

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie

**Entomofilní hlístice u kůrovců rodu *Ips*
(Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)**

Disertační práce

Autor: Mgr. Šárka Grucmanová

Školitel: Prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

2014

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Entomofilní hlístice u kůrovců rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)“ vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele. Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Děkuji svému školiteli Prof. Ing. Jaroslavu Holušovi, Ph.D. za odborné vedení všech terénních prací, konzultace k metodice, realizaci pokusů a za pomoc při sestavení disertační práce. Také děkuji všem spoluautorům odborných publikací a v neposlední řadě také své rodině za podporu. Disertační práce vznikla za finanční podpory interních grantů IGA FLD 20124321, IGA FLD 20134325, IGA FLD B00118/004 a celouniverzitního grantu CIGA 20124302 České zemědělské univerzity v Praze a projektu NAZV QH81136 Ministerstva zemědělství České republiky.

Abstrakt

Entomofilní hlístice u kůrovců rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Entomophilic nematodes of bark beetles of the genus *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Disertační práce se zabývá entomofilními hlísticemi u významných zástupců lýkožroutů rodu *Ips* (Coleoptera: Scolytinae), přičemž vychází z vlastního terénního a laboratorního výzkumu a stejně tak z již publikovaných výsledků vědeckých prací. Práce uvádí stručnou charakteristiku hostitelských druhů, které byly vybrány pro tuto studii pro velmi nedostatečnou či dokonce nulovou znalost jejich nematofauny, obsahuje základní informace o bioregulačním komplexu lýkožroutů, jehož součástí hlístice jsou a shrnuje poznatky o hlísticích, které byly dosud popsány u zástupců rodu *Ips* ve střední Evropě.

Během let 2011 - 2013 byl získán studijní materiál z pokácených napadených stromů, lapáků i lapačů. Zpracováno bylo na 6000 lýkožroutů rodu *Ips* a vyšetřeno více než 300 jejich požerků. Výsledkem pak je první studie nematofauny l. severského (*I. duplicatus*) ve střední Evropě, doplnění informací o druhovém spektru hlístic l. modřínového (*I. cembrae*) a zjištění míry napadení l. smrkového (*I. typographus*) endoparazitickými hlísticemi jako možného přirozeného regulátoru populací tohoto škůdce v jeho gradační fázi. Determinovány byly hlístice náležející do 7 rodů, z toho 1 rod byl zaznamenán nově v asociaci s lýkožrouty rodu *Ips* ve střední Evropě a 1 druh rodu již známého pro lýkožrouty je nový pro Českou republiku.

Práce také porovnává infestaci hlísticemi u lýkožroutů stejného druhu, různého pohlaví, na různých lokalitách a z různých generací (přezimující a dceřiná) či získaných různými odchytovými metodami a potvrzuje zásadní vliv lokálního mikroklima na rozvoj nematofauny.

Klíčová slova: Nematoda, *Ips*, pohlaví, generace

Abstract

Entomophilic nematodes of bark beetles of the genus *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Entomofilní hlístice u kůrovců rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

This PhD thesis deals with entomophilic nematodes associated with *Ips* bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) on the basis of field and laboratory research as well as previously published scientific works. This work gives a brief characterization of host species selected for this study by the reason of very few or even no knowledge of their nematofauna, includes the basic informations about natural enemies or bioregulation complex of *Ips* bark beetles including nematodes and summarizes the current knowledge about these nematodes described in representatives of *Ips* genus in Central Europe.

During the period 2011 - 2013 the study material was obtained from felled infected trees, tree traps and Theysohn pheromone traps. More than 6000 *Ips* bark beetles were processed and more than 300 their gallery contents were examined. One of the results of this thesis is the very first study of the double spined bark beetle (*I. duplicatus*) nematofauna in Central Europe together with the addition of informations on the range of nematode species associated with the large larch bark beetle (*I. cembrae*) and the determination of the level of endoparasitic nematode infestation in the spruce bark beetle (*I. typographus*) as a potential regulator of natural populations of this pest in its gradation phase. Nematodes of 7 genera were determined. One of these genera has been recorded newly in association with bark beetles of the genus *Ips* in Central Europe and one species is new for the Czech Republic.

This work also compares the prevalence of nematodes in bark beetles of the same species between overwintering and offspring generations, beetle sexes, localities or sampling methods and confirms the major influence of the local microclimate on the nematofauna development.

Keywords: Nematoda, *Ips*, sex, generation

Obsah

1.	Úvod	7
2.	Cíle	9
3.	Literární rešerše	10
3.1.	Charakteristika lýkožroutů rodu <i>Ips</i>	10
3.2.	Rozšíření a význam zkoumaných druhů	13
3.2.1.	<i>Ips typographus</i>	13
3.2.2.	<i>Ips duplicatus</i>	14
3.2.3.	<i>Ips cembrae</i>	15
3.3.	Bioregulační komplex.....	16
3.4.	Entomofilní hlístice kůrovců	20
3.5.	Vztahy hlístic s kůrovci.....	22
3.6.	Vliv parazitace	23
3.7.	Hlístice lýkožroutů rodu <i>Ips</i>	26
4.	Metodika.....	28
5.	Výsledky	33
5.1.	Nematofauna rodu <i>Ips</i> - review	34
5.2.	<i>Ips typographus</i>	45
5.3.	<i>Ips duplicatus</i>	55
5.4.	<i>Ips cembrae</i>	66
6.	Diskuse.....	89
7.	Závěr	97
8.	Seznam použité literatury	98

1. Úvod

Vztahy mezi hlísticemi a významnými lesními škůdci, mezi které lýkožrouti rodu *Ips* De Geer, 1775 bezesporu patří, jsou pro naše území dlouhodobě přehlíženým tématem. A to, i přestože je většina druhů tohoto rodu považována za velmi vážné škůdce (Pschorn-Walcher, 1977), z nich lýkožrout smrkový (*I. typographus* (Linné, 1758)) je dokonce dle naší legislativy kalamitní škůdce a lesnický význam l. severského (*I. duplicatus* (Sahlberg, 1836)) neustále roste (Holuša a kol., 2010b). Třebaže jsou hlístice studovány z hlediska možnosti jejich využití v biologickém boji, existuje pouze několik publikací, které se zabývají hlísticemi asociovanými s kůrovci na území střední Evropy (např. Rühm, 1956; 1960; Balazy, 1966; 1968; Takov a kol., 2006; Nedelchev a kol., 2008; Tenkáčová a Mituch, 1986; 1987; 1991).

Dle některých autorů jsou hlístice významným faktorem, který může ovlivňovat populace kůrovců (Rühm, 1956; Massey, 1974; Thong a Webster, 1975; Weiser a Mráček, 1988). Ačkoli většinou nejsou schopny svého hostitele usmrtit, mohou ovlivňovat jeho chování, přežívání, letovou aktivitu, redukovat plodnost či posunovat termín jejich rojení (např. Massey, 1956; 1960; Hoffard a Coster, 1976; Kaya, 1984). V této souvislosti jsou hlavně endoparazitické hlístice považovány za činitele, kteří oslabují svého hostitele, mohou snižovat počet nakladených vajíček až o 40 % a mohou redukovat počet generací kůrovce vyprodukovaných za rok (Massey, 1974; Lieutier, 1984b). Známé endoparazitické druhy hlístic rodů *Parasitylechus* a *Contortylenchus*, které parazitují lýkožrouty rodu *Ips* i ve střední Evropě, byly popsány jako příčina tvorby menšího tukového tělesa, ovarii a horšího vyvíjení terminálních oocytů u parazitovaných lýkožroutů (Lieutier, 1982). Stupeň napadení populace kůrovců a množství hlístic nalézáných na jednom jedinci se přitom velmi liší lokalitu od lokality a pravděpodobně závisí na mikroklimatických podmínkách, spíše než na nadmořské výšce nebo na tom, jestli jsou vzorky odebrány ze stojícího nebo padlého stromu (např. Rühm, 1956; Choo a kol., 1987; Meirmans a kol., 2006).

Účelem práce je shrnout dosavadní dostupné informace o hlísticích asociovaných s lýkožrouty rodu *Ips* jako součásti bioregulačního komplexu

a vytvořit seznam druhů těchto hlístic, které byly v této souvislosti zaznamenány na území střední Evropy. Rovněž stanovit hladinu infestace endoparazitickými hlísticemi s bioregulačním potenciálem u našeho nejvýznamnějšího kalamitního škůdce l. smrkového (*I. typographus*) v jeho gradační fázi. Poskytnout celoevropsky chybějící informace o spektru hlístic vázaných na l. severského (*I. duplicatus*), jehož hospodářský a ekonomický význam stále roste. Doplňit chybějící informace o nematofauně l. modřínového (*I. cembrae* (Heer, 1836)). A dále se zaměřit na některé aspekty, které ovlivňují nebo by mohly ovlivňovat výskyt těchto hlístic, jako je vliv existence bivoltinních populací lýkožroutů, vliv pohlaví lýkožrouta, vliv vývojového stadia (stáří požerku), vliv lokality (nadmořské výšky) na stupeň infestace lýkožroutů hlísticemi nebo vliv odchytové metody.

2. Cíle

- Shrnout dosavadní dostupné informace o nematofauně lýkožroutů rodu *Ips* a vytvořit seznam druhů těchto hlístic, které byly zaznamenány na území střední Evropy
- Stanovit míru infestace endoparazitickými hlísticemi jako součásti bioregulačního komplexu u našeho nejvýznamnějšího kalamitního škůdce l. smrkového (*I. typographus*) v jeho gradační fázi
- Popsat nematofaunu l. severského (*I. duplicatus*)
- Doplnit informace a seznam hlístic vázaných na l. modřínového (*I. cembrae*)
- Zhodnotit infestaci hlísticemi se zaměřením na aspekty, které ovlivňují nebo by mohly ovlivňovat jejich výskyt u lýkožroutů (např. bivoltinnismus, pohlaví a vývojové stadium lýkožrouta, lokalita/nadmořská výška či odchytová metoda)

3. Literární rešerše

3.1. Charakteristika lýkožroutů rodu *Ips*

Lýkožrouti rodu *Ips* jsou řazeni v rámci čeledi nosatcovití Curculionidae do podčeledi Scolytinae. Zástupci tohoto rodu dosahují velikosti od 2,2 do 8 mm. Jejich tělo je válcovité hnědé až hnědočerné, lesklé a krátce ochlupené. Tykadla mají pět článků a plochou oválnou paličku s různě tvarovanými švy, krovky jsou v řádcích tečkované, u některých druhů je tečkované i mezirýží. Krovky jsou vzadu vyhloubené a ozubené třemi až šesti páry pohlavně dimorfních zubů. Lýkožrouti rodu *Ips* se živí lýkem jehličnatých stromů, převážně smrků, modřínů a borovic. U nás se vyskytuje 7 druhů tohoto rodu: lýkožrout vrcholkový *Ips acuminatus* (Gyllenhal, 1827), l. menší *I. amitinus* (Eichhoff, 1871), l. modřínový *I. cembrae* (Heer, 1836), l. severský *I. duplicatus* (Sahlberg, 1836), *I. mansfeldi* (Wachtl, 1879), l. borový *I. sexdentatus* (Börner, 1776) a l. smrkový *I. typographus* (Linné, 1758). Determinační klíč k určování jednotlivých druhů lýkožroutů poskytuje publikace Pfeffer (1989).

Bionomie lýkožroutů tohoto rodu je v mnoha směrech obdobná. V našich podmínkách se zpravidla líhnou dvě generace za rok, ve vyšších polohách jedna, přičemž při celkově teplém průběhu počasí může být o jednu generaci více. Jarní rojení začíná většinou na přelomu dubna a května, závisí na teplotě a nadmořské výšce. Letní rojení se odehrává obvykle od konce června do počátku srpna. Za výhodných klimatických podmínek nebo při vysokých populačních hustotách může u obou generací dojít k sesterskému přerojení (Martínek, 1961; Anderbrant, 1990). Při velmi výhodných klimatických podmínkách dochází k rojení třetího pokolení. Brouci třetí generace svůj vývoj většinou nestihnou dokončit a zimují ve stadiu larev nebo kukel pod kůrou napadených stromů. Za normálních podmínek lýkožrouti ale přezimují hlavně jako dospělí jedinci pod silnější kůrou stromů, pod kmenem ležících stromů, či v lesní hrabance

do vzdálenosti 3 m od stromu (Postner, 1974; Zumr, 1982; Wermelinger, 2004; Holuša a kol., 2014).

Po přezimování se brouci rozletají do okolí, kdy se během jednoho dne mohou rozptýlit až do vzdálenosti 750 m (Matoušek, 2012). Za podmínek epidemie bylo zjištěno, že se 90 % nových zamoření objevilo ve vzdálenosti do 100 m od místa starého útoku (Wichmann a Ravn, 2001). A bylo zaznamenáno, že velké kůrovcem napadené plochy ohrožují okolní porosty do vzdálenosti až 500 m (Schröter, 1999; Wichmann a Ravn, 2001). U bivoltinních populací se přitom druhá generace rozšiřuje dále než první (Furuta a kol., 1996). Letové schopnosti lýkožroutů jim dovolují urazit vzdálenost až 8 km od místa rojení (Botterweg, 1983). Lýkožrouti byli ale zaznamenáni i ve vzdálenosti 35 - 40 km od místa rojení (Piel a kol., 2005; Matoušek, 2012).

Pokud jsou populační hustoty nízké, jsou lýkožrouti považováni za sekundární škůdce, kteří vyhledávají a upřednostňují polomové či jinak poškozené stromy nebo porosty oslabené suchem či polutanty (Zumr, 1995; Skuhřavý, 2002). Obecně je přijímán názor, že kůrovci vyhledávají hostitelský strom na základě emitovaných hostitelských atraktantů většinou terpenoidní povahy a dále zrakových, čichových a hmatových podnětů (Kausrud a kol., 2011; Matoušek, 2012). Přemnožení jsou způsobena nejčastěji extrémními podmínkami počasí. Např. při vzniku rozsáhlých polomů téměř vždy dochází ke zvýšení početnosti a rychlému nástupu gradace. V takových situacích, kdy se razantně zvětší populační hustota, lýkožrouti nenalézají dostatek vhodného materiálu pro založení potomstva, napadají i zdravé stromy (Zahradník a Knížek, 2000) a stávají se tak škůdci primárními (Křístek, 1994).

Jako první nalétávají na stromy samci, kteří během několika dnů vyhlodají snubní komůrku a produkují agregační feromon (jehož hlavními složkami jsou ipsdienol, ipsenol, verbenol) lákající obě pohlaví ke kolonizaci a samice k páření. Přitom úspěch kolonizace je závislý na populační hustotě lýkožroutů a odolnosti stromu, která je korelována s obsahem pryskyřice uvolňované během zavrtávání lýkožroutů. Paine a kol. (1997) zjistil, že lýkožrouti produkují agregační feromony pouze do chvíle, kdy je dosaženo limitu odolnosti hostitele (vyjádřeno v počtu útoků na jednotku plochy), tj. do té doby, dokud pryskyřicový systém

hostitele zůstává aktivní. Vylučování pryskyřice je označováno jako tzv. primární (konstitutivní) rezistence (obrana) a kromě ní byla u smrků popsána ještě sekundární schopnost obrany, která je vyvolaná patogenem nebo hmyzem v případě, že primární obranný systém selže nebo není dostatečně efektivní. Tato sekundární (indukovaná) obrana, která je zprostředkována působením endogenních fytohormonů, vede k tvorbě dalších pryskyřičných kanálků a následné další produkci terpenů. Indukovaná obrana může být specifická pro konkrétní patogenní organismus a indukovaná pryskyřice může mít rozdílné chemické složení od konstitutivní (Turčáni a kol., 2008).

Každá samice lýkožrouta po spáření, které probíhá ve snubních komůrkách, hloubí svou matečnou chodbu, kde klade vajíčka do zářezů po jejích stranách (v průměru 60 - 100 kusů (Pfeffer, 1955; Martínek, 1961; Zumr, 1995)). Samice lýkožrouta smrkového může při přemnožení řešit vzrůstající kompetici o lýko časnějším opuštěním matečné chodby a založením sesterského pokolení, kdy klade vajíčka ve stejném či nově obsazeném stromě bez nebo i s novou kopulací (Martínek, 1961). Čím kratší je doba pobytu samice v požerku, tím kratší matečnou chodbou vyhloubí a tím nižší počet vajíček do ní naklade (Thalenhorst, 1958; Mills, 1986; Anderbrant, 1990; Weslien, 1994; Skuhravý, 2002). Kladení obvykle trvá zhruba týden a poté se po jednom až dvou týdnech líhnou larvy, které hloubí larvální chodby a tím vytváří druhově specifické tvary požerků. Při velkých hustotách osídlení stromu byl zaznamenán kanibalismus u larev, jejichž chodby se křížily (Doležal a Sehnal, 2007). Délka vývoje larev je rovněž velmi závislá na průběhu počasí a obvykle trvá dva až čtyři týdny. Kuklení probíhá vždy až po přijetí minimálního množství potravy a tím dosažení minimální hmotnosti larvy. Probíhá v kukelných komůrkách, které larvy vyhloubí na koncích svých chodeb. Období kukly trvá obvykle déle než týden. Nově vylíhlí brouci jsou zpočátku bílí, postupně žloutnou a dále tmavnou a poté prodělávají přibližně dvoutýdenní zralostní žír, během kterého pohlavně dospívají. Za normálních podmínek je celková doba vývoje od založení požerku přibližně 6 - 10 týdnů.

3.2. Rozšíření a význam zkoumaných druhů

3.2.1. Lýkožrout smrkový - *Ips typographus* (Linné, 1758)

L. smrkový je nejznámějším a nejproblematictější zástupcem svého rodu. Vyskytuje se v celé Eurasii. Během pravidelných přemnožení v posledních dvou stoletích způsobil katastrofální škody ve střední a severní Evropě (Annala, 1969). Historicky jsou jeho kalamity dokumentované z Německa, Rakouska, Česka, Švédska a Norska, značné rozšíření je známo z Francie, Švýcarska, severní Itálie, Srbska, Bosny a Hercegoviny, Rumunska, Ukrajiny, pobaltských zemí, z rozsáhlých lesů Ruska, poulalí i Sibíře (Skuhravý, 2002). Za nejvážnější je považována situace, která nastala v první polovině 20. století (1942 - 1953), kdy bylo napadeno několik milionů m³ jehličnatého dříví, příčinou vzniku kalamity tehdy byly důsledky válečných škod a velká sucha (Skuhravý, 2002).

L. smrkový patří v celé Evropě k nejvýznamnějším škůdcům smrků. V České republice je ze zákona považován za kalamitního škůdce, vyskytuje se prakticky všude, kde jsou smrkové porosty (Zahradník a Knížek, 2007). Nejčastěji pak v porostech starších 60-ti let, zejména na jejich okrajích. Jeho hostitelskou dřevinou je téměř výhradně smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karts.), výjimečně napadá modřín opadavý (*Larix decidua* Mill.) a velmi vzácně borovici lesní (*Pinus sylvestris* Linné, 1758) či jedli bělokorou (*Abies alba* Mill., 1768). Přičemž napadá převážně spodní a střední partie kmene stromů.

Při nižších populačních hustotách je považován za sekundárního škůdce, který osídluje polomové stromy nebo oslabené porosty, např. suchem či polutanty (Zumr, 1995; Skuhravý, 2002). Za takových podmínek často dochází ke zvýšení početnosti a rychlému nástupu gradace. Při přemnožení pak mnohdy nenalézá dostatek vhodného materiálu pro rozmnožování, napadá i zdravé stromy (Zahradník a Knížek, 2000) a stává se primárním škůdcem (Křístek, 1994). Celkový objem evidovaného smrkového kůrovcového dříví v roce 2012 byl 0,63 mil. m³, jehož převážnou část tvořilo dříví napadené právě l. smrkovým, dále pak l. severským (*I. duplicatus*). Mezi dlouhodobě nejproblematictější oblasti v tomto ohledu patří jižní a jihozápadní Čechy, severní Morava a Slezsko (Knížek a Modlinger, 2013).

3.2.2. Lýkožrout severský - *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836)

L. severský je Evropskou a Středozevní organizací ochrany rostlin (EPPO) uváděn jako karanténní škůdce (Smith a kol., 1996). Jeho hostitelskou dřevinou je stejně jako u l. smrkového hlavně smrk ztepilý (*P. abies*) ve věku 40 - 70 let (Pfeffer, 1955), narozdíl od něho ale napadá převážně střední a vyšší partie stromů (Pfeffer a Knížek, 1995) a silnější větve (Holuša a kol., 2003). Často napadá pouze jednotlivé stojící stromy v porostu (Mrkva, 1995; Grodzki, 1999), ležící stromy napadá zřídka (Pfeffer a Knížek, 1995; Mrkva, 1995; Grodzki, 1997). Dokumentováno je také napadení borovic (*Pinus* sp.) modřínů (*Larix* sp.), jedlí (*Abies* sp.) a jalovců (*Juniperus* sp.) (Pfeffer, 1989; Mrkva, 1994; 1995; Michalski a Mazur, 1999; Holuša a Grodzki, 2008).

Jedná se o palearktický druh. Původně se vyskytoval v tajgách a jeho areál rozšíření do počátku 20. století sahal od Švédska po severovýchodní Asii (Sachalin), byl znám i z oblasti Alp (Pfeffer, 1955; Knížek a Holuša, 2007; Holuša a Grodzki, 2008). V Mongolsku a Číně, kde se od 50. let 20. století jeho přemnožení dosti často opakují, je považován za hlavní příčinu poškození v přirozených smrkových porostech (Zhang a Schlyter, 1995; Schlyter a kol., 2001; Zhang a kol., 2001). V průběhu 20. století se začal šířit na jih a osídlovat umělé smrkové porosty na horách i v nížinách (Pfeffer a Knížek, 1995). V České republice byl poprvé dokumentován v roce 1927 v její východní části (Wanka, 1927). A v 90. letech 20. století byl u nás a také v Polsku zaznamenán výskyt jeho lokálních přemnožení (Knížek a Zahradník, 1996; Grodzki, 1997; 2003). V tomto období bylo v důsledku jeho působení vytěženo několik set tisíc m³ dříví (Holuša a kol., 2013a). Dnes je rozšířen prakticky na celém území České republiky do nadmořské výšky asi 600 m n. m. (Turčáni, 2000; Holuša a kol., 2010), vzácněji i ve vyšších nadmořských výškách (Grodzki, 2003; Holuša a Grodzki, 2008; Holuša a kol., 2013a). Většina jeho gradací je lokalizovaná na severní Moravě a ve Slezsku (Holuša a Knížek, 2007). Poslední přemnožení l. severského v České republice začalo v roce 2003 a jeho populační hustoty zůstávají vysoké od roku 2005 (Holuša a kol., 2010a). V současné době je u nás považován za ekonomicky významného škůdce (Holuša a kol., 2010b) a jeho šíření v Evropě

pokračuje dále na západ, východ a na jih (Vakula a kol., 2009; Holuša a kol., 2010b).

3.2.3. Lýkožrout modřínový - *Ips cembrae* (Heer, 1836)

L. modřínový je eurosibiřským druhem, který se vyskytuje prakticky v celé Evropě od nejnižších poloh až do poloh subalpínského pásma (Rakousko, Chorvatsko, Česká republika, Dánsko, Finsko, Švédsko, Francie, Německo, Maďarsko, Velká Británie, Itálie, Anglie, Wales, Skotsko, Nizozemí, Polsko, Rumunsko, Srbsko a Černá Hora, Slovinsko, Slovensko, Švýcarsko a Ukrajina) a také v centrálním Rusku (Postner, 1974; OEPP/EPPO, 2005; Grodzki, 2008).

V celém areálu rozšíření je jeho hlavní hostitelskou rostlinou modřín opadavý (*L. decidua*) (Postner, 1974). V minulosti byl rovněž jeho výskyt zaznamenán na borovici (*Pinus cembra* Linné, 1758.), tento záznam byl ale revidován a nebyla potvrzena jeho správnost. Jednalo se o záměnu s jiným příbuzným lýkožroutem l. menším (*I. amitinus*) (Pfeffer, 1995).

L. modřínový je považován za sekundárního škůdce modřínových porostů nižších a středních poloh (Grégoire a Evans, 2004), ale je schopen ve výjimečných případech, zejména v období sucha, osídlivat také smrky (*P. abies*) (Pfeffer, 1989). Rozmnožuje se ve vytěženém dříví (Elsner, 1997), ve vývratech (Krehan a Steyer, 2005), polomech (Luitjes, 1974) či v hynoucích stromech (Grodzki, 2008). Na přirozeně sušších lokalitách může období s podprůměrným srážkovým úhrnem podpořit napadání i zelených vitálních stromů (Bevan, 1987). V takových případech se l. modřínový namnoží a následně působí jako primární škůdce zdravých stromů. Ohrožené jsou především mladé, ale i starší porosty nižších a středních poloh (Grodzki a Kosibowicz, 2009). S rostoucí populací při přemnožení může tento druh lýkožrouta škodit v modřínových porostech také jako fyziologický škůdce vizuálně zdravých stojících stromů, které podlely jeho masivnímu náletu. Rovněž působí škody jako defoliátor v důsledku zralostního žíru mladých brouků v tenkých větvích či v korunách zdravých stromů nebo v důsledku regeneračního žíru starších brouků na tenkých kmenech a silnějších větvích (Postner, 1974; Krehan a Cech, 2004). Historicky jsou známé gradace l. modřínového ve střední Evropě v souvislosti

s přemnožením bekyně mnišky (*Lymantria monacha* (Linné, 1758) ve 20. letech 20. století (Pfeffer, 1955). Následně lokálně gradoval na mnoha místech České republiky (Knížek, 2008). V posledních dvaceti letech nastalo několik období lokálních gradací, trvající nejdéle tři roky 2003 - 2005 a 2006 - 2008, které jsou dávány do souvislosti zejména s extrémním suchem (Krehan a Cech, 2004; Knížek a Zahradník, 2004; Stratmann, 2004).

3.3. Bioregulační komplex

Hlístice patří do tzv. bioregulačního komplexu s potenciálem regulovat (především snižovat) populace lýkožroutů. Do této skupiny organismů jsou řazeny hlavně patogeny (nemoci) lýkožroutů, kterým se podrobně věnují ve svých pracích např. Holuša a kol. (2013b); Lukášová a Holuša (2011; 2012; 2013), Lukášová a kol. (2013). Tyto nemoci jsou virového, protozoárního či houbového původu, ale uplatňují se zde také parazitické hlístice. Do tohoto komplexu dále spadají i parazitoidi a predátoři.

V současné době je známo několik desítek druhů patogenních mikroorganismů u podčeledi Scolytinae, z nichž je deset popsáno u lýkožrouta smrkového *I. typographus* (Wegensteiner, 2004; Takov a kol., 2010). Zájem o jejich studování začal ve 20. letech, intenzivněji jsou ale studovány až od 90. let minulého století (Fuchs, 1915; Wegensteiner, 2004).

Z virů byl u lýkožroutů rodu *Ips* popsán Entomopoxvirus (*ItEPV*), který napadá střeva pouze dospělých jedinců, vyplňuje střevní epitel, v důsledku čehož může dojít až k perforaci střev. Z těla odchází s výkaly, kterými se rovněž přenáší na další lýkožrouty (Weiser a Wegensteiner, 1994; Wegensteiner a Weiser, 1995; Weiser a kol., 2000; Wegensteiner, 2004; Burjanadze a Goginashvili, 2009; Yaman a Baki, 2011). Přestože viry teoreticky patří mezi nejvhodnější organismy využívané coby prostředky biologického boje, dosavadní studie ukazují, že v boji proti lýkožroutům pravděpodobně nebudou efektivní (Holuša a kol., 2004).

Z prvoků (Protozoa) se u lýkožroutů vyskytují hlavně měňavky (Rhizopoda) a hromadinky (Apicomplexa). Z měňavek se jedná o druh *Malamoeba scolyti* (Purrini, 1980) (Wegensteiner, 1994; Wegensteiner a kol., 1996; Händel a kol., 2001; Zitterer, 2002), který se vyskytuje v Malpigických trubicích a střevech. Do prostředí je uvolňován společně s trusem. Při experimentálním zavedení infekce tímto druhem měňavky došlo ke zkrácení života lýkožroutů asi o polovinu (Kirchhoff a Führer, 1990). Dalším prvokem je *Gregarina typographi* (Fuchs, 1915). Jedná se o druh hromadinky se složitým vývojovým cyklem, která je lokalizovaná ve střední části střeva a byla nalezena u celé řady zástupců podčeledi Scolytinae (např. Takov a kol., 2007; 2010; Yaman, 2007; Holuša a kol., 2009; Kereselidze a kol., 2010). Infekčním stadiem je oocysta v trusu či těle uhynulého kůrovce. Tento druh prvoka ale pravděpodobně není příliš virulentní a způsobuje spíše mechanická a fyziologická poškození epitelu střeva, či ucpání střeva (Yaman, 2007; Wegensteiner a kol., 2010). Poměrně vzácným druhem protozoárního patogenu, který se vyskytuje u lýkožroutů rodu *Ips* je schizogregarina *Menzbieria chalcographi* (Weiser, 1955), která napadá tukové těleso brouků (Wegensteiner a Weiser, 2004; Holuša a kol., 2009). Infekční spóry jsou z těla lýkožrouta uvolňovány až po jeho úhynu a rozkladu, který probíhá v prostředí požerku, nakažení jedinci totiž zůstávají v požerku a nevlétají (Weiser a kol., 2000). Nákazu je možné uměle rozšířit postříkem suspenze nakažených jedinců na povrch lapáku (Holuša a Weiser, 2005).

Hlavním houbovým patogenem lýkožroutů je *Beauveria bassiana* (Bals.), která po infikaci pokrývá tělo brouků hustým bílým povlakem mycelií a konidií. Prášek obsahující konidie byl v České republice registrován pod názvem Boverol. Postřík vodní suspenzí spór na povrch napadených stromů nebo lapáků jako způsob biologického boje proti lýkožroutu smrkovému je rozšířen hlavně v Německu, Švýcarsku a Rakousku. Tento druh houby byl popsán u více než stovky druhů hmyzu a je hodnocen jako vhodná náhrada za běžně užívané chemické pesticidy (Roberts a Hájek, 1992; Hájek a St. Leger, 1994). Dalším běžným druhem entomopatogenní houby u lýkožroutů rodu *Ips* je *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Mezi houbové patogeny patří i kvasinka *Metschnikowia*

typographi (Weiser a kol., 2003; Unal a kol., 2009), která je příležitostným patogenem v hemolymfě a střevním epitelu kůrovců. Z primitivních hub se u lýkožroutů coby patogeny uplatňují zástupci velké skupiny Mikrosporidií (Zygomycetes: Microsporidia). Tito intracelulární parazité napadají střevní epitel středního střeva, dostávají se do vaječniců a jsou přenášeny i na larvy, u kterých ale nezpůsobují mortalitu či onemocnění (Weiser a kol., 1998; Weiser, 2002; Wegensteiner, 2004). V tukové tkáni, Malpigických trubicích a vaječnicích I. smrkového je nalézán druh *Unikaryon montanum* (Weiser, Wegensteiner, Žižka, 1998) či *Nosema typographi* (Weiser, 1955). Nejběžněji se ale vyskytuje *Chytridiopsis typographi* (Weiser, 1954) Weiser, 1970 lokalizovaná ve střevním epitelu, její cysty jsou vylučovány s trusem a ve vnějším prostředí jsou infekční i několik měsíců (Wegensteiner a Weiser, 1996; Lukášová a Holuša, 2012). Tento druh mikrosporidie se vyskytuje u řady dalších zástupců podčeledi Scolytinae (Wegensteiner, 2004). Naopak druhově specifickou a teprve v nedávné době popsanou mikrosporidií je *Larssoniella duplicati* (Weiser, Holuša a Žižka, 2006) vázaná na lýkožrouta severského (*I. duplicatus*), která napadá svaly středního střeva (Holuša a kol., 2007). Přípravek na bázi mikrosporidií proti kůrovcům v současné době bohužel není na trhu insekticidů k dispozici (Wegensteiner, 2004).

Přestože entomopatogenní hlístice čeledí Steinernematidae a Heterorhabditidae jsou využívány jako prostředek biologické kontroly škůdců, kteří prodělávají část svého vývojového cyklu v půdě (ploskohřbetky, muchnice, klikorohové, ponravy chroustů) - zejména pro svou schopnost napadat vůbec nejširší spektrum hostitelů (Nermut' a kol., 2012), dauerlarvy (infekční stadia většinou 3. instaru) některých druhů těchto hlístic jsou již dokonce komerčně dostupné (např. *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), *S. feltiae* Filipjev, 1934, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976, *Phasmarhabditis hermaphrodita* (A. Schneider, 1859)) - a přestože část populací lýkožroutů přezimuje v hrabance (Postner, 1974; Zumr, 1982; Wermelinger, 2004; Holuša a kol.; 2014), nepatří tyto hlístice k běžným parazitům kůrovců (Weiser a Mráček, 1988). Třebaže v laboratorních podmínkách proběhly úspěšné pokusy o infikaci kůrovců těmito hlísticemi (Finney a Mordue, 1976; Poinar a Deschamps, 1981), v přírodě nebyla

jejich vazba na lýkožrouty zaznamenána. Hlísticím s vazbou na lýkožrouty rodu *Ips* je v následujícím textu věnována samostatná kapitola (3.7.).

Do bioregulačního komplexu lýkožroutů je nutné zahrnout také skupinu parazitoidů z řádu blanokřídlých (Hymenoptera). Parazitoid je organismus, který žije na těle nebo v těle jiného organismu a který vždy (narozdíl od parazita) na konci svého vývojového cyklu svého hostitele usmrcuje. Do této skupiny náleží zejména zástupci čeledí Braconidae a Pteromalidae, kteří jsou vaječnými parazitoidy, ektoparazitoidy larev či endoparazitoidy dospělých brouků. Z vaječných parazitoidů je to např. *Heydenia pretiosa* Foerster, 1856 z čeledi Pteromalidae. Dospělé samice larválních ektoparazitoidů se pohybují po povrchu kůry, skrze kůru paralyzují larvy lýkožrouta vstříknutím jedu a umísťují jedno vajíčko na jejich tělo. Ektoparazitoidi z čeledi Braconidae vytváří v požercích kokony, nejznámější z nich jsou např. lumčík dutohlav (*Coeloides bostrichorum* Giraud, 1872) a l. stromolib (*Dendrosoter middendorffii* (Ratzeburg, 1848). Zatímco larvy zástupců čeledi Pteromalidae se kuklí přímo v požercích (Kenis a kol., 2004), např. kovověnka kůrovcová (*Rhopalicus tutela* (Walker, 1836)) a k. kladélkatá (*Roptrocerus xylophagorum* (Ratzeburg, 1844)). Endoparazitoidem dospělých lýkožroutů je např. lumčík kyjorohý (*Ropalophorus clavicornis* (Wesmael 1835)) z čeledi Braconidae či kovověnka Seitnerova (*Tomicobia seitneri* (Ruschka 1924)) z čeledi Pteromalidae. Samice obou druhů napadají lýkožrouta ještě před zavrtáním do kůry, vráží kladélko do zadních článků zadečku pod krovky a pak do něho kladou vajíčko.

Za součást bioregulačního komplexu lýkožroutů mohou být považováni také roztoči (Acari). Některé druhy roztočů např. řádu Mesostigmata byly pozorovány, jak se v požercích živí jejich vajíčky či larvami (Hofstetter a kol., 2009). Jednalo se zejména o druh *Dendrolaelaps quadrisetus* (Berlese, 1920) či *D. cornutus* (Kramer, 1886), přičemž mortalita vajíček způsobena těmito roztoči dosahovala 7 % (Kielczewski a Balazy, 1966). Bylo rovněž zjištěno, že někteří foretičtí roztoči, nejen z řádu Mesostigmata, mohou mít také vliv na reprodukci a kvalitu potomstva svých hostitelů (Čejka a Holuša, 2013). Laboratorně bylo zjištěno, že přítomnost foretických roztočů na samicích lýkožrouta ovlivňuje kvalitu a také kvantitu produkovaného potomstva a byl

zjištěn silný negativní efekt na jeho reprodukční úspěch (Hodgkin a kol., 2010). Zároveň je ale těmto roztočům přisuzována i jistá užitečnost pro lýkožrouty. Bylo totiž popsáno, že se někteří zástupci rodů *Dendrolaelaps* či *Cercoleipus* přednostně živí hlísticemi (Hunter a Rosario, 1988).

Nelze opomenout ani predátory. Nejvýznamnějšími z nich jsou brouci čeledi pestrokrovečnickovití (Cleridae), zejména pestrokrovečník mravenčí (*Thanasimus formicarius* (Linné, 1758)) a *T. femoralis* (Zett.) (= *T. rufipes* (Brahm)), dále také zástupci čeledi drabčíkovití (Staphylinidae), např. druh *Nudobius lentus* (Gravenhorst, 1806) nebo rod *Phloeopora*. Svůj význam mají rovněž zástupci řádu dvoukřídlí (Diptera), zejména larvy lupicovitých much (čeleď Dolichopodidae) rodu *Medetera* a *Lonchaea* (čeleď Lonchaeidae) či larvy dlouhošijek (Raphidioptera). Mezi příležitostné predátory patří střevlíkovití brouci, vosy, mravenci, a někteří ptáci (zejména šplhavci). Studii bioregulačního komplexu včetně míry napadení endoparazitickými hlísticemi a stavu populace I. smrkového v gradační fázi v NP Šumava poskytuje kapitola 5.2.

3.4. Entomofilní hlístice kůrovců

Počátky zájmu o studium entomofilních hlístic kůrovcovitých sahají do 19. století. Jednou z prvních prací zabývajících se vztahy hlístic a kůrovců byla publikace von Linstow vydaná v roce 1890, ve které popsal hlístici *Allantonema diplogaster* (později přejmenoval Rühm (1956) na *Contortylenchus diplogaster*) u lýkožrouta smrkového (*I. typographus*) (Massey, 1974). Od této doby vznikaly publikace popisující nematody nalézané u různých druhů kůrovců (např. Fuchs, 1914; 1915; 1929; 1930; Oldham, 1930; Steiner, 1932; Thorne, 1935; 1949). Významnou publikaci v tomto období je práce Fuchs, 1915, ve které se zabývá hlísticemi s vazbou na I. smrkového a navazuje na ní i svou taxonomickou studii hlístic náležejících do podčeledí Aphelenchoidea a Tylenchoidea (Fuchs, 1938). Od 50. let se zájem o hlístice kůrovců zvyšuje. Vydáno bylo mnoho taxonomických studií a následně revizí např. Andrassy, 1954; Wachek, 1955; Massey, 1957; 1960; 1964ab; 1969; Nickle, 1967; 1970; Thong a Webster, 1973;

Hunt a Hague, 1974; Geraert a De Grise, 1981; Tomalak a kol., 1989; Kaya a Stock, 1997; Braasch, 2001; Ryss a kol., 2005 a mnoho dalších. Existuje tak množství determinačních klíčů zaměřených na jednotlivé čeledi či rody hlístic. Vznikají rovněž publikace zabývající se nematofaunou jednotlivých druhů nebo rodů kůrovců např. publikace týkající se nematofauny kůrovců rodu *Scolytus* poskytl Massey (1964a); Ashraf (1968); Ashraf a Berryman (1970); Hunt a Hague (1974); Moser a kol. (2005), rodu *Dendroctonus* Massey (1956; 1966); Furniss (1967); Thong a Webster (1983), rodu *Pityogenes* Reid (1958); Nickle (1963); a konečně rodu *Ips* Rühm (1954; 1955; 1956); Massey (1960); Hoffard a Coster (1976). Stěžejní studie Rühm (1956) podává přehled entomofilních hlístic nalézáných u zástupců podčeledi Scolytinae z území Německa, včetně vývojových cyklů, tato práce je i dnes hojně využívána a citovaná. V práci jsou podrobně uvedeny charakteristiky zástupců Nematoda nalézáných u kůrovců 13 rodů (*Cryphalus*, *Crypturgus*, *Dendroctonus*, *Dryocetes*, *Hylastes*, *Hylesinus*, *Hylurgus*, *Myelophilus*, *Orthotomicus*, *Pityogenes*, *Pityophthorus*, *Polygraphus*, *Scolytus*). Z rodu *Ips* jsou zpracováni *I. acuminatus*, *I. amitinus*, *I. cembrae*, *I. typographus*. Obdobnou publikací shrnující druhy entomofilní hlístic nalézáných u zástupců podčeledi Scolytinae představuje Massey (1974) a Choo a kol. (1987), ve kterých rovněž uvádí výčet druhů hlístic vázaných na lýkožrouty rodu *Ips*. Obě publikace pocházejí ze Spojených států amerických.

Jak bylo uvedeno výše, nematofauna kůrovcovitých je často zmiňována také společně s ostatními patogeny a jinými organismy v rámci studia bioregulačního komplexu. V těchto studiích jsou ale informace o nematofauně většinou neucelené a nezřídka se vztahují pouze na poměrně snadno rozeznatelné druhy endoparazitických hlístic nalézáných v tělních dutinách či trávicím ústrojí kůrovců (např. rod *Contortylenchus*, *Parasitylenchus*), např. Weiser a kol. (2006), Takov a kol. (2006; 2011), Burjanadze a Goginashvili (2009); Kereselidze a kol. (2010), Michalková a kol. (2012).

3.5. Vztahy hlístic s kůrovci

Vztahy mezi hlísticemi a kůrovci jsou stejně jako u hmyzu obecně popisovány různě. Např. endoparazitismus, ektoparazitismus, semiparazitismus, saprobitismus, komenzálismus, predace apod. (Tenkáčová a Mituch, 1987). Vedle různých forem parazitismu je u hlístic s vazbou na kůrovce (Scolytinae) velmi rozšířená foresie, kdy hlístice využívají svého hostitele jako prostředek pro osídlení nového prostředí. Foretické hlístice jsou nalézány na tělech brouků. Jejich dauerlarvy (stadia většinou 3. instaru) jsou nejčastěji lokalizované ve shlucích pod krovkami, na křídlech nebo mezi jednotlivými články těla. Zejména mezi hrudí a zadečkem a mezi abdominálními tergity. Tyto hlístice se většinou živí houbami, bakteriemi a jinými mikroorganismy a na tělech brouků se často nacházejí v anabioze, někdy ve specifických útvarech jako např. zástupci rodu *Ektaphelenchus*, kteří se pod krovkami a na křídlech nacházejí v čočkovitých strukturách zvaných nematangia (Cardoza a kol., 2006). Vývojový cyklus těchto hlístic vykazuje několik základních rysů. V požercích se vyskytují dospělé hlístice, které se páří, většinou kladou vajíčka, z nichž se pak líhnou larvy, které se několikrát svlékají, vyhledávají svého hostitele, a když se na něj přichytí, jsou jeho prostřednictvím přeneseny do nového prostředí, kde jej opustí a vývoj dále pokračuje. Larvy se svlékají, po dosažení dospělosti se páří a celý cyklus se opakuje. Mezi foretické hlístice kůrovců náleží např. zástupci rodů *Neoditylenchus*, *Ektaphelenchus* nebo *Micoletzkyia* či *Bursaphelenchus*.

Naopak parazitické hlístice jsou nalézány uvnitř těl svých hostitelů, přičemž infekce hostitele je podmínkou pro úspěšné dokončení jejich vývojového cyklu (Hunt a Hague, 1974). Hlístice bývají nalézány volně v tělní dutině dospělců, kukel i larev kůrovců. Vývojový cyklus endoparazitických hlístic je popisován následovně. Juvenilní hlístice jsou nalézány v požercích, kde dospívají a páří se. Infekčním stádiem je oplozená juvenilní samice, která se dostává skrz kutikulu (nejčastěji v místech mezi tělními články) nebo střevo do těla svého hostitele, který je obvykle ve stádiu 1. - 2. larválního instaru, napadány však mohou být i starší larvy kůrovců. Životní cyklus parazita je synchronizovaný

s vývojovým cyklem hostitele. Samice hlístice dosáhne dospělosti zhruba ve stejném období jako její hostitel. Samice pak produkuje larvy (např. *Parasitylenchus*) nebo vajíčka (např. *Contortylenchus*) do tělní dutiny hostitele. Mladé larvy hlístice penetrují střevo a jsou vyloučeny do prostředí požerku. Alternativou může být vývojový cyklus zástupců rodu *Parasitaphelenchus*. Vajíčka jsou kladena v požercích v blízkosti larev hostitele, z nich se vyvíjejí larvy, které po několikerém svlékání infikují larvu nebo i kuklu kůrovce, v její tělní dutině sají tekutiny, pak pronikají do střeva a tudy ven z těla do požerků, kde se svlékají do adultního stádia, páří se a kladou vajíčka. Počet generací hlístic vyprodukovaných za jeden rok je obvykle stejný jako počet generací hostitele. Přičemž při laboratorních pokusech jsou hlístice schopny dosáhnout až 12 generací (Massey, 1974).

V tělních dutinách nebo ve střevech kůrovců jsou nalézáni zástupci rodů *Contortylenchus*, *Parasitylenchus*, *Parasitaphelenchus*, *Parasitorhabditis* či *Cryptaphelenchus*. Zástupci rodu *Cryptaphelenchus* bývají také nalézáni v Malpigických trubicích, volně v tělní dutině i na povrchu těla kůrovců. V lumenu střeva se pak nejčastěji vyskytují zástupci rodů *Parasitaphelenchus* a *Parasitorhabditis*.

3.6. Vliv parazitace

Od počátků studia entomofilních hlístic kůrovců je velmi diskutovanou otázkou jejich vliv na populace těchto lesních škůdců. Hodnocen je vliv zejména endoparazitických hlístic parazitujících uvnitř těla brouků, které získávají živiny z tělních tekutin, diskutovaný je také odběr živin a energie konzumací přímo tukového tělesa a jiných tkání hostitelů. Endoparazitické hlístice jsou totiž u kůrovců nalézány běžně, i u více než 50 % jedinců (např. Burjanadze a Goginashvili, 2009). Massey (1974) považuje hlístice za důležitý biotický faktor ovlivňující populace kůrovců. Tato Nematoda obvykle nezabíjí svého hostitele, ale v několika případech bylo popsáno, že mění hostitelovo chování, snižují

plodnost, přežívání a letovou aktivitu nebo posunují (obvykle zpožďují) termín rojení (např. Hoffard a Coster, 1976; Kaya, 1984). Fuchs ve svých studiích z první poloviny 20. století uvádí, že hlístice zabíjejí nebo oslabují kůrovce, redukují počet nakladených vajíček až o 40 %, zabraňují vývoji většího počtu generací v daném roce (Massey, 1974) a Yatsenkowsky (1924) poznamenal, že infekce kůrovců malým množstvím hlístic způsobuje jejich sterilitu, větším pak smrt hostitele. Dnes ale už máme více poznatků o tom, jak mohou endoparazitické hlístice ovlivňovat svého hostitele.

Hlístice vyvíjející se uvnitř těla brouků prokazatelně odnímají svému hostiteli živiny. Svědčí o tom snížené množství tukových buněk u infikovaných kůrovců popisované např. ve studiích Nickle (1963); Thong a Webster (1973); Lieutier (1982). Bylo prokázáno měnění se složení hemolyfy charakteristické ubýváním živin (zejména proteinů) při vývoji oplozené samice rodu *Contortylenchus* v hemocelu kůrovců (Thong a Webster, 1972; 1975). Slankis (1967) dále uvádí také mechanické poškozování orgánů a tkání a intoxikaci vlivem přítomnosti hlístic. U lýkožrouta borového (*I. sexdentatus*) bylo zjištěno velké poškození epitelových buněk trávicího traktu u jedinců parazitovaných hlísticemi rodu *Parasitorhabditis* (Lieutier, 1984a).

Signifikantně negativní vliv napadení endoparazitickými hlísticemi na plodnost samic uvádí např. Reid (1958); Massey (1956; 1960); Thong a Webster (1975); Weiser a Mráček (1988). Menší gonády jsou u parazitovaných jedinců popsány již Oldhamem (1930) (Hunt a Hague, 1974). Thong a Webster (1975) uvádí 20% zmenšení oocytů u infikovaných samic. Tyto strukturální změny ale mohou být obrazem sníženého množství živin, které jsou hostiteli hlísticemi odnímány, což potvrzují zjištění Lieutier (1982), že jedinci *I. sexdentatus*, kteří byli parazitováni hlísticemi rodu *Parasitaphelenchus* nebo *Contortylenchus*, měli menší tukové těleso a ovaria a méně vyvinuté terminální oocyty než neparazitovaní. Tukové těleso tak není schopno nashromáždit potřebné množství živin pro normální zrání oocytů a způsobuje následné zpoždění rojení a počátku kladení vajíček. Zaznamenán byl také malý pokles hustoty zářezů a počtu nakladených vajíček u samic l. borového parazitovaných hlísticí rodu

Parasitorhabditis (Lieutier, 1984b). Posunutí termínu rojení potvrdil i Nickle (1963) u *I. confusus* LeConte.

Z dostupných údajů plyne poměrně diskutabilní vliv parazitace hlísticemi na letovou schopnost kůrovců. Strukturální patologické změny nalezené na létacích svalech u jedinců *Scolytus ventralis* LeConte napadených hlísticemi popsané v práci Aschraf a Berryman (1970) mohou být stejně tak odrazem přirozené degradace létacích svalů (Forsse, 1987). Možné ovlivnění letové aktivity bylo rovněž studováno u kůrovců rodu *Dendroctonus* (Atkins, 1961; Kinn a Stephen, 1981) a *Ips* (Thalenhorst, 1958; Forsse, 1987). Signifikantní rozdíly mezi parazitovanými a neparazitovanými brouky ale nebyly nalezeny.

Nickle (1971) a shodně i Poinar a Caylor (1974) ve svých studiích uvádí, že některé druhy hlístic mohou způsobit změny v chování hmyzu a ovlivňovat tvar požerků kůrovců. U l. borového (*I. sexdentatus*) infikovaného hlísticemi rodu *Parasitorhabditis* (Lieutier, 1984b) ani u lýkohuba douglaskového (*Dendroctonus pseudotsugae* Hopk.) infikovaného hlísticí *Contortylenchus reversus* (Thorne, 1935) (Thong a Webster, 1975) se tvar požerků nezměnil, změna byla zaznamenána pouze v délce chodeb, které byly o 25 - 28 % kratší u parazitovaných jedinců.

Míra napadení populace kůrovců a množství hlístic nalézáných na jednom jedinci se velmi liší lokalitu od lokality a pravděpodobně závisí na mikroklimatických podmínkách, spíše než na nadmořské výšce nebo na tom, jestli jsou vzorky odebrány ze stojícího nebo padlého stromu (např. Rühm, 1956; Choo a kol., 1987; Meirmans a kol., 2006). Literární údaje o incidenci hlístic u kůrovců značně varírují, uváděné hodnoty se pohybují od zhruba 1 do 91 % (Takov a Pilarska, 2008), nejčastěji se však pohybují kolem 50 - 60 %. Požerky kůrovců pak obsahují hlístice i ve více než 99 % případů (Hoffard a Coster, 1976; Tenkáčová a Mituch, 1986; 1987; 1991; Cardoza a kol., 2008; Burjanadze a Goginashvili, 2009; Kereselidze a kol., 2010). Pozorována byla také signifikantní rozdílnost míry parazitace mezi přezimující a dceřinou generací brouků (Choo a kol., 1987; Tenkáčová a Mituch, 1986). Přitom nebyly zjištěny rozdíly v parazitaci mezi samci a samicemi (např. Zitterer, 2002; Takov a Pilarska, 2008).

Jednoho kůrovce může obývat obrovské množství hlístic. Není neobvyklé najít kůrovce se stovkami larev hlístic ve střevě a hemocelu a zároveň pod krovkami (Nickle, 1973). Thong a Webster (1975) či Weiser (1966) našli přes tisíc vajíček a larev zástupce rodu *Contortylenchus* v hemocelu jednoho infikovaného brouka rodu *Dendroctonus* a *Ips*. Příčinou je obrovská plodnost hlístic, kdy na jednu samici může připadat až 10 tisíc vyprodukovaných larev (Nickle, 1973).

Počet druhů hlístic vázaných na jeden druh kůrovce je rovněž dosti variabilní. Rühm (1956) zaznamenal maximálně 11 různých druhů hlístic u lýkohuba borového (*Hylastes ater* (Paykull, 1800)). Massey (1974) dokonce 30 druhů u kůrovce *Dendroctonus adjunctus* Blaford, 1897 z území USA. Zdá se, že každý druh kůrovce má svou specifickou nematofaunu (Cardoza a kol., 2006).

3.7. Hlístice lýkožroutů rodu *Ips*

Nematofauna lýkožroutů rodu *Ips* je pro území České republiky prakticky nezpracovaným tématem. První publikací z našeho území, která popisuje nematofaunu lýkožroutů tohoto rodu je Weiser (1954), který popsal tři druhy hlístic nalezených v těle a pod krovkami l. smrkového. Dále existuje několik prací Tenkáčová a Mituch (1986; 1987; 1991) týkajících se nematofauny některých druhů kůrovcovitých z území bývalé Československé republiky. Všechny výzkumné lokality se ale nalézaly na území dnešní Slovenské republiky. Další práce se stejnou tematikou jsou známy např. z území Německa (Rühm, 1956; 1960), Polska (Balazy, 1966; 1968), Bulharska (Takov a kol., 2006; Nedelchev a kol., 2008), Portugalska (Penas a kol., 2006), Ruska (Slankis, 1969; 1972), Francie (Lieutier a Laumond, 1978), Švédska (Forsse, 1987), či Gruzie (Burjanadze a Goginashvili, 2009).

U lýkožroutů rodu *Ips* jsou nejčastěji popisováni zástupci řádů Diplogasterida, Rhabditida a Tylenchida a čeledí Parasitaphelenchidae,

Allantonematidae, Ektaphelenchidae, Aphelenchoididae, Diplogasteroididae, Neodiplogasteridae, Rhabditidae a Parasytylenchidae. Rühm (1956) zaznamenal devět různých druhů hlístic asociovaných s l. smrkovým (*I. typographus*), po pěti s l. vrcholkovým (*I. acuminatus*) a l. modřínovým (*I. cembrae*) a tři druhy hlístic asociovaných s l. menším (*I. amitinus*). Massey (1974) našel 4 - 14 druhů hlístic nalezených u zástupců rodu *Ips* na území USA. Velikost hlístic se přitom pohybuje v rozmezí od 0,2, např. u zástupců rodu *Cryptaphelenchus*, až do 2 mm u zástupců rodu *Contortylenchus*.

Přehled hlístic nalezených u druhů lýkožroutů rodu *Ips* vyskytujících se na území střední Evropy uvádí Tabulky 1-3 kapitoly 5.1. Velkým problémem v tomto ohledu je existence mnoha synonymních názvů pro zástupce jednoho druhu Nematoda. V tabulce jsou tyto druhy označeny (*) a přiložen je rovněž seznam známých synonym (Tabulka 4 kapitoly 5.1.).

4. Metodika

Předkládaná disertační práce je souborem článků a je členěna do tří částí. První částí je shrnutí dosavadních dostupných informací o nematofauně lýkožroutů rodu *Ips* a současné vytvoření seznamů druhů těchto hlístic, které byly zaznamenány na území střední Evropy. Jedná se tedy o review, jejichž zpracování je podmíněno prací s literaturou a jinými informačními zdroji.

Ve druhé části se disertace věnuje hlísticím jako součásti bioregulačního komplexu u našeho nejvýznamnějšího kalamitního škůdce I. smrkového (*I. typographus*) v jeho gradační fázi na území NP Šumava. Pro posouzení parazitace přemnožené populace I. smrkového v bezzásahové zóně NP Šumava byla provedena studie na třech lokalitách Na Ztraceném: Ptačí potok I-III (48°59'23.617"N, 13°30'40.858"E; 48°59'11.240"N, 13°30'5.403"E; 48°59'28.669"N, 13°29'31.022"E, nadmořská výška 1150 m n. m). Na okraji lokalit, které představovaly skupiny či plochy se stromy napadenými nebo opuštěnými lýkožrouty, byly vybrány a poraženy stromy smrku ztepilého (*P. abies*) (PP I a II po 2 stromech, PP III 6 stromů) jevící příznaky napadení kůrovci (přítomnost závrťových otvorů v kůře, drtinek, výronu pryskyřice). Po následném odvětvení stromů byly analyzovány vždy čtyři sekce (I. - IV.), tj. odkorněné pásy o délce rovnající se půlce délky obvodu kmene a o šířce přibližně 0,5 m. I. sekce byla umístěna ve vzdálenosti 0,5 m od paty stromu, II. v poloviční vzdálenosti mezi patou a začátkem koruny, III. na začátku koruny a IV. ve středu koruny. U každého analyzovaného stromu byla evidována jeho celková délka, průměr stromu na jednotlivých sekcích, tloušťka lýka a kůry a rozměry každé sekce. V rámci každé sekce byl zaznamenáván počet snubních komůrek (závrťových otvorů) I. smrkového, délka matečných chodeb, celkový počet nakladených vajíček samicemi (pokud možno 10 studovaných matečných chodeb), počet jedinců jednotlivých vývojových stádií (larva 1. - 3. instaru, kukla, žlutý brouk). Evidována byla také přítomnost jiných druhů kůrovců (podčeleď Scolytinae). Adspekci byl zjišťován stupeň napadení lýkožrouta parazitoidy (zejména zástupci čeledí Braconidae a Pteromalidae z řádu Hymenoptera).

Zaznamenan byl počet jejich larev, kulek nebo zámotků. Sledována byla přítomnost a množství larev či dospělců predátorů I. smrkového z řádu Coleoptera (brouci) zástupci rodu *Thanasimus*, z řádu Diptera (dvoukřídílí) zástupci rodu *Medetera* a z řádu Raphidioptera (dlouhošijky). Pomocí exhaustoru byli z jednotlivých sekcí odebráni všichni mateční a část dceřiných brouků a uloženi v plastových mikrozkuvkách typu Eppendorf do chladu (4°C). V laboratoři byli brouci pitváni dva dny po odběru a nativní preparáty jejich útrobních orgánů (zejména trávicí soustavy, Malpigických trubic, gonád, tukového tělesa) byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (zvětšení 100x až 400x, Arsenal LPE 5013i-T). Zjišťována byla přítomnost virů, mikrosporidií, prvoků, hlístic a parazitoidů (čeledi Braconidae, Pteromalidae). Přeživší jedinci představují sumu všech živých stadií lýkožroutů, od kterých byly odečteny parazitované larvy. Parazitace byla kalkulována jako podíl celkového počtu parazitoidů (larvy na larvách lýkožroutů, larvy parazitoidů mimo larvy lýkožroutů, zámotky a kukly parazitoidů) k celkovému počtu parazitoidů (výše vyjmenovaných) a všem žijícím vývojovým stadiím lýkožroutů. Získaná data byla převedena do tabulkového procesoru MS Excel 2007 a poté graficky a statisticky vyhodnocena v programu Statistica 9.

Ve třetí části se disertační práce zabývá studií nematofauny lýkožrouta severského (*I. duplicatus*) a I. modřínového (*I. cembrae*). Pro studium nematofauny I. severského byly vybrány lokality s jeho hojným výskytem, všechny tyto lokality se nacházely na severní Moravě či ve Slezsku, kde je hojný výskyt tohoto druhu lýkožrouta dlouhodobý. Jednalo se o lokality: Pustá Polom (49° 50' 57.5" N, 18° 2' 3.8" E, 350 m n. m.), Bystřice (49° 36' 36.0" N, 18° 41' 40.9" E; 450 m n. m.) a Břidličná (49° 58' 47.1" N, 17° 24' 52.7" E; 600 m n. m.). Na vybraných lokalitách byl od května do června (přezimující generace) a od srpna do září (dceřiná generace) odebrán materiál z pěti smrků (*P. abies*) napadených tímto druhem lýkožrouta. Z každého stromu bylo odebráno 20 matečných brouků, kteří byli po jednom samostatně vloženi do uzavíratelných mikrozkuvek typu Eppendorf a do doby zpracování byli uchováváni v lednici v laboratoři (teplota do +8 °C). Ze stromů bylo odebráno také 10 požerků I. severského v různém stupni jeho rozvoje. V laboratoři byl z každého požerku

preparační jehlou a štětečkem odebrán obsah a umístěn v uzavíratelném plastovém sáčku a rovněž uchován v lednici (teplota do +8 °C) do doby zpracování. Odebrané vzorky byly popsány, uváděno bylo datum odběru, počet matečných a larválních chodeb, nejstarší a nejhojnější vývojové stadium lýkožrouta v každém požerku. Pro studium nematofauny I. modřínového byly vybrány lokality, kde se aktuálně vyskytovaly pro tento druh typické lokální gradace. Vybrány byly následující lokality: Hradec nad Moravicí (49°51'28.37"N, 17°57'56.07"E 450 m n. m.), Pežgovský les u Havířova (49°48'40.40"N, 18°24'16.94"E 290 m n. m.), Kostelec nad Černými lesy (49°59'1.90"N, 14°48'29.53"E 420 m n. m.). Na vybraných lokalitách bylo v dubnu instalováno pět lapačů s feromonovými odparníky Cembraewit, které byly vybírány v intervalu 7 až 10 dnů. Takto získaní jedinci I. modřínového byli po jednom samostatně vloženi do uzavíratelných mikrozkušavek typu Eppendorf a do doby zpracování byli uchovávaní v lednici v laboratoři (teplota do +8 °C). Na lokalitách byly také instalovány lapáky navnaděné feromonem (odparníky Cembraewit), z nich byly společně s brouky odebrány také požerky. Z požerku byl preparační jehlou a štětečkem rovněž odebrán obsah a umístěn v uzavíratelném plastovém sáčku a uchován v lednici (teplota do +8 °C) do doby zpracování.

V laboratoři byli takto získaní brouci prohlíženi pod lupou či mikroskopem (Arsenal SZP 1102 T Zoom, Arsenal LPE 5013i-T), při tom byla zaznamenávána přítomnost foretických hlístic na jednotlivých částech těla: krovky, křídla, thorax, abdomen a prostory mezi jednotlivými tělními články. V případě I. modřínového byla zaznamenávána i přítomnost foretických roztočů pod krovkami. Následně byla provedena pitva v kapce destilované vody na podložním skle a rovněž byla zaznamenávána přítomnost a lokalizace nalezených hlístic: v hemocelu, střevu, Malpigických trubicích. Dále bylo zaznamenáno pohlaví brouka, lokalita, ze které pochází a datum odběru (příslušnost k přezimující či dceřiné generaci).

Obsah požerků byl vyšetřován na přítomnost hlístic pomocí Baermanovy nálevky, což je nálevka opatřena gumovou hadičkou, na které je umístěna svorka. Nálevka byla naplněna destilovanou vodou, do které bylo přidáno několik kapek peroxidu vodíku jako zdroj kyslíku pro živé hlístice. Vyšetřovaný obsah požerků byl umístěn do jemné tkaniny nebo jedné vrstvy papírového kapesníku, uzavřen

gumičkou, ponořen do vody v nálevce a ponechán přes noc do druhého dne. Hlístice procházely přes vrstvu tkaniny nebo papíru z vyšetřovaného materiálu do vody a usazovaly se v gumové hadičce v oblasti svorky. Druhý den byly sedimentované hlístice odebrány uvolněním svorky a odkapáním několika kapek sedimentu na hodinové sklo. Hlístice byly z hodinového skla odebírány preparační jehlou a byly vloženy do mikrozkušavky typu Eppendorf s kapkou destilované vody a fixovány zalitím horkým roztokem TAF (100 ml roztoku obsahuje: 7 ml 40% formaldehydu, 2 ml triethanolaminu a 91 ml destilované vody) (Kaya a Stock, 1997) o teplotě 60 - 70 °C. Část fixovaných hlístic byla převedena několikastupňovým procesem do glycerolu za použití směsi glycerolu, etylalkoholu a destilované vody (Kaya a Stock, 1997). Fixované hlístice byly umístěny na hodinové sklo s několika kapkami roztoku I (Sol I - 100 ml roztoku obsahuje 20 ml 95% etanolu, 1 ml bezvodého glycerolu a 79 ml destilované vody). Hodinové sklo bylo vloženo do exsikátoru a ponecháno po dobu minimálně 24 hodin. Poté bylo přidáno několik kapek roztoku II (Sol II - 100 ml roztoku obsahuje 95 ml 95% etanolu a 5 ml bezvodého glycerolu). Takto byly hlístice ponechány v exsikátoru znova po dobu minimálně 24 hodin. Následně byly zhotoveny trvalé preparáty. Na podložní sklo byla umístěna kapka bezvodého glycerolu, do které byly hlístice umisťovány v počtech 1 - 3 kusy a překryty krycím sklem, které bylo následně zataveno směsí parafínu a včelího vosku. Poté byly hlístice determinovány na základě morfologie podle Rühm (1956), Slankis (1972), Hunt (1993) a Andrassy (2007). Část hlístic byla také fixována etanolem (70%) a podrobena analýze DNA. Před samotnou analýzou byly hlístice přeneseny na hodinové sklo do sterilní vody, hodinová skla se vzorky byla vožena do Petriho misky s filtračním papírem a sterilní vodou a v ní byly ponechány přes noc v lednici. Pak byla z hlístic DNA extrahována. Hlístice byly přeneseny do sterilních mikrozkušavek typu Eppendorf (200 µl) s 20 µl extrakčního pufru (17,7 µl ddH₂O, 2 µl 10x PCR pufru s MgCl₂, 0,2 µl 1% Tween 20 a 0,1 µl proteináza K 100 µg/ml). Pufry s hlísticemi byly zmrazeny při -20 °C na 20 minut a následně inkubovány při 65 °C po dobu 1 hodiny, následovala inkubace při 95 °C po dobu 10 minut. Takto získané lyzáty byly vychlazeny na ledu a poté centrifugovány 2 minuty při 11 600 rpm (centrifuga Eppendorf

minispin plus), 2 μ l vzniklého supernatantu byly použity pro PCR. Byl použit segment malé a velké ribozomální podjednotky (SSU a LSU). Fragment obsahující vnitřní transkribovaný spacer (ITS1, 5.8 S, ITS2) byl amplifikován použitím primerů SSU 18A AAAGATTAAGCCATGCATG sense, SSU 26R CATTCTTGGCAAATGCTTTCG (Blaxter a kol., 1998), a fragment genu 28s rRNA použitím primeru D2A ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG (Subbotin a kol., 2006). PCR master mix obsahoval: 7,25 μ l ddH₂O, 1,25 μ l 10x PCR pufru s MgCl₂, 1 μ l dNTPs 2,5 mM, 0,75 μ l každého primeru 10 pmol/ μ l, 0,1 μ l Taq DNA polymerazy U/ μ l, a 1 μ l DNA extraktu. Podmínky PCR byly pro SSU 18A: 94 °C po dobu 5 min; následované 35 cykly při 94 °C po dobu 60 s, 52 °C po dobu 90 s, a 68 °C po 2 min a nakonec 68 °C po dobu 10 min (Eyualem a Blaxter, 2003). A podmínky pro D 2A: 4 min při 94 °C; následované 35 cykly 94 °C po 60 s, 55 °C po 90 s, a 72 °C po 2 min., a nakonec 72 °C po 10 min (Tanha Maafi a kol., 2003). Po PCR následovala elektroforéza (40 min, 120 V) 2 μ l PCR produktu v agarosovém gelu (1% TAE) barveného ethidium bromidem (20 μ l ETB 10 mg/ml na 100 ml gelu). Purifikovaný PCR produkt byl odeslán na sekvenaci (firmy Macrogen, Soul, Jižní Korea a Seq Me, Česká republika). Získané sekvence byly srovnávány se sekvencemi uloženými v GenBank metodou Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) National Centre for Biotechnology Information (NCBI).

Byla srovnávána procenta brouků s nematodami (u 1. modřínového i s roztoči) v závislosti na pohlaví jedince, lokalitě a generaci, vzorkem byli brouci odebráni ze stromu či lapače. Počty nematod v požercích byly srovnávány tak, že vzorkem byli všichni brouci z lokality. Ke zpracování dat byl použit MS Excel, ke statistickému zpracování dat program R a statistické testy Kruskal-Wallis test, jednocestná ANOVA, Paersonův korelační test, Wilcoxonův test, vždy na hladině významnosti $\alpha=0.05$.

5. Výsledky

Základem předkládané disertační práce jsou čtyři články, které tvoří jednotlivé podkapitoly kapitoly Výsledky. Dva články jsou publikovány nebo přijaty k publikování v časopisech s IF faktorem (Acta Zoologica Bulgarica a Journal of Applied Entomology). Jeden článek je publikovaný v recenzovaném časopise (Beskydy) a jeden je v podobě manuskriptu před odesláním do redakce Journal of Applied Entomology.

5.1. Nematofauna rodu *Ips* - review

Nematodes Associated with Bark Beetles, with Focus on the Genus *Ips* (Coleoptera: Scolytinae) in Central Europe

Šárka Grucmanová, Jaroslav Holuša

2013

Acta Zoologica Bulgarica 65 (4): 547-556

Publikováno

Nematodes Associated with Bark Beetles, with Focus on the Genus *Ips* (Coleoptera: Scolytinae) in Central Europe

Šárka Grucmanová, Jaroslav Holuša

Department of Forest Protection and Entomology, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 1176, Prague 6-Suchbát 165 21, Czech Republic, grucmanova@fld.czu.cz, holusa@fld.czu.cz

Abstract: The relationships between nematodes and *Ips* spp. has been a neglected topic in central Europe. This work summarizes available information on entomophilic nematodes associated with bark beetles (Scolytinae) with focus on the genus *Ips* DE GEER, 1775. The association can be phoretic, in which the nematode uses the bark beetle for transport to a new environment. This is the case of *Bursaphelenchus*, *Cryptaphelenchus*, *Ektaphelenchus*, *Fuchsnema*, *Micoletzkyia*, *Neoditylenchus* and *Plectus* species, while the most frequent phoretic nematodes in *Ips* bark beetles are *Bursaphelenchus eidmanni* (RUHM, 1956) and *Micoletzkyia buetschlii* (FUCHS, 1915) or endoparasitic, in which the nematode enters and obtains nutrients from the host beetle and depends on the beetle for completion of its life cycle, the case of *Contortylenchus*, *Cryptaphelenchus*, *Ektaphelenchus*, *Parasitaphelenchus*, *Parasitorhabditis* and *Parasitylenchus* species. The most frequent endoparasitic nematode in *Ips* species are *Parasitylenchus dispar* (FUCHS, 1915) and *Contortylenchus diplogaster* v. LINSTOW, 1890. The effects of nematodes on beetle hosts are discussed. Lists of the nematodes associated with particular *Ips* species in central Europe are provided, also the little that is known about these associations in central Europe is summarized.

Key words: Scolytinae, nematodes, phoresy, endoparasitism

Introduction

Nematodes (Phylum Nematoda) are among the most numerous and abundant animals. More than 24,000 species are currently known (HUGOT *et al.* 2001), although as many as 1 million species are thought to exist. Therefore, this phylum could be comparable in size to the class Insecta, which is represented by approximately 925,000 described species (GRIMALDI, ENGEL 2005).

Nematodes live in all types of environments. A large number of free-living, terrestrial, freshwater and of course saltwater species of nematodes are known. They display various life strategies and enter into numerous interactions with viruses, bacteria, plants, fungi, and other animals. Many nematodes are parasites of plants, invertebrates, and vertebrates, including humans. Representatives of this phylum are also frequently used as model organisms in research.

Nematology developed rapidly in the second half of the 20th century and became a well-developed discipline with a number of sub-disciplines, its own techniques, and a substantial literature. Nematode systematics benefitted from the introduction of the electron microscope in the 1960s, of PCR in the 1980s (FERRIS 1994), and of other molecular techniques more recently. Today, the classification and phylogenetic relationships within the Nematoda is the focus of substantial part of research, and many new species continue to be described.

The aim of this article is to summarize the current knowledge of the nematodes associated with bark beetles (i.e., beetles in the subfamily Scolytinae), with particular focus on the bark beetles of the genus *Ips* DE GEER, 1775 in central Europe. The present knowledge concerning nematodes of bark beetles is very fragmentary, and the topic has largely been ignored in central Europe.

Grucmanová Š., J. Holuša

Entomophilic nematodes

Publications concerning entomophilic nematodes (i.e., nematodes closely associated with insects) range from those that merely delineate an association to more detailed studies that describe the relationship between nematode and insect. These relationships include saprobiosis (living in decaying material), commensalism (benefit without affecting the other), which is, according to KAYA, STOCK (1997), one of the most common relationships between nematodes and insects, phoresy, and various degrees and types of parasitism (such as semi-parasitism commonly parasitic but also capable of living on dead or decaying animal matter, ectoparasitism- living on the body surface of the host, endoparasitism- living within the host, facultative parasitism- living independent of the host but may occasionally be parasitic under certain conditions, and obligate parasitism- cannot complete its life cycle without exploiting a suitable host (e.g., WEISER 1988, TENKACOVA, MITUCH, 1987, 1991).

Phoretic nematodes occur on the body and limbs, in the inter-segment spaces, and under the wings of beetles, flies, and other insects. These nematodes instinctively leave a drying substrate and attach themselves to an insect, which transports them to a new environment. In the new environment, the phoretic nematodes leave the insect and feed on fungi, bacteria, and other microorganisms (NICKLE, 1973). Nematodes are also found in the reproductive, respiratory, gastrointestinal, and excretory systems of insects. These endoparasitic nematodes can damage or kill their hosts. Entomophilic, especially entomopathogenic nematodes (nematodes that live within and that weaken and sometimes kill their host insects) have been studied by WEISER (1966), NICKLE (1973), POINAR (1975), WEISER, MRACEK (1988), SONIN, SHARMA (1990) SIDDIQI (2000), GAUGLER (2002), NGUYEN, HUNT (2007), and many others.

For more than 50 years, many researchers have studied entomopathogenic nematodes as biological control agents of insect pests. Much of this research has been focused on nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae, which have wide host ranges (NERMUT *et al.* 2012). Biological control of insect pests by entomopathogenic nematodes has been studied by GAUGLER, KAYA (1990), SCHEEPMAKER *et al.* (1997), STURHAN, LISKOVA (1999), FENTON *et al.* (2000), NAVON, ASCHER (2000), WILSON, GAUGLER (2004), GEBREMARIAM *et al.* (2005), and many others.

Entomophilic nematodes of bark beetles

Entomophilic nematodes were first studied in the 19th century, and one of the first works dealing with re-

lationships between nematodes and bark beetles was written by VON LINSTOW (1890), wherein he described the nematode *Allantonema diplogaster* (later renamed *Contortylenchus diplogaster* by RUHM (1956)) in the spruce bark beetle *Ips typographus* (LINNAEUS, 1758) (MASSEY 1974). Since that time, in many publications species of nematodes found in various bark beetles have been described (e.g., FUCHS 1914, 1915, 1929, 1930, OLDHAM 1930, STEINER 1932, THORNE 1935, 1949). Important work in this period included FUCHS (1915), which described nematodes associated with *I. typographus*, and FUCHS (1938), which is a taxonomic study of nematodes in the superfamilies Aphelenchoidea and Tylenchoidea. The interest in entomophilic nematodes has increased since the 1950s (ANDRASSY 1954, WACHEK 1955, MASSEY 1957, 1960, 1964ab, 1969, NICKLE 1967, 1970, THONG, WEBSTER 1973, HUNT, HAGUE 1974, GERAERT, DE GRISE 1981, TOMALAK *et al.* 1989, KAYA, STOCK 1997, BRAASCH 2001, RYSS *et al.* 2005). These publications include a number of taxonomic keys focusing on individual nematode families and genera. There are also publications dealing with nematodes associated with individual species of the following genera of bark beetles: *Scolytus* (MASSEY 1964a, ASHRAF 1968, ASHRAF, BERRYMAN 1970, HUNT, HAGUE 1974, MOSER *et al.* 2005), *Dendroctonus* (MASSEY 1956, 1966, FURNISS 1967, THONG, WEBSTER 1983), *Pityogenes* (REID 1958, NICKLE 1963), and *Ips* (RUHM 1954, 1955, 1956, MASSEY 1960, HOFFARD, COSTER 1976). An important study by RUHM (1956) provided an overview of entomophilic nematodes associated with bark beetles from Germany and information about nematode life cycles. This study, which is still frequently cited, contains detailed characteristics of nematodes found in 14 genera of bark beetles (*Cryphalus*, *Crypturgus*, *Dendroctonus*, *Dryocoetes*, *Hylastes*, *Hylesinus*, *Hylurgus*, *Ips*, *Myelophilus*, *Orthotomicus*, *Pityogenes*, *Pityophthorus*, *Polygraphus* and *Scolytus*) and details on *Ips acuminatus* (GYLLENHAL, 1827), *I. amitinus* (EICHHOFF, 1871), *I. cembrae* (HEER, 1836) and *I. typographus*. Similar publications from the United States (MASSEY 1974, CHOO *et al.* 1987) described the entomophilic nematodes found in bark beetles including *Ips* species.

The nematodes associated with bark beetles are frequently studied along with other pathogens that could serve as biological control agents of beetle pests. However, the information on these nematodes is incomplete and often limited to easily discernible, endoparasitic species (i.e., nematodes within the beetle rather than on the beetle), such as *Contortylenchus* and *Parasitylenchus* spp. (e.g., WEISER *et al.* 2006, TAKOV *et al.* 2006, 2011,

BURJANADZE, GOGINASHVILI 2009, KERESSELIDZE *et al.* 2010, MICHALKOVA *et al.* 2012).

Relationships between nematodes and bark beetles

Relationships between nematodes and bark beetles are described by the same terms as is the case for relationships between certain other organisms.

Phoretic nematodes

Phoresy is widespread between nematodes and bark beetles, and phoretic nematodes are commonly found on the bodies of beetles. They are most frequently located in clusters under the elytra, on the wings, or between the individual segments of the body, especially between the thorax and the abdomen and between abdominal tergites. These nematodes mostly consume fungi, bacteria, and other microorganisms, and they are often found on the bodies of beetles undergoing anabiosis. Groups of phoretic nematodes sometimes assume specific formations. Species in the genus *Ektaphelenchus*, for example, form cocoon-like structures (nematangia) under the elytra and on the wings of the beetle (CARDOZA *et al.* 2006). The life cycle of these phoretic nematodes has a number of essential features. Adult nematodes occur in the beetle galleries, where they mate and generally lay eggs (oviparity) from which the second stage juveniles hatch. The juveniles moult several times and then seek their host. Upon attaching to the host beetle, they are transferred to a new environment, where they leave the host and continue to develop and moult. Upon reaching maturity, the adults mate, and the entire cycle is repeated. Examples of phoretic nematodes of bark beetles include species of *Neoditylenchus*, *Ektaphelenchus*, *Micoletzkyia*, and *Bursaphelenchus*. Nematodes found on the bodies of *Ips* species in central Europe are presented in Table 1.

Parasitic nematodes

In contrast to phoretic nematodes, parasitic nematodes occur in the body cavities of their hosts and require hosts to complete their life cycle (HUNT, HAGUE 1974). In the case of parasites of bark beetles, endoparasitic nematodes are most frequently found moving freely in the body cavities of adults, larvae, and pupae. *Cryptaphelenchus* spp. are also found on the surface of the insect and in the Malpighian tubules, and *Parasitaphelenchus* and *Parasitorhabditis* spp. occur in the lumen of the intestine but also move freely in the body cavity. With respect to the life cycle of endoparasitic nematodes, juvenile nematodes mature and mate in bark beetle galleries. The impregnated pre-mature female infects the beetle, which is usually the 1st or 2nd stage larva, by passing through

its cuticle or intestine. The life cycles of the parasite and host are synchronized, and the female nematode reaches maturity at approximately the same time as its host. The female then produces juveniles (e. g., *Parasitylenchus*) or eggs (e. g., *Contortylenchus*) within the host body cavity. Young nematode juveniles then penetrate the intestine and are emitted into the gallery. A variation on this kind of life cycle is displayed by *Parasitaphelenchus* spp., which lay their eggs near host larvae in the gallery (e. g. *Scolytus*, *Ips*, *Polygraphus*, *Scolytus* genera). The nematode juveniles then hatch, and after several moults, infect the larvae or even the pupae of the bark beetle. They suck fluids within the beetle's body cavity, subsequently infect the intestine, and then leave the body and return to the gallery, where they moult into the adult stage, copulate, and lay eggs. The number of nematode generations per year is identical to the number of host generations per year, and can be as high as 12 in laboratory experiments of *Contortylenchus elongatus* (MASSEY, 1960) NICKLE, 1963 in *Ips confusus* (LE CONTE, 1876) (MASSEY 1974). Endoparasitic nematodes associated with *Ips* bark beetles in central Europe are presented in Table 2.

The effect of parasitic nematodes on their hosts

Since the first studies of entomophilic nematodes of bark beetles, researchers have been interested in the effects of endoparasitic nematodes on the populations of these forest pests. Endoparasitic nematodes obtain nutrients from the host body fluids, and in some cases consume all of the host's fat body and other tissues. Endoparasitic nematodes are commonly found in bark beetles, and sometimes at infestation rates exceeding 50 % (e. g. BURJANADZE, GOGINASHVILI 2009). MASSEY (1974) considered nematodes to be important factors limiting the populations of bark beetles. Although these nematodes seldom kill their host, they can change host behaviour; decrease host fertility, survival, and flight activity, and delay swarming (e.g., HOFFARD, COSTER 1976, KAYA 1984). Fuchs, in his studies from the first half of the 20th century, stated that nematodes weaken and kill bark beetles, reduce the number of eggs laid by as much as 40 %, and reduce the number of generations per year (MASSEY 1974). YATSENKOWSKY (1924) reported that infestation of bark beetles by small numbers of nematodes causes beetle sterility while infestation by large numbers causes death. Subsequent research has greatly increased our understanding of how endoparasitic nematodes affect insect hosts.

Nematodes developing inside the beetle deprive the host of nutrients. This is evidenced by a decreased number of fat cells in infected bark bee-

Grucmanová Š., J. Holuša

Table 1. Nematodes found under elytra, on the wings, thorax, abdomen and between body segments of *Ips* bark beetles in central Europe. For species marked with an asterisk (*) in the table see a list of known synonyms provided in Table 4

Nematode species	Nematode family	<i>Ips</i> species	Country	Reference
<i>Bursaphelenchus eidmanni</i> (RUHM, 1956) *	Parasitaphelenchidae	<i>I. amitinus</i> <i>I. typographus</i>	Germany, Slovakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1987, 1991
<i>Bursaphelenchus sexdentati</i> RUHM, 1960 *	Parasitaphelenchidae	<i>I. sexdentatus</i>	Germany	RUHM 1960
<i>Cryptaphelenchus macrogaster acuminati</i> RUHM, 1956	Aphelenchoididae	<i>I. acuminatus</i>	Germany	RUHM 1956
<i>Cryptaphelenchus macrogaster macrogaster</i> (FUCHS, 1937) *	Aphelenchoididae	<i>I. cembrae</i> <i>I. typographus</i>	Germany, Slovakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1991
<i>Ektaphelenchus amitini</i> (FUCHS, 1937) *	Ektaphelenchidae	<i>I. amitinus</i>	Germany	RUHM 1956
<i>Ektaphelenchus typographi</i> (FUCHS, 1930) *	Ektaphelenchidae	<i>I. typographus</i>	Germany	RUHM 1956
<i>Fuchsnema halleri</i> (FUCHS, 1915) *	Diplogasteroididae	<i>I. amitinus</i> <i>I. cembrae</i> <i>I. typographus</i>	Germany, Slovakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1991
<i>Micoletzkyia buetschlii acuminati</i> (MICOLETZKY, 1922) *	Neodiplogastridae	<i>I. acuminatus</i>	Germany	RUHM, 1956
<i>Micoletzkyia buetschlii</i> (FUCHS, 1915)	Neodiplogastridae	<i>I. cembrae</i> <i>I. typographus</i>	Czech Republic, Germany, Slovakia	WEISER 1954, RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1991
<i>Neoditylenchus major</i> (FUCHS, 1915) *	Neotylenchidae syn. Sychnotylenchidae	<i>I. amitinus</i> <i>I. typographus</i>	Germany, Slovakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1987, 1991
<i>Plectus rhizophilus</i> DE MAN, 1880	Plectidae	<i>I. sexdentatus</i>	Slovakia	VILAGIOVA 1990

tles, as described by NICKLE (1963), THONG, WEBSTER (1973), and LIEUTIER (1982). Depletion of nutrients (especially proteins) was confirmed by changes in the composition of the hemolymph caused by the development of a fertilized female of two *Contortylenchus* species in bark beetle hemocoel (THONG, WEBSTER 1972, 1975). During beetle diapause, nematodes may also undergo dormancy, as described for the nematode *Paraiotonchium autumnale* (NICKLE, 1967) SLOBODYANYUK, 1976 (syn. *Heterotylenchus autumnalis* NICKLE, 1967, which parasitizes certain flies. Otherwise, nematodes may infest the fat body, as is the case when *Mermis nigrescens* DUJARDIN, 1842 parasitizes grasshoppers (THONG, WEBSTER 1975). SLANKIS (1967) also reported that nematodes caused mechanical damage to organs and tissues as well as intoxication. Great damage to the intestinal epithelium was found in *Ips sexdentatus* (BORNER, 1776) parasitized by *Parasitorhabditis ipsophila* LIEUTIER AND LAUMOND, 1978 (LIEUTIER 1984a).

The fact that endoparasitic nematodes significantly reduce bark beetle fertility was reported by REID (1958), MASSEY (1956, 1960), THONG, WEBSTER (1975), and WEISER, MRACEK (1988). Smaller gonads

in parasitized individuals had been previously described by OLDHAM (1930) (in HUNT, HAGUE 1974). THONG, WEBSTER (1975) described a 20% reduction in oocytes. These structural changes might be direct effects or might reflect a general decrease in host nutrition caused by removal of nutrients by nematodes. This was confirmed by LIEUTIER (1982), who reported that individuals of *I. sexdentatus* parasitized by *Parasitaphelenchus* sp. and *Contortylenchus* sp. had smaller fat bodies and ovaries and less developed terminal oocytes than non-parasitized individuals. A small fat body is unable to provide the nutrients necessary for the normal maturation of oocytes, which therefore delays swarming and the start of oviposition. A slight decrease in the density of oviposition incisions and in the number of eggs in individuals parasitized by *Parasitorhabditis* sp. has also been reported (LIEUTIER 1984b). A shift in the time of swarming was confirmed by NICKLE (1963) in *I. confusus*.

Nematode infection was reported to cause pathological changes in flight muscle structure of *Scolytus ventralis* LeCONTE, 1868 (ASCHRAF *et al.* 1971) but these changes may have been caused by

a natural degradation (FORSSE 1987). Subsequent research has not confirmed that nematode parasitism affects bark beetle flight capability. For example, nematode parasitism did not affect the flight activity of *Dendroctonus pseudotsugae* HOPKINS, 1905 (ATKINS 1961), *D. frontalis* ZIMMERMANN, 1868 (KINN, STEPHEN 1981), or *I. typographus* (THALENHORST 1958, FORSSE 1987).

NICKLE (1971) as well as POINAR, CAYLOR (1974) stated that some nematode species can change insect behaviour and change the shape of bark beetle galleries. The shape of the galleries created by *I. sexdentatus*, however, was not changed by *Parasitorhabditis ipsophila* (LIEUTIER 1984b) or by *D. pseudotsugae* or *Contortylenchus reversus* (THORNE, 1935) RUHM, 1956 (THONG, WEBSTER 1975). Although nematodes did not change gallery shape, they did reduce gallery length by 25–28 % (THONG, WEBSTER 1975)

The percentage of nematode-parasitized bark beetles in a population and the number of nematodes per beetle varies widely by location and probably depends on microclimate rather than on elevation or on whether the samples are collected from a standing or fallen tree. The reported prevalence of nematodes in bark beetles ranges from approximately 1 to 91 % (TAKOV, PILARSKA 2008) but is frequently about 50–60 %. More than 99 % of galleries contained nematodes in the studies of HOFFARD, COSTER (1976), TENKACOVA, MITUCH (1986, 1987, 1991), CARDOZA *et al.* (2008), BURJANADZE, GOGINASHVILI (2009), and KERESSELIDZE *et al.* (2010). Significant differences have been documented in the parasitization rates between the spring and summer generations of beetles (CHOO, KAYA 1987, TENKACOVA, MITUCH 1986) but not between male and female beetles (e.g., ZITTERER 2002, TAKOV, PILARSKA 2008).

A single bark beetle may contain many nematodes, and it is not unusual to find a bark beetle with hundreds of nematode juveniles in its intestine and hemocoel and under its elytra (NICKLE 1973). THONG, WEBSTER (1975) and WEISER (1966) found more than 1,000 eggs and juveniles of *Contortylenchus* spp. in the hemocoel of individual *Dendroctonus* and *Ips* beetles. The large number of nematodes per beetle results from the high fecundity of entomopathogenic nematodes; one female can produce as many as 10,000 juveniles (NICKLE 1973).

Although each species of bark beetle is usually attacked by only a subset of the species of entomopathogenic nematodes (CARDOZA *et al.* 2006), the number of nematode species associated with a single species of bark beetle can be variable. RUHM (1956) recorded a maximum of 11 species of nematodes in the black pine bark beetle *Hylastes ater* (PAYKULL,

1800) in Germany, and MASSEY (1974) found 30 species in *Dendroctonus adjunctus* BLANDFORD, 1897 in the United States.

Nematodes associated with *Ips* spp.

Bark beetles of the genus *Ips* belong to the family of snout beetles (Curculionidae) and the Scolytinae subfamily. In central Europe, seven species occur (*Ips acuminatus*, *I. amitinus*, *I. cembrae*, *I. duplicatus* (SAHLBERG, 1836), *I. mannsfeldi* (WACHTL, 1879), *I. sexdentatus*, and *I. typographus*). An identification key to the bark beetle species, including *Ips* spp., was published by PFEFFER (1989). *Ips* spp. feed on the phloem of conifers, predominantly spruce, pine, and larch. These bark beetles have been often serious pests mainly in spruce monocultures but also in close-to-nature forests. Since 1950, 2–9 million m³ of wood have been damaged annually by bark beetles, and predominantly by *I. typographus* (SCHELHAAS *et al.* 2003).

There have been very few studies of the nematodes associated with *Ips* spp. in central Europe. The first publication that described nematodes of *Ips* spp. in this region was by WEISER (1954), who described three species of nematodes found in the body and under the elytra of *I. typographus* (in TENKACOVA, MITUCH 1987). There are also several studies by TENKACOVA, MITUCH (1986, 1987, 1991) related to nematodes of *Ips* spp. in the territory of the former Czechoslovakia. The study sites in all of these reports were in the territory of today's Slovak Republic. Researchers have also reported on nematodes associated with *Ips* spp. in Germany (RUHM 1956, 1960), Poland (BALAZY 1966, 1968), Bulgaria (TAKOV *et al.* 2006; NEDELICHEV *et al.* 2008), Portugal (PENAS *et al.* 2006), Russia (SLANKIS 1969), France (LIEUTIER, LAUMOND 1978), Sweden (FORSSE 1987) and Georgia (BURJANADZE, GOGINASHVILI 2009).

Ips spp. have been reported to be associated with nematodes in the orders Diplogasterida, Rhabditida, and Tylenchida and in the families Parasitaphelenchidae, Allantonematidae, Ektaphelenchidae, Aphelenchoididae, Diplogasteroididae, Neodiplogasteridae, Rhabditidae, and Parasitylenchidae. RUHM (1956) recorded nine species of nematodes in *I. typographus*, including five each in *I. acuminatus* and *I. cembrae* and three in *I. amitinus*. MASSEY (1974) found 4–14 species of nematodes in *Ips* spp. in the United States. The nematodes associated with *Ips* spp. range in size from 0.2 mm (*Cryptaphelenchus*) to 2.0 mm (*Contortylenchus*).

Lists of nematodes associated with *Ips* spp. in central Europe is given in Tables 1–3. A problem in preparing this kind of list is the existence of many

Grucmanová Š., J. Holuša

Table 2. Endoparasitic nematodes associated with *Ips* species in central Europe. For species marked with an asterisk (*) in the table see a list of known synonyms provided in Table 4

Nematode species	Nematode family	<i>Ips</i> species	Location	Country	Reference
<i>Contortylenchus acuminati</i> RUHM, 1956	Allantonematidae	<i>I. acuminatus</i>	hemocel	Germany	RUHM 1956
<i>Contortylenchus amitini</i> RUHM, 1956	Allantonematidae	<i>I. amitinus</i>	intestinum	Czech Republic, Germany, Slovakia	RUHM 1956, WEISER <i>et al.</i> 2006, VILAGIOVA 1993
<i>Contortylenchus diplogaster</i> v. LINSTOW, 1890 *	Allantonematidae	<i>I. cembrae</i> <i>I. sexdentatus</i> <i>I. typographus</i>	hemocel	Czech Republic, Germany, Poland, Slovakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1991, BALAZY 1966, 1968
<i>Cryptaphelenchus macrogaster acuminati</i> RUHM, 1956	Aphelenchoididae	<i>I. acuminatus</i>	Malpighian tubules intestinum	Germany	RUHM, 1956
<i>Cryptaphelenchus macrogaster macrogaster</i> (Fuchs, 1937) *	Aphelenchoididae	<i>I. cembrae</i> <i>I. typographus</i>	Malpighian tubules intestinum	Germany, Slo- vakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1991
<i>Ektaphelenchus typographi</i> (FUCHS, 1930) *	Ektaphelenchidae	<i>I. typographus</i>	larvae	Germany	RUHM 1956
<i>Parasitaphelenchus acuminati</i> RUHM, 1956	Parasitaphelenchi- dae	<i>I. acuminatus</i>	hemocel intestinum	Germany	RUHM 1956
<i>Parasitaphelenchus sexdentati</i> FUCHS, 1937 *	Parasitaphelenchi- dae	<i>I. sexdentatus</i>	hemocel intestinum	Czech Republic, Germany	WEISER, MRACEK 1988, FILIPJEV 1959
<i>Parasitorhabditis acuminati</i> (FUCHS, 1937) *	Rhabditidae	<i>I. acuminatus</i>	hemocel intestinum	Germany	RUHM 1956
<i>Parasitorhabditis amitini</i> (FUCHS, 1915) *	Rhabditidae	<i>I. amitinus</i>	intestinum	Germany, Slovakia	RUHM 1956, TENKACOVA, MITUCH 1987, 1991
<i>Parasitorhabditis obtusa</i> (FUCHS, 1915) *	Rhabditidae	<i>I. cembrae</i> <i>I. typographus</i>	intestinum	Austria, Switzerland, Czech Republic, Germany, Poland, Slovakia, Slovenia	RUHM 1956, WEISER, MRACEK 1988, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1987, 1991, BALAZY 1966, 1968, AN- DRASSY 1983
<i>Parasitylenchus dispar</i> (FUCHS, 1915) *	Parasitylenchidae	<i>I. typographus</i>	hemocel	Czech Republic, Germany, Poland, Slovakia, Slovenia	RUHM 1956, BALAZY 1966, 1968, WEISER 1954, 1977, WEISER, MRACEK 1988, 2006, TENKACOVA, MITUCH 1986, 1991

synonyms for nematode species. Not all of them are valid (see Table 4). Synonyms of the Genus *Bursaphelenchus* were published by RYSS *et al.* (2005), *Contortylenchus*, *Neoditylenchus* and *Parasitylenchus* by SIDDIQI (2000), *Micoletzky* and *Fuchsnema* by SUDHAUS, VON LIEVEN (2003), *Parasitaphelenchus* by RUHM, 1956 and the others by BAKER (1962).

Conclusion

As between other organisms various relationships from commensalism to obligate parasitism occur between bark beetles and nematodes. Nematodes are almost always found in the galleries of bark beetles and each nematode species may benefit from the proximity of the bark beetle differently.

Endoparasitic nematodes even can affect some important biological processes such as host fertility, survival, flight activity or swarming time, or change host behaviour. This review summarizes mentioned relationships and lists the known nematodes associated with the representatives of *Ips* genus which are important pests in Central Europe. Nematodes associated with *Ips* species could live as commensals using only bark beetle gallery environment (such e. g. members of *Clarkus*, *Panagrolaimus* or *Pristionchus* genera), phoretic nematodes use bark beetles for transfer to a new environment (e. g. members of *Bursaphelenchus* or *Micoletzky* genera), to inhabit bark beetle body cavity is essential for endoparasitic nematode life cycles (e. g. *Contortylenchus* and *Parasitylenchus* genera) but some nematodes are

Nematodes Associated with Bark Beetles with Focus on the Genus *Ips*...

Table 3. Nematodes found only in frass and feed marks of *Ips* bark beetles in central Europe

Nematode species	Nematode family	<i>Ips</i> species	Country	Reference
<i>Clarkus papillatus</i> (Bastian, 1865)	Mononchidae	<i>I. typographus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990
<i>Cuticularia oxycerca</i> (de Man, 1895)	Rhabditidae	<i>I. sexdentatus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990
<i>Mesorhabditis oschei</i> Körner, 1954	Mesorhabditidae	<i>I. sexdentatus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990
<i>Panagrolaimus chalcographi</i> Fuchs, 1930	Panagrolaimidae	<i>I. typographus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990, 1993
<i>Panagrolaimus rigidus</i> (Schneider, 1866)	Panagrolaimidae	<i>I. sexdentatus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1993
<i>Prionchulus muscorum</i> (Dujardin, 1845)	Mononchidae	<i>I. typographus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990
<i>Pristionchus lheritieri</i> (Maupas, 1919)	Neodiplogastridae	<i>I. typographus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990
<i>Tripyla filicaudata</i> de Man, 1880	Tripylidae	<i>I. sexdentatus</i>	Slovakia	Vilagiova, 1990

Table 4. Synonymous names of nematode species associated with *Ips* bark beetles in central Europe

Nematode species	Synonymous names
<i>Bursaphelenchus eidmanni</i> RÜHM, 1956	<i>Aphelenchoides (Bursaphelenchus) eidmanni</i> RÜHM, 1956
<i>Bursaphelenchus sexdentati</i> RÜHM, 1960	<i>Aphelenchoides (Bursaphelenchus) sexdentati</i> RÜHM, 1960; <i>Bursaphelenchus bakeri</i> RÜHM, 1964
<i>Contortylenchus diplogaster</i> (v. LINSTOW, 1890)	<i>Anguillulina contortus typographi</i> (FUCHS, 1915); <i>Allantonema diplogaster</i> v. LINSTOW, 1890; <i>Aphelenchulus contortus typographi</i> (FUCHS, 1915); <i>Aphelenchulus diplogaster</i> (FUCHS, 1915); <i>Parasitylenchus contortus cembrae</i> (FUCHS, 1915); <i>Parasitylenchus contortus typographi</i> (FUCHS, 1915); <i>Tylenchus contortus cembrae</i> (FUCHS, 1915); <i>Tylenchus contortus typographi</i> FUCHS, 1915; <i>Tylenchus diplogaster</i> (v. LINSTOW, 1890)
<i>Cryptaphelenchus macrogaster macrogaster</i> (FUCHS, 1937)	<i>Aphelenchoides macrogaster</i> (FUCHS, 1937); <i>Aphelenchoides (Schistonchus) macrogaster</i> (FUCHS, 1915); <i>Parasitaphelenchus macrogaster</i> (FUCHS, 1915); <i>Tylenchus macrogaster</i> FUCHS, 1915; <i>Parasitaphelenchus (Cryptaphelenchus) macrogaster</i> (FUCHS, 1915); <i>Schistonchus macrogaster</i> (FUCHS, 1915)
<i>Fuchsnema halleri</i> (FUCHS, 1915)	<i>Diplogaster (Fuchsia) halleri</i> (FUCHS, 1915); <i>Diplogasteroides (Diplogasteroides) halleri</i> (FUCHS, 1915); <i>Rhabditolaimus halleri</i> FUCHS, 1915
<i>Ektaphelenchus amitini</i> (FUCHS, 1937)	<i>Aphelenchoides amitini</i> (FUCHS, 1937); <i>Parasitaphelenchus (Cryptaphelenchus) amitini</i> FUCHS, 1937
<i>Ektaphelenchus typographi</i> (FUCHS, 1930)	<i>Aphelenchus typographi</i> (FUCHS, 1930); <i>Parasitaphelenchus typographi</i> FUCHS, 1930; <i>Parasitaphelenchus (Ektaphelenchus) typographi</i> (FUCHS, 1930)
<i>Micoletzkyia buetschli acuminata</i> (MICOLETZKY, 1922)	<i>Fuchsia buetschli acuminati</i> RÜHM, 1956
<i>Neoditylenchus major</i> (FUCHS, 1915) MEYL, 1961	<i>Anguillulina major</i> (FUCHS, 1915); <i>Ditylenchus major</i> (FUCHS, 1915); <i>Synchotylenchus major</i> (FUCHS, 1915); <i>Tylenchus major</i> FUCHS, 1915
<i>Parasitaphelenchus sexdentati</i> FUCHS, 1937	<i>Aphelenchoides uncinatus sexdentati</i> (FUCHS, 1937); <i>Parasitaphelenchus uncinatus sexdentati</i> FUCHS, 1937
<i>Parasitorhabditis acuminati</i> (FUCHS, 1915)	<i>Rhabditis obtusa acuminati</i> FUCHS, 1915; <i>Rhabditis (Parasitorhabditis) obtusa f. acuminati</i> (FUCHS, 1915)
<i>Parasitorhabditis amitini</i> (FUCHS, 1915)	<i>Rhabditis obtusa amitini</i> FUCHS, 1915; <i>Rhabditis (Parasitorhabditis) obtusa f. amitini</i> FUCHS, 1915
<i>Parasitorhabditis obtusa</i> (FUCHS, 1915)	<i>Parasitorhabditis typographi</i> (FUCHS, 1915); <i>Rhabditis obtusa</i> FUCHS, 1915; <i>Rhabditis obtusa typographi</i> FUCHS, 1915; <i>Rhabditis (Parasitorhabditis) obtusa f. typographi</i> FUCHS, 1915
<i>Parasitylenchus dispar</i> (FUCHS, 1915)	<i>Anguillulina dispar typographi</i> (FUCHS, 1915); <i>Aphelenchulus dispar typographis</i> (FUCHS, 1915); <i>Polymorphotylenchus typographi</i> (FUCHS, 1915); <i>Tylenchus dispar typographi</i> FUCHS, 1915

Grucmanová Š., J. Holuša

found on bark beetle body surface as well as in their body (e.g. *Cryptaphelenchus* and *Ektaphelenchus* species). Although considerable attention has been devoted to entomophilic nematodes associated with important pests like bark beetles, our knowledge of these nematode–beetle associations in central Europe is still limited. Furthermore, a large number of syn-

onymous names makes the orientation in this topic more difficult. Expanding on this knowledge will be an important task for the coming years. .

Acknowledgments: We thank Bruce Jaffee for very valuable advices and improvements. This study was supported by grants IGA 20124321 and CIGA 20124302.

References

- ANDRASSY I. 1954. Revision of the Genus *Tylenchus* Bastian, 1865 (Tylenchidae, Nematoda). – *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **1** (1-2): 5-42. (In German).
- ANDRASSY I. 1983. A taxonomic review of the suborder Rhabditina (Nematoda: Secernentia). Paris (ORSTOM), 241 p.
- ASHRAF M. 1968. Biological studies of *Scolytus ventralis* Le Conte (Coleoptera: Scolytidae) with particular reference to nematode parasite *Sulphuretylenchus elongatus* Massey. – [Ph.D. thesis.] Washington State University, Pullman, 81 p.
- ASHRAF M., A. A. BERRYMAN 1970. Biology of *Sulphuretylenchus elongatus* (Nematoda: Spaelariidae) and its effect on its host *Scolytus ventralis* (Coleoptera: Scolytidae). – *Canadian Entomologist*, **102**: 197-213.
- ATKINS M. D. 1961. A study of the flight of the *Dendroctonus pseudotsugae* Hopk. (Coleoptera: Scolytidae) III. Flight capacity. – *Canadian Entomologist*, **93**: 467-474.
- BAKER A. D. 1962. Checklist of the nematode superfamilies Dorylaimoidea, Rhabditoidea, Tylenchoidea, and Aphelenchoidea. Leiden, Netherlands (E. J. Brill), 261 p.
- BALAZY S. 1966. Living organisms regulate population density of bark beetles in spruce forests, with special reference to entomopathogenic fungi. – *Poznanskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk Wydział Nauk Rolniczych i Lesnych*, **21** (1): 3-48. (In Polish).
- BALAZY S. 1968. Analysis of bark beetle mortality in spruce forests in Poland. – *Ekologia Polska Seria A*, **16** (33): 657-687. (In Polish).
- BRAASCH H. 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relationships. – *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin*, **31**: 127-142.
- BURJANADZE M., N. GOGINASHVILI 2009. Occurrence of pathogens and nematodes in the spruce bark beetles, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in Borjomi Gorge. – *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, **3** (1): 145-150.
- CARDOZA Y. J., J. C. MOSER, K. D. KLEPZIG and K. F. RAFFA 2008. Multipartite Symbioses Among fungi, Mite, Nematodes and the Spruce Beetle, *Dendroctonus rufipennis*. – *Environmental Entomology*, **37** (4): 956-963.
- CARDOZA Y. J., S. PASKIEWITZ and K. F. RAFFA 2006. Traveling through time and space on wings of Beetles: A tripartite insect-fungi-nematode association. – *Symbiosis*, **41**: 71-79.
- CHOO H. Y., H. K. KAYA., P. SHEA and E. M. NOFFSINGER 1987. Ecological Study of Nematode Parasitism in *Ips* Beetles from California and Idaho. – *Journal of Nematology*, **19** (9): 495-502.
- FENTON A., R. NORMAN, J. P. FAIRBAIRN and P. J. HUDSON 2000. Modelling the efficacy of entomopathogenic nematodes in the regulation of invertebrate pests in glasshouse crops. – *Journal of Applied Ecology*, **37**: 309-320.
- FERRIS V. R. 1994. The future of nematode systematics. – *Fundamental and Applied Nematology*, **17** (2): 97-101.
- FILIPJEV I. H., J. M. JR. SCHUURMANS-STEKHOFEN 1959. A Manual of Agricultural Helminthology. 2nd Impression. Leiden (E. J. Brill), 880 p.
- FORSSE E. 1987. Flight duration in *Ips typographus* L.: Insensitivity to nematode infection. – *Journal of Applied Entomology*, **104**: 326-328.
- FUCHS A. G. 1914. *Tylenchus dispar curvidentis* m. and *Tylenchus dispar cryphali* m. – *Zoologischer Anzeiger, Leipzig*, **45** (5): 195-207. (In German).
- FUCHS A. G. 1915. Natural history of nematodes and some other parasites. 1. *Ips typographus* L. 2. *Hylobius abietis* L. – *Zoologische Jahrbucher, Abteilung fur Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*, **38** (3-4): 109-222. (In German).
- FUCHS A. G. 1929. The parasites of some of weevils and bark beetles. – *Zeitschrift für Parasitenkunde Berlin*, **2** (2): 2248-285. (In German).
- FUCHS A. G. 1930. Nematodes new for bark beetles and weevils, semiparasitic and inhabiting their galleries. – *Zoologische Jahrbucher, Abteilung fur Systematik, Geographie und Biologie der Tier*, **59** (5-6): 505-646. (In German).
- FUCHS A. G. 1938. New parasitic and semiparasitic nematodes of bark Beetles and some other nematodes II, III, and IV part. – *Zoologische Jahrbucher, Abteilung fur Systematik, Geographie und Biologie der Tier*, **771** (1-2): 123-190. (In German).
- FURNISS M. M. 1967. Nematode parasites of the Douglas-fir beetle in Idaho and Utah. – *Journal of Economic Entomology*, **92**: 941-954.
- GAUGLER R. 2002. Entomopathogenic Nematology, New York, USA (CABI), 388 p.
- GAUGLER R., H. K. KAYA 1990. Entomopathogenic nematodes in biological kontrol. Boca Raton, USA (CRC Press), 365 p.
- GEbremariam G., R. GAUGLER and K. B. NGUYEN 2005. Entomopathogenic nematodes (EPN): the perspective direction in the biological control of agricultural pests. – *Lucrari Stiintifice, UASM*, **14**: 409-413.
- GERAERT E., A. DE GRISE 1981. The Male Copulatory System in Tylenchid Taxonomy (Nematoda). *Nematologica*, **27**: 432-442.
- GRIMALDI D., M. S. ENGEL 2005. Evolution of the Insects, Cambridge, UK (Cambridge University Press), 772 p.
- HOFFARD W. H., J. E. COSTER 1976. Endoparasitic Nematodes of *Ips* Bark Beetles in Eastern Texas. – *Environmental Entomology*, **5** (1): 128-132(5).
- HUGOT J., P. BAUIARD and S. MORAND 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field study: an overview. – *Nematology*, **3**: 199-208.
- HUNT D. J., N. G. M. HAGUE 1974. A Redescription of *Parasitaphelenchus oldami* Ruhm, 1956 (Nematoda: Aphelenchoididae) a Parasite of Two Elm Bark Beetles: *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus*, together with some notes on its biology. – *Nematologica*, **20**: 174-180.
- KAYA H. K. 1984. Nematode parasites of bark beetle. – In: NICKLE W. R. (Ed.): Plant and Insect Nematodes. New York, USA

Nematodes Associated with Bark Beetles with Focus on the Genus *Ips*...

- (Marcel Dekker Inc). 727-754.
- KAYA H. K., S. R. STOCK 1997. Techniques in insect nematology. – In: LACEY L. A. (ed.): Manual of techniques in insect pathology. San Diego, USA (Academic Press). 281-324.
- KERESELDZE M., R. WEGENSTEINER, N. GOGINASHVILI, M. TVARADZE and D. PILARSKA 2010. Further Studies on the Occurrence of Natural Enemies of *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae) in Georgia. – *Acta Zoologica Bulgarica*, **62** (2): 131-139.
- KINN D. N., F. M. STEPHEN 1981. The incidence of endoparasitism of *Dendroctonus frontalis* Zimm. (Coleoptera: Scolytidae) by *Contortylenchus brevicomi* (Massey) Rühm (Nematoda: Sphaerulidae). – *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **91**: 452-458.
- LIEUTIER F. 1982. Weight variations of adipose tissue and ovaries and variations in the length of oocytes in *Ips sexdentatus* Boern. (Coleoptera: Scolytidae); relation to parasitism by nematodes. – *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **57** (4): 407-418.
- LIEUTIER F. 1984a. Disturbances in the digestive tract of *Ips sexdentatus* (Insecta: Scolytidae) induced by *Parasitorhabditis ipsophila* (Nematoda: Rhabditidae). – *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **59** (6): 597-605.
- LIEUTIER F. 1984b. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Insecta: Scolytidae) by *Parasitorhabditis ipsophila* (Nematoda: Rhabditidae). – *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **59** (5): 507-520.
- LIEUTIER F., C. LAUMOND 1978. Nematode Parasites and Associates of the *Ips sexdentatus* and *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). – *En Région Parisienne Nematologica*, **24** (2): 184-200. (In French).
- VON LINSTOW O. F. B. 1890. About *Allantonema* and *Diplogaster*. – *Centralblatt für Bakteriologie*, **8** (16): 489-493. (In German)
- MAGGENTI A. 1981. General Nematology. New York, USA (Springer-Verlag). 372 p.
- MASSEY C. L. 1956. Nematode parasites and associates of the Engelmann spruce beetle (*Dendroctonus engelmanni* Hopk.). – *Proceedings of The Helminthological Society of Washington*, **23** (1): 14-24.
- MASSEY C. L. 1957. Four new species of *Aphelenchus* (Nematoda) parasitic in bark Beetles in the united States. – *Proceedings of The Helminthological Society of Washington*, **24** (1): 29-34.
- MASSEY C. L. 1960. Nematode parasites and associates of the California five-spined engraver, *Ips confusus* (Lec.). – *Proceedings of The Helminthological Society of Washington*, **27** (1): 42-44.
- MASSEY C. L. 1964a. The nematode parasites and associates of the fir engraver beetle, *Scolytus ventralis* Le Conte, in New Mexico. – *Journal of Insect Pathology*, **6**: 133-155.
- MASSEY C. L. 1964b. Two new species of the nematode genus *Ektaphelenchus* (Nematoda: Aphelenchoididae) parasites of bark Beetles in the south-western United States. – *Proceedings of The Helminthological Society of Washington*, **31** (1): 37-40.
- MASSEY C. L. 1966. The nematode parasites and associates of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae) in New Mexico. – *Annals of the Entomological Society of America*, **59** (3): 424-440.
- MASSEY C. L. 1969. New species of tylenchs associated with bark beetles in New Mexico and Colorado. – *Proceedings of The Helminthological Society of Washington*, **64** (1): 43-52.
- MASSEY C. L. 1974. Biology and taxonomy of nematode parasites and associates of bark beetle in the United States. Washington DC, USA. (US Government Printing Office). 233 p.
- MICHALKOVÁ V., E. KRASCENITSOVÁ and M. KOZÁNEK 2012. On the pathogens of spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae) in the Western Carpathians. – *Biologia*, **67**: 217-221.
- MOSER J. C., H. KONRAD, T. KIRISITS and L. K. CARTA 2005. Phoretic mites and nematodes associates of *Scolytus multistriatus* and *Scolytus pygmeus* (Coleoptera : Scolytidae) in Austria. – *Agricultural and Forest Entomology*, **7**: 169-177.
- NAVON A., K. R. S. ASCHER 2000. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Wallingford, UK (CABI Publishing). 324 p.
- NEDELICHEV S., D. TAKOV and D. PILARSKA 2008. Parasitic and associated nematodes of bark beetles in Bulgaria. – *Acta Zoologica Bulgarica*, **2**: 83-991.
- NGUYEN, K. B., D. J. HUNT 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. Nematology Monographs and Perspectives 5. Leiden, Netherlands (Brill NV). 816 p.
- NERMUT J., V. PUZA and Z. MRACEK 2012. Entomopathogenic a moluscopathogenic nematodes – soil invisible killers. – *Živa*, **1**: 10-13. (In Czech)
- NICKLE W. R. 1963. Observations on the effect of nematodes on *Ips confusus* (LeConte) and other bark beetles. – *Journal of Insect Pathology*, **5**: 386-389.
- NICKLE W. R. 1967. On the Classification of the Insect Parasitic Nematodes of the *Sphaerulariidae* Lubbock, 1861 (Tylenchoidea: Nematoda). – *Proceedings of The Helminthological Society of Washington*, **34** (1): 72-94.
- NICKLE W. R. 1970. A Taxonomic Review of the Genera Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). – *Journal of Nematology*, **2** (4): 375-392.
- NICKLE W. R. 1971. Behavior of the Shothole Borer, *Scolytus rugulosus*, Altered by the Nematode Parasite *Neoparasitylenchus rugulosi*. – *Annals of the Entomological Society of America*, **64** (3): 751-751 (1).
- NICKLE W. R. 1973. Identification of Insect Parasitic Nematodes- A review. – *Experimental Parasitology*, **33** (2): 303-317.
- OLDHAM J. N. 1930. On the infestation of elm bark beetle (Scolytidae) by a nematode, *Parasitylenchus scouti* n. sp. – *Journal of Helminthology*, **8** (4): 239-248.
- PENAS A. C., M. A. BRAVO, P. NAVES, L. BONIFACIO, E. SOUSA and M. MOTA 2006. Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and other nematode genera associated with insects from *Pinus pinaster* in Portugal. – *Annals of Applied Biology*, **148**: 121-131.
- PFEFFER A.: Bark beetles Scolytidae and Platypodidae, Praha, Česká republika, Academia 1989. (In Czech).
- POINAR G. O. JR., J. N. CAYLOR 1974. *Neoparasitylenchus amylocercus* sp. n. (Tylenchida: Nematodea) from *Conophthorus monophyllae* (Scolytidae: Coleoptera) in California with a synopsis of the nematode genera found in bark beetles. – *Journal of Invertebrate Pathology*, **24** (1): 112-119.
- POINAR G. O. JR. 1975. Entomogenous Nematodes: A Manual and Host List of Insect-nematode Associations. Leiden, Netherlands (E. J. Brill). 317 p.
- REID R. W. 1958. Nematodes associated with the mountain pine beetle. – *Bimonthly Progress Report, Canada Department of Agriculture*, **14** (1): 3.
- RUHM W. 1954. A new nematodes species of *Ips* bark beetles. – *Zoologischer Anzeiger Leipzig*, **53** (9-10): 221-242. (In German).
- RUHM W. 1955. About some nematode species associate of wood breeding *Ips* bark beetles. – *Zoologischer Anzeiger Leipzig*, **155** (3-4): 70-83. (In German).
- RUHM W. 1956. The Nematodes of Bark Beetles. – *Parasitologische Schriftenreihe*, **6**: 1-437. (In German).
- RUHM W. 1960. A contribution to the nomenclature and systemat-

- ics of some nematode species associate of the Scolytids. – *Zoologischer Anzeiger Leipzig*, **164** (5-6): 201-213. (In German).
- RYSS A., P. VIEIRA, M. MOTA and O. KULINICH 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. – *Nematology*, **7** (3): 393-458.
- SCHEEPMAKER J. W. A., F. P. GEELS, P. H. SMITS and L. J. L. D. VAN GRIENSVEN 1997. Control of the mushroom pests *Lycoriella auripila* (Diptera: Sciaridae) and *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae) by *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) in field experiments. – *Annals of Applied Biology*, **131** (3): 359-368.
- SCHELHAAS M.J., NABUURS G.J., SCHUCK A. 2003. Natural disturbances in the European forests in the 19th and 20th centuries. – *Global Change Biology*, **9**: 1620-1633.
- SIDDIQI M. R. 2000. Tylenchida: parasites of plants and insects. Wallingford, UK (CABI Publisher), 833 p.
- SLANKIS A. 1967. *Contortylenchus cylindricus* sp. n. and *Contortylenchus rarus* sp. n. (Tylenchida: Contortylenchidae). Parasites of bark Beetles and taxonomic notes on the genus *Contortylenchus* Ruhm 1956. – *Trudy Gel'minto-logicheskoi Laboratorii*, **18**: 111-118.
- SLANKIS A. 1969. A new species of endoparasitic nematode, *Contortylenchus pseudodiplogaster* n.sp. from the bark beetle, *Ips sexdentatus*. – *Materialy nauchn Konf vsesoiuz Obshchestva Gel'mint*, **2**: 302-305.
- SONIN M. D., B. D. SHARMA 1990. Helminths of Insects. Leiden, Netherlands (E. J. Brill), 227 p.
- STEINER G. 1932. Some nemtic parasites and associates of the mountain pine beetle (*Dendroctonus monticolae*). – *Journal of Agricultural Research*, **45** (7): 437-444.
- STURHAN D., M. LISKOVA 1999. Occurrence and distribution of entomopathogenic in Slovak Republic. – *Nematology*, **1** (3): 273-277.
- SUDHAUS W., F. VON LIEVEN 2003. A phylogenetic classification and catalogue of the Diplogastridae (Secernentea, Nematoda). – *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, **6**: 43-90.
- TAKOV D., D. DOYCHEV, A. LINDE, S. DRAGANOVA and D. PILARSKA 2011. Pathogens of bark beetles (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgarian forests. – *Phytoparasitica*, **39** (4): 343-352.
- TAKOV D., D. PILARSKA 2008. Prevalence of *Gregarina typographi* Fuchs (Apicomplexa: Gregarinidae) and nematodes (Nematoda) in bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) from Bulgaria depending on the host gender. – *Acta Zoologica Bulgarica*, **60** (3): 227-232.
- TAKOV D., D. PILARSKA and R. WEGENSTEINER 2006. Entomopathogens in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) from several spruce stands in Bulgaria. – *Acta Zoologica Bulgarica*, **58**: 409-420.
- TENKACOVA I., J. MITUCH 1986. A contribution to the knowledge of nematofauna of Scolytidae bark beetles in norway spruce in forest park in Košice. – *Lesnický časopis*, **32** (5): 381-387. (In Slovak).
- TENKACOVA I., J. MITUCH 1987. Nematodes new for the fauna of the Czechoslovak Socialist Republic with the affinity to scolytids (Coleoptera: Scolytidae). – *Helmintologia*, **24**: 281-291.
- TENKACOVA I., J. MITUCH 1991. Nematodes of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Tatra National Park. – *Zborník prác o Tatranskom národnom parku*, **31**: 173-182. (In Slovak).
- THALENHORST W. 1958. Broad lines of population dynamics of spruce bark beetle *Ips typographus* L. – *Schriftenreihe der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen*, **21**: 1-126. (In German).
- THONG C. H. S., J. M. WEBSTER 1972. A redescription of the Bark Beetle Nematode *Contortylenchus brevicomi*: Synonym *Contortylenchus barberus* (Nematoda: Shaerulariidae). – *Journal of Nematology*, **4** (3): 213-216.
- THONG C. H. S., J. M. WEBSTER 1973. Morphology and the post-embryonic development of the bark beetle nematode *Contortylenchus reversus* (Sphaerularidae). – *Nematologica*, **19**: 159-168.
- THONG C. H. S., J. M. WEBSTER 1975. Effects of the Bark Beetles Nematode, *Contortylenchus reversus* on Gallery Construction, Fecundity and Egg Viability of the Douglas Fir Beetle *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Scolytidae). – *Journal of Invertebrate Pathology*, **26**: 235-238.
- THONG C. H. S., J. M. WEBSTER 1983. Nematode parasites and associates of *Dendroctonus* spp. and *Trypodendron lineatum* (Coleoptera: Scolytidae) with description of *Bursaphelenchus varicauda* n. sp. – *Journal of Nematology*, **15** (2): 312-318.
- THORNE G. 1935. Nemic parasites and associates of the mountain pine beetle (*Dendroctonus monticolae*) in Utah. – *Journal of Agricultural Research*, **51** (2): 131-144.
- THORNE G. 1949. On the classification of the Tylenchida, new order (Nematoda, Phasmida). – *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **16** (2): 37-73.
- TOMALAK M., H. E. WELCH and T. D. GALLOWAY 1989. Nematode parasites of bark beetles (scolytidae) in southern Manitoba, with descriptions of three new species of *Sulphuretylenchus* Ruhm (Nematoda: Allantonematidae). – *Canadian Journal of Zoology*, **67**: 2497-2505.
- VILAGIOVA I. 1990. Helminths of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in Slovakia. PhD. Thesis. Helminthological Institute of Slovak Academy of Sciences, Košice. 118 p. (In Slovak)
- VILAGIOVA I. 1993. Helminths of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in urban area of Košice city. – *Forest Journal*, **39**: 183-188. (In Slovak).
- WACHEK F. 1955. The Entomoparasitic Tylenchids. – *Parasitologische Schriftenreihe, Fischer, Jena*, **3**: 1-119. (In German).
- WEISER J. 1954. Contributions to the knowledge of *Ips typographus* parasites, I. *Věstník Československé Zoologické společnosti*, **19**: 217-224.
- WEISER J. 1966. The Insect Diseases. Prague, Czech Republic (Academia), 554 p.
- WEISER J., J. HOLUSA and Z. ZIZKA 2006. *Larssoniella duplicati* n. sp. (Microsporidia, Unikaryonidae), a newly described pathogen infecting the double-spined spruce bark beetle, *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in the Czech Republic. – *Journal of Pest Science*, **79**: 127-135.
- WEISER J., Z. MRACEK 1988. Parasitic nematodes of the insects. Prague, Czech Republic (Academia), 258 p.
- WILSON M., R. GAUGLER 2004. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. – *Journal of Applied Entomology*, **128** (4): 250-253.
- YATSENKOWSKY A. W. 1924. The castration of *Blastophagus* of pines by roundworms and their effect on the activity and life phenomena of the Ipsidae. – *Publication of Agriculture Institute, Western White Russian*, **3**: 1-19.
- ZITTERER P. M. 2002. Antagonists of *Ips acuminatus* (Gyllenhal) with special consideration of pathogens [Diploma thesis]. Vienna, Austria, Department für Wald- und Bodenwissenschaften, Universität für Bodenkultur, 57 p.

Received: 05.12.2012

Accepted: 18.09.2013

5.2. *Ips typographus*

Reproductive performance and natural antagonists of univoltine population of *Ips typographus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) at epidemic level: a study from Šumava Mountains, Central Europe

Lukášová, K., Holuša, J., & Grucmanová, Š.

2012

Beskydy, 5(2), 153-161

Publikováno



Reproductive performance and natural antagonists of univoltine population of *Ips typographus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) at epidemic level: a study from Šumava Mountains, Central Europe

*K. Lukášová, J. Holuša, Š. Grucmanová

Department of Forest Protection and Game Management, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-16521 Prague 6-Suchbát, Czech Republic, lukasovak@fld.czu.cz, holusa@fld.czu.cz, grucmanova@fld.czu.cz

Abstract: Lukášová K., Holuša J., Grucmanová Š. 2012: Reproductive performance of univoltine population of *Ips typographus* (Coleoptera, Curculionidae) at epidemic level in Central Europe: case study of small-scale and short-term bark beetles outbreak in the Šumava Mts. – *Beskydy*, 5 (2): 153–162

Population of *I. typographus* was studied in one locality with small-scale and short-term outbreak distant from large-scale and long-term outbreak area by several hundred meters. In total, ten spruce trees infested by the spruce bark beetle were examined. Always four stripes of bark (sample area) with the length equal to half the circumference of the trunk and the width of approximately 0.5 m were analyzed. The local spruce bark beetle population was characterized by high population density (1.5±1.2 entry holes per dm²), low number of eggs per female, and short maternal galleries. Relatively low reproductive success (0.8 female offspring per one mother beetle, percentage of surviving individuals varies between 1 and 18% was documented. The parasitism rate of living developmental stages of spruce bark beetle by larval parasitoids averaged 14%. The level of infestation by pathogens and endoparasitoids in maternal beetles from their galleries was low. Highly likely, it is a result of short-term outbreak during which response of parasitoids was delayed in time.

Keywords: spruce bark beetle, *Ips typographus*, natural enemies, intraspecific competition, epidemic level of population

Introduction

Over the past century, outbreaks of *Ips typographus* (Linnaeus, 1758) occurred in many places across Europe (Grégoire, Evans 2004). Since 1950, 2–9 million m³ of wood have been damaged annually by bark beetles, and predominantly by *I. typographus* (Schelhaas et al. 2003). In the 1990s, outbreaks of the beetle were also documented in places where they had not occurred previously (Grégoire, Evans 2004). Although the forests of the Šumava Mountains had been significantly altered by economic activities over the past centuries, today they are dominated by artificially established forests. During the 1990s, the large-scale outbreak of *I. typographus* was documented in the central part of the Šumava

Mountains, leading to disintegration of spruce stands. On the Czech side of the border with Germany, two main management approaches were applied during the outbreak. Part of the stands was left without any anthropogenic intervention, and in the remaining area the bands of clear cuts were created near the so-called intervention-free zone (Mánek, Ešnerová 2007). In January 2007, according to estimates by the administration of Šumava National Park, the wind storm Kyrill damaged approximately 15,000 m³ of wood in areas of those second zones around the so-called "Calamity Skidway" area. This represents about 20–40 ha of strongly damaged forest (Svoboda 2007). One year after the wind event, there was a remarkable increase in the

volume of trees infested by bark beetles. In 2011, more than 235,000 m³ of infested wood was recorded, which is a slight decrease in comparison to 2009 and 2010. In the Šumava Mountains, the outbreak of *I. typographus* outbreak lasted over 15 years. In cases of such long-term outbreaks, with high population densities of *I. typographus* retained high above average over many years and absence of management by forestry practices, a significant increase of mortality and parasitism in the beetle is often presumed (Weslien, Schroeder 1999).

The spruce bark beetle *Ips typographus* is one of the economically most serious pest species of Norway spruce in Eurasia (Christiansen, Bakke 1988). For successful colonization of living trees, a high density of attacking individuals is needed to overcome the defensive system of the trees (Mulock, Christiansen 1986, Christiansen et al. 1987). Reproductive success of the beetles depends on three main conditions: temperature, natural enemies, and inter- as well as intraspecific competition (Faccoli, Bernardinelli 2011). In early stages of the development of the offspring generation significant mortality is caused by predators, i. e. flies of the *Medetera* genus (Dipútera) with frequency of 0.2–0.26% (Herard, Mercadier 1996). Also *Thanasimus formicarius* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera) is able to reduce the offspring generation of *I. typographus* by as much as 18% (Mills 1985). In the final larval stages and in the pupal stage, parasitoids predominate (Krüger, Mills 1990, Feicht 2004). It is highly likely that at the endemic level predation effectively reduces the beetle density and its population growth. The questions as to whether predation also effectively reduces the epidemic population of the beetle remains open (Kausrud et al. 2012).

In Europe, nine species of pathogens are described as attacking *I. typographus* (Wegensteiner 2004, Holuša et al. 2009). Although their distribution has been monitored by many authors (survey see Wegensteiner 2004, Takov et al. 2010, Lukášová, Holuša 2012), their influence on population dynamics of the beetle is still unknown. When considering parasitism by nematodes, we presume its influence on the rate of development, fertility, survival and flight activity of the beetles (Nickle 1963, Lieutier 1981, Kaya 1984 Tenkáčová, Mituch 1986). Although an influence of nematodes on flight activity of the beetle has not yet been proven (Forsse 1987), fertility may decrease as documented by 20% reduction of the size of the oocytes in infected females (Thong, Webster 1975).

There are no works evaluating reproductive success in univoltine population of *I. typographus* in mountain conditions in Central Europe at an epidemic level, except for the studies of parasitism from the Bavarian side of the Šumava Mountains (Kalina 2000, Feicht 2004). There also are no studies dealing with the levels of parasitism, pathogen infections and nematode parasitism among maternal beetles and/or on parasitism of the offspring generation of the beetle.

The purpose of the study was to record the levels of pathogen infection of maternal beetles, parasitism of the offspring, number of predators, and reproductive success of the univoltine generation of *I. typographus* in small-scale and short-term outbreak with high population density in an area in epidemic level.

Materials and Methods

Study site

To evaluate parasitism in the population of *I. typographus* a special study was carried out at the following three study sites in the locality "Na Ztraceném": Ptačí potok (PP) I–III (48° 59' 23.617" N, 13° 30' 40.858" E; 48° 59' 11.240" N, 13° 30' 5.403" E; and 48° 59' 28.669" N, 13° 29' 31.022" E, at elevation 1150 m a.s.l.) on 23 August 2011. The locality is situated in the area with the epidemic level of *I. typographus* and the forest stand is characterized by 80% allochthonous trees. The forest is representing by *Piceetum* acid stands (spruce on acid substrates), i.e. firm, not waterlogged with the presence of small-reed (*Calamagrostis* spp.) or blueberry (*Vaccinium myrtillus*). The forest mostly consists of Norway spruce *Picea abies* (Linnaeus) Karsten, rowan *Sorbus aucuparia* Linnaeus, and also dwarf pine *Pinus mugo* Turra on peat-bogs. Most spruce stands in the locality are 60–80 years old and the original spruce stand was approximately 160 years old. During the period 1991–2007, the area (286 ha) was in the intervention regime (man-affected, managed forest), later it was on intervention-free regime. Above-average precipitation (1,224 mm per year) and average annual temperature between 5 and 6 °C is characteristic for this area. First trees infested by *I. typographus* were found in 2010. The locality with the short-term outbreak of the beetle is distant from long-term (>10 years) outbreak area approximately 700 meters.

Analysed trees

At the edges of the sites, there were groups of trees or places with trees infested or already left by bark beetles. Spruce trees infested by bark beetles (presence of entry holes, boring dust, resin on the bark) were selected and felled (2, 2, and 6 infested trees at each study sites). Diameter of felled trees ($d_{1.3}$) was 29 cm - median (range 17–33 cm). After the branches removed four distinct sample areas (I–IV) were examined for the presence of *I. typographus* and its natural enemies on each tree trunk. The sample areas were represented by debarked bands with length equal to the half the tree circumference and the width of approximately 0.5 m. Sample area I was situated 0.5 m from the tree base, sample area II in the middle between the base and the bottom of the tree's crown, sample area III at the beginning of the crown, and sample area IV in the centre of the crown. Height/length of the trunk, trunk diameter and thickness of the bast and bark in particular samples/sections, and the dimensions of each sample/section were recorded for each tree examined.

Material sampling and data recording

In each sample area, 10 maternal galleries of *I. typographus* were studied if this was possible, and the number of nuptial chambers (entry holes) was recorded, as was the number of eggs laid by the females, the length of maternal galleries, the number of individuals of the different development stages (larvae of the 1st–3rd instars, pupae, callow beetles), number of emergence holes, maternal beetles remaining in the gallery. Also the presence of other bark beetle species was recorded.

The average number of eggs per female (\pm SD) and average length of maternal galleries (\pm SD) were calculated. The main response variables - colonization density, reproductive success and production of *I. typographus* were summarized using mean values per dm² of the bark (\pm SD). Reproductive success was defined as the average number of offspring per mother beetle, calculated as [number of beetles produced \cdot 0.5] / [number of egg galleries] (Hedgren, Schroeder 2004). Sex ratio was defined as a number of maternal galleries per one nuptial chamber.

The presence and number of larvae and adults of predators of *I. typographus* were recorded, especially those among Raphidioptera and *Medetera* (Diptera) and *Thanasimus* spp. (Coleoptera).

Maternal beetles were collected from each trunk sample area and held under cold conditions (4 °C) in Eppendorf plastic vials. In the

laboratory, the beetles were dissected two days after collection, and the native dissections of their visceral organs (especially the digestive system, Malpighian tubules, gonads, fat body) were observed under a light microscope (magnification 100x to 400x, Arsenal LPE 5013i-T) and the presence of viruses, microsporidia, protozoa, nematodes and parasitoids was recorded.

The rate of parasitism of *I. typographus* by parasitoids (especially by representatives of Hymenoptera: Braconidae, Pteromalidae) was determined by visual examination in the field. The numbers of their larvae, pupae and cocoons of the given groups of Hymenoptera were recorded. The surviving individuals represent the sum of all living stages of bark beetles, and from these the larvae infected by parasitoids were subtracted. The rate of parasitism by parasitoids was calculated as the ratio of the total number of parasitoids (parasitoids larvae on the bark beetle larvae as well as outside bark beetle larvae, cocoons and pupae of the parasitoids in the beetles galleries) to the sum of parasitoids and all the living development stages of the bark beetles.

Data analysis

Differences in number of parasitoids among trees and percentage of parasitism on tree sample areas (I–IV) were tested using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Relationship between the number of entry holes of *I. typographus* and percentage of parasitism in infested trees was explored by regression analyses. The data were statistically evaluated using Statistica 9.

Results

The volume of harvested wood infested by bark beetles in the locality "Na Ztracném" was increasing steadily from 30th June until 15th August 2011, when 9,748 m³ of wood infested by bark beetles (5–72% rate, depending on the individual segments) was reported in the area of 286 ha. In this second year of outbreak, *I. typographus* was documented on all infested trees. In average, a total of 34 m³/ha was infested by bark beetles. The species was present in 87.5% of all samples. Exceptionally (in two samples), *Polygraphus poligraphus* (Linnaeus, 1758) was detected. Places not infested by *I. typographus* were either too dry or covered by the resin, or they were suitable for the beetle (fresh bast) but were not colonized.

The average number of nuptial chambers (entry holes) of *I. typographus* was 1.5 \pm 1.2 per dm² (0–2.8 holes per dm²). The length of maternal

galleries was 61.1 ± 11.4 mm. The average number of eggs per female was 23.1 ± 4.4 . The population of *I. typographus* consisted of larvae (L3), pupae and callow beetles. The number of living specimens in various stages (larvae without parasitoids, pupae, callow beetles) was 6.7 ± 5.4 individuals per dm^2 . No emergence holes were observed. The proportion of maternal beetles remaining in the gallery was 11%. Reproductive success was 0.8 daughters (female offspring) per one mother beetle, percentage of surviving individuals varied between 1 and 18%. Sex ratio was 1.4 ± 0.6 .

The average number of predatory larvae of *Medetera* spp. was 0.2 ± 0.2 per dm^2 . The number of larvae of *Thanasimus* spp. averaged 0.03 ± 0.06 per dm^2 . Snakefly larvae (Raphidioptera) averaged 0.009 ± 0.030 per dm^2 .

From the 10 trees, a total of 228 live maternal beetles were dissected. The entomopoxvirus *ItEPV* was detected in the middle intestine of only 3.9% of those individuals. The microsporidium *Chytridiopsis typographi* [(Weiser, 1954) Weiser, 1970] was observed only once, in the form of thin-walled cysts within the stomodeum. The neogregarine *Mattesia schwenkei* (Purrini, 1977) was identified in the fat body in 34.2% of maternal beetles examined. In the samples, the presence of intestinal (12.4%) and extraintestinal nematodes (10.8%) was determined by dissection. In most cases, these were invasive larvae which were very difficult to identify. In 6.5% of the samples, the species *Contortylenchus diplogaster* (von Linstow, 1890) Rühm, 1956 was detected.

Only one dead maternal beetle was found in a maternal gallery upon which the hyphal filaments of a fungus from the genus *Beauveria* were evident.

The eggs of endoparasitoids were detected in 0.4% of adults of *I. typographus*. *Tomicobia seitneri* (Ruschka 1924) in the first larval instar in 1% of the beetles examined. Not closely specified endoparasitoids were detected in 14.7% of adults.

Larvae of ectoparasitoids were detected on the larvae of the third instar and pupae of *I. typographus*, the pupae of Chalcidoids (chalcid flies) from the Pteromalidae family or the cocoons of Braconidae were found only rarely. Adults were observed in two cases only. The average number of ectoparasitoids was 0.9 ± 1.2 individuals per dm^2 , and the average parasitism was $14.3 \pm 18.3\%$. The average number of parasitoids did not statistically differ among the studied trees (Kruskal-Wallis test: $H=11.5$, $p>0.1$). Percentage of parasitism did not differ among particular tree sample areas (Kruskal-Wallis test: $H=6.5$, $p>0.5$; Fig. 1).

No statistically significant correlation was found between the number of entry holes and the percentage of parasitism ($y=8.2591+2.8691*x$, $r=0.17$, $p>0.5$; $R^2=0.0289$).

Discussion

The volume of wood infested by *I. typographus* and other bark beetle species in the locality "Na Ztraceném" was increasing from the beginning of 2011, growing more than eight times from May to August. In this second year of outbreak, in average $34 \text{ m}^3/\text{ha}$ was infested by bark beetles. The number of maternal galleries in the studied trees was around 0.4 per dm^2 (number of entry holes*sex ratio). This conforms to published data (Komonen et al. 2010) about the large number of maternal galleries in standing trees. In fallen trees the densities of the chambers were $1.24 \pm 0.72/\text{dm}^2$ and $1.62 \pm 1.26/\text{dm}^2$, while in standing trees it was $4.46 \pm 2.07/\text{dm}^2$. As in our data, no significant dependence on tree height (i.e. tree sample area) had been detected earlier by Komonen et al. (2010).

High population densities are also evidenced by the length of the maternal galleries and number of eggs laid. Various authors (e.g. Pfeiffer 1952, Martínek 1961, Zumr 1985) have stated different numbers of eggs per female, but the averages range around 60 eggs. Low number of eggs per female (on average 23.1 ± 4.4) at studied site can be explained by intraspecific competition which increases with growing population density. This is also confirmed by the results of other studies. For example, Anderbrant (1990), Weslien (1994), Grodzki (2004) likewise state that high density leads to a decrease in maternal gallery length and a reduction in the number of eggs laid.

In view of the number of eggs laid and the proportion of stadia living during the study and not parasitized (we are presuming there will no longer be high mortality), the portion of surviving individuals of *I. typographus* in particular tree sample areas is apparently small (1–18%). These numbers are, however, completely within the range of the known data. Of the original number of eggs laid, only 7–22% were surviving to become beetles, according to Thalenhorst (in Klimetzek, Vité 1989). Karpinski (1935) documented the mortality of *I. typographus* in a range of 96.3 and 98.8% and affected by various factors during development. Niemeyer (1987) studying the mortality of pre-imaginal stages in situations with 30,000–40,000 larvae per a tree determined the mortality to be approximately 50–75%. Such high larvae mortality in the larvae

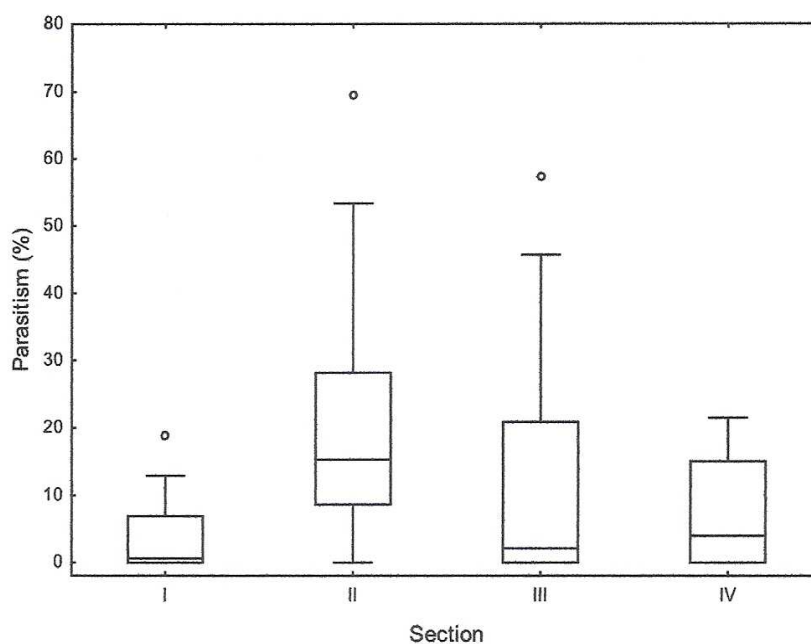


Fig. 1: Percentage of parasitism in *I. typographus* between tree sample areas I-IV. Box plots show median plus upper and lower quartiles for all three study sites in the Šumava Mts. in 2011. Minimum and maximum values are shown by the upper and lower whiskers ($1.5 \times$ interquartile range). Circles indicate outlying values. Sample area I was situated 0.5 m from the tree base, sample area II at middle distance between the base and the bottom of the tree's crown, sample area III at the beginning of the crown, and sample area IV at the center of the crown.

of *I. typographus* is most probably due to spatial competition. With high population densities, the competition among larvae increases. Fewer offspring then accrue to any individual female (Anderbrant 1990). Although the larvae tend to avoid one another in the galleries (De Jong et al. 1986), in cases of accidental crossing of their galleries cannibalism has been observed (Doležal, Sehnal 2007).

With the approximately determined number of 4 females per dm^2 and 6.7 surviving stadia per dm^2 , the reproductive success is 1.6 stadia per female. This corresponds to the published data. Egg gallery density correlated negatively with reproductive success (Komonen et al. 2010, Faccoli, Bernardinelli 2011, Kausrud et al. 2012). At the density of 0.5 females per 1 dm^2 , more than 20 offspring accrue to the average female; at the density of 31 females per dm^2 , it is only 0.6 (Anderbrant et al. 1985, Anderbrant, Schlyter 1989). The reproductive success, as measured by number of offspring per female, was greater for down trees (8 ± 7.5) than standing trees (1.82 ± 1.18), and this can be explained by higher densities of galleries in the standing trees (Komonen et al. 2010).

At high densities, the duration of development of *I. typographus* decreases, but pupation

always occurs only after ingesting a minimal quantity of food, and thus reaching the minimal weight of the larva. De Jong et al. (1986) state that the minimal length of the larval gallery was 20 mm, at which point the pupae weighed 1.6 mg. From this, the influence of the density of maternal and larval galleries per unit of area on the quality of the population can be indirectly inferred (De Jong et al. 1986). Competition resulting from high population densities is therefore considered to be the main factor influencing mortality and fertility of the beetle (De Jong et al. 1986, Anderbrant 1988, 1990, Wermelinger 2004, Faccoli, Bernardinelli 2011).

Due to high elevation and cool climate, there is only one generation of *I. typographus* documented regularly in the study area (Kalina 2000, Wermelinger 2004). Over the study period, therefore, overwintering maternal beetles as well as their offspring in the stages of higher instar larvae, pupae and callow beetles occurred in low numbers in the galleries during maturation feeding. No emergence holes were observed. This means that the beetles leave the bark and dig into the surrounding area (e.g. forest floor, where they overwinter) only after maturation of their gonads.

The members of the genus *Thanasimus* and flies of the genus *Medetera* are the most common predators of *I. typographus*, as are parasitic wasps from the families Pteromalidae and Braconidae (Eck 1990, Schopf, Kohler 1995, Weslien, Schroeder 1999, Hulcr 2001, Wermelinger 2002, Zelený 2007). The rate of occurrence of natural enemies in general, depends on a host tree species and even varies by a individual tree, as the bark texture is especially important (Lawson et al. 1997). The quantities of predators, pathogens and parasitoids correspond to the beetles' population density, but their response can be delayed by weeks or even as much as a year (Kausrud et al. 2012).

In this small-scale and short-term outbreak with high population density of *I. typographus* in an area in epidemic level the pathogenic infections of the maternal beetles are not high. For example, a common microsporidium *C. typographi* (Wegensteiner 2004, Takov et al. 2010) was determined only in one case, and *ItEPV* infection was also not high (3.9% of analysed individuals), even though Šumava locations have been among the places with very high infection (Weiser et al. 2000, Weiser 2002). A higher level of infection was displayed by the neogregarine *M. schwenkei* (34.2% of maternal beetles). This data can be overestimated. However, as it concerns beetles which remained in the galleries and never left them; such beetles could be affected by *M. schwenkei* infection occurring in the fat body in the form of scaphoid spores. All this, theoretically, may influence the tendency of beetles to emerge. It is presumed that only newly infected individuals leave the galleries, and therefore the pathogen occurs at higher rates towards the end of the vegetation season (Weiser 2002). The obtained data about pathogenic organisms (percentages) correspond with and/or are almost identical to the previous findings from the Šumava Mountains (Weiser et al. 2000).

The absence of the eugregarinida *Gregarina typographi* (Fuchs, 1915) is very surprising, as it is one of the most common pathogens of bark beetles (Wegensteiner 2004, Takov et al. 2010) which is very intensively transferred in nuptial chambers of the beetle (Lukášová, Holuša 2011). Such absence, documented also in the populations with high densities of the beetle, is caused by the absence of those infections in the initial populations. Parasitism by entomophagous nematodes was greater than expected. For example, Tenkáčová, Mituch (1986, 1987, 1991) report from various locations (e.g. the Tatra National Park), report the presence of nematodes

in bark beetles in the range of 4.3–5.1% of individuals examined. In the case of *I. typographus* in the Šumava National Park, higher values of parasitism by nematodes might be explained by the high density of the beetle population easily accessible to nematodes. In the case of *Contortylenchus diplogaster*, the given studies report its occurrence in about 9% of *I. typographus* individuals in the spring generation and slightly under 1% in the summer generation. The obtained data on the parasitism by this nematode species in the study area confirm to the known findings.

When evaluating the total rate of parasitism, it is necessary to observe how its values change on within individual trees, as even at relatively high levels of parasitism such rate only occurs in a small percentage of samples while the rest samples show very low parasitism (Hougaard, Grégoire 2001). Eck (1990) reported, for example, that if while infestation ranged between 0% and 70% more than half of the wood samples showed mortality of *I. typographus* below 5%. In the study area this was similar. *T. seitneri* responds to the *I. typographus* aggregation pheromone (Faccoli 2000). It is a common endoparasitoid in the adults (Eck 1990), but the rate of parasitism is low, i.e. 0–9.5% (Feicht 2004). The data in this instance fall entirely within the expected range, even though it concerns only larvae of the first instar, where the species affiliation is clear. In some cases, the total parasitism can reach 20–50% (Faccoli 2000). Other endoparasitoid larvae cannot be identified precisely. We can presume the samples to include the presence of another common species of endoparasitoid *Ropalophorus clavicornis* (Wesmael, 1835) (Faccoli 2001, Wermelinger 2002, Zelený 2007).

Most parasitoids of the Scolytinae are among the ectoparasitoids of larvae and attack their hosts through the bark (Kenis et al. 2004). Within the same tree, the representatives of Pteromalidae and Braconidae are predominate on the upper part of the trunk (with lower tree diameter), where the bark is thinner and smoother (Wermelinger 2002). In our study percentage of parasitism did not differ among trees section. This is probably the result of comparable bast and bark thickness of the trees, which did not vary much in the particular sections.

The parasitism rate most often varies in the range of 5–55% (Mills 1986, Eck 1990, Wermelinger 2002, Feicht 2004), but it can be even higher (Weslien 1992, Markovic, Stojanovic 2003). Parasitism rate in this study is near the lower limit of the published data outbreak

Acknowledgments

The research was supported by the Forest Protection Service and project NAZV QH81136 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

References

- ANDERBRANT, O. 1988: Survival of parent and brood adult bark beetles, *Ips typographus*, in relation to size, lipid content and re-emergence or emergence day. *Physiological Entomology*, 13: 121–129.
- ANDERBRANT, O. 1990: Gallery construction and oviposition of the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) at different breeding densities. *Ecological Entomology*, 15: 1–8.
- ANDERBRANT, O., SCHLYTER, F. 1989: Causes and effects of individual quality in bark beetles. *Ecography*, 12: 488–493.
- ANDERBRANT, O., SCHLYTER, F., BIRGERSSON, G. 1985: Intraspecific competition affecting parents and offspring in the bark beetle *Ips typographus*. *Oikos*, 45: 89–98.
- CHRISTIANSEN, E., BAKKE, A. 1988: The spruce bark beetle of Eurasia. In: BERRYMAN, A. (ed.) *Dynamics of forest insect populations*, Plenum Publishing Corporation, 480–503.
- CHRISTIANSEN, E., WARING, R.H., BERRYMAN, A.A. 1987: Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationship. *Forest Ecology and Management*, 22: 89–106.
- DE JONG, M. C. M., GRIJPMMA, P. 1986: Competition between larvae of *Ips typographus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 41: 121–133.
- DOLEŽAL, P., SEHNAL, F. 2007: Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology*, 131: 165–73.
- ECK, R. 1990: Die parasitischen Hymenopteren des *Ips typographus* in der Phase der Progradation. *Entomologische Abhandlungen*, 53: 152–178.
- FACCOLI, M. 2000: Notes on the biology and ecology of *Tomicobia seitneri* (Ruschka) (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae). *Frustula Entomologica*, 23: 47–55.
- FACCOLI, M. 2001: *Tomicobia seitneri* (Ruschka), *Ropalophorus clavicornis* (Wesmael) and *Coeloides bostrychorum* Giraud: three hymenopterous parasitoids of *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae) new to Italy. *Bollettino della Societa Entomologica Italiana*, 133: 237–246.
- FACCOLI, M., BERNARDINELLI, I. 2011: Breeding performance of the second generation in some bivoltine populations of *Ips typographus* (Coleoptera Curculionidae) in the south-eastern Alps. *Journal of Pest Science*, 84:15–23.
- FEICHT, E. 2004: Parasitoids of *Ips typographus* (Col., Scolytidae), their frequency and composition in uncontrolled and controlled infested spruce forest in Bavaria. *Journal of Pest Science*, 77: 165–172.
- FORSSE, E. 1987: Flight duration in *Ips typographus* L.: Insensitivity to nematode infection. *Journal of Applied Entomology*, 104: 326–328.
- GRÉGOIRE J. C., EVANS H. F., 2004: Damage and control of BAWBILT organisms—an overview. In: LIEUTIER F., DAY K. R., BATTISTI A., GRÉGOIRE J. C., EVANS H. F. (eds): *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, the Netherlands, 19–37.
- GRODZKI, W. 2004: Some reaction of *Ips typographus* (L.) (Col.: Scolytidae) to changing breeding conditions in a forest decline area in the Sudeten Mountains, Poland. *Journal of Pest Science*, 77: 43–48.
- HEDGREN, P. O., SCHROEDER, L. M. 2004: Reproductive success of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) and occurrence of associated species: a comparison between standing beetle-killed trees and cut trees. *Forest Ecology and Management*, 203: 241–250.
- HERARD, F., MERCADIER, G. 1996: Natural enemies of *Tomicus piniperda* and *Ips acuminatus* (Col., Scolytidae) on *Pinus sylvestris* near Orléans, France: Temporal occurrence and relative abundance, and notes on eight predatory species. *Entomophaga*, 41: 183–210.
- HOLUŠA, J., WEISER, J., ŽIŽKA, Z. 2009: Pathogens of the spruce bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. *Central European Journal of Biology*, 4: 567–573.

- HOUGARDY, E., GRÉGOIRE, J.C. 2001: Bark-beetle parasitoids population surveys following storm damage in spruce stands in the Vosges region (France). *Integrated Pest Management Reviews*, 6: 163–168.
- HULCR, J. 2001: Přirození regulátoři lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) na Šumavě. [Natural regulators of spruce bark beetle (*Ips typographus* L.) in the Šumava Mts.]. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 39 s.
- KALINA, V. 2000: Mortalita lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) v průběhu vývoje pod kůrou v Národním parku Šumava a její ovlivňování blanokřídlými parazitoidy (Hymenoptera: Pteromalidae; Braconidae). In: PODRÁZSKÝ, V., RYŠÁNKOVÁ, H., VACEK, S., ULBRICHOVÁ, I. (eds.) *Monitoring, výzkum a management ekosystémů Národního parku Šumava. Sborník celostátní konference. Kostelec nad Černými lesy 27. A 28. Listopadu 2000.*
- KARPIŃSKI, J. J. 1935: *Przyczyny ograniczają cerozmnazani esię korników drukarzy (Ips typographus L. i Ips duplicatus Salhb.) w lesie pierwotnym.* Instytut Badawczy Lasów Państwowych, Warszawa, Ser. A, 15, 86 s.
- KAUSRUD, K., OKLAND, B., SKARPAAS, O., GRÉGOIRE, J.C., ERBILGIN, N., STENSETH, N. C. 2012: Population dynamics in changing environments: the case of an eruptive forest pest species. *Biological Reviews*, 87: 34–51.
- KAYA, H. K. 1984: Nematode parasites of bark beetles. In: NICKLE, W. R. (ed.) *Plant and Insect Nematodes.* New York, Marcel Dekker, Inc., 727–754.
- KENIS, M., WERMELINGER, B., GRÉGOIRE, J. C. 2004: Research on parasitoids and predators of Scolytidae - a review. In: LIEUTIER, F., DAY, K. R., BATTISTI, A., GRÉGOIRE, J. C., EVANS, H. F. (eds.) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis,* Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 237–290.
- KLIMETZEK, D., VITĚ, J.P. 1989: Tierische Schädlinge. In: SCHMIDT-VOGT, H. (ed.) *Die Fichte Bd. II/2 Krankheiten, Schäden, Fichtensterben.* Verlag Paul Parey, Hamburg and Berlin, 607 pp.
- KOMONEN, A., SCHROEDER, L. M., WESLIEN J. (2010): Ips typographus population development after a severe storm in a nature reserve in southern Sweden. *Journal of Applied Entomology*, 135 (1–2): 132–141.
- KRÜGER, K., MILLS, N. J. 1990: Observations on the biology of three parasitoids of the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae): *Coeloides bostrychorum*, *Dendrosoter midderdorffii* (Hym., Braconidae) and *Rhopalicus tutela* (Hym., Pteromalidae). *Journal of Applied Entomology*, 110: 281–291.
- LAWSON, S. A., FURUTA, K., KATAGIRI, K. 1997: Effect of natural enemy exclusion of *Ips typographus japonicus* Nijima (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 121: 89–98.
- LIEUTIER, F. 1981: Influence des nématodes parasites sur l'essaimage du scolytode *Ips sexdentatus* (Boern.). Action régulatrice du froid. *Acta Oecologica, Oecologia Applicata*, 2: 357–368.
- LUKÁŠOVÁ, K., HOLUŠA, J. 2011: Gregarina typographi (Eugregarinorida: Gregarinidae) in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae): changes in infection level in the breeding system. *Acta Protozoologica*, 50: 311–318.
- LUKÁŠOVÁ, K., HOLUŠA, J. 2012: Patogeny lýkožroutů rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): review. [Pathogens of bark beetles of the genus *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): review]. *Zprávy lesnického výzkumu*, in press.
- MÁNEK, J., EŠNEROVÁ, J. 2007: Studium genetické variability a ověřování původnosti smrkových populací v Národním parku Šumava jako podklad pro záchranná managementová opatření. [Study of genetic variability of Norway spruce populations (*Picea abies* (L.) Karst.) in the Šumava National Park and verification of their origin as a basis for conservation measures]. In: DVOŘÁK, L., ŠUSTR, P., BRAUN, V. (eds.) *Aktuality šumavského výzkumu III. Sborník z konference Srní 4.-5.10. 2007.* Vimperk: Správa Národního parku a Chráněné krajinné oblasti Šumava, 87–89.
- MARKOVIC, C., STOJANOVIC, A. 2003: Significance of parasitoids in the reduction of oak bark beetle *Scolytus intricatus* Ratzeburg (Col., Scolytidae) in Serbia. *Journal of Applied Entomology*, 127: 23–28.
- MARTÍNEK, V. 1961: Problém natality a gradace kůrovce *Ips typographus* L. ve střední Evropě. *Rozpravy Československé Akademie Věd, Řada MPV*, 71: 1–78.
- MILLS, N. J. 1985: Some observations on the role of predation in the natural regulation of *Ips typographus* populations. *Journal of Applied Entomology*, 99: 209–215.
- MILLS, N. J. 1986: A preliminary analysis of the dynamics of within tree populations of *Ips typographus* (L.) (Coleoptera Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 102: 402–416.
- MULOCK, P., CHRISTIANSEN, E. 1986: The threshold of successful attack by *Ips typographus* on *Picea abies*: a field experiment. *Forest Ecology and Management*, 14: 125–132.

- NICKLE, W. R. 1963: Observations on the effect of nematodes on *Ips confusus* (LeConte) and other bark beetles. *Journal of Insect Pathology*, 5: 386–389.
- NIEMEYER, H. 1987: Erfahrungen mit der Bekämpfung rindenbrütender Borkenkäfer. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung*, 98: 29–31.
- PFEFFER, A. 1952: *Kůrovec lýkožrout smrkový a boj proti němu*. [Spruce bark beetle and control]. Nakladatelství Brázda, Praha, 45 s.
- SCHELHAAS, M.J., NABUURS, G.J., SCHUCK, A. 2003: Natural disturbances in the European forests in the 19th and 20th centuries. *Global Change Biology*, 9: 1620–1633.
- SCHOPF, R., KÖHLER, U. 1995: *Untersuchungen zur Populationsdynamik der Fichtenborkenkäfer im Nationalpark Bayerischer Wald*. Nationalpark Bayerischer Wald - 25 Jahre auf dem Weg zum Naturwald. Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald: Neuschönau, 88–110.
- SVOBODA, M. 2007: Efekt disturbance a hospodářských zásahů na stavlesního ekosystému – případová studie z oblasti tzv. Kalamitní svážnice na Trojmezí. [Effects of disturbances and management on the forest ecosystem – case study from the area of Trojmezí old-growth forest]. In: DVOŘÁK, L., ŠUSTR, P., BRAUN, V. (eds.) *Aktuality šumavského výzkumu III. Sborník z konference Srní 4.-5.10. 2007. Správa Národního parku a Chráněné krajinné oblasti Šumava: Vimperk*, 109–114.
- TAKOV, D., PILARSKA, D., WEGENSTEINER, R. 2010: List of protozoan and microsporidian pathogens of economically important bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Europe. *Acta Zoologica Bulgarica*, 62: 201–209.
- TENKÁČOVÁ, I., MITUCH, J. 1986: Príspevok k poznaniu nematofauny chrobákov čelade Scolytidae na smreku obyčajnom v Košickém lesnom parku. *Lesnícký časopis*, 32: 381–387.
- TENKÁČOVÁ, I., MITUCH, J. 1987: Nematodes new for the fauna of the Czechoslovak Socialist Republic with the affinity to scolytids (Coleoptera: Scolytidae). *Helminthologia*, 24: 281–291.
- TENKÁČOVÁ, I., MITUCH, J. 1991: Nematoda podkorníkovitých (Coleoptera: Scolytidae) z Vysokých Tatier. *Zborník prác o Tatranskom národnom parku*, 31: 173–182.
- THONG, C. H. S., WEBSTER, J.M. 1975: Effects of the Bark Beetles Nematode, *Contortylenchus reversus* on Gallery Construction, Fecundity and Egg Viability of the Douglas Fir Beetle *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 26: 235–238.
- WEGENSTEINER, R. 2004: Pathogens in bark beetles. In: LIEUTIER, F., DAY, K. R., BATTISTI, A., GRÉGOIRE, J. C., EVANS, H.F. (eds.) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 291–313.
- WEISER, J. 2002: Patogenní organismy. In: SKUHRAVÝ, V. (ed.) *Lýkožrout smrkový (Ips typographus L.) a jeho kalamity. Der Buchdrucker und seine Kalamitäten*. [Spruce bark beetle (*Ips typographus*) and its outbreaks]. Agrospoj, Praha, 97–100.
- WEISER, J., PULTAR, O., ŽIŽKA, Z. 2000: Biological protection of forest against bark beetle outbreaks with poxvirus and other pathogens. *IUAPPA, Section B*: 168–172.
- WERMELINGER, B. 2002: Development and distribution of predators and parasitoids during two consecutive years of an *Ips typographus* (Col., Scolytidae) infestation. *Journal of Applied Entomology*, 126: 521–527.
- WERMELINGER, B. 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* – a review of recent research. *Forest Ecology and Management*, 202: 67–82.
- WESLIEN, J. 1992: The arthropod complex associated with *Ips typographus* (L.) (Coleoptera, Scolytidae): species composition, phenology, and impact on bark beetle productivity. *Entomologica Fennica*, 3: 205–213.
- WESLIEN, J. 1994: Interactions within and between species at different densities of the bark beetle *Ips typographus* and its predator *Thanasimus formicarius*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 71: 133–143.
- WESLIEN, J., SCHROEDER, L. M., 1999: Population levels of bark beetles and insects in managed and unmanaged spruce stands. *Forest Ecology and Management*, 111: 267–275.
- ZELENÝ, J. 2007: Predátoři a parazitoidi lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) na Šumavě. In: DVOŘÁK, L., ŠUSTR, P., BRAUN V. (eds.) *Aktuality šumavského výzkumu III. Sborník z konference Srní 4.-5.10. 2007. Správa Národního parku a Chráněné krajinné oblasti Šumava, Vimperk*, 72–74.
- ZUMR, V. 1985: *Biologie a ekologie lýkožrouta smrkového (Ips typographus) a ochrana proti němu*. [Biology and ecology of eight-toothed spruce bark beetle (*Ips typographus* L.), and forest protection measures]. Academia, Praha, 124 s.

5.3. *Ips duplicatus*

Nematodes associated with the double-spined bark beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae) in central Europe

Š. Grucmanová, J. Holuša & J. Nermut'

2014

Journal of Applied Entomology

přijato k publikování

doi: 10.1111/jen.12142

ORIGINAL CONTRIBUTION

**Nematodes associated with the double-spined bark beetle
Ips duplicatus (Coleoptera: Curculionidae) in central Europe**Š. Grucmanová¹, J. Holuša¹ & J. Nermut²¹ Department of Forest Protection and Entomology, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic² Biology Centre, ASCR, v.v.i., Institute of Entomology České Budějovice, Czech Republic**Keywords**galleries, generations, *Ips duplicatus*, nematodes**Correspondence**Šárka Grucmanová (corresponding author),
Department of Forest Protection and
Entomology, Faculty of Forestry and Wood
Sciences, Czech University of Life Sciences,
Kamýcká 1176, Prague 6-Suchbát 165 21,
Prague, Czech Republic. E-mail:
grucmanova@fld.czu.czReceived: February 25, 2014; accepted: May
16, 2014

doi: 10.1111/jen.12142

Abstract

Ips duplicatus (Sahlberg) is an important forest pest in central Europe, but its nematode associates have seldom been studied. Therefore, nematodes associated with *I. duplicatus* were determined at three localities in the Czech Republic. The percentage of beetles with phoretic nematodes ranged from 18 to 65%. *Micoletzkyia buetschlii* and other phoretic nematodes were found under elytra, on wings, and between body segments. The percentage of beetles with nematodes in the haemocoel ranged from 3 to 30%, and the nematodes included *Contortylenchus diplogaster* and *Parasitylenchus* cf. *aculeatus*. Juveniles of *Parasitorhabditis obtusa* (Fuchs 1915) were found in the intestines of 0–16% of the beetles. The most abundant species in *I. duplicatus* galleries were *P. obtusa* and *M. buetschlii*. *Cryptaphelenchus* sp., *Parasitaphelenchus* sp. and unidentified tylenchid juveniles also were found in the galleries. The percentage of beetles with nematodes was greater in the overwintering than in the offspring generation, and numbers of nematodes per gallery increased with gallery development.

Introduction

The double-spined bark beetle *Ips duplicatus* (Sahlberg) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) is listed as a quarantine pest by the European Union and the European and Mediterranean Plant Protection Organization (Smith et al. 1996). Local outbreaks of *I. duplicatus* were recorded in Poland and the Czech Republic during the 1990s (Knizek and Zahradnik 1996; Grodzki 1997, 2003), and *I. duplicatus* has been considered the major species causing damage in natural spruce forests in Inner Mongolia, the People's Republic of China, where outbreaks of this beetle have occurred frequently since the 1950s (Zhang and Schlyter 1995; Schlyter et al. 2001; Zhang et al. 2001). The latest *I. duplicatus* outbreak in the Czech Republic began in 2003, and the numbers have remained high since 2005 (Holuša et al. 2010a). Consequently, the species is now considered economically important in the Czech Republic (Holuša et al. 2010b). It is one of 11 known *Ips* species in central

Europe and is spreading to the west (Holuša et al. 2010b), east and south (Vakula et al. 2009).

Even though most *Ips* species are considered serious pests (Pschorn-Walcher 1977) and even though nematodes have been studied as potential biological control agents against pest insects, there are only a few publications concerning nematodes associated with bark beetles in Europe (Rühm 1956, 1960; Balazy 1966, 1968; Tenkacova and Mituch 1986, 1987, 1991; Takov et al. 2006; Nedelchev et al. 2008). Nematodes are considered to be important factors limiting bark beetle populations (Rühm 1956; Massey 1974; Thong and Webster 1975; Weiser and Mracek 1988). Although nematodes seldom kill their hosts, they can change host behaviour; decrease host fertility, survival and flight activity; and delay swarming (Massey 1956, 1960; Hoffard and Coster 1976; Kaya 1984). Other research suggests that nematodes may weaken and kill bark beetles, reduce the number of eggs laid by as much as 40% and reduce the number of generations per year (Massey 1974; Lieutier 1984). The most

common species of the nematode genera *Parasitylenchus* and *Contortylenchus* parasitizing *Ips* bark beetles in central Europe (Grucmanová and Holuša 2013) reduce the size of fat bodies and ovaries and reduce development of terminal oocytes in *I. sexdentatus* (Lieutier 1982).

Among the possible interactions between nematodes and bark beetles, parasitism and phoresy are the most common (Massey 1974; Gaugler and Bilgrami 2004). For phoretic interactions, in which the nematodes use their hosts as a means of transportation to new environments (Nickle 1973), the nematodes are mainly found on the beetle bodies, that is, between beetle body segments, under the elytra and on the wings. For parasitic interactions, in contrast, nematodes are found in host body cavities, occurring freely in the haemocoel, in the intestine and rarely in the Malpighian tubules (Hunt and Hague 1974; Massey 1974; Poinar 1975; Gaugler and Bilgrami 2004; Serrao et al. 2008).

The only nematode known to be associated with *I. duplicatus* is *Parasitylenchus aculeatus* (Slankis 1972; as referred to by Poinar 1975). The existence of many synonymous names for certain nematode species constitutes a considerable problem (Grucmanová and Holuša 2013).

The main goals of the present work were to:

- (1) identify the nematodes associated with *I. duplicatus* in central European spruce forests
- (2) compare the prevalence of nematodes in beetles between the overwintering and offspring generations in bivoltine populations of *I. duplicatus* (Choo et al. 1987; Tenkacova and Mituch 1986)
- (3) determine whether the abundance of nematodes in *I. duplicatus* gallery frass increases with beetle development.

Materials and Methods

In the eastern part of the Czech Republic, where *I. duplicatus* numbers have long been high (Holuša et al. 2010b) and where the beetle regularly produces two generations per year (Holuša et al. 2003, 2013), we collected beetles from three localities at different elevations: Pustá Polom (49° 50' 57.5" N, 18° 2' 3.8" E, 350 m a.s.l.), Bystřice (49° 36' 36.0" N, 18° 41' 40.9" E; 450 m a.s.l.) and Břidličná (49° 58' 47.1" N, 17° 24' 52.7" E; 600 m a.s.l.). These represent the vertical range of abundant *I. duplicatus* populations (Holuša et al. 2010a,b). At each locality in 2012, we collected material from five spruce trees (*Picea abies* (L.) Karst.) infected by *I. duplicatus* during May–July

(overwintering generation) and August–September (offspring generation). We collected 20 maternal beetles from each tree (a total of 100 beetles per locality per sampling time). These were placed individually in closable Eppendorf tubes and stored in a refrigerator at about 7°C.

Ten gallery frass of *I. duplicatus* were also collected from each tree on each sampling time. The numbers of maternal and larval galleries were recorded for each gallery, and the oldest and the most numerous beetle stages were also recorded. The maternal and larval galleries frass was collected from each gallery using a dissecting needle and brush, placed into a sealable plastic bag and stored in a refrigerator about 7°C.

Processing of samples

In the laboratory, the individual beetles were examined with a magnifying glass or microscope (Arsenal SZP 1102 T Zoom, Arsenal LPE 5013i), and the presence of phoretic nematodes on the individual body parts (elytra, wings, thorax, abdomen) was recorded. The beetles were subsequently dissected, and the presence and locality of parasitic nematodes (i.e. those nematodes in the haemocoel, intestine and Malpighian tubules) were recorded.

Nematodes were extracted from galleries' frass in Baermann funnels (Weiser and Mracek 1988). After the nematodes were counted, they were put into Eppendorf tube with a drop of distilled water and then the tube was filled with hot (60–70°C) TAF fixative (a mixture of formaldehyde, triethanolamine and distilled water) and left until the next day; then, the solution was replaced by a new cold. Nematodes were identified to species or genus according to Rühm (1956), Slankis (1972) and Hunt (1993). Some of the fixed nematodes were transferred into glycerol (Kaya and Stock 1997). These were mounted as permanent specimens on microscope slides; the glass covers were sealed with a mixture of paraffin and beeswax. Other nematodes were preserved in ethanol (70%) and subjected to DNA analysis as described later.

We compared the percentages of beetles with nematodes between beetle sexes, among localities and between generations; the beetles obtained from each infested tree were used as the sample unit. The numbers of nematodes in the galleries' frass (total and by beetle stage) were compared so that the sample unit was all the beetles from a given locality. MS Excel was used for data processing, and the R program for statistical testing. The Kruskal–Wallis test, one-way ANOVA and Pearson's correlation were used with the significance level at $\alpha = 0.05$.

DNA analysis

For DNA analysis, the nematodes were first transferred into sterile water on watch glasses, which were placed in Petri dishes with filter paper and sterile water and left in a refrigerator overnight. DNA was then extracted from the nematodes. An individual nematode was transferred into a sterile Eppendorf tube (200 µl) with 20 µl of extracting buffer (17.7 µl ddH₂O, 2 µl 10 × PCR buffer with MgCl₂, 0.2 µl 1% Tween 20 and 0.1 µl proteinase K 100 µg/ml). The nematode in the buffer was frozen at -20°C for 20 min and then immediately incubated at 65°C for 1 h, followed by 10 min at 95°C. After the lysates were cooled on ice and centrifuged (2 min, 11600 rpm, centrifuge Eppendorf minispin plus), 1 µl of the supernatant was used for polymerase chain reaction (PCR). We used the segment of the small subunit ribosomal RNA (SSU) gene. A fragment of rDNA-containing internal transcribed spacer (ITS1, 5.8 S, ITS2) was amplified using primers SSU 18 A 5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3' sense and SSU 26 R 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG-3' (Blaxter et al. 1998). The PCR master mix consisted of 7.25 µl ddH₂O, 1.25 µl 10 × PCR buffer with MgCl₂, 1 µl dNTPs 2.5 mM, 0.75 µl of each primer 10 pmol/µl, 0.1 µl Taq DNA polymerase 5 U/µl and 1 µl DNA extract. The PCR conditions were: 94°C for 5 min; followed by 35 cycles at 94°C for 60 s, 52°C for 90 s, and 68°C for 2 min; and a final extension at 68°C for 10 min (Eyuaem and Blaxter 2003). PCR was followed by electrophoresis (40 min, 120 V) of 2 µl of PCR product in a 1% TAE-buffered agarose gel that was stained with ethidium bromide (20 µl ETB 10 mg/ml per 100 ml of gel). Purified PCR product was sent to a sequencing service (Macrogen, Seoul, South Korea). The sequences were compared with those in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Centre for Biotechnology Information. An alignment of our samples together with representative sequences of all different but similar species found in GenBank was produced for each amplified DNA region using ClustalW parameters in Mega 5.05 (Tamura et al. 2011) and then optimized manually in Bio Edit (Hall 1999). Pairwise distances were computed using MEGA (Tamura et al. 2011).

Results

We examined 600 beetles, of which 420 were females and 180 were males. A total of 300 galleries containing *I. duplicatus* at various stages of development (egg

to callow beetle) were processed. We found that 66% of overwintering beetles and 36.6% of the offspring generation were nematode positive (51.2% in total), while 72.0% of galleries' frass of the overwintering beetles and 88.7% of the offspring generation were nematode positive (80.3% in total).

Adult females as well as large numbers of eggs and juveniles of the nematodes *Contortylenchus diplogaster* (v. Linstow 1890) and *Parasitylenchus* cf. *aculeatus* (Slankis 1972) were found in the haemocoel of *I. duplicatus* adults (tables 1 and 2). Some juvenile tylenchids were found in the intestines and galleries' frass. Genetic analyses showed no match. GenBank does not contain data on the structure of this genome section for the genera *Contortylenchus*.

Parasitorhabditis obtusa (Fuchs 1915) juveniles were observed in the intestines of *I. duplicatus*, and *P. obtusa* juveniles and adults were simultaneously found galleries' frass. In a single case, five unidentified nematodes were detected in the Malpighian tubules of a female of the offspring generation at the Brídličná locality. *P. obtusa* was a very frequent and abundant nematode in galleries' frass. Another nematode frequently detected in galleries' frass was *Micoletzkyia buetschlii* (Fuchs 1915), and its juveniles also were found under elytra, on wings and between body segments. Usually, these were in groups from just a few to 30 individuals (table 3). The identities of *P. obtusa* and *M. buetschlii* were confirmed in GenBank (identity and query = 100). Our *P. obtusa* nucleotide sequence (KJ705089) is identical to the sequence EU003189 in GenBank (identity and query = 100). Our *M. buetschlii* nucleotide sequence (KJ705088) is identical to the sequence JX163973 in GenBank (identity and query = 100). Along with these two species, *Cryptaphelenchus* and *Parasitaphelenchus* species and unidentified tylenchid juveniles were observed galleries' frass. Our *Cryptaphelenchus* nucleotide sequence (KJ705087) was compared with the known *Cryptaphelenchus* sp (EU287588) (identity = 95, query = 99).

Infestation by parasitic nematodes (i.e. nematodes in the haemocoel or intestines) in the haemocoel ranged from 7.8 to 30.0% in the overwintering generation and from 3.0 to 13.3% in the offspring generation (table 1). Infestation by parasitic nematodes in the intestine ranged from 4.3 to 15.6% in the overwintering generation and from 0.0 to 10.8% in the offspring generation. Infestation by phoretic nematodes ranged from 42.3 to 65.2% in the overwintering generation and from 18.2 to 40.6% in the offspring generation (table 1).

Nematode infestation levels in beetles did not significantly differ among localities. Across all localities,

Table 1 Percentages of *Ips duplicatus* beetles with nematodes as affected by locality, beetle generation (F1 – offspring generation), beetle sex (M – males, F – females) and locality in the beetle (Int = intestinal nematodes; Hem = freely in the haemocoel; Endo = total parasitic nematodes, i.e., nematodes detected in the intestines or haemocoel; Body = found on the body of *Ips duplicatus*)

Locality	Generation	Sex	Number of beetles	Body (%)	Endo (%)	Hem (%)	Int (%)
Břidličná	Overwintering	F	74	50.0	24.3	12.2	14.9
Břidličná	Overwintering	M	26	42.3	26.9	19.2	7.7
Pustá Polom	Overwintering	F	70	74.3	17.1	10.0	7.1
Pustá Polom	Overwintering	M	30	46.7	33.3	30.0	6.7
Bystřice	Overwintering	F	77	55.8	23.4	7.8	15.6
Bystřice	Overwintering	M	23	65.2	17.4	13.0	4.3
Total	Overwintering	F	221	60.2	21.3	10.0	12.2
Total	Overwintering	M	79	50.6	26.6	21.5	6.3
Břidličná	F1	F	63	36.5	7.9	4.8	3.2
Břidličná	F1	M	37	32.4	10.8	2.7	10.8
Pustá Polom	F1	F	67	23.9	7.5	6.0	1.5
Pustá Polom	F1	M	33	18.2	6.1	3.0	3.0
Bystřice	F1	F	69	40.6	10.1	5.8	4.3
Bystřice	F1	M	31	33.3	13.3	13.3	0
Total	F1	F	199	33.7	8.5	5.5	3.0
Total	F1	M	101	27.7	9.9	5.9	5.0

however, infestation significantly differed between the overwintering and offspring generations for phoretic nematodes (ANOVA: d.f. = 1; F = 13.05; P = 0.0012) and also for parasitic nematodes (Kruskal–Wallis: d.f. = 1; P = 0.0102; $\chi^2 = 6.6012$). The values for parasitic and phoretic nematodes were in most cases higher in the overwintering generation than in the offspring generation (table 1). Male and female beetles did not differ in percentages with parasitic nematodes (Kruskal–Wallis: d.f. = 1; P = 0.521; $\chi^2 = 0.4103$) or with phoretic nematodes (ANOVA: d.f. = 1; F = 0.5545; P = 0.4736).

Table 2 Frequency at which nematode species were detected in *Ips duplicatus* at all localities as affected by generation

Nematode	Location	Overwintering (%)	Offspring (%)	Total (%)
<i>Contortylenchus diplogaster</i>	Haemocoel	3.3	1.0	2.2
<i>Parasitylenchus</i> cf. <i>aculeatus</i>	Haemocoel	8.3	4.3	6.3
<i>Parasitorhabditis obtusa</i>	Intestine	10.7	3.7	7.2
<i>Micoletzkyia buetschlii</i>	Body surface	57.7	31.7	44.7
<i>Cryptaphelenchus</i> cf. <i>macrogaster</i>	Galleries' frass	*	*	*
<i>Parasitaphelenchus</i> sp.	Galleries' frass	*	*	*

*The frequency in galleries' frass was not recorded.

The number of nematodes found per galleries' frass ranged from 0 to 1500 and tended to increase with bark beetle developmental stage (figs 1–3). The numbers of nematodes in galleries' frass significantly differed between localities (Kruskal–Wallis: d.f. = 2, P = 0.0011; $\chi^2 = 13.67$). The numbers of nematodes in galleries' frass differed between the generations at Břidličná (Kruskal–Wallis: d.f. = 1, P = 1.434e-15; $\chi^2 = 63.7206$) and at Bystřice (Kruskal–Wallis: d.f. = 1, P = 4.016e-09; $\chi^2 = 34.6158$). At Břidličná and Pustá Polom, the numbers of nematodes in the galleries' frass significantly differed depending on bark beetle development (which was assessed according to the most advanced beetle stage) but only for the overwintering generation (Břidličná, Kruskal–Wallis: d.f. = 4, P-value = 0.000992; $\chi^2 = 18.4846$); Pustá Polom, Kruskal–Wallis: d.f. = 6, P = 0.00142; $\chi^2 = 21.6178$) (figs 1–3).

Discussion

The nematodes associated with the bark beetle *I. duplicatus* have not been studied in detail. The only known nematode with a connection to this beetle is *Parasitylenchus aculeatus* (Slankis 1972), which was mentioned by Poinar (1975). This nematode was also detected in this study.

In the current study, adult females of *Parasitylenchus* cf. *aculeatus* (Slankis 1972) and *Contortylenchus diplogaster* (v. Linstow 1890) as well as large numbers of eggs and juveniles were found in the haemocoel of

Table 3 Numbers of phoretic nematodes on individual body parts of *Ips duplicatus* at three localities. Values are means \pm SD per beetle

Locality	Elytra	Wings	Thorax
Břidličná	17.9 \pm 16.2	14.4 \pm 11.9	14.8 \pm 11.0
Bystřice	17.8 \pm 16.7	16.0 \pm 13.1	14.8 \pm 14.6
Pustá Polom	11.1 \pm 10.9	12.8 \pm 12.5	11.1 \pm 11.7
Total	15.5 \pm 15.2	15.6 \pm 12.6	13.5 \pm 12.5

significant numbers of *I. duplicatus*. Some juvenile tylenchids were found even in intestines and galleries' frass. Based on what is known about their development cycles (Massey 1974; Siddiqi 2000), these tylenchid juveniles were probably representatives of the same nematode genera found in haemocoel. *Contortylenchus* and *Parasitylenchus* nematodes have also been found in the haemocoel of the bark beetles *Ips acuminatus* (Gyllenhal 1827), *I. amitinus* (Eichhoff 1871), *I. cembrae* (Heer 1836), *I. sexdentatus* (Borner 1776) and *I. typographus* (see Grucmanová and Holuša 2013). Even though it is known that individual beetles can be simultaneously infected (in the haemocoel) with more than one genus of parasitic nematode (Massey 1974; Lieutier 1980; Choo et al. 1987), no such case had been previously recorded for *I. duplicatus*.

The nematode *Parasitorhabditis obtusa* was found in *I. duplicatus* intestines and galleries' frass in the current study. This species was previously found in the galleries' frass and intestines of *I. typographus* and *I. cembrae* (Rühm 1956; Tenkacová and Mituch 1986;

Weiser and Mracek 1988). *Parasitorhabditis* spp. are also found in other *Ips* spp. [e.g. *I. acuminatus* and *I. amitinus*; see Grucmanová and Holuša (2013)].

Juveniles of *M. buetschlii* were found under the elytra, on the wings and between body segments of *I. duplicatus*. This nematode has also been found in *I. typographus* and *I. cembrae* in clusters of up to 50 individuals (Weiser 1954; Rühm 1956; Tenkacová and Mituch 1983, 1986, 1991), which is in accordance with our findings (table 3). This species is a typical phoretic nematode that use the bark beetle to colonize new environments. According to Rühm (1956), up to 70% of beetles of a given population have juveniles of this species under their elytra. In our case, up to 57.7% of individuals in the overwintering generation had *M. buetschlii* juveniles under their elytra (table 2). In general, nematode phoresy is very common, especially for beetles inhabiting trees (Maggenti 1981).

We found the nematodes *P. obtusa*, *M. buetschlii*, *Cryptaphelenchus* sp. and *Parasitaphelenchus* sp. in the galleries' frass of *I. duplicatus* (listed according to their abundance in the galleries' frass). This fully corresponds with previous reports that *Micoletzkyia* and *Cryptaphelenchus* species and especially *Parasitorhabditis* species are the dominant nematodes in galleries' frass (Tenkacová and Mituch 1980, 1986, 1991). *Cryptaphelenchus* and *Parasitaphelenchus* have been described in association with other *Ips* species (Rühm 1956; Tenkacová and Mituch 1986, 1991). *Cryptaphelenchus* is common in galleries of *I. typographus* and *I. cembrae* (being the most dominant species, second only to *P. obtusa*) and in the joints between the head and thorax of the beetles (Tenkacová and Mituch 1980, 1983, 1986, 1991). In our case, the species was probably *C. macrogaster*, which is known from *I. typographus* (Grucmanová and Holuša 2013). In addition to the species stated above, tylenchid juveniles that could not be further identified were also found in the galleries' frass, but these were probably *C. diplogaster* and *P. cf. aculeatus*, whose adults were identified in the same galleries.

The nematodes found to be associated with *I. duplicatus* in the current study are in many respects similar to those associated with the European spruce bark beetle, *Ips typographus* L., which is severe pest (Rühm 1956; Tenkacová and Mituch 1986, 1987, 1991). The two bark beetle species primarily feed on Norway spruce (*P. abies* (L.) Karst). While *I. typographus* prefers the lower parts of trees, *I. duplicatus* occurs predominantly on the upper parts of the trunk. Despite the different height preferences, overlap occurs, and it is not unusual to observe galleries' frass of both *I. duplicatus* and *I. typographus* in the middle parts of trees

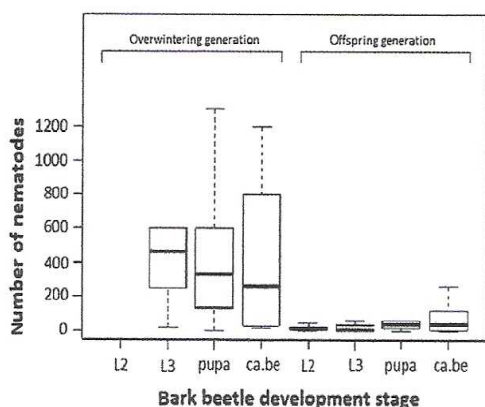


Fig. 1 Numbers of nematodes per *Ips duplicatus* galleries' frass at the Bystřice locality. Galleries are categorized according to the most advanced *I. duplicatus* developmental stage present (L1 = 1st instar larva, L2 = 2nd instar larva, L3 = 3rd instar larva, pupa = pupa, ca.be = callow beetle). Boxplot: band = median, box = SD, whiskers = maximum, minimum.

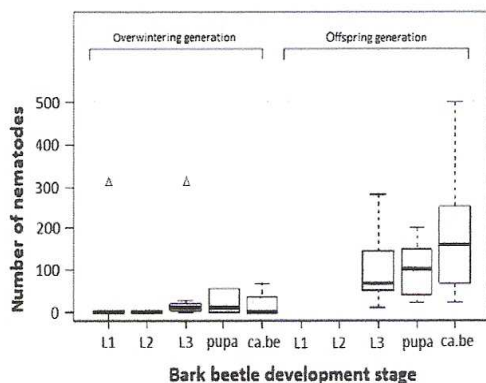


Fig. 2 Numbers of nematodes per *Ips duplicatus* galleries' frass at the Břidličná locality. Galleries are categorized according to the most advanced *I. duplicatus* developmental stage present (L1 = 1st instar larva, L2 = 2nd instar larva, L3 = 3rd instar larva, pupa = pupa, ca.be = callow beetle). Boxplot: band = median, box = SD, whiskers = maximum, minimum. Plots with triangles are significantly different from each other.

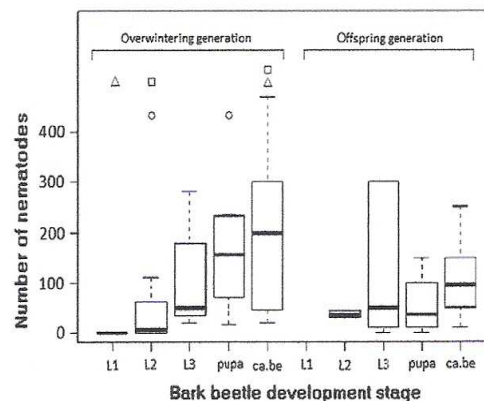


Fig. 3 Numbers of nematodes per *Ips duplicatus* galleries' frass at the Pustá Polom locality. Galleries are categorized according to the most advanced *I. duplicatus* developmental stage present (L1 = 1st instar larva, L2 = 2nd instar larva, L3 = 3rd instar larva, pupa = pupa, ca.be = callow beetle). Boxplot: band = median, box = SD, whiskers = maximum, minimum. Two plots with triangles, or with squares or circles, are significantly different from each other.

(Schlyter and Anderbrant 1993). One of the differences between the nematodes associated with *I. duplicatus* and *I. typographus* is the presence of two different species of *Parasitylenchus*. *P. aculeatus* has been described in *I. duplicatus*, as mentioned above, and *P. dispar* is known from *I. typographus*. A description of *P. aculeatus* and the characteristics that distinguish it from *P. dispar* were reported by Slankis (1972). These two species differ especially in the shape of the tail, which is pointy in *P. aculeatus* (fig 4) and round in *P. dispar*. Based upon the distinguishing characteristics provided by Slankis (1972), we identified the specimens as *P. aculeatus* in the current study. This fully agrees with the known narrow specialization and specificity of bark beetle nematodes, and especially of the parasitic genera such as *Parasitylenchus* and *Contortylenchus* (Mracek 1982).

The presence of parasitic and phoretic nematodes in association with *I. duplicatus* did not significantly differ between the three locality, which differed in elevation. Even though the studied localities represented the entire range of elevations that support large numbers *I. duplicatus*, the similarity in nematodes among the localities is not surprising considering that they differ by only 250 m in elevation.

The average annual temperature of the study area is 7°C, and the average annual precipitation is 819 mm. Nematodes associated with insects are thought to be more influenced by the local microclimate than by general climatic conditions, and the local microclimate depends in part on elevation (Rühm 1956; Choo et al. 1987; Meirmans et al.

2006). The microclimate in the galleries is influenced by various factors, but especially by the amount of sunlight striking the tree trunk (Rühm 1956; Meirmans et al. 2006). Because the development of all nematode genera detected occurs in bark beetle galleries for at least a certain time, the local microclimate is especially important for nematodes when they occur outside of the host body, where they are unprotected from external influences (Rühm 1956; Tenkacova and Mituch 1980; Meirmans et al. 2006). This environment is crucial for encountering individuals of the opposite sex and for reproduction. In the case of the parasitic nematodes of the genus *Contortylenchus*, for example, adult fertilized females, eggs and juvenile stages of both sexes occur in the host haemocoel, while the last moulting and sexual maturation of males and females occur outside the host but in the galleries. Copulation also occurs outside the host and in the galleries, and adult males occur only in the galleries (Rühm 1956; Massey 1974; Siddiqi 2000). In phoretic nematodes, such as those in the genus *Micoletzkyia*, the opposite is true. Most of the development of *Micoletzkyia* spp. occurs in the gallery environment, where the adults reproduce. In the case of *Micoletzkyia* spp., the bark beetles are mostly used by juveniles as transportation to new environments (Massey 1974; Tenkacova and Mituch 1983).

Nematodes were more frequently detected in *I. duplicatus* of the overwintering generation than of the offspring generation. This was true for both phoretic and parasitic (intestinal and haemocoel) nematodes

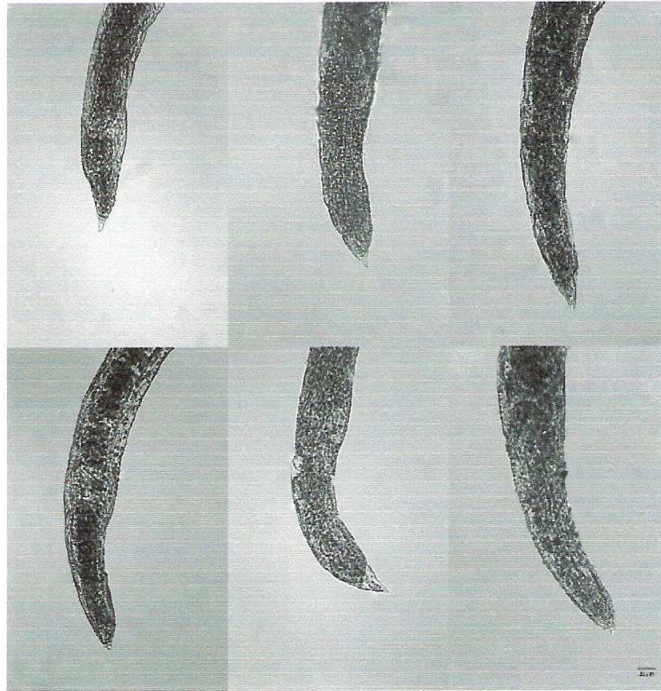


Fig. 4 Tails of *Parasitylenchus* cf. *aculeatus* nematodes found in *Ips duplicatus*. 20× magnification.

(table 2) and is consistent with data reported by Choo et al. (1987) and Tenkacova and Mituch (1983, 1986). Tenkacova and Mituch (1983) also reported that a higher percentage of *I. duplicatus* beetles had nematodes in the overwintering (6.5%) than in the offspring (1.3%) generation. This difference between generations is probably a consequence of beetle behaviour in that overwintering beetles spend long periods in the litter (Holuša et al. 2003), which increases the probability that they will contact nematodes. That the percentage of beetles with nematodes is greater in the overwintering than in offspring generations was also previously indicated for the beetles *I. typographus* and *Orthotomicus laricis* (Fabricius 1792) and the parasitic nematodes belonging to the genera *Parasitylenchus* and *Contortylenchus* (Fabricius 1792). For *Contortylenchus* spp., the values ranged from <10% for the overwintering generation to <1% for the offspring generation. For *Parasitylenchus* spp., the values ranged from <3.5% for the overwintering generation to <0.6% for the offspring generation (Slankis 1972; Tenkacova and Mituch 1980, 1983, 1986, 1987, 1988, 1991).

Nematodes are almost always present in bark beetle galleries. In Slovakia, Tenkacova and Mituch found nematodes in >96% of bark beetle galleries

(Tenkacova and Mituch 1980, 1983, 1986, 1987, 1988, 1991). In our study, 72.0% of the overwintering generation galleries and 88.7% of the offspring generation galleries were nematode positive (80.3% in total). The difference between generations in the number of nematodes in the galleries' frass was significant at Břidličná and Bystřice, which indicates the importance of the local microclimate.

Nematode and bark beetle developmental cycles are synchronized (Rühm 1956; Massey 1974; Thong and Webster 1975). In addition, as bark beetles develop, gallery conditions improve for nematodes, mites, fungi and other organisms associated with bark beetles (Stone and Simpson 1990; Cardoza et al. 2006, 2008; Meirmans et al. 2006). For these reasons, the number of nematodes in the galleries' frass usually increases with bark beetles development. For example, the numbers of mites and nematodes per unit sampling area were positively correlated with the development stage of *I. grandicollis* (Eichhoff) (Stone and Simpson 1990). That nematode numbers increase as bark beetles develop was confirmed at two of the three experimental localities in the current study.

The percentage of beetles with nematodes did not differ between males and females in the current study, which is consistent with previous reports

(Lieutier 1979; Choo et al. 1987). The percentage of beetles with nematodes also did not differ between sexual and asexual populations of *I. acuminatus* (Meir-mans et al. 2006).

In conclusion, the species of nematodes associated with *I. duplicatus* are very similar to those known to be associated with severe pest *I. typographus*. The occurrence of *P. aculeatus*, which was the only species previously known from *I. duplicatus*, was also confirmed. Our findings confirm that the percentage of bivoltine beetles with nematodes is greater in the overwintering than in the offspring generations and that the number of nematodes per gallery increases with bark beetle development.

Acknowledgements

We thank Dr. Zdeněk Mráček, Dr. Matthias Herrmann, Vladislav Susoy and Dr. Václav Čermák for help with nematode identification. This study was supported by Grants IGA 20134325 and CIGA 20124302 from Czech University of Life Sciences in Prague.

References

- Balazy S, 1966. Living organisms regulate population density of bark beetles in spruce forests, with special reference to entomopathogenic fungi. Pr. Kom. Nauk Roln. Kom. Nauk Lesn Poznan. Tow. Przyj. Nauk. 21, 3–48.
- Balazy S, 1968. Analysis of bark beetle mortality in spruce forests in Poland. Ekol. Pol. Ser. A. 16, 657–687.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey J, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK, 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature 392, 71–75.
- Cardoza YJ, Paskewitz S, Raffa KF, 2006. Traveling through time and space on wings of Beetles: a tripartite insect-fungi-nematode association. Symbiosis 41, 71–79.
- Cardoza YJ, Moser JC, Klepzig KD, Raffa KF, 2008. Multipartite symbioses among fungi, mite, nematodes and the spruce beetle *Dendroctonus rufipennis*. Environ. Entomol. 37, 956–963.
- Choo HY, Kaya HK, Shea P, Noffsinger EM, 1987. Ecological study of nematode parasitism in *Ips* beetles from California and Idaho. J. Nematol. 19, 495–502.
- Eyualet A, Blaxter M, 2003. Comparison of biological, molecular and morphological methods of species identification in a set of cultured *Panagrolaimus* isolates. J. Nematol. 35, 119–128.
- Gaugler R, Bilgrami AL, 2004. Nematode behaviour. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Grodzki W, 1997. The ability to control the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* C.R. Sahlb population in the southern Polish. Sylwan 11, 25–36.
- Grodzki W, 2003. The geographical range of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* C.R. Sahlb. (Col.: Scolytidae) in mountain areas of southern Polish. Sylwan 8, 29–36.
- Grucmanova S, Holusa J, 2013. Nematodes associated with bark beetles, with focus on the genus *Ips* (Coleoptera: Scolytinae) in Central Europe. Acta. Zool. Bulgar. 65, 547–556.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95–98.
- Hoffard WH, Coster JE, 1976. Endoparasitic nematodes of *Ips* bark beetles in Eastern Texas. Environ. Entomol. 5, 128–132.
- Holuša J, Zahradnik P, Knizek M, Drapela K, 2003. Seasonal flight activity of the double-spined spruce bark-beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) in Silesia (Czech Republic). Biologia 58, 935–941.
- Holuša J, Grodzki W, Lukasova K, 2010a. Comparison of the effectivity of the pheromone dispensers ID Ecolure, Pheagr IDU and Duplodor to the double-spined spruce bark beetle (*Ips duplicatus*). Sylwan 154, 363–370.
- Holuša J, Lubojacky J, Knizek M, 2010b. Distribution of double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* in the Czech Republic: spreading in 1997–2009. Phytoparasitica 38, 435–443.
- Holuša J, Grodzki W, Lukasova K, Lubojacky J, 2013. Pheromone trapping of the double-spined bark beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae): seasonal variation in abundance. Folia For. Pol. Ser. A. 55, 3–9.
- Hunt DJ, 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomics. CABI, Wallingford, UK.
- Hunt DJ, Hague NGM, 1974. A redescription of *Parasitaphelenchus oldami* Rühm, 1956 (Nematoda: Aphelenchoididae) a parasite of two elm bark beetles: *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus*, together with some notes on its biology. Nematologica 20, 174–180.
- Kaya HK, 1984. Nematode parasites of bark beetle. In: Plant and insect nematodes. Ed. by Nickle WR, Marcel Dekker Inc, New York, 727–754.
- Kaya HK, Stock SP, 1997. Techniques in insect nematology. In: Manual of techniques in insect pathology. Ed. by Lacey LA, Academic Press, New York, 281–324.
- Knizek M, Zahradnik P, 1996. Mass outbreak of *Ips duplicatus* Sahlberg (Coleoptera, Scolytidae). In: XX International Congress of Entomology. August 25–31 1996. Ed. by Doe J, Congress Scientific Committee, Firenze, Italy, 527.
- Lieutier F, 1979. Diptera associated with *Ips typographus* and *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Scolytidae) in Paris area,

- and the changes in their populations during the annual cycle. *Bull. Ecol.* 10, 1–13.
- Lieutier F, 1980. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Boern) (Coleoptera: Scolytidae) by nematodes of the genus *Parasitaphelenchus* Fuchs and relations with parasitism by *Contortylenchus diplogaster* (v Lins). *Rev. Nematol.* 3, 271–281.
- Lieutier F, 1982. Weight variations of adipose tissue and ovaries and variations in the length of oocytes in *Ips sexdentatus* Boern. (Coleoptera: Scolytidae); relation to parasitism by nematodes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 407–418.
- Lieutier F, 1984. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Insecta: Scolytidae) by *Parasitorhabditis ipsophila* (Nematoda: Rhabditidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 507–520.
- Maggenti A, 1981. *General nematology*. Springer-Verlag, New York.
- Massey CL, 1956. Nematode parasites and associates of the Engelmann spruce beetle (*Dendroctonus engelmanni* Hopk.). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 23, 14–24.
- Massey CL, 1960. Nematode parasites and associates of the California five-spined engraver, *Ips confusus* (Lec.). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 27, 42–44.
- Massey CL, 1974. *Biology and taxonomy of nematode parasites and associates of bark beetles in the United States*. US Government Printing office, Washington, DC.
- Meirmans S, Skorping A, Loyning MK, Kirkendall LR, 2006. On the track of the Red Queen: bark beetles, their nematodes, local climate and geographic parthenogenesis. *J. Evol. Biol.* 19, 1939–1947.
- Mracek Z, 1982. The role of nematodes in the biological fight to protect the environment. Study information: protection and development of the environment in agriculture and forestry. 2nd edn. UVTIZ Press, Prague.
- Nedelchev S, Takov D, Pilarska D, 2008. Parasitic and associated nematodes of bark beetles in Bulgaria. *Acta. Zool. Bulgar.* 2, 83–991.
- Nickle WR, 1973. Identification of insect parasitic nematodes – a review. *Exp. Parasitol.* 33, 303–317.
- Poinar GO, 1975. *Entomogenous nematodes*. Brill, Leiden, The Netherlands.
- Pschorn-Walcher H, 1977. Biological control of forest insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22, 1–22.
- Rühm W, 1956. *Die Nematoden der Ipiden*. Parasitologische Schriftenreihe 6, Fischer, Jena.
- Rühm W, 1960. Ein Beitrag zur Nomenklatur und Systematik einiger mit Scolytiden vergesellschafteter Nematodenarten. *Zoologischer Anzeiger Leipzig* 164, 201–213.
- Schlyter F, Anderbrant O, 1993. Competition and niche separation between two bark beetles: existence and mechanisms. *Oikos* 68, 437–447.
- Schlyter F, Zhang QH, Liu GT, Ji LZ, 2001. A successful case of pheromone mass trapping of the bark beetle *Ips duplicatus* in a forest island, analysed by 20-year time-series data. *Integrated Pest Manag. Rev.* 6, 185–196.
- Serrao JE, Rocha-Silva C, Zanuncio JC, Viana-Bailez AMM, 2008. Occurrence of nematodes inside the malpighian tubules of *Hypocryphalus mangiferae* (Stebbing) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Coleopt. Bull.* 62, 344–348.
- Siddiqi MR, 2000. *Tylenchida: parasites of plants and insects*. CABI, Wallingford, UK.
- Slankis AY, 1972. Parasites of bark beetles, *Parasitelenchus dispar* and *P. aculeatus* n.sp. *Nematoda, Sphaerulariidae*. *Zool. Zh.* 51, 1731–1733.
- Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M, 1996. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. CABI, Wallingford, UK.
- Stone C, Simpson JA, 1990. Species associations in *Ips grandicollis* galleries in *Pinus taeda*. *N. Z. J. For. Sci.* 20, 75–96.
- Takov D, Pilarska D, Wegensteiner R, 2006. Entomopathogens in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) from several spruce stands in Bulgaria. *Acta. Zool. Bulgar.* 58, 409–420.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tenkacova I, Mituch J, 1980. Helminthofauna of bark beetles (Scolytidae) from spruce from Mnisek and Hnilcom area, Final report. Helminthological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice.
- Tenkacova I, Mituch J, 1983. Helminthofauna of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Vysoke Tatry mountains area, Final report. Helminthological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice.
- Tenkacova I, Mituch J, 1986. A contribution to the knowledge of nematofauna of Scolytidae bark beetles in norway spruce in forest park in Košice. *Lesn. čas.* 32, 381–387.
- Tenkacova I, Mituch J, 1987. Nematodes new for the fauna of the Czechoslovak Socialist Republic with the affinity to Scolytids (Coleoptera: Scolytidae). *Helminthologia* 24, 281–291.
- Tenkacova I, Mituch J, 1988. Nematofauna of bark beetles (Scolytidae) from silver fir (*Abies alba* Mill.) from Polana area. *Lesn. čas.* 34, 125–131.
- Tenkacova I, Mituch J, 1991. Nematodes of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Tatra National Park. *Zborník prác o Tatranskom národnom parku.* 31, 173–182.
- Thong CHS, Webster JM, 1975. Effects of the bark beetles nematode, *Contortylenchus reversus* on gallery construction, fecundity and egg viability of the douglas fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invertebr. Pathol.* 26, 235–238.
- Vakula J, Brutovsky D, Gubka A, Galko J, Kunca A, 2009. Assessment of monitoring of double-spined

Nematodes of *Ips duplicatus* (Curculionidae)

Š. Grucmanová, J. Holuša and J. Nermut'

- spruce bark beetle *Ips duplicatus* Sahlb. in 2009 in Forests of SVK, s. c. some non-state actors. NLC-LVÚ, Zvolen, Slovakia.
- Weiser J, 1954. Contributions to the knowledge of *Ips typographus* parasites, I. Věstník Československé Zoologické společnosti 19, 217–224.
- Weiser J, Mracek Z, 1988. Parasitic nematodes of the insects. Academia, Prague, (in Czech).
- Zhang QH, Schlyter F, 1995. Distribution, mortality and sex-ratio of overwintering *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in the soil of *Picea koraiensis* reserve in Inner Mongolia, China, with a model of diffusion. In: Behavior, Population Dynamics and Control of Forest Insects. Ed. by Hain FP, Salom S, Ravlin W, Payne TL, Raffa KF, Ohio State University, OARDC, Wooster, OH.
- Zhang QH, Liu GT, Schlyter F, Birgersson G, Anderson P, Valeur P, 2001. Olfactory responses of *Ips duplicatus* from inner Mongolia, China to nonhost leaf and bark volatiles. J. Chem. Ecol. 27, 995–1010.

5.4. *Ips cembrae*

Nematodes associated with *Ips cembrae* (Coleoptera: Curculionidae): comparison of generations, sexes and sampling methods

Šárka Grucmanová, Jaroslav Holuša, Václav Čermák, Jiří Nermut

2014

předpokládaný časopis Journal of Applied Entomology

manuskrip před dopracováním

1 Nematodes associated with *Ips cembrae* (Coleoptera: Curculionidae):
2 comparison of generations, sexes and sampling methods

3 Šárka Grucmanová^{1*}, Jaroslav Holuša¹, Václav Čermák², Jiří Nermut³

4 ¹Department of Forest Protection and Entomology, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of
5 Life Sciences, Kamýcká 1176, Prague 6 – Suchbátka 165 21, Czech Republic, grucmanova@fld.czu.cz,
6 holusa@fld.czu.cz

7 ²Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Šlechtitelů 773/23, Holice, Olomouc, 77900, Czech
8 Republic, v.cermak@ukzuz.cz

9 ³Institute of Entomology, Biology Centre, ASCR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech
10 Republic, Jirka.Nermut@seznam.cz

11

12 **Abstract**

13 A study of nematodes associated with the large larch bark beetle *Ips cembrae* (Heer 1836) was carried out at
14 three locations in the Czech Republic. The proportion of bark beetles with phoretic nematodes ranged from 18 to
15 42.9 %. Phoretic nematodes (genus *Micoletzkyia*) were found under elytra, on wings, and between body segments
16 of the bark beetles. The proportion of beetles infested by endoparasitic nematodes (representatives of genera
17 *Contortylenchus*, *Parasitylenchus*, *Cryptaphelenchus* and *Parasitorhabditis*) ranged from 29.9 to 50.9%.
18 Significant differences were determined in nematode infestation rates level? among locations, generations, and
19 sampling methods. No differences were found in infestation rate between males and females.

20 **Keywords:** *Ips cembrae*, nematodes, phoresy, endoparasitism

21

22 **Introduction**

23 The large larch bark beetle *Ips cembrae* (Heer 1836) (Coleoptera: Curculionidae) is a Euro-Siberian species
24 occurring practically throughout Europe from the lowest elevations to subalpine levels (Postner 1974; Grodzki

25 2008). It is one of 11 known *Ips* species in central Europe. In most of Europe, *I. cembrae* is an indigenous
26 species presenting no particular risk and is a much less important pest than *I. typographus* (EPPO/CABI 1997). *I.*
27 *cembrae* is therefore considered to be a secondary pest of European larch (*Larix decidua* Mill.) stands (Gregoire
28 and Evans 2004). Especially in time of drought, the species is nevertheless able exceptionally to colonize also
29 spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) (Pfeffer 1989; Grucmanova et al. in press). Local gradations of *I. cembrae*
30 have in past years been seen in many places within the Czech Republic (Knizek 2008). Although most *Ips*
31 species are considered serious pests (Pschron-Walcher 1977) and nematodes have been studied as potential
32 biological control agents against insect pests, only a few publications exist concerning nematodes associated
33 with bark beetles in Europe (Rühm 1956, 1960; Balazy 1966, 1968; Tenkacova and Mituch 1986, 1987, 1991;
34 Takov et al. 2006; Nedelchev et al. 2008). The nematodes associated with bark beetles generally use two main
35 life strategies: parasitism and phoresy (Massey 1974; Gaugler and Bilgrami 2004). Phoretic nematode species
36 usually use their hosts as a means of transportation to new environments (Nickle 1973). The nematodes are in
37 this case found mainly on the beetle bodies, most typically between the beetles' body segments, under the elytra,
38 and on the wings. In contrast, parasitic nematodes are found in hosts' body cavities, occurring freely in the
39 haemocoel, intestine, or the Malpighian tubules (Hunt and Hague 1974; Massey 1974; Poinar 1975; Gaugler and
40 Bilgrami 2004; Serrao et al. 2008). Previous studies have focused especially on the effects associated parasitic
41 nematodes on the lives of bark beetles. It is known that they can influence bark beetle populations (Rühm 1956;
42 Massey 1974; Thong and Webster 1975; Weiser and Mracek 1988) by changing host behaviour, decreasing host
43 fertility via reducing the number of eggs laid by as much as 40 %, and reducing the number of generations per
44 year (Massey 1974; Lieutier 1984). The nematodes can also affect survival and flight activity and delay bark
45 beetle swarming (e.g. Massey 1956, 1960; Hoffard and Coster 1976; Kaya 1984, Forsse 1987). Members of the
46 nematode genera *Parasitylenchus* and *Contortylenchus* parasitizing *Ips* bark beetles in central Europe
47 (Grucmanova and Holusa 2013) reduce the size of fat bodies and ovaries and hamper the development of
48 terminal oocytes in *I. sexdentatus* (Lieutier 1982).

49 Even though *I. cembrae* is an important pest, we have only fragmentary knowledge of the nematode
50 associated with it. The main goals of the present work, therefore, were to

51 1) identify the nematodes associated with *I. cembrae*,

52 2) compare the prevalence of nematodes in beetles among the overwintering and offspring generations and
53 sexes using various sampling methods

54

55 **Methods**

56 **Sampling**

57 At each of three study locations within the Czech Republic – Hradec nad Moravicí (49° 51' 28.37" N, 17° 57'
58 56.07" E, 450 m a.s.l.), Pežgovský les near Havířov town (49° 48' 40.40" N, 18° 24' 16.94" E, 290 m a.s.l.), and
59 Kostelec nad Černými lesy (49° 59' 1.90" N, 14° 48' 29.53" E, 420 m a.s.l.) – five traps with Cembrowit
60 pheromone dispensers (Witasek Pflanzenschutz, Austria) were installed in April and regularly emptied at 7 – 10
61 day intervals until September.

62 At the Hradec nad Moravicí location, a trap tree baited with a Cembrowit pheromone dispenser was prepared
63 in April and July. Each month, 500 individuals of *I. cembrae* were collected by debarking. Beetles acquired in
64 this way were placed individually in closable Eppendorf tubes, then stored in a refrigerator at about 7 °C. The
65 maternal and larval galleries frass was collected using a dissecting needle and brush, placed into a sealable
66 plastic bag, then stored in a refrigerator at about 7 °C.

67

68 **Processing of samples**

69 In the laboratory, the individual beetles were examined using a magnifying glass or microscope (Arsenal SZP
70 1102 T Zoom, Arsenal LPE 5013i) and presence of phoretic nematodes and mites on the individual body parts
71 (elytra, wings, thorax, abdomen) was recorded. The beetles were subsequently dissected, and the presence and
72 location of parasitic nematodes (i.e. those nematodes in the haemocoel, intestine, and Malpighian tubules) were
73 recorded.

74 Nematodes were extracted from gallery frass in Baermann funnels, which is a funnel equipped with a rubber
75 tube upon which a clamp is placed. The funnel was filled with distilled water into which several drops of

76 hydrogen peroxide were added as an oxygen source for the live nematodes. The content of the galleries under
77 investigation was placed into soft fabric or a single layer of paper tissue, closed with a rubber band, submerged
78 in the water in the funnel, and left overnight. The nematodes passed through the layer of fabric or paper from the
79 material under investigation into the water and accumulated in the rubber tube just above the clamp. The next
80 day, settled nematodes were collected by releasing the clamp and allowing several drops of sediment to fall onto
81 watch glasses. After the nematodes were counted, they were put into an Eppendorf tube with a drop of distilled
82 water and then the tube was filled with hot (60 - 70°C) TAF fixative (a mixture of formaldehyde,
83 triethanolamine, and distilled water) and left until the following day. The solution was then replaced by a new,
84 cold one. Nematodes were identified to species or genus according to Rühm (1956), Hunt (1993), and Andrassy
85 (2007). Some of the fixed nematodes were transferred into glycerol (Kaya and Stock 1997). These were mounted
86 as permanent specimens on microscope slides, the glass covers of which were sealed with a mixture of paraffin
87 and beeswax. Other nematodes were preserved in ethanol (70%) and subjected to DNA analysis as described
88 below.

89 We compared the percentages of beetles infested with nematodes and mites between beetle sexes, among
90 locations, and between the overwintering and offspring generations. The sample unit was defined as beetles
91 obtained from each infested tree or each Theysohn trap. MS Excel was used for data processing, and the R
92 program for statistical testing. The Kruskal–Wallis test, chi-squared test, Wilcoxon test, and Pearson's
93 correlation coefficient were used while the significance level was defined as $\alpha = 0.05$.

94

95 DNA analysis

96 For DNA analysis, the nematodes were first transferred into sterile water on watch glasses, which were placed in
97 Petri dishes with filter paper and sterile water and left in a refrigerator overnight. DNA was then extracted from
98 the nematodes. An individual nematode was transferred into a sterile Eppendorf tube (200 μ l) with 20 μ l of
99 extracting buffer (17.7 μ l ddH₂O, 2 μ l 10 \times PCR buffer with MgCl₂, 0.2 μ l 1% Tween 20, and 0.1 μ l proteinase K
100 100 μ g/ml). The nematode in the buffer was frozen at -20°C for 20 min and then immediately incubated at 65°C
101 for 1 h, followed by 10 min at 95°C. The lysates were then cooled on ice and centrifuged (2 min, 11,600 rpm,
102 using an Eppendorf MiniSpin plus). Next, 1 μ l of the supernatant was taken for polymerase chain reaction

103 (PCR). We used the segment of the small and large subunit ribosomal RNA (SSU and LSU) genes. A fragment
104 of rRNA containing internal transcribed spacer (ITS1, 5.8 S, ITS2) was amplified using primers SSU 18 A
105 AAAGATTAAGCCATGCATG sense (Blaxter et al. 1998) and expansion fragments of the 28S ribosomal RNA
106 genes by D 2 A ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG (Subbotin et al. 2006). The PCR master mix consisted
107 of 7.25 μ l ddH₂O, 1.25 μ l 10 \times PCR buffer with MgCl₂, 1 μ l dNTPs 2.5 mM, 0.75 μ l of each primer 10 pmol/ μ l,
108 0.1 μ l Taq DNA polymerase 5 U/ μ l, and 1 μ l DNA extract. The PCR conditions for SSU 18 A primer were: 94°C
109 for 5 min; followed by 35 cycles at 94°C for 60 s, 52°C for 90 s, and 68°C for 2 min; and a final extension at
110 68°C for 10 min (Eyuaem and Blaxter 2003). PCR conditions for the D2A primer were as follow: 4 min at
111 94°C; 35 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 55°C and 2 min at 72°C; followed by a final step of 10 min at 72°C.
112 PCR was followed by electrophoresis (40 min, 120 V) of 2 μ l of PCR product in a 1% TAE buffered agarose gel
113 that was stained with ethidium bromide (20 μ l ETB 10 mg/ml per 100 ml of gel). The purified PCR product was
114 sent to a sequencing service (Seq Me, Czech Republic). The sequences were compared with those in GenBank
115 using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information.
116 An alignment of our samples together with representative sequences of all different but similar species found in
117 GenBank was produced for each amplified DNA region using ClustalW parameters in Mega 5.05 (Tamura et al.
118 2011) and then optimized manually in Bio Edit (Hall 1999). Pairwise distances were computed using MEGA
119 (Tamura et al. 2011).

120

121 Results

122 In total, 5,229 *I. cembrae* individuals were processed. At the Hradec nad Moravicí location, 45.4 % of the
123 examined beetles from traps were nematode positive. At the Kostelec nad Černými lesy and Havířov locations,
124 respectively, 52.3 % and 64.9 % of all examined individuals were positive (Table 1). Nematode presence in
125 beetles differed significantly across locations, both for phoretic nematodes (nematodes between body segments,
126 on wings and under elytra) (Kruskal–Wallis: $df = 2$; $P < 0.001$; $\chi^2 = 18.98$) and for endoparasitic nematodes
127 (nematodes in the haemocoel and intestine) (Kruskal–Wallis: $df = 2$; $P = 0.004$; $\chi^2 = 10.93$). Males and females
128 did not differ significantly by infestation levels at any of the locations (Figs. 1 - 2).

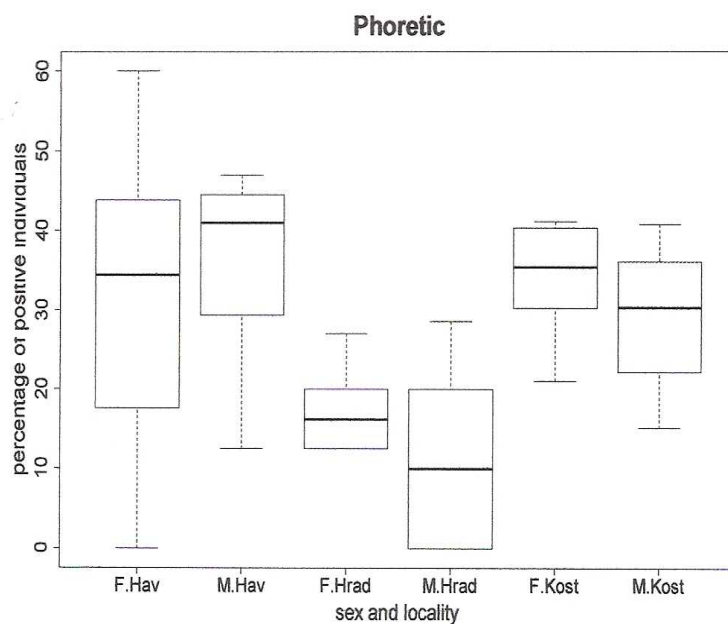
129

130 **Table 1** Percentages of *Ips cembrae* beetles with nematodes and mites as affected by location, beetle sex (M =
 131 males, F = females) and infestation site (Phor = phoretic nematodes found on the body, Hem = freely in the
 132 haemocoel, Int = intestinal nematodes, Endo = total parasitic nematodes [i.e. nematodes detected in the
 133 intestines or haemocoel],)

Location	Sex	Phor	Hem	Int	Endo	Total	Mites
Haviřov	F	37.5	13.3	40.2	46.0	63.3	21.0
Haviřov	M	42.9	15.3	41.9	50.9	66.8	24.1
Haviřov	Sum	39.9	14.2	41.0	48.2	64.9	22.4
Hradec	F	21.6	10.4	24.8	33.6	47.2	14.4
Hradec	M	13.0	13.0	20.3	33.3	42.0	18.8
Hradec	Sum	18.6	11.3	23.2	33.5	45.4	16.0
Kostelec	F	34.5	6.8	25.1	29.9	52.8	10.6
Kostelec	M	30.5	6.3	29.4	33.6	51.5	16.8
Kostelec	Sum	32.9	6.6	26.8	31.4	52.3	13.1

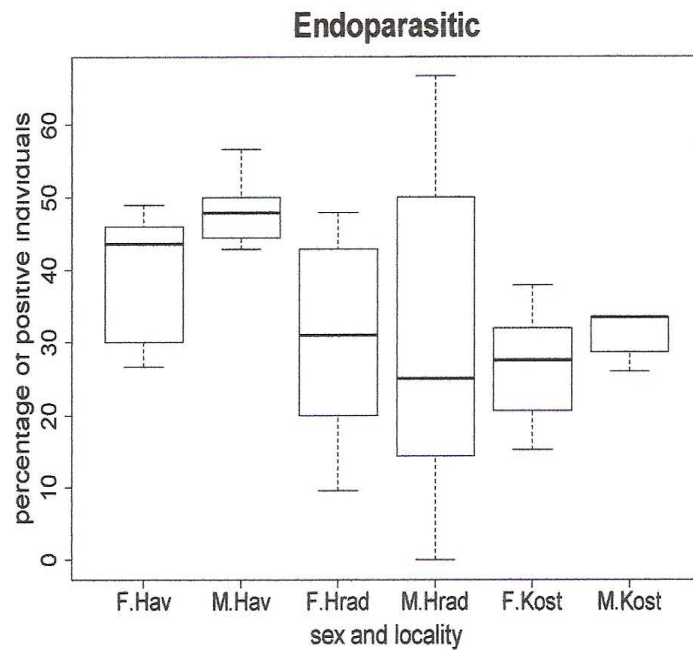
134

135



136

137 **Fig. 1** Percentages of *Ips cembrae* infested by phoretic nematodes according to sex (M = males, F = females) and
 138 location (Hav = Haviřov, Hrad = Hradec nad Moravicí, Kost = Kostelec nad Černými lesy). The differences
 139 among locations were significant (Kruskal–Wallis: $df = 2$, $P < 0.001$, $\chi^2 = 18.99$).



140

141 Fig. 2 Percentages of *Ips cembrae* infested with endoparasitic (haemocoel + intestine) nematodes according to
 142 sex (M = males; F = females) and location (Hav = Havířov, Hrad = Hradec nad Moravicí, Kost = Kostelec nad
 143 Černými lesy). The differences among locations were significant (Kruskal–Wallis: $df = 2$, $P = 0.004$, $\chi^2 = 10.93$).

144

145 Nematode infestation site differed significantly between beetles acquired by different sampling methods only
 146 for nematodes found freely in the haemocoel ($W = 0$, $P = 0.029$). These values were always higher for
 147 individuals from trees than for those from traps (Table 2).

148 Infestation by nematodes differed significantly between beetles of the overwintering and offspring
 149 generations sampled from trees ($\chi^2 = 9.78$, $df = 2$, $P = 0.007$). Infestation by phoretic nematodes was higher in
 150 beetles from the overwintering generation, while endoparasitic nematodes were more frequently recorded in bark
 151 beetles from the offspring generation (Table 2).

152

153 **Table 2** Percentages of *Ips cembrae* with nematodes and mites according to generation, sex and sampling
 154 method. Phor = phoretic nematodes found on the body , Hem = freely in the haemocoel, Int = intestinal
 155 nematodes, Endo = total parasitic nematodes (i.e. nematodes detected in the intestines or haemocoel)

Generation	Sex	Method	Phor	Hem	Int	Endo	Total	Mites
overwintering	female	tree	42.8	19.5	18.4	29.8	58.3	0.8
overwintering	female	trap	20.8	4.2	25.0	25.0	41.7	8.3
overwintering	male	tree	21.4	20.6	17.6	29.0	42.0	0.0
overwintering	male	trap	8.3	16.7	25.0	41.7	41.7	8.3
overwintering	sum	tree	37.2	19.8	18.2	29.6	54.0	0.6
overwintering	sum	trap	16.7	8.3	25.0	30.6	41.7	8.3
offspring	female	tree	28.7	24.8	42.8	56.6	68.2	8.3
offspring	female	trap	21.8	11.9	24.8	35.6	48.5	15.8
offspring	male	tree	16.2	24.3	39.9	56.1	59.5	7.5
offspring	male	trap	14.0	12.3	19.3	31.6	42.1	21.1
offspring	sum	tree	24.4	24.6	41.8	56.4	65.2	8.0
offspring	sum	trap	19.0	12.0	22.8	34.2	46.2	17.7

156

157 Nematodes of the genus *Micoletzkyia* were found under elytra, on wings, on thoracic and abdominal tergites
 158 and between body segments (especially between the thorax and abdomen) of *I. cembrae* in groups of dozens of
 159 individuals. Our *Micoletzkyia* nucleotide sequence (KM245036) is identical to the sequence JX163973 in
 160 GenBank (identity = 100%), which sequence was from nematodes acquired from *I. cembrae* in Germany (Susoy
 161 and Herrmann 2014).

162 The nematode *Contortylenchus diplogaster* (v. Linstow 1890) (Ruhm 1956) was found in the haemocoel
 163 (Fig. 3) as adult females (1 - 5 individuals) and large numbers of juveniles and eggs (up to 2000 individuals).
 164 The nematode *Parasitylenchus dispar* (Fuchs 1915) was also found in haemocoel (Fig. 4), in this case with large
 165 numbers of adult females (up to 34 individuals) and also up to 2000 juveniles and males. In seven cases, both of
 166 the aforementioned genera occurred simultaneously in the haemocoel of a single *I. cembrae*. Our
 167 *Contortylenchus* and *Parasitylenchus* nucleotide sequences (KM245035 and KM245038, respectively) are
 168 identical to the sequences DQ 328731.1 (identity = 99%) and DQ 328729.1 (identity = 100%), respectively, in
 169 GenBank. Nematodes of *Cryptaphelenchus* genus which were not further determined, but probably were *C.*
 170 *macrogaster* (Fuchs 1937), also were present and had previously been recorded also in other bark beetles of the
 171 same genus (Grucmanova and Holusa 2013).

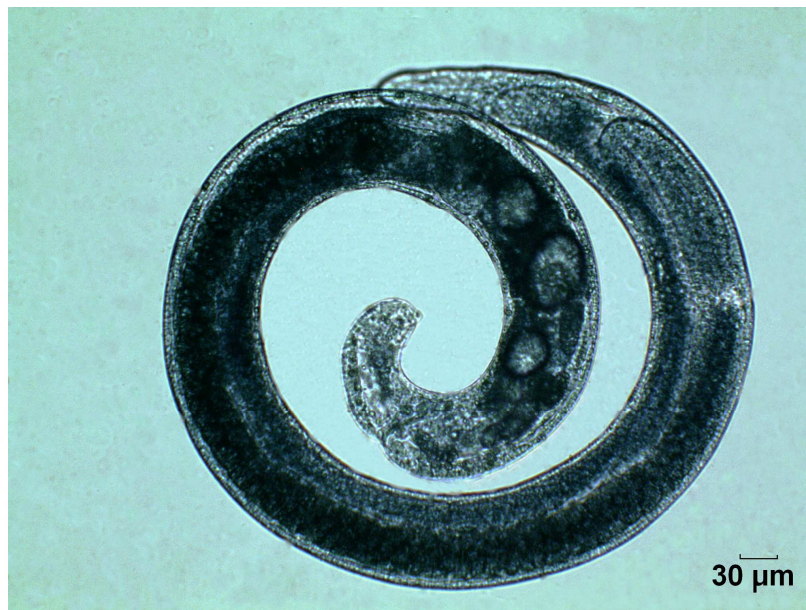
172 In the intestine of *I. cembrae*, there were found juveniles of the nematodes *Parasitorhabditis obtusa* and the
 173 aforementioned genera *Contortylenchus* and *Parasitylenchus*, whose adults and juveniles, and in the case of
 174 *Contortylenchus* also eggs, were found in the haemocoel of this bark beetle species. Our *P. obtusa* nucleotide
 175 sequence (KM245037) is identical to the sequence EU003189 in GenBank (identity =100%).

176 Adult and juvenile nematodes of genera *Parasitorhabditis*, *Micoletzkyia*, *Cryptaphelenchus*, *Bursaphelenchus*
 177 and *Laimaphelenchus* were found in the galleries of *I. cembrae* as well as tylenchid juveniles. In this case, these
 178 are probably also the aforementioned *Contortylenchus* and *Parasitylenchus* species (Table 3).

179

180 **Table 3** Frequency (%) at which nematode species were detected in *Ips cembrae* in relation to location (Hav =
 181 Havířov, Hrad = Hradec nad Moravicí, Kost = Kostelec nad Černými lesy). Asterisk (*) indicates that the
 182 frequency in gallery frass was not recorded

Nematode	Location	Hav	Hrad	Kost	Total
<i>Contortylenchus diplogaster</i> (v. Linstow, 1890) Ruhm, 1956	haemocoel	12.8	9.8	5.9	9.8
<i>Parasitylenchus dispar</i> (Fuchs, 1915)	haemocoel	1.3	1.0	0.4	1.0
<i>Parasitorhabditis obtusa</i> (Fuchs, 1915)	intestine	23.2	40.9	26.8	35.1
<i>Micoletzkyia cf. buetschlii</i> (Fuchs, 1915)	body surface	39.9	18.6	32.9	36.4
<i>Cryptaphelenchus cf. macrogaster</i> (Fuchs, 1937)	haemocoel	0.2	0.5	0.1	0.2
<i>Cryptaphelenchus cf. macrogaster</i> (Fuchs, 1937)	gallery frass	*	*	*	*
<i>Bursaphelenchus</i> sp.	gallery frass	*	*	*	*
<i>Laimaphelenchus</i> sp.	gallery frass	*	*	*	*



183

184 Fig. 3 Adult female *Contortylenchus diplogaster* found in the haemocoel of *Ips cembrae*.



185

186 Fig. 4 *Parasitylenchus dispar* females found in the haemocoel.

187 Relationships between the presence of phoretic nematodes and mites were also evaluated. Infestation by
188 phoretic nematodes positively correlated with the presence of mites under elytra ($t = 2.26$, $df = 57$, $P = 0.03$, $r =$
189 0.29).

190 **Table 4** Mean and maximum (max) numbers of mites found on the bodies of *Ips cembrae* according to location
 191 (Hradec ov – Hradec nad Moravicí location, overwintering generation; Hradec off – Hradec nad Moravicí
 192 location, offspring generation) and beetle collection methods (trap – pheromone trap, tree – tree trap)

Location	Method	Mean	SE	Max
Haviřov	trap	0.7	1.8	13
Kostelec	trap	0.4	1.5	15
Hradec	trap	0.5	1.7	17
Hradec ov	tree	0.0	0.5	10
Hradec off	tree	0.2	1.1	15

193

194 **Table 5** Mean and maximum (max) number of phoretic nematodes found on *Ips cembrae* according to location
 195 (Hradec ov – Hradec nad Moravicí location, overwintering generation; Hradec off – Hradec nad Moravicí
 196 location, offspring generation) and beetle collection methods (trap – pheromone trap, tree – tree trap)

Location	Method	Mean	SE	Max
Haviřov	trap	10.0	18.5	120
Kostelec	trap	6.5	13.7	130
Hradec	trap	3.8	11.3	100
Hradec ov	tree	8.8	15.0	70
Hradec off	tree	5.2	13.4	110

197

198

199 Discussion

200 Nematodes associated with *Ips cembrae* are very similar to those associated with *I. typographus* and *I.*
 201 *duplicatus* (see Grucmanova and Holusa 2013, 2014), perhaps as a result of the similarity or absolute
 202 equivalence of the host trees (Pfeffer 1989). Transportation of the same nematode species by the bark beetle
 203 *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus 1761), which naturally occurs on spruce, larch and pine, is also considered
 204 as a possibility (Pfeffer 1989; Lieutier et al 2004).

205 The nematodes *Contortylenchus diplogaster*, *Parasitylenchus dispar* and *Cryptaphelenchus* sp. were found in
 206 the haemocoel of *I. cembrae*. These nematode species have been found in the haemocoel, intestines and

207 Malpighian tubules (*Cryptaphelenchus*) of other *Ips* bark beetles, including *I. acuminatus* (Gyllenhal 1827), *I.*
208 *amitinus* (Eichhoff 1871), *I. cembrae* (Heer 1836), *I. sexdentatus* (Borner 1776), and *I. typographus* (see
209 Grucmanova and Holusa 2013). Specifically, *C. diplogaster*, which was the species most frequently found in the
210 haemocoel during the current study, has also been associated with *I. cembrae*, *I. duplicatus*, *I. sexdentatus* and *I.*
211 *typographus* (Rühm 1956; Balazy 1966, 1968; Tenkacova and Mituch 1986, 1991; Grucmanova et al 2014). It is
212 known that the haemocoel of individual beetles can be simultaneously infested with more than one genus of
213 parasitic nematode (Massey 1974; Lieutier 1980; Choo et al. 1987). This fact was also confirmed in the current
214 study, where *Contortylenchus* and *Parasitylenchus* species were found simultaneously in seven *I. cembrae*
215 individuals.

216 *Parasitorhabditis obtusa* was found in *I. cembrae* intestines and frass from galleries in the current study. This
217 is one of the nematode species most commonly found in bark beetles of genus *Ips*. This species had previously
218 been found in the frass of galleries and intestines of *I. cembrae*, *I. typographus* and *I. duplicatus* (e.g. Rühm
219 1956; Tenkacova and Mituch 1986; Weiser and Mracek 1988; Grucmanova et al. 2014). Other *Parasitorhabditis*
220 species, including *I. acuminatus* and *I. amitinus*, have been found also in other *Ips* species (Grucmanova and
221 Holusa 2013).

222 *Micoletzkyia* juveniles were found in clusters of up to 130 individuals under the elytra, on the wings and
223 between body segments of *I. cembrae*. This species is a typical phoretic nematode which uses the bark beetle to
224 colonize new environments. It is known that as many as 70 % of beetles in a population may have juveniles of
225 this species under their elytra (Rühm 1956). In our case, up to 42.9 % of individuals had phoretic nematode
226 juveniles under their elytra (Table 2). Our sequence acquired from *I. cembrae* matches the sequence of
227 *Micoletzkyia* sp. from *I. cembrae* in Germany, where crosses between *M. buetschlii* and *Micoletzkyia* sp. acquired
228 from *I. cembrae* resulted in fertile offspring, thus indicating that they might belong to the same biological
229 species. The nematodes of *Micoletzkyia* have intimate, stable and highly specific associations with their hosts
230 (Susoy and Herrmann 2014). The association of *Micoletzkyia buetschlii* with *I. cembrae* as well as with *I.*
231 *typographus*, *I. duplicatus* and *I. amitinus* has been described in previous works (Weiser 1954; Rühm 1956;
232 Tenkacova and Mituch 1983, 1986, 1991; Grucmanova et al. 2014; Susoy and Herrmann 2014). Nematodes of
233 the buetschlii clade are exclusively associated with the members of the *Ips* genus and their close relatives,
234 beetles of genus *Orthotomicus* (Susoy and Herrmann 2014).

235 We found the nematodes *P. obtusa*, *M. cf. buetschlii*, *Cryptaphelenchus* sp., *Bursaphelenchus* sp. and
236 *Laimaphelenchus* sp. in the frass of galleries from *I. cembrae*. This fully corresponds with reports that
237 *Parasitorhabditis*, *Cryptaphelenchus* and *Micoletzkyia* species are the most dominant nematodes in gallery frass
238 (Tenkacova and Mituch 1980, 1986, 1991; Grucmanova et al. 2014). *Cryptaphelenchus* is common in galleries
239 of *I. typographus*, *I. duplicatus* and *I. cembrae* (being the most dominant species, second only to *P. obtusa*) and
240 in the joints between the head and thorax of the beetles (Tenkacova and Mituch 1980, 1983, 1986, 1991;
241 Grucmanova et al. 2014). In our case, the species was probably *C. macrogaster*, which is known from Germany
242 and Slovakia to infest haemocoel, intestines and body surfaces of *I. cembrae* and *I. typographus* (Grucmanova
243 and Holusa 2013).

244 Those representatives found of genera *Laimaphelenchus* and *Bursaphelenchus* were not further
245 determined. The genus *Laimaphelenchus* is, however, described as part of the nematode bark and wood
246 community, and *Laimaphelenchus* species have been described on every continent (Hunt 1993; Swart 1997;
247 Peneva and Chipev 1999). Across the world, 14 species of this genus have been described. Three species exist in
248 Europe: *Laimaphelenchus pamocaudus* (Massey 1966), *L. vescus* (Truskova and Eroshenko 1977), and *L.*
249 *penardi* (Steiner 1914) (Filipjev and Schuurmans Stekhoven 1941)) (Andrássy 2007). These are mostly found
250 associated with moss, algae and lichen on trees, particularly conifers, and also in tunnels of wood borers (Hunt
251 1993), but their association with *I. cembrae* in central Europe has not heretofore been described. Only *L. penardi*
252 is known from the American species *Ips confusus* (LeConte) (Massey 1960). In reference to those
253 *Bursaphelenchus* representatives found, an association in central Europe of *B. eidmanni* (Ruhm 1956) with *I.*
254 *amitinus* and *I. typographus* is known, as is one of *B. sexdentati* (Ruhm 1960) with *I. sexdentatus* (Rühm 1956;
255 T01960; Tenkacova and Mituch 1986, 1987, 1991). In addition to the species stated above, tylenchid juveniles
256 that could not be further identified were found also in the gallery frass, but these were probably *C. diplogaster*
257 and *P. dispar*, whose adults were identified in the beetles.

258 The presence of parasitic and phoretic nematodes in association with *I. cembrae* differed significantly
259 among the three locations. Nematodes associated with insects are thought to be influenced more by local
260 microclimate than by general climatic conditions, and the local microclimate depends in part on elevation (e.g.
261 Rühm 1956; Choo et al. 1987; Meirmans 2006). The microclimate in the galleries is influenced by various
262 factors. The most important of these is the amount of sunlight striking the tree trunk (Rühm 1956; Meirmans et

263 al. 2006), which very much affects the humidity of the substrate in which the nematodes live. Nematodes are
264 primarily water organisms and are mostly very sensitive even to short-term drying of their environment. Their
265 habitat is always wet, and they depend on thin water films within which they live and move (Massey 1974;
266 Dropkin 1980; Neher 2000). Because all those nematode genera detected develop within bark beetle galleries for
267 at least a certain time, the local microclimate is especially important for nematodes when they occur outside of
268 the host body (Rühm 1956; Tenkacova and Mituch 1980; Meirmans et al. 2006).

269 In evaluating the differences in nematode infestation between beetles acquired by the different methods
270 (Theysohn pheromone traps versus tree traps), a significant difference was found only for nematodes found
271 freely within the haemocoel. In that case, the nematode counts in bark beetles from tree traps were higher than
272 those in bark beetles from Theysohn pheromone traps. Theoretically, the numbers within the material from
273 pheromone traps could be understated. In the case of a pheromone trap 25 m from an infested tree, only 20 - 54%
274 of the catch would likely be from the local population (Weslien and Lindelow 1990; Nemeč et al. 1993; Duelli et
275 al. 1997). Based on an analysis of the beetles' fat bodies, Nemeč et al. (1993) suggested that at most just one-
276 third of the trapped beetles had come from local populations, as their fat bodies were large. The rest of the *I.*
277 *typographus* beetles, with more developed muscle tissue, must have flown longer distances. In our study, too, we
278 determined that there were significant differences in haemocoel infestations between locations, so some of the
279 beetles in the traps might have come from locations with lower infestations.

280

281 On the other hand, nematodes can also influence flight activity (e.g. Massey 1956, 1960; Hoffard and Coster
282 1976; Kaya 1984). Although flight of *I. typographus* is thought to be little affected by the endoparasitic
283 nematodes *C. diplogaster* and *P. dispar* (Forsse 1987), nematodes developing inside the beetle do deprive the
284 host of nutrients. This is indicated by the fact that the number of fat cells decreases in infested bark beetles
285 (Nickle 1963; Thong and Webster 1973; Lieutier 1982). Depletion of nutrients (especially proteins) has been
286 confirmed by changes in the composition of the haemolymph caused by the development of a fertilized female
287 from either of two *Contortylenchus* species in bark beetle haemocoel (Thong, Webster 1972, 1975). An ideal
288 nematode parasite should not impede the flight of its host, however, because doing so increases its risk of not
289 reaching a new tree and the new environment that is necessary for its successful development. Nematode
290 infection also has been reported to cause pathological changes in flight muscle structure of *Scolytus ventralis*
291 (LeConte 1868) (Aschraf et al. 1970), but these changes may have been caused by natural degradation (Forsse
292 1987),

293 Assessing infestation differences between the spring and summer generations is problematic, because it is
294 difficult to discern the end of the flight activity of beetles from the overwintering generation. It is typical for *I.*
295 *cembrae* that individuals are captured practically through the entire season from the start of swarming in April or
296 May. Its flight activity generally does not display obvious swarming peaks (Holusa et al. 2014). Therefore, the
297 differences between the overwintering and offspring generations were assessed only for beetles from tree traps,
298 where the collections were sufficiently separated in time. A significant difference was recorded between the
299 overwintering and offspring generations. Infestation by phoretic nematodes was higher in beetles from the
300 overwintering generation, while endoparasitic nematodes were more frequently recorded in bark beetles from the
301 offspring generation. The determined significant difference corresponds with data from other studies. In most
302 publications, infestation by both phoretic and endoparasitic nematodes is higher for the overwintering generation
303 (e.g. Slankis 1972; Tenkacova and Mituch 1980, 1983, 1986, 1987, 1988, 1991; Choo and Kaya 1987;
304 Grucmanova et al. 2014). The higher nematodes infestation found in the haemocoel of bark beetles in our study
305 can then support the assumed influence of the local microclimate on nematodes.

306 The percentage of beetles with nematodes did not differ between males and females in this study. This is
307 fully consistent with known data from the related species *I. duplicatus* (Grucmanova et al. 2014) and from other
308 previous reports (Lieutier 1979; Choo et al. 1987).

309 In addition to nematodes, mites are also closely associated with bark beetles. Members of the orders
310 Mesostigmata, Astigmata, Oribatida and Prostigmata are typical representatives of mites associated with bark
311 beetles of the genus *Ips*. Five species of mites are known for *I. cembrae* (Kielczewski and Wisniewski 1983).
312 Some of them are also known phoretics and were found, just like nematodes, on the bodies and under elytra of
313 the studied species. Certain publications also document mites hunting nematodes (Massey 1962; Krantz 1965;
314 Kinn 1967 and 1971). For example, the phoretic representatives of the Mesostigmata genera *Dendrolaelaps*,
315 *Trichouropoda*, and others most frequently feed on nematodes occurring together with beetles in their galleries
316 or on their bodies (Kielczewski and Wisniewski 1983; Cejka and Holusa 2013). The determined positive
317 correlation between the number of beetles with phoretic nematodes and with mites documents a simple
318 relationship that as the gallery develops a favourable environment arises for the reproduction of all the associated
319 organisms. Stone and Simpson (1990), for another example, found the numbers of mites and nematodes per unit
320 sampling area to be positively correlated with the development stage of *Ips grandicollis* (Eichhoff), and a similar
321 trend has been recorded also in the case of *I. duplicatus* (Grucmanova et al. 2014). The finding of mites more

322 frequently on beetles from traps only serves to document the phoretic relationships between bark beetles and
323 certain mites.

324 The acquired results correspond fully with the known narrow specialization and specificity of bark beetle
325 nematodes, and in particular of such parasitic genera as *Parasitylenchus* and *Contortylenchus* (Mracek 1982).
326 The findings support the conclusion that host-switching is very common among parasitic and pathogenic
327 nematodes (Pozio et al. 2009; Hasegawa et al. 2010; Laetsch et al. 2012; McFrederick et al. 2013; Susoy and
328 Herrmann 2014).

329 In conclusion, the spectrum of nematodes associated with *I. cembrae* is very similar to the list of species
330 known to be associated with the severe pest *I. typographus*. Our findings confirm differences in infestation rates
331 between the overwintering and offspring bark beetle generations and that there are no differences in infestation
332 rates between males and females.

333

334 **Acknowledgments**

335 This study was supported by grant B0118/004 from the Internal Grant Agency of Czech University of Life
336 Sciences Prague.

337

338 **References**

- 339 Andrassy I, 2007. Free-living nematodes of Hungary, II. (Nematoda errantia), 4. In: Pedozoologica Hungarica.
340 Ed. by Csuzdi C, Mahunka S, Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary 496.
- 341 Ashraf M, Berryman AA, 1970. Biology of *Sulphuretylenchus elongatus* (Nematoda: Spaerulariidae) and its
342 effect on its host *Scolytus ventralis* (Coleoptera: Scolytidae). Canadian Entomologist. 102, 197-213.
- 343 Balazy S, 1966. Living organisms regulate population density of bark beetles in spruce forests, with special
344 reference to entomopathogenic fungi. Pr. Kom. Nauk Roln. Kom. Nauk Lesn., Poznan. Tow. Przyj. Nauk. 21(1),
345 3-48.
- 346 Balazy S, 1968. Analysis of bark beetle mortality in spruce forests in Poland. Ekol. Pol., Seria A. 16(33), 657-
347 687.

- 348 Blaxter ML, De Ley P, Garey J, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris
 349 M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK, 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda.
 350 Nature. 392, 71-75.
- 351 Cejka M, Holusa J, 2013. Roztoči řádu Mesostigmata u kůrovců (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) –
 352 Review. ZLV, 58(4), 353-359.
- 353 Choo HY, Kaya HK, Shea P, Noffsinger EM, 1987. Ecological study of nematode parasitism in *Ips* beetles from
 354 California and Idaho. J. Nematol. 19(9), 495-502.
- 355 Dropkin V, 1980. Introduction to Plant Nematology. John Willey and Sons, New York, NY, 38-44, 242-246.
 356 256.
- 357 Duelli P, Zahradnik P, Knizek M, Kalinová B, 1997. Migration in spruce bark beetles (*Ips typographus* L.) and
 358 the efficiency of pheromone traps. J. Appl. Entomol. 121, 297-303.
- 359 EPPO/CABI, 1997. *Ips typographus*. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn. CAB International, Wallingford,
 360 UK.
- 361 Eyuaem A, Blaxter M, 2003. Comparison of biological, molecular and morphological methods of species
 362 identification in a set of cultured *Panagrolaimus* isolates. J. Nematol. 35, 119-128.
- 363 Forse E, 1987. Flight duration in *Ips typographus* L.: Insensitivity to nematode infection. J. Appl. Entomol. 104,
 364 326-328.
- 365 Gaugler R, Bilgrami AL, 2004. Nematode Behaviour. CABI Publishing, UK.
- 366 Gregoire J, Evans HF, 2004. Damage and control of BAWBILT organisms – an overview. In: Bark and Wood
 367 Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. Ed. by Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire, JC,
 368 Evans HF, Dordrecht, Kluwer Academic, 19-37.
- 369 Grodzki W, 2008. *Ips cembrae* Heer. (Col.: Curculionidae, Scolytinae) in young larch stands - a new problem in
 370 Poland. Forstschutz Aktuell. 44, 8-9.
- 371 Grucmanova S, Holusa J, 2013. Nematodes Associated with Bark Beetles, with Focus on the Genus *Ips*
 372 (Coleoptera: Scolytinae) in Central Europe. Acta Zool. Bulg. 65(4), 547-556.
- 373 Grucmanova S, Holusa J, Nermut J, in press. Nematodes associated with the double-spined bark beetle *Ips*
 374 *duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae) in central Europe. J. Appl. Entomol, DOI: 10.1111/jen.12142.
- 375 Grucmanova S, Holusa J, Trombik J, Lukasova K in press. *Ips cembrae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)
 376 in the Czech Republic: analysis of population development and pheromone traps samples.

- 377 Hasegawa H, Sato H, Fujita S, Nguema PPM, Nobusue K, Miyagi K, Kooriyama T, Takenoshita Y, Noda S,
 378 Sato A, Morimoto A, Ikeda Y, Nishida T, 2010. Molecular identification of the causative agent of human
 379 strongyloidiasis acquired in Tanzania: dispersal and diversity of *Strongyloides* spp. and their hosts. *Parasitol.*
 380 *Int.* 59, 407-413.
- 381 Hoffard WH, Coster JE, 1976. Endoparasitic nematodes of *Ips* bark beetles in Eastern Texas. *Environ. Entomol.*
 382 5(1), 128-132.
- 383 Holusa J, Kula E, Wewiora F, Lukasova K, 2014. Flight activity, within the trap tree abundance and
 384 overwintering of the larch bark beetle (*Ips cembrae*) in Czech Republic. *Sumar. list.* 1-2, 19-27.
- 385 Hunt DJ, 1993. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomics.* CABI,
 386 Wallingford, UK .
- 387 Hunt, DJ, Hague NGM, 1974. A Redescription of *Parasitaphelenchus oldami* Rühm, 1956 (Nematoda:
 388 Aphelenchoididae) a Parasite of Two Elm Bark Beetles: *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus*, together with
 389 some notes on its biology. *Nematologica* 20, 174-180.
- 390 Kaya HK, 1984. Nematode parasites of bark beetle. In: *Plant and insect nematodes.* Ed. by Nickle WR, Marcel
 391 Dekker, Inc., New York, 727-754.
- 392 Kaya HK, Stock SP, 1997. Techniques in insect nematology. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology.* Ed.
 393 by Lacey LA, Academic Press, New York, 281-324.
- 394 Knizek M, 2008. Bark Boring Insect. In: Ed. by Knizek M, Peskova V, (ed.): *Incidence of forest damaging*
 395 *agents in 2007 and their expected status in 2008. Zpravodaj ochrany lesa. Supplementum, VÚLHM Jíloviště -*
 396 *Strnady.* 74, 21-33.
- 397 Kinn DN, 1967. Notes on the life cycle and habits of *Digamasellus quadrisetus* (Mesostigmata: Digamasellidae).
 398 *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60(4), 862-865.
- 399 Kinn DN, 1971. The life cycle and behavior of *Cercoleipus coelonotus* (Acarina: Mesostigmata) including a
 400 survey of phoretic mite associates of California Scolytidae. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 65, 1-59.
- 401 Kielczewski B, Wisniewski J, 1983. Bark beetle acarofauna in different types of forest habitat. Part I and II.
 402 *Introduction and Mesostigmata. Fol. Forest. Polonica* A(25), 129-160.
- 403 Krantz GW, Walter DE, 2009. *A manual of acarology.* Lubbock, (TX), Texas Tech. University Press, Texas.
- 404 Laetsch DR, Heitlinger EG, Taraschewski H, Nadler SA, Blaxter ML, 2012. The phylogenetics of
 405 *Anguillicolidae* (Nematoda: Anguillicolioidea), swimbladder parasites of eels. *BMC Evol. Biol.* 12, 60.

- 406 Lieutier F, 1979. Diptera associated with *Ips typographus* and *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Scolytidae) in Paris
 407 area, and the changes in their populations during the annual cycle. Bull. Ecol. 10, 1-13.
- 408 Lieutier F, 1980. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Boern) (Coleoptera: Scolytidae) by nematodes of the genus
 409 *Parasitaphelenchus* Fuchs and relations with parasitism by *Contortylenchus diplogaster* (v Lins). Rev. Nematol.
 410 3, 271-281.
- 411 Lieutier F, 1982. Weight variations of adipose tissue and ovaries and variations in the length of ovocytes in *Ips*
 412 *sexdentatus* Boern. (Coleoptera: Scolytidae); relation to parasitism by nematodes Ann. Parasitol. Hum. Comp. 57
 413 (4), 407-418.
- 414 Lieutier F, 1984. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Insecta: Scolytidae) by *Parasitorhabditis ipsophila* (Nematoda:
 415 Rhabditidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59(5), 507-520.
- 416 Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire JC, Evans HF, 2004. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in
 417 Europe, a Synthesis. Kluwer, Dordrecht.
- 418 Massey CL, 1956. Nematode parasites and associates of the Engelmann spruce beetle (*Dendroctonus*
 419 *engelmanni* Hopk.). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 23(1), 14-24.
- 420 Massey CL, 1960. Nematode parasites and associates of the California five-spined engraver, *Ips confusus* (Lec.).
 421 Proc. Helminthol. Soc. Wash. 27(1), 42-44.
- 422 Massey CL, 1962. Life history of *Aphelenchoides elongatus* Massey (Nematoda), an endoparasite of *Ips*
 423 *confusus* LeConte, with a description of the male. J. Insect Pathol. 4, 95-103.
- 424 Massey CL, 1974. Biology and taxonomy of nematode parasites and associates of bark beetles in the United
 425 States. US Government Printing office, Washington.
- 426 McFrederick QS, Haselkorn TS, Verocai GG, Jaenike J, 2013. Cryptic *Onchocerca* species infecting North
 427 American cervids, with implications for the evolutionary history of host associations in *Onchocerca*.
 428 Parasitology 140, 1201–1210.
- 429 Meirmans S, Skorpung A, Loyning MK, Kirkendall LR, 2006. On the track of the Red Queen: bark beetles, their
 430 nematodes, local climate and geographic parthenogenesis. J. Evol. Biol. 19(6), 1939-1947.
- 431 Mracek Z, 1982. The role of nematodes in the biological fight to protect the environment. Study information:
 432 protection and development of the environment in agriculture and forestry. 2. ed. UVTIZ Press, Prague.
- 433 Neher DA, 2010. Ecology of Plant and Free-Living Nematodes in Natural and Agricultural Soil. Annu. Rev.
 434 Phytapahtol. 48, 371-394.

- 435 Nedelchev S, Takov D, Pilarska D, 2008. Parasitic and associated nematodes of bark beetles in Bulgaria. Acta.
 436 Zool. Bulgar. 2, 83-991.
- 437 Nemeč V, Zúmr V, Stary P, 1993. Studies on the nutritional state and the response to aggregation pheromones in
 438 the bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). J. Appl. Entomol. 116, 358-363.
- 439 Nickle WR, 1963. Observations on the effect of nematodes on *Ips confusus* (LeConte) and other bark beetles. –
 440 J. Insect Pathol. 5, 386-389.
- 441 Nickle WR, 1973. Identification of insect parasitic nematodes- A review. Exp. Parasitol. 33(2), 303-317.
- 442 Peneva V, Chipev N, 1999. *Laimaphelenchus helicospoma* (Maslen, 1979) n. comb. (Nematoda: Aphelenchida)
 443 from the Livingston Island (the Antarctic). Bulgarian Antarctic Research: Life Science. 2, 57-61.
- 444 Poinar GO, 1975. Entomogenous nematodes. Brill, Leiden, The Netherlands.
- 445 Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS, 2009. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of
 446 nematodes belonging to the *Trichinella* genus. Infect. Genet. Evol. 9, 606-616.
- 447 Postner M, 1974. *Ips cembrae*. In: Die Forstschädlinge Europas. II. Band. Kafer. ed. by Schwenke W, Paul
 448 Parey, Hamburg, 458-459.
- 449 Pfeffer A, 1989: Scolytidae and Platypodidae. Academia, Prague.
- 450 Pschorn-Walcher H, 1977. Biological control of forest insects. Annu. Rev. Entomol. 22, 1-22.
- 451 Rühm W, 1956. Die Nematoden der Ipiden. Parasitologische Schriftenreihe 6, Fischer, Jena.
- 452 Rühm W, 1960. Ein Beitrag zur Nomenklatur und Systematik einiger mit Scolytiden vergesellschafteter
 453 Nematodenarten. Zoologischer Anzeiger Leipzig 164(5-6), 201-213.
- 454 Serrao JE, Rocha-Silva C, Zanuncio JC, Viana-Bailez AMM, 2008. Occurrence of nematodes inside the
 455 malpighian tubules of *Hypocryphalus mangiferae* (Stebbing) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Coleopt.
 456 Bull. 62(2), 344-348.
- 457 Stone C, Simpson JA, 1990. Species associations in *Ips grandicollis* galleries in *Pinus taeda*. N. Z. J. For. Sci.
 458 20(1), 75-96.
- 459 Subbotin SA, Sturhan D, Chizhov VN, Vovlas N, Baldwin JG, 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida
 460 Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. Nematology 8,
 461 455-474.
- 462 Susoy V, Herrmann M, 2014. Preferential host switching and codivergence shaped radiation of bark beetle
 463 symbionts, nematode of *Micoletzkyia* (Nematoda: Diplogastridae). J. Evol. Biol. 27(5), 889-898.

- 464 Swart A, 1997. Description of *Laimaphelenchus patulus* sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) from Pinus
465 *pinaster* Ait. South Africa. Afr. Plant Prot. 3, 23-28.
- 466 Takov D, Pilarska D, Wegensteiner R, 2006. Entomopathogens in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) from
467 several spruce stands in Bulgaria. Acta. Zool. Bulgar. 58: 409-420.
- 468 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary
469 genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Mol.
470 Biol. Evol. 28(10), 2731-2739.
- 471 Tanha Maafi Z, Subbotin SA, Moens M, 2003. Molecular identification of cyst-forming nematodes
472 (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on the ITS sequences of rDNA. Nematology 5, 99-111.
- 473 Tenkacova I, Mituch J, 1980. Helminthofauna of bark beetles (Scolytidae) from spruce from Mnisek nad
474 Hnilcom area. Final report, Helminthological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice.
- 475 Tenkacova I, Mituch J, 1983. Helminthofauna of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Vysoke Tatry
476 mountains area. Final report. Helminthological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice.
- 477 Tenkacova I, Mituch J, 1986. A contribution to the knowledge of nematofauna of Scolytidae bark beetles in
478 norway spruce in forest park in Košice. Lesn. čas. 32(5), 381-387.
- 479 Tenkacova I, Mituch J. 1987. Nematodes new for the fauna of the Czechoslovak Socialist Republic with the
480 affinity to Scolytids (Coleoptera: Scolytidae). Helminthologia. 24, 281-291.
- 481 Tenkacova I, Mituch J, 1988. Nematofauna of bark beetles (Scolytidae) from silver fir (*Abies alba* Mill.) from
482 Polana area. Lesn. čas. 34(2), 125-131.
- 483 Tenkacova I, Mituch J. 1991. Nematodes of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Tatra National Park.
484 Zborník prác o Tatranskom národnom parku. 31, 173-182.
- 485 Thong CHS, Webster JM, 1972. A redescription of the Bark Beetle Nematode *Contortylenchus brevicomi*.
486 Synonym *Contortylenchus barberus* (Nematoda: Sphaerulariidae). – J. Nematol. 4(3), 213-216.
- 487 Thong CHS, Webster JM, 1973. Morphology and the postembryonic development of the bark beetle nematode
488 *Contortylenchus reversus* (Sphaerulariidae). Nematologica. 19, 159-168.
- 489 Thong CHS, Webster JM, 1975. Effects of the bark beetles nematode, *Contortylenchus reversus* on gallery
490 construction, fecundity and egg viability of the douglas fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera:
491 Scolytidae). J. Invertebr. Pathol. 26, 235-238.
- 492 Weiser J, 1954. Contributions to the knowledge of *Ips typographus* parasites, I. Věstník Československé
493 Zoologické společnosti 19, 217-224.

- 494 Weiser J, Mracek Z, 1988. Parasitic nematodes of the insects. Academia, Prague.
- 495 Weslien J, Lindelow A, 1990. Recapture of marked spruce bark beetles (*Ips typographus*) in pheromone traps
496 using area-wide mass trapping. Can. J. For. Res. 20, 1786-1790.

6. Diskuse

Podobně jako mezi jinými organismy i mezi hlísticemi a lýkožrouty existuje mnoho typů vztahů, od komezálismu po obligátní parazitismus (Tenkáčová a Mituch, 1987; 1991; Kaya a Stock, 1997). Hlístice jsou téměř vždy nalézány v požercích lýkožroutů, přičemž různé druhy hlístic využívají svého hostitele různým způsobem. Mohou být pouze komenzály, kteří vyhledávají jen prostředí požerků lýkožroutů, takovým příkladem jsou rody *Clarkus*, *Panagrolaimus* a *Pristionchus* uvedené ve studiích Világiové (1990; 1993), které však v naší studii nebyly zjištěny, či námi pro území České republiky nově nalezený rod *Laimaphelenchus*. Mohou být také foreticky lýkožroutů a využívat je jako prostředek k osídlení nového prostředí (rod *Bursaphelenchus* či *Micoletzkyia*) nebo mohou žít přímo v těle lýkožrouta (endoparazitické hlístice rodů *Contortylenchus* a *Parasitylenchus*). Některé hlístice jsou ale nalézány jak na těle, tak v těle lýkožroutů (rod *Cryptaphelenchus*). O endoparazitických hlísticích je známo, že mohou ovlivňovat fertilitu, přežívání, letovou aktivitu, termín rojení nebo dokonce mohou měnit hostitelovo chování (Reid, 1958; Massey, 1956; 1960; Thong a Webster, 1972; 1975; Lieutier, 1982; 1984b; Weiser a Mráček, 1988). Z těchto důvodů tedy existuje určitý potenciál pro jejich využití v biologickém boji. Úskalím při použití biologického boje proti kůrovcům jsou ale některé praktické problémy, zejména v oblasti namnožení bioagens a zvolení vhodné aplikační metody.

Přestože se v NP Šumava jedná o dlouhodobě přemnoženou populaci I. smrkového s vysokými denzitami, nebyly zjištěny vysoké hladiny infekční nákazy patogenů matečných brouků. Získané údaje o patogenních organismech odpovídají a jsou procentuálně prakticky totožné s předchozími zjištěními z oblasti Šumavy (Weiser a kol., 2000). Parazitace entomofilními hlísticemi v NP Šumava byla proti očekávání vyšší (19%). Např. Tenkáčová a Mituch (1986, 1987; 1991), ve svých pracích z různých lokalit (např. Tatranský národní park) uvádí přítomnost hlístic u kůrovců v rozmezí 4,3 % až 5,1 % zkoumaných jedinců. Příčiny vyšších zaznamenaných hodnot v NP Šumava mohou spočívat ve větších hustotách populace I. smrkového, kdy mají hlístice pravděpodobně

snadnější přístup ke svému hostiteli. V případě sledovaného druhu *Contortylechus diplogaster* stejné studie uvádí výskyt u asi 9 % jedinců I. smrkového v případě přezimující generace a necelého 1 % u generace dceřiné. Námi naměřené hodnoty parazitace I. smrkového tímto druhem hlístice (6,5 %) jsou tedy v souladu s výsledky těchto studií, vzhledem k tomu, že šumavská populace tohoto druhu lýkožrouta je univoltinní.

Obecně se jeví být pravděpodobné, že predace a parazitace přirozenými nepřáteli hrají určitou roli při redukci populací lýkožroutů a jejich růstu v jejich základním stavu. Ale zda jsou schopni zredukovat kalamitní stav populace na základní úroveň, zůstává zatím otevřenou a poměrně dosti diskutovanou otázkou (Kausrud a kol., 2011). Je známo, že dynamika populace kůrovců je ovlivňována hlavně faktory, které ovlivňují odolnost stromu, zatímco přirození nepřátelé jsou považováni pouze za minoritní faktor, který v nejlepším případě pouze urychluje kolaps populace (Reeve, 1997). Populace kůrovců mohou zůstat v kalamitním stavu po dlouhou dobu, pokud je příznivá kombinace hlavních faktorů, kterými jsou dostatečné množství vhodných živných rostlin, dostatečná populační hustota, vhodné klimatické podmínky a nízké hodnoty predace přirozenými nepřáteli (Raffa a kol., 2008). Současně ale bylo popsáno, že přestože je parazitace vysoká, počty jedinců I. smrkového mohou dosahovat nebezpečných hodnot (Feicht, 2004).

Nematofauna I. severského (*I. duplicatus*), evropského škůdce se stále rostoucím hospodářským a ekonomickým významem, dosud nebyla podrobně studována. Jedinou známou hlísticí s vazbou na tento druh byl *Parasitylenchus aculeatus* Slankis, 1972 zmíněný v publikaci Poinar (1975). Tento druh hlístice byl potvrzen i v naší studii. Pozorovaná nematofauna je v mnoha rysech shodná se známou nematofaunou kalamitního škůdce I. smrkového (Rühm, 1956; Tenkáčová a Mituch, 1986; 1987; 1991). Zmíněné dva druhy lýkožroutů primárně žijí na smrku ztepilém (*P. abies*). Zatímco *I. typographus* preferuje spodní partie stromů, *I. duplicatus* se vyskytuje převážně v horních částech kmene. Přes rozdílnou výškovou preferenci však dochází k překryvu a není neobvyklé pozorovat ve středních partiích stromů požerky jak *I. duplicatus*, tak *I. typographus* (Schlyter a Anderbrant, 1993). Jedním z rozdílů v druhovém

spektru *I. duplicatus* a *I. typographus* je přítomnost dvou různých druhů stejného rodu *Parasitylenchus*. U *I. duplicatus* byl popsán, jak již bylo zmíněno, *P. aculeatus* a je tak novým druhem pro území České republiky a z *I. typographus* je znám *P. dispar*, který byl v rámci naší studie nalezen také u l. modřínového, jehož nematofauna je rovněž velmi podobná nematofauně l. smrkového a l. severského, možná v důsledku podobnosti či někdy naprosté shodě hostitelských dřevin (Pfeffer, 1989). Uvažován taky je přenos hlístic l. lesklým *Pityogenes chalcographus* (Linné, 1761), který se přirozeně vyskytuje na smrcích, modříněch a borovicích (Pfeffer, 1989; Lieutier a kol., 2004).

V hemocelu všech třech druhů byly dále nalézány hlístice *Contortylenchus diplogaster* a *Cryptaphelenchus* sp. Tyto hlístice jsou známy z hemocelu, střev či Malpigických trubic (*Cryptaphelenchus*) i jiných lýkožroutů rodu *Ips*. Jmenovitě *I. acuminatus*, *I. amitinus* a *I. sexdentatus* (viz. seznam druhů nalézáných u lýkožroutů rodu *Ips* kapitola 5.1.). Je známo, že jednotliví brouci mohou být současně napadeni více než jedním rodem endoparazitických hlístic (Massey, 1974; Lieutier, 1980; Choo a kol., 1987), tato skutečnost byla námi potvrzena u l. modřínového, současný výskyt *Contortylenchus* a *Parasitylenchus* byl zaznamenán v sedmi jedincích. V případě l. severského nebyl současný výskyt zaznamenán. Možným vysvětlením rozdílu by mohla být rozdílná velikost těla těchto dvou druhů lýkožroutů, zatímco l. severský dosahuje maximálně 4,5 mm (Knížek a Holuša, 2007), l. modřínový až 6 mm (Knížek, 2006) a je celkově robustnější.

Hlístice *Parasitorhabditis obtusa* byla nalezena ve střevech a požercích všech studovaných druhů. Jedná se o jeden z nejběžnějších druhů hlístic nalezaných u lýkožroutů rodu *Ips* (např. Rühm, 1956; Tenkáčová a Mituch, 1986; Weiser a Mráček, 1988). Jiné druhy rodu *Parasitorhabditis* jsou rovněž známy z ostatních druhů lýkožroutů zmiňovaného rodu (např. *I. acuminatus* a *I. amitinus* (viz. seznam druhů nalézáných u lýkožroutů rodu *Ips* kapitola 5.1.)).

Juvenilní stadia hlístic rodu *Micoletzkyia* (u l. severského potvrzena *M. buetschlii*) byla nalézána pod krovkami, na křídlech a mezi tělními články l. severského i l. modřínového ve shlucích až několika desítek jedinců. Asociace *M. buetschlii* s *I. cembrae* stejně jako s *I. typographus*, *I. duplicatus* a *I.*

amitinus je popsána již v dřívějších pracích (Weiser, 1954; Rühm, 1956; Tenkáčová a Mituch, 1983; 1986; 1991; Susoy a Herrmann, 2014), což je v souladu s našimi poznatky. Tento druh je typický zástupce foretických hlístic, které lýkožrouta využívají jako prostředek k osídlení nového prostředí. Podle Rühm (1956) nosí až 70 % brouků jedné populace pod krovkami juvenilní stadia těchto hlístic, v našem případě to bylo maximálně 57,7 % jedinců l. severského a 42,9 % l. modřínového. Naše sekvence hlístice rodu *Micoletzkyia* získaná z l. modřínového se shoduje se sekvencí *Micoletzkyia* sp. z l. modřínového z Německa, kde pokusné křížení *M. buetschlii* a *Micoletzkyia* sp. získané z l. modřínového dalo vznik plodným potomkům, což naznačuje, že se jedná o totožný biologický druh. Je známo, že hlístice rodu *Micoletzkyia* mají velmi těsné, stabilní a vysoce specifické vazby na svého hostitelé (Susoy a Herrmann, 2014). Hlístice skupiny *buetschlii* jsou exkluzivně svázané s lýkožrouty rodu *Ips* a jejich blízkými příbuznými kůrovci rodu *Orthotomicus* (Susoy a Herrmann, 2014).

Spektrum hlístic nalézáných v požercích l. severského a l. modřínového je rovněž velmi podobné. V požercích obou druhů lýkožroutů byly nalezeny hlístice *P. obtusa*, *Micoletzkyia* sp. a *Cryptaphelenchus* sp. (uvedené v pořadí podle jejich početnosti v požercích). Což plně koresponduje se známými údaji (Tenkáčová a Mituch, 1980; 1986; 1991). U l. severského se v požercích vyskytovaly navíc hlístice rodu *Parasitaphelenchus*, které jsou stejně jako zástupci rodu *Cryptaphelenchus* popisovány i u jiných druhů rodu *Ips* (Rühm, 1956; Tenkáčová a Mituch, 1986; 1991). *Cryptaphelenchus* je velmi hojně zastoupen v požercích *I. typographus* a *I. cembrae* (druhý dominantní druh po *P. obtusa*) a je také nalézán v záhybech mezi hlavou a hrudí (Tenkáčová a Mituch, 1980; 1983; 1986; 1991). V našem případě se pravděpodobně jednalo o *C. macrogaster macrogaster*, který je znám z *I. typographus* (viz. seznam druhů nalézáných u lýkožroutů rodu *Ips* kapitola 5.1.).

V požercích l. modřínového byli navíc nalezení zástupci rodů *Laimaphelenchus* a *Bursaphelenchus*, kteří nebyli blíže determinováni. Rod *Laimaphelenchus* je však popisován jako součást společenstva hlístic kůry a dřeva a je znám ze všech kontinentů (Hunt, 1993; Swart, 1997; Peneva

a Chipev, 1999). Na světě je dosud popsáno 14 druhů tohoto rodu, v Evropě se vyskytují 3 druhy (*Laimaphelenchus pannocaudus* Massey, 1966, *L. vescus* Truskova a Eroshenko, 1977 a *L. penardi* (Steiner, 1914) Filipjev a Schuurmans Stekhoven, 1941 (Andrássy, 2007)). Jsou popsány jejich asociace s mechy, řasami a lišejníky rostoucími převážně na jehličnatých stromech, jsou známí také z požerků dřevokazného hmyzu (Hunt, 1993), ale dosud nebyla popsána jejich asociace s l. modřínovým. Pouze *L. penardi* byl zaznamenán u amerického druhu lýkožrouta *I. confusus* (Massey, 1960). V případě zástupců rodu *Bursaphelenchus* je pro střední Evropu známa asociace *B. eidmanni* (Rühm, 1956) s *I. amitinus* a *I. typographus* a *B. sexdentati* Rühm, 1960 s *I. sexdentatus* (Rühm, 1956; Tenkáčová a Mituch, 1986; 1987; 1991). Vedle výše zmíněných druhů byli v požercích nalézáni také juvenilní jedinci z řádu Tylenchida, které nebylo možno determinovat, ale pravděpodobně se jedná o juvenilní stadia nalezených hlístic *C. diplogaster* a *Parasitylenchus* spp.

Mezi jedinci l. severského z lokalit, které se nacházejí v různých nadmořských výškách, nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v přítomnosti endoparazitických či foretických hlístic. Ačkoli studované lokality reprezentovaly celou šíři vertikálního výskytu l. severského, nelze očekávat změny ve druhovém spektru nematod, také protože rozdíl lokalit je jen 250 m. Naproti tomu byl u l. modřínového rozdíl mezi studovanými lokalitami signifikantní pro endoparazitické i foretické hlístice. U obou druhů byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi přezimující a dceřinou generací. Infestace foretickými hlísticemi byla vyšší u brouků pocházejících z přezimující generace, zatímco endoparazitické hlístice l. modřínového byly častěji zaznamenány u jedinců pocházejících z dceřiné generace. Nalezený signifikantní rozdíl koresponduje s údaji z ostatních studií. Ve většině publikací je však infestace jak foretickými tak endoparazitickými hlísticemi vyšší pro přezimující (např. Choo a kol., 1987; Slankis, 1972; Tenkáčová a Mituch, 1980; 1983; 1986; 1987; 1988; 1991), takový rozdíl mezi generacemi byl potvrzen u l. severského v naší studii. Námi zjištěná vyšší infestace hlísticemi nalezanými v hemocelu l. modřínového pak může podporovat vliv lokálního mikroklima na nematofaunu.

Široce je totiž uznáván vliv lokálního mikroklima spíše než klimatických podmínek prostředí v závislosti např. na nadmořské výšce (např. Rühm, 1956; Choo a kol., 1987; Meirmans a kol., 2006). Mikroklima požerků je pak ovlivňováno různými faktory, zejména množstvím slunečního záření dopadajícího na kmen stromu (Rühm, 1956; Meirmans a kol., 2006). A protože vývojové cykly všech nalezených rodů hlístic vždy aspoň po určitou dobu probíhají v požerku lýkožrouta, je lokální mikroklima životně důležité pro hlístice právě ve fázi, kdy se nacházejí mimo tělo svého hostitele, když nejsou chráněny před vnějšími vlivy (Rühm, 1956; Tenkáčová a Mituch, 1980; Meirmans a kol., 2006). Toto prostředí je klíčové pro setkávání jedinců opačného pohlaví a následné rozmnožování. Např. v případě endoparazitických hlístic (rod *Contortylenchus* se v hemocelu hostitele vyskytují dospělé oplodněné samice, vajíčka a juvenilní stadia obou pohlaví, zatímco v prostředí požerků pak probíhá poslední svlékání a pohlavní dospívání samců i samic a následná kopulace, dospělí samci se vyskytují pouze v požercích (Rühm, 1956; Massey, 1974; Siddiqi, 2000). U foretických hlístic, jako je např. *Micoletzkyia*, je tomu právě naopak. Většina jejich vývojového cyklu probíhá v prostředí požerku, kde se dospělci rozmnožují. Lýkožrouta pak využívají juvenilní jedinci pro transport do nového prostředí (Massey, 1974; Tenkáčová a Mituch, 1983).

Dále nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi samci a samicemi v přítomnosti endoparazitických či foretických hlístic u žádného z analyzovaných druhů lýkožroutů. Což je v souladu se známými údaji, tyto rozdíly nebyly prokázány ani jinými autory (Choo a kol., 1987; Lieutier, 1979).

V požercích lýkožroutů jsou téměř vždy přítomny hlístice. Tenkáčová a Mituch ve svých studiích ze Slovenské republiky uvádějí více než 96 % požerků, ve kterých byly hlístice nalezeny (Tenkáčová a Mituch, 1980; 1983; 1986; 1987; 1988; 1991). V naší studii bylo na hlístice pozitivních více než 80 % všech požerků. Rozdíl mezi generacemi v množství hlístic v požerku byl signifikantní, což může potvrzovat zásadní vliv již zmíněného lokálního mikroklima. Pro známou synchronizaci vývojových cyklů hlístic s cykly kůrovců (např. Rühm, 1956; Massey, 1974; Thong a Webster, 1975) a postupné vytváření vhodných podmínek v požerku pro organismy asociované s kůrovci jako jsou

hlístice, roztoči nebo houby (Stone a Simpson, 1990; Meirmans a kol., 2006, Cardoza a kol., 2006; 2008), bylo očekáváno rostoucí množství hlístic v požerku s jeho postupným rozvojem. To je známo např. ze studie Stone a Simpson (1990), kde celkový počet roztočů a hlístic na vzorkovací jednotku plochy pozitivně koreloval s vývojovou fází *I. grandicollis* Eichhoff. Tato skutečnost byla pozorována a byla statisticky průkazná i v naší studii, kdy denzity populace hlístic v požerku narůstaly s jeho postupným rozvojem.

Při posuzování rozdílů v infestaci hlísticemi mezi brouky získanými různými metodami (lapač/lapák) byl nalezen signifikantní rozdíl pouze pro hlístice nalezené volně v hemocelu, hodnoty pro lýkožrouty z lapáků byly vyšší než pro lýkožrouty z lapačů. Teoreticky mohou být nákazy v materiálu z feromonových lapačů podhodnoceny. Lapač s feromonem ve vzdálenosti 25 m od napadeného stromu zachytí 20 - 54 % lokální populace (Weslien a Lindelöw, 1990; Němec a kol., 1993; Duelli a kol., 1997). Na základě analýzy velikosti tukového tělesa, je hypotetizováno, že pouze maximálně třetina brouků pochází z lokálních populací, protože jejich tukové těleso je velké. Zbytek brouků *I. typographus* s rozvinutější svalovinou přilétl z větších vzdáleností (Němec a kol., 1993). I v naší studii jsme zjistili, že jsou rozdíly v infestacích hlísticemi v hemocelu mezi lokalitami signifikantní, takže část brouků v lapačích může pocházet z lokalit s nižšími infestacemi.

Kromě hlístic jsou s kůrovci rovněž úzce spojeni i roztoči. Typickými zástupci roztočů asociovanými s lýkožrouty rodu *Ips* jsou příslušníci řádů Mesostigmata, Astigmata, Oribatida a Prostigmata. U 1. modřínového je známo 5 druhů roztočů (Kielczewski a Wisniewski, 1983). Někteří z nich jsou rovněž známými foretiky a byli stejně jako hlístice nalézáni na tělech a pod krovkami studovaného druhu. Některé publikace také dokládají lov hlístic roztoči (Massey, 1962; Kinn, 1967; 1971; Krantz, 2009). Tak např. foretičtí zástupci mesostigmátních rodů *Dendrolaelaps*, *Trichouropoda* a dalších se nejčastěji živí hlísticemi, které se vyskytují společně s brouky v jejich požercích a nebo na jejich tělech (Kielczewski a Wisniewski, 1983; Čejka a Holuša, 2013). Zjištěná pozitivní korelace mezi počtem brouků pozitivních na přítomnost foretických hlístic a roztočů dokládá jednoduchý vztah, že s rozvojem požerku vzniká

i vhodné prostředí pro rozmnožování všech asociovaných organismů. Např. počet roztočů a nematod na jednotku studované plochy pozitivně koreloval s vývojovým stadiem *I. grandicollis* (Stone a Simpson, 1990) a podobný trend byl zaznamenán i v případě *I. duplicatus*. Zjištěný častější výskyt roztočů na broucích z lapačů jen dokládá foretické vztahy mezi lýkožrouty a některými roztoči.

7. Závěr

- V rámci disertační práce byly shrnuty informace o hlísticích, které jsou svým způsobem života vázané na kůrovce (podčeleď Scolytinae) a zejména pak na lýkožrouty rodu *Ips*. Sestaven byl seznam všech známých druhů hlístic asociovaných s lýkožrouty zmíněného rodu pro území střední Evropy, včetně seznamu jejich synonymních názvů.
- Přestože je světově věnována velká pozornost hlísticím jako prostředku biologické ochrany v boji se škůdci, v případě lýkožroutů je jejich využití velmi problematické.
- U l. severského byly nalezeny hlístice náležející do 6 a u l. modřínového do 7 různých rodů kmene Nematoda. Výsledky byly podpořeny také molekulární analýzou. Seznam původního počtu 18 rodů hlístic asociovaných s lýkožrouty rodu *Ips* ve střední Evropě byl rozšířen o rod *Laimaphelenchus* nalezený v požercích l. modřínového. A seznam původních 31 druhů hlístic vázaných na tyto lýkožrouty byl rozšířen o jeden druh, který je současně novým druhem pro Českou republiku (*Parasitylenchus aculeatus* asociovaný s l. severským). Obecně je nematofauna všech námi zkoumaných druhů lýkožroutů v mnoha rysech shodná, a to pravděpodobně v důsledku podobnosti či někdy naprosté shodě hostitelských dřevin.
- Potvrzena byla rozdílná infestace lýkožroutů hlísticemi mezi jednotlivými generacemi bivoltinních populací, naopak neexistence rozdílů v infestaci mezi samci a samicemi. Rovněž byl potvrzen vliv stáří požerku na množství hlístic v něm žijících a tím i potvrzen zásadní význam lokálního mikroklima na nematofaunu lýkožroutů a její rozvoj, vliv odchytových metod zůstává nejasný.

8. Seznam použité literatury

- Anderbrant, O., 1990. Gallery construction and oviposition of the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) at different breeding densities. *Ecol. Entomol.* 15(1), 1-8.
- Andrássy, I., 1954. Revision der Gattung *Tylenchus* Bastian, 1865. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 1, 5-42.
- Andrássy, I., 2007. Free-living nematodes of Hungary, II. (Nematoda errantia), in: Csuzdi, C., Mahunka, S., (Eds.), *Pedozoologica Hungarica*, 4. edition, Hungarian Natural History Museum. Budapest, Hungary. s. 496.
- Annala, E., 1969. Influence of temperature upon the development and voltinism of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Ann. Zool. Fen.* 6, 161-208.
- Ashraf, M., 1968. Biological studies of *Scolytus ventralis* LeConte (Coleoptera: Scolytidae) with particular reference to nematode parasite *Sulphuretylenchus elongatus* Massey. Ph.D. thesis. Washington State University, Pullman.
- Ashraf, M., Berryman, A.A., 1970. Biology of *Sulphuretylenchus elongatus* (Nematoda: Spaelariidae) and its effect on its host *Scolytus ventralis* (Coleoptera: Scolytidae). *Can. Entomol.* 102, 197-213.
- Atkins, M.D., 1961. A study of the flight of the *Dendroctonus pseudotsugae* Hopk. (Coleoptera: Scolytidae) III. Flight capacity. *Can. Entomol.* 93, 467-474.
- Balazy, S., 1966. Living organisms regulate population density of bark beetles in spruce forests, with special reference to entomopathogenic fungi. *Pr. Kom. Nauk Roln. Kom. Nauk Lesn., Poznan. Tow. Przyj. Nauk.* 21(1), 3-48.
- Balazy, S., 1968. Analysis of bark beetle mortality in spruce forests in Poland. *Ekol. Pol., Seria A.* 16(33), 657-687.
- Bevan, D., 1987. *Forest insects. A Guide to Insects Feeding on Trees in Britain.* Forestry Commission, Handbook 1. HMSO, London.
- Blaxter, M.L., DeLey, P., Garey, J., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T.,

- Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75.
- Botterweg, P.F., 1983. The effect of attack density on size, fat content and emergence of the spruce bark beetle *Ips typographus* L. *Z. Angew. Entomol.* 96, 47- 55.
- Braasch, H., 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin.* 31, 127-142.
- Burjanadze, M., Goginashvili, N., 2009. Occurrence of pathogens and nematodes in the spruce bark beetles, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in Borjomi gorge. *BNAS.* 3, 145-149.
- Cardoza, Y.J., Moser, J.C., Klepzig, K.D., Raffa, K.F., 2008. Multipartite Symbioses Among fungi, Mite, Nematodes and the Spruce Beetle, *Dendroctonus rufipennis*. *Environ. Entomol.* 37(4), 956-963.
- Cardoza, Y.J., Paskewitz, S., Raffa, K.F., 2006. Traveling through time and space on wings of Beetles: A tripartite insect-fungi-nematode association. *Symbiosis.* 41, 71-79.
- Choo, H.Y, Kaya, H.K, Shea, P., Noffsinger, E.M., 1987. Ecological study of nematode parasitism in *Ips* beetles from California and Idaho. *J. Nematol.* 19(9), 495-502.
- Čejka, M., Holuša, J., 2013. Roztoči řádu Mesostigmata u kůrovců (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) - Review. *ZLV* 58(4), 353-359.
- Doležal, P., Sehnal, F., 2007. Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *J. Appl. Entomol.* 131(3), 165-173.
- Duelli, P., Zahradník, P., Knížek, M., Kalinová, B., 1997. Migration in spruce bark beetles (*Ips typographus* L.) and the efficiency of pheromone traps. *J. Appl. Entomol.* 121, 297-303.
- Elsner, G., 1997. Relationships between cutting time in winter and breeding success of *Ips cembrae* in larch timber. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.* 11, 653-657.

- Eyuaem, A., Blaxter, M., 2003. Comparison of biological, molecular and morphological methods of species identification in a set of cultured *Panagrolaimus* isolates. *J. Nematol.* 35, 119-128.
- Feicht, E., 2004. Parasitoids of *Ips typographus* (Col., Scolytidae), their frequency and composition in uncontrolled and controlled infested spruce forest in Bavaria. *J. Pest Sci.* 77, 165-172.
- Finney, J.R., Mordue, W., 1976. The susceptibility of the elm bark beetle *Scolytus scolytus* to the DO-136 strain of *Neoaplectana* sp. *Ann. of Appl. Biol.* 83, 311-312.
- Forsse, E., 1987. Flight duration in *Ips typographus* L.: Insensitivity to nematode infection. *J. Appl. Entomol.* 104, 326-328.
- Fuchs, A.G., 1914. *Tylenchus dispar curvidentis* m. und *Tylenchus dispar cryphali* m. *Zool. Anz. Leipzig.* 45(5), 195-207.
- Fuchs, A.G., 1915. Die Naturgeschichte der Nematoden und einiger anderer Parasiten 1. des *Ips typographus* L. 2. des *Hylobius abietis* L. *Zool. Jahrb., Abt. Jena.* 38, 109-222.
- Fuchs, A.G., 1929. Die Parasiten einiger Russel- und Borkenkäfer Z. *Parasitenkd. Berlin.* 2(2), 248-285.
- Fuchs, A.G., 1930. Neue an Borken- und Russelkäfer gebundene Nematoden, halbparasitische und Wohnungseinmieter. Freilebende Nematoden aus Moos und Walderde in Borken- und Rüsselkäfergängen. *Zool. Jahrb. Abt. Syst.* 59(5-6): 505-646.
- Fuchs, A.G., 1938. Neue Parasiten und Halbparasiten bei Borkenkäfern und einige andere Nematoden II, III, u. IV Teil. *Zool. Jahrb. Abt. Syst.* 77(1-2), 123-190.
- Furniss, M.M., 1967. Nematode parasites of the Douglas-fir beetle in Idaho and Utah. *J. Econ. Entomol.* 92, 941-954.
- Furuta, K., Iguchi, K., Lawson, S., 1996. Seasonal difference in the abundance of the spruce beetle (*Ips typographus japonicus* Nijima) (Col., Scolytidae) within a outside forest in a bivoltine area. *J. Appl. Entomol.* 120, 125-129.
- Geraert, E., De Grise, A., 1981. The Male Copulatory System in Tylenchid Taxonomy (Nematoda). *Nematologica.* 27, 432-442.

- Grégoire, J.C., Evans, H.F., 2004.: Damage and control of BAWBILT organisms – an overview, in: Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F., (Eds.), Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. Kluwer Academic, Dordrecht, s. 19-37.
- Grodzki, W., 1997. The ability to control the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* C.R. Sahlb. population in the southern Polish. Sylwan 11, 25-36.
- Grodzki, W., 1999. Problematika výskytu lýkožrouta severského *Ips duplicatus* (Sahlberg) (Coleoptera: Scolytidae) na území Polska. ZOL 5, 13-15.
- Grodzki, W., 2003. The geographical range of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* C.R. Sahlb. (Col.: Scolytidae) in mountain areas of southern Polish. Sylwan 8, 29-36.
- Grodzki, W., 2008: *Ips cembrae* Heer. (Col.: Curculionidae, Scolytinae) in young larch stands - a new problem in Poland. Forstschutz Aktuell. 44, 8-9.
- Grodzki, W., Kosibowicz, M., 2009. Materiały do poznania biologii kornika modrzewiowca *Ips cembrae* (Heer) (Col., Curculionidae, Scolytinae) w warunkach południowej Polski. Sylwan 153(9), 587-593.
- Hájek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Ann. Rev. Entomol. 39, 293-322.
- Händel, U., Kenis, M., Wegensteiner, R., 2001. Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenen und Parasiten in Populationen überwinterner Fichtenborckenkäfer (Col., Scolytidae). Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol. 13, 423-428.
- Hodgkin, L.K., Elgar, M.A., Symonds, M.R.E., 2010. Positive and negative effects of phoretic mites on the reproductive output of an invasive bark beetle. Aust. J. Zool. 58, 198-204.
- Hoffard, W.H., Coster, J.E., 1976. Endoparasitic nematodes of *Ips* bark beetles in Eastern Texas. Environ. Entomol. 5(1), 128-132.
- Hofstetter, R.W., Moser, J.C., McGuire, R., 2009. Observations on the mite *Schizosthetus lyriformis* (Acari: Parasitidae) preying on bark beetle eggs and larvae. Entomol. News. 120, 397-400.

- Holuša, J., Grodzki, W., 2008. Occurrence of *Ips duplicatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) on pines (*Pinus* sp.) in the Czech Republic and southern Poland - Short Communication. J. For. Sci. 54(5), 234-236.
- Holuša, J., Grodzki, W., Lukášová, K., 2010a. Comparison of the effectivity of the pheromone dispensers ID Ecolure, Pheagr IDU and Duplodor to the double-spined spruce bark beetle (*Ips duplicatus*). Sylwan 154, 363-370.
- Holuša, J., Knížek, M., 2007. Aktuální rozšíření lýkožrouta severského v ČR. LOS informuje. Les. práce 85, 314.
- Holuša, J., Lubojacký, J., Knížek, M., 2010b. Distribution of double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* in the Czech Republic: Spreading in 1997-2009. Phytoparasitica 38, 435-443.
- Holuša, J., Kula, E., Wewiora, F., Lukášová, K., 2014. Flight activity, within the trap tree abundance and overwintering of the larch bark beetle (*Ips cembrae*) in Czech Republic. Šumarski list 1-2, 19-27.
- Holuša, J., Lukášová, K., Trombik, J., 2013: The first record of *Ips duplicatus* (coleoptera: curculionidae, scolytinae) infestations in central european inner mountains. SAB 44(2), 97-101.
- Holuša, J., Lukášová, K., Wegensteiner, R., Grodzki, W., Pernek, M., Weiser, J., 2013. Pathogens of the bark beetle *Ips cembrae*: microsporidia and gregarines also known from other *Ips* species. J. Appl. Entomol. 137(3), 181-187.
- Holuša, J., Weiser, J., 2005. Biologické postupy boje s lesními škůdci. ZOL 11, 18-23.
- Holuša, J., Weiser, J., Drápela, K., 2007. Pathogens of *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in three areas in Central Europe. Acta Protozool. 46, 157-167.
- Holuša, J., Weiser, J., Pultar, O., 2004. Possibility of using of virus against bark beetles? Experiences with simulated infection of two bark beetles, *Ips typographus* and *Ips duplicatus*, with three pathogens. in: Csóka, G., Hirka, A., Koltay, A, (Eds.), Biotic damage in forests. Proceedings of the IUFRO Symposium (WP 7. 03. 10 "Methodology of forest pest and disease survey in Central Europe"). Mátrafüred, Hungary, 12-16 September 2004, s. 72-78.

- Holuša, J., Weiser, J., Žižka, Z., 2009. Pathogens of the spruce bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. Cent. Eur. J. Biol. 4, 567-573.
- Holuša, J., Zahradník, P., Knížek, M., Drápela, K., 2003. Seasonal flight activity of the double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) in Silesia (Czech Republic). Biológia 58, 935-941.
- Hunt, D.J., 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomics. University Press, Cambridge.
- Hunt, D.J., Hague, N.G.M., 1974. A Redescription of *Parasitaphelenchus oldhami* Rühm, 1956 (Nematoda: Aphelenchoididae) a Parasite of Two Elm Bark Beetles: *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus*, together with some notes on its biology. Nematologica 20, 174-180.
- Hunter, P.E., Rosario, R.M.T., 1988. Associations of Mesostigmata with other arthropods. Ann. Rev. Entomol. 33, 393-417.
- Kausrud, K., Okland, B., Skarpaas, O., Grégoire, J.C., Erbilgin, N., Stenseth, N.C., 2011. Population dynamics in changing environments: the case of an eruptive forest pest species. Biol. Rev. 87, 34-51.
- Kaya, H.K., 1984. Nematode parasites of bark beetle, in: Nickle, W.R., (Eds.), Plant and insect nematodes. Marcel Dekker, Inc., New York, s. 727-754.
- Kaya, H.K., Stock, S.R., 1997. Techniques in insect nematology, in: Lacey, L.A., (Eds.), Manual of techniques in insect pathology, Academic Press, San Diego, s. 281-324.
- Kenis, M., Wermelinger, B., Grégoire, J.C., 2004. Research on parasitoids and predators of Scolytidae - a review. in: Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F., (Eds.), Bark and wood boring insects in living trees in Europe, A synthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 237-290.
- Kereselidze, M., Wegensteiner, R., Goginashvili, N., Tvaradze, M., Pilarska, D., 2010. Further studies on the occurrence of natural enemies of *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Georgia. Acta Zool. Bulg. 62, 131-139.

- Kielczewski, B., Balazy, S., 1966. Zagadanie drapieznictwa roztoczy (Acarina) na jajach kornikow (Scolytidae, Coleoptera). *Ekol. Pol.* 12, 161-163.
- Kielczewski, B., Wisniewski, J., 1983. Bark beetle acarofauna in different types of forest habitat. Part I and II. Introduction and Mesostigmata. *Fol. Forest. Polonica A(25)*, 129-160.
- Kinn, D.N., 1967. Notes on the life cycle and habits of *Digamasellus quadrisetus* (Mesostigmata: Digamasellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60(4), 862-865.
- Kinn, D.N., 1971. The life cycle and behavior of *Cercoleipus coelonotus* (Acarina: Mesostigmata) including a survey of phoretic mite associates of California Scolytidae. *University of California Publication in Entomology* 65, 1-59.
- Kinn, D.N., Stephen, F.M., 1981. The incidence of endoparasitism of *Dendroctonus frontalis* Zimm. (Coleoptera: Scolytidae) by *Contortylenchus brevicomi* (Massey) Rühm (Nematoda: Sphaerulidae). *Z. Angew. Entomol.* 91, 452-458.
- Kirchhoff, J.F., Führer, E., 1990. Experimentelle Analyse der Infektion und des Entwicklungszyklus von *Malamoeba scolyti* in *Dryocoetes autographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Entomophaga* 35, 537-544.
- Knížek, M., 2006. Lýkožrout modřínový *Ips cembrae* (HEER). *Les. práce* 85(12), Příloha I-IV.
- Knížek, M., 2008. Podkorní hmyz, in: Knížek, M., Pešková, V., (Eds.), *Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2007 a jejich očekávaný stav v roce 2008*. ZOL, Supplementum, VÚLHM Jíloviště - Strnady, 74, s. 21-33.
- Knížek, M., Holuša, J., 2007. Lýkožrout severský. *Ips duplicatus* Sahlberg. 2. vyd., *Les. práce* 86(4) Příloha.
- Knížek, M., Modlinger, R., 2013. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2012 a jejich očekávaný stav v roce 2013. ZOL, Supplementum, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady.
- Knížek M, Zahradník, P., 1996. Mass outbreak of *Ips duplicatus* Sahlberg (Coleoptera, Scolytidae), in: Doe, J., (Eds.), *XX International Congress of Entomology*. August 25–31 1996. Firenze, Italy, s. 527.

- Knížek, M., Zahradník, P., 2004. Podkorní hmyz, in: Kapitola, P., Knížek, M., Baňar, P., (Eds.), Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2003 a jejich očekávaný stav v roce 2004. ZOL, Supplementum, VÚLHM Jíloviště - Strnady 80, s. 30-39.
- Krantz, G.W., Walter, D.E., 2009. A manual of acarology. Lubbock, (TX), Texas Tech. University Press.
- Krehan, H., Cech, T.L., 2004. Larch damage in Upper Styria. An example of the complex effects of damage agents. Forstschutz Aktuell. 32, 4-8.
- Krehan, H., Steyer, G., 2005. Borkenkäfer-Monitoring und Borkenkäfer-kalamität 2004. Forstschutz Aktuell. 33, 12-14.
- Křístek, J., 1994. Škůdce primární. in: Poleno, Z., (Eds.), Lesnický naučný slovník, Ministerstvo zemědělství, Praha, s. 415.
- Lieutier, F., 1979. Diptera associated with *Ips typographus* and *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Scolytidae) in Paris area, and the changes in their populations during the annual cycle. Bull. Ecol. 10, 1-13.
- Lieutier, F., 1980. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Boern) (Coleoptera: Scolytidae) by nematodes of the genus *Parasitaphelenchus* Fuchs and relations with parasitism by *Contortylenchus diplogaster* (v Lins). Rev. Nematol. 3, 271-281.
- Lieutier, F., 1982. Weight variations of adipose tissue and ovaries and variations in the length of ovocytes in *Ips sexdentatus* Boern. (Coleoptera: Scolytidae); relation to parasitism by nematodes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 57(4), 407-418.
- Lieutier, F., 1984a. Disturbances in the digestive tract of *Ips sexdentatus* (Insecta: Scolytidae) induced by *Parasitorhabditis ipsophila* (Nematoda: Rhabditidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59(6), 597-605.
- Lieutier, F., 1984b. Parasitism of *Ips sexdentatus* (Insecta: Scolytidae) by *Parasitorhabditis ipsophila* (Nematoda: Rhabditidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59(5), 507-520.
- Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F., 2004. Bark and wood boring insects in living trees in Europe: a synthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Lieutier, F., Laumond, C., 1978. Nematode Parasites and Associates of the *Ips sexdentatus* and *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) in Paris Region. *Nematologica* 24(2), 184-200.
- Luitjes, J., 1974. *Ips cembrae*, a new noxious forest insect in the Netherlands. *Ned. Bosb.-Tijdschr.* 46, 244-246.
- Lukášová, K., Holuša, J., 2011. *Gregarina typographi* (Eugregarinorida: Gregarinidae) in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae): changes in infection level in the breeding system. *Acta Protozool.* 50(4), 311-318.
- Lukášová, K., Holuša, J., 2012. Patogeny lýkožroutů rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): review. *ZLV* 57(3), 230-240.
- Lukášová, K., Holuša, J., 2013. New data on the host specificity of *Larssoniella duplicati*. *Period. Biol.* 115(3), 455-457.
- Lukášová, K., Holuša, J., Turčáni, M., 2013. Pathogens of *Ips amitinus*: new species and comparison with *Ips typographus*. *J. Appl. Entomol.* 137(3), 188-196.
- Martínek, V., 1961. Problém natality a gradace kůrovce *Ips typographus* L. ve střední Evropě. *Rozpravy ČSAV* 71(3), 1-77.
- Massey, C.L., 1956. Nematode parasites and associates of the Engelmann spruce beetle (*Dendroctonus engelmanni* Hopk.). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 23(1), 14-24.
- Massey, C.L., 1957. Four new species of *Aphelenchus* (Nematoda) parasitic in bark Beetles in the united States *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 24(1), 29-34.
- Massey, C.L., 1960. Nematode parasites and associates of the California five-spined engraver, *Ips confusus* (Lec.). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 27(1), 42-44.
- Massey, C.L., 1962. Life history of *Aphelenchoides elongatus* Massey (Nematoda), an endoparasite of *Ips confusus* LeConte, with a description of the male. *J. Insect Pathol.* 4, 95-103.

- Massey, C.L., 1964a. The nematode parasites and associates of the fir engraver beetle, *Scolytus ventralis* LeConte, in New Mexico. J. Insect Pathol. 6, 133-155.
- Massey, C.L., 1964b. Two new species of the nematode genus *Ektaphelenchus* (Nematoda: Aphelenchoididae) parasites of bark Beetles in the south-western United States. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 31(1), 37-40.
- Massey, C.L., 1966. The nematode parasites and associates of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae) in New Mexico. Ann. Entomol. Soc. Am. 59(3), 424-440.
- Massey, C.L., 1969. New species of tylenchs associated with bark beetles in New Mexico and Colorado. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 64(1), 43-52.
- Massey, C.L., 1974. Biology and taxonomy of nematode parasites and associates of bark beetles in the United States. US Government Printing office, Washington.
- Matoušek, P., 2012. Populační dynamika lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) v různých gradačních fázích: plodnost na klasických lapácích. Disertační práce. ČZU. Praha.
- Michalková, V., Krascsenitsová, E., Kozánek, M., 2012. On the pathogens of spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae) in the Western Carpathians. Biologia 67, 217-221.
- Michalski, J., Mazur, A., 1999. Korniki. Praktyczny przewodnik dla leśników. Oficyna Wydawnicza Wydawnictwo Świat. Warszawa.
- Mills, N.J., 1986. A preliminary analysis of the dynamics of within tree population of *Ips typographus* (L.) (Coleoptera:Scolytidae). J. Appl. Entomol. 102, 402-416.
- Meirmans, S., Skorping, A., Loyning, M.K., Kirkendall, L.R., 2006. On the track of the Red Queen: bark beetles, their nematodes, local climate and geographic parthenogenesis. J. Evol. Biol. 19(6), 1939-1947.
- Moser, J.C., Konrad, H., Kirisits, T., Carta, L.K., 2005. Phoretic mites and nematodes associates of *Scolytus multistriatus* and *Scolytus pygmeus* (Coleoptera : Scolytidae) in Austria. Agric. Forest Entomol. 7, 169-177.

- Mrkva, R., 1994. Lýkožrout severský (*Ips duplicatus* Sahlberg), nový významný škůdce na smrku. Les. práce 73, 35–37.
- Mrkva, R., 1995. Nové poznatky o bionomii, ekologii a hubení lýkožrouta severského. Les. práce 74, 5–7.
- Nedelchev, S., Takov, D., Pilarska, D., 2008. Parasitic and associated nematodes of bark beetles in Bulgaria. Acta. Zool. Bulgar. 2, 83-991.
- Nermuť, J., Půža, V., Mráček, Z., 2012. Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice - neviditelní půdní zabijáci. Živa 1, 10-13.
- Němec, V., Zumr, V., Starý, P., 1993. Studies on the nutritional state and the response to aggregation pheromones in the bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). J. Appl. Entomol. 116, 358-363.
- Nickle, W.R., 1963. Observations on the effect of nematodes on *Ips confusus* (LeConte) and other bark beetles. J. Insect Pathol. 5, 386-389.
- Nickle, W.R., 1967. On the Classification of the Insect Parasitic Nematodes of the Sphaerulariidae Lubbock, 1861 (Tylenchoidea: Nematoda). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 34(1), 72-94.
- Nickle, W.R., 1970. A Taxonomic Review of the Genera Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). J. Nematol. 2(4), 375-392.
- Nickle, W.R., 1971. Behavior of the Shothole Borer, *Scolytus rugulosus*, Altered by the Nematode Parasite *Neoparasitylenchus rugulosi*. Ann. Entomol. Soc. Am. 64(3), 751-751.
- Nickle, W.R., 1973. Identification of Insect Parasitic Nematodes-A review. Exp. Parasitol. 33(2), 303-317.
- OEPP/EPPO, 2005. *Ips cembrae* and *Ips subelongatus*. Bulletin OEPP/EPPO 35, 445-449.
- Oldham, J.N., 1930. On the infestation of elm bark beetle (Scolytidae) by a nematode *Parasitylenchus scouti* n. sp. J. Helminthol. 8(4), 239-248.
- Paine, T.D., Raffa, K.F., Harrington, T.C., 1997. Interactions Among Scolytid Bark Beetles, Their Associated Fungi, and Live Host Conifers. Ann. Rev. Entomol. 42, 179-206.
- Penas, A.C., Bravo, M.A., Naves, P., Bonifacio, L., Sousa, E., Mota, M., 2006. Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda:

- Parasitaphelenchidae) and other nematode genera associated with insects from *Pinus pinaster* in Portugal. *Ann. Appl. Biol.* 148, 121-131.
- Peneva, V., Chipev, N., 1999. *Laimaphelenchus helicostoma* (Maslen, 1979) n. comb. (Nematoda: Aphelenchida) from the Livingston Island (the Antarctic). *Bulgarian Antarctic Research: Life Science* 2, 57-61.
- Pfeffer, A., 1955. Fauna ČSR. Svazek 6. Kůrovci Scolytidae. (Řád: Brouci–Coleoptera). Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- Pfeffer, A., 1989. Kůrovcovití Scolytidae a jádrohlodovití Platypodidae. Academia, Praha.
- Pfeffer, A., 1995. Zentral- und westpaläarktische Borken- und Kernkäfer (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae). *Pro Entomologia*, Basel.
- Pfeffer, A., Knížek, M., 1995. Expanze lýkožrouta *Ips duplicatus* (Sahlb.) ze severské tajgy. *ZOL* 2, 8-11.
- Piel, F., Gilbert, M., Franklin, A., Grégoire, J.C., 2005. Occurrence of *Ips typographus* (Col., Scolytidae) along an urbanization gradient in Brussels, Belgium. *Agric. Forest Entomol.* 7, 161-167.
- Poinar, G.O.Jr., 1975. *Entomogenous nematodes*. Brill, Leiden.
- Poinar, G.O.Jr., Caylor, J.N., 1974. *Neoparasitylenchus amvlocercus* sp. n. (Tylenchida: Nematodea) from *Conophthorus monophyllae* (Scolytidae: Coleoptera) in California with a synopsis of the nematode genera found in bark beetles. *J. Invertebr. Pathol.* 24(1), 112-119.
- Poinar, G.O. Jr., Deschamps, H., 1981. Susceptibility of *Scolytus multistriatus* to neoaplectanid and heterorhabditid nematodes. *Environ. Entomol.* 10, 85-87.
- Postner, M., 1974. *Ips cembrae*, in: Schwenke, W., (Eds.), *Die Forstschädlinge Europas*. II. Band. Kafer. Paul Parey, Hamburg, s. 334-482.
- Pschorn-Walcher, H., 1977. Biological control of forest insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22, 1-22.
- Raffa, K.F., Aukema, B.H., Bentz, B.J., Carroll, A.L., Hicke, J.A., Turner, M.G., Romme, W.H., 2008. Cross-scale drivers of natural disturbances prone to anthropogenic amplification: the dynamics of bark beetle eruptions. *BioScience* 58, 501-517.

- Reid, R.W., 1958. Nematodes associated with the mountain pine beetle. Bimonthly Progress Report, Canada Department of Agriculture 14(1), 3.
- Reeve, J.D., 1997. Predation and bark beetle dynamics. *Oecologie* 112, 48-54.
- Roberts, D.W., Hájek, A.E., 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, in: Leatham, G.F., (Eds.), *Frontiers of industrial mycology*. Chapman and Hall, New York, s. 144-159.
- Rühm, W., 1954. Einige neue, ipidenspezifische Nematodenarten. *Zool. Anz. Leipzig*. 53(9-10), 221-242.
- Rühm, W., 1955. Über einige an holzbrütende Ipiden gebundene Nematodenarten. *Zool. Anz. Leipzig*. 155(3-4), 70-83.
- Rühm, W., 1956. Die Nematoden der Ipiden. *Parasitologische Schriftenreihe* 6, Fischer, Jena.
- Rühm, W., 1960. Ein Beitrag zur Nomenklatur und Systematik einiger mit Scolytiden vergesellschafteter Nematodenarten. *Zool. Anz. Leipzig* 164(5-6), 201-213.
- Ryss, A., Vieira, P., Mota, M., Kulinich, O., 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7(3), 393-458.
- Schlyter, F., Anderbrant, O., 1993. Competition and niche separation between two bark beetles: Existence and mechanisms. *Oikos* 68, 437-447.
- Schlyter, F., Zhang, Q.H., Liu, G.T., Ji, L.Z., 2001. A successful case of pheromone mass trapping of the bark beetle *Ips duplicatus* in a forest island, analysed by 20-year time-series data. *Integrated Pest Manag. Rev.* 6, 185-196.
- Schröter, H., 1999. Ausbreitung des Borkenkäferbefalls in Bannwäldern Baden-Württembergs. *Forstschutzprobleme in Nationalparks und Naturschutzgebieten*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstw. Berlin 362, 63-79.
- Siddiqi, M.R., 2000. *Tylenchida: parasites of plants and insects*. CABI, Wallingford, UK.
- Skuhrový, V., 2002: *Lýkožrout smrkový (Ips typographus L.) a jeho kalamity*. Agrospoj, Praha.

- Slankis, A.Y., 1967. *Contortylenchus cylindricus* sp. n. and *Contortylenchus rarus* sp. n. (Tylenchida: Contortylenchidae). Parasites of bark Beetles and taxonomic notes on the genus *Contortylenchus* Rühm 1956. Trudy Gelminto- logischeskoi Laboratorii, 18, 111-118.
- Slankis, A.Y., 1969. A new species of endoparasitic nematode, *Contortylenchus pseudodiplogaster* n.sp. from the bark beetle, *Ips sexdentatus*. Materialy nauchn Konf vsesoiuz Obshestva Gelmint 2, 302-305.
- Slankis, A.Y., 1972. Parasites of bark beetles, *Parasitylenchus dispar* and *P. aculeatus* n.sp. Nematoda, Sphaerulariidae. Zool. Zh. 51(11), 1731-1733.
- Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M., 1996. Quarantine pests for Europe. 2nd ed, CABI, Wallingford.
- Steiner, G., 1932. Some nemtic parasites and associates of the mountin pine beetle (*Dendroctonus monticolae*). J. Agric. Res. 45(7), 437-444.
- Stone, C., Simpson, J.A., 1990. Species associations in *Ips grandicollis* galleries in *Pinus taeda*. N. Z. J. For. Sci. 20(1), 75-96.
- Stratmann, J., 2004. Borkenkäferkalamität 2003 was haben wir gelernt, sind wir für 2004 gerustet? Forst Holz 59, 166-169.
- Subbotin, S.A., Sturhan, D., Chizhov, V.N., Vovlas, N., Baldwin, J.G., 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. Nematology 8, 455-474.
- Susoy, V., Herrmann, M., 2014. Preferential host switching and codivergence shaped radiation of bark beetle symbionts, nematode of *Micoletzkyia* (Nematoda: Diplogastridae). J. Evolution. Bio. 27(5), 889-898.
- Swart, A., 1997. Description of *Laimaphelenchus patulus* sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) from *Pinus pinaster* Ait. in South Africa. African Plant Protection 3, 23-28.
- Takov, D., Doychev, D., Linde, A., Draganova, S., Pilarska, D., 2011. Pathogens of bark beetles (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgarian forests. Phytoparasitica 39(4), 343-352.

- Takov, D., Doychev, D., Wegensteiner, R., Pilarska, D., 2007. Study on the pathogens of bark beetles (Coleoptera, Scolytidae) from different coniferous stands in Bulgaria. *Acta Zool. Bulg.* 59, 87-96.
- Takov, D., Pilarska, D., 2008. Prevalence of *Gregarina typographi* Fuchs (Apicomplexa: Gregarinidae) and nematodes (Nematoda) in bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) from Bulgaria depending on the host gender. *Acta Zool. Bulg.* 60(3), 227-232.
- Takov, D., Pilarska, D., Wegensteiner, R., 2006. Entomopathogens in *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) from several spruce stands in Bulgaria. *Acta Zool. Bulg.* 58, 409-420.
- Takov, D., Pilarska, D., Wegensteiner, R., 2010. List of protozoan and microsporidian pathogens of economically important bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Europe. *Acta Zool. Bulg.* 62, 201-209.
- Tanha Maafi, Z., Subbotin, S.A., Moens, M., 2003. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on the ITS sequences of rDNA. *Nematology* 5, 99-111.
- Tenkáčová, I., Mituch, J., 1980. Helminthofauna of bark beetles (Scolytidae) from spruce from Mníšek nad Hnilcom area. Závěrečná správa, Helmintologický ústav SAV, Košice.
- Tenkáčová, I., Mituch, J., 1983. Helminthofauna podkornáíkovitých (Coleoptera: Scolytidae) z Vysokých Tatier. Závěrečná správa. Helmintologický ústav SAV, Košice.
- Tenkáčová, I., Mituch, J., 1986. A contribution to the knowledge of nematofauna of Scolytidae bark beetles in norway spruce in forest park in Košice. *Lesn. čas.* 32(5), 381-387.
- Tenkáčová, I., Mituch, J., 1987. Nematodes new for the fauna of the Czechoslovak Socialist Republic with the affinity to Scolytids (Coleoptera: Scolytidae). *Helminthologia.* 24, 281-291.
- Tenkáčová, I., Mituch, J., 1988. Nematofauna of bark beetles (Scolytidae) from silver fir (*Abies alba* Mill.) from Polana area. *Lesn. čas.* 34(2), 125-131.

- Tenkáčová, I., Mituch, J., 1991. Nematodes of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Tatra National Park. Zborník prác o Tatranskom národnom parku 31, 173-182.
- Thalenhorst, W., 1958. Grundzüge der Populationsdynamik des großen Fichtenborkenkäfers *Ips typographus* L. Schriftenr. Forstl. Fak. Univ. Göttingen.
- Thong, C.H.S., Webster, J.M., 1972. A redescription of the Bark Beetle Nematode *Contortylenchus brevicomi*: Synonym *Contortylnchus barberus* (Nematoda: Shaerulariidae). J. Nematol. 4(3). 213-216.
- Thong, C.H.S., Webster, J.M., 1973. Morphology and the postembryonic development of the bark beetle nematode *Contortylenchus reversus* (Sphaerularidae). Nematologica 19, 159-168.
- Thong, C.H.S., Webster, J.M., 1975. Effects of the bark beetles nematode, *Contortylenchus reversus* on gallery construction, fecundity and egg viability of the douglas fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Scolytidae). J. Invertebr. Pathol. 26, 235-238.
- Thong, C.H.S., Webster, J.M., 1983. Nematode parasites and associates of *Dendroctonus* spp. and *Trypodendron lineatum* (Coleoptera: Scolytidae) with description of *Bursaphelenchus varicauda* n. sp. J. Nematol. 15(2), 312-318.
- Thorne, G., 1935. Nemic parasites and associates of the mountain pine beetle (*Dendroctonus monticolae*) in Utah. J. Agr. Res. 51(2), 131-144.
- Thorne, G., 1949. On the classification of the Tylenchida, new order (Nematoda, Phasmida). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 16(2), 37-73.
- Tomalak, M., Welch, H.E., Galloway, T.D., 1989. Nematode parasites of bark beetles (scolytidae) in southern Manitoba, with descriptions of three new species of *Sulphuretylenchus* Rühm (Nematoda: Allantonematidae). Can. J. Zool. 67, 2497-2505.
- Turčáni, M., 2000. Lykožrút severský (*Ips duplicatus*) - Skúsenosti na Slovensku po troch rokoch monitoringu a perspektívy ďalšieho vývoja. Les 56(1), 18-19.

- Turčáni, M., Holuša, J., Kalinová, B., Hlásny, T., Čížková, D., Šrůtka, P., Nakládal, O., Marušák, R., Modlinger, R., Matoušek, P., Mašánková, K., Kovářová, I., Zajíčková, L., Půža, V., Zahradník, P., 2008. Studium a optimalizace skutečné efektivity obranných opatření proti lýkožroutu smrkovému v různých gradačních fázích, Periodická zpráva za rok 2008, XII/2008 Výzkumný projekt NAZV- QH81136, Praha.
- Unal, S., Yaman, M., Tosun, O., Aydin, C., 2009. Occurrence of *Gregarina typographi* (Apicomplexa, Gregarinidae) and *Metschnikowia typographi* (Ascomycota, Metschnikowiaceae) in *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) populations in Kastamonu (Turkey). J. Anim. Vet. Adv. 8, 2687-2691.
- Vakula, J., Brutovský, D., Gubka, A., Galko, J., Kunca, A., 2009. Assessment of monitoring of double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* Sahlb. in 2009 in Forests of SVK, s. c. some non-state actors. NLC–LVÚ, Zvolen, Slovakia.
- Világiová, I., 1990. Helminthofauna podkôrníkovitých (Coleoptera: Scolytidae) na Slovensku. (Kandidátska dizertácia), Helminologický ústav SAV, Košice.
- Világiová, I., 1993. Helminty podkorníkovitých (Coleoptera: Scolytidae) v suburbánnej oblasti Košíc. Les. časopis 39, 183-188.
- Wachek, F., 1955. The Entomoparasitic Tylenchids. Parasitol. Schrift. Fischer. Jena. 3, 1-119.
- Wanka, T., 1927. Fourth contribution of Coleopterenfauna from Austria Silesia. Wiener Ent. Zeit. 46, 1.
- Wegensteiner, R., 1994. *Chytridiopsis typographi* (Protozoa, Microsporidia) and other pathogens in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). IOBC/wprs Bulletin 17, 39-42.
- Wegensteiner, R., 2004. Pathogens in bark beetles, in: Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F., (Eds.), Bark and wood boring insects in living trees in Europe, Asynthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 291-313.
- Wegensteiner, R., Dedryver, C.A., Pierre, J.S., 2010. The comparative prevalence and demographic impact of two pathogens in swarming *Ips typographus*

- adults: a quantitative analysis of long term trapping data. *Agric. Forest Entomol.* 12, 49-57.
- Wegensteiner, R., Weiser, J., 1995. A new entomopoxvirus in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invertebr. Pathol.* 65, 203-205.
- Wegensteiner, R., Weiser, J., 1996: Occurrence of *Chytridiopsis typographi* (Microspora, Chytridiopsida) in *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) field population and in a laboratory stock. *J. Appl. Entomol.* 120, 595-602.
- Wegensteiner, R., Weiser, J., 2004. Annual variation of pathogen occurrence and pathogen prevalence in *Ips typographus* L. (Col, Scolytidae) from the BOKU University Forest Demonstration Centre. *J. Pest Sci.*, 77: 221-228.
- Wegensteiner, R., Weiser, J., Führer, E., 1996. Observations on the occurrence of pathogens in the bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *J. Appl. Entomol.* 120, 199-204.
- Weiser, J., 1954. Contributions to the knowledge of *Ips typographus* parasites, I. *Věstník Československé Zoologické společnosti* 19, 217-224.
- Weiser, J., 1966. *Nemoci hmyzu*. Academia, Praha.
- Weiser, J., 2002. Patogenní organismy, in: Skuhřavý, V., (Eds.), *Lýkožrout smrkový (Ips typographus L.) a jeho kalamity*. Agrospoj, Praha, s. 97-100.
- Weiser, J., Mráček, Z., 1988. *Parazitické hlístice hmyzu*. Academia, Praha.
- Weiser, J., Holuša, J., Žižka, Z., 2006. *Larssoniella duplicati* n. sp. (Microsporidia, Unikaryonidae), a newly described pathogen infecting the double-spined spruce bark beetle, *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in the Czech Republic. *J. Pest Sci.* 79, 127-135.
- Weiser, J., Pultar, O., Žižka, Z., 2000. Biological protection of forest against bark beetle outbreaks with poxvirus and other pathogens. *IUAPPA, Section B*, 12, 168-172.
- Weiser J., Wegensteiner, R., 1994. A new entomopoxvirus in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) in Czechoslovakia. *Z. Angew. Entomol.* 80, 425-434.
- Weiser, J., Wegensteiner, R., Händel, U., Žižka, Z., 2003. Infections with the Ascomycete *Metschnikowia typographi* n. sp. in the bark beetle *Ips*

- typographus* and *Ips amitinus* (Col., Scolytidae.). Folia Microbiol. 48, 611-618.
- Weiser, J., Wegensteiner, R., Žižka, Z., 1998. *Unikaryon montanum* sp.n., (Protista, Microspora), a new pathogen of the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). Folia Parasitol. 45, 191-195.
- Weslien, J., 1994. Interactions within and between species at different densities of the bark beetle *Ips typographus* and its predator *Thanasimus formicarius*. Entomol. Exp. Appl. 71, 133-143.
- Weslien, J., Lindelöw, A., 1990. Recapture of marked spruce bark beetles (*Ips typographus*) in pheromone traps using area-wide mass trapping. Can. J. Forest Res. 20, 1786-1790.
- Wermelinger, B., 2004. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*-a review of recent research. Forest Ecol. Manag. 202, 67-82.
- Wichmann, L., Ravn, H.P., 2001. The spread of *Ips typographus* (L.) (Coleoptera, Scolytidae) attacks following heavy windthrow in Denmark analysed using GIS. Forest Ecol. Manag. 148, 31-39.
- Yaman, M., 2007. *Gregarina typographi* Fuchs, a gregarine pathogen of the six-toothed pine bark beetle, *Ips sexdentatus* (Boerner) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) in Turkey. Turk. J. Zool. 31, 359-363.
- Yaman, M., Baki, H., 2011. First Record of Entomopoxvirus of *Ips typographus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) for Turkey. Acta Zool. Bulg. 63, 199-202.
- Yatsenkowsky, A.W., 1924. The castration of *Blastophagus* of pines by roundworms and their effect on the activity and life phenomena of the Ipsidae. Publication of Agriculture Institute, Western White Russian 3, 1-19.
- Zahradník, P., Knížek, M., 2000. Lýkožrout smrkový – *Ips typographus* (L.), Les. práce 10, 8.
- Zahradník, P., Knížek, M., 2007. Leták LOS - Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (L.). Les. práce, 86(4), 1-8.
- Zhang, Q.H., Schlyter, F., 1995. Distribution, mortality and sex-ratio of overwintering *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in the soil of *Picea*

- koraiensis* reserve in Inner Mongolia, China, with a model of diffusion. in: Hain, F.P., Salom, S., Ravlin, W., Payne, T.L., Raffa, K.F., (Eds.), Behavior, Population Dynamics and Control of Forest Insects, Ohio State University, OARDC, Wooster, OH. s. 99-101.
- Zhang, Q.H., Liu, G.T., Schlyter, F., Birgersson, G., Anderson, P., Valeur, P., 2001. Olfactory responses of *Ips duplicatus* from inner Mongolia, China to nonhost leaf and bark volatiles. J. Chem. Ecol. 27, 995-1010.
- Zitterer, P.M., 2002. Antagonists of *Ips acuminatus* (Gyllenhall) with special consideration of pathogens. Diploma thesis. Department fur Wald- und Bodenwissenschaften, Universität fur Bodenkultur. Vienna.
- Zumr, V., 1982. Podklady pro prognózu rojení hlavních druhů kůrovců (Coleoptera, Scolytidae) na smrku ztepilém (*Picea excelsa* L.). Sborn. ČSAZV, Lesnictví 28, 941-960.
- Zumr, V., 1995. Lýkožrout smrkový – biologie prevence a metody boje. Matice lesnická, Písek.