

Marek Barta ▪ Katarína Pastirčáková ▪ Miriam Kádasi-Horáková
Juraj Galko ▪ Christo Nikolov

Barta, M., Pastirčáková, K., Kádasi-Horáková, M., Galko, J., Nikolov, Ch.: Species diversity of fungi transmitted by the beech bark beetle (*Taphrorychus bicolor*). APOL, 2024, vol. 5, no. 1, p. 165–173.

Abstract: The common beech (*Fagus sylvatica* L.) is one of the most economically important deciduous trees in Central Europe. Beyond its economic value, it plays a crucial role in maintaining biodiversity and ecological stability in the region. Beech forests cover approximately 35.1% of the forested area in Slovakia. In recent years, increased beech decline has been observed in warmer and drier regions. In several locations, characteristic cracks in the bark with exuding dark fluid have been noted on beech trees, which are associated with the presence of the beech bark beetle, *Taphrorychus bicolor* Herbst. There is a hypothesis that the activity of bark beetles initiates the development of bark necroses. The aim of this research was to analyze the species diversity of microscopic fungi from the body surface of the beech bark beetle, with a particular focus on phytopathogenic fungi. We analyzed 400 beetle samples collected from four locations in Slovakia. A total of 293 isolates of microscopic fungi were obtained, and we identified 22 fungal taxa through molecular analyses. The orders Ophiostomatales (154 isolates) and Hypocreales (114 isolates) were the most abundant. The two most frequently isolated species, *Ophiostoma taphrorychi* and *Geosmithia brunnea*, were identified at all locations and were characterized as dominant species in the identified fungal population based on Camargo's criterion. This indicates a close association between these fungi and the beech bark beetle. However, their pathogenicity towards the host tree and their role in association with the bark beetle have not yet been investigated and require further research. The abundance and prevalence of the remaining identified fungal taxa were low, suggesting their opportunistic nature and only a weak association with the beech bark beetle.

Key words: bark beetles; *Fagus sylvatica* L.; mycobiota; ophiostomatoid fungi

Úvod

Buk lesný (*Fagus sylvatica* L.) je jednou z hospodársky najvýznamnejších listnatých drevín v strednej Európe. Okrem hospodárskeho významu, bukové lesy plnia aj dôležité ekologické funkcie, ako je regulácia vodného režimu, ochrana pôdy, tvorba biomasy a v neposlednom rade zohrávajú kľúčovú úlohu pri udržiavaní biodiverzity a ekologickej stability regiónu. Buk lesný rastie v miernych zemepisných šírkach Európy a vo vyšších polohách je rozšírený aj v južnej Európe. Prirodzene sa vyskytuje v nadmorských výškach 300 až 1 000 m n. m., no jeho súčasné rozšírenie je oproti prirodzenému výrazne obmedzené. Na Slovensku vytvára v porastoch s inými druhmi stromov komplexné lesné ekosystémy klasifikované ako Bukové a zmiešané bukové lesy. Ide o najrozšírenejší lesný biotop na Slovensku (Viceníková & Polák 2003). V roku 2022 bukové porasty pokrývali približne 35,1 % lesnej plochy na Slovensku (Anonymous 2023).

Zvýšené chradnutie bukových porastov v posledných rokoch (Mihál et al. 2015) naznačuje zmenu v tradičnom vnímaní buka ako vysoko odolnej dreviny. Tento fenomén je obzvlášť výrazný v teplejších a suchších polohách. Zvýšené teploty, ako prejav klimatických zmien, môžu byť kľúčovým faktorom zhoršujúceho sa zdravotného stavu bukových porastov. V roku 2022 až 37 % porastov buka lesného na území Slovenska trpelo stredným až vysokým stupňom defoliácie (Anonymous 2023). Zvýšená transpirácia v dôsledku vyšších teplôt môže viesť k vodnému stresu, ktorý oslabuje obranné mechanizmy stromu. Znížená odolnosť voči stresu následne zvyšuje náchylnosť stromov k napadnutiu patogénmi a hmyzom (Leuschner 2020). V poslednom období boli na viacerých lokalitách Slovenska pozorované na buku charakteristické praskliny v kôre s nekro-

tizujúcim pletivom a vytekajúcim tmavým exsudátom (Nikolov et al. 2023). Pri prvotnom skúmaní patogénov zodpovedných za výskyt typických nekrotických lézií kôry na buku boli v Nemecku identifikované huby *Neonectria coccinea* (Pers.) Rossman & Samuels, *Diplodia corticola* A. J. L. Phillips, A. Alves & J. Luque a *Diplodia mutila* (Fr.) Fr. (Langer & Bußkamp 2023). Ochorenie s podobnými symptómami sa v posledných rokoch objavilo na duboch v rámci celej Európy (napr. González & Ciordia 2020; Tkaczyk et al. 2021, 2024; Zalkalns & Celma 2021; Fernandes et al. 2022; Carluccio et al. 2024). Ukázalo sa, že rozvoj ochorenia dubov je spojený s prítomnosťou baktérií (napr. *Brenneria* spp.) a je výsledkom komplexnej interakcie medzi patobiómom a podkôrnym hmyzom. Je možné, že v prípade buka sa jedná o podobný mechanizmus, kedy aktivita podkôrneho hmyzu iniciuje rozvoj pôvodcov kôrových nekroz. Jedným z významných hmyzích škodcov buka lesného je lykožrút bukový, *Taphrorychus bicolor* (Herbst 1793). Je to bežný európsky druh rozšírený v západnej časti Palearktckej oblasti (Harz & Topp 1999). Larvy aj dospelí jedinci vyžierajú pod kôrou chodby, čím môžu spôsobiť značné škody na hostiteľskom strome (Lakatos & Molnár 2009). Zatiaľ čo staršie štúdie (napr. Simon 1995) nezaznamenali významnejšie poškodenie zdravých stojacich bukov, nové výskumy z posledných dvoch dekád jednoznačne preukázali schopnosť *T. bicolor* spôsobiť rozsiahle škody v bukových porastoch. Ohniská výskytu tohto škodcu boli zaznamenané v Maďarsku (Lakatos & Molnár 2009), Srbsku (Mihajlović 2003), Čiernej Hore (Spaić & Stevanović 1991) a Nemecku (Delb 2005). Zvýšená frekvencia a intenzita týchto ohnísk sú často asociované s teplými a suchými rokmi (Petercord 2008), čo naznačuje potenciálny vplyv klimatických zmien na dynamiku populácií tohto škodcu. Poškodenie zdravých stojacich stromov bolo zdokumentované aj v rôznych oblastiach Slovenska (Nikolov et al. 2023). V roku 2022 bol zaznamenaný objem dreva poškodeného lykožrútom bukovým na úrovni 2 589 m³ (Anonymous 2023). Lykožrút bukový napáda stromy rôzneho veku a hrúbky, pričom poškodením kôry vytvára vstupné brány pre sekundárne infekcie spôsobené patogénnymi hubami a baktériami. Aj keď *T. bicolor* pravdepodobne nedokáže sám o sebe prekonať obranné mechanizmy zdravého stromu, jeho úloha ako vektora patogénov môže výrazne zoslabovať stromy a zvyšovať ich náchylnosť k odumieraniu (Mihál et al. 2014; Corcobado et al. 2020). Hoci priamy dôkaz o prenose patogénov týmto lykožrútom zatiaľ na Slovensku chýba, prítomnosť nekrotických lézií v kôre po napadnutí lykožrútom podporuje túto hypotézu.

Cieľom výskumu bolo analyzovať druhovú diverzitu mikroskopických húb z povrchu tela imága lykožrúta bukového s dôrazom na fytopatogénne druhy húb. V štúdiu sa porovnávali vzorky lykožrútov odobratých na štyroch rôznych lokalitách Slovenska.

Materiál a metódy

Lokality a odber vzoriek

Imága lykožrúta bukového sme zberali v mesiacoch júl – september 2023 z lapákov buka lesného založených na štyroch lokalitách: Kysihýbel (48°27'34.0"N, 18°57'35.2"E; 600 m n. m.), Kamenica nad Cirochou (48°49'57.5"N, 22°01'43.2"E; 335 m n. m.), Jablonové (48°19'15.1"N, 17°07'49.4"E; 459 m n. m.) a Pliešovce – Vidov vrch (48°23'53.2"N, 19°12'43.1"E; 644 m n. m.). V každej lokalite sme z lapáka náhodne odobrali 100 ks živých lykožrútov. Na lapáku sme v mieste závrtového otvoru odstránili kôru (cca. 2 × 2 cm) a imága lykožrúta sme individuálne pomocou sterilnej pinzety premiestnili do sterilných 1,5 ml mikroskopických. Získané imága sme v deň zberu rozdelili podľa pohlavia a použili na izoláciu mikroskopických húb.

Získanie *in vitro* izolátov mikroskopických húb

Získanie *in vitro* kultúr húb z lykožrúta bukového sme vykonali štandardnými izolačnými postupmi na ne-selekčnom agarovom médiu (2 % sladínový agar s antibiotikami streptomycín (600 mg/L) a tetracyklín (100 mg/L)) v sterilných podmienkach laminárneho boxu Ecostar Flow (Elmax Žilina, a. s.). Na povrch pripraveného kultivačného média v Petriho miske (Ø 60 mm) sme umiestnili jedného lykožrúta. Takto sme postupovali pri všetkých nazbieraných jedincoch. Lykožrúty sme ponechali na povrchu agaru 24 hod. pri 21 °C bez prístupu svetla. Po 24 hod. sme lykožrúty z misiek odobrali a agarové médium sme ďalej inkubovali nasledujúcich 5 – 10 dní pri teplote 21 °C. Misky sme denne kontrolovali a všetky vyrastajúce kolónie húb sme v sterilných podmienkach laminárneho boxu preočkovali do nových Petriho misiek s rovnakým kultivačným médiom, ale bez pridaných antibiotík. Rozočkované kolónie húb sme inkubovali 14 dní pri 21 °C a následne uskladnili v chladničke pri teplote 8 °C.

Identifikácia izolátov húb

Získané izoláty húb sme v prvom kroku identifikácie rozdelili do morfológických skupín na základe makroskopických znakov (tvar a veľkosť kolónie, okraj kolónie, farba a textúra mycélia, pigmentácia média). Z každej morfológickej skupiny sme vybrali reprezentatívne izoláty, ktoré sme identifikovali použitím molekulárnych metód.

Z vybraných izolátov sme odobrali cca. 500 mg mycélia, z ktorého sme extrahovali genomickú DNA použitím extrakčného kitu EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Kit (Bio Basic Canada Inc., Ontário, Kanada). Pri extrakcii sme postupovali podľa protokolu výrobcu. Pre účel identifikácie húb sme amplifikovali ITS región ribozomálnej DNA (ITS1-5.8S-ITS2) pomocou univerzálnych primérov ITS1-F/ITS4 (White et al. 1990; Gardes & Bruns 1993). Amplifikácia DNA prebiehala v 20 μ l PCR reakčnej zmesi, ktorá pozostávala z cca. 2 ng/ μ l templátovej DNA, 5 \times HOT FIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estónsko), primérov (10 pmol/ μ l) a vody. Podmienky reakcie PCR v termocykléry BioRad T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornia, USA) boli nastavené nasledovne: pre-denaturácia 14 min pri 95 °C, ďalej 35 cyklov: denaturácia 15 s pri 95 °C, anelácia 30 s pri 50 °C, elongácia 80 s pri 72 °C a záverečná elongácia 10 min pri 72 °C. Získané amplikóny sme purifikovali pomocou QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen n. v., Venlo, Holandsko) a následne odoslali na Sangerovo sekvenovanie (Macrogen Europe B. V., Amsterdam, Holandsko). Získané sekvencie boli porovnané pomocou algoritmu BLASTn (Altschul et al. 1997) so sekvenciami uloženými v databáze NCBI GenBank.

Štatistické vyhodnotenie

Použitím chí-kvadrát testu ($p = 0,05$) sme porovnávali rozdiely v počte pozitívnych a negatívnych vzoriek lykožrútov v závislosti od pohlavia a lokality. Vzorky lykožrútov boli pozitívne, ak sme z nich získali aspoň jeden *in vitro* izolát huby. V opačnom prípade boli vzorky kategorizované ako negatívne. Druhovú diverzitu húb izolovaných z povrchu tela lykožrútov sme kvantifikovali pomocou indexov druhovej vyrovnanosti (evenness, E) a Shannonovho indexu (Shannon index, H). Dominantné druhy húb sme identifikovali kritériom podľa Camarga (Camargo 1995). Druh bol považovaný za dominantný, ak jeho relatívna početnosť (relative abundance, A) v odobratých vzorkách lykožrútov prekročila hodnotu 1/S, kde S predstavuje celkový počet druhov v danej vzorke (species richness, S).

Výsledky a diskusia

V roku 2023 sme celkovo analyzovali diverzitu mikroskopických húb zo 400 jedincov lykožrúta bukoveho. Analyzovaná vzorka pozostávala z 299 samičiek a 101 samčekov. Pomer samčekov a samičiek v jednotlivých lokalitách neindikoval výraznejšie odchýlky (Kysihýbel 76♀ : 24♂, Kamenica nad Cirochou 80♀ : 20♂, Jablonové 81♀ : 19♂ a Vidov vrch 62♀ : 38♂) s výnimkou lokality Vidov vrch, kde bol pomocou chí-kvadrát testu potvrdený štatisticky významný rozdiel v pomere pohlaví ($\chi^2_{(1; N=400)} = 12,2256; p = 0,0066$). Keďže však nebol preukázaný vplyv pohlavia ($\chi^2_{(1; N=400)} = 0,1691; p = 0,6809$) na počet získaných izolátov húb (obr. 1), tak sme efekt pohlavia nepovažovali za relevantný faktor ovplyvňujúci štruktúru mykobiómu a v ďalšej analýze diverzity nebol zohľadňovaný. Mykologická analýza vzoriek lykožrútov pomocou metódy kultivácie na sladínovom agare priniesla celkovo 293 izolátov mikroskopických húb, ktoré sme na základe morfológie začlenili do 28 morfológických skupín. Izoláty húb sme získali z 213 (53,25 %) vzoriek lykožrúta bukoveho. Zo zvyšných vzoriek (187 lykožrútov) nevyrástli na sladínovom agare žiadne kultúry húb. Podrobnejšiu analýzu vzoriek lykožrúta z pohľadu úspešnosti izolácie kultúr zobrazuje obr. 1. Významné rozdiely v podiele pozitívnych a negatívnych vzoriek lykožrútov sme zaznamenali medzi lokalitami. Pre účely analýzy bola vzorka označená ako pozitívna, ak sme z nej izolovali aspoň jednu kultúru huby a vzorka bola označená ako negatívna, ak z nej neboli získané žiadne izoláty. Podľa chí-kvadrát testu boli rozdiely medzi lokalitami z pohľadu úspešnosti izolácie kultúr štatisticky preukázateľné ($\chi^2_{(1; N=400)} = 64,4624; p < 0,0001$). Najvyšší podiel pozitívnych vzoriek a tiež najvyšší počet izolátov sme získali z lykožrútov nazbieraných v Kysihýbli (130 izolátov sme získali z 83 lykožrútov) a naopak najnižší podiel pozitívnych vzoriek bol z lokality Vidov vrch (47 izolátov sme získali z 33 lykožrútov). Celkovo najnižší počet izolátov sme získali z lykožrútov odobratých v lokalite Kamenica n. Cirochou (41 izolátov sme získali z 37 lykožrútov). Sekvenovaním ITS regiónu ribozomálnej

DNA reprezentatívnych izolátov jednotlivých morfológických skupín sme celkovo identifikovali 22 taxónov mikroskopických húb. Sekvencie piatich izolátov neboli dostatočne popisné na presnú determináciu konkrétneho druhu, a preto ich uvádzame len v úrovni rodu (*Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. a *Mucor* sp.). Komplexnú taxonomickú diverzitu húb a počet ich izolátov získaných z imág lykožrúta bukového na jednotlivých lokalitách sumarizuje tabuľka 1. Identifikované izoláty húb sú taxonomicky rozptýlené medzi ôsmimi radmi, pričom najbohatšie zastúpenie z pohľadu počtu identifikovaných taxónov majú rady Hypocreales (7 druhov) a Eurotiales (5 druhov). Z pohľadu počtu získaných izolátov boli najviac zastúpené rady Ophiostomatales (154 izolátov) a Hypocreales (114 izolátov). Relatívnu početnosť izolátov podľa taxonomických skupín (radu) a relatívne zastúpenie počtu identifikovaných druhov húb v konkrétnom rade sú graficky znázornené na obr. 2. Viac ako 52 % všetkých získaných izolátov patrí taxonomicky do radu Ophiostomatales. V rámci tohto radu sme identifikovali z analyzovaných lykožrútov tri druhy húb: *Ophiostoma taphrorychi*, *Ophiostoma californicum* a *Ophiostoma piceae*, pričom výrazne dominoval prvý zo spomínaných druhov. Celkovo bolo izolovaných 142 izolátov druhu *Ophiostoma taphrorychi*. Zvyšné dva druhy boli len minoritne zastúpené v populácii, získaných bolo iba 7 (*O. californicum*) alebo 5 (*O. piceae*) izolátov. Druhý najpočetnejší druh huby izolovaný z lykožrúta bukového bol *Geosmithia brunnea*, izolovaných bolo spolu 99 izolátov. Z rodu *Geosmithia* sme identifikovali vo vzorkách aj ďalší druh, *Geosmithia longistipitata*. Jeden izolát tohto druhu bol izolovaný z lykožrúta odobratého na lokalite Vidov vrch. Dva najčastejšie izolované druhy, *Ophiostoma taphrorychi* a *Geosmithia brunnea*, boli identifikované na všetkých lokalitách a na základe Camargovho kritéria boli charakterizované ako dominantné druhy v populácii identifikovaných húb. Sú to zároveň jediné dva druhy húb izolované na všetkých lokalitách, čo naznačuje ich úzku asociáciu s lykožrútom bukovým. Presnejšiu distribúciu identifikovaných taxónov medzi lokalitami ilustruje Vennov diagram (obr. 3). Z diagramu je zrejmé, že až 13 taxónov húb bolo identifikovaných iba na jednej z hodnotených lokalít. Abundancia a prevalencia väčšiny identifikovaných taxónov húb bola nízka, čo naznačuje ich oportunistický charakter a len slabé prepojenie s lykožrútom bukovým. Na druhej strane z prezentovaných výsledkov môžeme vysloviť hypotézu, že oba dominantné druhy húb, *O. taphrorychi* a *G. brunnea*, sú tesne naviazané na lykožrúta bukového. Ich úloha v asociácii s lykožrútom zatiaľ nie je preskúmaná a zaslúži si ďalší výskum.

Z húb izolovaných v tejto práci predstavujú potenciálne riziko pre hostiteľa hlavne huby zo skupiny Ophiostomatales. Rod *Ophiostoma* zahŕňa druhy s rôznym stupňom patogenity vo vzťahu k rastlinnému hostiteľovi. Väčšina druhov rodu *Ophiostoma* sa považuje za nepatogénnych alebo sú zodpovedné za spôsobenie modrého zafarbenia beľového dreva (Wingfield et al. 2017). Niektoré druhy sú však vysoko virulentné patogény stromov (Harrington 1993). Informácie o patogenite *O. taphrorychi*, ktorú sme v našej štúdii najčastejšie izolovali, však chýbajú. Taktiež patogenita druhu *O. californicum* doposiaľ izolovaného iba z *Prunus domestica* L. (Hausner et al. 1993) nie je známa. Huba *O. piceae* spôsobujúca modré sfarbenie dreva v kmeni a rezive dreva ihličnanov je síce považovaná za saprofytický druh (Haridas et al. 2013), avšak jej identifikácia len na základe ITS regiónu nie je jednoznačná, nakoľko v prípade komplexu blízko príbuzných druhov je na ich rozlíšenie nepostačujúca a môže tak zahŕňať aj závažných stromových patogénov (Wang et al. 2021).

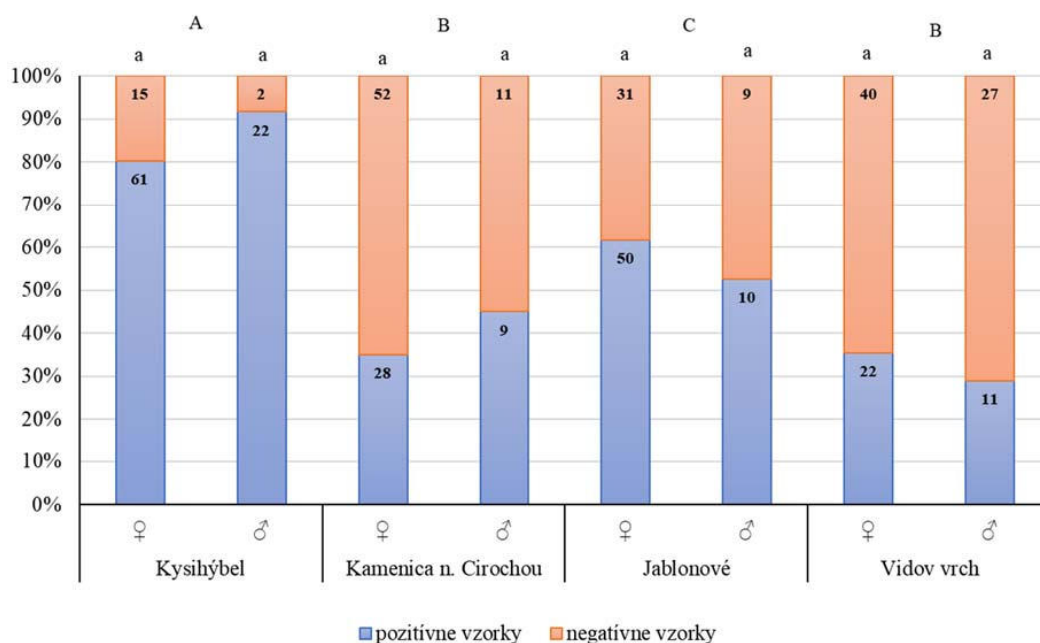
Z rodu *Geosmithia* je známych len niekoľko patogénnych druhov, napr. *Geosmithia morbida* M. Kolařík, Freeland, C. Utley & Tisserat na *Juglans nigra* L. (Tisserat et al. 2009) a *G. pallida* (G. Sm.) M. Kolařík, Kubátová & Pažoutová na *Quercus agrifolia* Née (Lynch et al. 2014), a väčšina druhov tohto rodu je považovaných za nepatogénne, čo potvrdili výsledky inokulačných testov sadeníc rôznych ihličnatých a listnatých drevín (Jankowiak & Kolařík 2010; Dori-Bachash et al. 2015; Strzalka et al. 2021). Zdá sa, že aj štyri druhy rodu *Geosmithia* (*G. fagi* B. Strzalka, R. Jankowiak & M. Kolařík; *G. flava* M. Kolařík, Kubátová & Pažoutová; *G. pazoutovae* B. Strzalka, R. Jankowiak & M. Kolařík; *Geosmithia* sp. 3) izolované z *T. bicolor* na *F. sylvatica* sú nepatogénne, nakoľko neprodukovali žiadne lézie ani symptómy ochorenia inokulovaných sadeníc (Strzalka et al. 2021). Patogenita druhu *G. brunnea* doposiaľ izolovaného z *Xylosandrus compactus* (Eichhoff 1875) na *Liquidambar styraciflua* L. a z *Hypothenemus dissimilis* (Zimmermann 1868) na *Quercus* sp. (Huang et al. 2017), ako aj druhu *G. longistipitata* izolovaného len zo smreka obyčajného (*Picea abies* [L.] Karst.) napadnutého lykožrútmí *Ips typographus* (Linnaeus 1758) a *Polygraphus poligraphus* (Linnaeus 1758) (Strzalka et al. 2021) nebola zatiaľ potvrdená.

Tabuľka 1. Druhová diverzita húb a počet ich izolátov získaných z imág lykožrúta bukoveho na hodnotených lokalitách v roku 2023

Table 1. Species diversity of fungi and number of isolates obtained from adults of Beech bark beetle in selected localities in 2023

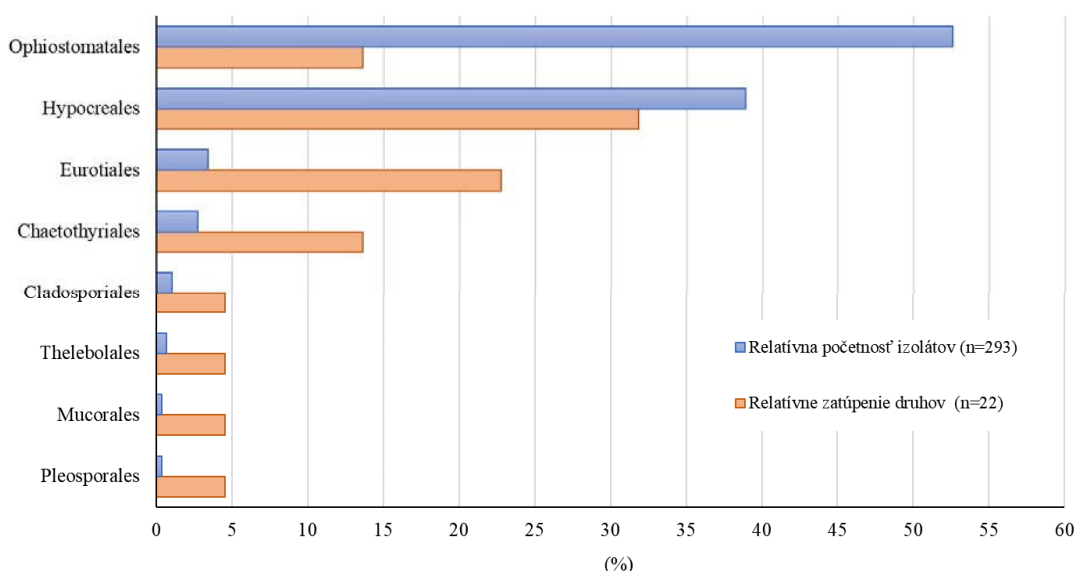
Názov lokality	Kysihýbel	Kamenica n. Cirochou	Jablonové	Vidov vrch	Lokality spolu
Názov taxónu	Počet získaných izolátov (% podiel z celkového počtu izolátov)				
<i>Ophiostoma taphrorychi</i> Strzalka & Jankowiak	52 (40,00)*	25 (60,98)*	46 (61,33)*	19 (40,43)*	142 (48,46)*
<i>Geosmithia brunnea</i> Y. T. Huang, M. Kolařík & Hulcr	56 (43,08)*	7 (17,07)*	24 (32,00)*	12 (25,53)*	99 (33,79)*
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	—	1 (2,44)	—	8 (17,02)*	9 (3,07)
<i>Ophiostoma californicum</i> (DeVay, R. W. Davidson & W. J. Moller) Georg Hausner, J. Reid & Klassen	7 (5,38)	—	—	—	7 (2,39)
<i>Penicillium bialowiezense</i> K. W. Zaleski	2 (1,54)	1 (2,44)	—	3 (6,38)	6 (2,05)
<i>Ophiostoma piceae</i> (Münch) Syd. & P. Syd.	4 (3,08)	—	1 (1,33)	—	5 (1,71)
<i>Cyphellophora sessilis</i> (de Hoog) Réblová & Unter.	1 (0,77)	—	3 (4,00)	—	4 (1,37)
<i>Cladosporium</i> sp.	2 (1,54)	—	—	1 (2,13)	3 (1,02)
<i>Rhinocladiella quercus</i> Crous & R.K. Schumacher.	1 (0,77)	2 (4,88)	—	—	3 (1,02)
<i>Akanthomyces muscarius</i> (Petch) Spatafora, Kepler & B. Shrestha	2 (1,54)	—	—	—	2 (0,68)
<i>Geomyces auratus</i> Traaen	1 (0,77)	1 (2,44)	—	—	2 (0,68)
<i>Geosmithia longistipitata</i> M. Kolařík & R. Jankowiak	—	—	—	1 (2,13)	1 (0,34)
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	—	—	—	1 (2,13)	1 (0,34)
<i>Cosmospora lavitskiae</i> (Zhdanova) Gräfenhan & Seifert	1 (0,77)	—	—	—	1 (0,34)
<i>Exophiala tremulae</i> Wei Wang	—	1 (2,44)	—	—	1 (0,34)
<i>Keissleriella taminensis</i> (H. Wegelin) S. K. Bose	—	1 (2,44)	—	—	1 (0,34)
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> (J. C. Gilman & E. V. Abbott) Schroers	—	—	1 (1,33)	—	1 (0,34)
<i>Penicillium pancosmium</i> Houbraken, Frisvad & Samson	—	—	—	1 (2,13)	1 (0,34)
<i>Beauveria pseudobassiana</i> S. A. Rehner & Humber	1 (0,77)	—	—	—	1 (0,34)
<i>Penicillium salmoniflumine</i> S. W. Peterson, Jurjevic & Frisvad	—	1 (2,44)	—	—	1 (0,34)
<i>Penicillium</i> sp.	—	1 (2,44)	—	—	1 (0,34)
<i>Mucor</i> sp.	—	—	—	1 (2,13)	1 (0,34)
Celkový počet izolátov	130	41	75	47	293
Druhová bohatosť (Species richness) – S	12	10	5	9	22
Shannonov index diverzity (Shannon index) – H	1,374	1,385	0,908	1,601	1,497
Druhová vyrovnanosť (Evenness) – E	0,553	0,601	0,564	0,729	0,484

Poznámka: *taxóny húb označené hviezdíčkou sú na základe relatívnej početnosti získaných izolátov zaradené k dominantným druhom v rámci populácie identifikovaných húb (relatívna početnosť > 1/S, (Camargo 1995)).



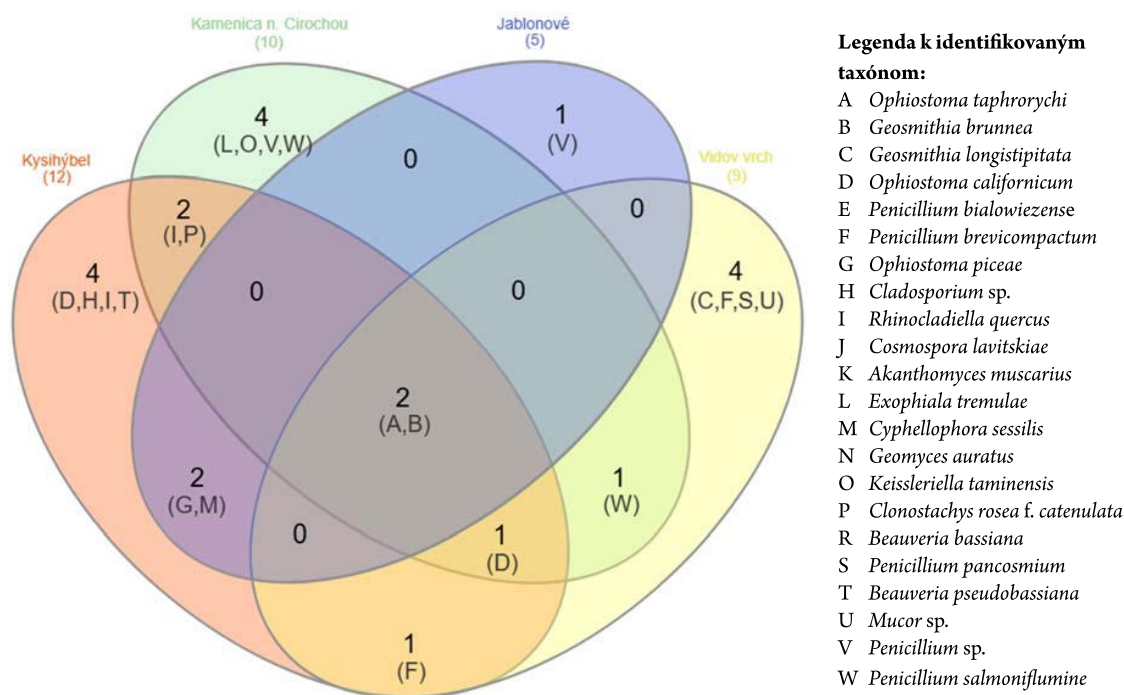
Obrázok 1. Zastúpenie vzoriek lykožrútov, podľa pohlavia a lokalít, z ktorých boli získané izoláty húb (■ pozitívne vzorky) alebo neboli získané žiadne izoláty (■ negatívne vzorky). Rozdiely v počte pozitívnych a negatívnych vzoriek lykožrútov pre ♂ a ♀ v rámci konkrétnych lokalít označené rovnakým malým písmenom nie sú štatisticky preukazné ($p < 0,05$). Rozdiely v počte pozitívnych a negatívnych vzoriek lykožrútov pre obe pohlavia medzi lokalitami označené rovnakým veľkým písmenom nie sú štatisticky preukazné ($p < 0,05$)

Figure 1. Distribution of bark beetle samples by sex and sampling location, showing samples with fungal isolates (■ positive samples) and those without (■ negative samples). There were no statistically significant differences ($p < 0.05$) in the number of positive and negative samples between male and female beetles within the same location (indicated by lowercase letters). There were no statistically significant differences ($p < 0.05$) in the number of positive and negative samples between locations (indicated by uppercase letters) for both sexes



Obrázok 2. Relatívna početnosť izolátov podľa taxonomických skupín (radu) a relatívne zastúpenie počtu identifikovaných druhov húb v konkrétnom rade

Figure 2. Relative frequency of isolates by taxonomic order and percentage proportions of species number in a particular order to the overall number of isolated species



Obrázok 3. Vennov diagram, ktorý ilustruje ako boli izolované taxóny húb distribuované medzi skúmanými lokalitami
Figure 3. Venn diagram showing the number of isolated fungal taxa shared among different sampling sites

Podakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja v rámci riešenia projektu APVV-22-0545 „Nový škodca v bučinách na Slovensku: Výskum metód ochrany lesa proti lykožrútovi bukovejmu (*Taphrochus bicolor*)“.

Literatúra

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et al., 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389–3402.
- Anonymous, 2023: Správa o lesnom hospodárstve v Slovenskej republike za rok 2022 – Zelená správa (Skrátená verzia). Bratislava, Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky a Národné lesnícke centrum, 66 s.
- Camargo, J. A., 1995: On Measuring Species Evenness and Other Associated Parameters of Community Structure. *Oikos*, 74:538–542.
- Carluccio, G., Sabella, E., Greco, D., Vergine, M., Delle Donne, A. G., Nutricati, E. et al., 2024: Acute and Chronic Oak Decline in urban and forest ecosystems in Southern Italy. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, cpae011.
- Corcobado, T., Cech, T. L., Brandstetter, M., Daxer, A., Hüttler, C., Kudláček, T. et al., 2020: Decline of European Beech in Austria: Involvement of *Phytophthora* spp. and Contributing Biotic and Abiotic Factors. *Forests*, 11:895.
- Delb, H., 2005: Rindenbrüter an Buchen nach der trocken-heißen Witterung im Sommer 2003. In: Dujesiefken, D., Kockerbeck, P. (eds.): *Jahrbuch der Baumpflege 2005*. Braunschweig, Thalacker Verlag, p. 203–207.

- Dori-Bachash, M., Avrahami-Moyal, L., Protasov, A., Mendel, Z., Freeman, S., 2015: The occurrence and pathogenicity of *Geosmithia* spp. and common blue-stain fungi associated with pine bark beetles in planted forests in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 143:627–639.
- Fernandes, C., Duarte, L., Naves, P., Sousa, E., Cruz, L., 2022: First report of *Brenneria goodwinii* causing acute oak decline on *Quercus suber* in Portugal. *Journal of Plant Pathology*, 104:837–838.
- Gardes, M., Bruns, T. D., 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2:113–118.
- González, A. J., Ciordia, M., 2020: *Brenneria goodwinii* and *Gibbsiella quercinecans* isolated from weeping cankers on *Quercus robur* L. in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 156:965–969.
- Haridas, S., Wang, Y., Lim, L., Alamouti, S. M., Jackman, S., Docking, R. et al., 2013: The genome and transcriptome of the pine saprophyte *Ophiostoma piceae*, and a comparison with the bark beetle-associated pine pathogen *Grosmannia clavigera*. *BMC Genomics*, 14:373.
- Harrington, T., 1993: Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: Wingfield, M. J., Seifert, K. A., Webber, J. F. (eds): *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology and pathogenicity. St. Paul, American Phytopathological Society Press, p. 161–172.
- Harz, B., Topp, W., 1999: Totholz im Wirtschaftswald: eine Gefahrenquelle zur Massenvermehrung von Schadinsekten? *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 118:302–313.
- Hausner, G., Reid, J., Klassen, G. R., 1993: On the phylogeny of *Ophiostoma*, *Ceratocystis* s.s., and *Microascus*, and relationships within *Ophiostoma* based on partial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 71:1249–1265.
- Huang, Y. T., Kolařík, M., Kasson, M. T., Hulcr, J., 2017: Two new *Geosmithia* species in *G. pallida* species complex from bark beetles in eastern USA. *Mycologia*, 109:790–803.
- Jankowiak, R., Kolařík, M., 2010: Fungi associated with the fir bark beetle *Cryphalus piceae* in Poland. *Forest Pathology*, 40:133–144.
- Lakatos, F., Molnár, M., 2009: Mass mortality of beech (*Fagus sylvatica* L.) in South-West Hungary. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*, 5:75–82.
- Langer, G. J., Bußkamp, J., 2023: Vitality loss of beech: a serious threat to *Fagus sylvatica* in Germany in the context of global warming. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130:1101–1115.
- Leuschner, C., 2020: Drought response of European beech (*Fagus sylvatica* L.) – A review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 47:125576.
- Lynch, S. C., Wang, D. H., Mayorquin, J. S., Rugman-Jones, P. F., Stouthamer, R., Eskalen, A., 2014: First report of *Geosmithia pallida* causing foamy bark canker, a new disease on coast live oak (*Quercus agrifolia*) in association with *Pseudopityophthorus pubipennis* in California. *Plant Disease*, 98:1276.
- Mihajlović, Lj., 2003: Insect Pests in Beech Forests in Serbia. *Šumarstvo*, 1–2:73–84.
- Mihál, I., Cicák, A., Tsakov, H., 2014: Selected biotic vectors transmitting beech bark necrotic disease in Central and South-Eastern Europe. *Folia Oecologica*, 41:62–74.
- Mihál, I., Cicák, A., Tsakov, H., 2015: Beech bark necrotic disease (*Fagus sylvatica* L.) of tracheomycotic type in Central and South-eastern Europe. *Journal of Forest Science*, 61:7–17.
- Nikolov, Ch., Galko, J., Barta, M., Pastirčáková, K., Kádasi-Horáková, M., Kunca, A. et al., 2023: A new pest in beech stands of Slovakia: Evaluation and proposal of control methods against *Taphrorychus bicolor* – project APVV-22-0545. *APOL*, 4:93–97.
- Petercord, R., 2008: Zukünftige Gefährdung der Rotbuche durch rinden- und holzbrütende Käfer in Baden-Württemberg (Future endangerment of the European beech by bark and wood boring beetles in Baden-Württemberg). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, 16:247–250.
- Simon, M., 1995: Investigations into bark beetles (Coleoptera, Scolytidae) living on beech (*Fagus sylvatica*). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, 10:161–165.

- Spaić, I., Stevanović, M., 1991: Scolytidae (Insecta, Coleoptera). CANU, posebna izdanja: Fauna Durmitora, 4:161–179.
- Strzałka, B., Kolařík, M., Jankowiak, R., 2021: *Geosmithia* associated with hardwood-infesting bark and ambrosia beetles, with the description of three new species from Poland. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114:169–194.
- Tisserat, N., Cranshaw, W., Leatherman, D., Utley, C., Alexander, K., 2009: Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and thousand cankers disease. *Plant Health Progress*, 10:1–10.
- Tkaczyk, M., Celma, L., Ruņģis, D. E., Bokuma, G., 2021: First report of *Brenneria goodwinii* and *Gibbsiella quercinecans* bacteria, detected on weakened oak trees in Poland. *Baltic Forestry*, 27:563.
- Tkaczyk, M., Sikora, K., Galko, J., 2024: First report of bacteria causing Acute Oak Decline on *Quercus robur* in Slovakia. *European Journal of Plant Pathology*, 169:113–120.
- Viceníková, A., Polák, P., 2003: Európsky významné biotopy na Slovensku. ŠOP SR Banská Bystrica, Daphne – Inštitút aplikovanej ekológie, 151 s.
- Wang, Z., Zhou, Q., Zheng, G., Fang, J., Han, F., Zhang, X. et al., 2021: Abundance and Diversity of Ophiostomatoid Fungi Associated With the Great Spruce Bark Beetle (*Dendroctonus micans*) in the Northeastern Qinghai-Tibet Plateau. *Frontiers in Microbiology*, 12:721395.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.): *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York, Academic Press, p. 315–322.
- Wingfield, M. J., Barnes, I., De Beer, Z. W., Roux, J., Wingfield, B. D., Taerum, S. J., 2017: Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects and tree hosts: current status – future prospects. *Biological Invasions*, 19:3215–3228.
- Zalkalns, O., Celma, L., 2021: The distribution of bacteria *Gibbsiella quercinecans* and *Brenneria goodwinii* in oak (*Quercus robur* L.) stands in Latvia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 875:012033.

ADRESA

Ing. Marek Barta, PhD., Mgr. Katarína Pastirčáková, PhD., Ing. Miriam Kádasi-Horáková, PhD.
Ústav ekológie lesa SAV, v. v. i.
Oddelenie fytopatológie a mykológie
Akademická 2
SK-949 01 Nitra
e-mail: marek.barta@savba.sk

Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD.
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen
Lesnícka 11
SK-969 01 Banská Štiavnica
e-mail: juraj.galko@nlcsk.org, christo.nikolov@nlcsk.org