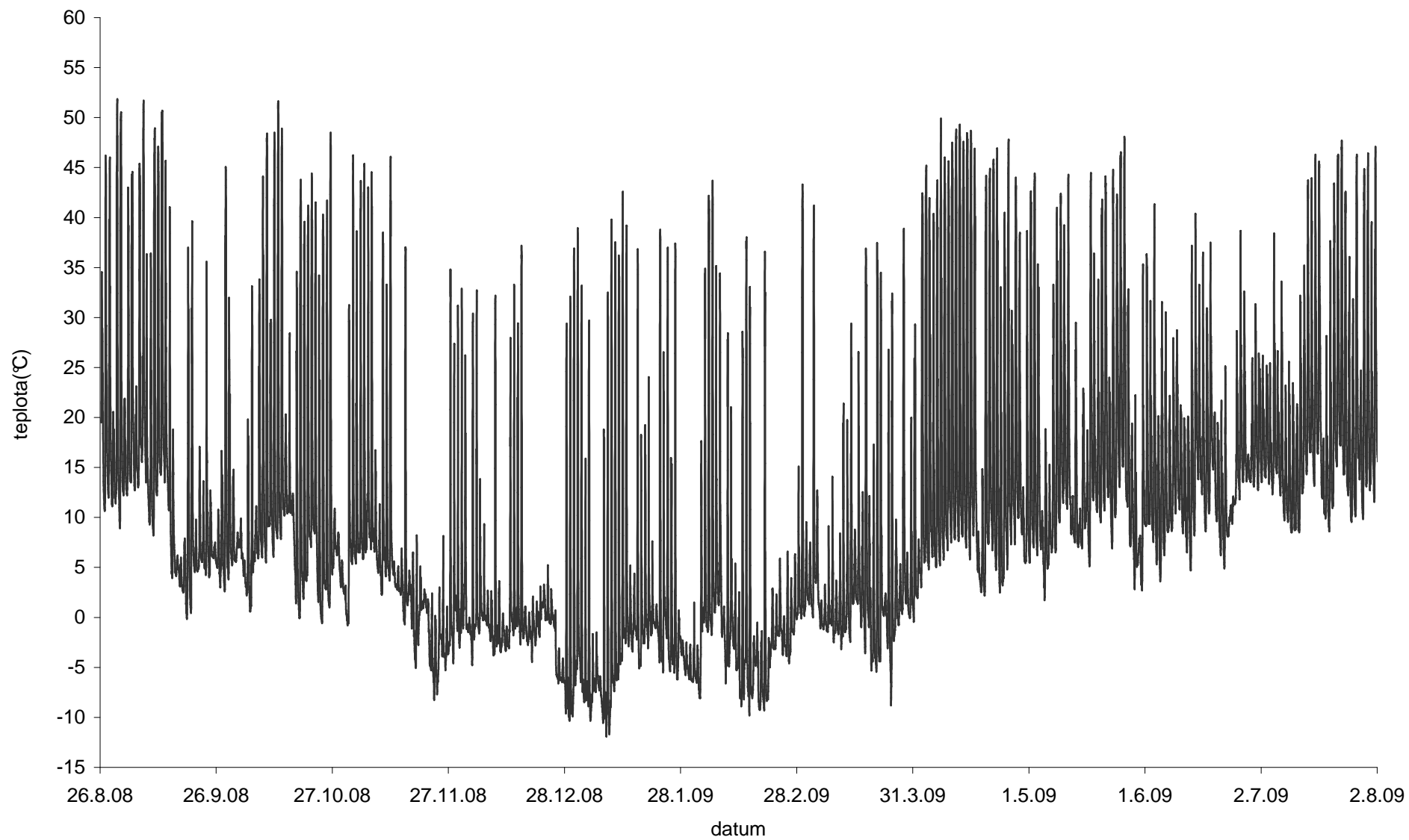
Obr. 9 Průběh teplot vzduchu na slunci na lokalitě Kubova Hut'

Obr. 10 Průběh teplot vzduchu ve stínu na lokalitě Hluboká

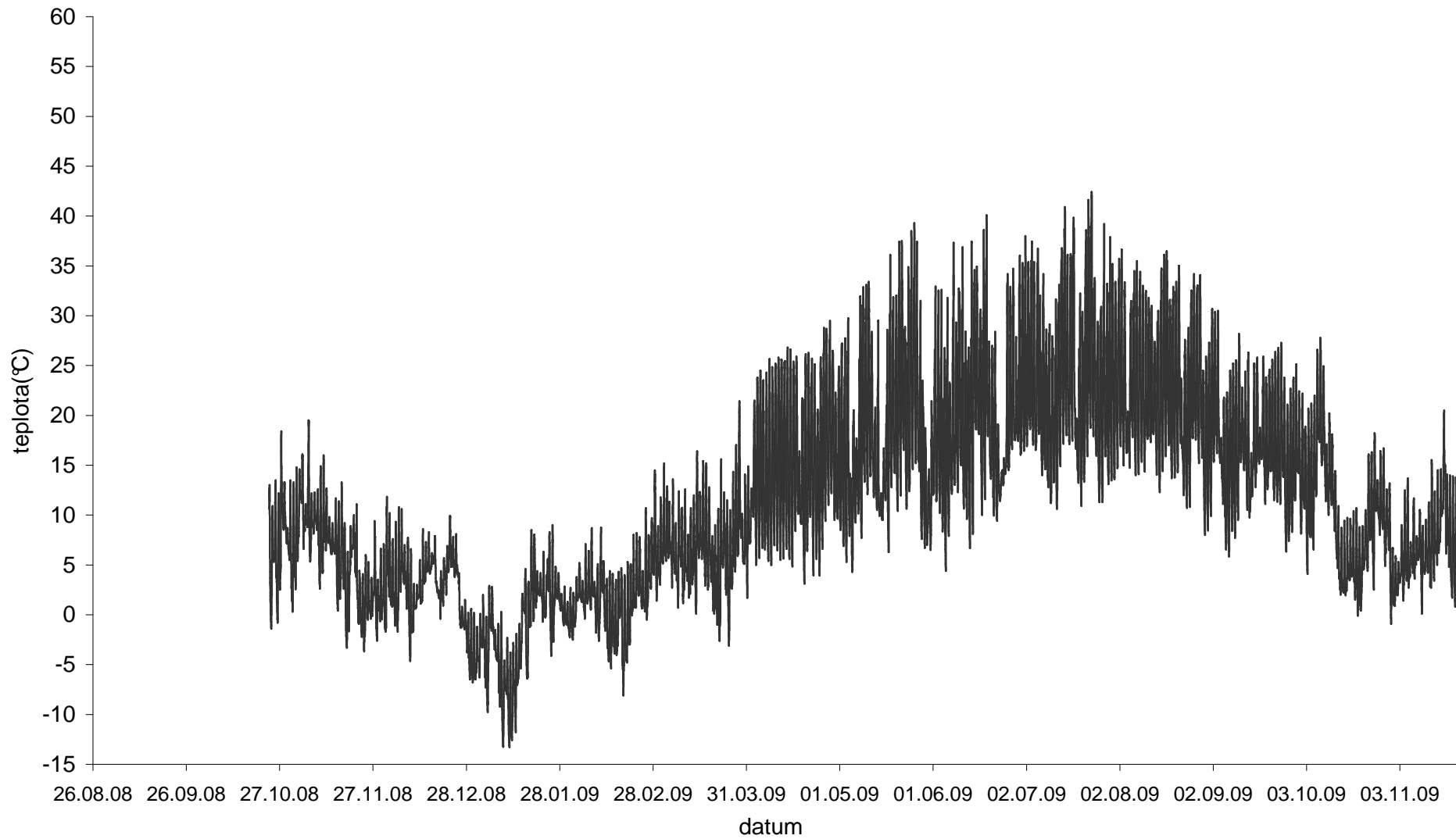
Obr. 11 Průběh teplot vzduchu na slunci na lokalitě Hluboká



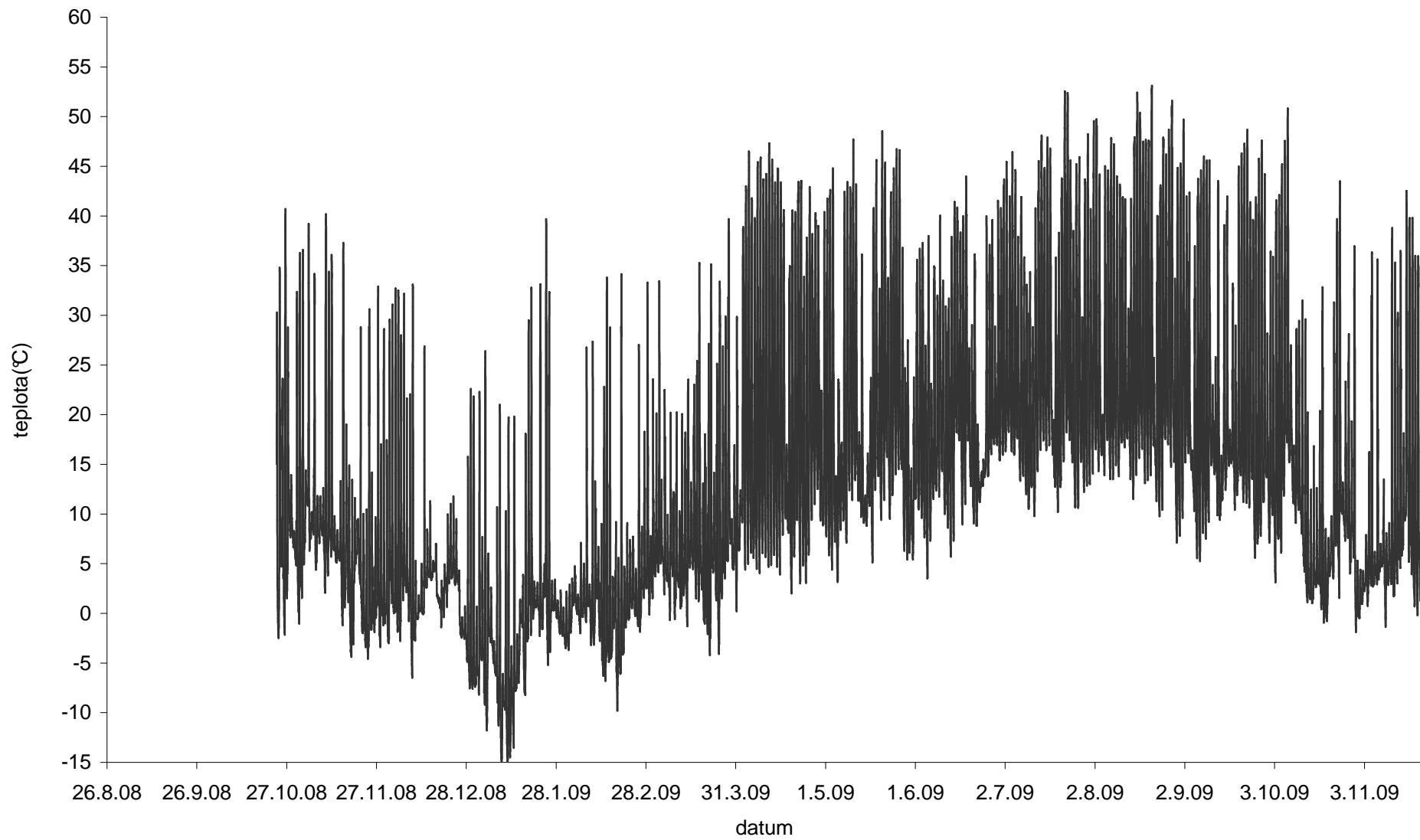
Obr.8 Průběh teploty vzduchu ve stíně na lokalitě Kubova Huť



Obr.9Pr ůběhteploťnasluncinalokalit ěKubovaHu t'



Obr.10 Pr ůbě teploty vzduchu ve stíně na lokalitě ěHluboká



Obr.11 Průběh teploty vzduchu na slunci v lokalitě ěHluboká