

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Václav Havlíček

**Role mikrobiálních symbiontů v životním cyklu *Ips typographus***

The role of microbial symbionts in the life cycle of *Ips typographus*

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D

Praha, 2020



**Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Miroslavu Kolaříkovi Ph.D za jeho cenné a věcné připomínky a osvětlení některých problematičtějších témat práce. Také bych rád poděkoval svým rodičům za podporu nejen během psaní této práce, ale během celé doby studia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla využita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 08. 06. 2020

Podpis: .....

## Abstrakt

Kůrovci (*Coleoptera; Scolytinae*) jsou považováni za škůdce, protože napadají dřeviny na hospodářských, chráněných a rekreačních plochách. Larvy těchto brouků se vyvíjí pod kůrou stromů, kde narušují lýko a tím a i transport látek v rostlině. *Ips typographus* napadá smrk ztepilý (*Picea abies*), čímž působí velké hospodářské škody. Na životní cyklus *I. typographus* mají vliv jeho mikrobiální symbionti, kteří ho mohou ovlivňovat jak pozitivně, tak negativně. Většina symbiontů je fakultativních a tedy nejsou na hostiteli zcela závislí, kůrovec však ke svému přežití tyto symbionty potřebuje. Tyto houby a bakterie jsou rozšiřovány broukem, často se však mohou šířit i nezávisle na něm. Menší část symbiontů jsou tzv. obligátní symbionti, kteří jsou vázání čistě na kůrovce. Mikroby pomáhají kůrovci překonat obranu stromu a po úspěšném napadení stromu i s příjmem živin a trávením potravy. Protože přijímaná rostlinná hmota má vysoký poměr přijímaného uhlíku ku dusíku, dokáží některé houby snižovat tento poměr v okolí chodbiček vyvíjejících se larev a některé bakterie fixují vzdušný dusík, či využívají odpadní kyselinu močovou, čímž se výrazně podílejí na koloběhu dusíku. Diverzita intestinálního mikrobiomu kůrovců se během vývoje zvětšuje. To nám ukazuje, že někteří mikroby jsou přijímáni z okolí. Přítomnost a prevalenci intracelulárních symbiontů u kůrovců neznáme. Studium mikrobiálních symbiontů se provádí především za pomoci kultivace, v posledních letech se však přidávají i metody, při kterých kultivace není vyžadována.

Klíčová slova: kůrovci, *Ips typographus*, holobiont, symbióza, bakterie, houby

## Abstract

Bark beetles (Coleoptera; Scolytinae) are usually considered as pests, because they attack trees in the protected and recreational forests and in the forests with economic importance. Their larvae develop under the bark, where it disturb the conductive tissues and affect the nutrient transport. *Ips typographus* attack Norway spruce (*Picea abies*). *P. abies* is an economic important woody plant. The life cycle of bark beetle is affected by its microbial symbionts in both positive and negative manner. Most of these organisms are facultative symbionts and they aren't completely depend on bark beetles. However, bark beetles are completely depend on its microbial symbionts. Symbiotic bacteria and fungus can be disseminated without bark beetles, but they are often spread by beetles. Microbial symbionts help overcome the defence mechanism of attacked trees, later they help with food digestion. Some fungi species can accumulate nitrogen in areas near the feeding chambers and improve ratio between carbon and nitrogen in plant tissue. Some bacteria are able to fix atmospheric nitrogen or use uric acid, helping with nitrogen recycling. Number of intestinal symbiont diversity increase in the course of host development. This symbionts are probably gained during feeding. The presence and prevalence of the intracellular symbionts is not known in bark beetles. A lot of studies use culture-dependent methods to examine microbial symbiont, but now days are this methods supplemented by culture-independent methods.

Key words: bark beetles, *Ips typographus*, holobiont, symbiosis, bacteria, fungi

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Symbióza kůrovců.....	2
2.1. Symbióza s houbami.....	2
2.1.1. Ophiostomatální houby.....	3
2.1.2. Kvasinky a neophiostomatální houby.....	5
2.2. Symbióza s bakteriemi.....	7
2.2.1. Role bakterií při kolonizaci stromu.....	7
2.2.2. Role bakterií při trávení potravy a recyklaci živin.....	8
2.2.3. Interakce symbiotických bakterií s dalšími organizmy společenstva.....	11
2.2.4. Intracelulární symbióza.....	12
2.3. Změny mikrobiálních symbiontů v rámci životního cyklu kůrovce.....	14
3. Moderní metody studia.....	15
3.1. Hlavní mezery v poznání.....	17
3.2. Zaměření dalšího výzkumu.....	18
4. Závěr.....	20
5. Seznam zdrojů.....	21

# 1. Úvod

Kůrovci jsou diverzifikovaná skupina brouků patřící mezi nosatcovité (*Curculionidae*) do podčeledi *Scolytinae*. Podle potravní strategie je dělíme na herbivorní, mykofágní (tzv. ambrosiový brouci), popřípadě druhy se smíšenou potravní strategií (tzv. phloeomykofágní druhy). Mnoho druhů kůrovců tráví většinu svého života pod kůrou stromů, kde se krmí, a toto útočiště opouštějí pouze jako dospělci po vylíhnutí z kukly, kdy hledají úkryt pro přezimování, či vhodné rostliny ke kolonizaci. V těchto nových stanovištích následně samičky nakladou svá vajíčka (Anderbrant 1990). Někteří kůrovci (tzv. primární či agresivní) napadají vizuálně živé a mírně chřadnoucí stromy, které následně usmrtí, či stromy čerstvě usmrčené. Další skupinou jsou tzv. sekundární kolonizátoři, kteří nenapadají a neusmrcují vitální stromy, ale žijí pouze v jedincích chřadnoucích či odumřelých. Mezi faktory oslabující hostitelskou dřevinu může patřit jak vnitrodruhová, tak i mezidruhová kompetice rostliny, ale i faktory abiotické, jako je sucho, přílišné zamokření, polomy a vývraty v důsledku silného větru či deficiencie živin v půdě (Lewis and Lindgren 2002). Mnoho kůrovců má také druhovou specifitu k rostlinám, které napadají (Pureswaran and Borden 2003), díky tomu je jejich rozšiřování v lesních monokulturách velmi usnadněno. Právě kvůli jejich výskytu v hospodářských a chráněných lesích jsou považováni za škůdce.

Tato práce se zaměřuje na mikrobiální symbionty lýkožrouta smrkového, *Ips typographus*, který napadá smrk ztepilý (*Picea abies*), popřípadě další taxony z čeledi *Pinaceae* (Pfeffer 1995). Smrk ztepilý je hospodářsky významný a vysazuje se tedy na velkých plochách řady evropských států. V posledních letech jsou tyto stromy oslabeny suchem a jejich odolnost proti tomuto druhu kůrovce klesla. Tyto faktory vedou ke zvýšenému hynutí smrků (Ditmarová et al. 2009; Huang et al. 2020). *Ips typographus* napadá přednostně oslabené stromy, avšak po přemnožení je schopný napadat i zdravé stromy, které následně oslabí a ty umírají (Mulock and Christiansen 1986; Biedermann et al. 2019). Tyto faktory vedou k rychlému šíření tohoto druhu.

*Ips typographus* žije v symbióze s řadou bakteriálních a houbových symbiontů, přičemž někteří nejspíše hrají v jeho životním cyklu klíčovou roli, jejich funkce jsou různé a vzájemně se doplňují (Zhao et al. 2019). Dle lokalizace lze symbionty rozdělit na vně žijící ektosymbionty a v něm žijící endosymbionty. V případě hmyzu jsou endosymbionti převážně lokalizováni ve střevě, popřípadě gonádách a hemolymfě. Zatímco studiem ektosymbiontů se zabývá řada prací, tak studium intestinálního mikrobiomu hmyzu je teprve na svém začátku. Cílem mé práce

je shrnout poznatky o diverzitě, lokalizaci a ekologické roli mikrobiálních symbiontů lýkožrouta smrkového. Mnoho těchto symbiontů bylo zjištěno zkoumáním metagenomu požerků, střev larev a dospělců a některé druhy byly zjištěny z chodbiček brouka. Práce dále shrnuje moderní metody studování symbiontů a navrhuje jejich využití v dalším výzkumu.

## 2. Symbióza kůrovců

Symbióza označuje jakékoliv úzké soužití dvou či více organismů, tj. symbiontů. Všichni symbionti ovlivňují ostatní členy symbiotického vztahu, a to buď pozitivně nebo negativně, což vede k velmi komplexním a proměnlivým interakcím (Paracer and Ahmadjian 2000). Symbionti kůrovců jsou ovlivňováni především kompeticí o zdroje uvolňovanými látkami, schopností metabolizovat látky z prostředí, které jsou pro jiné členy společenstva toxické a kůrovci také pozitivně ovlivňují asociované mikroorganismy, některé členovce a hlístice tím, že je přenáší na nová stanoviště (Pernek et al. 2008). Někteří symbionti mohou kůrovce ovlivňovat v jeho určité vývojové fázi pozitivně, zatímco v jiné fázi negativně. (Cardoza et al. 2008).

Všichni kůrovci napadají již odumřelý rostlinný materiál nebo živé rostliny, přičemž napadané rostliny jsou většinou negativně ovlivněny (Grégoire et al. 2015). Některé druhy kůrovců napadají dřeviny ve více jedincích. Mezi tyto druhy patří i zástupci druhu *Ips typographus* a komunikace mezi jedinci probíhá pomocí feromonů (Christiansen et al. 1987). Ti se při rané fázi kolonizace stromu ovlivňují pozitivně, protože jim to umožní úspěšné napadení. V pozdějších fázích se při určité hustotě již neovlivňují. Je-li však v okolí málo zdrojů, jejich hustota se zvyšuje a ovlivňují se negativně, což především platí pro jejich krmící se larvy (Schlyter et al. 1987). Různé druhy kůrovců obývající navzájem stejný strom spolu také soupeří (Birch et al. 1980).

K symbiontům kůrovců se řadí zástupci virů, bakterií, hub i živočichů, mezi které se nejčastěji řadí zástupci z kmenů členovců a hlístic. Zatímco roztoči, řadící se k členovcům, jsou ektosymbionti žijící na povrchu těla kůrovců, a proto se nazývají foretičtí, ostatní skupiny žijí jak ektosymbioticky, tak i endosymbioticky (Hofstetter et al. 2015). Dále je popsána pouze symbióza s houbami a bakteriemi.

### 2.1. Symbióza s houbami

Jak už bylo zmíněno, kůrovci včetně *Ips typographus* žijí symbioticky s řadou druhů hub, která nacházíme jak mezi ekto-, tak mezi endosymbionty. Většina těchto houbových symbiontů patří mezi askomycety, v této skupině se jako symbionti uplatňují nejčastěji houby ze skupiny



tzv. ophiostomatálních hub. Houby asociované s kůrovci nacházíme i ve skupinách *Mucoromycotina* a *Basidiomycota* (Jankowiak and Hilszczański 2005). Patří sem jak fakultativní symbionti, kteří žijí i v okolním prostředí, tak obligátní symbionti, které nenacházíme mimo těla či požerky kůrovců. Pro specifický přenos mikroorganismů, mají někteří kůrovci vyvinutý zvláštní orgán nazývaný mycangium (či mycetangium) (Barras and Perry 1972; Whitney and Farris 1970). *Ips typographus* tento orgán vyvinutý nemá a spory proto přenáší na povrchu svého těla, nebo i pod krovkami (Furniss et al. 1990). Jiní kůrovci, včetně těch patřících k rodu *Ips*, mohou spory hub přenášet v ústní dutině (Francke-Grosmann 1963). Spory se také mohou zachytávat na foretických roztočích žijících na těle brouka. Tito roztoči nemají žádný specializovaný orgán a stejně jako někteří kůrovci nesou spory na povrchu těla (Moser et al. 1989, 1997). Dalším mechanismem přenosu, který se jistě uplatňuje u střevní bioty, je přenos v zažívacím traktu.

### 2.1.1. Ophiostomatální houby

Nejvíce prozkoumanou skupinou hub asociovaných s kůrovci jsou houby řadící se do skupiny tzv. hub ophiostomatálních, které patří mezi *Ascomycota*, do řádů *Ophiostomatales* a *Microascales*. Přes třicet let nejvíce zkoumanou ophiostomatální houbou je fytopatogenní druh *Endoconidiophora polonica* (syn. *Ceratocystis polonica*, *Ophiostoma polonicum*). V napadených stromech byla zjištěna jak v bělovém dřevě v okolí chodbiček brouků, kde se vyskytuje nejvíce, tak i v těchto chodbičkách a v okolním lýku. *Ips typographus* také s největší pravděpodobností preferuje stromy, které již jsou *E. polonica* kolonizovány. Po napadení stromu broukem ihned kolonizuje bělové dřevo a vyskytuje se ve výrazně větším počtu, pokud byl broukem napaden již mrtvý strom. Také její početnost výrazně narůstá v epidemické fázi šíření kůrovce (Jankowiak 2005). *E. polonica* je schopná rozkládat fenoly, které používají napadené stromy ke své obraně, avšak v menší míře než druhy *Grosmania penicillata* a *Grosmania europioides* (Zhao et al. 2019). Uvolňuje některé těkavé látky, které může kůrovec rozeznávat a mohou tedy být používány ke komunikaci mezi těmito symbionty. *Ips typographus* je také podle uvolňovaných látek schopný od sebe jednotlivé symbiotické houby rozeznávat. *E. polonica* uvolňuje oproti *G. penicillata* a *G. europioides* méně 3-methyl-1-butanolu, 2-methyl-1-butanolu a 2-fenylethanolu, ale jako jediný zkoumaný druh produkuje acetát-estery těchto látek. (Kandasamy et al. 2019).

*G. penicillata* roste po napadení stromu kůrovcem v lýku i dřevě pomaleji než *E. polonica* (Solheim 1988). Krátce po napadení stromu roste pouze v lýku a do bělového dřeva prorůstá až později (Jankowiak 2005). Stejně jako symbiotický druh *G. europioides* efektivně rozkládá

stilbeny a flavonoidy, ale lignany katabolizuje rychleji (Zhao et al. 2019) a do svého okolí vypouští bicyklické seskviterpeny, přesněji  $\beta$ -caryophyllen a caryophyllene-oxid (Kandasamy et al. 2019). *G. penicillata* produkuje 2-methyl-3-buten-2-ol, což je jedna z hlavních složek agregačních feromonů hmyzu, ale v menším množství než *G. europioides*, která ho také dokáže vyrábět *de novo* z glukózy. Umožňuje tedy shlukování kůrovců při napadání hostitelského stromu (Zhao et al. 2015). Tato houba však může konkurovat *E. polonica* a výskyt jedné tak možná snižuje šanci na výskyt druhé (Jankowiak and Hilszczański 2005).

Hojně izolovanou houbou asociovanou s kůrovcem *Ips typographus* je *Ophiostoma bicolor* (Repe et al. 2015; Viiri and Lieutier 2004). Ta je spolu s *E. polonica* prvním kolonizátorem napadeného stromu, ale roste pomaleji. V raném stádiu napadení je nalézána v bělovém dřevě i v lýku, ve kterém je následně nahrazena *Graphium* sp., *G. penicillata* a *O. ainoae* (Jankowiak 2005; Solheim 1992). Jako většina symbiotických hub s kůrovci způsobuje modráni dřeva, ale méně než druhy *O. piceaperdum*, *O. ainoae* a *O. tetropii*. Spolu s *E. polonica* ale nejagresivněji napadá a znehodnocuje bělové dřevo (Sallé et al. 2005). Při kolonizaci stromu je schopná, stejně jako většina patogenních hub, rozkládat některé obranné látky, jako jsou taxifolin, katechin a proanthocyanidin, nekatabolizuje ale fenoly (Zhao et al. 2019). Žádné fenolické látky ani nevypouští do prostředí, kam ale dokáže vylučovat 2-methyl-1-butanol. Látky, které vylučuje, kůrovce *Ips typographus* nepřitahují, některé jej dokonce odpuzují (Kandasamy et al. 2019). *O. bicolor* nejspíše není sama schopná zabít dospělý a zdravý smrk, a její výraznější virulence je prokázána jen u semenáčků mladších než dva roky (Repe et al. 2015). *Ips typographus* někdy ve své epidemiologické fázi napadá i jiné jehličnany než *P. abies*. Pokud je napadeným stromem *Pinus sylvestris*, je *O. bicolor* klíčovým faktorem k úspěšnému napadení tohoto stromu, protože *E. polonica*, která rychle kolonizuje a zabíjí smrky *P. abies*, neproniká obranou borovice (Jankowiak and Hilszczański 2005).

Nejlépe prostudovanou antagonistickou houbou žijící v symbióze s kůrovci je *O. minus*. Ta se patrně u *I. typographus* nevyskytuje (Kirisits 2004). Přesný mechanismus, proč jsou některé houby antagonistické ke kůrovcům není znám. Předpokládá se ale, že to může být způsobeno tím, že nezvyšují koncentraci dusíku a fosforu v lýku v okolí chodbiček, kde se tyto brouci živí (Ayres et al. 2000). Spory této houby nikdy nejsou roznášeny v mycangiích ani u druhů, u kterých je vyvinuté, ale vždy na povrchu těla nebo na těle foretických roztočů. Samice před ovipozicí je schopná rozeznat zónu, kde *O. minus* tvoří perithecia a těmto místům se vyhýbá. Larvy, které se vyvíjejí v zóně, kde *O. minus* tvoří plodnice, obvykle umírají. Na druhou stranu, pokud se vyvíjejí v místech, které *O. minus* kolonizovala, ale netvoří zde plodnice, tak její vývoj probíhá normálně (Barras 1970). V tkáních, které byly kolonizovány touto houbou, se snižuje

množství sacharidů a volných aminokyselin. V lýku jehličnanů se vyskytuje sacharóza, fruktóza a glukóza a většina hub, včetně *O. minus*, jako první využívá fruktózu. V místech prorostlých houbami se snižuje i množství aminokyselin využitelných mikroorganismy i hmyzem. Zajímavé je, že množství tyrosinu a fenylyalaninu zůstává stejné jako ve sterilních zónách i v místech lýka, které kolonizovala *O. minus*. (Barras and Hodges 1969; Hodges et al. 1968).

Ophiostomatální symbiotické houby i některé bakterie mohou lákat parazitoidy a predátory kůrovců. Tento efekt byl prokázán pro *O. Ips*, kdy její přítomnost zvyšuje pravděpodobnost útoku na kůrovce *I. pini* od blanokřídlé *Heydenia unica*. Pro *O. minus* však podobný efekt potvrzen není (Boone et al. 2008; Sullivan and Berisford 2004).

Mezi další ophiostomatální houby často izolované jako symbionty kůrovce *I. typographus* patří druhy *O. ainoae*, *O. araucariae*, *O. cainii*, *O. clavatum*, *O. cucullatum*, *O. flexuosum*, *O. olivaceum*, *O. piceae*, *O. piceaperdum*, *O. tetropii*, *Ceratocystiopsis minuta*, *Graphium fimriisporum*, *G. pycnocephalum*, *Leptographium euphyes*, *L. lundbergii*, *L. procerum*, *Pesotum* sp., a v Japonsku také *O. japonicum* (Chang et al. 2018; Jankowiak 2005; Jankowiak and Hilszczański 2005; Solheim 1986, 1992; Viiri and von Weissenberg 1995, Viiri and Lieutier 2004; Yamaoka et al. 1997). Ophiostomatálních hub společně žijících a ovlivňujících kůrovce *I. typographus* je ale více (Kirisits 2004).

### 2.1.2. Kvasinky a neophiostomatální houby

Symbiotické kvasinky, stejně jako vláknité houby, ovlivňují celé společenství symbiotických kůrovců. Většina symbiotických kvasinek se vykytuje v chodbičkách v malém množství při napadání hostitelského stromu, ale daleko častější jsou jako zástupci intestinální mikrobioty (Rivera et al. 2009). Po úspěšném napadení dřeviny se jejich četnost jako ektosymbiontů zvyšuje a v pozdních fázích kolonizace opět klesá. Nejlépe je tento vývoj pozorován u *Hansenula holstii* a *Candida diddensii*, které spolu s *Candida nitratophila* nejrychleji přeměňují cis-verbenol na verbenon (Leufvén and Nehls 1986). I některé jiné kvasinkové kmeny jsou schopné této přeměny na verbenon. Mezi tyto kmeny, symbiotické s *Ips typographus*, patří *Candida molischiana*, *C. nitratophila* a *Pichia pinus* (Hunt and Borden 1990; Leufvén et al. 1984). Cis-verbenol je významnou složkou agregačních feromonů kůrovce *I. typographus* (Krawielitzki and Mori 1977), zatímco verbenon funguje jako jeho inhibiční složka (Bakke 1981), takže změna těchto látek vyvolá významnou změnu chování brouka. Možná to je důvod, proč četnost kvasinkových kmenů po úspěšném napadení stromu roste a při dostatečném množství verbenonu se již přestanou brouci shlukovat (Leufvén and Birgersson 1987).

Všechny symbiotické kvasinky umí tvořit z látek nacházejících se běžně v lýku kyslíkaté monoterpeny, jiné biologicky aktivní látky a ovlivňovat množství vyskytujících se rostlinných monoterpenů. Z kvasinek asociovaných s *Ips typographus* tvoří největší množství těchto látek druhy *C. molischiana* a *C. nitratophila*. Nejčastěji produkované monoterpeny jsou  $\alpha$ -terpineol, borneol, v menším množství i terpinen-4-ol, myrtenol, trans-pinocarveol a 2-phenyl-ethanol (Leufvén et al. 1988).

Kvasinka *Ogatea pini*, která žije symbioticky s americkými druhy kůrovců *Dendroctonus ponderosae* a *D. brevicomis*, patří mezi mutualistické symbionty a je přenášena v mycangiích. Také ovlivňuje produkci biologicky aktivních látek růst symbiotických hub. Stimuluje růst mutualistické houby *Entomocorticium* sp., ale růstu entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* brání (Davis et al. 2011). Můžeme předpokládat, že podobný mechanismus se uplatňuje i u evropských druhů kůrovců včetně *I. typographus*. *O. pini* také mění koncentraci některých monoterpenů v lýku, koncentrace látek, které její růst inhibují, snižuje, a koncentraci těch, které její růst stimulují, zvyšuje (Davis and Hofstetter 2011).

Přítomnost a ekologická role neophiostomatálních vláknitých askomycetů a mucoromycetů není příliš prozkoumána. Avšak víme, že mezi tyto symbionty patří několik entomopatogenních hub, jako jsou *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana* a *Isaria coleopterorum*. Několik identifikovaných druhů jsou i běžní endofyty hostitelských stromů a není známo, jak tyto endofyty interagují s kůrovcem nebo jeho symbiotickými mikroorganismy (Giordano et al. 2013). Na druhou stranu, neophiostomatální houby se vyskytují ve větší míře v napadených, mrtvých stromech (Jankowiak 2005). Velký vliv na populace kůrovců mají entomopatogenní houby, které jsou schopné svého hostitele zabít. Růst většiny těchto hub může být potlačován pomocí mutualistických kvasinek, nacházejících se na stěnách chodbiček (Davis et al. 2011). *B. pseudobassiana* je agresivní patogen hmyzu, včetně kůrovců. Tento patogen způsobuje smrt téměř všech napadených jedinců a také se dokáže rychle šířit v rámci populace dospělců. To je důvod, proč se o této houbě uvažuje jako o důležitém agens v biologickém boji proti řadě kůrovců, včetně *I. typographus* (Kocaçevik et al. 2016; Kreutz et al. 2004). Houby z rodu *Geosmithia* žijí v symbióze s množstvím brouků, včetně některých kůrovců (Kolařík and Jankowiak 2013). S *I. typographus* žije ale v symbióze jen vzácně (Linnakoski et al. 2016).

Oproti předchozím skupinám, jsou basidiomycety asociovány s kůrovcem podstatně méně. Větší význam mají pro hmyz, který se houbami živí. U kůrovců žijících v lýku se mykofágie vyskytuje poměrně málo, na rozdíl od některých jiných skupin hmyzu. Některé druhy kůrovců z rodu *Dendroctonus* a *Ips* mezi tento mykofágní hmyz patří také (Harrington 2005). V případě *I. typografus* není podíl hub na výživě znám, ale lze předpokládat, že není nijak zásadní.

Američtí mykofágní kůrovci se živí mnohem častěji basidiomycety než askomycety, v Evropě se v lýku žijící kůrovci živí spíše ambrosiovými houbami řadící se mezi ophiostomatální houby (Franke-grosmann 1952). Většina s kůrovci asociovaných druhů basidiomycetů jsou rozkladači dřeva a šíří se tedy nezávisle na hmyzu pomocí větru. Některé druhy se přizpůsobili částečně na šíření pomocí kůrovců. Druh *Phlebiopsis gigantea* tvoří konidie v komůrkách larev, které po přeměně v dospělce roznáší na další stanoviště. Zároveň však tvoří spory v plodnicích na vnější straně kmenu. Houby rodu *Entomocorticium* ztratily schopnost šířit se větrem a jejich rozšiřování je tak zcela závislé na hmyzu (Hsiau and Harrington 2003). Zvyšují ale množství živin v okolním lýku a samice, které se živí touto houbou kladou více vajec než jiné (Ayres et al. 2000; Whitney et al. 1987).

Při napadání mrtvého stromu soupeří mutualistické ophiostomatální houby s rozkladači ze skupiny *Basidiomycota*. Mezi tyto konkurenční rozkladače patří nejčastěji *Peniophora gigantea* a *Stereum sanguinolentum* (Dowding 1973). Basidiomycety také způsobují nemoci dřevin a tato onemocnění mohou být predisposicí ke kolonizaci kůrovci. *Armillariella mellea* způsobuje onemocnění kořenů a tím výrazně zvětšuje pravděpodobnost, že strom bude kolonizován kůrovci (Kulhavy et al. 1984). Vzácně je s *I. typographus* nalézána i *Exidia saccharina* (Kirschner 2010).

## 2.2. Symbióza s bakteriemi

Role bakterií v životním cyklu *I. typographus* a jejich diverzita je o poznání méně poznána než u hub, předpokládá se ale, že u kůrovců se bakterie žijící ve střevě mezi druhy příliš neliší a to ani při porovnání s ostatními nosatcovitými brouky (Hansen and Moran 2013). Jako své střevní symbionty má veškerý hmyz bakterie z kmenů *Proteobacteria* a *Firmicutes*, další se poté liší podle taxonomického zařazení nebo podle typu potravy (Colman et al. 2012).

### 2.2.1. Role bakterií při kolonizaci stromu

Některé bakterie, stejně jako houby, pomáhají broukovi pronikat obranou stromu a rozkládat nebo přeměňovat terpeny na jiné látky. Některé bakterie žijí jako endosymbionti stromu a po jeho napadení kůrovcem, strom obývají společně a je tedy možné, že jsou více asociované s rostlinou než s broukem. Mezi tyto bakterie patří zástupci rodů *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia* a *Serratia* a napadení kůrovcem možná vyvolá rychlou proliferaci těchto bakterií, a protože jsou schopné rozkládat řadu terpenů, umožňují úspěšnou kolonizaci brouky (Adams et al. 2013). Rod *Serratia* umí degradovat velké množství terpenů, ne však  $\alpha$ -pinen, ten je ale schopná do určité míry rozkládat *Rahnella* sp., která ho přeměňuje na 3-

isopropylbut-3-enovou kyselinu. Na druhou stranu, jiná studie schopnost *Serratia* sp. degradovat  $\alpha$ -pinen, potvrzuje, a dokonce ukazuje i to, že mírně tato látka podporuje její růst (Xu et al. 2016). Řada bakterií je také schopná rozkládat látky jako terpeny téměř stoprocentně pouze do určité koncentrace, po překročení této koncentrace se už rychlost rozkladu nezvyšuje a část terpenů zůstává v prostředí. Bakterie *Serratia* sp. a *Brevundimonas* sp. rozkládají kyselinu abietovou, která brání v růstu ektosymbiotických hub *O. montium* a *G. Clavigera* (Adams et al. 2013; Boone et al. 2013).

V Číně invazivní druh kůrovce *D. valens* napadá místní dřeviny, které se brání vypouštěním naringeninů. Ten snižuje životaschopnost tohoto brouka a je degradován pomocí mutualistické bakterie rostoucí na stěnách chodbiček patřící do rodu *Novosphingobium*. Tuto schopnost má i *Stenotrophomonas* sp., ale v menší míře než *Novosphingobium*. Až na pár výjimek mezi kvasinkami, tato látka není degradována houbami, a tak téměř celé množství rozkládají *Proteobacteria*, jejichž četnost je největší v místech nejintenzivnějšího rozkladu (Cheng et al. 2018).

Mikrobiální symbionti kůrovce *I. paraconfusus* produkují z myrcenu, který rostliny používají jako obraný monoterpen, feromony ipsenol a ipsdienol (Hunt and Borden 1989). *Bacillus cereus*, další symbiont tohoto kůrovce, syntetizuje z  $\alpha$ -pinenu verbenol (Brand et al. 1975). *B. cereus* ale možná nepřispívá k celkové produkci verbenolu v kůrovci, nebo jen málo. Brouci krmení antibiotiky obsahují menší množství ipsenolu a ipsdienolu, než jedinci, kteří antibiotiky krmení nejsou. Množství verbenolu však zůstává stejné (Byers and Wood 1981). Dále nebyl zjištěn vztah mezi množstvím přijímaného myrcenu a  $\alpha$ -pinenu a množstvím produkovaných feromonů. Jedinci, kteří se živí lýkem *P. sabiniana*, ve kterém se myrcen nenachází, měli v proktodeu stejné množství ipsenolu a ipsdienolu jako jedinci, kteří se živili lýkem s různými koncentracemi myrcenu (Byers and Birgersson 1990). Následně pak bylo zjištěno, že *I. paraconfusus* je schopný produkovat tyto agregační feromony *de novo* (Seybold et al. 1995). Kmeny *Pantoea cedenensis* izolované ze střeva *I. typographus*, rostou na myrcenu a také jej rozkládají, jestli ovšem produkují i ipsenol a ipsdienol, se nezjišťovalo (Skrodenytė-Arbačiauskienė et al. 2006). Méně rezistentní bakterií vůči myrcenu je *Erwinia typographi*, izolovaná z trávicí trubice *I. typographus* (Skrodenytė-Arbačiauskienė et al. 2012).

### 2.2.2. Role bakterií při trávení potravy a recyklaci živin

Nemykofágní kůrovci se živí po celý život nutričně nevyváženým lýkem, dřevem a částí kůry stromu. Ty obsahují velké množství celulózy a hemicelulóz a málo zdrojů dusíku (Mattson 1980; Morales-Jiménez et al. 2012). Málo živočichů je schopno bez prokaryotických

symbiontů vytvářet celulózy a tím celulózu štěpit a využívat jako zdroj uhlíku. Mezi *Metazoa* vytvářející si vlastní celulózy patří někteří pláštěnci, hlístice, měkkýši, šváby a termiti. Přítomnost genů, kódujících celulózy, se vysvětluje horizontálním přenosem z prokaryotických symbiontů (Matthysse et al. 2004; Ni and Tokuda 2013; Smant et al. 1998). Možná ale geny pro celulózy *GHF9* získali živočichové od společného předka, a ty přetrvali jen u některých živočichů (Davison and Blaxter 2005). U kůrovce *Hypothenemus hampei* však horizontální přenos genu byl prokázán. Nejedná se však o gen kódující enzym štěpící celulózu, ale galaktomannan. Ten je hlavní zásobní látkou kávových zrn, na kterých se dokáže dospělec živit (Acuña et al. 2012). Mnoho druhů hmyzu využívá ke štěpení celulózy komplex enzymů C<sub>1</sub>-celulózy, C<sub>x</sub>-celulózy a celobiázy. C<sub>1</sub>-celulózu a celobiázu si hmyz obvykle syntetizuje sám. Toto však neplatí u čeledi brouků *Scarabaeidae* a u kůrovců toto schéma štěpení celulózy nikdo nezkoumal (Martin 1983). Po celé délce trávicí trubice kůrovce *I. cembrae* je zásadité prostředí a hodnota pH stoupá od stomodea k proktodeu, nikde však není silně alkalické prostředí. To však neplatí u všech zástupců hmyzu, kdy pH může být jak kyselé, tak i zásadité. Největší schopnost štěpit většinu substrátů je stejná jako u většiny v mezenteronu, kde se štěpí většina látek přijatých z potravy, většina z nich se štěpí i v předním a zadním střevě hmyzu, ale v malém množství. V žádné části střeva kůrovce také nebyla zjištěna přítomnost hmyzí celulózy (Balogun 1969; Engel and Moran 2013).

Jak probíhá štěpení celulózy, xyланu a ligninu je u skupiny termitů poměrně dobře prozkoumáno, u kůrovců to však neplatí (Ni and Tokuda 2013). Téměř všechny informace, které máme o roli bakterií při trávení potravy kůrovci máme ze studia druhů z rodu *Dendroctonus*. Mezi symbiotické bakterie s nejvyšší četností ve střevě brouka patří *Rahnella* sp. a *Serratia* sp. Protože kůrovci nejspíše nemají vlastní celulózy, jsou při jejím štěpení zcela závislí na symbiotických bakteriích. Bakterie schopné štěpit celulózu jsou *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ponticoccus gilvus*, *Paenibacillus* sp., *Pseudoxanthomonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Sphingomonas* sp., *Brevundimonas kwangchunensis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Methylobacterium populi*, *Pseudoxanthomonas* sp., *Janibacter* sp., *Leifsonia* sp., *Cellulomonas* sp. a *Cellulosimicrobium* sp. Nejvíce se však uplatňuje *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. a *Bacillus* sp. (Briones-Roblero et al. 2016; Hu et al. 2014; Morales-Jiménez et al. 2009, Morales-Jiménez et al. 2012). Bakterie rodu *Pseudomonas*, která je schopná štěpit celulózu, umí štěpit i chitin, protože se může vyskytovat jako příležitostný patogen hmyzu (Sindhu and Dadarwal 2001). Mořský kmen *Bacillus flexus* rostoucí na zelených řasách tvoří halotolerantní celulózu a její aktivita je zmapovaná. Je otázkou, na kolik je její aktivita shodná s celúázami bakterií vyskytujících se v symbióze s kůrovci (Trivedi et al. 2011). Kůrovci na

rozdíl od brouků z čeledi *Anobiidae*, kteří také část svého životního cyklu tráví v lýku, ale i ve dřevě, neštěpí karboxymethylcelulózu. Tesaříkovi druhu *Saperda vestita* to umožňuje bakterie *Sphingobium yanoikuyae*. Tato schopnost může být vysvětlena tím, že larvy *S. vestita* žijí v lýku jen krátce a v pozdějších stádiích vývoje se přesouvají do dřeva, avšak kůrovci do dřeva nepronikají (Delalibera et al. 2005).

Další rozšířenou vlastností bakterií je schopnost štěpit lipidy. Bakterie schopné této reakce jsou *Acinetobacter lwoffii*, *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas azotoformans* a *Rahnella* sp., u které je tato aktivita největší. Některé bakterie schopné štěpit celulózu a lipidy mají schopnost štěpit i jiné látky, například některé estery, škrob, xylan či lignin. V případě bakterií symbiotických s kůrovci nebyla schopnost štěpit pektin prokázána. Bakterie nacházející se ve střevě kůrovců také dokáží jako zdroj energie využívat velké množství látek (Briones-Roblero et al. 2016; Morales-Jiménez et al. 2012; Yilmaz et al. 2006).

Protože kůrovci se živí rostlinnými tkáněmi, ve kterých je malé množství dusíku, je pro ně tento prvek limitující (Ayres et al. 2000; Mattson 1980). Kůrovci řeší tento problém pomocí symbiózy s bakteriemi, které jsou schopné fixovat vzdušný dusík nebo využívat kyselinu močovou, jako zdroj dusíku. To, že *I. typographus* a *I. chalcographus*, nebo některý z jejich symbiontů, jsou schopní fixovat vzdušný dusík, je dlouho známo (Peklo and Satava 1949). Později byla tato schopnost potvrzena i u dalšího hmyzu ze *Scolytinae* a také bylo zjištěno, že dusík fixující organizmy jsou symbiotické bakterie nacházející se uvnitř hmyzu, nejspíše v trávicí trubici. Tyto bakterie byly určeny jako *Enterobacter* sp., *E. agglomerans* a *E. aerogenes* (Bridges 1981). Další bakterie schopné fixovat dusík jsou *Rahnella aquatilis*, *Raoultella terrigena*, *Serratia* sp. a *Erwinia* sp. Všechny tyto bakterie byly nakonec lokalizovány ve střevech hmyzu. Přítomnost některých cukrů, jako je fruktóza, glukóza, laktóza, mannitol nebo rafinóza, zvyšuje efektivitu fixace. *R. aquatilis* je nečastější dusík fixující bakterie nacházející se u kůrovců a vyskytuje se ve všech vývojových stádiích brouka. Také je možná běžnou endofytickou bakterií a do kůrovce se dostává při konzumaci lýka (Morales-Jiménez et al. 2009, 2012, 2013). Lokalizace fixace dusíku byla také určena pomocí genů *nifD* a *nifH* kódující nitrogenázu. *nifD* spolu s *nifK* kóduje jednu složku nitrogenázy (dinitrogenázu), což je tetramer  $\alpha_2\beta_2$ . *nifH* kóduje druhou složku (dinitrogenázová reduktáza), která následně tvoří homodimer. Obě tyto složky jsou schopné nakonec štěpit molekulu  $N_2$  (Fani et al. 2000). Tyto geny byly vždy lokalizovány v trávicí soustavě (Morales-Jiménez et al. 2009, 2013).

Druhou možností, jak se hmyz vyrovnává s nízkým příjmem dusíku je recyklace kyseliny močové, která je hlavní odpadní látkou brouků (Bursell 1967). *Pseudomonas fluorescens*,



*Serratia proteomaculans* a *R. aquatilis* využívají kyselinu močovou jako zdroj dusíku, uhlíku i energie. V dospělých se nachází větší množství kyseliny močové než v larvách. Větší schopnost nebo četnost těchto bakterií se nachází ve vyvíjejících se larvách. Produktem fixace vzdušného dusíku i využívání kyseliny močové jako zdroje dusíku je molekula amoniaku. Tato molekula může být využita přímo hmyzem, je ale pravděpodobnější, že bude využita v bakteriální buňce a do hmyzu se dostane až po jejím odumření a strávení (Morales-Jiménez et al. 2013).

### 2.2.3. Interakce symbiotických bakterií s dalšími organizmy společenstva

Některé symbiotické bakterie, stejně jako kvasinky, mají vliv na růst a tvorbu konidií hub ve svém okolí. Mykofágní druh *D. frontalis* využívá tyto bakterie k ochraně *Entomocorticium sp.* před antagonistickou *O. minus*. *Streptomyces thermosacchari* patřící mezi Aktiniobakterie produkuje mucangimycin, který má antifungální účinky. Mucangimycin má silnější antifungální účinky než lidmi využívané antimykotikum amfotericin B, avšak mutualistické *Entomocorticium sp.* téměř neovlivňuje, zatímco růst *O. minus* silně inhibuje. Protože je mnoho kůrovců závislých na symbiotických houbách, bude tento děj nejspíše hojně rozšířený (Oh et al. 2008; Scott et al. 2008). Bakterie schopné rozkládat obrané látky napadeného stromu často mají větší vliv na symbiotické houby. Také přítomnost těchto látek, jako jsou terpeny ovlivňuje, jaký vliv bakterie na houby má. Bakterie také často ovlivňují množství produkovaných konidií, zatímco růst zůstává téměř nepozměněn (Adams et al. 2009). Kůrovec také dokáže selektovat přítomné houbové druhy, a to pomocí bakterií jako je *Micrococcus luteus*, *Serratia grimesii* a *Staphylococcus hominis*, rozšiřovaných ve svém orálním sekretu. Houby, které jsou takto inhibovány jsou *Leptographium abietinum*, *Aspergillus fumigatus* a *Trichoderma harzianum*, ale *A. nomius* je proti látkám těchto bakterií odolný. Avšak během působení těchto látek tvoří slabé, atypicky zbarvené kultury. Také je možné, že hmyz takto ovlivňuje symbiotické houby, které pro něj byly přínosné v předchozím vývojovém stádiu, ale nyní již nejsou (Cardoza et al. 2006). Zatímco některé bakterie asociované s kůrovci většinou inhibují růst pouze antagonistických hub, endofytní bakterie vyskytující se v lýku nebo i xylému inhibují růst i mutualistických druhů hub (Adams et al. 2008; Schreiber et al. 1988). Zatímco se endofytních bakterií v lýku jak zdravých, tak i napadených stromů vyskytuje pouze malé množství, v chodbičkách kůrovců žije velké množství bakterií a ty jsou buď broukem roznášeny, nebo po napadení se koncentrují v těchto místech a poměrně rychle proliferují (Mason et al. 2016).

Bakterie mohou napadat také kůrovce, způsobovat mu nemoci, poškozovat ho či zabít (García-Fraile 2018). Takovéto patogenní bakterie se liší svým účinkem u různých druhů

kůrovců. Můžeme však říci, že vysokou mortalitu u řady kůrovců mají *Pseudomonas fluorescenc* a *Serratia marescenc* (Moore 1972; Sevim et al. 2012). Společenstvo bakterií ve střevě kobyly *Schistocerca gregaria* však snižuje pravděpodobnost, že daný jedinec bude *S. marescenc* napaden. Jestli podobný mechanismus funguje i u kůrovců, nevíme (Dillon et al. 2005). O řadě těchto bakterií se uvažuje jako o potenciálním agens využitelném v biologickém boji proti těmto škůdcům (Yaman et al. 2010). Pro *I. typographus* byla jako bakterie s nejvyšší patogenitou i mortalitou určena bakterie *S. liquefaciens* (Muratoğlu et al. 2009).

#### 2.2.4. Intracelulární symbióza

Nejnámější bakterií tvořící intracelulární symbiózu s hmyzem je *Wolbachia*. Tato bakterie se dědí po mateřské linii a u hmyzu spouští partenogenezi (Stouthamer et al. 1993), způsobuje cytoplasmatickou inkompabilitu (O'Neill et al. 1992), způsobuje feminizaci samců (Rousset et al. 1992) a zabíjí samce (Hurst et al. 1999). Byla prokázána u hmyzu v řádech *Diptera* (Dobson and Rattanadechakul 2001; Kittayapong et al. 2000), *Lepidoptera* (Sweby et al. 2010; Tagami and Miura 2004), *Hemiptera* (Espino et al. 2009; Nakamura et al. 2012), *Hymenoptera* (Dedeine et al. 2001; Plantard et al. 1999) a i *Coleoptera* (Kolasa et al. 2018). V rámci řádu *Coleoptera* tvoří *Wolbachia* symbiózu s ambróziivými častěji než s lýkožravými kůrovci. Může to být způsobeno tím, že ambróziivý brouci mají často haplo-diploidní určení pohlaví, ale kůrovci diploidní. Existuje zde hypotéza, že přítomnost wolbachie souvisí s haplo-diploidním určením pohlaví u hmyzu (Kawasaki et al. 2016). Studie potvrzují wolbachie u jiných kůrovců, např. *Hypothenemus hampei* (Vega et al. 2002), *Coccotrypes dactyliperda*, kde ovlivňuje množství kladených vajec (Zchori-Fein et al. 2006), a *Pityogenes chalcographus* (Arthofer et al. 2010; Wolfgang et al. 2009), ale prozatím nebyla potvrzena v symbióze s *Ips typographus* (Kolasa et al. 2018; Michalková et al. 2012). Existují však odhady, že 20 % (Werren and Windsor 2000) až 66 % (Hilgenboecker et al. 2008) všech druhů členovců může být wolbachii nakaženo. Je tedy také možné, že se vyskytuje jen u malého množství jedinců druhu, a proto nebyla nalezena (Weinert et al. 2007). Avšak v rámci Evropy jsou si populace *Ips typographus* geneticky velmi blízké (Sallé et al. 2007) a nabízí se tedy možnost, že by bylo nakaženo spíše větší procento jedinců.

Další hojně studovanou bakterií tvořící intracelulární symbiózu s hmyzem je *Rickettsia*. Tato bakterie je známá jako patogen obratlovců včetně člověka, ale část životního cyklu se odehrává ve členovcích (Azad and Beard 1998). Ta také dokáže manipulovat s reprodukcí svého hostitele a ovlivňovat partenogenezi (Hagimori et al. 2006), stejně tak jako zabíjet samce hostitelského

druhu, pokud je napaden (Lawson et al. 2001). V těle hostitele se může nacházet pouze v jedné určité tkáni nebo místě, stejně tak jako v celém těle (Gottlieb et al. 2008). Protože se vyvinula jako primární symbiont členovců, je v hmyzu hojně nalézána (Weinert et al. 2009). Byla potvrzena v řádech hmyzu jako je *Psocoptera* (Yusuf and Turner 2004), *Siphonaptera* (Azad et al. 1992), *Sternorhyncha* (Sakurai et al. 2005), *Hymenoptera* (Hagimori et al. 2006), *Lepidoptera*, *Diptera* a *Coleoptera* (Weinert et al. 2009). Jako symbiont *I. typographus* nalezena nebyla. *Rickettsia* byla ale potvrzena u 16 % zkoumaných druhů čeledi *Curculionidae*, ale žádný z těchto infikovaných brouků nepatří mezi kůrovce (Kolasa et al. 2018). Na přítomnost *Rickettsia* a jiných intracelulárních symbiotických bakterií byl testován kůrovec *I. acuminatus*, avšak přítomnost žádné takovéto bakterie nebyla potvrzena (Schebeck et al. 2019). I zde platí stejně jako u wolbachie, že prevalence nákazy v jednotlivých druzích se může pohybovat od nízkých po vysoké hodnoty, a možná proto nebyla nalezena.

Mezi bakterie tvořící intracelulární symbiózu s hmyzem patří i bakterie *Cardinium* a *Spiroplasma*, které jsou však podstatně méně studované. Obě tyto bakterie jsou také schopné ovlivňovat rozmnožování svých hostitelů (Schebeck et al. 2018) a mají u brouků rozmezí infikovaných jedinců v rámci populace mezi 1 % a 89 %. (Weinert et al. 2007). *Cardinium* bylo prozatím potvrzeno v řádech *Hemiptera*, *Hymenoptera* (Zchori-Fein et al. 2004) a *Coleoptera*. Mezi brouky symbiotickými s *Cardinium* jsou i tři druhy patřící k čeledi *Curculionidae*, ani jeden z nich však nepatří do podčeledi *Scolytinae*. *Cardinium* nebylo nalezeno ani u dřevokazného *Oryzophilus surinamensis*, který žije pod kůrou stromů, avšak nepatří mezi kůrovce (Kolasa et al. 2018; Zchori-Fein and Perlman 2004). Máme potvrzené případy infekce spiroplasmou u hmyzu z řádu *Lepidoptera* (Jiggins et al. 2000), *Hymenoptera* (Whitcomb et al. 1993), *Diptera* (Williamson et al. 1999) a *Coleoptera*, kde se studie nejčastěji zaměřují na druhy z čeledi *Coccinellidae* (Hurst et al. 1996; Weinert et al. 2007). Byla také nalezena v čeledích brouků jako *Scarabaeidae*, *Staphylinidae* a *Curculionidae*, avšak v druhu *Ips typographus* nebyla nalezena žádná bakterie tvořící intracelulární symbiózu (Kolasa et al. 2018). *Spiroplasma* byla nalezena u kůrovce *Pityogenes chalcographus*, avšak pouze u jednoho jedince, a tato studie také nepotvrdila výskyt *Cardinia*. Zdá se tedy, že *Spiroplasma* i *Cardinium* mají u kůrovců velmi nízkou prevalenci (Schebeck et al. 2018).

*Sodalis* je dědičná symbiotická bakterie tvořící intracelulární symbiózu s celou řadou hmyzu. Jako první byla nalezena v mouše tse-tse (*Glossina morsitans*) (Dale and Maudlin 1999). Většina studií hledala *Sodalis* v hmyzu z řádu *Diptera* (Nováková and Hypša 2007) a *Hemiptera* (Kaiwa et al. 2010; Matsuura et al. 2014). Existují však studie prokazující její přítomnost i u bazálnějších řádů hmyzu (Fukatsu et al. 2007). Jako endosymbiont byla

potvrzena také u nosatce rodu *Curculio*, kde žije v bakteriocytech, které mají redukovanou buněčnou stěnu, jsou lokalizovány na rozmezí stomodea a mezenteronu a bakterie se vyskytují v jejich cytoplasmě bez obalové membrány hostitelské buňky (Toju et al. 2010). Přestože častý výskyt v polokřídlem hmyzu ukazuje, že tato bakterie je pravděpodobně mnohem běžnější než se předpokládalo, stále je dávána do ústraní a její vliv je upozadován (Hosokawa et al. 2015).

### 2.3. Změny mikrobiálních symbiontů v rámci životního cyklu kůrovce

Někteří symbionti kůrovců se vyskytují v asociaci pouze s určitým vývojovým stádiem těchto brouků. Houby a některé bakterie žijící ektosymbioticky spolu s kůrovci se mohou vyskytovat v rámci celého jeho životního cyklu, nebo mohou být v určité vývojové fázi potlačeny jinými mikroby (Cardoza et al. 2006). Tato skutečnost však není příliš zkoumána a spíše se předpokládá, že nejvíce se během různých vývojových stádií kůrovců mění jejich bakteriální mikrobiota nacházející se ve střevě. Tyto změny mohou být závislé na typu přijímané potravy nebo na vlastnostech těchto bakterií (Delalibera et al. 2007). Avšak tyto bakterie se liší i mezi jedinci stejného druhu nejen v různých vývojových stádiích a různých lokalitách, ale i v závislosti na zdravotním stavu a fyziologii daného jedince i hostitelského stromu (Morales-Jiménez et al. 2012). Největší diverzita střevních bakterií se vyskytuje u dospělců, kteří již opustili hostitelský strom, ve kterém proběhl jejich vývoj včetně metamorfózy, naopak nejnižší diverzitu těchto bakterií mají larvy. To může naznačovat, že vertikálním přenosem od předchozí generace se přenáší jen malé množství těchto bakterií a většina je získána během života (Briones-Roblero et al. 2017). To může být také důvodem, proč v některých studiích všechny bakterie nalezené v larvách a kuklách byly nalezeny i v dospělcích (Morales-Jiménez et al. 2012). Také celková diverzita střevní mikrobioty kůrovců je poměrně malá oproti jiným skupinám hmyzu (Delalibera et al. 2007).

Mezi bakterie nalezené v larvách kůrovce *Dendroctonus rhizophagus* patří *Rahnella* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter lwoffii*, *Serratia* sp., *Propionibacterium* sp. a *Stenotrophomonas maltophilia*, přičemž řada z nich patří mezi endofyty běžně se vyskytující i v nekolonizovaných stromech. Některé z těchto bakterií také fixují dusík, štěpí ligniny, lipidy, terpeny či jiné látky a mají tak nejspíše velký vliv na růst a vývoj larev *D. rhizophagus*, a možná i dospělců, jelikož všechny tyto bakterie byly poté nalezeny v jejich trávicí soustavě (Briones-Roblero et al. 2017; Briones-Roblero et al. 2016; Morales-Jiménez et al. 2012). Jedinou zjištěnou kvasinkou symbiotickou s larvou *D. rhizophagus* je *Cyberlinderina americana* štěpící škrob a lipidy. Ta také přetrvává ve stádiu kukly i dospělce. Ve střevěch dospělců se však již vyskytují i další kvasinky, mezi které patří *Candida piceae* a *Zygoascus* sp. (Briones-Roblero

et al. 2016). Na druhou stranu, u jiného druhu rodu *Dendroctonus* byly nalezeny bakterie *Bacillus* sp. a *Leuconostoc* sp., které se již ve stádiu dospělce nevyskytují a mohou tedy hrát důležitou roli při vývoji a růstu pouze larvy (Vasanthakumar et al. 2006). Čínský druh *D. armandi* má ve svých střevech *Citrobacter* sp. a *Pantoea* sp. Tyto bakterie jsou dominantní během stádia larvy a dospělce, avšak během stádia kukly převládá *Methylobacterium* sp., která může hrát důležitou roli z hlediska energie při metamorfóze (Hu et al. 2013).

Kůrovec *Ips pini* hostí *Pantoea* sp. a *Stenotrophomonas* sp. v rámci celého životního cyklu. V larvách a dospělci se vyskytují ve velkém množství, zatímco v kuklách se vyskytují s nízkou četností. Jelikož však byl jejich výskyt potvrzen i během této vývojové fáze, nejspíše přetrvávají i během metamorfózy. Také ale možná jejich množství během fáze kukly klesá až úplně vymizí a dospělci je po vylíhnutí získají znovu z okolí (Delalibera et al. 2007).

Z larev kůrovce *I. typographus* byly izolovány bakterie *Rahnella variigena*, *Rahnella woolbedingensis* a *Pseudomonas trivialis*. Ty jsou schopné štěpit škrob a bakterie rodu *Rahnella* i karboxymethylcelulózu. Střevní mikrobiota dospělců však zjištěna nebyla. Také je ale možné, že je podobná jako mikrobiota druhu *Pityophthorus pityographus*, jehož vzorky byly získány na stejné lokalitě. Tento druh však napadá jedli bělokorou (*Abies alba*). Střevními symbionty *P. pityographus* je *Erwinia billingiae*, *Curtobacterium plantarum*, *Yersinia ruckeri*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas arsenicoxydans*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus hominis*. Většina kmenů těchto druhů bakterií jsou také schopny štěpit karboxymethylcelulózu, škrob a xylan (Fabryová et al. 2018).

### 3. Moderní metody studia

Prvním a stále častým způsobem studia symbiontů kůrovců zůstávají metody, při kterých je nutný mikroorganismus nejdříve izolovat a kultivovat (Klepzig 1998), ty jsou však v moderních studiích doplňovány o metody, které nejsou závislé na kultivaci (Vasanthakumar et al. 2006). Velký vliv na kultivaci bakterií i hub má vybrané médium, na kterém tyto organizmy rostou. Tyto média se liší pro různé skupiny organizmů, takže se někdy využívají různá média ke kultivaci bakterií a hub. Pro kultivaci bakterií i hub se nejčastěji využívá malt extrakt agar (MEA) (Cardoza et al. 2006; Davis and Hofstetter 2011; Jankowiak and Hilszczański 2005). Následně můžeme u těchto izolátů sledovat jejich morfologii, produkci různých metabolitů či schopnost využívat určité látky jako zdroj energie (Bridges 1983; Briones-Roblero et al. 2016). Nejčastěji se tyto kultivované mikroorganismy určují po izolaci DNA a jejím zmnožení pomocí PCR Sangerovou metodou sekvenace (Nováková et al. 2015; Wolfgang et al. 2009). Nedokážeme však kultivovat všechny mikroorganismy a tyto nekultivatelné organizmy

nejsme následně schopní nalézt. Tento fakt, že řadu mikroorganismů nejsme schopní kultivovat, má za důsledek podhodnocení nejenom množství symbiontů kůrovců (Briones-Roblero et al. 2017; Sanzani et al. 2014). Například pouze 73,5 % mikroorganismů nacházejících se ve střevě člověka lze kultivovat. Jak to je s procentuální schopností kultivovat střevní mikrobiom kůrovců, není známo (Browne et al. 2016). Z tohoto důvodu se čím dál častěji při studiu mikroorganismů asociovanými s kůrovcem využívají metody, při kterých není nutné je kultivovat.

Mezi metody, které nejsou závislé na kultivaci patří metagenomika. Pomocí této metody jsme schopni určit počet a četnost genomů nacházejících se v metagenomu vzorku (Handelsman et al. 1998). Nejvyužívanější verzí metagenomiky je metabarcoding, který nicméně vnáší chybu díky nutnosti použití PCR. Metabarcoding nám umožňuje podle krátkého a poměrně konzervovaného úseku DNA, tzv. barcode, taxonomicky zařadit organismus (Abdelfattah et al. 2018; Taberlet et al. 2012). Pro bakterie se jako barcode využívá část 16S rDNA (Dollive et al. 2012) a pro houby úsek jaderné rDNA nazvaný ITS (internal transcribed spacer), který obsahuje přepisované mezerníky ITS1 a ITS2 a kódující oblast 5.8S rDNA (Schoch et al. 2012). Protože je však stále problém studovat celý barcode, a to i pomocí technik sekvenování další generace (next-generation sequencing), jsou v rámci daného barcode studovány jen menší úseky (Yang et al. 2016). V rámci úseku ITS je nejčastěji studován jen úsek ITS1 či ITS2. Při porovnání výsledků těchto sekvencí bylo zjištěno, že jejich výsledky se mírně liší, ne však příliš a jsou tedy srovnatelné. Výběr mezi nimi celkový výsledek nijak výrazně neovlivní (Blaalid et al. 2013). Úsek 16S využívaný jako barcode pro bakterie byl rozdělen na subregiony V1 až V9. Zde ale výběr subregionu může již výsledky výrazně ovlivnit a proto byly jako využívané úseky barcode určeny části V4 až V6, jejichž výsledky totiž nejvíce odpovídají i výsledkům celé sekvence 16S rRNA (Yang et al. 2016). Houby jsou velkou skupinou organismů a nejspíše nelze využít pouze jeden úsek DNA jako barcode, ale je třeba jich využívat více a nalézt nové pro nižší taxonomické jednotky (Chakraborty et al. 2014). Limitací úseku ITS je i to, že někdy sdružuje nepříbuzné druhy do jednoho clusteru a blízké příbuzné druhy rozdělí do několika clusterů (Blaalid et al. 2013; Schena and Cooke 2006).

Stejně jako při taxonomickém zařazování organismů se i při zjišťování jejich ekologické role ve společenstvu využívala kultivace a tato metoda je stále velmi častou. Odebíráním či přidáváním jednotlivých látek, které se mohou vyskytovat i v jejich přirozeném prostředí, se poté určovala jejich role ve společenstvu (Leufvén et al. 1984; Xu et al. 2016). Stejně se kultivovaly různé mikroorganismy v jedné, společné kultuře a sledovalo se, jak spolu tyto organismy interagují (Klepzig and Wilkens 1997). S rozvojem metod, které nejsou závislé na

kultivaci, lze určit s velkou přesností lokalizaci daného děje, avšak s obtížemi se poté určuje jeho původce (Maron et al. 2007; Schneider and Riedel 2010). Mezi tyto metody patří proteomika, metaproteomika a metabolomika. Zatímco metabolomika poskytuje informaci podle zjištěných metabolitů, proteomika a metaproteomika podle přítomných či právě syntetizovaných bílkovin (Gotelli et al. 2012; Turnbaugh and Gordon 2008). Pomocí proteomiky můžeme zjistit, jaké množství jednotlivých proteinů se ve vzorku nachází, z toho můžeme vyvodit, jaká bude celková aktivita tohoto děje. Přítomné proteiny mají větší propojenost s aktuální ekologickou rolí daného mikroorganismu než DNA (Biron et al. 2006). Oproti studování metaproteomu získaného z půdního či vodního prostředí, je studování střevní mikrobioty stále velmi limitované technickými možnostmi, a právě proto se i dnes hojně využívají kultivační metody (Shi et al. 2010). Přesto ale můžeme určit funkci, metabolismus či ekologii i bez nutnosti kultivace mikroorganismu, a to pomocí transkriptomiky. Ta nám umožňuje určit funkci i taxonomické zařazení organismu pomocí mRNA, která se následně pomocí reverzní transkriptázy přepisuje do cDNA. Při použití vhodných metod, nemusíme zkoumaný organismus předem znát (Johansson et al. 2013; Lowe et al. 2017).

Ekologickou roli mikroorganismů můžeme určovat i podle operačních taxonomických jednotek (OTU, operation taxonomic unit) získaných pomocí metagenomiky a to použitím nástrojů FUNGuild a PICRUSt. FUNGuild je určený pro houby a PICRUSt pro bakterie a oba fungují podle ekologické role dané taxonomické skupiny (Langille et al. 2013; Nguyen et al. 2016).

### 3.1. Hlavní mezery v poznání

Důležité, ale chybějící informace, které by poskytly významný pokrok v pochopení ekologie a vlivu jednotlivých symbiontů, nazýváme „knowledge gap“. Tyto mezery lze vyplnit dalšími výzkumy, které by nám tyto informace poskytly. Hlavní mezery ve vědění o interakcích a vlivu mikrobů na kůrovce jsou:

- 1.) Většinou není jasné, jestli se bakterie a houby přenáší vertikálně (z rodičů na potomstvo) či horizontálně (zisk z prostředí). Je jasné, že se uplatňují oba způsoby, ale konkrétní studie chybí. K pochopení přenosu jsou nutné studie, ve kterých by se studovali vajíčka, brouci před vylétnutím a před zavrtáním do hostitelské dřeviny.
- 2.) Jestli je lignocelulóza štěpena broukem, mikroby či oběma organizmy. Tato informace by měla být získána studiem transkriptomu.
- 3.) Fyziologie a interakce mikroorganismů jsou studovány stále *in vitro* na běžných médiích za běžných koncentrací kyslíku. Přitom můžeme předpokládat, že antiherbivorní látky (terpenoidy

a třísloviny) výrazně ovlivňují metabolismus a jejich aktivita se výrazně liší *in vivo*. Je nutné provést studium genomů těchto mikroorganismů a predikci jejich metabolických funkcí *in silico*.

4.) Absence manipulativních experimentů u většiny druhů kůrovců (tj. případ, kdy využívá sterilní larva a studuje se v definovaném prostředí, s danými mikroby). Zde je ale problém, že axenické kultury brouka je těžké udržovat.

5.) Víme, že během vývoje brouka se zvyšuje diverzita intestinálních mikroorganismů, jestli se však zvyšuje i jejich četnost, není známo. Je také možné, že celková četnost zůstává stejná, ale se zvyšující se diverzitou klesá abundance jednotlivých druhů mikroorganismů. Ke zjištění, jestli a jak se abundance mění během vývoje je nutné ji určit a porovnat ve více vývojových stádiích.

6.) O přítomnosti, prevalenci a vlivu intracelulárních symbiontů nemáme u kůrovců téměř žádné informace, ačkoliv jsou u hmyzu tyto symbionti rozšířeni. Ke zjištění přítomnosti lze využít genomické metody či PCR za použití specifických primerů.

### 3.2. Zaměření dalšího výzkumu

V současné době máme jen omezené množství informací o mikrobiálních symbiontech *Ips typographus* a to především těch bakteriálních. Ani u hub si však nejsme zcela jisti, jak velký vliv mají na životaschopnost a rozmnožování brouka. Další výzkumy by se měly zaměřit na roli intestinálních bakterií při trávení těžko rozložitelných složek potravy a na identifikaci látek, které tyto bakterie syntetizují. Dále by se studie mohly zaměřit na intracelulární symbionty, jejich prevalenci a vliv při krmení, rozmnožování a hledání nových hostitelů. Některé esenciální látky mohou být uvolňované jedním nebo více symbiontů a pro ostatní členy společenstva může být tento zdroj jediným nebo hlavním zdrojem této látky. To by ukazovalo na důležitost tohoto symbionta a metabolickou provázanost mezi jednotlivými členy společenstva.

Při budoucím studiu s kůrovci asociovaných mikrobů a jejich role by bylo zajímavé testovat jednu z následujících hypotéz: (I.) Intestinální mikrobiom hraje klíčovou roli při trávení potravy larvami i dospělci *Ips typographus*; (II.) Intestinální mikrosymbionti *Ips typographus* se nepřenáší mezi generacemi, ale jsou nově získáváni s potravou; (III.) Bakterie pomáhají kůrovci *Ips typographus* kolonizovat nové hostitele díky rozkladu či přeměně obraných rostlinných látek; (IV.) Houboví ektosymbionti pomáhají kůrovci *Ips typographus* kolonizovat nové hostitele díky jejich růstu tkáněmi rostliny, čímž je nucena k rozložení obrany; (V.) Odpadní látky *Ips typographus* jsou využívány mikrobiálními symbionty, dusík z těchto látek je následně



uvolněn a znovu vstřebán broukem; (VI.) *Ips typographus* hostí intracelulární symbionty, kteří vedou ke zvýšení počtu potomků u napadených jedinců.

Protože technické možnosti pro studium střevních mikroorganismů jsou stále velmi limitující, je vhodné testovat hypotézu (I.) pomocí kultivace izolovaných mikroorganismů na médiích obohacená o hlavní složky potravy kůrovce, a to jak smíšené v podobě lýka, tak jako jednotlivé molekuly, které se v nich běžně nachází a sledovat schopnost je rozkládat či využívat jako zdroj živin a energie. Také by bylo nutné sledovat schopnost brouka krmeného antibiotiky a antimykotiky trávit potravu. Ke zjištění původu různých enzymů by bylo vhodné použít transkriptomiku. Ostatní moderní metody nezávislé na kultivaci by poté mohly nést pouze doplňující informace. Podobně lze testovat i hypotézu (III.). Při testování (II.) hypotézy lze využít metabarcoding, který není závislý na kultivaci mikroorganismů. Při tomto pokusu by bylo nutné sesbírat a omýt vajíčka, která by byla následně inkubována ve sterilních podmínkách a po vylíhnutí by jsme zjišťovali přítomnost intestinálních mikroorganismů. Při testování vlivu hub při napadání stromu (IV.) lze využít semenáčky či mladé stromky. Někteří brouci by se zbavily svých houbových symbiontů pomocí antimykotik a následně by se sledovala schopnost kolonizace mezi oběma skupinami kůrovců. K testování druhé části teorie lze využít metabolické metody, kdy budeme sledovat přítomnost obraných látek stromu v různých místech napadené dřeviny. Testování schopnosti mikrobů využívat kyselinu močovou (V.) *in situ* je značně omezeno, a to jak limitací množstvím vázaných atomů izotopů dusíku ( $^{15}\text{N}$ ) v těle brouka, tak nutností tyto izotopy sledovat. Proto je vhodné i zde přikročit k využití kultivace. Hlavní informaci by jsme ale mohli získat pomocí transkriptomiky, pomocí které bychom dokázali tyto organizmy identifikovat. Přítomnost intracelulárních symbiontů (VI.) lze testovat metabarcodingem jednotlivých tkání kůrovce *I. typographus*. Pokud by v některém typu tkáně byly tyto symbionti potvrzeni, sledovala by se tato tkáň a následně by jsme porovnávali množství potomků napadených a nenapadených jedinců.

## 4. Závěr

Bakteriální a houbový symbionti velmi ovlivňují životaschopnost, rozšiřování a rozmnožování kůrovců. Přestože kůrovci patří mezi největší škůdce ovlivňující lesnictví i kvalitu získávaného dřeva, nejsou vztahy mezi jednotlivými členy společenstva známy. Pochopení vztahů mezi jednotlivými symbionty můžeme využít k následné eliminaci klíčových členů společenstva, a tím snížit jeho schopnost rozmnožovat se či napadat nové hostitele.

Dnes již víme, že někteří mikroby produkují látky, které *Ips typographus* používá jako feromony, čímž výrazně ovlivňují jejich chování. Také víme, že řada symbiotických bakterií a hub dokáže potlačovat mikroby, kteří na *I. typographus* parazitují nebo snižují jeho fitness. Jak významní jsou symbionti při napadání nových hostitelů, rozkladu obraných terpenů dřevin, trávení potravy, recyklaci z potravy málo dostupných atomů dusíku a fosforu či syntéze esenciálních aminokyselin a vitamínů, však není známo. Existují ale předpoklady, že při těchto dějích mají mikroby rozhodující roli nutnou k přežití brouka.

Celé společenstvo však může být silně ovlivněno i mikrobiomem foretických roztočů. Na povrchu těchto roztočů se mohou stejně jako na povrchu hmyzu zachytávat spory hub, a to jak mutualistických, tak antagonistických (Levieux et al. 1989). Tyto roztoči se však velmi liší mezi jednotlivými stanovišti i četností svého výskytu (Gwiazdowicz et al. 2012; Takov et al. 2009). K pochopení vztahů mezi členy společenstva a jejich role při rozmnožování a šíření *Ips typographus* je zapotřebí provést další studie.

## 5. Seznam zdrojů

- Abdelfattah, Ahmed, Antonino Malacrinò, Michael Wisniewski, Santa O. Cacciola, and Leonardo Schena. 2018. "Metabarcoding: a powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies." *Biological control* 120:1–10.
- Acuña, Ricardo, Beatriz E. Padilla, Claudia P. Flórez-Ramos, José D. Rubio, Juan C. Herrera, Pablo Benavides, Sang Jik Lee, Trevor H. Yeats, Ashley N. Egan, Jeffrey J. Doyle, and Jocelyn K. C. Rose. 2012. "Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee." *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 109(11):4197–4202.
- Adams, Aaron S., Frank O. Aylward, Sandye M. Adams, Nadir Erbilgin, Brian H. Aukema, Cameron R. Currie, Garret Suen, and Kenneth F. Raffa. 2013. "Mountain pine beetles colonizing historical and native host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism." *Applied and environmental microbiology* 79(11):3468–75.
- Adams, A. S., C. R. Currie, Y. Cardoza, K. D. Klepzig, and K. F. Raffa. 2009. "Effects of symbiotic bacteria and tree chemistry on the growth and reproduction of bark beetle fungal symbionts." *Canadian journal of forest research* 39(6):1133–47.
- Adams, Aaron S., Diana L. Six, Sandye M. Adams, and William E. Holben. 2008. "In vitro interactions between yeasts and bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus Ponderosae*)." *Microbial ecology* 56(3):460–66.
- Anderbrant, Olle. 1990. "Gallery construction and oviposition of the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) at different breeding densities." *Ecological entomology* 15(1):1–8.
- Arthofer, Wolfgang, Dimitrios N. Avtzis, Markus Riegler, and Christian Stauffer. 2010. "Mitochondrial phylogenies in the light of pseudogenes and *Wolbachia*: re-assessment of a bark beetle dataset." *ZooKeys* 56(SPEC. ISSUE):269–80.
- Ayres, Matthew P., Richard T. Wilkens, Jonathan J. Ruel, Maria J. Lombardero, and Erich Vallery. 2000. "Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi." *Ecology* 81(8):2198.
- Azad, Abdu F., and Charles B. Beard. 1998. "Rickettsial pathogens and their arthropod vectors." *Emerging infectious diseases* 4(2):179–86.
- Azad, Abdu F., John B. Sacci, William M. Nelson, Gregory A. Dasch, Edward T. Schmidtman, and Mitchell Carl. 1992. "Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas." *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 89(1):43–46.
- Bakke, Alf. 1981. "Inhibition of the response in *Ips typographus* to the aggregation pheromone; field evaluation of verbenone and ipsenol." *Zeitschrift Für angewandte Entomologie* 92(1–5):172–77.
- Balogun, R. A. 1969. Digestive enzymes of the alimentary canal of the larch bark beetle *Ips cembrae* Heer. *Comparative biochemistry and physiology* zg, 1267-1270.
- Barras, Stanley J. 1970. "Antagonism between *Dendroctonus frontalis* and the fungus *Ceratocystis minor*." *Annals of the entomological society of America* 63(4):1187–90.
- Barras Stanley J, Hodges John D. 1969. Carbohydrates in inner bark of *Pinus taeda* as affected by *Dendroctonus frontalis* and associated microorganisms. *Can. entomol.* 101:489–93

- Barras, Stanley J., and Thelma Perry. 1972. "Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae)." *Zeitschrift Für angewandte Entomologie* 71(1-4):95-104.
- Biedermann, P.H.W.; Müller, J.; Grégoire, J.-C.; Gruppe, A.; Hagge, J.; Hammerbacher, A.; Hofstetter, R.W.; Kandasamy, D.; Kolarik, M.; Kostovcik, M., et al. 2019 "Bark beetle population dynamics in the anthropocene: challenges and solutions." *Trends in ecology & evolution*, 34, 914-924,
- Birch, M. C., Svihra, P., Paine, T. D., and Miller, J. C., 1980 "Influence of chemically mediated behavior on host tree colonization by four cohabiting species of bark beetles. *J. chem. Ecol.* 6, 395-414.
- Biron, David G., Hugh D. Loxdale, Fleur Ponton, Hercules Moura, Laurent Marché, Christophe Brugidou, and Frédéric Thomas. 2006. "Population proteomics: an emerging discipline to study metapopulation ecology." *Proteomics* 6(6):1712-15.
- Blaalid, R., S. Kumar, R. H. Nilsson, K. Abarenkov, P. M. Kirk, and H. Kausrud. 2013. "ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi." *Molecular ecology resources* 13(2):218-24.
- Boone, C. K., D. L. Six, Y. Zheng, and K. F. Raffa. 2008. "Parasitoids and dipteran predators exploit volatiles from microbial symbionts to locate bark beetles." *Environmental entomology* 37(1):150-61.
- Boone, Celia K., Ken Keefover-Ring, Abigail C. Mapes, Aaron S. Adams, Jörg Bohlmann, and Kenneth F. Raffa. 2013. "Bacteria associated with a tree-killing insect reduce concentrations of plant defense compounds." *Journal of chemical ecology* 39(7):1003-6.
- Brand, J. M., Bracke, J. W., Markovetz, A. I., Wood, D. L., Browne, L. E. 1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature* 254:136-37
- Bridges, J. Robert. 1981. "Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles." *Microbial ecology* 7(2):131-37.
- Bridges, J. Robert. 1983. "Mycangial fungi of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) and their relationship to beetle population trends." *Environmental entomology* 12(3):858-61.
- Briones-roblero, Carlos I., Roberto Rodríguez-díaz, and José A. Santiago-cruz. 2016. "Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae : Scolytinae)." *Folia Microbiologica* 62: 1-9
- Briones-Roblero, Carlos Iván, Juan Alfredo Hernández-García, Roman Gonzalez-Escobedo, L. Viridiana Soto-Robles, Flor N. Rivera-Orduña, and Gerardo Zúñiga. 2017. "Structure and dynamics of the gut bacterial microbiota of the bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae) across their life stages." *PLoS one* 12(4):1-16.
- Browne, Hilary P., Samuel C. Forster, Blessing O. Anonye, Nitin Kumar, B. Anne Neville, Mark D. Stares, David Goulding, and Trevor D. Lawley. 2016. "Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation." *Nature* 533(7604):543-46.
- Bursell, E. 1967. "The excretion of nitrogen in insects." *Advances in insect physiology* 4(C):33-67.
- Byers, J. A., and G. Birgersson. 1990. "Pheromone production in a bark beetle independent of myrcene precursor in host pine species." *Naturwissenschaften* 77(8):385-87.
- Byers, J. A., and D. L. Wood. 1981. "Antibiotic-induced inhibition of pheromone synthesis in a bark beetle." *Science* 213(4509):763-64.
- Cardoza, Yasmin J., John C. Moser, Kier D. Klepzig, and Kenneth F. Raffa. 2008. "Multipartite symbioses among fungi, mites, nematodes, and the spruce beetle, *Dendroctonus rufipennis*." *Environmental entomology* 37(4):956-63.

- Cardoza, Yasmin J., Kier D. Klepzig, and Kenneth F. Raffa. 2006. "Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi." *Ecological entomology* 31(6):636–45.
- Chakraborty, Chiranjib, C. George Priya Doss, Bidhan C. Patra, and Sanghamitra Bandyopadhyay. 2014. "DNA barcoding to map the microbial communities: current advances and future directions." *Applied microbiology and biotechnology* 98(8):3425–36.
- Chang, R., T. A. Duong, S. J. Taerum, M. J. Wingfield, X. Zhou, M. Yin, and Z. W. de Beer. 2018. "Ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus*, including 11 new species from China." *Persoonia: Molecular phylogeny and evolution of fungi* 42:50–74.
- Cheng, Chihang, Jacob D. Wickham, Li Chen, Dandan Xu, Min Lu, and Jianghua Sun. 2018. "Bacterial microbiota protect an invasive bark beetle from a pine defensive compound." *Microbiome* 6(1):1–16.
- Christiansen, Erik, Richard H. Waring, and Alan A. Berryman. 1987. "Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationships." *Forest ecology and management* 22: 89–106.
- Colman, D. R., E. C. Toolson, and C. D. Takacs-Vesbach. 2012. "Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities?" *Molecular ecology* 21(20):5124–37.
- Dale, Colin, and Ian Maudlin. 1999. "*Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*." *International journal of systematic bacteriology* 49(1):267–75.
- Davis, Thomas S., and Richard W. Hofstetter. 2011. "Reciprocal interactions between the bark beetle-associated yeast *Ogataea pini* and host plant phytochemistry." *Mycologia* 103(6):1201–7.
- Davis, Thomas S., Richard W. Hofstetter, Jeffrey T. Foster, Nathaniel E. Foote, and Paul Keim. 2011. "Interactions between the yeast *Ogataea pini* and filamentous fungi associated with the western pine beetle." *Microbial ecology* 61(3):626–34.
- Davison, Angus, and Mark Blaxter. 2005. "Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes." *Molecular biology and evolution* 22(5):1273–84.
- Dedeine, Franck, Fabrice Vavre, Frédéric Fleury, Benjamin Loppin, Michael E. Hochberg, and Michel Boulétreau. 2001. "Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp." *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 98(11):6247–52.
- Delalibera, Italo, Archana Vasanthakumar, Benjamin J. Burwitz, Patrick D. Schloss, Kier D. Klepzig, Jo Handelsman, and Kenneth F. Raffa. 2007. "Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera) colonizing red pine." *Symbiosis* 43(2):97–104.
- Delalibera, Italo, Jo Handelsman, and Kenneth F. Raffa. 2005. "Contrasts in cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae)." *Environmental entomology* 34(3):541–47.
- Dillon, R. J., C. T. Vennard, A. Buckling, and A. K. Charnley. 2005. "Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion." *Ecology letters* 8(12):1291–98.
- Ditmarová, L'Ubica, Daniel Kurjak, Sari Palmroth, Jaroslav Kmet', and Katarína Štrelcová. 2009. "Physiological responses of norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress." *Tree physiology* 30(2):205–13.
- Dobson, Stephen L., and Wanchai Rattanadechakul. 2001. "A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)." *Journal of medical entomology* 38(6):844–49.

- Dollive, Serena, Gregory L. Peterfreund, Scott Sherrill-Mix, Kyle Bittinger, Rohini Sina, Christian Hoffmann, Christopher S. Nabel, David A. Hill, David Artis, Michael A. Bachman, Rebecca Custers-Allen, Stephanie Grunberg, Gary D. Wu, James D. Lewis, and Frederic D. Bushman. 2012. "A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples." *Genome biology* 13(7):R60.
- Dowding, P. 1973. Effects of felling time and insecticide treatment on the inter-relationships of fungi and arthropods in pine logs. - *Oikos* 24: 422-429
- Engel, P. & N. A. Moran. 2013. "The gut microbiota of insects - diversity in structure and function." *FEMS Microbiology reviews* 37(5):699–735.
- Espino, C. I., T. Gómez, G. González, M. F. Brazil Do Santos, J. Solano, O. Sousa, N. Moreno, D. Windsor, A. Ying, S. Vilchez, and A. Osuna. 2009. "Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae)." *Applied and environmental microbiology* 75(2):547–50.
- Fabryová, Anna, Martin Kostovčík, Alexandra Díez-Méndez, Alejandro Jiménez-Gómez, Lorena Celador-Lera, Zaki Saati-Santamaría, Hana Sechovcová, Esther Menéndez, Miroslav Kolařík, and Paula García-Fraile. 2018. "On the bright side of a forest pest-the metabolic potential of bark beetles' bacterial associates." *Science of the total environment* 619–620:9–17.
- Fani, Renato, Romina Gallo, and Pietro Liò. 2000. "Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the *NifD*, *NifK*, *NifE*, and *NifN* genes." *Journal of molecular evolution* 51(1):1–11.
- Francke-grosman. 1952. "Über die Ambrosiazucht der beiden Kiefernborckenkäfer *Myelophilus minor* Htg. und *Ips acuminatus* Gyll." *Meddelanden från Statens Skogforskningsinstitut*, 41, 1-52.
- Francke-Grosman. 1963. "Die Übertragung der Pilzflora beidem Borkenkäfer *Ips acuminatus* Gyll." *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 52, 355-61.
- Fukatsu, Takema, Ryuichi Koga, Wendy A. Smith, Kohjiro Tanaka, Naruo Nikoh, Kayoko Sasaki-Fukatsu, Kazunori Yoshizawa, Colin Dale, and Dale H. Clayton. 2007. "Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse, *Columbicola columbae*, allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies." *Applied and environmental microbiology* 73(20):6660–68.
- Furniss, Malcolm M., Halvor Solheim, and Erik Christiansen. 1990. "Transmission of blue-stain fungi by *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) in norway spruce." *Annals of the Entomological society of America* 83(4):712–16.
- García-Fraile, P. 2018. "Roles of bacteria in the bark beetle holobiont – How do they shape this forest pest?" *Annals of applied biology* 172(2):111–25.
- Giordano, Luana, Matteo Garbelotto, Giovanni Nicolotti, and Paolo Gonthier. 2013. "Characterization of fungal communities associated with the bark beetle *Ips typographus* varies depending on detection method, location, and beetle population levels." *Mycological progress* 12(1):127–40.
- Gotelli, Nicholas J., Aaron M. Ellison, and Bryan A. Ballif. 2012. "Environmental proteomics, biodiversity statistics and food-web structure." *Trends in ecology and evolution* 27(8):436–42.
- Gottlieb, Yuval, Murad Ghanim, Gwenaëlle Gueguen, Svetlana Kontsedalov, Fabrice Vavre, Frederic Fleury, and Einat Zchori-Fein. 2008. "Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies." *The FASEB journal* 22(7):2591–99.
- Grégoire, Jean Claude, Kenneth F. Raffa, and B. Staffan Lindgren. 2015. "Economics and politics of bark beetles." *Bark Beetles: Biology and ecology of native and invasive species* (2011): 585–613.

- Gwiazdowicz, Dariusz J., Jacek Kamezczyk, Ewa Teodorowicz, and Jerzy Błoszyk. 2012. "Mite communities (Acari, Mesostigmata) associated with *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) in managed and natural norway spruce stands in Central Europe." *Central European journal of biology* 7(5):910–16.
- Hagimori, Tetsuya, Yoshihisa Abe, Shuichi Date, and Kazuki Miura. 2006. "The first finding of a *Rickettsia* bacterium associated with parthenogenesis induction among insects." *Current microbiology* 52(2):97–101.
- Handelsman, Jo, Michelle R. Rondon, Sean F. Brady, Jon Clardy, and Robert M. Goodman. 1998. "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products." *Chemistry and biology* 5(10).
- Hansen, Allison K., and Nancy A. Moran. 2013. "The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects." *Molecular ecology* 23(6):1473–96.
- Harrington Thomas C. 2005. "Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners." *Ecological and evolutionary advances in insect-fungal associations*, 257–291
- Hilgenboecker, Kirsten, Peter Hammerstein, Peter Schlattmann, Arndt Telschow, and John H. Werren. 2008. "How many species are infected with *Wolbachia*? - A statistical analysis of current data." *FEMS Microbiology letters* 281(2):215–20.
- Hodges, John D., Stanley J. Barras, and Joe K. Mauldin. 1968. "Amino acids in inner bark of loblolly pine, as affected by the southern pine beetle and associated microorganisms." *Canadian journal of botany* 46(12):1467–72.
- Hofstetter, Richard W., Jamie Dinkins-Bookwalter, Thomas S. Davis, and Kier D. Klepzig. 2015. "Symbiotic associations of bark beetles." Pp.209–237 in F. E. Vega, and R. W. Hofstetter, eds. *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*. Academic Press, Cambridge, MA.
- Hosokawa, Takahiro, Nahomi Kaiwa, Yu Matsuura, Yoshitomo Kikuchi, and Takema Fukatsu. 2015. "Infection prevalence of *Sodalis* symbionts among stinkbugs." *Zoological Letters* 1(1):1–7.
- Hsiau, Portia T. W., and Thomas C. Harrington. 2003. "Phylogenetics and adaptations of basidiomycetous fungi fed upon by bark beetles (Coleoptera: Scolytidae)." *Symbiosis* 34(2):111–31.
- Hu, Xia, Chunyan Wang, Hui Chen, and Junning Ma. 2013. "Differences in the structure of the gut bacteria communities in development stages of the chinese cwite pine beetle (*Dendroctonus armandi*)." *International Journal of molecular sciences* 14(10):21006–20.
- Hu, Xia, Jiamin Yu, Chunyan Wang, and Hui Chen. 2014. "Cellulolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus armandi* larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)." *Forests* 5(3):455–65.
- Huang, J., M. Kautz, A.M. Trowbridge, A. Hammerbacher, K.F. Raffa, H.D. Adams, D.W. Goodsmann, C. Xu, A.J.H. Meddens, D. Kandasamy, J. Gershenson, R. Seidl and H. Hartmann. 2020. "Tree defence and bark beetles in a drying world: carbon partitioning, functioning and modelling." *New phytologist*. 225:26-36
- Hunt, D. W. A., and J. H. Borden. 1989. "Terpene, alcohol, pheromone production by *Dendroctonus ponderosae* and *Ips paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae) in the absence of readily culturable microorganisms." *Journal of chemical ecology* 15(5):1433–63.
- Hunt, D. W. A., and J. H. Borden. 1990. "Conversion of verbenols to verbenone by yeasts isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae)." *Journal of chemical ecology* 16(4):1385–97.

- Hurst, Gregory D. D., Francis M. Jigging, J. Hinrich Graf Von Der Schulenburg, Dominique Bertrand, Stuart A. West, Irina I. Goriacheva, Ilia A. Zakharov, John H. Werren, Richard Stouthamer, and Michael E. N. Majerus. 1999. "Male-killing *Wolbachia* in two species of insect." *Proceedings of the royal society B: Biological sciences* 266(1420):735–40.
- Hurst, Gregory D. D., Linda E. Walker, and Michael E. N. Majerus. 1996. "Bacterial infections of hemocytes associated with the maternally inherited male-killing trait in british populations of the two spot ladybird, *Adalia Bipunctata*." *Journal of invertebrate pathology* 68(3):286–92.
- Jankowiak, R. 2005. "Fungi associated with *Ips typographus* on *Picea abies* in southern Poland and their succession into the phloem and sapwood of beetle-infested trees and logs." *Forest pathology* 35(1):37–55.
- Jankowiak, Robert, and Jacek Hilszczański. 2005. "Ophiostomatoid fungi associated with *Ips typographus* (L.) on *Picea abies* [(L.) H. Karst.] and *Pinus sylvestris* L. in north-eastern Poland." *Acta societatis botanicorum poloniae* 74(4):345–50.
- Jiggins FM, Hurst GDD, Jiggins CD, von der Schulenburg JHG, Majerus MEN. 2000. "The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium." *Parasitology* 120:439–46.
- Johansson, Helena, Kishor Dhaygude, Stafva Lindström, Heikki Helanterä, Liselotte Sundström, and Kalevi Trontti. 2013. "A metatranscriptomic approach to the identification of microbiota associated with the ant *Formica exsecta*." *PLoS ONE* 8(11):1–11.
- Kaiwa, Nahomi, Takahiro Hosokawa, Yoshitomo Kikuchi, Naruo Nikoh, Xian Ying Meng, Nobutada Kimura, Motomi Ito, and Takema Fukatsu. 2010. "Primary gut symbiont and secondary, *Sodalis*-allied symbiont of the scutellerid stinkbug *Cantao ocellatus*." *Applied and environmental microbiology* 76(11):3486–94.
- Kandasamy, Dineshkumar, Jonathan Gershenzon, Martin N. Andersson, and Almuth Hammerbacher. 2019. "Volatile organic compounds influence the interaction of the Eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts." *ISME journal* 13(7):1788–1800.
- Kawasaki, Yuuki, Hannes Schuler, Christian Stauffer, Ferenc Lakatos, and Hisashi Kajimura. 2016. "*Wolbachia* endosymbionts in haplodiploid and diploid *Scolytine* beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)." *Environmental Microbiology Reports* 8(5):680–88.
- Kirisits, T. 2004. 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. edited by F. Lieutier, K.R. Day, A. Battisti, J.-C. Grégoire, and H.F. Evans. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands. pp. 181–235
- Kirschner, Roland. (2010). The synnematosus anamorph of *Exidia saccharina* (Auriculariales, Basidiomycota): morphology, conidiogenesis and association with bark beetles. *Polish botanical journal*. 55. 335-342.
- Kittayapong, Pattamaporn, Kathy J. Baisley, Visut Baimai, and Scott L. O'Neill. 2000. "Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in southeast asian mosquitoes (Diptera: Culicidae)." *Journal of medical entomology* 37(3):340–45.
- Klepzig, K. D. 1998. "Competition between a Biological control fungus, *Ophiostoma piliferum*, and symbionts of the southern pine beetle." *Mycologia* 90(1):69–75.
- Klepzig, Kier D., and Richard T. Wilkens. 1997. "Competitive interactions among symbiotic fungi of the southern pine beetle." *Applied and environmental microbiology* 63(2):621–27.



- Kocaçevik, Seda, Ali Sevim, Mahmut Eroğlu, Zihni Demirbağ, and İsmail Demir. 2016. "Virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* s.A. Rehner & Humber in *Ips sexdentatus* and *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae)." *Turkish journal of agriculture and forestry* 40(2):241–48.
- Kolařík, Miroslav, and Robert Jankowiak. 2013. "Vector affinity and diversity of *Geosmithia* fungi living on subcortical insects inhabiting *Pinaceae* species in Central and Northeastern Europe." *Microb. Ecol.* 66:682–700.
- Kolasa, Michał, Daniel Kubisz, Jerzy M. Gutowski, Radosław Oecibior, Miłosz A. Mazur, Milada Holecová, and Łukasz Kajtoch. 2018. "Infection by endosymbiotic 'male-killing' bacteria in *Coleoptera*." *Folia biologica (Poland)* 66(4):165–77.
- Krawielitzki, By Sigrid, and Kenji Mori. 1977. "Field and laboratory response of *Ips typographus* to optically pure pheromonal components." 83:300–302.
- Kreutz, J., G. Zimmermann, and O. Vaupel. 2004. "Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions ." *Biocontrol science and technology* 14(8):837–48.
- Kulhavy, David L., A. D. Partridge, and R. W. Stark. 1984. "Root diseases and blister rust associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in western white pine in Idaho." *Environmental entomology* 13(3):813–17.
- Langille, Morgan G. I., Jesse Zaneveld, J. Gregory Caporaso, Daniel McDonald, Dan Knights, Joshua A. Reyes, Jose C. Clemente, Deron E. Burkepile, Rebecca L. Vega Thurber, Rob Knight, Robert G. Beiko, and Curtis Huttenhower. 2013. "Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences." *Nature biotechnology* 31(9):814–21.
- Lawson, Eileen T., Timothy A. Mousseau, Rebecca Klaper, Mark D. Hunter, and John H. Werren. 2001. "*Rickettsia* associated with male-killing in a buprestid beetle." *Heredity* 86(4):497–505.
- Lewis, Kathy J., and B. Staffan Lindgren. 2002. "Relationship between spruce beetle and tomentosus root disease: two natural disturbance agents of spruce." *Canadian journal of forest research* 32(1):31–37.
- Leufvén, A., and G. Birgersson. 1987. "Quantitative variation of different monoterpenes around galleries of *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) attacking norway spruce ." *Canadian journal of botany* 65(5):1038–44.
- Leufvén, Anders, Gunnar Bergström, and Enevold Falsen. 1984. "Interconversion of verbenols and verbenone by identified yeasts isolated from the spruce bark beetle *Ips typographus*." *Journal of chemical ecology* 10(9):1349–61.
- Leufvén, Anders, Gunnar Bergström, and Enevold Falsen. 1988. "Oxygenated monoterpenes produced by yeasts, isolated from *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and grown in phloem medium." *Journal of chemical ecology* 14(1):353–62.
- Leufvén, Anders, and Lars Nehls. 1986. "Quantification of different yeasts associated with the bark beetle, *Ips typographus*, during its attack on a spruce tree." *Microbial ecology* 12(2):237–43.
- Levieux, J., F. Lieutier, J. C. Moser, and T. J. Perry. 1989. "Transportation of phytopathogenic fungi by the bark beetle *Ips sexdentatus* Boerner and associated mites." *Journal of applied entomology* 108(1–5):1–11.
- Linnakoski, R.; Mahilainen, S.; Harrington, A.; Vanhanen, H.; Eriksson, M.; Mehtätalo, L.; Pappinen, A.; Wingfield, M.J. 2016 "Seasonal succession of fungi associated with *Ips typographus* beetles and their phoretic mites in an outbreak region of Finland. " *PLoS one*, 11, 1–14

- Lowe, Rohan, Neil Shirley, Mark Bleackley, Stephen Dolan, and Thomas Shafee. 2017. "Transcriptomics technologies." *PLoS computational biology* 13(5):1–23.
- Maron, Pierre Alain, Lionel Ranjard, Christophe Mougel, and Philippe Lemanceau. 2007. "Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology." *Microbial ecology* 53(3):486–93.
- Martin, Michael M. 1983. "Cellulose digestion in insects." *Comparative biochemistry and physiology*, 75(3):313–24.
- Mason, Charles J., Alissa S. Hanshew, and Kenneth F. Raffa. 2016. "Contributions by host trees and insect activity to bacterial communities in *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Curculionidae) galleries, and their high overlap with other microbial assemblages of bark beetles." *Environmental entomology* 45(2):348–56.
- Matsuura, Yu, Takahiro Hosokawa, Mario Serracin, Genet M. Tulgetske, Thomas A. Miller, and Takema Fukatsu. 2014. "Bacterial symbionts of a devastating coffee plant pest, the stinkbug *Antestiopsis thunbergii* (Hemiptera: Pentatomidae)." *Applied and environmental microbiology* 80(12):3769–75.
- Matthysse, Ann G., Karine Deschet, Melanie Williams, Mazz Marry, Alan R. White, and William C. Smith. 2004. "A functional cellulose synthase from ascidian epidermis." *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 101(4):986–91.
- Mattson, W. J. 1980. "Herbivory in relation to plant nitrogen content." *Annual review of ecology and systematics* 11(1):119–61.
- Michalková, Veronika, Eva Krascenitsová, and Milan Kozánek. 2012. "On the pathogens of the spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae) in the western Carpathians." *Biologia* 67(1):217–21.
- Moore, Gordon E. 1972. "Pathogenicity of ten strains of bacteria to larvae of the southern pine beetle." *Journal of invertebrate pathology* 20(1):41–45.
- Morales-Jiménez, Jesús, Arturo Vera-Ponce de León, Aidé García-Domínguez, Esperanza Martínez-Romero, Gerardo Zúñiga, and César Hernández-Rodríguez. 2013. "Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae)." *Microbial ecology* 66(1):200–210.
- Morales-Jiménez, Jesús, Gerardo Zúñiga, Hugo C. Ramírez-Saad, and César Hernández-Rodríguez. 2012. "Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities." *Microbial ecology* 64(1):268–78.
- Morales-Jiménez, Jesús, Gerardo Zúñiga, Lourdes Villa-Tanaca, and César Hernández-Rodríguez. 2009. "Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)." *Microbial ecology* 58(4):879–91.
- Moser, J. C., T. J. Perry, and K. Furuta. 1997. "Phoretic mites and their hyperphoretic fungi associated with flying *Ips typographus japonicus* Niiijima (Col., Scolytidae) in Japan ." *Journal of applied entomology* 121(1–5):425–28.
- Moser, John C., Thelma J. Perry, and Halvor Solheim. 1989. "Ascospores hyperphoretic on mites associated with *Ips typographus*." *Mycological research* 93(4):513–17.
- Mulock, Peter, and Erik Christiansen. 1986. "The threshold of successful attack by *Ips typographus* on *Picea abies*: A field experiment." *Forest ecology and management* 14(2):125–32.
- Muratoğlu, Hacer, Kazim Sezen, and Zihni Demirbağ. 2009. "Determination and pathogenicity of the bacterial flora associated with the spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)." *Turkish journal of biology* 35(1):9–20.

- Nakamura, Yuki, Fumiko Yukuhiro, Masaya Matsumura, and Hiroaki Noda. 2012. "Cytoplasmic incompatibility involving *Cardinium* and *Wolbachia* in the white-backed planthopper *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae)." *Applied entomology and zoology* 47(3):273–83.
- Nguyen, Nhu H., Zewei Song, Scott T. Bates, Sara Branco, Leho Tedersoo, Jon Menke, Jonathan S. Schilling, and Peter G. Kennedy. 2016. "FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild." *Fungal ecology* 20:241–48.
- Ni, Jinfeng, and Gaku Tokuda. 2013. "Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota." *Biotechnology advances* 31(6):838–50.
- Nováková, Eva, and Václav Hypša. 2007. "A new *Sodalis* lineage from bloodsucking fly *Craterina melbae* (Diptera, Hippoboscoidea) originated independently of the tsetse flies symbiont *Sodalis glossinidius*." *FEMS Microbiology letters* 269(1):131–35.
- Nováková, Eva, Filip Husník, Eva Šochová, and Václav Hypša. 2015. "*Arsenophonus* and *Sodalis* symbionts in louse flies: an analogy to the *Wigglesworthia* and *Sodalis* system in tsetse flies." *Applied and environmental microbiology* 81(18):6189–99.
- O'Neill, Scott L., Rosanna Giordano, Angela M. E. Colbert, Timothy L. Karr, and Hugh M. Robertson. 1992. "16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects." *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 89(7):2699–2702.
- Oh, Dong Chan, Jarrod J. Scott, Cameron R. Currie, and Jon Clardy. 2008. "Mycangimycin, a polyene peroxide from a mutualist *Streptomyces* sp." *Organic letters* 11(3):633–36.
- Paracer, S. & Ahmadjian, V. 2000. "Symbiosis an introduction to biological interactions." *Oxford University Press, Oxford*
- Peklo, J., and J. Satava. 1949. "Fixation of free nitrogen by bark beetles." *Nature* 163:336–337.
- Pernek, Milan, Boris Hrasovec, Dinka Matosevic, Ivan Pilas, Thomas Kirisits, and John C. Moser. 2008. "Phoretic mites of three bark beetles (*Pityokteines* spp.) on silver fir." *Journal of pest science* 81(1):35–42.
- Pfeffer, A. 1995, *Zentral-und westpaläarktische Borken-und Kernkäfer (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae)*; *Pro Entomologica, Naturhistorisches Museum Basel*: Basel; Vol. 17, pp. 310.
- Plantard, Olivier, J. Y. Rasplus, G. Mondor, I. Le Clainche, and M. Solignac. 1999. "Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in *Rhoditini* and '*Aylacini*' (Hymenoptera: Cynipidae)." *Insect molecular biology* 8(2):185–91.
- Pureswaran, Deepa S., and John H. Borden. 2003. "Test of semiochemical mediated host specificity in four species of tree killing bark beetles (Coleoptera: Scolytidae)." *Environmental entomology* 32(5):963–69.
- Repe, A., S. Bojović, and M. Jurc. 2015. "Pathogenicity of ophiostomatoid fungi on *Picea abies* in Slovenia." *Forest pathology* 45(4):290–97.
- Rivera, Flor N., Evelyn González, Zulema Gómez, Nydia López, César Hernández-Rodríguez, Amy Berkov, and Gerardo Zúñiga. 2009. "Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)." *Biological journal of the linnean society* 98(2):325–42.
- Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault, and M. Solignac. 1992. "*Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in *Arthropods*." *Proceedings of the royal society B: Biological sciences* 250(1328):91–98.

- Sakurai, M., R. Koga, T. Tsuchida, X. Y. Meng, and T. Fukatsu. 2005. “*Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*.” *Environmental microbiology* 71(7):4069–75.
- Sallé, A., W. Arthofer, F. Lieutier, C. Stauffer, and C. Kerdelhué. 2007. “Phylogeography of a host-specific insect: genetic structure of *Ips typographus* in Europe does not reflect past fragmentation of its host.” *Biological journal of the linnean society* 90(2):239–46.
- Sallé, Aurélien, Romain Monclus, Annie Yart, Jacques Garcia, Paul Romary, and François Lieutier. 2005. “Fungal flora associated with *Ips typographus*: frequency, virulence, and ability to stimulate the host defence reaction in relation to insect population levels.” *Canadian journal of forest research* 35(2):365–73.
- Sanzani, Simona M., Maria G. Li Destri Nicosia, Roberto Faedda, Santa O. Cacciola, and Leonardo Schena. 2014. “Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and Oomycetes in environmental samples.” *Journal of phytopathology* 162(1):1–13.
- Schebeck, Martin, Lukas Feldkirchner, Belen Marín, Susanne Krumböck, Hannes Schuler, and Christian Stauffer. 2018. “Reproductive manipulators in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera: Curculionidae)—The role of *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, and *Wolbachia*.” *Journal of insect science* 18(3).
- Schebeck, Martin, Susanne Krumböck, Hannes Schuler, and Christian Stauffer. 2019. “Are bacterial endosymbionts reproductive manipulators in the bark beetle *Ips acuminatus* ?” *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, 22:1–3.
- Schena, Leonardo, and David E. L. Cooke. 2006. “Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a ‘molecular tool box’ for the detection and characterization of *Phytophthora* species.” *Journal of microbiological methods* 67(1):70–85.
- Schlyter, Fredrik, John A. Byers, and Jan Löfqvist. 1987. “Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: density-regulation mechanisms in bark beetle *Ips typographus*.” *Journal of chemical ecology* 13(6):1503–23.
- Schneider, Thomas, and Kathrin Riedel. 2010. “Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities.” *Proteomics* 10(4):785–98.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf A, et al. 2012. “Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*.” *Proceedings of the National academy of sciences USA* 109: 6241–6246.
- Schreiber, L. R., Garold F. Gregory, C. R. Krause, and J. M. Ichida. 1988. “Production, partial purification, and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*.” *Canadian journal of botany* 66(11):2338–46.
- Scott, Jarrod J., Dong Chan Oh, M. Cetin Yuceer, Kier D. Klepzig, Jon Clardy, and Cameron R. Currie. 2008. “Bacterial protection of beetle-fungus mutualism.” *Science* 322(5898):63.
- Sevim, Ali, Cihan Gökçe, Zeynep Erbaş, and Filiz Özkan. 2012. “Bacteria from *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and their biocontrol potential.” *Journal of basic microbiology* 52(6):695–704.
- Seybold, S. J., D. R. Quilici, J. A. Tillman, D. Vanderwel, D. L. Wood, and G. J. Blomquist. 1995. “De novo biosynthesis of the aggregation pheromone components ipsenol and ipsdienol by the pine bark beetles *Ips paraconfusus* Lanier and *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae).” *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 92(18):8393–97.

- Shi, Weibing, Ryan Syrenne, Jian Zhong Sun, and Joshua S. Yuan. 2010. "Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age." *Insect science* 17(3):199–219.
- Sindhu, S. S., and K. R. Dadarwal. 2001. "Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea." *Microbiological research* 156(4):353–58.
- Skrodenytė-Arbačiauskienė, Vesta, Vincas Būda, Sandra Radžiūtė, and Virmantas Stunžėnas. 2006. "Myrcene-resistant bacteria isolated from the gut of phytophagous insect *Ips typographus*." *Ekologija* (4):1–6.
- Skrodenytee-Arbaciauskiene, Vesta, S. Radziute, V. Stunzenas, and V. Buda. 2012. "*Erwinia typographi* sp. nov., isolated from bark beetle (*Ips typographus*) gut." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62(4):942–48.
- Smant, Geert, Jack P. W. G. Stokkermans, Yitang Yan, Jan M. De Boer, Thomas J. Baum, Xiaohong Wang, Richard S. Hussey, Fred J. Gommers, Bernard Henrissat, Eric L. Davis, Johannes Helder, Arjen Schots, and Jaap Bakker. 1998. "Endogenous cellulases in animals: isolation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes." *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 95(9):4906–11.
- Solheim, H. 1988. "Pathogenicity of some *Ips typographus* associated blue-stain fungi to Norway spruce." *Meddelelser fra Norsk institutt for skogforskning*, 40, 1-11.
- Solheim, H. 1992. "The early stages of fungal invasion in Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*." *Canadian journal of botany*, 70, 1-5.
- Solheim, H. 1986. "Species of *Ophiostomataceae* isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus*." *Nordic journal of botany*, 6, 199-207.
- Stouthamer, R., J. A. J. Breeuwer, R. F. Luck, and J. H. Werren. 1993. "Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis." *Nature* 361(6407):66–68.
- Sullivan, Brian T., and C. Wayne Berisford. 2004. "Semiachemicals from fungal associates of bark beetles may mediate host location behavior of parasitoids." *Journal of chemical ecology* 30(4):703–17.
- Sweby, D. L., L. A. Martin, S. Govender, D. E. Conlong, and R. S. Rutherford. 2010. "The presence of *Wolbachia* in *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae): implications for biological control." *Proceedings of the annual congress-South African Sugar technologists' association* (83):257–61.
- Taberlet, P., E. Coissac, and F. Pompanon. 2012. "Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding." *Molecular ecology* 33:2045–50.
- Tagami, Y., and K. Miura. 2004. "Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of *Lepidoptera*." *Insect molecular biology* 13(4):359–64.
- Takov, Danai, Daniela Pilarska, and John Moser. 2009. "Phoretic mites associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Curculionidae: Scolytinae) from Bulgaria." *Acta zoologica Bulgarica* 61(3):3–4.
- Toju, Hirokazu, Takahiro Hosokawa, Ryuichi Koga, Naruo Nikoh, Xian Ying Meng, Nobutada Kimura, and Takema Fukatsu. 2010. "*Candidatus curculioniphilus buchneri*, a novel clade of bacterial endocellular symbionts from weevils of the genus *Curculio*." *Applied and environmental microbiology* 76(1):275–82.
- Trivedi, Nitin, Vishal Gupta, Manoj Kumar, Puja Kumari, C. R. K. Reddy, and B. Jha. 2011. "An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*." *Carbohydrate Polymers* 83(2):891–97.

- Turnbaugh, Peter J., and Jeffrey I. Gordon. 2008. "An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics." *Cell* 134(5):708–13.
- Vasanthakumar, Archana, Italo Delalibera, Jo Handelsman, Kier D. Klepzig, Patrick D. Schloss, and Kenneth F. Raffa. 2006. "Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann." *Environmental entomology* 35(6):1710–17.
- Vega, Fernando E., Pablo Benavides, Jeffrey A. Stuart, and Scott L. O'Neill. 2002. "*Wolbachia* infection in the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae)." *Annals of the entomological society of America* 95(3):374–78.
- Viiri H. and Lieutier F. 2004. "Ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle, *Ips typographus*, in three areas in France." *Annals of forest science* 61:215–19.
- Viiri H, von Weissenberg K. 1995. "*Ophiostoma*, blue-staining fungi associated with *Ips typographus* in Finland." *Aktuelt fra Skogforsk* 4:58–60
- Weinert, Lucy A., Matthew C. Tinsley, Matilda Temperley, and Francis M. Jiggins. 2007. "Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles." *Biology letters* 3(6):678–81.
- Weinert, Lucy A., John H. Werren, Alexandre Aebi, Graham N. Stone, and Francis M. Jiggins. 2009. "Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria." *BMC Biology* 7:1–15.
- Werren, John H., and Donald M. Windsor. 2000. "*Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?" *Proceedings of the royal society B: Biological sciences* 267(1450):1277–85.
- Whitcomb, Robert F., K. J. Hackett, T. B. Clark, M. Kona, J. Adams, and D. L. Williamson. 1993. "*Spiroplasma monobiae* sp. nov. from the vespidae wasp *Monobia quadridens* (Hymenoptera: Vespidae)." *International journal of systematic bacteriology* (26):256–60.
- Whitney HS, Farris SH. 1970. "Maxillary mycangium in the mountain pine beetle." *Science* 167:54–55
- Whitney HS, Bandoni RJ, Oberwinkler F. 1987. "*Entomocorticium dendroctoni* gen. et. sp. nov. (Basidiomycotina), a possible nutritional symbiote of the mountain pine beetle in lodgepole pine in British Columbia". *Can. J. Bot.* 65:95–102
- Williamson, David L., Bungo Sakaguchi, Kevin J. Hackett, Robert F. Whitcomb, Joseph G. Tully, Patricia Carle, Joseph M. Bové, Jean R. Adams, Meghnad Konai, and Roberta B. Henegar. 1999. "*Spiroplasma poulsonii* sp. nov., a new species associated with male-lethality in *Drosophila willistoni*, a neotropical species of fruit fly." *International journal of systematic bacteriology* 49(2):611–18.
- Wolfgang, Arthofer, Riegler Markus, Avtzis Dimitrios N., and Stauffer Christian. 2009. "Evidence for low-titre infections in insect symbiosis: *Wolbachia* in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae)." *Environmental microbiology* 11(8):1923–33.
- Xu, Le Tian, Min Lu, and Jiang Hua Sun. 2016. "Invasive bark beetle-associated microbes degrade a host defensive monoterpene." *Insect science* 23(2):183–90.
- Yaman, M., Ö. Ertürk, and I. Aslan. 2010. "Isolation of some pathogenic bacteria from the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* and its specific predator, *Rhizophagus grandis*." *Folia microbiologica* 55(1):35–38.
- Yamaoka, Yuichi, Michael J. Wingfield, Ikuo Takahashi, and Halvor Solheim. 1997. "Ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* f. *Aponicus* in Japan." *Mycological research* 101(10):1215–27.

- Yang, Bo, Yong Wang, and Pei Yuan Qian. 2016. "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis." *BMC Bioinformatics* 17(1):1–8.
- Yilmaz, Hüseyin, Kazim Sezen, Hatice Kati, and Zihni Demirbağ. 2006. "The first study on the bacterial flora of the european spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae)." *Biologia* 61(6):679–86.
- Yusuf, Mohammed, and Bryan Turner. 2004. "Characterisation of wolbachia-like bacteria isolated from the parthenogenetic stored-product pest psocid *Liposcelis bostrychophila* (Badonnel) (Psocoptera)." *Journal of stored products research* 40(2):207–25.
- Zchori-Fein, and Steve J Perlman 2004. "Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods." *Reactions* (13):2009–16.
- Zchori-Fein, Einat, Chandresh Borad, and Ally R. Harari. 2006. "Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria." *Physiological entomology* 31(2):164–69.
- Zchori-Fein, Einat, Steve J. Perlman, Suzanne E. Kelly, Nurit Katzir, and Martha S. Hunter. 2004. "Characterization of a 'bacteroidetes' symbiont in encarsia wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of '*Candidatus cardinium Hertigii*.'" *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(3):961–68.
- Zhao, Tao, Dineshkumar Kandasamy, Paal Krokene, Jingyuan Chen, Jonathan Gershenzon, and Almuth Hammerbacher. 2019. "Fungal associates of the tree-killing bark beetle, *Ips typographus*, vary in virulence, ability to degrade conifer phenolics and influence bark beetle tunneling behavior." *Fungal ecology* 38:71–79.
- Zhao, Tao, Karolin Axelsson, Paal Krokene, and Anna Karin Borg-Karlson. 2015. "Fungal symbionts of the spruce bark beetle synthesize the beetle aggregation pheromone 2-methyl-3-buten-2-ol." *Journal of chemical ecology* 41(9):848–52.