

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie



**Mikroorganismy asociované s brouky rodu *Hylesinus*
(Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) na jasanech**

Diplomová práce

Autor: Bc. Denisa Jašková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jan Šobotník, Ph. D.

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Denisa Jašková

Lesní inženýrství

Název práce

Houby asociované s brouky rodu *Hylesinus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) na jasanech

Název anglicky

Fungi associated with *Hylesinus* beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on Ash tree

Cíle práce

Tato práce se bude zabývat pochopením významu jednotlivých hub a kvasinek asociovaných s lýkohubou *Hylesinus fraxini* a *H. crenatus*. Pomocí kultivačních metod vysledujeme, jaké mikroorganismy žijí spolu s kůrovci v jejich chodbách a drtinkách. Bude popsána diverzita houbových symbiontů dospělců i larev brouků se zvláštním přihlédnutím k nejdůležitějším symbiotickým houbám.

Metodika

Disponujeme celkem třemi sběry *H. fraxini* a *H. crenatus*, u nichž bude studována a následně sekvenována kultivovatelná část asociovaných mikroorganismů, především hub a kvasinek. V DP bude zahrnuta celková kultivovatelná diverzita hub pouze z červencového sběru (kdy byli v jasanech dospělci brouků) a hlavní symbiotické houby ze všech sběrů (*Geosmithia* a ophiostomatální houby).

Pomocí molekulárních metod (Sangerovská sekvenace genů ITS a TEF1a) budou identifikovány houby včetně kvasinek nalezené v průběhu kultivací. Molekulární determinace jednotlivých asociovaných mikroorganismů nám umožní přiřadit jim funkci v životě hostitelského brouka, případně rizika, která jejich přítomnost hostitelskému stromu, jasanu, přináší.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

Hylesinus fraxini, *Hylesinus crenatus*, lýkohub, houby, kvasinky, jasan, 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.
- Douglas, A. E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64 (4), 409-434.
- 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.
- Hulcr, J., Rountree, N. R., Diamond, S. E., Stelinski, L. L., Fierer, N., & Dunn, R. R. (2012). Mycangia of ambrosia beetles host communities of bacteria. *Microbial ecology*, 64(3), 784-793.
- Hussa, E. A., & Goodrich-Blair, H. (2013). It takes a village: ecological and fitness impacts of 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.
- 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., 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., & Wingfield, M. J. (2011). The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual review of entomology*, 56, 255-272.
- Six, D. L. (2013). The bark beetle holobiont: why microbes matter. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 989-1002.
-

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FLD

Vedoucí práce

doc. Mgr. Jan Šobotník, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ochrany lesa a entomologie

Konzultant

RNDr. Barbora Křížková

Elektronicky schváleno dne 29. 3. 2017

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 29. 3. 2017

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 30. 03. 2017

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Mikroorganismy asociované s brouky rodu *Hylesinus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) na jasaněch vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Jana Šobotníka, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že odevzdáním 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 2017

Bc. Denisa Jašková

Poděkování

Velmi děkuji prof. Ing. Jaroslavu Holušovi, Ph.D. a všem přednášejícím z Katedry ochrany lesa a entomologie za zajímavé přednášky a získání teoretických i praktických znalostí během celého studia. Mé velké poděkování patří vedoucímu diplomové práce doc. Mgr. Janu Šobotníkovi, Ph.D. za výběr tématu a odborné vedení při vypracování práce. Stejně tak patří velké poděkování odborné konzultantce mé práce RNDr. Barboře Křížkové za pečlivé vedení v praktické i teoretické části a Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. za odborné rady a poznatky k obsahu mé diplomové práce. A velké poděkování patří také mé milované rodině za podporu a trpělivost během celého studia. Výzkum byl podpořen projektem IGA A11/17.

ABSTRACT

Our project focuses on the study of microbiota of phloemophagous bark beetles *H. crenatus* and *H. fraxini* on Ash tree. The aim is to gain insight into significance of fungi associated with these bark beetles. This thesis is the first study to describe mycobiota of *H. fraxini*, furthermore in light of new information about symbiotic fungi of bark beetles.

Cultivation methods were used to find out frequencies of fungal symbionts of beetles and their galleries. Biodiversity description of cultivable fungi was performed using molecular approach (sequencing of ITS and β -tubulin genes and their n-blast).

Filamentous fungi and yeasts were identified and sorted into several ecological groups. Most detected fungi have saprophytic way of life, endophytes as well as insect-associated fungi were present.

Genera *Ophiostoma* and *Geosmithia* were listed as the most important symbiotic fungi associated with these bark beetles. Ophiostmatoid fungi live with *H. crenatus* and *Geosmithia* species can be found in *H. fraxini*. These fungi colonize environments according to their humidity level (Jankowiak & Rossa 2008) as well as the associated beetles. Last but not least, we discuss the role and importance of various yeasts that have been underestimated in previous studies.

KEY WORDS: *Hylesinus fraxini*, *Hylesinus crenatus*, fungi, yeasts, *Fraxinus*, symbiosis

ABSTRAKT

Náš projekt je zaměřen na studium mikrobioty floemofágních kůrovců *H. crenatus* a *H. fraxini* na jasaněch. Cílem práce je utřídit získané informace o významu hub asociovaných s těmito dřevokaznými brouky. Jedná se o první popisnou práci zahrnující mikrobiotu *H. crenatus*, navíc ve světle nových studií o významu symbiotických hub kůrovců.

V praktické části práce jsme využili kultivační metody ke zjištění houbových symbiontů nalezených v broucích či v jejich chodbičkách a určili jsme jejich početnost. Popis biodiverzity kultivovatelných hub jsme získali pomocí molekulárních metod (sekvenace genů ITS a β -tubulin a jejich n-blast).

Vláknité houby a kvasinky byly identifikovány a rozříděny do několika ekologických kategorií. Nejvíce hub žije saprofytickým způsobem života, přítomné jsou i endofytické houby a houby asociované s hmyzem.

Jako nejdůležitější druhy symbiomy mezi kůrovci a houbami spatřujeme houby rodu *Ophiostoma* asociované s *H. crenatus* a houby rodu *Geosmithia* asociované s *H. fraxini*. Tyto houby osidlují různá prostředí podle stupně vlhkosti (Jankowiak & Rossa 2008), stejně jako brouci s nimi asociovaní. V neposlední řadě se vyjadřujeme k širokému spektru kvasinek, jejichž funkce a význam byly v odborné literatuře dlouhodobě podceňovány.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Hylesinus fraxini, *Hylesinus crenatus*, lýkohub, houby, kvasinky, jasan, symbiomy

Obsah	10
1 ÚVOD.....	11
2 JASANY A LUŽNÍ LESY	12
3 ŠKŮDCI JASANU	14
4 BROUCI RODU HYLESINUS	15
4.1 Hylesinus crenatus - lýkohub zrnitý.....	16
4.2 Hylesinus fraxini - lýkohub jasanový	17
5 MIKROORGANISMY A SYMBIÓZA S BROUKY.....	20
5.1 Podkorní hmyz a mikroorganismy	20
5.2 Xylomycetofágové - ambrosioví brouci.....	20
5.3 Floemofágní kůrovci	21
5.4 Houby v požercích floemofágních kůrovců.....	22
5.5 Vztah mezi floemofágními kůrovci a dalšími houbami a kvasinkami.....	25
6 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA	27
6.1 Kultivace vzorků	29
6.2 Kultivace kontroly:.....	30
7 VÝSLEDKY.....	31
8 DISKUZE.....	37
9 ZÁVĚR.....	42
10 SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	43

TABULKY

Tabulka č. 1: Přehled hub izolovaných z <i>Hylesinus crenatus</i> zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencí ITS rDNA.....	31
Tabulka č. 2: Přehled hub izolovaných z <i>Hylesinus fraxini</i> zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencí ITS rDNA.....	33
Tabulka č. 3: Přehled hub izolovaných ze zdravého dřeva zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencí ITS rDNA.....	35
Tabulka č. 4: Výskyt předpokládaných hlavních symbiotických hub rodu <i>Ophiostoma</i> a <i>Geosmithia</i> zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencemi ITS rDNA a β -tubulin....	36

OBRÁZKY

Obr. 1 Chráněná krajinná oblast Litovelské Pomoraví	13
Obr. 2 <i>Hylesinus crenatus</i>	16
Obr. 3 <i>Hylesinus crenatus</i> požerek.....	17
Obr. 2 <i>Hylesinus fraxini</i>	18
Obr. 3 <i>Hylesinus fraxini</i> požerek.....	19

1 ÚVOD

Brouci rodu *Hylesinus* (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*) patří do nadčeledi *Curculionoidea*, zvané nosatci, kteří si své označení zasloužili tvarem své hlavy, protažené do dlouhého nosce. V České republice se vyskytuje 6 čeledí a kolem 1040 druhů.

Kůrovci (*Scolytinae*) se vyvíjejí pod kůrou oslabených dřevin, v případě přemožení je nalezneme i na zdravých stromech. *Hylesinus fraxini* (Panzer, 1779), *Hylesinus crenatus* (Fabricius, 1787) - zástupci kůrovců, kteří jsou součástí výzkumu mé diplomové práce, patří mezi druhynapadající pouze listnaté stromy. V našem případě se jedná o stromy rodu *Fraxinus* L, zejména o jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.).

Při osídlování napadených dřevin dochází k asociaci mezi brouky rodu *Hylesinus* a mikrobiálními a houbovými symbionty, kteří jim pomáhají překonat obranu stromu či zvyšují nutriční hodnotu potravy.

Diplomová práce se zabývá výzkumem, na základě kterého se snažíme pochopit vzájemný vztah hostitelského brouka s asociovanými houbami a zjištění rizik, který tento vztah přináší.

Tato diplomová práce je součástí většího projektu, který bude vyhodnocovat data ze třech sběrů za období jaro, léto a podzim roku 2014. K dispozici tudíž bude široké spektrum informací, ze kterých se bude zjišťovat zejména biodiverzita mikrobiálních symbiontů, ale i další ekologická data.

2 JASANY A LUŽNÍ LESY

Jasan (*Fraxinus* L.) je rod opadavých listnatých stromů z čeledi olivovníkovitých (*Oleaceae*, Hoffmans. Et Link). Celý rod zahrnuje asi 45 – 65 obvykle středně vysokých, většinou opadavých druhů, ačkoli několik subtropických druhů řadíme mezi stálezelené. V našich lesích je zástupce rodu jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) šestou nejrozšířenější dřevinou. Roste roztroušeně v nížinách, jako součást tvrdého nížinného luhu, přes suťové lesy v pahorkatinách, až po horské oblasti celého území. Přirozeně se vyskytující jasan ztepilý bývá indikátorem nejlepších půd (Patočka 2013).

Lužní lesy, z nichž pochází materiál studovaný v této práci, řadíme mezi velmi vzácné lesní ekosystémy a ohrožené typy vegetace s funkcí biologických koridorů. Z ekologického hlediska se jedná o ekosystém s největší produkcí biomasy. Pravidelné povodně zajišťují dostatečný přísun živin a vláhy. V současné době tvoří lužní lesy jakési „zelené ostrovy“ uprostřed obhospodařované zemědělské krajiny. Tyto ostrůvky jsou negativně ovlivňovány antropogenními krajinnými procesy, jako je plošné znečištění chemikáliemi ze zemědělské činnosti, eutrofizace, odvodňování zemědělských pozemků a výstavba inženýrských staveb, především komunikací (Machar 1998).

Původně byly lužní lesy využívány jako zdroj paliva a steliva, velký význam měly pro pastvu dobytka. Většina lužních lesů v České republice však vznikla teprve v nedávné minulosti, a to spontánní sukcesí. Plošně nejrozsáhlejší komplexy lužních lesů tvoří tvrdé nížinné luhy v okolí velkých řek, řazené fytocenology do podsvazu *Ulmenion* (Machar 1998). Zápavy v oblastech tvrdého luhu trvají přibližně 10–14 dní. Můžeme je považovat za disturbance, pro něž je typické: periodicitu, dobu trvání a intenzitu.

CHKO Litovelské Pomoraví je v rámci České republiky posledním zbývajícím územím plošně rozsáhlého lužního lesa s doposud nenarušenou přirozenou inundační dynamikou říčního toku obr. 1 (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*).



Obr. 1 Chráněná krajinná oblast Litovelské Pomoraví (zdroj <http://www.olomoucky-kraj.com/object.php?object=36>)

Pro podmínky hospodaření v lesích ČR jsou stanoveny hospodářsko – pěstební jednotky, tzv. hospodářské soubory. Jedná se o základní jednotky diferenciací rámcového plánování hospodaření v přírodních lesních oblastech, které jsou charakterizované přírodními podmínkami (geologickými, klimatickými, orografickými a fyto geografickými), funkčním zaměřením a stavem lesních porostů.

Cílový hospodářský soubor 19 stanovuje hospodaření pro lužní stanoviště, především pro tvrdý luh smíšeného porostu s příměsí jasanu. Jasan se velmi dobře přirozeně obnovuje, na většině stanovišť bývá jeho růst často až agresivní. Pěstební intenzita je silně nadprůměrná.

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) patří v praxi mezi nejosvědčenější meliorační a zpevňující dřeviny (Podrázský 2005), proto je v našich lesích rozšířen.

3 ŠKŮDCI JASANU

V posledních letech dochází k odumírání jasanů všech vývojových stádií. Symptomy chřadnutí jasanů, tedy prosychání korun, odumírání mladých letorostů a nekrózy započaly v České republice v letech 2004–2006 v oblasti lužních lesů (Jankovský et al. 2008).

Mortalita je výraznější u mladých jedinců, ale postihuje dřeviny na všech stanovištích, tzn. v oblastech lužních lesů i v nižších horských oblastech. První zmínky o zhoršování stavu jasanů pocházejí z počátků devadesátých let z Polska a Litvy. To se dále rozšiřovalo v Pobaltí, na území Lotyšska a Estonska, a dále v Dánsku, Švédsku a Německu (Kowalski 2006).

V roce 2006 byla popsána houba *Chalara fraxinea* (v anamorfní formě rozmnožující se nepohlavně) jako možný původce choroby chřadnutí (Kowalski 2006). Pozdější studie zjistily houbu v teleomorfní formě (schopnou produkovat pohlavní buňky tzv. gamety). Pomocí molekulárních genetických metod byl tedy potvrzen nový druh patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* Queloz et al. 2011 zavlečený z Asie do Evropy. Existuje další, velmi podobná houba *Hymenoscyphus albidus* (Roberge ex Desm.) W. Phillips původem z Evropy (Queloz et al. 2011).

V souvislosti s prosycháním a odumíráním jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior*) evidujeme zvýšený výskyt kůrovcovitých, zejména lýkohuba jasanového (*Hylesinus fraxini*) a lýkohuba zrnitého (*Hylesinus crenatus*) (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 (lýkohubi, mšice atp.) přístup do napadeného stromu.

Ochrana i obrana proti chorobám je prakticky nemožná, neboť není dosud známa bionomie infekce a nebyly zkoušeny žádné chemické zásahy. Mezi fytopatologi jde o velmi diskutovaný lesnický problém. Přestože řadíme jasan spíše k invazivním druhům

dřevin, vystává nebezpečí, že by se mohl díky chorobě chřadnutí zařadit k „problematickým dřevinám“, jako je jilm, jedle nebo dub. (Jankovský et al. 2008).

Další škůdce byl pozorován v lesní školce, ve které se pěstovaly jasanů určené pro městskou výsadbu. Jedná se o dutilku jasanovou (*Prociophilus bumeliae*, Schrank 1801 – Hemiptera: Aphididae), který způsobuje zkadeření listů.

Škodlivý brouk krasec (*Agrilus planipennis*, Fairmaire 1888) je významným škůdcem jasanů zejména v USA a v Rusku, kam se rozšířil jako invazní druh z Asie. S ohledem na jeho vysoký potenciál je velmi pravděpodobné, že po případném zavlečení do Evropy by došlo k nevyčíslitelným škodám na jasaněch. V Evropské unii je zařazen na seznam karanténních škodlivých organismů (Spurná et al. 2010).

4 BROUCI RODU HYLESINUS

Kůrovci (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) jsou brouci, kteří 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 mykangích, a na lýkožravé, kteří konzumují floém, avšak ke svému vývoji rovněž potřebují symbiotické houby. Tyto brouky řadíme do podčeledi Scolytinae. V podčeledi Scolytinae jsou triby jak lýkožravých, tak ambrosiových brouků. Fylogeneze ukázala, že vazba na ambrosiové houby vznikla několikrát nezávisle (Farrell et al., 2001, Hulcr et al. 2007).

Symbióza s houbami ovlivňuje i samotný způsob života brouků, jelikož lýkožravé druhy nacházíme nejčastěji v lýku těsně pod kůrou, ale ambrosioví brouci žijí převážně ve dřevě.

Diplomová práce se zabývá dvěma zástupci rodu *Hylesinus*, a to *H. crenatus* (Fabricius, 1787) a *H. fraxini* (Panzer, 1779) žijících na jasaněch. Tito brouci mají navzájem odlišné ekologické nároky. Nejedná se o ambrosiové brouky, jsou to 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.

4.1 *Hylesinus crenatus* - lýkohub zrnitý

Jedná se o největšího zástupce rodu *Hylesinus* v České republice. Je to tmavý až černý brouk 4-6 mm velký s řídkým ochlupením, téměř lysý (obr. 2). 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 jasaný. Brouci se rojí od poloviny dubna do začátku června. Požerek (obr. 3) s matečnou chodbou je dlouhý pouze 4-8 cm, ale poměrně široký, s hvězdčovitě rozloženými larválními chodbičkami, které jsou dlouhé až 30 cm. Larvální vývoj je dvouletý, přezimování probíhá v prvním roce v larválním stadiu, ve druhém roce jako dospělec. Imago prodělává během léta zralostní žír na bázích silných jasanů, během něhož si připravuje chodbičky k přezimování.



Obr. 2 *Hylesinus crenatus* (zdroj <http://www.forestryimages.org/>, autor Milan Zubrik)



Obr. 3 Požerek *Hylesinus crenatus* (zdroj <http://www.forestryimages.org/>, autor Gyorgy Csoka)

4.2 *Hylesinus fraxini* - lýkohub jasanový

Lýkohub jasanový je drobný brouk, jehož povrch těla je asymetricky světle hnědě až skvrnitě zbarvený s drobnými šupinkami, mezi kterými se nalézají delší vlasovité štětiny (obr. 4). Obývá téměř celou Evropu včetně Britských ostrovů a jižní Skandinávie, na východě zasahuje až do Číny. Rovněž 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. Vývoj jedince trvá přibližně 3 měsíce. Rojení začíná brzy na jaře. Larvy se kuklí v bělí dřeviny, pokud však vývoj prodělávají v tlustší borce obr. 5, kuklí se pak v ní. Imaga se objevují počátkem léta. Zralostní žír provádějí ve spících očkách mladých jasanů, ve kterých si připravují chodbičky k přezimování. Opakovaný žír dospělých brouků způsobuje na mladých kmíncích a větvích tvorbu hojivého pletiva, tzv. „korových

růžic“. Takto poškozenou kůru dřeviny napadají nejenom další generace brouků, ale je lákadlem i pro další druhy dřevokazných hub.



Obr. 4 *Hylesinus fraxini* (zdroj <http://www.everystockphoto.com/>, autor J. Coelho)



Obr. 5 Požerek *Hylesinus fraxini* Hostěnice 2007

(zdroj <http://atlasposkozeni.mendelu.cz>)

5 MIKROORGANISMY A SYMBIÓZA S BROUKY

5.1 Podkorní hmyz a mikroorganismy

Mikrobiální symbiózy jsou nedílnou součástí všech aspektů biologie, od ekologie až k lidskému zdraví, ve které mají mikrobi pozitivní (mutualistický), nebo negativní (parazitický) dopad na kondici hostitele (Hussa & Goodrich 2013).

Živočichové i rostliny jsou v podstatě vždy zapojeni do symbióz s mikroorganismy. Důležitost těchto symbióz vedla ke konceptu holobiontu, který můžeme definovat jako spojení jedince se všemi jeho mikroorganismy (Six 2013). U hmyzu mezi symbionty řadíme ektosymbionty, jako jsou mikroskopické houby, a endosymbionty, kam patří zejména bakterie a další mikroorganismy v trávicí soustavě. Hmyz tímto partnerstvím získává přístup k využití dalších adaptivních stanovišť, což ovlivní výsledky symbióz nejen v rámci ontogeneze hmyzu, ale znamená inovace a změny, ke kterým dochází v průběhu evolučního času. Skutečností je, že vzájemné interakce např. mezi členovci a jejich symbionty vytvořily základ úspěchu pro rozmanitost této skupiny (Six 2013).

Symbióza mezi kůrovci a jejich houbami, bakteriemi či kvasinkami představuje komplex vzájemných interakcí. Vzájemně výhodné benefity v rámci symbiozy znamenají však i to, že každá strana musí něco dát do vztahu, aby byl v obou směrech prospěšný. Symbiotické houby slouží jako potrava pro kůrovce a také mohou potlačovat růst konkurenčních mikroorganismů. Kůrovci na oplátku přenášejí houby přímo pod kůru stromu, kde mohou úspěšně růst. Tento poskytovaný benefit vlastně způsobil, že některé houby zcela ztratily schopnost pohlavního způsobu rozmnožování (Six & Paine 1996, Six & Paine 1998).

Konkrétní poznatky uvádím v kapitole 6.2 a 6.3.

5.2 Xylomycetofágové - ambrosioví brouci

Výrazem xylomycetofágové označujeme druhy, pro které ektosymbiotické „ambrosiové“ houby tvoří hlavní část potravy, a to jak pro larvy, tak i pro dospělé, a jsou nezbytné pro dokončení vývojového cyklu kůrovců. K rozmnožování většiny ambrosiových brouků dochází v bělí 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.

Zajímavější bohatší výběr nacházejí v tropických oblastech, avšak v našich podmínkách, v mírném podnebném pásu, 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, které jsou určeny jako potrava nejen pro dospělé ale i pro larvy. Xylém slouží broukům jako potrava pouze v omezené míře (Paine et al. 1997, 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, Hulcr et al. 2007).

Ambrosioví brouci nabírají své houby do mykangií (Cassier et al. 1996, Grebennikov & Leschen 2010), specializované „kapsy“ na těle brouka sloužící výhradně k přepravě symbiotických ambrosiových hub a dalších mikroorganismů (Hulcr et al. 2012). Tito brouci se stali zcela závislými na svých houbách. Pro svůj řádný vývoj a reprodukci potřebují steroly (Bentz & Six 2006). 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. Na oplátku poskytují mikroorganismům stabilní podmínky a snadnou šířitelnost (Six & Paine 1996, Six & Paine 1998, Bentz & Six 2006).

5.3 Floemofágní kůrovci

Floemofágní kůrovci primárně žijí v kambiu a ve floému, avšak existuje několik druhů, kteří mohou svůj vývojový cyklus prodělat ve vnější kůře dřeviny (Wood 1982). 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 (Six 2012).

Velmi významnou úlohu plní houby u floemofágních brouků při tzv. detoxikaci terpenů pro překonání obrany dřeviny (DiGuistini et al 2011). Hmyz si dřeviny, které se chystá napadnout, nachází čichem pomocí rostlinných monoterpenů. Produkce

těchto látek je vlastně vzájemnou interakcí mezi dřevinou, hmyzem a mikroorganismy (Desneux et al. 2010). Monoterpeny, organické sloučeniny převážně rostlinného původu, si hmyz přetransformuje na feromony, ovšem velmi často právě s pomocí mikroorganismů. Feromony pomáhají ve vnitrodruhové i mezidruhové kompetici, umožňují přilákat partnera a slouží i k dorozumívání (Dudareva et al. 2004). 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 (Dudareva et al. 2004). Zajímavostí je, že napadená rostlina rozlišuje mezi napadením škodlivým hmyzem a mechanickým poškozením (Desneux et al. 2010).

Lýkožraví brouci houby nekonzumují přímo. Houby poskytují těmto broukům část své enzymatické výbavy, kterou používají k degradaci celulózy, stavební součásti rostlinných buněčných stěn. Jedná se o trávicí enzymy celulózu a hemicelulózu (Binz & Canevascini 1996, Przybył et al. 2006, Svaldi & Elgersma 1982, Tamerler & Keshavarz 2000). Schopnost strávit celulózu je u živočichů velmi vzácná, proto tuto činnost obvykle zprostředkovávají mikroorganismy (Martin et al. 1991). Steroly, organické látky, které slouží i jako hormony hmyzu, patří mezi další živiny, které brouk může od hub získat (Clayton 1964, Kok & Norris 1973, Noda & Kodama 1996).

5.4 Houby v požercích floemofágních kůrovců

Spektrum hub asociovaných s jedním druhem brouka je velmi široké. Nicméně v této práci se zabýváme dvěma hlavními skupinami houbových symbiontů cílových druhů kůrovců. Jedná se o tzv. ophiostomatální houby a houby rodu *Geosmithia*, které řadíme mezi askomycety (Seifer et al. 2013). Askomycety neboli vřeckovýtrusné houby patří mezi druhově nejpočetnější oddělení, které se rozmnožuje anamorfním i teleomorfním způsobem. Mykologický termín „anamorfa“ znamená, že se houby rozmnožují nepohlavně, např. konidiami, naopak „teleomorfa“ je schopna produkovat pohlavní buňky (gamety). Často jsou rozdílné v morfologii, proto byly dříve popisovány jako různé rody. Anamorfní způsob je u hub častější, nicméně dosud neexistují studie, které by tento způsob rozmnožování podrobněji analyzovaly.

Brouci, kteří preferují kmeny a silné větve se stabilními vlhkostními podmínkami, tvoří vazbu se spektrem ophiostomatálních hub. Nacházíme je už ve spodních částech stromů, cca od 150 cm nad zemí, kde je vysoká vlhkost. Naopak kůrovci, které nacházíme

pod tenkou borkou nebo v tenčích větvích do tloušťky 5 cm, tvoří vazbu s houbami rodu *Geosmithia* (Kolařík & Jankowiak 2013, Jankowiak et al. 2014). Důvody pro toto rozdělení zatím nejsou známy, ale předpokládá se zásadní vliv rozdílů abiotických podmínek jako je vlhkost, míra vysychání substrátu, koncentrace kyslíku a toxických látek. Oba typy hub se také ukázaly jako patogeny rostlin, z čehož vyplývá, že by mohly být schopné narušovat rostlinná pletiva (Čížková et al. 2005).

Všechny spory ophiostomatálních hub včetně "neambrosiových druhů" jsou lepkavé, a tím zvyšují pravděpodobnost úspěšné kolonizace nového zdroje potravy (Cassier et al. 1996, Grebennikov & Leschen 2010, Harrington et al. 2001). Obě skupiny hub mají podobnou funkci, a to obohacovat potravu, zprostředkovávat chybějící živiny a vitamíny, jelikož dřevo je málo výživné a mohou reagovat s hmyzími feromony (Ayres et al. 2000; Harrington 2005; Vega and Dowd 2005). Obecně je však nutriční potenciál klasických ophiostomatálních hub u lýkožravých brouků dosud neznámý.

Termín entomochorie používáme při vzájemné spolupráci mezi hmyzem a houbami, které jsou na něm závislé z důvodu rozšiřování svých spor. Nejedná se však o entomopatogeny. V případě lýka a bělového dřeva slouží kůra jako bariéra, která brání průniku hub do stromu. Houby, jejichž spory jsou šířeny vzduchem nebo vodou, mají velmi nízkou pravděpodobnost úspěšného dispergování na daná stanoviště. Naopak houby, které mají lepkavé spory, využívají hmyz jako průkopníky ke vstupu do dřevin (Kirschner 2001). Brouci jako vektory přenosu hub zajišťují kontinuitu z generace na generaci a podstatně ovlivňují fylogenetickou historii houbových partnerů (Kolařík et al. 2008).

OPHIOSTOMA (Ascomycota: Sordariomycetes)

Ophiostomatální houby asociované s kůrovci zahrnují několik rodů. Patří mezi ně rod *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., *Ceratocystiopsis* H.P. Upadhyay & W.B. Kendr., *Grosmannia* Goid. a *Ceratocystis* Ellis & Halst. (Kirisits 2007; Zipfel et al 2006). Rody *Ophiostoma*, *Grosmannia* a *Ceratocystiopsis* jsou příslušníky jediné fylogenetické linie řádu *Ophiostomatales*, rod *Ceratocystis* patří do řádu *Microascales* (Zipfel et al. 2006). Tyto dvě hlavní skupiny hub se liší v preferenci své hostitelské rostliny. Většina hub *Ophiostomatales* preferuje jehličnany, naopak houby *Ceratocystis* se pojí s krytosemennými (Harrington 1993). Ophiostomatální houby se účastní různých typů symbióz, od obligátního mutualismu až k parazitismu (Jankowiak et al. 2014). Houby

mohou larvám a čerstvě vylíhlým nesklerotizovaným broukům sloužit jako hlavní nebo doplňkový zdroj potravy. Významnou roli hrají při recyklaci limitujících prvků (především dusíku a fosforu) z hmyzích exkrementů nebo z antiagregačních feromonů brouků (Ayres et al. 2000, Harrington 2005, Vega & Dowd 2005). Žijí ve vlhku a jako tzv. blue stain fungi znehodnocují dřevo.

Ophiostomatální houby jsou na stromy zavlečeny při ataku brouků na dřevinu, což houbám umožňuje kolonizovat živé nebo oslabené jedince a vyhnout se tak konkurenci s jinými druhy. Avšak pouze některé ophiostomatální druhy jsou agresivními útočníky schopnými přežít ve velmi čerstvých tkáních napadených stromů. Tyto druhy jsou považovány za původce nebezpečných chorob dřevin (například *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier způsobující grafiózu jilmů) (Six & Wingfield 2011). Ophiostomatální houby jsou entomochorinní a mají konidie nebo askospory s lepivým povrchem, což umožňuje udržet spory hub na exoskeletu hmyzu. Spory tak nejsou během transportu ztraceny nebo rozptýleny, což je zvláště důležité pro houby asociované s kůrovci, kteří nemají mykangia (Kolařík et al. 2008).

U ophiostomatálních hub nacházíme různou šíři hostitelské specifity. Řada generalistů, jako je druh *O. piceae* či *O. quercus* přenáší široké spektrum kůrovců napříč řadou rostlinných čeledí. Další druhy mají hostitelské spektrum úzké. Příkladem jsou jilmové druhy *O. ulmi* a *O. novo-ulmi*. Obecně lze říci, že ophiostomatální houby následují svojí specificitou své přenašeče. Tj. například druh *Endoconidiophora* (= *Ceratocystis*) *polonica* nacházíme hlavně u druhu *Ips typographus* (Linnaeus, 1758) na smrku, ale příležitostně je nalézán i na dalších kůrovcích ze smrků, popřípadě borovic (Lieutier et al. 2004).

GEOSMITHIA (Ascomycota: Hypocreales)

Houby rodu *Geosmithia* žijí v symbiotickém vztahu s floemofágními a ambrosiovými kůrovci (Kolařík et al. 2008, Kolařík & Kirkendall 2010, Kolařík & Jankowiak 2013). Jednotlivé druhy se vzájemně liší silou vazby na své přenašeče. Nejvolnější vztah nacházíme u tzv. generalistů, kteří jsou přenášeni řadou druhů kůrovců s hostitely z mnoha rostlinných čeledí. Tyto houby lze najít i ve volné přírodě (např. půda, endofyti atd.) (Seibold 2015). Jejich možnému rozšíření mimo pozerky nasvědčuje i fakt, že *Geosmithia* nemá lepkavé spory, nýbrž tzv. „suché“ spory, které se dobře šíří vzduchem (Kolařík et al. 2008). Další druhy, tzv. specialisté,

jsou vázány pouze na úzké spektrum přenašečů, kteří napadají jednu rostlinnou čeleď. Sem patří řada druhů, které jsou vázány jen na kůrovce, kteří napadají čeleď *Pinaceae* (Kolařík & Jankowiak 2013). Kůrovci kolonizující byliny mohou žít dokonce bez přítomnosti ophiostomatálních hub či hub rodu *Geosmithia* (Kolařík et al. 2008). Ekologická role hub rodu *Geosmithia* není dobře známa. Několik druhů určitě patří mezi nutriční symbionty (Kolařík & Kirkendall 2010). *Geosmithia morbida*, která způsobuje nekrózu ořešáku černého, je jediný známý fytopatogen z rodu *Geosmithia* (Kolařík et al. 2011, Veselská & Kolařík 2015).

Jankowiak a Rossa (2008) předložili hypotézu, že kůrovci, kteří vyhledávají sušší substráty, nejsou schopni mutualismu s ophiostomatálními houbami, avšak vyhledávají symbiotický vztah s houbami rodu *Geosmithia*, jelikož houby rodu *Geosmithia* jsou adaptovány pro osídlování těch částí stromů, jejichž krycí pletiva obsahují málo vody a jsou vystaveny vysokým teplotám. Přítomnost houby *Geosmithia* souvisí s konkrétními brouky, s hostitelskými stromy nebo s určitým typem lesní půdy. Výzkum ukázal, že lesy smíšené byly zamořeny větším počtem druhů *Geosmithia* než lesy smrkové či borové. Naopak ve smrkových a borových lesích jsou kolonie hub *Geosmithia* stabilnější. Z toho vyplývá, že čím více jsou součástí smíšeného porostu zástupci jehličnanů *P. abies* (L.) H. Karst. nebo *P. sylvestris* (L.), klesá druhová rozmanitost hub *Geosmithia* (Jankowiak et al. 2014).

5.5 Vztah mezi floemofágními kůrovci a dalšími houbami a kvasinkami

Chodbičky floemofágů představují určitý ekosystém, který v omezeném prostoru osidluje širokou škálu 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* nejsou jedinými houbovými symbionty, které se asociují s floemofágními kůrovci. Nacházíme zde druhy parazitických, mykoparazitických, fytopatogenních, saprofytických či půdních hub (Kirschner 2001):

- houbu *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, kolonizující živé rostliny, řadíme mezi mykoparazitické houby (Kirschner 2001).

- *Penicillium* (Link) spp. nevytváří spory v chodbičkách brouků, ale často jsou izolovány z povrchu těl kůrovců. Ke kontaminaci *Penicillium* zřejmě dochází

při přezimování hmyzu v půdě od půdních hub a k následnému zavlečení do chodbiček (Kirschner 2001).

- rod *Aspergillus* (P. Micheli ex Link) je jednou z nejrozšířenějších skupin saprofytických hub s více než 150 druhy, přestože původně byl považován za slabý patogen (Latgé 1999).

Zajímavým tématem jsou kvasinky a jejich symbióza s brouky. 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 (Leach & Orr 1973, Shifrine & Phaff 1956). Je pravděpodobné, že mají pro svého symbionta nutriční význam, což by znamenalo, že slouží broukům jako potrava (Barras & Perry 1972, Berryman 1989).

6 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA

Symbiózy mezi houbami a kůrovci se v nedávné době staly předmětem velkého zájmu vědců, jelikož dosud nebyla publikována komplexní studie, která by zpracovala nashromážděné informace a vysvětlila příčiny a důsledky vzájemných vztahů. Naše porozumění těmto vztahům zůstává tedy na základní úrovni, nicméně molekulární taxonomické nástroje umožňují vědcům přesně identifikovat houbové partnery a řešit fylogenetické vztahy brouků a hub (Six 2012).

Tato práce se zabývá popisem diverzity a četnosti kultivovatelných hub asociovaných s lýkohubou *Hylesinus fraxini* a *Hylesinus crenatus* na jasanu. Identifikace pomocí molekulárních metod (sekvenace genů ITS a) zaručí spolehlivé určení kritických skupin a možnost porovnání s publikovanými výsledky. 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 ze tří sběrů obou druhů kůrovců. Pro účely diplomové práce jsme zvolili pouze nejlepší data, která pocházejí z 2. sběru z července 2014.

Cíle práce:

- Popsat kultivovatelnou diverzitu houbových symbiontů studovaného hmyzu.
- Popsat funkce vybraných hub v symbióze s brouky, pokusit se vysledovat i ekologii hub.
- Předpokládáme, že *H. crenatus* má odlišnou hlavní symbiotickou houbu než *H. fraxini*. Odlišné ekologické nároky brouků zřejmě souvisí s nároky hub na vlhkost.

METODIKA

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

Sběr materiálu obsahoval části tenčích větví ze slunného stanoviště s kůrovcem *H. fraxini* a tlustou kůru jasanu, kde se nacházel *H. crenatus*. Z jasanů jsme vysekli část kůry a lýka, které byly evidentně napadené brouky, a ze zdravého stromu jsme vzali ta samá pletiva jako kontrolu vzorků. Proběhly celkem 3 sběry (viz Tabulka č. 4) ve Vísece nedaleko Litovle. Dřevní materiál byl přímo v terénu zamrazen a až do upotřebení skladován při -18 °C.

Vzorky z 12. července 2014 určené k popsání kultivovatelné biodiverzity hub pocházejí ze stejného instaru u obou brouků. Jedná se o dospělé. U *H. crenatus* jsme sbírali brouky budující snubní komůrku a u *H. fraxini* to byla imaga těsně po kuklení, která ještě neopustila lýko.

Praktická část této práce probíhala na Akademii věd České republiky v Praze – Krči v Mikrobiologickém ústavu.

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

Složení média MEA 2 % agar:

- 1 l 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 neoptimálnější 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 mohou vyrůst i méně konkurenčně schopné kolonie mikroorganismů, které vyžadují stabilní životní podmínky, neměly by tak šanci proti agresivněji rostoucím plísním.

Celkový počet vzorků u jednoho druhu brouka dosáhl 80 (40 kukel, larev nebo dospělců a 40 drtinek), od každého vzorku byla 2 ředění. Dohromady 320 Petriho misek se vzorky.

6.1 Kultivace vzorků

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 nálezu.

2/ Provést homogenizaci vzorků v 1ml sterilizované destilované vody (dH₂O).

3/ Ředění vzorků 10x, 100x, 1000x pomocí dH₂O do finálního objemu 1000 μ l.

10x ... 100 μ l homogenátu + 900 μ l dH₂O

100x ... 10 μ l homogenátu + 990 μ l dH₂O

1000x ... 1 μ l homogenátu + 999 μ l dH₂O

4/ Pomocí sterilizované skleněné laboratorní hokejky provést výsev 100 μ l 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 ředění.

8/ Každý morfotyp očkovat na malou Petriho misku (průměr 55 mm), utěsnit parafilmem, aby se zabránilo kontaminaci sporama z vnějšího okolí, a kultivovat dalších několik dní podle úspěšnosti růstu morfotypu.

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

6.2 Kultivace kontroly:

- 1/ ve zdravém dřevním materiálu zjišťovat zejména endofytické houby
- 2/ vyříznout u středu dřeva nebo kůry štěpiny o rozměru 1 cm x 2 cm
- 3/ štěpiny povrchově sterilizovat:
 - 1 min v 96% EtOH
 - 3 min v dezinfekčním prostředku Savo
 - 0,5 min v čistém EtOH 96%
 - opláchnout v destilované vodě
- 4/ na sterilním prkýnku naštípat skalpelem štěpiny na třísky o rozměru 1 mm x 1 cm
- 5/ třísky položit na MEA na Petriho misky, 5 ks třísek na 1 misku
- 6/ čtyřtýdenní kultivace Petriho misek v místnosti o stabilní teplotě 24 °C
- 7/ zjištění biodiverzity hub, které vyrostly z třísek

Po úspěšné kultivaci byly parataxonomicky popsány jednotlivé morfotypy kolonií vláknitých hub a kvasinek. Tzn., že jejich identifikace nespočívá v taxonomickém zařazení, ale v jejich vzájemném odlišení (podobnosti). Namísto podrobných morfologických znaků se u tohoto odlišení přistupuje k identifikaci pomocí molekulárních metod.

- 1/ Nejdříve je nutné izolovat DNA kultivovaných mikroorganismů; pro tento krok je použit jeden z komerčně dostupných kitů.
- 2/ Amplifikuje se úsek z celogenomové DNA pomocí PCR (poly chain reaction). Použijí se primery pro ITS hub a kvasinek, tj. jaderný úsek pro internal transcribed spacer, což je část rDNA, která je přepisována do rRNA, ale v ribozomu nemá funkci, není tedy pod selekčním tlakem a snáze mutuje (ITS1-F a ITS4 - Anderson et al. 2003). U hub *Geosmithia* a ophiostomatálních hub budou pro detailnější výsledky využity i jiné úseky DNA, zejména β -tubulin (Matheny et al. 2007).
- 3/ PCR produkty budou přečištěny v laboratoři a zaslány na sekvenaci pomocí Sangerovské metody do firmy Macrogen.
- 4/ Získané sekvence budou porovnány s databází pomocí metody BLAST (Altschul et al. 1990).
- 5/ Jednotlivě zjištěné taxony a jejich podobnosti budou zapsány do tabulky, včetně jejich relativní četnosti v rámci daného druhu brouka či kontroly.

7 VÝSLEDKY

U kůrovce *H. crenatus* byly identifikovány jednotlivé morfotypy vláknitých hub a kvasinek pomocí molekulárních metod (viz Tabulka č. 1). Rod *Ophiostoma* byl zjištěn v 5,6 % všech CFU (colony-forming unit). Taxonomickou identitu těchto izolátů uvádíme v samostatné tabulce č. 4.

Tabulka č. 1: Přehled hub izolovaných z *Hylesinus crenatus* zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencí ITS rDNA.

Druh	Druhové zařazení nejpodobnější sekvence	Nejpodobnější sekvence	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	AJ564900.1	499/500 (99%)	38,4
	<i>Blastobotrys nivea</i>	FM178345.1	399/477 (84%)	0,04
Saccharomycetales sp.	<i>Cadophora malorum</i>	GU067760.1	490/490 (100%)	4,3
<i>Candida</i> sp.	<i>Candida vrieseae</i>	KY102517.1	243/252 (96%)	3,1
<i>Penicillium</i> spp.	určeno pouze morfologicky			36,5
<i>Eucasphaeria capensis</i>	<i>Eucasphaeria capensis</i>	EU272516.1	539/540 (99%)	0,04
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	KU516468.1	513/513 (100%)	0,03
<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	KM044086.1	412/412 (100%)	1,2
<i>Hypocreales</i> sp.	<i>Hypocreales</i> sp.	DQ682585.1	472/479 (99%)	0,02
Nectriaceae sp.	<i>Chaetopsina penicillata</i>	HQ897798.1	473/559 (85%)	0,03
<i>Massarina</i> sp.	<i>Massarina</i> sp.	JX981477.1	493/497 (99%)	0,1
<i>Ogataea</i> sp.	<i>Ogataea salicorniae</i>	KY104443.1	489/504 (97%)	1,6
<i>Ophiostoma</i> spp.	<i>Ophiostoma</i> spp.	viz tabulka 4		5,6
<i>Paracamarosporium fagi</i>	<i>Paracamarosporium fagi</i>	KR611887.1	537/537 (100%)	0,04
<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	KT948360.1	413/416 (99%)	0,2
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	<i>Pyrenochaeta corni</i>	KU325404.1	336/341 (99%)	0,1
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	JQ912675.1	586/587 (99%)	0,1
houba vláknitá sp. 1				0,04

houba vláknitá sp. 2	0,04
houba vláknitá sp. 3	0,03
houba vláknitá sp. 4	1,5
houba vláknitá sp. 5	0,02
houba vláknitá sp. 6	0,01
houba vláknitá sp. 7	0,3
houba vláknitá sp. 8	0,04
houba vláknitá sp. 9	0,1
houba vláknitá sp. 10	0,02
houba vláknitá sp. 11	0,01
houba vláknitá sp. 12	0,01
houba vláknitá sp. 13	0,01
houba vláknitá sp. 14	0,1
houba vláknitá sp. 15	0,1
houba vláknitá sp. 16	0,1
houba vláknitá sp. 17	0,04
houba vláknitá sp. 18	0,13
houba vláknitá sp. 19	0,12
kvasinka sp. 1	0,2
kvasinka sp. 2	0,2
kvasinka sp. 3	3,5
kvasinka sp. 4	0,1
kvasinka sp. 5	0,01
kvasinka sp. 6	0,01
kvasinka sp. 7	0,01
kvasinka sp. 8	0,01
kvasinka sp. 9	0,01
kvasinka sp. 10	0,04
kvasinka sp. 11	2,0
kvasinka sp. 12	0,02
kvasinka sp. 13	0,01
kvasinka sp. 14	0,01

U kůrovce *H. fraxini* byly identifikovány pomocí molekulárních metod jednotlivé morfotypy vláknitých hub a kvasinek (viz tabulka č. 2). Houby rodu *Geosmithia* byly zjištěny ve frekvenci 2,02 % ze všech izolovaných CFU. Přehled taxonomických skupin rodu *Geosmithia* je v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 2: Přehled hub izolovaných z *Hylesinus fraxini* zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencí ITS rDNA.

Druh	Druhov \acute{e} zařazení nejpodobnější sekvence	Nejpodobnější sekvence	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	KU377272.1	442/447 (99%)	0,01
<i>Ascomycete</i> sp.	<i>Ascomycete</i> sp.	AJ972831.1	524/535 (98%)	0,01
Dothideales sp.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX249734.1	455/456 (99%)	0,02
<i>Candida</i> sp.	<i>Candida</i> sp.	FJ873567.1	179/187 (96%)	22,05
<i>Cladosporidium</i> sp.	<i>Cladosporidium</i> sp.	KX387686.1		0,1
<i>Coniochaeta</i> sp.	<i>Coniochaeta</i> sp.	KF367558.1	508/524 (97%)	3,4
<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	AB665313.1	285/294 (97%)	0,003
<i>Penicilium</i> spp.	určeno pouze morfologicky			1,49
<i>Filobasidium wieringae</i>	<i>Filobasidium wieringae</i>	KY103450.1	534/534 (100%)	20,5
<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Fusarium lateritium</i>	GU062232.1	513/513 (100%)	0,3
<i>Geosmithia</i> spp.	<i>Geosmithia</i> spp.	viz tabulka 4		2,02
<i>Pucciniomycotina</i> sp.	<i>Jianyunia sakaguchii</i>	KY103615.1	353/415 (85%)	4,1
<i>Mycocalicium victoriae</i>	<i>Mycocalicium victoriae</i>	AJ312123.1	481/484 (99%)	15,9
<i>Nakazawaea anatomiae</i>	<i>Nakazawaea anatomiae</i>	KY104354.1	574/575 (99%)	2,8
<i>Nectria aurigera</i>	<i>Nectria aurigera</i>	HM484551.1	473/475 (99%)	17,8
<i>Piskurozyma capsuligena</i>	<i>Piskurozyma capsuligena</i>	KY104658.1	554/557 (99%)	2,2
houba vláknitá sp. 1				1,9
houba vláknitá sp. 2				0,01
houba vláknitá sp. 3				0,01
houba vláknitá sp. 4				0,01

houba vláknitá sp. 5	0,1
houba vláknitá sp. 6	0,01
houba vláknitá sp. 7	0,5
houba vláknitá sp. 8	0,003
houba vláknitá sp. 9	0,01
houba vláknitá sp. 10	0,01
houba vláknitá sp. 11	0,02
kvasinka sp. 1	4,4
kvasinka sp. 2	0,1
kvasinka sp. 3	0,03
kvasinka sp. 4	0,1

Po kultivaci kontroly (viz Tabulka č. 3), tj. vzorků dřeva a štěpin ze zdravého jasanu, byly identifikovány některé morfotypy vláknitých hub a kvasinek.

Tabulka č. 3: Přehled hub izolovaných ze zdravého dřeva zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencí ITS rDNA.

Druh	Druhové zařazení nejpodobnější sekvence	Nejpodobnější sekvence	Podobnosti	Celková frekvence (%)
<i>Botryosphaeria</i> sp.	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	AJ293881.1	151/154 (98%)	4,2
<i>Capronia</i> sp.	<i>Capronia</i> sp.	FR865030.1	488/497 (98%)	6,8
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Cryptococcus gattii</i>	NR_144805.1	469/493 (95%)	2,9
<i>Fusarium larvarum</i>	<i>Fusarium larvarum</i>	FN868469.1	514/516 (99%)	1,4
<i>Geosmithia flava</i>	<i>Geosmithia flava</i>	KJ513214.1		1,4
<i>Lophiostoma</i> sp.	<i>Lophiostoma</i> sp.	HE998729.1	403/408 (99%)	2,9
<i>Naganishia diffluens</i>	<i>Naganishia diffluens</i>	KY104328.1	479/480 (99%)	1,4
<i>Piskurozyma capsuligena</i>	<i>Piskurozyma capsuligena</i>	KY104658.1	554/557 (99%)	27,2
<i>Pleosporales</i> sp.	<i>Pleosporales</i> sp.	JX570932.2	423/425 (99%)	2,9
houba vláknitá sp. 1				24,6
houba vláknitá sp. 2				2,9
houba vláknitá sp. 3				2,9
houba vláknitá sp. 4				14,1
kvasinka sp. 1				1,4
kvasinka sp. 2				1,4
kvasinka sp. 3				1,4

Tabulka č. 4: Výskyt předpokládaných hlavních symbiotických hub rodu *Ophiostoma* a *Geosmithia* zjištěný pomocí morfologie nebo sekvencemi ITS rDNA a β -tubulin.

Doba sběru	Druh	Sekvence	Podobnost	Gen
10.vi.2014	<i>H. fraxini</i>	<i>Geosmithia flava</i> KJ513214.1	578/579 (99%)	ITS
10.vi.2014	<i>H. fraxini</i>	<i>Geosmithia</i> sp. Určeno pouze morfologicky		
10.vi.2014	kontrola	<i>Geosmithia flava</i> KJ513214.1	515/516 (99%)	ITS
12.vii.2014	<i>H. fraxini</i>	<i>Geosmithia</i> sp. 5 KR229885.1	477/477 (100%)	ITS
12.vii.2014	<i>H. fraxini</i>	<i>Geosmithia flava</i> KF853898.1	535/535 (100%)	β -tubulin
22.ix.2014	<i>H. fraxini</i>	<i>Geosmithia</i> sp. 12 KF853932.1	519/523 (99%)	β -tubulin
22.ix.2014	<i>H. fraxini</i>	<i>Geosmithia</i> sp. Určeno pouze morfologicky		

Doba sběru	Druh	Sekvence	podobnost	Gen
10.vi.2014	<i>H. crenatus</i>	<i>Ophiostoma catonianum</i> EU443765.1	585/587 (99%)	ITS
12.vii.2014	<i>H. crenatus</i>	<i>Ophiostoma catonianum</i> EU443765.1	586/588 (99%)	ITS
22.ix.2014	<i>H. crenatus</i>	<i>Ophiostoma catonianum</i> EU443765.1	586/588 (99%)	ITS

8 DISKUZE

Z výsledků v tabulkách č. 1 – 4 vidíme, že molekulární metody odhalují přítomnost vláknitých hub i kvasinek. Na základě sekvence jednotlivých morfotypů byly určeny rody, případně druhy daných hub a stanoveny arbitrární ekologické skupiny. Mnoho morfotypů nebylo určeno z důvodu nedokonalostí v použité metodice, které jsou diskutovány níže. I přes poměrně nízkou úspěšnost kultivací je tento projekt velmi důležitý pro poznání symbiomy kůrovců a hub, jelikož jde o první studii zahrnující i *Hylesinus crenatus*.

Z dostupné literatury můžeme odvodit následující rozdělení určených hub. Pracovali jsme pouze s houbami určenými alespoň do rodu (viz sloupce s názvem Druh v Tabulce č. 1, 2 a 3).

Houby asociované s hmyzem:

Ophiostoma spp., *Geosmithia* spp., *Eucasphaeria capensis*.

Houby saprofytické a potenciálně patogenní:

Všechny druhy rodu *Fusarium*, *Sistotrema brinkmannii*, *Beauveria pseudobassiana*, *Massarina* sp., *Paracamarosporium fagi*, *Penicillium* spp., *Cladosporidium* sp., *Coniochaeta* sp., *Naganishia diffluens*, *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp, *Coniothyrium* sp., *Mycocalicium victoriae*. Patří sem i všechny kvasinky, které byly jak u brouků, tak v kontrole.

Houby endofytické:

Všechny houby izolované z kontroly patří mezi endofytické houby. Jde o zástupce rodu *Fusarium*, *Pyrenochaeta* sp., *Dothideales* sp., *Nectria aurigera*. Zajímavý je nález druhu *G. flava*.

Nejčtenější houby:

U *H. crenatus* byly nejčtenější různé druhy rodu *Penicillium*. To je dáno tím, že jsme sbírali brouky těsně před tvorbou snubní komůrky, a proto na sobě mají mnoho kontaminantů z prostředí mimo chodbičky. To je případ i druhé nejčtenější houby *Beauveria pseudobassiana*, což je patogen hmyzu, ale zároveň i častý endofyt (Rehner et al. 2011).

U *H. fraxini* jsou jednoznačně nejčetnější kvasinky. Brouci, kteří ještě neopustili místo kuklení, jsou obaleni v drtinkách, jež obsahují i výkaly. Předpokládáme, že se jedná o kvasinky podílející se na trávení složitých polysacharidů. Myslíme si, že kvasinky působí nejen jako ektosymbionti, ale pomáhají broukům i uvnitř střeva. Kvasinky u *H. crenatus* budou pravděpodobně obdobně důležité, i když jsou zastíněny počty kontaminantních druhů hub.

Další velmi čtené houby u *H. fraxini* byly endofyty. To je velmi široká ekologická skupina hub, která může napadat živé části stromů, stejně tak rozkládající se dřevní hmotu, a dokonce i brouka.

Houby nalezené v kontrole patří mezi endofyty a řada z nich je známá i jako pozdější rozkladači mrtvé rostlinné hmoty, případně jako parazité hmyzu (*F. larvarum*).

Houby asociované s hmyzem:

Kromě ophiostomatálních hub a Geosmithií byl zjištěn ještě další druh houby, která může přinést kůrovcům benefit. Jedná se o druh *Eucasphaeria capensis*, jež se u brouků *Hylobius abietis* podílí na konverzi komunikačních feromonů. Tím může lákat nebo odpuzovat své další konspecifické jedince (Azeem et al. 2015). V našem případě se vyskytovala u *H. crenatus*.

Saprofytní a potenciálně patogenní houby:

V této ekologické kategorii nalezneme mnoho hub, které využívají jak živá rostlinná pletiva, tak i odumírající dřevní hmotu. Zároveň jsou zde často rody se širokým spektrem hostitelů a substrátů.

Rod *Fusarium* sestává z generalistických patogenních hub, které napadají nejen hmyz, ale také rostliny a člověka a zároveň mohou žít i endofyticky (Uhlig et al. 2007, Zhang et al. 2006). Jako výsledné druhy jsme zaznamenali *F. avenaceum*, *F. solani* a *F. lateritium* u brouků. V kontrole se vyskytoval druh *F. larvarum*. Mezi saprofyty můžeme řadit i entomopatogenní houby rodu *Beauveria* (Rehner et al. 2011).

Mezi hemibiotrofické saprofyty řadíme např. *Massarina* sp. (Voglmayr & Jaklitsch 2011) a *Sistotrema brinkmannii* (Ullrich & Raper 1975). Za zmínku stojí jistě i *Mycocalicium victoriae*, což je generalista, který je tolerantní k velkým teplotním rozsahům, má proto velký areál rozšíření (Pilotti et al. 2012). *Paracamarosporium fagi*

je saprofytickým generalistou – predátorem (Crous et al. 2015). *Botryosphaeria stevensii* je fytopatogenní houba způsobující rakovinu dřeviny (Bakys et al. 2009).

Houby endofytické:

Mezi endofytické houby řadíme ty, jež dokáží žít v rostlinných pletivech, aniž by je poškozovaly. Z této definice sem patří všechny druhy izolované z kontroly. Mezi nimi například zástupci rodu *Pyrenochaeta* žijící v kmenech dřevin (Cloete et al. 2011) a *Nectria aurigera* jako charakteristický endofyt jasanu (Lechat et al. 2002).

Endofytní houby přežívají ve zdravých pletivech rostliny a po jejím oslabení či smrti mohou fungovat jako patogeny či saprofyty. To dokazuje i nalezené spektrum hub, včetně patogenní *Botryosphaeria stevensii*. Za zmínku ovšem stojí i přítomnost *Geosmithia flava* v 1,4 % u kontroly. 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 (např. *Hordeum* sp., Kolařík et al. 2004). Podobně širokou ekologickou niku (tj. požerky hmyzu, zdravé dřeviny a další substráty) má i několik dalších druhů rodu *Geosmithia*, jako je *G. pallida*, *G. putterillii* či *G. fassatae* (Kolařík et al. 2004, McPherson et al. 2013).

Zajímavostí je i přítomnost entomopatogenu *Fusarium larvarum* v kontrole, který evidentně nenapadá pouze brouky ve stádiu larev (Cozzi et al. 2000), ale také dokáže žít saprofytický.

Kvasinky:

Naneštěstí se nepovedlo získat sekvence pro dostatečný počet morfotypů, navíc určení pomocí ITS nebyla přesná. Přesto si tróufáme shrnout, že kvasinky nalezené u brouků se mohou volně asociovat s larvami či dospělci, ale mohou žít i samostatným životem. Jedná se proto o všechny ekologické skupiny – houby asociované s brouky (trávení), saprofyty i endofyty. Konkrétní kvasinky určené v této studii řadíme mezi endofyty: černou kvasinku *Dothideales* sp. (Pugh & Buckley 1971), kvasinku *Filobasidium wieringae* (Glushakova & Kachalkin 2017); případně mezi saprofyty: *Piskurozyma capsuligena*, která žije v půdě nebo v listovém odpadu (Mašínová et al. 2017). V průběhu zpracování celého projektu se pokusíme vazbu brouků a kvasinek rozklíčovat, nyní však nelze odhadovat jejich konkrétní vztahy.

Překryv hub nalezených u obou druhů brouků a v kontrole:

Vzhledem k nedokonalému vzorkování jsme nebyli schopni porovnat stejná vývojová stádia obou druhů hmyzu. Při porovnání přítomnosti jednotlivých taxonů napříč vzorky jsme zaznamenali překryv pouze u generalistů, jako jsou *Penicilium* spp., *Fusarium* spp. a *Piskurozyma capsuligena*.

Naše práce ukázala absenci ophiostomatálních hub u *H. fraxini* a přítomnost hub rodu *Geosmithia*, které naopak chyběly u *H. crenatus*. Jediná dostupná data o celkové diverzitě hub u druhu *Hylesinus crenatus* na našich jasaních poskytuje Kirschner (2001), který udává, že 74 % dospělců přenášelo houby rodu *Geosmithia* (určeno jako *G. putterillii*), 68 % dospělců *Penicillia* a 15 % dospělců houby *Beauveria bassiana*. Naše výsledky jsou srovnatelné, i když byla zachycena menší frekvence hub *Geosmithia*. V případě mykobioty asociované s *H. crenatus* podobnou možnost srovnání nemáme, protože tento brouk nebyl patrně po stránce mykologické studován.

V tabulkách se vyskytuje velké množství morfotypů vláknitých hub a kvasinek, které nelze zcela přesně určit. Důvodem byla nedostatečná kultivace ze vzorků, případně kontaminace při manipulaci a následné přerostení jiným druhem. Příště by bylo vhodné dbát velmi důkladně na sterilitu prostředí a vést si seznam fotografií, který umožní párovat houby vyrostlé z hmyzu s těmi po přeočkování na menší Petriho miskou.

Důležitým poznatkem je i fakt, že se v žádném vzorku neobjevila nebezpečná fytopatogenní houba *Chalara fraxinea*, která způsobuje chřadnutí jasanů (Kowalski 2006).

***H. crenatus* a ophiostomatální houby:**

Ve všech třech sběrech byla přítomna stejná sekvence z této skupiny, a to *Ophiostoma catonianum*. Díky kombinaci sekvence ITS a β -tubulin se domníváme, že se jedná o druh blízce příbuzný této houbě, avšak nepopsaný (podobnost u ITS byla 99 %, ale u β -tubulinu pouze 98 %).

Frekvence této ophiostomatální houby byla u *H. crenatus* 5,6 %. Domníváme se, že i tento relativní počet CFU je stále vhodný pro kolonizaci lýka dospělými brouky. Předpokládáme, že frekvence symbiotických hub bude vyšší v chodbičkách než u dospělých brouků.

Ophiostomatální houby byly nalezeny pouze u *H. crenatus*, můžeme tedy usuzovat, že mají důležitou funkci ve vztahu k těmto broukům, potažmo k floemofágním kůrovcům napadajícím tlusté větve a kmeny dřevin.

***H. fraxini* a *Geosmithia*:**

Celková frekvence kolonií rodu *Geosmithia* tvoří 2,02 % u *H. fraxini*. Brouci vylétávající z larválních komůrek si tedy s sebou houby rodu *Geosmithia* přenášejí, ale jejich frekvence se opět zvyšuje až po úspěšné kolonizaci dřeva a vylíhnutí larev další generace.

Dva druhy se nepodařilo určit molekulárně, proto jsme mohli jen zaznamenat jejich příspěvek k celkové početnosti (sběr z června a září 2014). Další houby se však podařilo identifikovat jako *G. flava*, což je druh generalistický, častý na jasaněch a z naší studie zjevně vyplývá, že může žít i bez přítomnosti brouka (Kolařík et al. 2004, Kolařík et al. 2008) a *Geosmithia* sp. 5, což je příbuzný druh *G. pallida* a taktéž je spíše generalistou na listnatých dřevinách (Kolařík et al. 2008). Nakonec se zde objevuje ještě *Geosmithia* sp. 12, což je druh úzce asociovaný s jasanou (Kolařík et al. 2008). Diverzita rodu *Geosmithia* popsána u *H. fraxini* odpovídá očekáváním dle Kolaříka a kol. (2008).

Lýkohubům v tenkých větvích jsou pravděpodobně prospěšné všechny druhy tohoto rodu, jelikož jejich vazba bývá častá. Biochemickou a fyziologickou podstatu tohoto vztahu je nutné teprve popsat.

9 ZÁVĚR

Diplomová práce na téma „Mikroorganismy asociované s brouky rodu *Hylesinus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) na jasanech“ poskytuje díky použitým molekulárním metodám přehled vláknitých hub a kvasinek přítomných v broucích a chodbičkách dvou druhů kůrovců. Na základě barcodové sekvence jednotlivých morfotypů byly určeny rody, případně druhy daných hub a stanoveny ekologické skupiny.

Škála vysledovaných morfotypů zahrnovala houby asociované s brouky, houby endofytické, saprofytické a potenciálně patogenní. Nejvíce nalezených hub žije saprofytickým způsobem života. Všechny ekologické skupiny zahrnovaly vláknité houby i kvasinky, ačkoliv posledně jmenované nebylo možné určit příliš podrobně. Nicméně v kontrole a u *H. fraxini* představovaly kvasinky nejpočetnější morfotypy. Znamená to, že tvoří vazby pouze s larvami či brouky. Hrají jistou úlohu při asociaci s rostlinami, nebo je jejich existence zcela nezávislá. Proto spatřujeme velký potenciál v dalším výzkumu vzájemných vztahů mezi kvasinkami, dřevinami a brouky.

Předpokladem našeho výzkumu bylo, že houby rodu *Ophiostoma* a *Geosmithia* 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*. Funkce těchto dvou skupin hub zjišťovány nebyly, protože se jedná pouze o popisnou studii. Další houbou, která byla zřejmě asociována přímo s kůrovci, byl druh *Eucasphaeria capensis*. Můžeme se domnívat, že tato houba mění signál vysílaný konspicivním jedincům *H. crenatus* při napadení stromu. Toto tvrzení však bude ještě potřeba podložit více daty.

Významné bylo zjištění, že v žádném vzorku jsme neidentifikovali závažný patogen jasanu *Hymenoscyphus fraxineus*. Brouci rodu *Hylesinus* tedy nepředstavují riziko spojené s přenosem tohoto houbového patogenu, ale jde o druhotné škůdce. Stromy oslabené houbovou nákazou totiž umožňují snadný přístup dřevokazným broukům a dalším patogenům. (Kowalski 2006).

10 SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

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.

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(1), 36-47. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00383.x>

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.

AZEEM, M.; TERENIUS, O.; RAJARAO, G. K.; NAGAHAMA, K.; NORDENHEM, H.; NORDLANDER, G.; BORG-KARLSON, A. K. Chemodiversity and biodiversity of fungi associated with the pine weevil *Hylobius abietis*. *Fungal biology*, 2015, 119.8: 738-746.

BAKYS, R.; VASAITIS, R.; BARKLUND, P.; THOMSEN, I. M.; STENLID, J. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *European Journal of Forest Research*, 2009, 128.1: 51-60.

BARRAS, S.; PERRY, T. Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleopt.: Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 1972, 71.1-4: 95-104.

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.

BENTZ, B. J.; SIX, D. L. Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 2006, 99.2: 189-194.

BERRYMAN, A. A. Adaptive pathways in scolytid-fungus associations. *Insect-fungus interactions*, 1989, 3: 145-159.

- BINZ, T.; CANEVASCINI, G. Xylanases from the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 49.3: 159–175.
- CASSIER, P.; LÉVIEUX, J.; MORELET, M.; ROUGON, D. The mycangia of *Platypus cylindrus* Fab. and *P. oxyurus* Dufour (Coleoptera: Platypodidae). Structure and associated fungi. *Journal of Insect Physiology*, 1996, 42.2: 171-179.
- CLAYTON, R. B. The utilization of sterols by insects. *Journal of lipid research*, 1964, 5.1: 3-19.
- CLOETE, M.; FOURIE, P. H.; ULRIKE, D. A. M. M.; CROUS, P. W.; MOSTERT, L. Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 2011, 50.4: 176-190.
- COZZI, G.; STORNELLI, C.; MORETTI, A.; LOGRIECO, A.; PORCELLI, F. Field evaluation of *Fusarium larvarum* formulations in the biocontrol of *Saissetia oleae* on olive in Apulia. In: *IV International Symposium on Olive Growing* 586. 2000. p. 811-814.
- 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.
- CROUS, P. W.; SCHUMACHER, R. K.; WINGFIELD, M. J.; LOMBARD, L.; GIRALDO, A.; CHRISTENSEN, M.; GROENEWALD, J. Z. Fungal systematics and evolution: FUSE 1. *Sydowia*, 2015, 67: 81-118.
- DESNEUX, N.; RAMÍREZ-ROMERO R.; BOKONON-GANTA; A. H., BERNAL J. S. Attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* to host (*Spodoptera frugiperda*) frass is affected by transgenic maize. *Ecotoxicology*. Springer US, 2010, 19.7: 1183-1192.
- DIGUISTINI, S.; WANG, Y.; LIAO, N. Y.; TAYLOR, G.; TANGUAY, P.; FEAU, N.; TSUI, C. K. Genome and transcriptome analyses of the mountain pine beetle-fungal symbiont *Grosmannia clavigera*, a lodgepole pine pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108.6: 2504-2509.

- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, 2004, 135.4: 1893-1902.
- 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.
- GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. Y. Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. *Microbiology*, 2004, 73.2: 184-188.
- GLUSHAKOVA, A. M.; KACHALKIN, A. V. Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact. *Microbiology*, 2017, 86.1: 128-135.
- GREBENNIKOV, V. V.; LESCHEN, R. A. External exoskeletal cavities in Coleoptera and their possible mycangial functions. *Entomological Science*, 2010, 13.1: 81-98.
- HARRINGTON, T. C. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*, 1993, 161-172.
- 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.
- HARRINGTON, T. C. Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. *Insect-fungal associations: ecology and evolution*, 2005, 1: 22.
- 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.; KOLAŘÍK M.; KIRKENDALL, L. R. A new record of fungus-beetle symbiosis in Scolytodes bark beetles (Scolytinae, Curculionidae, Coleoptera). *SYMBIOSIS-REHOVOT-*, 2007, 43.3: 151.

- HULCR, J.; ROUNTREE, N. R.; DIAMOND, S. E.; STELINSKI, L. L.; FIERER, N.; DUNN, R. R. Mycangia of ambrosia beetles host communities of bacteria. *Microbial ecology*, 2012, 64.3: 784-793.
- 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.
- JANKOWIAK, R.; KOLAŘÍK, M.; BILAŃSKI, P. Association of Geosmithia fungi (Ascomycota: Hypocreales) with pine- and spruce-infesting bark beetles in Poland. *Fungal Ecology*. Elsevier, 2014, (11), 71-79. ISSN: 1754-5048.
- JANKOWIAK, R.; ROSSA, R.. Associations between Pityogenes bidentatus and fungi in young managed Scots pine stands in Poland. *Forest Pathology* 38, 2008, 169-177.
- 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. *Trichomyces and other fungal groups*, 2001, 175-196.
- KLEPZIG, K. D.; MOSER, J. C.; LOMBARDERO, F. J.; HOFSTETTER, R. W.; AYRES, M. P. Symbiosis and competition: complex interactions among beetles, fungi, and mites. 2001.
- KOLAŘÍK, M.; JANKOWIAK, R. Vector affinity and diversity of Geosmithia fungi living on subcortical insects inhabiting Pinaceae species in Central and Northeastern Europe. *Microbial ecology*, 2013, 66.3: 682-700.
- 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.; 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.
- 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.
- KOK, L. T.; NORRIS, D. M. Comparative sterol composition of adult female *Xyleborus ferrugineus* and its mutualistic fungal ectosymbionts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1973, 44.2: 499-505.
- 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 ash dieback. *Forest Pathology*, 2009. 39: 304–308.
- KŘÍSTEK, J.; URBAN, J. *Lesnická entomologie*. Vyd. 2., upr. Praha: Academia, 2013, 30-45 p. ISBN 978-80-200-2237-0.
- LANDELL, M. F.; BILLODRE, R.; RAMOS, J. P.; LEONCINI, O.; VAINSTEIN, M. H.; VALENTE, P. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2010, 60.1: 244-248.
- LATGÉ, J. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12.2: 310-350.
- LEACH, J. G.; ORR, L. W. The interrelationships of bark beetles and blue-staining fungi in felled Norway pine timber. *Readings in Insect-plant Disease Relationships*, 1973, 49: 233.
- LECHAT, Ch. New European discoveries of *Nectria aurigera*. *Bulletin de la Société Mycologique de France*, 2002, 118.1: 55-60.
- LIEUTIER, F.; DAY, K. R.; BATTISTI, A.; GREGOIRE, J. C.; EVANS, H. F. (ed.). *Bark and wood boring insects in living trees in Europe: a synthesis*. 2004.

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

MARTIN, M. M.; JONES, C. G.; BERNAYS, E. A. The evolution of cellulose digestion in insects [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1991, 333.1267: 281-288.

MAŠÍNOVÁ, T.; BAHNMANN, B. D.; VĚTROVSKÝ, T.; TOMŠOVSKÝ, M.; MERUNKOVÁ, K.; BALDRIA, P. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93.2: fiw223.

MATHENY, P. B.; WANG, Z.; BINDER, M.; CURTIS, J. M.; LIM Y. W.; NILSSON, R. H.; LANER, E. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular phylogenetics and evolution*, 2007, 43(2), 430-451.

MCPHERSON, B. A.; ERBILGIN, N.; BONELLO, P.; WOOD, D. L. Fungal species assemblages associated with *Phytophthora ramorum*-infected coast live oaks following bark and ambrosia beetle colonization in northern California. *Forest Ecology and Management*, 2013, 291: 30-42.

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

PATOČKA, J. *Chalara fraxinea*: houba, která ničí jasany. *Toxicology* [online]. 2013–8-4 [cit.2017-01-06]. Dostupné z WWW: < <http://www.toxicology.cz/>>. modules.php?name=News&file=article&sid=593. ISSN 1213-7103.

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.

PFEFFER, A. Zentral- und westpaläarktische Borken- und Kernkäfer: (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae). *Pro Entomologia, c/o Naturhistorisches Museum Basel*, c1995. ISBN 39-520-8406-9.

- PILOTTI, M.; LUMIA, V.; DI LERNIA, G.; BRUNETTI, A. Development of Real-Time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus* spp. *European journal of plant pathology*, 2012, 134.1: 61-79.
- PODRÁZSKÝ, V., Lesnická práce: Meliorační a zpevňující dřeviny - přínos, nebo ztráta? *Lesnická práce* [online]. 2006-06-0 [2017-01-06]. Dostupné z WWW: < <http://www.lesprace.cz/>>. ISSN 0322-9254.
- PRZYBYŁ, K.; DAHM, H.; CIESIELKA, A.; MOLÍŃSKI, K. Cellulolytic activity and virulence of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* isolates. *Forest Pathology*, 2006, 36.1: 58-67.
- PUGH, G. J. F.; BUCKLEY, N. G. *Aureobasidium pullulans*: an endophyte in sycamore and other trees. *Transactions of the British Mycological Society*, 1971, 57.2: 227-231.
- QUELOZ, V.; GRÜNIG, C. R.; BERNDT, R.; KOWALSKI, T.; SIEBER, T. N.; HOLDENRIEDER, O. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*, 2011, 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.
- SEIBOLD, S.; BÄSSLER, C.; BRANDL, R.; GOSSNER, M. M.; THORN, S.; ULYSHEN, M. D.; MÜLLER, J. Experimental studies of dead-wood biodiversity—a review identifying global gaps in knowledge. *Biological Conservation*, 2015, 191: 139-149.
- SEIFERT, K. A.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J. *The ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2013.
- SHIFRINE, M.; PHAFF, H. J. The association of yeasts with certain bark beetles. *Mycologia*, 1956, 48.1: 41-55.
- SIX, D. L.; PAINE, T. D. *Leptographium pyrinum* is a mycangial fungus of *Dendroctonus adjunctus*. *Mycologia*, 1996, 739-744.
- SIX, D. L.; PAINE, T. D. Effects of mycangial fungi and host tree species on progeny survival and emergence of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Environmental Entomology*, 1998, 27.6: 1393-1401.

- SIX, D. L. Bark beetle-fungus symbioses. *Insect symbiosis*, 2003, 1: 97-114.
- 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*, 2011, 56: 255-272.
- 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.
- SPURNÁ, J.; KAPITOLA, P.; RŮŽIČKA, T., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: *Informační leták nebezpečný škůdce jasanů - krasec*. 1. Praha 1 - Těšnov: Ministerstvo zemědělství, 2010. Dostupné z www: < <http://eagri.cz> >.
- SVALDI, R.; ELGERSMA, D. M. Further studies on the activity of cell wall degrading enzymes of aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. *Forest Pathology*, 1982, 12.1: 29-36.
- TAMERLER, C.; KESHAVARZ, T. Lipolytic enzyme production in batch and fed-batch cultures of *Ophiostoma piceae* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2000, 75.9: 785-790.
- UHLIG, S.; JESTOI, M.; PARIKKA, P. *Fusarium avenaceum*—the North European situation. *International journal of food microbiology*, 2007, 119.1: 17-24.
- ULLRICH, R. C.; RAPER, J. R. Primary homothallism—relation to heterothallism in the regulation of sexual morphogenesis in *Sistotrema*. *Genetics*, 1975, 80.2: 311-321.
- VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeasts as insect endosymbionts. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, New York, 2005, 211-243.
- VESELSKÁ, T.; KOLAŘÍK, M. Application of flow cytometry for exploring the evolution of *Geosmithia* fungi living in association with bark beetles: the role of conidial DNA content. *Fungal Ecology*, 2015, 13: 83-92.

VOGLMAYR, H.; JAKLITSCH, W. M. Molecular data reveal high host specificity in the phylogenetically isolated genus *Massaria* (Ascomycota, Massariaceae). *Fungal Diversity*, 2011, 46.1: 133-170.

WOOD, S. L. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph.*, 1982.

ZIPFEL, R. D.; DE BEER, Z. W.; JACOBS, K.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in mycology*, 2006, 55: 75-97.

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.