

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská
Katedra ochrany lesa a entomologie



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta lesnická
a dřevařská**

Houby a bakterie asociované s kůrovci rodu *Hylesinus* v
Litovelském Pomoraví.

Diplomová práce

Autor: Bc. Simona Soukupová
Vedoucí práce: doc. Mgr. Jan Šobotník, Ph.D.

2019

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Simona Soukupová

Lesní inženýrství

Název práce

Houby a bakterie asociované s kůrovci rodu Hylesinus v Litovelském Pomoraví.

Název anglicky

Fungi and bacteria associated with Hylesinus bark beetles in Litovelském Pomoraví.

Cíle práce

Tato práce se bude zabývat popisem hub asociovaných se dvěma druhy brouků rodu Hylesinus (*H. crenatus* a *H. fraxini*) na jasanu. Bude studována kultivovatelná diverzita hub, které se vyskytují v drtinkách a v různých instarech brouků. Zaměříme se zejména na hlavní symbiotické houby brouků a zároveň budeme v literatuře dohledávat jejich možné role.

Metodika

Larvy, kukly či nevyvíhlá imaga brouků získané z lýka jasanu ztepilého budou homogenizovány, bude proveden výsev na živné médium a po kultivaci budou houby spočítány pomocí parataxonomického přístupu. Ze zjištěných OTU bude izolována DNA, která poslouží jako templát pro barcodový úsek DNA (ITS pro houby a 16S pro bakterie). Tato část DNA bude porovnána s databází GenBank, díky čemuž bude zjištěna identita hub. V případě hlavních symbiotických hub (rody *Ophiostoma* a *Geosmithia*) bude využito více genů (TEF1, β -Tubulin) pro zjištění, zda se jedná o nové nebo již popsané druhy.

Doporučený rozsah práce

60 stran

Klíčová slova

Hylesinus fraxini, Hylesinus crenatus, symbióza

Doporučené zdroje informací

- Ayres, M. P., Wilkens, R. T., Ruel, J. J., Lombardero, M. J., & Vallery, E. (2000). Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology*, 81(8), 2198-2210.
- Farrell, B. D., Sequeira, A. S., O'Meara, B. C., Normark, B. B., Chung, J. H., & Jordal, B. H. (2001). The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, 55(10), 2011-2027.
- Hussa, E. A., & Goodrich-Blair, H. (2013). It takes a village: ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. *Annual review of microbiology*, 67, 161-178.
- Jankowiak, R., Kolařík, M., & Bilański, P. (2014). Association of Geosmithia fungi (Ascomycota: Hypocreales) with pine- and spruce-infesting bark beetles in Poland. *Fungal Ecology*, 11, 71-79.
- Kirschner, R. (2001). Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in central Europe. In *Trichomyces and other fungal groups*, Misra, J. K., Horn, B. W. (eds.). Science Publishers: Plymouth (UK), pp 175-196.
- Klepzig, K. D., Moser, J. C., Lombardero, F. J., Hofstetter, R. W., & Ayres, M. P. (2001). Symbiosis and competition: complex interactions among beetles, fungi, and mites. *Symbiosis*, 30, 83-96.
- Kolařík, M., Freeland, E., Utley, C., & Tisserat, N. (2011). *Geosmithia morbida* sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in USA. *Mycologia*, 103(2), 325-332.
- Kolařík, M., Kubátová, A., Hulcr, J., & Pažoutová, S. (2008). Geosmithia fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: evidence from their community structure in temperate Europe. *Microbial Ecology*, 55(1), 65-80.
- Six, D. L. (2013). The bark beetle holobiont: why microbes matter. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 989-1002.
- Zhou, X., Burgess, T. I., de Beer, Z. W., Lieutier, F., Yart, A., Klepzig, K., Carnegie A., Portales, J. M., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J. (2007). High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology*, 16(1), 89-99.

Předběžný termín obhajoby

2018/19 LS – FLD

Vedoucí práce

doc. Mgr. Jan Šobotník, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ochrany lesa a entomologie

Konzultant

RNDr. Barbora Křížková

Elektronicky schváleno dne 14. 12. 2018

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 8. 2. 2019

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 18. 04. 2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Houby a bakterie asociované s kůrovci rodu *Hylesinus* v Litovelském Pomoraví vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Jana Šobotníka, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 20. dubna 2019

Podpis autora

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na studium mikrobiotických symbiontů floemofágních kůrovců druhů *H. crenatus* a *H. fraxini* na jasaněch. Cílem práce je utřídit získané informace o významu hub a bakterií asociovaných s těmito dřevokaznými brouky. Studována je kultivovatelná diverzita hub a bakterií, které se vyskytují v různých instarech brouků. Speciální pozornost je věnována rodům *Geosmithia* a *Ophiostoma*.

V praktické části této práce jsme využili standartních kultivačních metod ke zjištění houbových symbiontů nalezených v larvách či v dospělých a určili jsme jejich frekvence. Rozsah biodiverzity kultivovatelných hub a bakterií jsme získali pomocí molekulárních metod (sekvenace genů ITS a 16S rDNA). Získané sekvenace byly konfrontovány s internetovými databázemi.

Takto identifikované houby a bakterie byly roztrženy do několika ekologických kategorií. Zjistili jsme, že nejvíce hub žije saprofytickým způsobem života. Nemalou roli hrají i endofytické houby a houby asociované s hmyzem.

Nejdůležitější však pro nás byla symbióza mezi kůrovci a houbami rodu *Ophiostoma* asociované s *H. crenatus* a houby rodu *Geosmithia*, asociované s *H. fraxini*. Tyto houby osidlují různá prostředí podle stupně vlhkosti (Jankowiak et al., 2008), stejně tak jako brouci s nimi asociovaní. Také se ale vyjadřujeme k širokému spektru kvasinek a bakterií, jejichž funkce a význam byly v odborné literatuře doposud podceňovány.

Klíčová slova:

Hylesinus fraxini, *Hylesinus crenatus*, jasan, symbióza, houby, bakterie, kvasinky

Abstract

This thesis is focused on the study of microbiotic symbionts of phloemophagous bark beetles of the species *H. crenatus* and *H. fraxini* on ash trees. The aim of this work is to sort out the information about the importance of fungi and bacteria associated with these ligniperdous beetles. It studies the cultivable diversity of fungi and bacteria occurring in various beetle instars. Special attention is paid to the genera *Geosmithia* and *Ophistoma*.

In the practical part of this work we used standard cultivation methods to detect fungal symbionts found in larvae or in adults and we determined their frequencies. The range of biodiversity of cultivable fungi and bacteria was obtained by molecular methods (sequencing of ITS and 16S rDNA genes). Obtained sequences were confronted with the Internet databases.

The fungi and bacteria thus identified have been categorized into several ecological categories. We found that most fungi live a saprophytic way of life. But endophytic fungi and fungi associated with insects also play an important role.

Most important, however, was the symbiosis between bark beetles and *Ophistoma* fungi associated with *H. crenatus* and fungi of the genus *Geosmithia* associated with *H. fraxini*. These fungi populate different environments according to the degree of humidity (Jankowiak et al., 2008), as do the beetles associated with them. Finally we also comment on a wide range of yeasts and bacteria, whose function and significance have been underestimated in the literature so far.

Keywords:

Hylesinus fraxini, *Hylesinus crenatus*, ash, symbiosis, fungi, bacteria, yeast

Obsah

Úvod	10
1. Cíle práce.....	11
2. Rozbor problematiky	12
2.1 Hostitelská dřevina	12
2.2 Rod <i>Hylesinus</i>	13
2.2.1 <i>Hylesinus fraxini</i>	14
2.2.2 <i>Hylesinus crenatus</i>	15
2.3 Symbióza mikroorganismů s brouky.....	16
2.3.1 Floemofágní kůrovci	18
2.3.2 Ambrosioví kůrovci.....	19
2.4 <i>Geosmithie</i>	20
2.5 Ophiostomatální houby	24
2.6 Další nalezené houby.....	28
2.7. Bakterie	29
3. Metodika.....	30
3.1 Sběr dat.....	30
3.2 Popis laboratorní činnosti	31
3.2.1 Amplifikace DNA	33
3.2.2 Zpracování sekvencí.....	35
3.3 Statistické analýzy	36
4. Výsledky.....	37
4.1 Izoláty z <i>Hylesinus fraxini</i>	37
4.2 Izoláty z <i>Hylesinus crenatus</i>	41
4.3 Kontrola.....	43
4.4 PCA a indexy.....	45
5. Diskuze	48
5.1 Houby asociované s hmyzem	48
5.2 Houby saprofytické (či patogenní)	49
5.3 Houby endofytické	50
5.4 Kvasinky.....	50
5.5 Bakterie	51
5.6 Překryv u brouků a kontrol.....	53
6. Závěr.....	54
Seznam použité literatury	56

Tabulky

Tabulka č. 1: Standartní cyklus teplot při amplifikaci ITS.....	33
Tabulka č. 2: Standartní cyklus teplot při amplifikaci 16S.....	34
Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro amplifikaci ITS (objemy jsou uvedeny v μl na 25 μl reakční směsi).....	34
Tabulka č. 4: Složení reakční směsi pro amplifikaci 16S (objemy jsou uvedeny v μl na 25 μl reakční směsi).....	34
Tabulka č. 5: Primery využité v této práci.....	35
Tabulka č. 6: Přehled hub izolovaných z <i>Hylesinus fraxini</i>	37–39
Tabulka č. 7: Přehled bakterií izolovaných z <i>Hylesinus fraxini</i>	40
Tabulka č. 8: Přehled hub izolovaných z <i>Hylesinus crenatus</i>	41–42
Tabulka č. 9: Přehled bakterií izolovaných z <i>Hylesinus crenatus</i>	43
Tabulka č. 10: Přehled hub izolovaných ze zdravého dřeva.....	43–45
Tabulka č. 11: Přehled bakterií izolovaných ze zdravého dřeva.....	45
Tabulka č. 12: Indexy diversity pro houby.....	45
Tabulka č. 13: Indexy diversity pro bakterie.....	46

Obrázky

Obr. č. 1: Analýza hlavních komponent (<i>Principal Component Analysis, PCA</i>) byla počítána z netransformovaných dat v základním nastavení v programu PAST 3.23 pro houbové vzorky.....	47
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Úvod

Rod *Hylesinus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) patří do nadčeledi *Curculionoidea*. Nazýváme je také nosatci, toto označení si zasloužili typickým tvarem své hlavy, která je protažena do dlouhého nosce. V České republice se v současné době vyskytuje celkem 6 čeledí a v nich pak kolem 1040 druhů.

Hylesinus fraxini (Panzer, 1779) a *Hylesinus crenatus* (Fabricius, 1787) - druhy, které byly zkoumány v rámci mé diplomové práce, patří mezi kůrovce napadající pouze listnaté stromy. Vyvíjejí se pod kůrou oslabených stromů. Při přemnožení ale mohou napadat i zdravé jedince. V mém případě se jedná o stromy rodu *Fraxinus*, konkrétně o jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*).

Během osidlování hostitelského stromu dochází k asociaci mezi brouky tohoto rodu a houbovými či bakteriálními symbionty, kteří jim pomáhají překonat obranu stromu nebo mohou zvyšovat nutriční hodnotu potravy. Má diplomová práce se bude zabývat výzkumem tohoto vzájemného vztahu mezi broukem a houbami/bakteriemi.

Tato práce je součástí většího projektu pod záštitou Akademie věd České republiky. Budeme zde vyhodnocovat data ze dvou sběrů z přelomu červen/červenec 2014. Zjišťována bude zejména biodiverzita mikrobiálních symbiontů, ale i další ekologická data.

1. Cíle práce

Tato diplomová práce se bude zabývat popisem hub a bakterií asociovaných se dvěma druhy brouků rodu *Hylesinus*. Lýkohub zrnitý (*Hylesinus crenatus*) a Lýkohub jasanový (*Hylesinus fraxini*) vyskytující se na jasanu ztepilém (*Fraxinus excelsior*). Bude studována kultivovatelná diverzita hub a bakterií, které se vyskytují v drtinkách a v různých instarech daných brouků. Zaměříme se zejména na hlavní symbiotické houby brouků a zároveň budeme v literatuře dohledávat jejich možné role v organismu. Tyto údaje mají sloužit jako základní podklad pro studium sukcese a ekologické role symbiontů jasanových lýkohubů.

Celý projekt, jehož je má práce součástí, zahrnuje popis biodiverzity kultivovatelných hub z prvního a druhého sběru obou druhů kůrovců. Pro účely diplomové práce jsme zvolili pouze nejlepší data.

Hlavní cíle tedy jsou:

- Popsat kultivovatelnou diverzitu houbových a bakteriálních symbiontů studovaného hmyzu.
- Popsat jejich funkce v symbióze s brouky a pokusit se vysledovat i příslušnou ekologii.
- Významným předpokladem je, že *H. crenatus* má jiné hlavní symbiotické houby (rod *Ophiostoma*) než *H. fraxini* (rod *Geosmithia*). Statisticky prokázat tuto hypotézu.
- Zjistit, zda závisí druhová rozmanitost symbiontů na vývojových cyklech zkoumaných druhů kůrovců.

2. Rozbor problematiky

2.1 Hostitelská dřevina

V této diplomové práci jsou studováni kůrovci a s nimi asociované organismy na rodu *Fraxinus*. Jde o opadavé listnaté stromy z čeledi olivovnickovitých (*Oleaceae*). Celý rod zahrnuje asi 45–65 obvykle středně vysokých, většinou opadavých druhů, ačkoliv několik subtropických druhů řadíme mezi stálezelené (např. jamovec). Fylogeneticky je tento druh vzdálený ostatním listnatým stromům ČR. Jiné ze stejné čeledi se přirozeně na našem území nevyskytují. Nejpříbuznější uměle pěstované druhy jsou keře *Syringa vulgaris* (šeřík obecný) či původní druh *Ligustrum vulgare* (ptačí zob obecný) (Wallander, 2008).

V našich lesích je zástupce rodu jasan ztepilý šestou nejrozšířenější dřevinou (Nárovec a kol., 2008). Roste roztroušeně v nížinách jako součást tvrdého nížinného luhu, přes suťové lesy v pahorkatinách až po horské oblasti celého území. Jasan ztepilý zahrnuje tři ekotypy: lužní, horský a vápencový, všechny jsou v ČR zastoupeny (Úradníček, 2014). Dává však přednost půdám obohaceným dusíkem, nesnáší zasolené půdy a neroste na zrašeliněných podkladech. Zetlívajícím listím dobře obohacuje svrchní vrstvu půdy. Je citlivý na klimatické výkyvy, škodí mu silné mrazy, dobře snáší trvale vanoucí vítr. Nehodí se příliš do průmyslového prostředí (Hejný, 1988).

Za posledních dvacet bylo pozorováno, že dochází k většímu odumírání jasanů všech vývojových stádií. Symptomy tohoto chřadnutí, tedy prosychání korun, odumírání mladých letorostů a nekrózy započaly v České republice v letech 2004–2006 v oblasti lužních lesů (Jankovský et al., 2009). Mortalita je výraznější u mladých jedinců, ale postihuje dřeviny na všech stanovištích, tzn. v oblastech lužních lesů i v nižších horských oblastech (Jankovský et al., 2009).

S rokem 2006 byla popsána houba *Chalara fraxinea*, původce choroby chřadnutí jasanů (Kowalski, 2006). Kowalski, Holdenrieder (2009) popsali, že *Ch. fraxinea* je anamorfním (nepohlavním) stádiem *Hymenoscyphus albidus*, což je rozšířený nepatogenní endofyt, vyskytující se na řapících listů jasanu po jejich opadu a podílející se na rozkladu tohoto opadaného listí. V roce 2011 došlo pomocí genetických testů ke zjištění, že se na jasanu vyskytují dva

morfologicky velmi podobné druhy rodu *Hymenoscyphus*. Houba vyskytující se na řapících napadených jasanů tedy není *H. albidus*, ale nově popsáný taxon *H. pseudoalbidus* (Queloz et al., 2011). Za houbu způsobující chřadnutí jasanů byl tedy označen *H. pseudoalbidus*, který se při výzkumech vyskytoval na nemocných jasanech, zatímco *H. albidus* se vyskytoval pouze ve zdravých jasanových porostech (Husson et al., 2011). Pomocí molekulárních genetických metod byl tedy potvrzen nový druh patogenu s platným jménem *H. fraxinus*. Zavlečen byl zřejmě z Asie (Sieber et al., 2010).

Právě v souvislosti s prosycháním a odumíráním jasanu zteplého evidujeme zvýšený výskyt kůrovcovitých, zejména lýkohuba jasanového a lýkohuba zrnitého (Kowalski, 2006). Tyto druhy lýkohubů se vyskytovaly pouze v původním areálu jasanů, v souvislosti se zavedením jasanů jako melioračních a zpevňujících dřevin došlo k jejich rozšíření v hospodářských lesích, v oblasti městské zeleně apod. Na základě zkoumání života lýkohubů je zřejmé, že jejich úloha při chřadnutí jasanů je až druhořadá, přestože *H. fraxini* napadá i mladé zdravé stromy (Kowalski, 2006). Pro odumírání jasanů je typické, že dochází k rychlému nástupu choroby, která je spojována s vysokou densitou šířících se spor. Patogen okamžitě infikuje listy a řapíky hostitelského stromu, mycelium patogenu může pronikat i pupeny či poraněními dřeviny (Kowalski & Holdenrieder, 2009), a tím umožňuje druhotným škůdcům (lýkohubům, mšicím atp.) přístup do napadeného stromu.

2.2 Rod *Hylesinus*

Kůrovci (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*) jsou brouci, kteří nejčastěji napadají nejrůznější dřeviny a jejichž larvy vyhlodávají chodbičky v kmenech, větvích či koncových větvičkách. Podle ekologie se dělí na dvě hlavní skupiny. Na brouky ambrosiové, pěstující si v chodbičkách symbiotické houby, kterými se živí a přenášejí je v mykangíích, a na lýkožravé, kteří konzumují floém, avšak ke svému vývoji rovněž potřebují symbiotické houby (Farrell et al., 2001). Ke druhým zmíněným patří i rod *Hylesinus*.

Floém (lýko) je poměrně výživným zdrojem potravy, xylem (dřevo) je naopak živinami chudý a brouci v něm žijící jsou ve většině případů obligátně závislí na přítomnosti symbiotické houby (Byers, 2004; Kirisits, 2007; Mueller 2005; Farrell et al., 2001). U těchto tzv. xylomycetofágních nebo mycetofágních hmyzích druhů a jejich houbových průvodců se vyvinula velmi těsná symbióza doprovázená morfologickými adaptacemi. Na straně brouků jsou to mykangia – specializované orgány sloužící k přenosu symbiotických hub. V typickém případě se jedná o vchlípeniny kutikuly, do nichž ústí různé tělní žlázy. V širším pojetí mohou mít mykangia i podobu kartáčků z chlupů, na nichž se výtrusy hub mohou zachytit (Six, 2013). Houby účastnící se této symbiózy se nazývají ambrosiové a přizpůsobily se jí tvorbou různých útvarů funkčně analogických plodům kulturních rostlin. Jedná se například o zvětšené spory nebo o vylučování kapek. Účelem těchto útvarů je maximalizovat poměr výživného obsahu k nestravitelnému obalu (Kolařík & Kirkendall, 2010; Mueller et al., 2005).

Tato diplomová práce se zabývá dvěma konkrétními zástupci rodu *Hylesinus*. Tito brouci jsou floemofágové, kteří žijí ve vnitřní kůře, v lýku, případně ve svrchních vrstvách bělového dřeva. Floemofágové se živí především lýkem, které transportuje rozpustné organické produkty fotosyntézy, zejména sacharózu (Lieutier et al., 2004).

2.2.1 *Hylesinus fraxini*

Lýkohub jasanový je drobný brouk, dospělec je 2,5-3,5 mm dlouhý, krátce podlouhle oválný, relativně silně klenutý, černý, na povrchu štítu a krovek výrazně pokrytý různobarevnými drobnými sětami (štetinkami) ve tvaru šupinek. Tyto šupinky jsou zbarvené od tmavě hnědé do šedé až bělavé barvy, takže povrch těla je pestře asymetricky zbarvený. Mezi šupinkami se nalézají ještě delší odstálé vlasovité sety, zejména po stranách přední poloviny krovek. Na mezirýžích krovek jsou řady drobných hrbolků. Čelo je lesklé, velmi hustě a jemně tečkované. Pohlavní dimorfismus je zřetelný v utváření čela, které je u samic vyklenuté, u samečků zploštělé (Pfeffer, 1995).

Obývá téměř celou Evropu včetně Britských ostrovů a jižní Fennoskandinávie, na východě zasahuje až do Číny, jižní část areálu prochází severní Afrikou. K vývoji využívá prakticky všechny zástupce rodu *Fraxinus*, v jižní části areálu se může vyvíjet na olivě (*Olea europaea*), jeho hlavní hostitelskou dřevinou jsou však jasaný. V České republice patří k poměrně rozšířenému druhu kůrovců, který je současně závažným škůdcem na jasaněch (Pfeffer, 1995). Nejčastěji napadá mladé jasaný a dříví na skládkách, žije pod tenkou hladkou borkou nebo v tenkých větvích do průměru cca 5 cm.

Lýkohub jasanový má jednu generaci v roce, časté bývá sesterské rojení. Brouci jsou aktivní již brzy zjara (březen, duben). Vývoj od vajíčka po dospělce trvá zhruba 3 měsíce. Larvy se kuklí v běli dřeviny, pokud však vývoj prodělávají v tlustší borce kuklí se pak v ní. Imaga se začínají objevovat počátkem května. Nejvíce jich pak můžeme nalézt na začátku léta (Loyning, 1999). Zralostní žír provádějí ve tzv. „spících očkách“ mladých jasanů, ve kterých si připravují chodbičky k přezimování. Tento žír podmiňuje tvorbu hojivého pletiva a v okolí závrtů se vytvářejí tzv. „korové růžice“, které se po několikaletém opakovaném žíru rozrůstají do mohutných útvarů (Pfeffer, 1995). Takto poškozenou kůru dřeviny napadají nejenom další generace brouků, ale je lákadlem i pro další druhy dřevokazných hub.

2.2.2 *Hylesinus crenatus*

Jedná se o největšího zástupce rodu *Hylesinus* v České republice. Je to tmavý až černý brouk, jehož dospělec je 4–6 mm dlouhý, robustní, krátce podlouhle oválný, silně klenutý, tmavě hnědý až černý, matně lesklý. Na povrchu štítu a krovek velmi řídké „ochlupený“ vlasovitými a šupinovitými sětami, téměř lysý. Na mezirýžích jsou řady znatelných hrbolků, zejména v zadní polovině krovek. Čelo je ve spodní polovině slabě promáčklé, u samečka je tato prohlubenina nepatrně hlubší (Pfeffer, 1995).

Na našem území není příliš rozšířený, nezpůsobuje ani velké hospodářské škody, velké škody může způsobit na lesních polomech. V poslední době se vyskytly důkazy, že se tento brouk šíří společně

s houbovým patogenem *Hymenoscyphus fraxineus*. Důvodem je nejspíš fakt, že stromy jsou oslabené houbovou nákazou, a to umožňuje přístup dalším dřevokazným broukům a jiným patogenům (Kowalski, 2006).

Lýkohub zrnitý má velké nároky na vlhkost, proto vyhledává staré stromy s tlustou borkou nebo odumřelé či čerstvě pokácené jasany. Brouci se rojí od poloviny dubna do začátku června. Požerek s matečnou chodbou je dlouhý pouze 4-8 cm, ale poměrně široký. Larvové chodby se paprskovitě rozbíhají a dosahují délky až 30 cm. Vývoj je dvouletý, v prvním roce přezimuje larva, druhou zimu dospělec. K náletu na stromy dochází v průběhu léta (červenec, srpen), dospělí brouci se líhnou v červnu následujícího roku, prodělávají zralostní žír na bázi starších kmenů či v čerstvých pařezech, přičemž vytvářejí krátké chodbičky. K založení nové generace dochází až po přezimování (Pfeffer, 1995).

2.3 Symbióza mikroorganismů s brouky

Mikrobiální symbiózy mohou podstatně měnit fyziologii hostitelského organismu. V mnoha případech propůjčují nové či zlepšují stávající schopnosti organismu a zlepšují tak fitness daného jedince. To má dopad jak na ekologickou niku organismu (rozšířením niky se hostitelský organismus dostane k novým zdrojům potravy), tak na jeho schopnost odolávat stresovým faktorům prostředí, predátorům a parazitům. Toto ovlivňování (mutualismus) probíhá mezi dvěma i více organismy a je založené na vzájemném vykořisťování. Všem zúčastněným organismům tak vznikají náklady přispívající k interakci, avšak dostává se jim odpovídajících benefitů (Hussa & Goodrich-Blair, 2013)

Všechny vyšší organismy jsou v podstatě vždy zapojeny do symbióz s mikroorganismy. Důležitost těchto symbióz vedla ke konceptu holobiontu, který můžeme definovat jako spojení mnohobuněčného hostitele se všemi jeho symbionty, včetně virů (Gilbert et al., 2012; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). Kupříkladu u hmyzu je koncept symbiózy hostitele s mikroorganismy základem pro úspěch a rozmanitost této třídy. Hmyz „spoléhá“ na své mikroorganismy, co se týká jeho základních životních funkcí a schopnosti

využívat zdroje potravy (Janson et al., 2008). U hmyzu mezi symbionty řadíme ektosymbionty, jako jsou mikroskopické houby (Mueller, 2005), a endosymbionty, kam patří zejména bakterie a další mikroorganismy v trávicí soustavě (Moran et al., 2008).

Kůrovci, jako mnoho dalších zástupců hmyzu, využívají úzce specifické niky. Symbióza mezi nimi a jejich houbami, bakteriemi či kvasinkami představuje komplex vzájemných interakcí. Pro úspěšnou kolonizaci je třeba souhra obou „vetřelců“. Brouci svým mechanickým hloubením chodeb rozvrátí vodní režim stromu. Když jich je hodně, vysuší i pryskyřičné kanálky, protože většina pryskyřice se vyplaví už během prvních několika hodin. Houby přeruší transport vody, protrhnou membrány mezi tracheidami, ucpou cévy smůlou a navíc produkují jedovaté izokumariny (Morgan, 2010). V lýku dokážou růst překvapivě rychle, uvádí se až 1 cm za den. Když už je obsazeno lýko, napadnou dřevo, které se zbarví. Tato fáze je však už pomalejší, prorůst do centimetrové hloubky trvá houbám i několik týdnů (Hanson, 2008).

Ve skutečnosti pouze jeden nebo několik málo druhů přenášených hub skutečně pomáhá kůrovcům při kolonizaci stromů (Six, 2012). Ostatní jsou vesměs saprofyty, tedy požírači mrtvé rostlinné suroviny, kteří se přizívují na odumřelé hmotě po invazi kůrovce (Kirschner, 2001) či mají jiné úlohy nebo jsou pouze příživníci (komezállové) (Kok, 1979). Tito „příživníci“ sice mají ze soužití potravní prospěch, svého hostitele ale sami nijak neovlivňují. K nim řadíme především ophiostomatální houby (Harrington, 1993).

U některých severoamerických agresivních kůrovců je známo, že houba odpovědná za usmrcování stromu je pravděpodobně škodlivá i pro samotného brouka. Proto si samice nosí v mykangiích jiné druhy hub, které tomuto patogenu úspěšně konkurují, když už je lýko mrtvé, a tím umožňují larvám kůrovce nerušený vývoj (Lantschner et al., 2017). Krom toho si kůrovci pěstují houby, jejichž podhoubím se živí nejen larvy, ale i vylíhnutí brouci. Jelikož jsou symbiotické houby přenášené brouky v mykangiích specializované spíše na rozklad mrtvé hmoty, v již mrtvém lýku pak rostou lépe než jim a jejich přenašeči nebezpečný patogen, a tak jsou jejich spory přenášeny často v mnohem větším množství než spory daného patogenu.

2.3.1 Floemofágní kůrovci

Kůrovci jsou xylofágní, s výjimkou rodů *Xyleborus*, *Xyleborinus* a *Trypodendron*, které jsou mycetofágní. Xylém slouží broukům jako potrava pouze v omezené míře (Paine et al., 1997). Floemofágní kůrovci primárně žijí v kambiu a ve floému, avšak existuje několik druhů, kteří mohou svůj vývojový cyklus prodělat ve vnější kůře dřeviny (Six, 2013). Lýko sice obsahuje více živin, než běl, ale přesto má nízkou hodnotu dusíku, který je limitujícím faktorem ve stravě kůrovců a je důležitý k dokončení vývojového cyklu (Ayres et al., 2000).

Velmi významnou úlohu plní symbiotické houby u floemofágních brouků. Pomáhají jim například při detoxikaci terpenů pro překonání obrany hostitelské dřeviny (Ayres, 2000). Hmyz si dřeviny, které se chystá napadnout, nachází čichem pomocí rostlinných monoterpenů. Monoterpeny jsou významné především tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím, zajišťují komunikaci i mezi rostlinami. Monoterpeny emitované stromy na obranu mohou být zároveň ale prekursorů hmyzích agregačních feromonů (např. α -pinen, myrcen). Hmyz si je ve střevě hydroxylací přetransformuje na feromony (Davis et al., 2011). Produkce těchto agregačních feromonů broukem určuje dobu vhodnou k masivnímu napadení hostitelské rostliny a řídí páření kůrovců (Vanderwel, 1994). Někteří kůrovci jsou schopni syntetizovat feromony *de novo*. Tak *Ips pini* či *Ips paraconfusus* přebírají monoterpen-syntázu z hostitele a s její pomocí pak syntetizují své feromony – ipsenol a ipsdienol (Blomquist et al., 2010). Napadené stromy bývají zpravidla již oslabené, a proto produkují méně monoterpenů než zdravé stromy. Avšak při napadení začnou rostliny produkovat více těchto látek, anebo změni jejich složení (Davis et al., 2011).

Zajímavostí je, že napadená rostlina rozlišuje mezi napadením škodlivým hmyzem a mechanickým poškozením. Pokud je tedy napadena škodlivým hmyzem, produkuje specifické komunikační látky (mono-terpeny a seskvi-terpeny), které mají za úkol přilákat predátory a parazitoidy daného hmyzu (Wood, 1982).

Lýkožraví brouci symbiotické houby nekonzumují přímo. Tyto houby jim poskytují část své enzymatické výbavy, kterou používají k degradaci celulózy, stavební součásti rostlinných buněčných stěn. Jedná se o trávicí enzymy celulózy a hemicelulózy (Przybył et al., 2006). Schopnost strávit celulózu je u živočichů velmi vzácná, proto tuto činnost obvykle zprostředkovávají mikroorganismy (Scharf et al., 2011). Steroly, organické látky, které slouží i jako hormony hmyzu, patří mezi další živiny, které brouk může od hub získat (Noda & Kodama, 1996).

2.3.2 Ambrosioví kůrovci

Někteří kůrovci se místo dřevem či lýkem živí myceliem svých symbiotických hub. Takové kůrovce nazýváme výrazem xylomycetofágové nebo také ambrosioví brouci. Ambróziových kůrovců známe asi 3400 druhů. Požerky hloubí většinou do běle stromů, kde je dostatek vlhkosti. Tam také dopraví své houby a vysejí je. Svůj požerok si čistí a větrají. Zatímco larvy původních druhů živících se lýkem si hloubí vlastní chodby, o larvy ambróziových druhů je postaráno. Většinou pouze společně žerou podhoubí a plodnice v chodbách či dutinách, které vydolovali jejich rodiče. Ambróziové houby jsou přenosem a růstem plně závislé na svých pěstitelích, jimž na oplátku poskytují kompletní stravu (Hulcr, 2003). K rozmnožování většiny ambrosiových brouků dochází v běli kmene nebo v silných větvích stromů. Hlavní část dřeva z budovaných chodbiček brouci nepozřou, avšak vytlačují ji ven (Beaver et al., 1989). Ambrosioví brouci nejsou nároční k výběru hostitelské dřeviny. V našich podmínkách patří ke kůrovcům, kteří působí velké ekonomické škody v dřevozpracujícím průmyslu tím, že svými požerky a „pěstováním“ hub znehodnocují dřevní hmotu (Hulcr, 2003).

Původním způsobem života ambrosiových kůrovců je kolonizace vodivých pletiv živých i odumírajících dřevin a využívání živin stromu jako potravy. Tento způsob života se dále vyvíjel a brouci začali využívat čerstvé dřevní cévní svazky jako vhodný substrát pro pěstování svých symbiotických hub. Ambrosioví kůrovci si konzumací hub obohacují svou potravu o esenciální nutrienty, zejména o prvky jako dusík a fosfor a o steroly, které

slouží jako prekurzory steroidních, tedy rozmnožovacích hormonů (Six, 2003). Těsné vzájemně prospěšné soužití mezi ambrosiovými brouky a houbami vzniklo během evolučního vývoje několikrát nezávisle. Během vývoje docházelo k adaptaci houbových společenstev na dřevní prostředí, jako je zvětšování spor, kvasinkovitý růst či obměna enzymatického aparátu (Farrell et al., 2001).

2.4 *Geosmithia*

Rod *Geosmithia* vyčlenil v roce 1979 Pitt pro několik druhů dříve popsaných v rodě *Penicillium*. Odlišujícími znaky od rodu *Penicillium* jsou odlišná barva kolonií a konidií (chybí odstíny šedo-modré a šedo-zelené barvy), povrch konidioforu je drsný a fialidy a konidie jsou válcovité. Taxonomií rodu *Geosmithia* se dále zabýval Ogawa v 90. letech (Ogawa et al., 1997). Ten zjistil, že se jedná o polyfyletický rod patřící do nejméně tří skupin v rámci *Ascomycota*. Druh *Geosmithia putterillii* a typový druh rodu *Geosmithia lavendula* byly zařazeny do řádu *Hypocreales*. Molekulární studie zaměřené na tento řád ukázaly, že *Geosmithia* náleží do čeledi *Bionectriaceae*, konkrétně do rozvětvené větve obsahující rody buď anamorfní nebo s plodnicemi typu kleistothecium (ty mají na rozdíl od většiny zástupců čeledi *Bionectriaceae* plodnice peritheciální). Za sesterský taxon rodu *Geosmithia* byl považován druh *Acremonium alternatum* (Ogawa et al., 1997; Rossman et al. 2001), novější studie s větším počtem zastoupených druhů rodu *Acremonium* však přisuzuje toto postavení druhu *Acremonium sclerotigenum* (Summerbell et al., 2011). Nelze ovšem obecně říci, že sesterským rodem *Geosmithia* je rod *Acremonium*, neboť tento anamorfní rod je polyfyletický a jeho zástupce lze kromě řádu *Hypocreales* nalézt i v řádech *Glomerellales* a *Sordariales* a ve třídě *Leotiomyces* (Summerbell et al., 2011). Ostatní známé druhy pak patří do řádu *Eurotiales* čili do příbuznosti původního rodu *Penicillium*.

Geosmithia dnes zahrnují 37 (z toho 14 již popsaných) termotolerantních až termofilních hubových druhů (Huang et al., 2017). Všechny druhy jsou asociované s podkorním hmyzem, především s kůrovci podčeledi *Scolytinae* nebo se vzácně nacházejí i v půdních substrátech (Kubátová et al., 2004). *G. argillacea*, *G. eburnea*, *G. emersonii*, *G. cylindrospora* a pro další dva

druhy byl vymezen rod *Rasamsonia* (Houbraken et al., 2012). *G. viridis* a *G. swiftii* byly převedeny do rodu *Talaromyces* (Samson et al., 2011). *G. namyslowskii* a *G. malachiteum* patří do rodu *Penicillium* (Houbraken & Samson, 2011). Jednotlivé druhy se vzájemně liší silou vazby na své přenašeče. Nejvolnější vztah nacházíme u tzv. generalistů, kteří jsou přenášeni řadou druhů kůrovců s hostiteli z mnoha rostlinných čeledí. Tyto houby lze najít i ve volné přírodě (např. půda, endofyti atd.) (Kolařík et al., 2017). Endofytní houby přežívají ve zdravých pletivech rostliny a po jejím oslabení či smrti mohou fungovat jako patogeny či saprofyty (Čížková et al., 2005).

Na rozdíl od ophiostomálních hub (viz kapitola 2.5) *Geosmithia* tvoří lepkavé spory. Jejich přenos na podkorním hmyzu je však i přes tento fakt vysoce efektivní. O funkci rodu pro hmyzího přenašeče ani pro hostitelskou rostlinu je toho málo známo. Při porovnání s ekologicky obdobnými ophiostomálními houbami se předpokládá, že svému přenašeči prospívají tvorbou esenciálních látek. Mezi ty patří například různé vitamíny, lipidy (fosfolipidy, glykolipidy, lipoproteiny) a steroly (Six, 2003; Byers, 2004; Kirisits, 2007). Dalším předpokladem je pak pomoc hub při koncentraci živin z pletiv hostitelských rostlin do mycelia, kde je přenašečem snadněji spásáno (Six, 2003). Pro lýkožravé brouky není tato symbióza obligátní, nicméně v některých případech bylo prokázáno, že přítomnost symbiotické houby zvyšuje rozmnožovací úspěšnost brouků (Farrell et al., 2001). Další předpokládaná výhoda *Geosmithia* může spočívat v patogenním působení na hostitelskou rostlinu. To může vést až k jejímu oslabení a usnadňuje tak přenašeči rostlinu kolonizovat (Six, 2013; Byers, 2004). Podobný efekt mohou mít i rychle rostoucí houby, které svým myceliem ucpou pryskyřičné kanálky a ochrání tak brouka před obrannou reakcí rostliny (Farrell et al., 2001).

Znaky ambrosiových hub vykazují v různé míře čtyři nepříbuzné druhy geosmithií, z toho dva druhy jsou zřetelně typické ambrosiové houby (tzn. dominují v požercích svého přenašeče a tvoří velké „krmné“ spory) (Kolařík & Kirkendall, 2010). Ve vztahu k rostlině jsou téměř všechny geosmithie saprotrofové kolonizující již mrtvá pletiva. Výjimkou je *Geosmithia morbida*, která je prokazatelně fytopatogenní a způsobuje chorobu „thousand canker

disease“ amerických ořešáků (Tisserat et al., 2009). Stromy druhu *Juglans nigra*, který je nejnáchylnější k této chorobě, umírají obvykle během tří až čtyř let. Projevem onemocnění je žloutnutí listů a následné odumírání větví končící odumřením celého stromu. Onemocnění je způsobeno agresivním žírem brouka *Pityophthorus juglandis* a vytvářením nekrotických ložisek jím přenášenou houbou *G. morbida*. Nekrózy mohou následně splývat po celém obvodu větve, což vede k jejímu odumření (Kolařík et al., 2011).

Podrobné studium výskytu jednotlivých druhů *Geosmithia* v evropském temperátním a mediteránním pásmu (Kolařík et al. 2011; Kolařík et al. 2008; Kolařík et al., 2007) prokázalo úzkou vazbu druhů na vektor (podkorní hmyz). Podobně jako u jiných hub asociovaných s podkorním hmyzem (Six, 2003; Gebhardt et al., 2004) je míra vektorové specifity *Geosmithia* spp. dána šíří niky vektoru. Druhy hmyzu, které sdílí stejného rostlinného hostitele, přenášejí obdobné spektrum hub. Naopak kůrovci s odlišnou nikou se liší i asociovanými druhy hub. To je způsobeno tím, že asociovaná houba jednoho kůrovce může prorůst až do vedlejšího požerku a je následně broukem přenesena dále. Příkladem mohou být druhy hmyzu vytvářející požerky ve floému rostlin z čeledi *Pinaceae*, které hostí zcela jiné druhy *Geosmithia* než druhy asociované se škůdci listnatých dřevin (Kolařík et al., 2011; Kolařík et al., 2008; Kolařík et al., 2007). Většina druhů *Geosmithia* žije v symbióze s floémofágním hmyzem konifer a listnáčů. Nejméně dvakrát nezávisle na sobě došlo k přechodu k ambrosiovému způsobu života (Kolařík & Kirkendall, 2010). Jedná se o druhy izolované z požerků a fekálních pelet ambrosiových brouků *Microcorthylus* sp., *G. microcorthyli*, a *Eupagiocerus dentipes*, *G. eupagioceri*. Tyto druhy sdílejí morfologické znaky typické pro ambrosiovou houbu, např. tvorba velikých terminálních spor a střídání myceliální a kvasinkovité fáze růstu (Batra, 1967). Dosud nepopsaný druh *G. cnesini* byl nalezen v požercích ambrosiového brouka *Cnesius lecontei*. I když se pravděpodobně jedná o ambrosiovou houbu, přímý doklad o jejím významu pro brouka doložen nebyl. Zajímavým druhem je *G. rufescens*, který doprovází *G. eupagioceri* a *G. cnesini* v požercích a je považována za auxiliární (sekundární) ambrosiovou houbu (Kolařík & Kirkendall, 2010). Tato

houba nese přechodný fenotyp mezi ambrosiovými a floémovými druhy *Geosmithia* ve formě tvorby jak elipsoidních, malých konidií v řetízcích, tak i velikých, „ambrosiových“ konidií. Ambrosiová *G. microcorthyli* je blízkce příbuzná svým sesterským druhům žijícím ve floému rostlin, *G. sp. 8* a *G. sp. CCF4200*. Tyto druhy nejsou odlišitelné ITS rDNA sekvencí, zcela se však liší morfologií, rozšířením i ekologií. Další variabilní geny (TEF1 α , Tub2, IGS rDNA) potvrzují, že jde o dva odlišné, byť velmi příbuzné druhy. Tato náhlá změna v morfologii ambrosiové *G. microcorthyli* byla zřejmě způsobena koevolucí s ambrosiovým broukem. Evoluční procesy, které utvářely její fenotyp, nejsou zatím známy.

Jinou významnou změnou v ekologii rodu *Geosmithia* je přechod od saprotrofního způsobu života k patogennímu. Tento účinek některých druhů byl zjišťován v pracích Čížkové et al. (2005), Jankowiaka a Kolaříka (2010). U druhů izolovaných z brouka *Cryphalus piceae*, který napadá *Abies alba*, nebyla prokázána patogenita (Jankowiak & Kolařík, 2010). Druhy *G. pallida* a *G. langdonii* však inhibovaly růst kořenů rostliny *Lepidium sativum*, *G. langdonii* inhibovala i růst stonku (Čížková et al., 2005). U izolátu IVV7 (*G. pallida*) byla v práci „A Non-Ophiostoma fungus express the gene encoding the Hydrophobin cerato-ulmin“ (Scala et al., 2007) nalezena produkce toxinu cerato-ulminu, který způsobuje symptomy takzvané holandské nemoci jilmů. Toto onemocnění způsobovalo hromadné odumírání jilmů v Evropě a Americe. Symptomy způsobují houby *Ophiostoma ulmi* a *O. novo-ulmi*, u kterých byla také dříve prokázána produkce zmíněného toxinu (Scala et al., 1997). Izolát IVV7 *Geosmithia* je tak doposud jediný houbový druh mimo *O. ulmi* a *novo-ulmi*, který produkuje zmíněný toxin. Autoři Scala et al. (2007) předpokládají, že gen pro cerato-ulmin byl do genomu tohoto izolátu vnesen prostřednictvím horizontálního genového transferu umožněnému mezidruhovými hyfálními anastomosami. Nicméně směr tohoto přenosu zůstává nejistý. V provedených inokulačních testech na *Ulmus glabra* však izolát IVV7 nebyl schopen vyvolat symptomy onemocnění (Scala et al., 2007).

V mé diplomové práci je rod *Geosmithia* jeden ze dvou hlavních druhů hub asociovaných s kůrovci na jasanech. Jde jak o generalisty, tak o specialisty na rod *Fraxinus*.

2.5 Ophiostomatální houby

Druhá nejčastější skupina hub spojená s kůrovci živícími se floémem jsou ophiostomatální houby. Houby z tohoto rodu byly poprvé popsány roku 1919 mykology Hansem a Paulem Sydowovými (otec a syn), a přísluší do čeledi *Ophiostomataceae*. Tyto houby se vyznačují hyalinním nebo barevným myceliem, askokarpy tvořícími se jednotlivě nebo ve skupinách na povrchu substrátu, živného média nebo ponořené v těchto substrátech, které jsou ostiolární nebo méně často neostiolární (Upadhyay, 1993; Wingfield et al., 1993). Báze je kulovitá nebo lahvicovitá hyalinní až tmavě zbarvená s nebo bez ostiolárních hyf. Vřečka se tvoří nepravidelně, jsou osmisporová, s rychle se rozplývající stěnou. Parafýzy zde chybějí. Askospory jsou hyalinní, jednobuněčné s nebo bez gelovitého obalu. Anamorfní stádia jsou mononematózní nebo synnematózní a mají hyalinní nebo pigmentované konidiofory. Konidie jsou hyalinní, jednobuněčné nebo s přehrádkou (Upadhyay, 1981).

Tyto houby v současné době řadíme do dvou řádů vřečkovýtrosých hub (*Ascomycota*). Jde o řády *Ophiostomatales* a *Microascales*. Do řádu *Ophiostomatales* náleží rody *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis*, *Graphilbum*, *Raffaelea*, *Hawksworthiomyces*, *Aureovirgo* (Seifert et al., 2013). Z řádu *Microascales* jsou to rody *Ceratocystis* a *Sphaeronaemella*. Rozdělení do uvedených rodů je na základě biochemických znaků a morfologických znaků (typ anamorfního stadia a tvar askospor), které podpořilo a upřesnilo poznání genomu (zejména ITS a LSU oblastí ribozomální DNA) těchto hub. K ophiostomatálním houbám patří i nepohlavní stadia (*Leptographium*, *Sporothrix*, *Hyalorhinocladiella* a *Pesotum*). Houby řazené do řádu *Microascales* mají anamorfní stadia v rodech *Thielaviopsis* (*Ceratocystis*), *Knoxdaviesia* (*Gondwanomyces*) a *Gabarnaudia* (*Sphaeronaemella*) (McNew et al., 2015). Mezi ophiostomatální houby je také řazen nepohlavní rod

Graphium, u něhož není známo pohlavní stadium a který je podle poznatků molekulární genetiky příbuzný druhům řádu *Hypocreales* (Okada et al., 1998).

V Evropě napadají různé druhy stromů, nejčastěji jsou asociovány s koniferami (rody *Pinus*, *Picea*, *Larix*) (Kirisits, 2007). Houby rodu *Ophiostoma* se do stromů dostávají při napadení brouky a vzhledem ke své fytopatogenicitě pak v živých tkáních rostlinného hostitele soutěží s dalšími organismy o potravu a přežití (Six & Wingfield, 2010). Také byl tento rod izolován z druhu *Pityogenes* na borovici lesní. Dvě studie pak uvádí volné sdružení *Pityogenes quadridens* s *Leptographium lundbergii*, *Ophiostoma canum* a *Ophiostoma piceae* (Mathiesen, 1950; Mathiesen – Käärik, 1953). Podobně volné přidružení ophiostomatálních hub bylo také objeveno u mladých borovic lesních napadených *P. bidentatus* (Jankowiak & Rossa, 2008). Nedávno Linnakoski et al. (2010) našli druhy *O. brunneo-ciliatum*, *O. canum*, *O. canum-like*, *O. floccosum* a *O. minus*. Také popsali nový druh *O. fuscum*, *O. saponiodorum* a *O. tapionis* asociované s *Pityogenes chalcographus* ve Finsku. Tyto druhy byly izolovány ze vzorků odebraných na borovici lesní a smrku ztepilém.

V České republice je zatím potvrzen výskyt přibližně 24 druhů ophiostomatálních hub (Novotný, 2007), které lze dělit na dvě skupiny. Jednak jsou to druhy vyskytující se v asociaci s kůrovci a jednak jsou to druhy, které nacházíme ve floému a xylému kmenů, větví a kořenů různých druhů dřevin. Druhé zmíněné se do hostitelského organismu dostávají skrze rány způsobené jak animálním působením, tak mechanickým poškozením například při těžbě. Do ran je inokulum ophiostomatálních hub přineseno větrem či zaneseno běžnými druhy hmyzu, které láká čerstvě poraněné dřevo. Do této skupiny řadíme druhy jako *O. minus* či *O. piliferum*.

Některé druhy žijící v symbióze s kůrovci mohou a prokazatelně způsobují onemocnění dřevin. Prvním pozorovatelem zástupců těchto hub na území České republiky byl Corda (1837), který popsal rod *Graphium*. Ophiostomatální houby žijící ve spojitost s kůrovci na území České republiky detailně studovala Kotýnková – Sychrová (1966). Ophiostomatální houby byly v ČR nalezeny u těchto druhů kůrovců *Hylesinus crenatus*, *Hylurgops palliatus*,

Ips amitinus, *Myelophilus piniperda*, *I. typographus*, *I. cembrae*, *Pityogenes chalcographus*, *Scolytus multistriatus*, *S. scolytus*, *S. intricatus*, *Tomicus minor*, *T. piniperda* a *Xyloterus lineatus* (Novotný and Jankovský, 2005). Jednoznačně nejstudovanějším druhem v tomto směru je dnes „palčivý“ *Ips typographus*. S tímto druhem je spojena houba *Endoconidiophora polonica* (Gershenzon et al., 2016).

Asi nejrozšířenější chorobou způsobovanou ophiostomatálními houbami v ČR je grafióza jilmů (holandská nemoc jilmů). Tato nemoc je způsobená houbou *Ophiostoma ulmi* či dnes již *Ophiostoma novo-ulmi*. Houba zamezuje protékání mízy cévami, což způsobuje postupné odumírání nejdříve větví, později celého stromu. Strom jako by uschnul nastojato, pak z něho opadala i veškerá kůra. Obranou reakcí stromu je tvorba thyl v trachejích, jimiž se jilm brání postupu houbového mycelia. To ale zároveň brání pronikání vody do výše položených částí dřeviny, což výsledně vede k jejímu prosychání až odumření. *O. ulmi* a *O. novo-ulmi* jsou přenášeny kůrovci *Scolytus scolytus*, *Scolytus multistriatus* a *Scolytus ratzeburgi* (Aas et al., 2018). V rámci druhu *O. novo-ulmi* jsou dnes známy dva poddruhy *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* a *O. novo-ulmi ssp. Americana*. (Brasier, 2001). Během studia mykobioty dubů byly pozorovány dva druhy ophiostomatálních hub. Druh *Ophiostoma stenoceras* byl izolován z endofytické mykobioty kořenů dubů a mladých dubových semenáčků (*Quercus petraea*). Druh *Ophiostoma grandicarpum* byl nalezen na kmeni dubu letního (*Q. robur*) (Jankowiak et al., 2019).

Dalšími známými druhy ophiostomatálních hub jsou *Ophiostoma quercus* a *O. piceae*, což jsou si navzájem podobné druhy, které mají současně anamorfní stadia z rodů *Pesotum* a *Sporothrix*. Oba druhy jsou pozorovány jak na dřevě a kůře kmenů a větví, tak někdy i na kůrovcích a v jejich chodbičkách. *O. quercus* žije převážně na listnácích, *O. piceae* převážně na jehličnanech. (Taerum et al., 2018). *Graphium fimbriisporum* žije na jehličnanech v chodbičkách různých druhů kůrovců. Nepohlavním stadiem je *Hyalorhinocladiella* (Novotný, 2004).

Četné studie evropského mediteránu potvrdily, že *Ophiostoma* spp. se svým obligátním sdružením, afinitou na konkrétní vektor (Kolařík et al., 2008), patogenitou (Kolařík et al., 2011) a vývojovým cyklem podobají *Geosmithia* spp. (Kolařík et al., 2010). Míra vektorové specifity je zde také dána šíří niky příslušného vektoru. Příkladem jsou floemofágní kůrovci na čeledi *Pinaceae*, kteří pokud preferují jeden druh, pak sdílejí i obdobné ophiostomatální houby. Typickými zástupci tohoto spojení jsou *Tomicus piniperda* a *Tominus minor* na borovicích (Jankowiak et al., 2006). Naopak kůrovci s odlišnou nikou se liší i asociovanými druhy hub. Zde se dají jako příklady uvést další přenašeči ophiostomatálních hub *Ips cembrae* (*Larix* spp. a *Picea* spp.), a *Ips typographus* (*Picea* spp. eventuelně *Pinus* spp. a *Larix* spp.), *Hylurgops palliatus* (*Picea abies*), *Monochamus galloprovincialis* (*Pinus sylvestris*) (Jankowiak et al., 2007; Kolařík et al., 2013).

2.6 Další nalezené houby

Požerky všech kůrovců, tedy i těch floemofágních, představují malý ekosystém, který v omezené prostoru osidluje široká škála taxonomicky odlišných hub. Ty hrají ve vzájemných interakcích v těchto ekosystémech různé role, ale na rozdíl od poznání jejich diverzity, taxonomie, hostitelského spektra a biogeografie jsou informace o mnoha druzích hub nedostatečné (Kirschner, 2001).

Houby rodu *Ophiostoma* a *Geosmithia* tak nejsou jedinými symbionty, které se asociují s floemofágními kůrovci. Nacházíme zde druhy parazitických, mykoparazitických, fytopatogenních, saprofytických či půdních hub (Kirschner, 2001).

Například houby rodu *Penicillium* spp. nevytváří spory v požercích brouků, ale často jsou izolovány z povrchu jejich těl. Ke kontaminaci tímto rodem tak zřejmě dochází při přezimování hmyzu v půdě (Kirschner, 2001).

Rod *Aspergillus* je jednou z nejrozšířenějších skupin saprofytických hub s více než 150 druhy, přestože původně byl považován za slabý patogen (Calvo et al., 1999).

Rod *Fusarium*, jehož zástupci jsou součástí půdního ekosystému, zde se podílí na rozkladu organické hmoty. Většina druhů jsou tudíž jen neškodní saprofyty. Ovšem řada druhů se během evoluce přizpůsobila k parazitismu rostlin, část za určitých podmínek může být patogenní i pro živočichy, včetně člověka (Zhang et al., 2006).

Zajímavými houbovými mikroorganismy jsou kvasinky. Přestože se jedná v poslední době o velmi diskutované téma, neexistují dosud vědecké studie, které by funkci těchto symbiontů jednoznačně vysvětlily. Kvasinky lze najít ve všech stádiích vývoje kůrovců, včetně vajíček a kukel (Adams et al., 2008). Je pravděpodobné, že mají pro svého symbionta nutriční význam, což by znamenalo, že slouží broukům jako potrava (Ayres et al., 2000; Bleiker and Six, 2007).

2.7. Bakterie

Jak už bylo výše několikrát zmíněno, kůrovci jsou spojeni s mnoha mikroorganismy, které formují celou entitu nazývanou „holobiont“ (Six, 2013). Nejvíce zkoumané jsou vztahy brouků a symbiotických hub. Nicméně nedávné studie poukázaly na to, že i bakterie mohou hrát důležitou roli v poskytování některých živin, podpoře růstu prospěšných hub, detoxikaci prostředí od fenolových sloučenin, které produkují hostitelské stromy či inhibují růst antagonistických hub (García-Fraile, 2018). Za určitých podmínek však mohou bakteriální symbionty kůrovce zabíjet.

Bakteriální společenství jsou asociovaná jak s dospělými brouky, tak s larvami. Dominantními zástupci jsou rody *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Stenothrophomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Janibacter*, *Leifsonia*, *Cellulomonas*, and *Cellulosimicrobium*. Členové posledních čtyř vykazují schopnost hydrolýzy celulózy *in vitro* a mohou tak být zapojeni do jejího štěpení v broučích střevech (Morales-Jiménez et al., 2009).

Zatím bylo izolováno a zařazeno jen několik málo rodů bakterií, které broukům skutečně nějak pomáhají. Například zástupci těch, jež odbourávají sloučeniny monoterpenů a fenolu patří k rodům *Pseudomonas*, *Serratia* a *Rahnella* (Boone et al., 2013; Xu et al., 2016). U rodu *Pseudomonas* pak kupříkladu při stimulaci sloučeninou terpenů (α -pinene) dochází i k podpoře růstu symbiotických hub rodu *Grosmannia* (Adams et al., 2009). Další zmíněná role, tedy produkce bioaktivních sloučenin, byla přiznána rodu *Streptomyces* (Hulcr et al., 2011). Jiní bakteriální symbionti mohou svým hostitelům pomoci se syntézou dusíkatých bází (*Enterobacter*, *Pantoea*) či s hydrolýzou tkání polymerů na jednoduché cukry (Morales-Jiménez et al., 2009).

3. Metodika

3.1 Sběr dat

Pro studium symbiotických mikroorganismů a jejich frekvencí je využito zejména tradičních kultivačních metod. Identifikace různých morfotypů hub a bakterií je provedena pomocí DNA barcodingu.

Sběr materiálu obsahoval části tenkých větví ze slunného stanoviště s kůrovcem *H. fraxini* a tlustou kůru jasanu, kde se nacházel *H. crenatus*. Pracovala jsem s materiálem sbíraným ve Vísce nedaleko Litovle, a to 10.6.2014 a 12.7.2014. CHKO Litovelské Pomoraví je v rámci České republiky posledním zbývajícím územím plošně rozsáhlého lužního lesa s doposud nenarušenou přirozenou inundační dynamikou říčního toku (Machar, 1998). Tak jako ostatní mokřady, je i tato oblast chráněna Ramsarskou úmluvou, plným názvem „Úmluva o mokřadech majících mezinárodní význam především jako biotopy vodního ptactva“ (anglicky The Ramsar Convention on Wetlands). Biologický materiál byl přímo v terénu zamrazen a až do upotřebení skladován při -18 °C.

Vzorky z prvního sběru z června obou zkoumaných druhů pocházejí z larev a kulek. Druhý sběr z července 2014 zahrnoval u *H. crenatus* brouky nalétávající do hostitelské dřeviny za účelem páření, zatímco u *H. fraxini* to byli brouci těsně před vylíhnutím. Studované izoláty jsou součástí dlouhodobého výzkumu RNDr. Barbory Křížkové, týkající se kůrovců na jasanech. Všechny izoláty byly předběžně zařazeny do operačně taxonomických jednotek na základě morfologických znaků a barkodových sekvencí ITS (houby) a 16S (bakterie).

Celkově jsem využila 80 vzorků pro *H. crenatus* ve dvou ředěních, 80 vzorků *H. fraxini* ve dvou ředěních, 80 vzorků pro drtinky od *H. crenatus* ve dvou ředěních a 80 vzorků pro drtinky od *H. fraxini* ve dvou ředěních. 20 vzorků zahrnovala kontrola k *H. crenatus* (nenapadené lýko kmene) a 20 vzorků kontrola pro *H. fraxini* (nenapadené lýko tenkých větví).

3.2 Popis laboratorní činnosti

Pracovní činnost na této diplomové práci byla prováděna jak v laboratořích Akademie věd České republiky, konkrétně v jejím Mikrobiologickém ústavu, tak v laboratoři fakulty Lesnické a dřevařské České zemědělské university.

Kultivace hub se provádí v laboratorním prostředí *in vitro*. Vzorky jsou naočkovány na umělou půdu (médiu) do Petriho misek o průměru 85 mm s volně přiléhajícím víčkem. Vybrané médium, 2 % agar se sladinovým extraktem (MEA), nahrazuje jejich původní životní prostředí.

Složení média MEA 2 % agar:

- 1 l sterilizované destilované vody (dH₂O)
- 20 g sladinový extrakt (malt extrakt)
- 20 g glukóza
- 1 g pepton
- 20 g agar

Kultivace na agarovém médiu proběhla ve dvou ředěních. Z předchozích pokusů jsme usoudili, že optimální ředění je 10x a 100x pro larvy i drtinky *H. fraxini*. Pro kukly a drtinky *H. crenatus* bylo použito ředění 100x a 1000x, zatímco pro jeho larvy pouze 10x a 100x. Více ředění jsme zvolili proto, že tak mohou vyrůst i méně konkurenčně schopné kolonie mikroorganismů, které vyžadují stabilní životní podmínky. V nižších ředěních by neměly šanci proti agresivněji rostoucím plísním.

Průběh kultivace:

- 1) Ve sterilním laminárním boxu značky VEB Elektromat Dresden nožem opatrně odkrojit vrstvy borky, až do objevení dospělce nebo larvy. Vydezinfikovanou pinzetou vyjmout a vložit do připravené zkumavky. Ke každému vzorku vložit do další zkumavky drtinky z místa nálezů.
- 2) Provést homogenizaci vzorků v 1 ml sterilizované destilované vody (dH₂O).

- 3) Ředění vzorků 10x, 100x, 1000x pomocí dH₂O do finálního objemu 1000 µl.
- 10x ... 100µl homogenátu + 900µl dH₂O
 - 100x ... 10µl homogenátu + 990µl dH₂O
 - 1000x ... 1µl homogenátu + 999µl dH₂O
- 4) Pomocí sterilizované skleněné laboratorní hokejky provést výsev 100µl vzorku na Petriho misky s MEA.
- 5) V místnosti při stabilní teplotě 24 °C kultivovat Petriho misky s výsevem vzorků 7 až 11 dní.
- 6) Po kultivační době spočítat a zapsat morfotypy mikroorganismů z Petriho misek ve všech ředěních.
- 7) Spočítat četnost kolonií každého morfotypu a zaznamenat, v jakém byly vzorku a ředění.
- 8) Každý morfotyp houby očkovat na malou Petriho misku (průměr 55 mm) s médiem 2 % MEA, utěsnit parafilmem, aby se zabránilo kontaminaci sporami z vnějšího okolí, a kultivovat dalších několik dní podle úspěšnosti růstu morfotypu.
- 9) Bakteriální morfotypy očkovat na médium YES na Petriho misku o průměru 55 mm, utěsnit parafilmem, aby se zabránilo kontaminaci sporami z vnějšího okolí, a kultivovat dalších několik dní podle úspěšnosti růstu morfotypu.

Složení média YES:

- 5 g kvasinkového extraktu
- 30g glukózy
- 15 g agaru
- 1000 ml dH₂O

- 10) Z malých Petriho misek odebrat vzorek a zamrazit ve 3 zkumavkách pro další použití (sbírky) a pro izolaci DNA.

Kultivace kontroly probíhala tak, že ze zdravého lýtka byla vyříznuta štěpina, 3 minuty omývána v přípravku Savo, následně 30 vteřin ponořena do 96 % ethanolu kvůli povrchové sterilizaci, následně opláchnuta v dH₂O a položena na médium 2% MEA. Jeden vzorek zahrnoval 5 takovýchto štěpin. Po 10 a 30 dnech v 24 °C byly určeny morfotypy a zjištěny jejich frekvence, jelikož endofytické houby mohou růst déle.

3.2.1 Amplifikace DNA

Složení reakčních směsí pro PCR je uvedeno v tabulce 4 a 5. Pro amplifikace, které jsem prováděla v rámci této práce, jsem používala polymerázu MyTaq DNA. Jde o hojně využívanou polymerázu, která je vysoce termostabilní, má dobrou afinitu k DNA, a proto poskytuje velký výnos amplifikace i při malém množství DNA templátu. Pro zajištění odpovídajícího chemického prostředí pro polymerázu byl využit draselný purf (K⁺) z KCl. Také jsem využila BSA (Bovine Serum Albumin) pro zvýšení výnosu, který rovněž zabraňuje přilnutí enzymů ke zkumavce. V tabulce 1 a 2 jsou uvedeny standardní cykly teplot pro PCR jak pro bakterie, tak pro houby, zatímco v tabulce 3 a 4 je složení reakčních směsí použitých k PCR.

Tabulka č. 1: Standardní cyklus teplot při amplifikaci ITS

Počáteční denaturace	95°C	3:00 min	
Denaturace	55°C	0:30 min	
	72°C	1:00 min	
Nasedání	95°C	0:30 min	34 x cyklus
	55°C	0:30 min	
Extenze	72°C	1:00 min	
Závěrečná extenze	72°C	10:00 min	

Tabulka č. 2: Standartní cyklus teplot při amplifikaci 16S

Počáteční denaturace	95°C	1:00 min	
Denaturace	94°C	1:00 min	35 × cyklus
Nasedání	52°C	1:30 min	
Extenze	72°C	2:00 min	
Závěrečná extenze	72°C	7:00 min	

Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro amplifikaci ITS (objemy jsou uvedeny v µl na 25 µl reakční směsi).

ddH ₂ O	14,75
Pufř	5
ITS4	1
ITS1F Kyo2	1
Polymeráza MyTaq	0,25
BSA	1
Vzorek DNA	2

Tabulka č. 4: Složení reakční směsi pro amplifikaci 16S (objemy jsou uvedeny v µl na 25 µl reakční směsi).

ddH ₂ O	14,75
Pufř	5
1492r	1
27f	1
Polymeráza MyTaq	0,25
BSA	1
Vzorek DNA	2

Úspěšnost amplifikace jsem následně ověřovala elektroforézou na agarózovém gelu (1,1 g agarózy, 55 ml pufru 1x TBE a 1,6 µl interkalárního barviva GelRED), do kterého jsem nanášela 2 µl amplifikovaného vzorku smíchaného s nanášecím pufrům. Následně jsem amplifikované fragmenty vizualizovala v UV světle. Vybrané vzorky byly následně purifikovány metodou precipitace DNA ledovým ethanolem.

- 1) K cca 20 μ l PCR produktu přidáme 2 μ l 3M NaOAc (acetát sodný) a 50 μ l ledového 96 % EtOH (ethanol).
- 2) Promícháme, necháme 10–15 minut stát při pokojové teplotě.
- 3) Centrifuga se nastaví na maximum (3700 rpm pro destičky) a po dobu 30 minut se točí při teplotě 4° C.
- 4) Vylít opatrně tekutinu, aby peleta zůstala na zkumavce.
- 5) Do destičky se přidáme 200 μ l ledového 70 % EtOH, zalepíme, promícháme, stočíme na 3700 rpm po dobu 15 minut při 4° C.
- 6) Opakovat bod 4 (vylít, vytočit). Nechat vysušit od zbytků ethanolu.
- 7) Rozpustit peletu v 5 μ l ddH₂O.

Následnou sekvenaci prováděla firma Macrogen (Korea/Holandsko). Sekvenační primery byly totožné s primery použitými k amplifikaci.

Tabulka č. 5: Primery využité v této práci

Primer forward	Sekvence primeru 5'–3'
ITS1-F_KYO2	TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA
27f	AGAATTTGATCTTGGTTCAG
Primer revers	Sekvence primeru 5'–3'
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
1492r	TACCTG TTACGACTT
Sekvenační primer pro bakterie	Sekvence primeru 5'–3'
800r	TACCAGGGTATCTAATCC

3.2.2 Zpracování sekvencí

Kvalitu sekvencí jsem kontrolovala vizuálně na základě chromatogramů, které vysekvenovala firma Macrogen. Editaci těchto sekvencí jsem následně prováděla v programu BioEdit (Hall, 1999). Alignment sekvencí jsem prováděla rovněž v programu BioEdit, pomocí aplikace ClustalW (Thompson et al., 1994) či pomocí internetové aplikace MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (Chojnacki et al., 2017).

Poté, co byly sekvence editovány a vhodně spojeny pomocí výše zmíněných programů, byly konfrontovány s databází BLAST (Altschul et al., 1990), která je vhodná pro sekvence ITS a EZBioCloud (Yoon et al., 2017) pro sekvence bakteriální 16S rDNA. Obě databáze vyhodnocují podobnost sekvencí na základě již prokázaných sekvencí, které jsou v nich uloženy. Výstupem z databází je vždy seznam možných druhů seřazených podle procentuální shody s porovnávaným vzorkem. Z tohoto seznamu byl zvolen taxon s nejvyšší procentuální shodou k vytvoření a zařazení do ekologických skupin.

3.3 Statistické analýzy

V závěru byla na upravená data houbových a bakteriálních rodů využita analýza PCA, tedy analýza hlavních komponent (*Principal Component Analysis*) v programu PAST 3.23 (Hammer et al., 2001), pro lepší pochopení početnosti houbových/bakteriálních druhů v závislosti na obou kůrovcích a jejich instarech.

V PCA analýze byly zobrazeny všechny zahrnuté rody. Kde bylo možné určit až do druhů bylo využito těchto. Z této analýzy byly vyňaty vzorky s neurčenou taxonomií. Ve stejném programu pak byly zjištěny i indexy diversity. Já využila Shannonův index a Simpsonův index.

Shannonův index vyjadřuje nejistotu, se kterou jsme schopni předpovědět jakého druhu bude náhodně vybraný jedinec ze vzorku; nejistota klesá s klesajícím počtem druhů a s klesající vyrovnaností (pro společenstvo s málo dominantními druhy).

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \cdot \ln P_i$$

Simpsonův index vyjadřuje pravděpodobnost, že dva náhodně vybraní jedinci budou patřit ke stejnému druhu. Se zvyšující se diverzitou hodnota indexu klesá, což zdůrazňuje dominanci druhu (při počtu druhů > 10 záleží jeho velikost prakticky už jen na dominanci druhů).

$$Simpson(dom) = \sum_{i=1}^S P_i^2$$

4. Výsledky

U obou druhů kůrovců byly identifikovány jednotlivé morfotypy hub a bakterií pomocí molekulárních metod a morfologie. Jejich frekvence byly zjištěny klasickým kultivačním přístupem. Zjištěné výsledky uvádím v tabulkách 6–11. PCA analýza byla provedena pouze na houbových izolátech, protože bakteriální data obsahovala velké množství singletonů, neměly tedy normální rozložení. Pro houby i bakterie bylo využito indexů diversity. Ty jsou uvedeny a dále komentovány v kapitole 4.4.

4.1 Izoláty z *Hylesinus fraxini*

U druhu *H. fraxini* byly identifikovány pomocí molekulárních metod houby a bakterie uvedené v následující tabulce. Houby rodu *Geosmithia* byly zjištěny ve frekvenci 22,2 % ze všech izolovaných CFU (colony-forming unit).

Tabulka č. 6: Přehled hub izolovaných z *Hylesinus fraxini*

Druh	Původ	Nejpodobnější sekvence (ID)	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Alternaria sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	NR_137143.1	523/523 (100%)	0,01
<i>Angustimassarina quercicola</i>	1. sběr (larvy)	KP899133.1	481/481 (100%)	0,02
<i>Aspergillus spp.</i>	1. sběr (larvy)			0,09
<i>Botrytis cinerea</i>	1. sběr (larvy)	KF859918.1	490/490 (100%)	0,01
<i>Bullera alba</i>	1. sběr (larvy)	KY101819.1	484/485 (99%)	0,45

<i>Candida sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	KU557486.1	274/305 (90%)	0,64
<i>Candida sp. 2</i>	1. sběr (larvy)	NR_151810.1	336/397 (85%)	1,83
<i>Cladosporium spp.</i>	1. sběr (larvy)			0,11
<i>Crustomyces subabruptus</i>	1. sběr (larvy)	MF183944.1	527/527 (100%)	0,01
<i>Cystobasidium pinicola</i>	1. sběr (larvy)	KY103147.1	511/511 (100%)	1,27
<i>Didymella pinodella</i>	1. sběr (larvy)	KU516553.1	493/494 (99%)	0,04
<i>Dissoconium aciculare</i>	1. sběr (larvy)	AY725520.1	477/477 (100%)	0,65
<i>Entyloma microsporium</i>	1. sběr (larvy)	AY081045.2	553/588 (94%)	0,05
<i>Exophiala sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	KP347955.1	437/452 (97%)	0,32
<i>Fusariella sinensis</i>	1. sběr (larvy)	KP269058.1	485/512 (95%)	0,13
<i>Fusarium larvarum</i>	1. sběr (larvy)	FN868469.1	514/516 (99%)	0,01
<i>Geosmithia spp.</i>	1. sběr (larvy)			22,21
<i>Kazachstania servazzii</i>	1. sběr (larvy)	KY103667.1	667/667 (100%)	0,69
<i>Penicillium spp.</i>	1. sběr (larvy)			0,14
<i>Peniophora sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	KT692548.1	567/571 (99%)	0,01
<i>Phaeosphaeria nigrans</i>	1. sběr (larvy)	KF251184.1	516/516 (100%)	0,01
<i>Piskurozyma capsuligena</i>	1. sběr (larvy)	KY104658.1	534/557 (99%)	0,05
<i>Pucciniomycotina sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	KY103615.1	353/415 (85%)	6,21
<i>Quambalaria cyanesces</i>	1. sběr (larvy)	NR_111202.1	534/534 (100%)	0,01
<i>Rhodotorula babjevae</i>	1. sběr (larvy)	KY104722.1	555/556 (99%)	0,01
<i>Schizopora radula</i>	1. sběr (larvy)	KJ183190.1	330/379 (87%)	0,03
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1. sběr (larvy)	HG008766.1	553/553 (100%)	0,92
<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	1. sběr (larvy)	AF294696.1	600/602 (99%)	0,01
<i>Trametes gibbosa</i>	1. sběr (larvy)	MF098690.1	533/535 (99%)	0,16
<i>Valsa cypri</i>	1. sběr (larvy)	KT004557.1	543/546 (99%)	0,02

Ostatní houby 1	1. sběr (larvy)			4,61
Ostatní kvasinky 1	1. sběr (larvy)			59,27
<i>Alternaria sp.1</i>	2. sběr (dospělci)	KU377272.1	523/523 (100%)	0,01
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2. sběr (dospělci)	KT898763.1	528/533 (99%)	0,31
<i>Botrytis cinerea</i>	2. sběr (dospělci)	KF859918.1	490/490 (100%)	0,01
<i>Candida sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	NR_151810.1	336/397 (85%)	27,26
<i>Cladosporidium sp.3</i>	2. sběr (dospělci)	KX387686.1	160/161 (99%)	0,03
<i>Coniochaeta sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	KF367558.1	509/524 (97%)	2,43
<i>Exophiala sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	KP347955.1	437/452 (97%)	0,01
<i>Filobasidium wieringae</i>	2. sběr (dospělci)	KY103450.1	534/534 (100%)	22,34
<i>Fusarium lateritium</i>	2. sběr (dospělci)	GU062232.1	513/513 (100%)	0,18
<i>Geosmithia flava</i>	2. sběr (dospělci)	KJ513214.1	515/516 (99%)	2,47
<i>Geosmithia putterillii</i>	2. sběr (dospělci)	KF808307.1	542/542 (100%)	0,02
<i>Mycocalicium victoriae</i>	2. sběr (dospělci)	AJ312123.1	481/484 (99%)	13,11
<i>Nakazawaea anatomiae</i>	2. sběr (dospělci)	KY104354.1	574/575 (99%)	3,47
<i>Nectria aurigera</i>	2. sběr (dospělci)	HM484551.1	473/475 (99%)	14,34
<i>Penicillium spp.</i>	2. sběr (dospělci)			1,26
<i>Piskurozyma capsuligena</i>	2. sběr (dospělci)	KY104658.1	554/557 (99%)	1,65
<i>Pleosporales sp.1</i>	2. sběr (dospělci)	KF293990.1	285/294 (97%)	0,00
<i>Pucciniomycotina sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	KY103615.1	353/415 (85%)	5,04
Ostatní houby 2	2. sběr (dospělci)			1,39
Ostatní kvasinky 2	2. sběr (dospělci)			4,68

Tabulka č. 7: Přehled bakterií izolovaných z *Hylesinus fraxini*

Druh	Původ	Nejpodobnější sekvence (ID)	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Bacillus sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	AYTO01000043	738/745 (99%)	0,01
<i>Curtobacterium sp.</i>	1. sběr (larvy)	AJ310413	1416/1427 (99%)	0,68
<i>Enterobacterales</i>	1. sběr (larvy)	BCTN01000053	1366/1413 (97%)	0,01
<i>Methylobacterium sp.</i>	1. sběr (larvy)	CP001001	676/692 (98%)	0,01
<i>Propionibacteriaceae</i>	1. sběr (larvy)	AWZZ01000008	1272/1401 (91%)	0,001
<i>Pseudomonas sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	BAMA01000316	1388/1388 (100%)	0,59
<i>Pseudomonas sp. 2</i>	1. sběr (larvy)	EU557337	1386/1434 (97%)	0,001
<i>Rhodanobacteriaceae</i>	1. sběr (larvy)	CP017480	709/737 (96%)	0,01
<i>Sphingomonas sp.</i>	1. sběr (larvy)	JH584237	1363/1385 (98%)	0,07
<i>Xanthomonadales sp.</i>	1. sběr (larvy)	AM418384	656/715 (92%)	0,001
Ostatní bakterie 1	1. sběr (larvy)			98,63
<i>Bacillus sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	EF114313	740/740 (100%)	2,87
<i>Bacillus sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	AYTO01000043	727/745 (98%)	0,58
<i>Burkholderiaceae</i>	2. sběr (dospělci)	BAYC01000104	695/732 (95%)	0,00
<i>Geodermatophilaceae</i>	2. sběr (dospělci)	DQ200983	673/688 (98%)	9,08
<i>Gluconobacter sp.</i>	2. sběr (dospělci)	BEWM01000030	1385/1388 (99%)	0,96
<i>Leifsonia sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	EU912483	1303/1341 (97%)	0,90
Ostatní bakterie 2	2. sběr (dospělci)			46,43
<i>Nitrobacteraceae</i>	2. sběr (dospělci)	FR753034	666/692 (96%)	0,88
<i>Pseudomonas sp. 3</i>	2. sběr (dospělci)	JYHE01000183	1411/1422 (99%)	38,29

4.2 Izoláty z *Hylesinus crenatus*

U druhu *H. crenatus* byly také identifikovány houby a bakterie pomocí molekulárních metod. Všechny druhy jsou uvedeny v tabulce č. Rod *Ophiostoma* byl zjištěn v 33, 55 % všech CFU (colony-forming unit).

Tabulka č. 8: Přehled hub izolovaných z *Hylesinus crenatus*

Druh	Původ	Nejpodobnější sekvence (ID)	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Alternaria sp.1</i>	1. sběr (larvy)	NR_137143.1	523/523 (100%)	0,05
<i>Antrodia sinuosa</i>	1. sběr (larvy)	KC491849.1	597/599 (99%)	0,01
<i>Ascomycete sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	AM084820.1	499/499 (100%)	0,004
<i>Aspergillus spp.</i>	1. sběr (larvy)			0,04
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	1. sběr (larvy)	NR_111598.1	501/501 (100%)	1,25
<i>Botrytis cinerea</i>	1. sběr (larvy)	KF859918.1	490/490 (100%)	0,25
<i>Cadophora malorum</i>	1. sběr (larvy)	GU067760.1	533/533 (100%)	0,38
<i>Cladosporium sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	MH863875.1	502/502 (100%)	0,10
<i>Cladosporium sp.2</i>	1. sběr (larvy)	MK562063.1	501/501 (100%)	0,01
<i>Coniochaeta decumbens</i>	1. sběr (larvy)	NR_144912.1	464/465 (99%)	0,004
<i>Cucurbitaria berberidis</i>	1. sběr (larvy)	JF740191.1	422/448 (94%)	0,03
<i>Epicoccum nigrum</i>	1. sběr (larvy)	AJ279448.1	497/498 (99%)	0,02
<i>Fusarium solani</i>	1. sběr (larvy)	KX014704.1	515/516 (99%)	1,23
<i>Ogataea deakii</i>	1. sběr (larvy)	NR_156550.1	694/697 (99%)	9,03
<i>Ogataea sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	KY104443.1	661/682 (97%)	49,11
<i>Ogataea sp. 2</i>	1. sběr (larvy)	KC252610.1	616/616 (100%)	0,08
<i>Ophiostoma hylesinum</i>	1. sběr (larvy)	MH055636.1	580/580 (100%)	37,55
<i>Penicillium spp.</i>	1. sběr (larvy)			0,55
<i>Peniophora sp.1</i>	1. sběr (larvy)	KT692548.1	567/571 (99%)	0,01
Ostatní houby 1	1. sběr (larvy)		-	0,19
Ostatní kvasinky 1	1. sběr (larvy)			0,12

<i>Amorosiaceae sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	JX981477.1	493/497 (99%)	0,08
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	2. sběr (dospělci)	NR_111598.1	501/501 (100%)	51,02
<i>Cadophora malorum</i>	2. sběr (dospělci)	GU067760.1	533/533 (100%)	5,88
<i>Candida sp. 3</i>	2. sběr (dospělci)	KY102517.1	243/252 (96%)	4,49
<i>Capronia sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	LC015687.1	566/572 (99%)	2,16
<i>Eucasphaeria capensis</i>	2. sběr (dospělci)	EU272516.1	539/540 (99%)	0,06
<i>Fusarium lateritium</i>	2. sběr (dospělci)	GU062232.1	513/513 (100%)	0,04
<i>Fusarium solani</i>	2. sběr (dospělci)	KX014704.1	515/516 (99%)	1,67
<i>Hypocreales sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	HQ897798.1	473/559 (85%)	0,04
<i>Hypocreales sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	HQ649874.1	480/487 (99%)	0,03
<i>Lophiostoma lignicola</i>	2. sběr (dospělci)	MH863205.1	496/506 (98%)	0,48
<i>Ogataea sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	KY104443.1	661/682 (97%)	2,73
<i>Ophiostoma hylesinum</i>	2. sběr (dospělci)	MH055636.1	580/580 (100%)	4,47
<i>Paracamarosporium fagi</i>	2. sběr (dospělci)	KR611887.1	537/537 (100%)	0,06
<i>Phoma multirostrata</i>	2. sběr (dospělci)	KT004594.1	404/407 (99%)	0,33
<i>Pleosporales sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	KU325404.1	336/341 (99%)	0,06
<i>Saccharomycetaceae sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	FM178345.1	399/477 (84%)	0,05
<i>Saccharomycetales sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	KC681899.1	290/353 (82%)	5,03
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	2. sběr (dospělci)	MH859402.1	564/568 (99%)	0,13
<i>Penicillium spp.</i>	2. sběr (dospělci)			19,07
Ostatní houby 2	2. sběr (dospělci)			1,35
Ostatní kvasinky 2	2. sběr (dospělci)			0,78

Tabulka č. 9: Přehled bakterií izolovaných z *Hylesinus crenatus*

Druh	Původ	Nejpodobnější sekvence (ID)	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Leifsonia sp. 1</i>	1. sběr (larvy)	DQ232614	1395/1407 (99%)	100
<i>Bacillus sp. 2</i>	2. sběr (dospělci)	EF114313	1238/1266 (98%)	0,01
<i>Bacillus sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	AYTO01000043	737/745 (99%)	2,06
<i>Leifsonia sp. 1</i>	2. sběr (dospělci)	DQ232614	1389/1406 (99%)	0,27
<i>Microbacteriac eae</i>	2. sběr (dospělci)	AJ784400	710/715 (99%)	0,41
Ostatní bakterie 1	2. sběr (dospělci)			97,03
<i>Pantoea sp.</i>	2. sběr (dospělci)	EF688012	1357/1369 (99%)	0,12
<i>Sphingomonas sp.</i>	2. sběr (dospělci)	AJ429239	1372/1380 (99%)	0,10

4.3 Kontrola

Po kultivaci kontroly, tedy vzorků štěpin ze zdravého jasanu, byly identifikovány morfotypy hub a bakterií uvedených v tabulce 10 a 11.

Tabulka č. 10: Přehled hub izolovaných ze zdravého dřeva

Druh	Původ	Nejpodobnější sekvence (ID)	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Beauveria bassiana</i>	1. sběr (kmeny)	AJ560682	520/520 (100%)	2,94
<i>Didymella exitialis</i>	1. sběr (kmeny)	KC989097	495/496 (99%)	2,94
<i>Kazachstania servazzii</i>	1. sběr (kmeny)	KY103667	667/667 (100%)	5,88
<i>Phaeosphaeriaceae sp. 1</i>	1. sběr (kmeny)	JQ757915	399/408 (98%)	2,94
<i>Rhodotorula diobovata</i>	1. sběr (kmeny)	KY104778	567/567 (100%)	2,94
Ostatní houby 1	1. sběr (kmeny)			20,59
Ostatní kvasinky 1	1. sběr (kmeny)			61,76
<i>Amphisphaeriaceae sp. 1</i>	1. sběr (větvíčky)	KJ921931	355/365 (97%)	6,67
<i>Ascochyta phacae</i>	1. sběr (větvíčky)	NR_135942.1	495/495 (100%)	10,00
<i>Candida sp. 2</i>	1. sběr (větvíčky)	NR_151810.1	336/397 (85%)	3,33
<i>Cladosporium sp. 1</i>	1. sběr (větvíčky)	MH863875.1	502/502 (100%)	10,00
<i>Cystobasidiomycetes sp. 1</i>	1. sběr (větvíčky)	FJ238090	500/507 (99%)	3,33

<i>Cystobasidium pinicola</i>	1. sběr (větvičky)	KY103147	506/511 (99%)	3,33
<i>Didymella pinodella</i>	1. sběr (větvičky)	KU516553	494/494 (100%)	6,67
<i>Fusarium lateritium</i>	1. sběr (větvičky)	GU062232.1	513/513 (100%)	3,33
<i>Geosmithia flava</i>	1. sběr (větvičky)	KJ513214	515/516 (99%)	6,67
<i>Neodidymelliopsis ranunculi</i>	1. sběr (větvičky)	NR_155476.1	479/482 (99%)	3,33
<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	1. sběr (větvičky)	KU981162	554/554 (100%)	3,33
<i>Phialemonium sp. 1</i>	1. sběr (větvičky)	MK163733.1	496/507 (98%)	3,33
<i>Phoma sp.1</i>	1. sběr (větvičky)	DQ474104	469/470 (99%)	6,67
<i>Rhodotorula diobovata</i>	1. sběr (větvičky)	KY104778	567/567 (100%)	6,67
<i>Sclerostagonophora sp. 1</i>	1. sběr (větvičky)	KR611890	416/419 (99%)	3,33
<i>Wallemia muriae</i>	1. sběr (větvičky)	AY302527.1	474/474 (100%)	6,67
Ostatní houby 2	1. sběr (větvičky)			13,33
<i>Candida sp. 2</i>	2. sběr (větvičky)	NR_151810.1	336/397 (85%)	5,88
<i>Capronia sp.1</i>	2. sběr (větvičky)	FR865030.1	488/497 (98%)	8,82
<i>Cryptococcus sp. 1</i>	2. sběr (větvičky)	KY104328.1	479/480 (99%)	2,94
<i>Fusarium larvarum</i>	2. sběr (větvičky)	FN868469.1	514/516 (99%)	2,94
<i>Lophiostoma sp.1</i>	2. sběr (větvičky)	HE998729.1	403/408 (99%)	2,94
<i>Lophiostoma sp.2</i>	2. sběr (větvičky)	KR909174.1	423/425 (99%)	2,94
<i>Piskurozyma capsuligena</i>	2. sběr (větvičky)	KY104658.1	529/532 (99%)	41,18
<i>Tremellales sp. 1</i>	2. sběr (větvičky)	KY105769.1	472/493 (96%)	5,88
Ostatní houby 3	2. sběr (větvičky)			23,53
<i>Penicillium spp.</i>	2. sběr (větvičky)			2,94
<i>Capronia sp.1</i>	2. sběr (kmeny)	FR865030.1	488/497 (98%)	4,17
<i>Geosmithia flava</i>	2. sběr (kmeny)	KJ513214.1	515/516 (99%)	41,67
<i>Lophiostoma sp.1</i>	2. sběr (kmeny)	HE998729.1	403/408 (99%)	4,17
<i>Lophiostoma sp.2</i>	2. sběr (kmeny)	KR909174.1	423/425 (99%)	4,17
<i>Paracamarosporium fagi</i>	2. sběr (kmeny)	KR611887.1	537/537 (100%)	4,17
<i>Phialocephala sp. 1</i>	2. sběr (kmeny)	AF486125.1	148/154 (96%)	8,33

<i>Piskurozyma capsuligena</i>	2. sběr (kmeny)	KY104658.1	529/532 (99%)	8,33
Ostatní houby 4	2. sběr (kmeny)			25,00

Tabulka č. 11: Přehled bakterií izolovaných ze zdravého dřeva

Druh	Původ	Nejpodobnější sekvence (ID)	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Methylobacterium sp.</i>	2. sběr (kmeny)	FJ155589	1379/1389 (99%)	12,5
<i>Mycolicibacterium sp.</i>	2. sběr (kmeny)	KJ855063	1362/1394 (98%)	12,5
<i>Mycobacterium sp.</i>	2. sběr (kmeny)	AY457079	1365/1421 (96%)	25
Ostatní bakterie 1	2. sběr (kmeny)			25
<i>Xanthomonadales</i>	2. sběr (kmeny)	CP007597	702/737 (95%)	25

4.4 PCA a indexy

Jak bylo uvedeno v kapitole Metodika, jako reprezentativní indexy diversity pro houby a bakterie v tomto výzkumu byly zvoleny Simpsonův a Shannonův index.

Tabulka č. 12: Indexy diversity pro houby

Houby	H. crenatus 1. sběr	H. fraxini 1. sběr	H. crenatus 2. sběr	H. fraxini 2. sběr	Kontrola 1. sběr (tenké)	Kontrola 1. sběr (tlusté)	Kontrola 2. sběr (tenké)	Kontrola 2. sběr (tlusté)
Počet druhů	17	29	19	16	16	5	8	7
Simpsonův index	0,67	0,77	0,78	0,84	0,93	0,79	0,80	0,80
Shannonův index	1,31	1,92	1,91	1,98	2,71	1,60	1,85	1,77

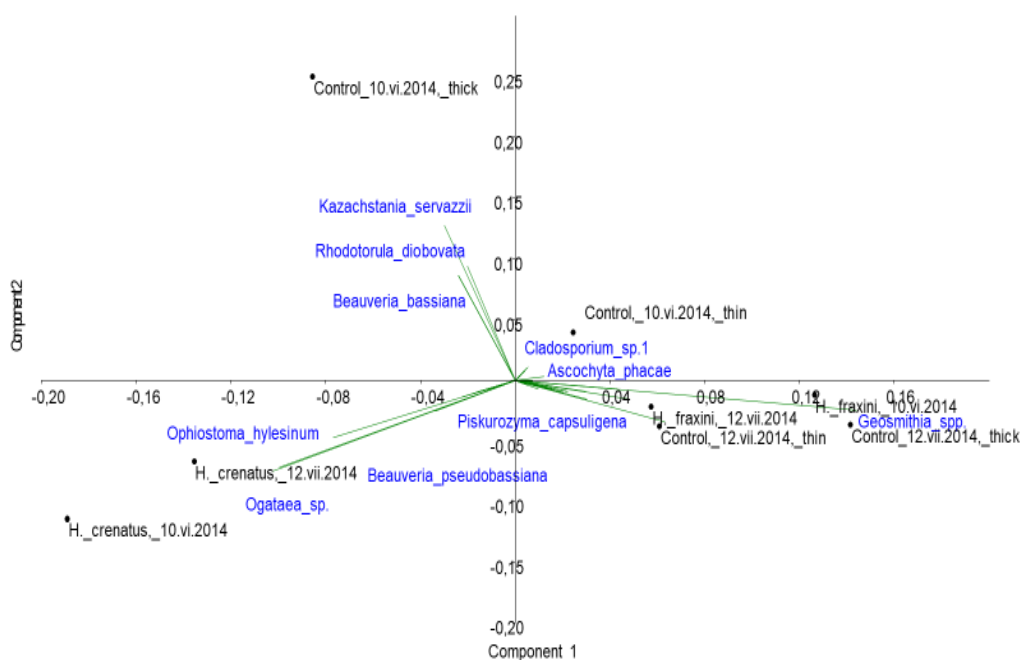
Tabulka č. 13: Indexy diversity pro bakterie

	H. crenatus 1. sběr	H. fraxini 1. sběr	H. crenatus 2. sběr	H. fraxini 2. sběr	Kontrola 2. sběr (tlusté)
Počet druhů	1	10	8	6	4
Simpsonův index	0	0,57	0,46	0,49	0,72
Shannonův index	0	1,00	0,96	1,00	1,33

U Simpsonova indexu pro houby i bakterie vidíme, že velikost indexu nezávisí na počtu druhů. Je to dáno tím, že tento index přikládá větší význam běžným druhům nežli těm vzácnějším. S jeho zvyšující se hodnotou stoupá dominance a klesá vyrovnanost společenstva (abundance).

Shannonův index nám ukazuje, s jakou pravděpodobností jsme schopni předpovědět, jakého druhu bude náhodně vybraný jedinec ze vzorku. Hodnota indexu klesá s klesající abundancí. *H. crenatus* (SI = 1.3-1.9), *H. fraxini* (SI = 1.92-1.98) i kontroly (SI = 1.6-2.7), hostily podobnou diverzitu kultivovatelných hub.

V případě bakterií lze říci, že diverzita vázaná na kůrovce byla vzájemně podobná a výrazně větší než diverzita kontrol. Vzhledem k malému počtu opakování nebylo možné provést další testy. Proto ani nemůžeme obecně říct, zda *H. crenatus* obecně hostí menší diversitu symbiontů než *H. fraxini*.



Obr. č. 1: Analýza hlavních komponent (*Principal Component Analysis, PCA*) byla počítána z netransformovaných dat v základním nastavení v programu PAST 3.23 pro houbové vzorky.

První komponenta vysvětluje 31 % celkové variability, druhá komponenta 20 %. První komponenta (osa X, Fig. XY) rozděluje vzorky podle přítomnosti *Ophiostoma hylesinum*, *Ogataea sp.* a *Beauveria bassiana* (negativní korelace s PC1) a *Geosmithia spp.* a *Piskurozyma capsuligena* (pozitivní korelace). Tato osa rozděluje vzorky z *H. crenatus* od vzorků s *H. fraxini* a kontrolních vzorků. Druhá osa odděluje vzorek Control 10iv2014thick od ostatních. A to díky přítomnosti *Kazachstania* a *Rhodotorula*.

5. Diskuze

Z tabulek uvedených v kapitole „Výsledky“ jasně vyplývá rozmanitost druhů asociovaných s kůrovci rodu *Hylesinus*. Na základě podobností sekvencí jednotlivých morfotypů porovnávaných s databázemi bylo zvoleno co nejpřesnější taxonomické zařazení. Následně byly stanoveny odpovídající ekologické skupiny. Velké procento morfotypů bohužel nebylo možné určit z důvodů jejich špatné kultivovatelnosti. Ovšem i přesto nabízí tato studie základní vhled do problematiky. Níže se vyjádřím k taxonům s relativně vysokými frekvencemi v rámci celé studie.

5.1 Houby asociované s hmyzem

Jedním z hlavních cílů naší práce bylo dokázat absenci ophiostomatálních hub u *H. fraxini* a naopak přítomnost hub rodu *Geosmithia*. Ty by pak naopak měly chybět u *H. crenatus*. Tento předpoklad poskytuje práce Kirschner (2001), který udává, že 74 % dospělců *H. fraxini* přenášelo houby rodu *Geosmithia* (určeno jako *G. putterillii*), 68 % dospělců *Penicillia* a 15 % dospělců houby *Beauveria bassiana*. Z našich výsledků vidíme určitou podobnost, i když byla zachycena podstatně menší frekvence daných rodů.

Celková frekvence kolonií rodu *Geosmithia* tvoří 22.2 % u larev *H. fraxini* z 1. sběru a 2.5 % u dospělců *H. fraxini* z druhého sběru. Zde vidíme drastický rozdíl a můžeme jej přisuzovat důležitosti rodu *Geosmithia* pro larvální instary a schopnost floemofágního brouka měnit složení mikrosymbiontů v chodbičce podle svého vývojového stádia. Druh *G. flava* je druh generalistický, velmi častý na jasaněch. Vzhledem k jeho přítomnosti i v obou kontrolách z této studie jasně vyplývá, že může žít i bez přítomnosti brouka (Kolařík et al., 2008). Kůrovci vylétávající z larválních komůrek si s sebou houby tohoto rodu sice přenášejí, ale jejich frekvence se opět zvyšuje až po úspěšné kolonizaci dřeva a vylíhnutí larev další generace.

Ophiostomatální houby měly celkovou frekvenci tvořící 37,5 % u *H. crenatus* z prvního sběru, zatímco jen 4,5 % u *H. crenatus* z druhého sběru. Opět zde vidíme rozdíl ve frekvencích mezi larvami a dospělci. Tento fakt může ukazovat i na nutriční význam těchto hub. Reprezentovány jsou jen druhem *Ophiostoma hylesinum*.

Podle obrázku 1, tedy výsledků PCA analýzy je jasně ukázáno, že *Ophiostoma hylesinum* je asociována s *H. crenatus*, zatímco *Geosmithia* spp. je spojena s druhem *H. fraxini*. Můžeme tedy říct, že jejich funkce ve vztahu k daným broukům je poměrně významná a jak již bylo uvedeno výše, jde pravděpodobně o nutriční funkci.

5.2 Houby saprofytické (či patogenní)

Do této ekologické kategorie řadíme houby, které využívají buďto živá rostlinná pletiva nebo odumírající dřevní hmotu. Zároveň jsou zde často rody se širokým spektrem hostitelů a substrátů.

V rámci této kategorie byl ve zkoumaných vzorcích nejvíce zastoupen rod *Fusarium*. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.6, řada druhů se během evoluce přizpůsobila k parazitismu rostlin či jejich herbivorů. Jako výsledné druhy jsme zaznamenali *F. solani* a *F. lateritium* v několika vzorcích obou druhů brouků.

Mezi saprofyty můžeme řadit i entomopatogenní houby rodu *Beauveria* (Rehner et al., 2011). Nalezen byl druh *Beauveria pseudobassiana* u brouků *H. crenatus*.

V nemalém procentuálním zastoupení jsme našli i houby rodu *Coniochaeta* (Heerden et al., 2016). Jde o lignivorní dřevokazné houby, které rozkládají kromě celulózní a hemicelulózní složky dřeva také lignin. Jejich přítomnost byla zaznamenána u vzorků *H. fraxini*.

Do této kategorie také spadají různé druhy rodu *Penicillium*, nalezené ve větší míře u dospělců rodu *H. crenatus* (19,07 %). Podle předpokladů si myslíme, že je to dáno tím, že jsme sbírali dospělé brouky těsně před tvorbou snubní komůrky. V té době na sobě mají mnoho kontaminantů z prostředí mimo chodbičky, včetně plísní rodu *Penicillium*. Tento kosmopolitní rod je

znám jako „všudypřítomní“ rozkladači organických materiálů (Perrone et al., 2017).

5.3 Houby endofytické

Vedle parazitických a mykorhizních hub existují ještě houby nevyvolávající žádné vnější známky své přítomnosti, i když se vyskytují v podstatě v kterékoli části rostliny.

Endofytní houby přežívají ve zdravých pletivech rostliny a po jejím oslabení či smrti mohou fungovat jako patogeny či saprofyty. Za zmínku třeba stojí přítomnost *Geosmithia flava* v obou kontrolách. Tento druh je přenášen řadou kůrovců, včetně *H. fraxini* (Kolařík et al., 2008), jak také ukázaly výsledky v naší práci. Naše výsledky dále ukazují, že je tento druh schopen i endofytního růstu a že jeho životní cyklus není výhradně vázán na hmyz. To potvrzují i nálezy *G. flava* mimo podkorní hmyz (Kolařík et al., 2004).

V námi zkoumaných vzorcích rodu *H. fraxini* jsme našli také *Nectria aurigera*, což je charakteristický endofyt jasanu (Hirooka et al., 2011).

5.4 Kvasinky

Ačkoliv nebyly reprezentovány velkými frekvencemi, byly v obou druzích indikovány přítomnosti několika rodů kvasinek. Tyto kvasinky se mohou volně asociovat jak s dospělci, tak s larvami obou druhů kůrovců. Mohou také ale žít samostatně. Jedná se proto o všechny ekologické skupiny – kvasinky přímo asociované s kůrovcem, saprofytické kvasinky i endofytické druhy.

Pro kontrolu ze sběru 1 je charakteristická *Kazachstania servazzii*, *Rhodotorula diobovata* a *Candida* sp. 2, která je nepopsaným druhem. *K. servazzii* je druhem vyskytujícím se ve fermentovaných potravinách (Spanoghe et al., 2017), je tedy možné domnívat se, že se tento druh komenzálně žíví na míze jasanu. *Rhodotorula diobovata* je druh, který přeměňuje anorganický dusík do jeho organické formy, může tedy být vhodnou symbiotickou kvasinkou pro strom, rovněž produkuje karotenoidy (El-Ziney et al., 2018).

U *H. fraxini* byl u prvního sběru identifikován jen zlomek kvasinek, můžeme se ovšem vyjádřit ke druhému sběru, kde byla nalezena nejčastěji *Candida* sp. 2 (byla rovněž v kontrole), *Filobasidium wieringae* a *Nakazawaea anatomiae*. *Candida* sp. 2 je nepopsaným druhem, nemůžeme proto o jeho ekologii nic říci, snad jen, že mnoho druhů tohoto rodu je schopno nitrifikace. *Filobasidium wieringae* je typická endofytická kvasinka v listech stromů (Kemler et al., 2017). *N. anatomiae* je taktéž častým endofytem stromů (Kaewwichian a Limtong, 2014).

U *H. crenatus* prvního sběru jsou nejčastějšími kvasinkami tři druhy rodu *Ogataea*. Tyto kvasinky dokáží asimilovat methanol jako jediný zdroj uhlíku a byly nalezeny v rostlinné tkáni, kde tento alkohol vzniká při metabolismu buněčných stěn a zároveň při rozkladu dřeva (Čadež et al., 2013). U *H. crenatus* z druhého sběru byly zaznamenány pouze nepřilíš dobře určené kvasinky, takže ten také nelze komentovat.

Nejvíce byly zastoupeny kvasinky sobě příbuzných druhů *Ogataea* (Yamada et al., 1994) a *Candida* (Irinzi et al., 2015). Jedná se o neškodné komenzály, i když některé těkavé látky produkované těmito kvasinkami mohou napomoci růstu asociovaných hub, zatímco potlačují růst jiných, entomopatogenních druhů (Davis et al., 2011). Tyto kvasinky také mohou měnit chemické prostředí v hostitelském stromu v prvních fázích vývoje kůrovců, když je hladina obraných látek hostitele nejvyšší, a tak napomáhat k potlačení jejich vlivu na parazita a jeho houby (Davis et al., 2011).

Typicky endofytickou kvasinkou nalezenou při této studii byla například *Filobasidium wieringae* (Liu et al., 2015). *Piskurozyma capsuligena*, nejpočetněji zastoupená kvasinka u kontroly druhého sběru, je charakteristická pro listový opad buků (Mašínová et al., 2017).

5.5 Bakterie

Ani bakterie nebyly v rámci této studie zastoupeny významně velkými frekvencemi. Na začátku jsme předpokládali výskyt jen několika druhů. Mezi takové patřil například rod *Pseudomonas*. Jeho výskyt byl nakonec potvrzen v několika vzorcích druhu *H. fraxini*. Ovšem naštěstí nebyl v žádném ze

vzorků identifikován nebezpečný druh *Pseudomonas savastanoi*, což jenom potvrzuje domnění, že jde o druh nebezpečný zejména pro jasanové mlaziny a tyčkoviny, ve kterých tato studie neprobíhala (Rodríguez - Moreno et al., 2009).

Také jsme narazili na rod *Leifsonia*, který lze považovat za dřevní bakteriální patogen. Pro jasanů však není nijak podstatný. Některé studie poukazují na jeho možnou pomoc při štěpení celulózy ve střevě kůrovců (Morales-Jiménez et al., 2009). Vzhledem k tomu, že byl tento rod námi objeven především ve vzorcích z drtinek obou kůrovců, nemůžeme tuto domněnku vyvrátit ani potvrdit.

Pantoea je rodem typickým pro kůrovce všech druhů. Tento rod patří k zástupcům těch, kteří potencionálně pomáhají kůrovcům snížit obranyschopnost jejich hostitele. Z této skupiny jsme ve větším či menším procentuálním zastoupení našli také rody *Curtobacterium*, *Erwinia* a *Rahnella*. Odhaduje se, že jejich činnost souvisí s odbouráváním lignocelulózních materiálů a pravděpodobně tak napomáhají kůrovcům při příjmu živin skrze hydrolýzu sloučenin z hostitelských stromů (Fabryová et al., 2018).

V neposlední řadě se pak podle očekávání objevili v několika vzorcích i zástupci rodů *Sphingomonas*, *Xanthomonadeles* a *Methylobacterium* (Menendez et al., 2015). Jedná se o endosymbionty kůrovců, kteří jim pomáhají odbourávat další buněčné polymery jako xylan a škrob (Fabryová et al., 2018). Můžeme je také ale nalézt i v půdě mimo broučí těla.

Ve vzorcích se krom bakterií, které kůrovcům pomáhají, objevily i ty, které se naopak chovají jako patogeny. Ty mohou kolonizovat broučího hostitele a způsobit i jeho smrt. Do této skupiny spadá rod *Bacillus*, nalezený ve vzorcích jako *H. fraxini* tak *H. crenatus*. Zástupci tohoto rodu dokáží zabít jak larvu, tak dospělce (Yaman et al., 2010).

5.6 Překryv u brouků a kontrol

Při porovnání přítomnosti jednotlivých taxonů mezi vzorky obou brouků a kontrol jsme zaznamenali překryv jen u několika generalistů, jako jsou rody *Penicilium* a *Fusarium*. U obou těchto rodů se jedná o saprofyty, žijící se mrtvou biologickou hmotou.

Další společnou proměnou pro všechny sorty byly kvasinky rodu *Candida* či *Cladosporium*, což je běžný a hojně rozšířený rod hub obsahující jak endofyty, lidské patogeny, tak saprofyty (Crous et al., 2007b). Objevila se také *Kazachstania servazzii*, jež se podle nás komenzálně žíví na míze jasanu.

Co se týká bakterií, ty se nepřekrývaly při porovnání vzorků brouků a kontrol. Společné druhy měly jen oba kůrovci mezi sebou (tj. rod *Pseudomonas*, *Leifsonia*).

V tabulkách se ale vyskytuje i množství hub, kvasinek a bakterií, které nebylo možné přesně určit. Důvodem byla jejich nevykultivovatelnost ze vzorků, případně kontaminace při manipulaci, po které následovalo přerostení jiným druhem. Pro další výzkum by bylo vhodné dbát striktně na sterilitu pracovního prostředí a vést si pečlivější seznam fotografií, který by umožnil lepší porovnatelnost houby vyrostlé z hmyzu s těmi po přeočkování na následující Petriho misku.

6. Závěr

Má diplomová práce na téma „Houby a bakterie asociované s kůrovci rodu *Hylesinus* v Litovelském Pomoraví“ poskytuje dle mého názoru a také díky použitým molekulárním metodám komplexní přehled hub a bakterií přítomných v broucích a chodbičkách dvou druhů kůrovců. Na základě barcodové sekvence morfotypů byly určeny rody, případně druhy daných hub a sestaveny odpovídající ekologické skupiny.

Řada objevených morfotypů patřila mezi houby asociované s brouky, houby endofytické, saprofytické a či případně patogenní. Nejvíce jich žije saprofytickým způsobem života. Všechny ekologické skupiny zahrnovaly jak houby, tak bakterie. Ačkoliv posledně jmenované se nepodařilo určit příliš podrobně. U *H. fraxini* a u kontrol byly nejpočetnější různé kvasinky, které tvořily nadpoloviční většinu vzorků. Znamená to, že netvoří vazby pouze s larvami či brouky. Odhadujeme, že hrají úlohu při asociaci s rostlinami, nebo je jejich existence zcela nezávislá. Tomuto tématu se v dnešní době věnuje hned několik výzkumů, na jejichž výsledky si ale musíme ještě počkat.

V rámci této studie jsme si stanovili za cíl dokázat, že hlavní rody hub, tedy *Geosmithia* a *Ophiostomy* mají s ohledem na své vlhkostní nároky odlišné hostitele. Výsledky potvrdily absenci ophiostomatálních hub u *H. fraxini* a přítomnost hub rodu *Geosmithia*, naopak rod *Geosmithia* chyběl u *H. crenatus*. Tento předpoklad byl tedy potvrzen. Zároveň jsme také přišli na fakt, že vzorky z dospělců obou druhů v sobě obsahovaly méně ophiostomatálních hub a geosmithií. To je dáno tím, že dospělci už nepřijímají tolik potravy jako larvární stádium, a tak jich do sebe tolik tímto způsobem z okolí nepřijímají.

Posledním cílem uvedeným v kapitole 1. bylo zjistit, zda se rozmanitost symbiotických druhů liší v závislosti na instaru brouka a zda tedy floemofágní brouk dokáže měnit složení mikrosymbiontů v chodbičce v průběhu svého vývoje. Tento předpoklad lze potvrdit pouze u druhu *H. fraxini*, kde jsme objevili celkem 40 různých druhů v larválním stádiu a 26 u dospělců. Nemusí to být však směrodatné, jelikož se spoustu vzorků nepodařilo vykultivovat.

Významné bylo zjištění, že v žádném vzorku jsme neidentifikovali patogen *Hymenoscyphus fraxineus*, který působí nekrózu jasanů. Tato choroba napadající především jasaný, způsobuje, že jednoleté a dvouleté letorosty odumírají ještě před narašením, nebo odumírají během suchého léta. Brouci rodu *Hylesinus* tedy nepředstavují riziko spojené s přenosem tohoto houbového patogenu (Kowalski, 2006). V žádném vzorku se neobjevila ani nebezpečná fytopatogenní houba *Chalara fraxinea*, která způsobuje chřadnutí jasanů (Kowalski, 2006).

Seznam použité literatury

- AAS, T.; SOLHEIM, H.; JANKOWIAK, R.; BILAŃSKI, P., HAUSNER, G. Four new *Ophiostoma* species associated with hardwood-infesting bark beetles in Norway and Poland, *Fungal Biol.* 2018, roč. 122, č. 12, s. 1142–1158.
- ADAMS, A. S.; SIX, D. L.; HOLBEN, W. In vitro interactions among yeasts, bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *Microb. Ecol.* 2008, 56:460–466.
- ADAMS, A.S.; CURRIE, C.R.; CARDOZA Y.; KLEPZIG, K.D.; RAFFA, K.F. Effects of symbiotic bacteria and tree chemistry on the growth and reproduction of bark beetle fungal symbionts. *Canadian Journal of Forest Research.* 2009, Vol. 39, No. 6, pp. 1133–1147.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215.3: 403–410.
- AYRES, M. P.; WILKENS, R. T.; RUEL, J. J.; LOMBARDERO, M. J.; VALLERY, E. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology*, 2000, 81.8: 2198-2210.
- BATRA, L. R. Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. *Mycologia*, 1967, 59: p. 976-1017.
- BEAVER, R. A.; WILDING, N.; COLLINS, N.; HAMMOND, P.; WEBBER, J. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. *Insect-fungus interactions*, 1989, 121-143.
- BLEIKER, K; SIX, D.L. Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: potential implications of multiple associates on host population dynamics. *Environ Entomol.* 2007, 36: pp. 1384–1396.
- BLOMQUIST, G. J.; FIGUEROA-TERAN, R.; AW, M.; SONG, M.; GORZALSKI, A.; ABBOT, N. L.; CHANG, E.; TITTIGER, C. Insect Biochem. *Mol. Biol.* 2010, 40, 699.
- BOONE, C.K.; KEEFOVER-RING K.; MAPES, A.C.; ADAMS, A.S.; BOHLMANN, J.; RAFFA, K.F. Bacteria associated with a tree-killing insect reduce concentrations of plant defense compounds. *Journal of Chemical Ecology.* 2013, 39, 1003–1006. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0313-0>.
- BRASIER, C. M.; KIRK, S. A. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycol. Res.* 2001, 105: 547-554

BYERS, J.A. Chemical Ecology of Bark Beetles in a Complex Olfactory Landscape Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. In LIEUTIER, F.; DAY K. R.; BATTISTI A.; GRÉGOIRE J.C., EVANS, H. F., *Springer Netherlands*, pp. 89-134.

CALVO, A. M.; HINZE, L. L.; GARDNER, H. W.; KELLER, N. P. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, Vol. 65, No. 8, s. 3668–3673.

CROUS, P. W.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K.; GROENEWALD, J.Z.; Delimiting Clado? sporium from morphologically similar genera. *Studies in Mycology.* 2007b, 58: 33–56.

ČADEŽ, N.; DLACHY, D., RASPOR, P., & PÉTER, G. *Ogataea kolombanensis* sp. nov., *Ogataea histriana* sp. nov. and *Ogataea deakii* sp. nov., three novel yeast species from plant sources. *International journal of systematic and evolutionary mikrobiology.* 2013, 63(8), 3115-3123.

ČÍŽKOVÁ, D.; ŠRŮTKA, P.; KOLAŘÍK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; PAŽOUTOVÁ, S. Assessing the pathogenic effect of *Fusarium*, *Geosmithia* and *Ophiostoma* fungi from broad-leaved trees. *Folia microbiologica*, 2005, 50(1), 59-62.

DAVIS, T.S.; HOFSTETTER, R.W.; FOSTER, J.T.; FOOTE, N.E.; KEIM, P. Interactions between the yeast *Ogataea pini* and filamentous fungi associated with the western pine beetle. *Microb Ecol.* 2011, 61:626–634

EL-ZINEY, M. G., ZAID, E. A. A., & EL-NAGGAR, M. Y. Characterization of Carotenogenic *Rhodotorula* Strains Isolated from Delta Region, Egypt and their Potential for Carotenoids Production. *Journal of PurE and aPPLiEd Microbiology*, 2018, 12(2), 587-599.

FABRYOVÁ, A.; KOSTOVČÍK, M.; DÍEZ-MÉNDEZ, A.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, A.; CELADOR-LERA, L.; SAATI-SANTAMARÍA, Z.; SECHOVCOVÁ, H.; MENÉNDEZ, E.; KOLAŘÍK, M.; GARCÍA-FRAILE, P. On the bright side of a forest pest-the metabolic potential of bark beetles' bacterial associates. *Sci. Total. Environ.* 2018 Apr. 1; 619-620:9-17. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.074. Epub 2017 Nov 11.

FARRELL B. D.; SEQUEIRA A. S.; MEARA B. C. O.; NORMARK B. B.; CHUNG J. H.; JORDAL B. H. The Evolution of Agriculture in Beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, 2001, 55:10: 2011-2027.

GARCÍA-FRAILE, P. Roles of bacteria in the bark beetle holobiont – how do they shape this forest pest?, *Ann. Appl. Biol.* 2018, roč. 172, č. 2, s. 111–125.

GEBHARDT, H.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Identification of the ambrosia fungus of *Xyleborus monographus* and *X. dryographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Mycological Progress*, 2004. 3: p. 95-102.

GERSHENZON, J. ET AL., The Bark-Beetle-Associated Fungus, *Endoconidiophora polonica*, Utilizes the Phenolic Defense Compounds of Its Host as a Carbon Source, *Plant Physiol.* 2016, roč. 171, č. June, s. pp.01916.2015.

GILBERT, S.F.; SAPP, J.; TAUBER, A.I. A symbiotic view of life: We have never been individuals. *Quarterly Review Of Biology.* 2012, Volume 87, Issue 4. 325-341.

HALL, T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999, 41: 95-98.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001. 4: p. 1-9.

HANSON, J.R. The chemistry of fungi. *Department of chemistry*, University of Sussex, Brighton, UK. 2008, 978-0-85404-136-7

HARRINGTON, T. C. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*, 1993, 161-172. HARRINGTON,

HARRINGTON, T. C.; McNEW, D.; STEIMEL, J.; HOFSTRA, D.; FARRELL, R. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia*, 2001, 111-136.

HEJNÝ, S. A KOL. Květena České republiky. 1. 2. vyd., Reprint 1. vyd. z r. 1988. Praha: Academia, 1997. 557 s. ISBN 80-200-0643-5. – S. 447–450.

HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A. Y.; CHAVERRI, P. A morphological and phylogenetic revision of the *Nectria cinnabarina* species complex, *Stud. Mycol.* 2011, roč. 68, s. 35–56.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology.* 2011 Nov 15;70 (1): 1-51.

HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; FRISVAD, J.C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2012 101: 403-421

HUANG, Y.-T.; KOLAŘÍK, M.; KASSON, M.; HULCR, J. Two new *Geosmithia* species in *G. pallida* species complex from bark beetles in eastern USA. *Mycologia*. 2017, 109: 790-803.

HULCR, J. Kůrovci milácci evoluce. *Vesmír: přírodovědecký časopis*. 2003, 82, č. 12. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z WWW: <<http://casopis.vesmir.cz/clanek/kurovci-milacci-evoluce>>. ISSN 1214-4029.

HULCR, J.; ADAMS, A.S.; RAFFA, K.F.; HOFSTETTER, R.W.; KLEPZIG, K.D.; CURRIE, C.R. Presence and diversity of *Streptomyces* in *Dendroctonus* and sympatric bark beetle galleries across North America. *Microbial Ecology*. 2011, 61, 759–768. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9797-0>.

HUSSA, E. A.; GOODRICH-BLAIR, Heidi. It takes a village: ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. *Annual review of microbiology*, 2013, 67: 161-178.

HUSSON, C., SCALA, B., CAËL, O., FREY, P., FEAU, N., IOOS, R., MARÇAIS, B., 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *Eur. J. Plant Pathology*. 130. 311–324.

CHOJNACKI, S.; COWLEY, A.; LEE, J.; FOIX, A.; LOPEZ, R. Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul;45(W1) W550-W553. doi:10.1093/nar/gkx273. PMID: 28431173; PMCID: PMC5570243.

IRINYI, L.; SERENA, C.; GARCIA-HERMOSO, D.; ARABATZIS, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; VU, D.; CARDINALI, G.; ARTHUR, I.; NORMAND, A.C.; GIRALDO, A.; International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) - ITS reference DNA barcoding database the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol.* 2015; 53:313–337. [PubMed: 25802363]

JANKOVSKÝ, L.; HOLDENRIEDER, O. *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. *Plant Protection Science*. 2009 45. 75-78.

JANKOWIAK R. & ROSSA R. Associations between *Pityogenes bidentatus* and fungi in young managed Scots pine stands in Poland. *Forest Pathology*. 2008, 38: 169–177.

JANKOWIAK, R.; KOLAŘÍK, M., Fungi associated with the fir bark beetle *Cryphalus piceae* in Poland. *Forest Pathology*, 2010. 40: p. 133-144.

JANKOWIAK, R.; STRAŁKA, B.; BILAŃSKI, P.; KACPRZYK, M.; WIECZOREK, P.; LINNAKOSKI, R. Ophiostomatoid fungi associated with hardwood-infesting bark and ambrosia beetles in Poland: Taxonomic diversity and vector specificity, *Fungal Ecol.* 2019, roč. 39, s. 152–167.

JANSON, E. M.; STIREMAN, J.O.; SINGER, M.S.; ABBOT, P. Phytophagous insect microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution*. 2008 62: 997–1012.

KAEWWICHIAN, R., & LIMTONG, S. *Nakazawaea siamensis* fa, sp. nov., a yeast species isolated from phylloplane. *International journal of systematic and evolutionary mikrobiology*. 2014, 64(1), 266-270.

KEMLER, M.; WITFELD, F.; BEGEROW, D.; & YURKOV, A. Phylloplane yeasts in temperate climates. In *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. 2017, (pp. 171-197). Springer, Cham.

KIRISITS, T. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Springer Netherlands, 2007. 181-236.

KIRSCHNER, R. Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in central Europe. *Trichomycetes and other fungal groups*, 2001, 175-196.

KOK, L.T. Lipids of Ambrosia Fungi and the Life of Mutualistic Beetles. In *Insect-Fungus Symbiosis: Nutrition, Mutualism, and Commensalism*; BATRA, L.; Ed.; John WILEY and Sons: Hoboken, NJ, USA, 1979; pp. 33–52.

KOLAŘÍK, M. ET AL, *Geosmithia* associated with bark beetles and woodborers in the western USA: Taxonomic diversity and vector specificity", *Mycologia*, 2017 roč. 109, č. 2, s. 185–199.

KOLAŘÍK, M.; FREELAND, E.; UTLEY, C.; TISSERAT, N. *Geosmithia morbida* sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in USA. *Mycologia*, 2011, 103.2: 325-332.

KOLAŘÍK, M.; HULCR, J.; KIRKENDALL, L.R. New species of *Geosmithia* and *Graphium* associated with ambrosia beetles in Costa Rica. *Czech Mycology*. 2015 67: 29-35.

KOLAŘÍK, M.; KIRKENDALL, L. R. Evidence for a new lineage of primary ambrosia fungi in *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales). *Fungal Biology*, 2010, 114.8: 676-689.

KOLAŘÍK, M.; KOSTOVČÍK, M.; PAŽOUTOVÁ, S. Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. *Mycological Research*, 2007. 111: p. 1298-1310.

KOLAŘÍK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; HULCR, J.; PAŽOUTOVÁ, S. *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: evidence from their community structure in temperate Europe. *Microbial Ecology*, 2008, 55.1: 65-80.

KOLAŘÍK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; PAŽOUTOVÁ, S. Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov. and *G. flava* sp. nov., associated with subcorticolous insects. *Mycological research*. 2004, 108(9), 1053-1069.

KOTÝNKOVÁ – SYCHROVÁ, E. Mykoflóra chodeb kůrovců v Československu. *Čes. mykol.* 1966, 20: 45-53

KOWALSKI, T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology*, 2006. 36.4.: 264-270.

KOWALSKI, T.; HOLDENRIEDER, O. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology*, 2009. 39: 304–308.

KUBÁTOVÁ, A.; KOLAŘÍK, M.; PRÁŠIL, K. B.; NOVOTNÝ, D. Bark beetles and their galleries: well known niches for little known fungi on the example of *geosmithia*. *Czech mycology*. 2004, 56: 1–18

LANTSCHNER, M. V.; ATKINSON, T. H.; CORLEY, J. C.; LIEBHOLD A. M. Prediction North America *Scolytinae* invasions in the Southern Hemisphere. *Ecological Applications*. 2017, 27. 10.1002/eap.1451.

LIEUTIER, F.; KEITH, D.R.; BATTISTI, A.; GRÉGORIE, J.C.; EVANS, H.F. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, *Synthesis*. *Kluwer Academic Publishers*. 2004, Dordrecht-Boston-London. 569 p.

LINNAKOSKI R., DE BEER Z. W., AHTIAINEN J., SIDOROV., NI – EMELÄ P., PAPPINEN A. & WINGFIELD M. J. 2010. *Ophiostoma* spp. associated with pine and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia. *Persoonia* 25: 72–93.

LOYNING, M.K.; KIRKENDALL, L.R. Notes on the mating system of *Hylesinus varius* (F.) (*Col.*, *Scolytidae*), putatively bigynous bark beetle. *J.Appl. Ent.* 1999, 123: 77-82.

MACHAR, I. Ochrana lužních lesů a olšin. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. Praha: ČR, 1998. 31 p. 80-86064-31-X.

MAŠÍNOVÁ, T., BAHNMANN, B. D., VĚTROVSKÝ, T., TOMŠOVSKÝ, M., MERUNKOVÁ, K., & BALDRIAN, P. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS microbiology ecology*, 2017, 93(2).

MATHIESEN A. 1950. Übe einige mit Borkenkäfern assoziierten Bläuepilze in Schweden. *Oikos* 2: 275–308

MATHIESEN-KÄÄRIK A. 1953. Eine Übersicht über die gewöhnlichsten mit Borkenkäfern assoziierten Bläuepilze in Schweden und einige für Schweden neue Bläuepilze. *Meddelanden från Statens Skogsforskningsinstitut* 43: 1–74.

MCNEW, D. L. ET AL. Three genera in the *Ceratocystidaceae* are the respective symbionts of three independent lineages of ambrosia beetles with large, complex mycangia. *Fungal Biology*. 2015, 119, 1075–92

MENENDEZ, E.; RAMIZEZ-BAHENA, M.H.; FABRYOVÁ, A.; IGUAL, J.M.; BENADA, O.; MATEOS, P.F.; PEIX, A.; KOLAŘÍK, M.; GARCIA-FRAILE P. *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *International Journal of Systems and Evolution Microbiology*. 2015, 65, 2852–2858. [https://doi.org/ 10.1099/ijs.0.000344](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000344).

MORALES-JIMÉNES J.; ZÚÑIGA, G.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*). *Microbial Ecology*. 2009, 58, 879–891. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9548-2>.

MORAN, N.A.; MCCUTCHON, J.P.; NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev. Genet.* 2008, 42:165–190

MORGAN, E. D. Biosynthesis in Insects. *Chemical Ecology Group*, 2010, Keele University, Keele, UK. 978-1-84755-808-4

MUELLER, U.G.; GERARDO, N.M.; AANEN, D.K.; SIX, D.L.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. 2005, 36: 563-595

NÁROVEC, V., TREJTNAROVÁ, J., JANČAŘÍK, V., 2008. Čeká jasany chřadnutí? (Are ash stands expected to decline?). *Lesu zdar (Hradec Králové)* č. 5. 14. 4-6.

NODA, H.; KODAMA, K. Phylogenetic position of yeastlike endosymbionts of anobiid beetles. *Applied and environmental microbiology*, 1996, 62.1: 162-167.

NOVOTNÝ, D. Ophiostomatální houby České republiky, Zpravodaj ochrany lesa, svazek 14, 2007, ISBN 978-80-86461-81-6 (Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.vi)

NOVOTNÝ, D.; JANKOVSKÝ, L. Notes on mycobiota associated with *Ips typographus* from the Šumava Mts. (Czech Republic). *Czech Mycol.* 2005, 57: 91-96.

NOVOTNÝ, D.; ŠRŮTKA, P. *Ophiostoma stenoceras* and *O. grandicarpum* (*Ophiostomatales*), first records in the Czech Republic. *Czech. Mycol.* 2004, 56: 19-32

OGAWA, H.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA J., Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: evidence from 18 S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia*, 1997. 89: p. 756-771.

OKADA, G.; SEIFERT, K. A.; TAKEMATSU, A.; YAMAOKA Y.; MIYAZAKI, S.; TUBAKI, K. A molecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. *Can. J. Bot.* 1998, 76: 1495-1506

PAINE, T. D.; RAFFA, K. F.; HARRINGTON, T. C. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual review of entomology*, 1997, 42.1: 179-206.

PERRONE, G.; SUSCA, A. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1542: 107–119. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_5.

PFEFFER, A. Zentralund westpaläarktische Borken und Kernkäfer: (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae). *Pro Entomologia*, c/o Naturhistorisches Museum Basel, 1995. ISBN 39-520-8406-9.

PITT, J. I. *Geosmithia* gen. nov. for *Penicillium lavendulum* and related species. *Canadian Journal of Botany*, 1979. 57: p. 2021-2030.

PRZYBYŁ, K.; DAHM, H.; CIESIELKA, A.; MOLIŃSKI, K. Cellulolytic activity and virulence of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* isolates. *Forest Pathology*, 2006, 36.1: 58-67.

QUELOZ, V., GRUNIG, C., BERNDT, R., KOWALSKI, T., SIEBER T., HOLDENRIEDER, O., 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*. 41. 133–142.

- REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G. H.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 2011, 103(5), 1055-1073.
- RODRÍGUEZ-MORENO, L.; JIMÉNEZ, A. J.; RAMOS, C. Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. roč. 2, č. January, 2009, s. 476–488.
- ROSSMAN, A.Y.; MCKEMY, J.M.; PARDO-SCHULTHEISS, R.A.; SCHROERS, H.J. Molecular studies of the Bionectriaceae using large subunit rDNA sequences. *Mycologia*. 2001 93: 100-110.
- SAMSON, R.A.; YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K.A.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*. 2011, 70: 159-183.
- SCALA, A., ET AL. Dutch elm disease progression and quantitative determination of ceratoulmin in leaves, stems and branches of elms inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1997. 50: p. 349-360.
- SCALA, A.; ET AL. A non-Ophiostoma fungus expresses the gene encoding the hydrophobin cerato-ulmin. *Journal of Plant Pathology*, 2007. 89: p. 233-240.
- SEIFERT, K. A., DE BEER, Z. W., WINGFIELD, M. J. Emerging lineages in the Ophiostomatales. *Ophiostomatoid Fungi-Expand*. Front. 2013, roč. 12, č. May 2014, s. 21–46.
- SEIFERT, K. A.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J. The ophiostomatoid fungi: expanding frontiers. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2013.
- SCHARF, M.E.; KARL, Z.J.; SETHI, A.; BOUCIAS, D.G. Demonstrates the synergy among host and symbiont-encoded cellulases in the termite gut. *PLoS One*. 2011 6: e21709.
- SIEBER, T. N.; BERNDT, R.; KOWALSKI, T.; GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; HOLDENRIEDER, O. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*, *For. Pathol.* 2010, roč. 41, č. 2, s. 133–142.
- SIX, D. L. Bark Beetle-Fungus Symbiosis, in *Insect Symbiosis*, K. Bourtzis and Miller, T. A., Editors. 2003, CRC Press: Florida. p. 97-114.

SIX, D. L. Ecological and evolutionary determinants of bark beetle—fungus symbioses. *Insects*, 2012, 3.1: 339-366.

SIX, D. L. The bark beetle holobiont: why microbes matter. *Journal of chemical ecology*, 2013, 39.7: 989-1002.

SIX, D. L.; WINGFIELD, M. J. The role of phytopathogenicity in bark beetle—fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual review of entomology*. 2010, 56: 255-272.

SPANOGHE, M.; JARA, M. G.; RIVIÉRE, J.; LANTERBECQ, D.; GADENNE, M., & MARIQUE, T. Development and application of a quantitative real-time PCR assay for rapid detection of the multifaceted yeast *Kazachstania servazzii* in food. *Food microbiology*, 2017, 62, 133-140.

SUMMERBELL, R.C.; GUEIDAN, C.; SCHROERS, H.J.; DE HOOG, G.S.; STARINK, M.; AROCHA ROSETE, Y.; GUARRO, J.; SCOTT, J.A. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Stud. Mycol.* 2011, 68, 139–162.

TAERUM, S. J.; DE BEER, Z. W.; MARINCOWITZ, S.; JANKOWIAK, R.; WINGFIELD, M. J. *Ophiostoma quercus*: An unusually diverse and globally widespread tree-infecting fungus, *Fungal Biol.* 2018, roč. 122, č. 9, s. 900–910.

TISSERAT, N., ET AL. Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and Thousand Cankers Disease. *Plant Health Progress*, 2009. doi:10.1094/PHP-2009-0811-01-RS.

UPADHYAY, H. P. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press: Athens. 1981.

UPADHYAY, H. P. Classification of the ophiostomatoid fungi. In *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology and pathogenicity (ed. M. J. Wingfield, K. A. Seifert & J. F. Webber), pp. 7–13. *American Phytopathological Society Press*. St Paul, Minnesota. 1993.

ÚRADNÍČEK, L. 2014. Dendrologie: (společenstva a významné dřeviny ČR). Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 143 s.

VANDERWEL, D. Factors affecting pheromone production in beetles. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1994, 25:347–62

WALLANDER, E. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy, *Plant Syst. Evol.* 2008, roč. 273, č. 1–2, s. 25–49.

WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (eds.). *Ceratocystis* and *Ophiostoma* – taxonomy, ecology and pathogenicity, St. Paul, APS Press. 1993.

WOOD, D.L. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 1982, 27:411–46

XU, L.T.; LU, M.; SUN, J.H. Invasive bark beetle-associated microbes degrade a host defensive monoterpene. *Insect Sci.* 2016, 23, 183–190. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12255>.

YAMAN, M.; ERTURK, O.; ASLAN, I. Isolation of some pathogenic bacteria from the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* and its specific predator, *Rhizophagus grandis*. *Folia Microbiologica.* 2010, 55, 35–38.

Yoon, S.-H., ET AL. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017, roč. 67, č. 5, s. 1613–1617.

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; NALIM, F. A.; SUMMERBELL, R. C., PADHYE, A. A.; GEISER, D. M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44.6: 2186-2190.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants. *FEMS Microbiol Rev.* 2008, 32: 723–735