

Mendelova univerzita v Brně
Lesnická a dřevařská fakulta

**Detekce výskytu *Hymenoscyphus fraxineus*
pomocí lapačů spor a molekulárně
biologických metod ve Vranovickém lese**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:
Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.

Vypracovala:
Daniela Smetanová

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: Detekce výskytu *Hymenoscyphus fraxineus* pomocí lapačů spor a molekulárně biologických metod ve Vranovickém lese vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne _____

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá nekrózou jasanů, kterou způsobuje patogen *Hymenoscyphus fraxineus*. Práce je zaměřena na vyhodnocení souvislosti mezi klimatickými podmínkami a výskytem inokula patogenní houby. Praktická část obsahovala sběr dat na výzkumné ploše ve Vranovickém lese pomocí lapače spor Burkardova typu. Následovalo zpracování dat v laboratoři, kde byla provedena extrakce DNA a aplikace qPCR za účelem kvantifikace DNA ve vzorcích.

Klíčová slova

nekróza jasanů, extrakce DNA, qPCR, spory

Abstract

This bachelor thesis deals with ash dieback. It is caused by *Hymenoscyphus fraxineus* pathogen. The thesis is focused on the evaluation of the connection between climatic conditions and the occurrence of inoculum of this pathogenic fungi. The practical in the field consists of fair sampling. The research area was in the forest in Vranovice. The traps of Burkard's type were used during the collection. Data were processed in the laboratory after the collection, where DNA was extracted and qPCR applied in order to quantify DNA in samples.

Keywords

ash dieback, DNA extraction, qPCR, spores

Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat především svým rodičům Haně Smetanové a Jaroslavu Smetanovi za podporu při celém studiu. Díky patří i mému příteli Michalu Grabovskému za podporu a pevné nervy při psaní této práce.

Dále děkuji mému vedoucímu práce Ing. Miloňovi Dvořákovi PhD. za odbornou pomoc při řešení problémů a profesionální přístup.

Nemalé dík si zaslouží moje rodina, přátelé a kamarádi - obzvláště Monika a Matěj Grabovští za poskytnutí cenných rad v tomto krutém období.

Obsah

1. Úvod	4
2. Cíl	5
3. Literární přehled	6
3.1. Popis dřevin	6
3.1.1. Jasan ztepilý (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	6
3.1.2. Jasan úzkolistý (<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.)	7
3.1.3. Jasan zimnář (<i>Fraxinus ornus</i> L.)	8
3.2. Původce nekrózy jasanů	9
3.3. Historie šíření nekrózy jasanů	9
3.3.1. Nekróza jasanů v Česku	11
3.4. Symptomy	11
3.5. Další škůdci související s nekrózou jasanů	13
3.6. Taxonomie a životní cyklus původce nekrózy jasanů	15
3.7. Aerobiologie	17
3.8. Typy lapačů spor	18
3.8.1. Objemové lapače spor	18
3.8.2. Schenckův lapač spor	19
3.8.3. Panzerův lapač spor	20
3.8.4. Grainerův lapačspor	20
3.8.5. Davisův a Sechlerův lapač	20
3.8.6. Miniaturní lapač spor	21
3.8.7. Manuálně ovládaný přenosný lapač spor	21
3.8.8. Czabatarův a Scottův lapač spor	22
3.8.9. Morrisův lapač spor	22

4.1. Popis lapače spor	23
4.2. Postup při výměně pásky v lapači.....	25
4.3. Postup zpracování vzorků v laboratoři.....	27
4.4. Metoda qPCR.....	27
4.5. Popis lokality.....	28
5. Výsledky	28
6. Diskuze	30
7. Závěr	31
8. Summary	33
9. Použitá literatura	34
10. Přílohy	38

Seznam obrázků

Obrázek 1: Šíření nektrózy jasanů v Evropě (https://www.researchgate.net/publication/227728837/)	10
Obrázek 2: Symptomy nektrózy jasanu: A) zbarvená dřevní část, B) nekrotizované řapíky listu, C) nekrotické, zbarvené léze na větvích (Orrgis et al. 2009)	12
Obrázek 3: Životní cyklus <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (Gross et al . 2012)	17
Obrázek 4: Meteorologická stanice a měřič vlhkosti listu (Foto: Smetanová, VII/ 2015, Vranovický les)	24
Obrázek 5: Lapač spor Burkardova typu, ve Vranovickém lese (Foto: Smetanová, VII/ 2015, Vranovice)	24
Obrázek 7: Mikroskopavky (Foto: Smetanová, IV/2015, Brno)	26
Obrázek 6: Výměna pásky v lapači (Foto: Smetanová, V/2015, Vranovice)	26
Obrázek 8: Polystyrenová podložka, sloužící k rozřezání pásky (Foto: Smetanová, IV/ 2016, Brno)	26
Obrázek 9: Grafické zobrazení výsledku (Graf: Smetanová IV/ 2016, Brno)	28

1. Úvod

Hymenoscyphus fraxineus napadá pouze jasaný. Tyto dřeviny jsou šestou nejrozšířenější dřevinou v České republice. U nás je původní druh jasan ztepilý *Fraxinus excelsior* L. a jasan úzkolistý *Fraxinus angustifolia* Vahl. Jasaný jsou vysazovány jak ve městech, tak i kolem řek nebo v lesích. Nejvíce se jim však daří v půdách s neutrálním pH.

Jasaný byly dříve nazývány jako tzv. bezproblémové dřeviny a netrpěly ani významnými chorobami, to se však rychle změnilo. Nekróza jasanů se objevila v 90. letech 20. stol v Evropě, konkrétně v polském Pobaltí. Postupně se choroba šířila i do dalších evropských zemí včetně České republiky, kde byla potvrzena v roce 2007. Nejvíce jsou napadány jasan ztepilý (*F. excelsior*) a jasan úzkolistý (*F. angustifolia*). Patogen poškozují stromy všech věkových kategorií na různých stanovištích jak ve městech, tak ve volné krajině i v lesích. Příznaky nemoci jsou nekrotizovaná pletiva řapíků listů a jejich předčasný opad. Kmen, kořeny i vzdušné kořeny jsou poškozovány pod kůrou jak v lýku, tak i ve dřevě doprovázené zbarvením. Odumírání větví, nekrotické, do hněda zbarvené léze v okolí pupenů a celkové prosychání korun stromů, směřuje k záhubě celého stromu. Reakce dřeviny je taková, že se vytvoří výmladky vyrůstající pod odumřelými částmi větví a vzniká shlukovité olistění.

Na jižní Moravě se tato nemoc vyskytuje například ve Vranovickém lese a protože tuto oblast dobře znám, tak jsem se rozhodla využít pro svou bakalářskou práci toto téma. Také jsem chtěla pomoci objasnit biologické chování *Hymenoscyphus fraxineus*.

2. Cíl

V této práci se zabývám nekrotou jasanů, přesněji houbou *Hymenoscyphus fraxineus*. Cílem této práce bylo zpracování nasbíraných vzorků v laboratoři – extrakce DNA a následné aplikace qPCR za účelem kvantifikace dat ve vzorcích. Hlavním cílem bylo pomocí statistických metod zjistit vztah mezi klimatickými podmínkami a patogenem *H. fraxineus* a interpretovat výsledky za pomoci statistických metod.

3. Literární přehled

3.1. Popis dřevin

3.1.1. Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.)

Jasan ztepilý (*F. excelsior* .) je hojným druhem v Evropě, díky své ekologické charakteristice je cenným listnatým stromem, který má dobré vlastnosti dřeva. Jasanu se nejlépe daří na neutrálních, hlubokých, propustných půdách. Tato celkem rychle rostoucí dřevina je běžná v celé Evropě s výjimkou centrální a jižní části Pyrenejského poloostrova, na jihovýchodě Turecka, severní Skandinávie, Islandu a nejsevernější části Britských ostrovů. Přirozený výskyt jasanů se shoduje s dubem letním (*Quercus robur* L.) V jižní části se k jasanu ztepilému připojuje i jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) a jasan zimnář (*Fraxinus ornus* L.). Nejběžnějšími druhy jasanů v Evropě je jasan ztepilý a úzkolistý. Jasan roste v severní a západní části Evropy v nížinných lesích, zatímco ve střední a jižní Evropě se vyskytuje i v horských oblastech ve výšce až do 1600 – 1800 m. n.m. a v severním Íránu dokonce až 2200 m.n.m. Ve východní části Evropy rostou jasanové především v lužních lesích a na vlhkých jílovitých půdách. Na druhou stranu mohou růst i na relativně suchých místech, například na horských, kamenitých svazích a lesních roklích. Často se vyskytuje ve smíšených listnatých lesích, kde dominuje buk lesní (*Fagus sylvatica* L.) dub zimní (*Quercus petraea* Liebl.), javor klen (*Acer pseudoplatanus* L.), olše lepkavá (*Alnus glutinosa* L.) a olše šedá (*Alnus incana* L.) Jasanům se daří ve více ekotypech s výjimkou míst s kyselou půdou. Ukazatelem vhodné půdy pro jasanové jsou byliny, například medvědí česnek, kopřiva dvoudomá a čarovník pařížský. Jasan je považován za náročný typ, pokud jde o vyšší požadavky ohledně dusíku, vápníku, hořčíku a fosforu, nejvíce ale potřebuje dusík. Jasanové snášejí krátkodobé záplavy, ale nejsou tolerantní k stojaté vodě z důvodu nedostatku kyslíku, a také nesnášejí ztuhlou půdu. Výkyvy podzemní vody mohou mít za následek prosychání korun stromů. Jasanové jsou citlivé na tuhé zimy a koncem jara na mrazíky. Sazenice a mladé stromy jsou tolerantní k zastínění, ale postupně se stávají na světelné podmínky náročnými (Dobrowolska et al. 2011).

Jasan ztepilý (*F. excelsior*). je největší strom z rodu *Fraxinus* a při dosažení 90-120 let může měřit 20-35 m (maximálně 40 m) výšky. Průměr kmene se pohybuje od 30-70cm u dospělých dřevin. Koruna má nepravidelný tvar s mohutnými a protáhlými větvemi v lesním porostu. Kvetení začíná v 15-20 letech života v nepravidelném cyklu a trvá zhruba 30 let (Pliura a Heuertz, 2003).

V České republice jasanů činí 3,5% plošného podílu v lesní druhové skladbě a je šestou nejrozšířenější dřevinou. Rostou po celé ČR od nížin až po horské plochy, nejvíce v planárním a kolinném stupni lužních lesů a také v suťových lesích kolinného až montánního stupně. Jasanů nikdy dříve nepatřily k problémovým dřevinám (Nárovec et al 2008).

3.1.2. Jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* Vahl.)

Jasan úzkolistý (*F. angustifolia*) je středně velký listnatý opadavý strom, rostoucí do výšky 40 - 45 m a kmen dosahuje průměru až do 1,5 m. Koruna je hustá a nepravidelná. Jeho kůra je šedá, hladká, ale postupem času popraská. Listy jsou složité, lichozpeřené, štíhlé, 3-8 cm dlouhé a 1-1,5 cm široké, leskle zelené a lysé. Plody jsou nažky 3-4 cm dlouhé, zploštělé a s křídlem, ke zrání dochází na konci léta. Vyskytuje se hlavně na území s mírnými klimatickými podmínkami, s ročními srážkami mezi 400 – 800 mm. Daří se mu na vlhkých půdách, provzdušněných s pH mezi 5 a 8. Ve středo-mořských oblastech může růst i na sušších místech s vyšší nadmořskou výškou. Ve střední Evropě, Panenské pánvi a Balkánu se jasan úzkolistý vyskytuje především v nížinách, v lužních lesích a podél velkých řek a také se používá do městských výsadeb (Caudullo a Durrant, 2016). *F. angustifolia* je také široce používán ve střední a jižní Evropě jako okrasný strom podél silnic (Fraxigen, 2016).

3.1.3. Jasan zimnář (*Fraxinus ornus* L)

Jasan zimnář (*F. ornus*) je středně velký listnatý strom, s dosahující výškou až 25 m a o průměru kmene kolem 1 m. Kůra je tmavě šedá, obvykle velmi hladká i u starých stromů. Koruna je často asymetrická, polokulovitá nebo zploštělá s přímým kmenem, větve směřují vzpřímeně vzhůru. Pupeny jsou šedohnědé hustě porostlé krátkými šedými chloupky. Listy jsou složité, 25-30 cm dlouhé, lichozpeřené, složité z 5-9 listů, které jsou vejčité, zašpičatělé a 7-10 cm dlouhé. Zabarvení listů je olivově zelené a na podzim tmavě růžové. Květy jsou seskupeny ve velkých květenstvích 10-20 cm dlouhé, kvetoucí na konci jara ve stejnou dobu, kdy raší listů. Květy voní a lákají řadu opylujícího hmyzu, i když nevytvářejí nektar. Jasan zimnář je rozšířen v jihozápadní Evropě a jihovýchodní Francii, přes Itálii, středomořské ostrovy, Balkánský poloostrov, až do západního Turecka. Severní hranice přirozeného výskytu jasanu jsou na jižním okraji Alp, v Maďarsku a transylvanských horách, ale je také přítomen ve více severských zemích jako okrasný strom (Caudollo a Rigo, 2016).

3.2. Původce nekrózy jasanů

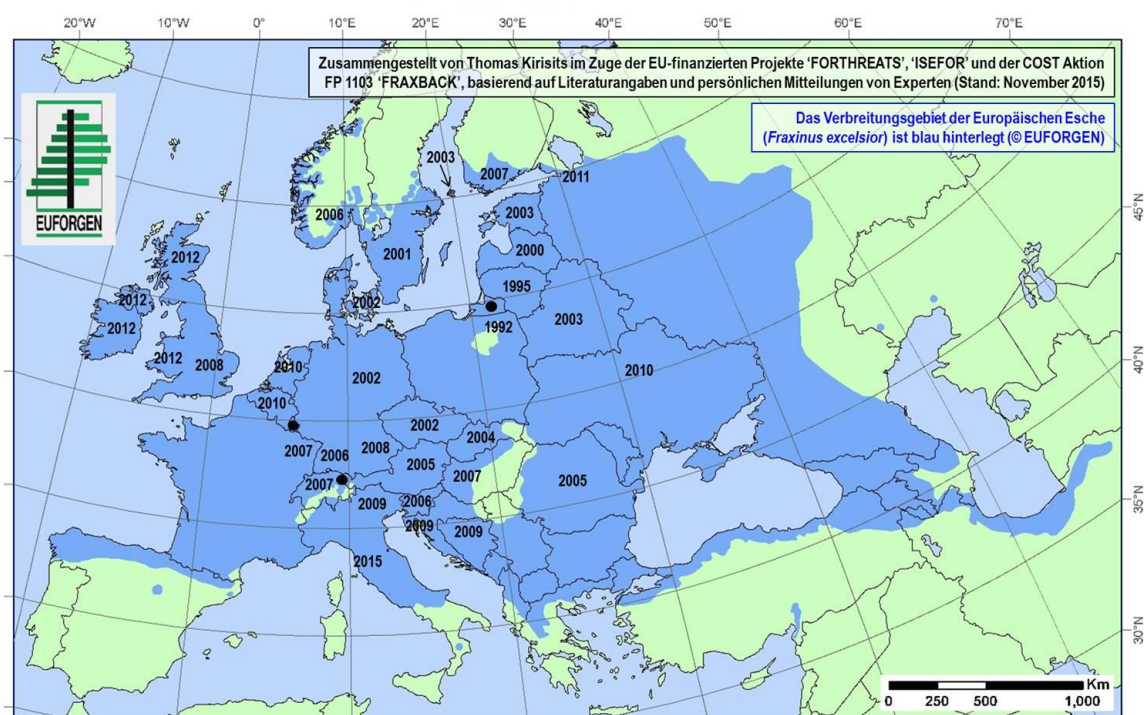
Původce odumírání jasanů *Chalara fraxinea* (Kowalski et al. 2006), to je nepohlavní stadium, které bylo zaznamenáno v mnoha Evropských zemích (viz. obr. č. 1). Poté, co byla *Chalara fraxinea* publikována, k ní byl pomocí molekulárních metod přiřazen *Hymenoscyphus albidus* jako sexuální stadium (Kowalski a Holdenrieder, 2009). *H. albidus* je ale zaznamenán v Evropě od roku 1850 nebo i dříve, jako saprofyt na opadaných listech jasanu, *H. albidus* nikdy nebyl hlášen jako patogen. Na základě molekulárních dat získaných z apotecia nebo kultur vzorků ze Švýcarska a dalších evropských zemí, Queloz et al. (2011) došel k závěru, že *H. albidus* představuje jeden ze dvou jasně oddělených druhů, které autoři dříve považovali za morfologicky nerozlišitelné. *H. albidus* byl jediný druh, který se vyskytl v oblastech bez odumírání jasanů, a proto se došlo k závěru, že tento druh na živých pletivech jasanů neškodí. U houby, považované za teleomorfu *Ch. fraxinea*, se zjistilo, že se jedná o jiný druh, který byl pojmenován *H. pseudoalbidus*.

U tohoto patogenu bylo později prokázáno, že byl zavlečen z Asie, kde byl dříve uváděn pod názvem *Lambertella albida* (syn. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*). Od roku 2014 platí jediný oficiální název *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski). (Baral a Queloz, 2014)

3.3. Historie šíření nekrózy jasan

V Evropě se příznaky odumírání jasanu objevují již v 90. letech 20. století v Polském Pobaltí. Později byla choroba popsána jako *Chalara fraxinea* (T. Kowalski et al. 2006). Nekróza se v roce 2000 objevuje v Lotyšsku, v roce 2001 ve Švédsku, v roce 2002 v Estonsku, v Dánsku v roce 2003, v jižním Norsku a Finsku v roce 2005. Také v dalších zemích se choroba projevila, a to v roce 2002 v Německu, v roce 2004 na Slovensku, v Rumunsku, Maďarsku a Rakousku v roce 2005, v roce 2006 na Slovinsku a v Chorvatsku, v roce 2007 ve Švýcarsku a v Itálii v roce 2009 (Jankovský et al. 2009). Výskyt *H. fraxineus* byl potvrzen v letech 2010 až 2011

v Belgii, Rusku, Nizozemsku a Ukrajině (Lustr et al., 2011, Davyďenko et al., 2013, Kopinga a de Vries, 2012 in Rozsypálek, 2012, s. 4). V roce 2011 ve Velké Británii, Irské republice a Severním Irsku (Douglas a Ryan, 2012 in Rozsypálek, 2012). V roce 2013 byla nekróza potvrzena v Bosně a Hercegovině (Eforgen, 2016). V současnosti je choroba rozšířená v 22 zemích Evropy (Longauerová et al. 2013). *H. fraxineus* je smrtelný invazivní patogen, který pochází z východní Asie a je hlavní příčinou odumírání jasanů (Dvořák et al. 2016). Choroba se rozšířila do velké části Evropy, vlna epidemie se pohybuje od severovýchodu, především na jihozápad Evropy, na sever, jih a východ méně (Havrďová et al. 2014). Odumírání jasanů je velkou hrozbou pro biologickou rozmanitost v Evropě, smrt velkého množství dřevin může mít významné ekologické dopady na lesní ekosystémy, včetně stromové biomasy (Pautaso et al. 2012).



Obrázek 1: Šíření nekrózy jasanů v Evropě (<https://www.researchgate.net/publication/227728837/>)

3.3.1. Nekróza jasanů v Česku

Patogen se v ČR vyskytuje od roku 2002, vyplývá to ze studia herbářových dokladů z Národního muzea. Ale je velmi pravděpodobné, že se zde patogen vyskytuje již od konce 90. let, kdy byly pozorovány první chřadnoucí jasanů. Chřadnutí jasanů bylo nejspíše dlouhou dobu přehlíženo (Havrdová et al. 2014). Poškození nektrózou jasanů mohlo být zaměněno za poškození stromů mrazem či zasolením substrátu alejových stromů podél silnic a chodníků (Jankovský et al. 2009).

První ověřená identifikace *C. fraxinea* v České republice byla laboratorně provedena O. Holdenriederem (ústní sdělení a poskytnutí kultury) ze vzorku odebraného z *Fraxinus excelsior* cv. „Pendula“ v arboretu ve Křtinách na Drahanské vrchovině v září 2007.“ Již v letech 2004 až 2009 se projevy choroby objevovaly na různých místech ČR, v Beskydech, Krkonoších, Šumavě, Jeseníkách, Českomoravské vrchovině, východních Čechách, v okolí Prahy, Drahanské vrchovině, Chříbech a Hostýnských vrších. Termín pro toto onemocnění, infekci jasanů způsobovanou houbou *C. fraxinea*, byl navrhnout Jankovským jako „nekróza jasanů“. Nejvíce je napadán druh jasan ztepilý (*F. excelsior*) a jasan úzkolistý (*F. angustifolia*) (Jankovský et al. 2009). Později se zjistilo, že *H. fraxineus* (dříve znám jako anamorfní stádium *C. fraxinea*) vykazuje typické znaky chřadnutí jasanů. Bylo tedy určeno, že primární příčinou odumírání jasanů v Evropě, je právě tato choroba (Rozsypálek, 2015).

3.4. Symptomy

Příznaky nektrózy jasanů jsou různorodé a vyskytují se na široké škále orgánů a pletiv dřevin (listy, prýty, větve, kmene, báze kmene a dokonce i kořeny), (viz. Obrázek č. 2). Symptomy v koruně stromů zahrnují odumírání výhonů, větví, nekrotické léze na listech a listových řapících, napadení listové žilnatiny a následné vadnutí a předčasný opad listů. Kmen, kořeny i vzdušné kořeny jsou poškozovány pod kůře doprovázené zbarvením (Krautler et al. 2015). Díky prorůstání mycelia pod kůrou dochází

k odumírání kambia, následně mycelium prorůstá i do dřevní, která také odumírá (Košťálová a Sázelová, 2010). V některých případech může dřevina oddělit napadenou část kalusem a infekci zastavit (Havrdová et al. 2014). Vliv infekce na zdravotní stav a přežití stromu ovlivňuje více faktorů – již zmíněný věk, povětrnostní podmínky, přítomnost jiných patogenních organizmů, hmyzu a hub (Longauerová et al. 2013).

Patogen prostupuje pupeny, lenticelami i místem posátí hmyzem. Je možné, že mycelium nekrózy přežívá zimu v pletivech hostitele a pak se dále šíří a zvyšuje se poškození dřeviny (Koukol a Havrdová, 2014). Odumírání lýka způsobuje zvětšování nekrózy ve dřevině a následné vadnutí listů a odumírání až celých výhonů. Zbarvení nekrózy je často hnědé a šedé, podélně se rozšiřující v místě léze, které jsou nejdříve okrouhlé a dále jsou přetvořeny v propadlé a elipticky protáhlé skvrny. Přejít mezi živým a napadeným pletivem je velmi ostrý (Košťálová a Sázelová 2010).

Na listech se jako první příznaky vyskytují hnědé až černé nekrotické léze. Nekróza postupně prorůstá žilnatinou až k hlavní listové žilce. Následně list vadne distálním směrem od nekrotických lézí, díky čemuž listy brzy schnou a opadají (Kirisits et al. 2009). Listy mohou předčasně opadat ještě zelené, čímž dojde k úplné defoliaci napadených dřevin (Rozsypálek, 2015).



Obrázek 2: Symptomy nekrózy jasanu: A) zbarvená dřevní část, B) nekrotizované řapíky listu, C) nekrotické, zbarvené léze na větvích (Orrgis et al. 2009)

H. fraxineus vyvolává příznaky, jakými jsou léze a nekrózy v okolí pupenů a odumírání kambia pod kůrou. Nekróza se tvoří kolem listové jizvy a infekce se šíří z napadených listů a řapíků listů do dřevní části a to oběma směry – asimilačním i transpiračním. (Kiristis et al. 2008). Tyto příznaky mohou vést až k úplnému odumření dřeviny (Kirisits et al. 2008).

Nekróza jasanů napadá všechny věkové kategorie na různých stanovištích, nejvíce ovšem mladé stromy (Košťálová a Sázelová, 2008). Napadány jsou jak solitérní dřeviny, tak i roztroušené výsadby, břehové vegetace, různé typy lesů, stromořadí, okrasná zeleň měst a větrolamy (Koukol a Havrdová, 2014).

Sazenice a mladé výsadby jsou nekrózou napadány rychleji a ve větším rozsahu než dospělé stromy. Mladí jedinci mohou v důsledku choroby odumřít i během jedné vegetační sezóny. Vzrostlí jedinci reagují na napadení výhonů postupným řidnutím koruny. Dochází k výraznému napadení výhonů a tím i prosychání po obvodu koruny, dále odumírají drobné a později i kosterní větve. Dřevina reaguje na onemocnění patogenem tím, že tvoří výmladky vyrůstající pod odumřelými částmi větví a vzniká shlukovité olistění. Poškozeno může být 80 – 90% objemu koruny. Stromy, které jsou takto poškozené a oslabené nezabezpečují všechny své funkce a většinou odumírají (Havrdová et al. 2014). Nemoc byla zatím zjištěna pouze u jasanů. (Košťálová a Sázelová, 2010).

3.5. Další škůdci související s nekrózou jasanů

Jankovský (2009) uvádí, že v období květen – červen v několika lokalitách s výskytem nekrózy byly pozorovány gradace mšic a červců, především dutilek *Prociphilus bumeliae* (Schrank, 1801) a *Prociphilus fraxini* (Fabricius, 1777)“.

Dutilka jasanová (*Prociphilus bumelia*), která pochází ze severozápadní, střední a východní Evropy, je relativně velká mšice. Tyto dutilky na jasanech způsobují zkadeření a tvorbu tzv. listových hnízd, díky sání na rašících listech. Dalšími znaky jsou potřísněné listy cukernatými šťávami (Beránek, 2011).

Krasec *Agrilus planipennis* je významným podkorním škůdcem jasanů, ale může škodit i na jiných listnatých dřevinách. Brouk kovově zelenomodré barvy a klínovitého tvaru, pocházející z Asie má vysoký invazivní potenciál a v Evropské unii je řazen jako karanténní škodlivý druh. Poprvé byl zaznamenán v evropské části Ruska, přesněji v Moskvě. V České republice nebyl zatím výskyt zjištěn, ani v jiných zemích EU. Příznakem jsou úživné žíry na listech a výletové otvory v kůře. Vylíhlé larvy se nejdříve prokousají kůrou do kambia, následně vytváří zakřivené chodbičky, které s postupným růstem larvy rozšiřují a jsou zaplněné trusem a pilinami. Krasec rodu *Agrilus* vytváří typické chodbičky pod kůrou esovitě zakřivené, dalším znakem jsou dřevěné drtinky kolem místa žíru. Při napadení dřeviny dochází ke žloutnutí, odumírání větví a korun. Obvykle k úplnému odumření dojde po 3 letech. Pokud je strom silně napaden, odumře i během 1 – 2 let. Evropským zástupcem je *Agrilus convexicollis* (Spurná et al. 2010).

A. planipennis je opravdu významným škůdcem jasanů, hlavně pokud se jedná o nepůvodní oblasti. Velké škody na jasanech, které krasec způsobil po zavlečení jen v několika málo letech v Severní Americe, dokládají, že je zde, jako invazivní druh. Je dost možné, že tento druh s vysokým invazivním potenciálem, po osídlení Evropy by tak mohl významně uškodit v okrasných výsadbách, což by vedlo ke snížení výběru okrasných dřevin (Spurná et al. 2010).

Lýkohub jasanový *Hylesinus varius* (Fabricius, 1775) obývá skoro celou Evropu. Na východu zasahuje až do Číny a na jižní části prochází severní Afrikou. Jasany jsou nejčastěji napadány ve středním a mladším věku. Pokud dojde k přemnožení, mohou i jednotlivé mladé stromky odumřít. Brouci nalétávají na nové stromy a v jizvách po starších větvích provádějí úživný žír. V současnosti je spoluúčastníkem při chřadnutí a nekróze jasanů. Při tomto odumírání není úloha brouka zatím dokonale objasněna, avšak hraje zde významnou sekundární roli. Lýkohub zrnitý *Hylesinus crenatus* (Fabricius, 1787) se zaměřuje na starší kmeny a stromořadí, které dokáže opakovanými nálety zničit. Nálet na stromy probíhá v létě a to v červenci a srpnu. Lýkohub zrnitý žije a pře-

zimuje pod kůrou silných jasanů, na kterých se pak vytvoří korová růžice, díky opakovanému přezimování (Modlinger a Knížek, 2012).

Také houby z rodu *Armillaria* se běžně vyskytují na jasanech spolu s *H. fraxineus* a mohou působit jako sekundární činidlo úmrtnosti. Dosud byla tato houba vyloučena, že je primárním stresorem (Chandelier et al. 2010). Stres stromů vyvolaný václavkou s následnou defoliací, může zvýšit hromadění zásob cukru v kořenových systémech a může proto snížit chemickou obranyschopnost, čímž se vytvoří vhodnější podmínky pro infekce způsobené *Armillaria* spp. (Longauerová et al. 2013).

K dalším škůdcům jasanů patří např. fytoftory (*Phytophthora* spp.), verticilia (*Verticillium* spp.), padlí jasanové (*Phyllactinia fraxini*), rážovka (*Nectria galligena*), pseudomonáda (*Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*), rezavec štětinatý (*Inonotus hispidus*) a další organismy (Havrdová et al. 2014).

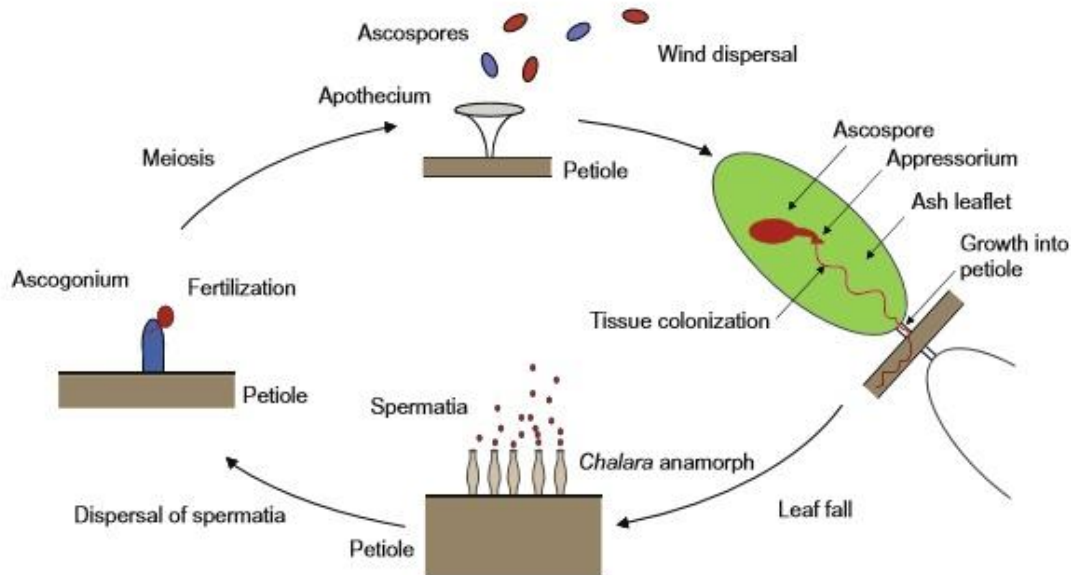
3.6. Taxonomie a životní cyklus původce nekrózy jasanů

Díky askosporám unášeným větrem se choroba dokáže velmi dobře šířit (Seifertová, 2014). *H. fraxineus* se šíří velkou rychlostí po celé Evropě, i když obecně platí, že pro tyto houby není snadné proniknout strukturální bariérou, kterou je nepoškozená kůra dřeva (Košťálová a Sázelová, 2010). Hlavní sporulační doba je od června do začátku září, ale za příznivých podmínek, může sporulace začít dříve a pokračovat až do října. (Chandelier, 5/3). Mycelium prorostlé dřevinou může v živých pletivech přežívat zimu (Havrdová et al. 2014).

Rod *Chalara* obsahuje přes sto druhů hub a většina patří do řádu voskovičkotvaré (*Helotiales*) (Koukol a Havrdová, 2014). *H. fraxineus*, a *H. albidus* jsou příbuzné druhy, ale mají rozdílné biologické chování (Dvořák et al. 2016). Saprotrofní druh *H. albidus* se zdá být v posledním desetiletí nahrazován blízkým příbuzným, ale invazivním parazitem jasanů *H. fraxineus*. Oba druhy kolonizují stejnou niku, opadlé řapíky

listů jasanu. Autor se zaměřil na rozložení *H. fraxineus* a také na výskyt *H. albidus* v Česku. Opakované pokusy znovu objevit *H. albidus* ve čtyřech historických lokalitách spolu s dalšími 87 lokalitami byly neúspěšné. Nicméně, výsledky přímo cílené detekce *H. albidus* ve čtyřech různých lokalitách s využitím daného specifického druhu PCR v reálném čase ukázaly nízkou, ale konstantní přítomnost askospor *H. albidus*. Koncentrace askospor *H. albidus*, které byly zjištěny na všech čtyřech zkoumaných místech byly v rozmezí 0,02 až 5,43 % koncentrací *H. fraxineus*. Z toho vyplývá, že *H. albidus* není nahrazena *H. fraxineus*, ale tyto dva druhy zřejmě koexistují (Koukol, et al. 2015).

H. fraxineus patří k druhům heterotalickým. K tvorbě plodnic je proto zapotřebí dvou mycelií s různým párovacím typem. K pohlavnímu procesu a tedy tvorbě plodnic může dojít, jestliže jsou přítomna mycelia s odlišnou variantou genu. Pohlavní proces vřeckovýtrusých hub probíhá tak, že je oplozen askogon (samičí gametangium) za pomoci hyfy (samčí) nebo spermacie (nepohyblivá gameta). Úlohou konidií, které jsou produkovány anamorfou *C. fraxinea* a fungující jako spermacie oplodňující askogon, je najít mycelium s opačným párovacím typem. V populacích se nacházejí oba párovací typy v podobném množství. Na podzim dochází k pohlavnímu procesu na opadaných řapících listů tak, že vytvořené fialidy *C. fraxinea* produkují konidie, fungující jako spermacie. *H. fraxineus* přezimuje na infikovaných, opadaných listech i řapících ve formě černých pseudosklerocií, na nichž se v následujícím začátku léta vytvoří apoteci miskovitého tvaru produkující askospory, které se šíří vzduchem a ulpívají na živých listech stromů (Koukol a Havrdová, 2014) Nejvyšší počet spor se objevuje mezi 6 – 8 hodinou ráno s vrcholem v 7 hodin (Timmermann, 2011).



Obrázek 3: Životní cyklus *Hymenoscyphus fraxineus* (Gross et al. 2012)

3.7. Aerobiologie

V mnoha zemích pomáhají lapače alergikům svým zaznamenáváním množství pylu. Burkardův lapač je používán vědci i pro zkoumání jiných částic obsažených ve vzduchu, a to spor. Při zaznamenávání množství pylu a spor by lapač měl být pečlivě umístěn, a to z důvodu optimálního výkonu a fungování. Umístění lapače závisí na tom, jaké částice jsou zkoumány a na rozsahu cíle. Lapače umístěné na střechách vysokých budov nasávají vzduch, který byl důkladně promíchán. Výsledkem toho je důkladné rozptýlení uvolněných částic ze stromů a země, proto vzduch, který projde lapačem, zastupuje poměrně široké okolí. Naopak lapače umístěné na zemi, v důsledku filtrování a ukládání na rostlinách a budovách, vzduch není tak promíchán a do lapače se dostává z menší plochy. Aby se mohl pyl počítat, jsou vzorky sbírány denně. Tyto lapače jsou obvykle umístěny na plochých střechách bez překážek a lokálních zdrojů pylu. Pro potřeby práce rostlinné patologie jsou lapače umístěny v nebo po směru větru, aby se odhalila inokula nebo se mohlo zkoumat rozptýlení patogenů v určité oblasti. Spory

a ostatní částice obsažené ve vzduchu se zachytávají každý den na část pásky, tyto částice mohou být pak zkoumány pod mikroskopem (Lacey a West, 2006).

3.8. Typy lapačů spor

3.8.1. Objemové lapače spor

Cylindrické tyčinky jsou účinnými lapači spor, ale neumožňují korelaci mezi koncentracemi spor a meteorologickými daty. Z tohoto důvodu je použit nasávací typ objemového lapače spor, který umožňuje lepivému povrchu se pohybovat konstantní rychlostí dokola, kde proudí vzduch. Nasávání běží konstantní rychlostí, které je obdobné průměrné rychlosti větru v určitém regionu. Tento nasávací otvor je těsný a vždy ve směru větru.

Hirstův lapač spor zachycuje spory na samolepící mikroskopické sklíčko, které se pohybuje kolem nasávacího otvoru rychlostí 2 mm za hodinu a zachycuje spory po 24 hodin. Jakmile je lapač uveden do provozu a je správně použit, není potřeba se o něj více starat. Nasávací otvor je veden směrem větru, pomocí větrné lopatky. Pokud je nízká rychlost větru, lapač nemění svůj směr.

V Bukardově sedmidenním objemovém lapači, dopadají spory na lepicí pásku připevněnou k bubnu, který je připojen k sedmidenním hodinám. Exponovaná páska se po sedmi dnech odlepí a připevní se nová. Výhoda tohoto lapače oproti Hirstovu lapači, je schopnost nepřetržitého sedmidenního lapání.

Kramer – Collinův 7denní lapač je podobný Hirstovu a Bukhardovu lapači. Spory se zachytávají na lepicí celofánovou pásku připevněnou na buben, který je otáčen po dobu 8 dní pomocí hodin. Páska se otáčí rychlostí 60 mm za 24 hod (Dhingra a Sinclair, 1995).

Paddyho 24 hodinový lapač spor zachytává spory každou hodinu na lepící skličko a to umožňuje určit hodinu zachycení spor (Dhingra a Sinclair, 1995).

3.8.2. Schenckův lapač spor

Tento lapač byl vyroben k lapání *Didymella bryoniae* (*Mycrosphaella citrullina*) askospor. Má důležité vlastnosti Hirstova a Paddyho lapače. Základem spodní části lapače je 4 litrová nádrž, která slouží jako hlavní část konstrukce ukrývající časový mechanismus. Větrák o velikosti 7, 5 cm poháněn dvanácti vatovou je namontován do otvoru stejné velikosti tak, aby vytlačoval vzduch ven. Lapací otvor je umístěn na boční straně lapače. Lapací otvor je trubka dlouhá 17, 5 cm o průměru 4, 5 cm, slouží jako nárazové těleso pro spory. Nárazový otvor je z měděných trubek obdélníkového tvaru o velikosti 2 x 14 mm. Je vložen a sletován do podobného otvoru na stěně trubky. Vzdálenost mezi sklíčkem a vnitřním koncem lapacího otvoru není delší než 1 mm. Trubka je pevně připevněna k plášti lapače. Pohyb sklíčka je řízen nylonovou nití, která je přivázaná na jedné straně k držáku sklíčka a na straně druhé ke kladce a k budíku umístěnému v hlavní části lapače. Hodiny a kladka jsou přišroubovány tak, aby udržovaly správnou vzdálenost mezi kladkou a minutovou ručičkou. Špička minutové ručičky je ohnuta směrem ven do pravého úhlu, aby se zapojila jedna z dvanácti rovnoměrně rozmístěných řemenic ozubených kol. Tato řemenice je vyrobena z cívky šicího vlákna. Každou hodinu se minutová ručička dotkne ozubeného kola, vlákno se navine a posune pásku o 1/24 své délky. Lapač je připevněn k větrné lopatce. Původní lapač podléhal poletujícímu prachu a obtížím s údržbou, ale Casselma and Berger lapač zdokonalili. Montáž je podobná Schenkenovému svým mechanismem složeného z budíku a minutové ručičky, jež aktivuje motor. Cívka je připevněna k hřídeli motoru, která navine nit a zvedne držák s páskou. Ten se pak každou hodinu posune o 4 mm poté, co minutová ručička oběhne svůj obvod a sepne krokový motor. Hodiny a mikrospínač jsou připevněny k hlavnímu plášti směrem od proudu vzduchu a větráku. Motor je utěsněn a víko hlavního pláště je vzduchotěsné (Dhingra a Sinclair, 1995).

3.8.3 Panzerův lapač spor

Tento lapač je vzduchotěsný a může být buď dřevěný, nebo kovový s vnitřními rozměry 31 cm (délka), 26 cm (šířka) a 20 cm (výška). Ventilátor je namontován na horní stěně lapače tak, že jsou lopatky ventilátoru umístěny mezi horní a dolní plochou víka. Čtyřicet mikroskopických sklíček je horizontálně umístěno na disku. Disk je přimontován k hřídeli dvacetičtyřhodinovým hodinám. Každá páska představuje hodinový sběr (6, 25 cm pásy). Objem odebraného vzduchu závisí na rychlosti větráku, který může být měřen pomocí dočasně připojeného obyčejného plynoměru. Míra účinnosti lapače je 70% při sací rychlosti 4,8 l/min. Lapač je účinný pro širokou škálu spor různých velikostí. Díky větrné lopatce se lapač otáčí po směru větru (Dhingra a Sinclair, 1995).

3.8.4. Grainerův lapač spor

Hlavní část lapače je nádoba se vzduchotěsným víkem na horní straně a odvzdušňovací trubicí na spodní straně. Štěrbina ve víku o velikosti 0,5 x 5 mm slouží jako lapací otvor. Kovové podpory o tloušťce 0,5 mm jsou připevněné na každou stranu otvoru tak, aby střed pásy byl čelem k otvoru. Pásku drží na svém místě ocelová pružina. Toto uspořádání dovoluje nasávání vzduchu přes konce pásek a umožňuje tak dlouhý průchod přes přilnavý, lepkavý povrch pomocí vakuové pumpy připevněný k zadní části nádoby. Vyfukovaný vzduch prochází plynoměrem, který měří objem vzduchu. Pásy se vyměňují po 500 až 600 l nasátého vzduchu. Tento lapač je účinný na 93 až 100% při rychlosti větru od 1 do 5,3 m/s (Dhingra a Sinclair, 1995).

3.8.5. Davisův a Sechlerův lapač

Davisův a Sechlerův lapač využívá hygromografy a termografy jako lapací těleso ve vzduchotěsné nádobě. Sestava se skládá ze sedmidenních hodin s časovou stupnicí. Je-li zapotřebí počítat počet spor za hodinu, buben je upraven tak, že jedno

otočení trvá 24 hodin. Spory se ukládají na celofánové fólie potažené lepidlem a jsou rozřezány, aby se svými rozměry rovnaly časovému diagramu, a také aby mohl být určen čas zachycení spor. Sací otvor o velikosti 0,75 x 25 mm je vyříznut z plastové fólie a poté vložen do svislého výřezu ve stěně pouzdra. Plocha pro ukládání spor musí být umístěna v rozmezí 3 mm od otvoru. Na stěně pouzdra naproti otvoru je kovová trubička přiletována a připojena k vakuové pumpě tak, aby mohla být rychlost sání upravována. Přes otvor je nasazena nálevka, aby se dovnitř nedostala dešťová voda (Dhingra a Sinclair,1995).

3.8.6. Miniaturní lapač spor

Miniaturní lapač spor byl vyvinut k 1 – 2 hodinovému odběru vzorků. Hlavní částí je válcovitá nádoba o průměru 65 mm a výšce 72 mm. Jeden až dvouhodinový mechanismus je umístěn na spodní straně pouzdra s rotačním bubnem o průměru 56 mm a šířce 22 mm. Buben je přimontován ke středu hřídele hodin a drží na svém místě díky matici na závitech hřídele. Lapací otvor je čtyřhranná trubka dlouhá 2 x 14 mm a 24 mm upevněná a umístěná ve šterbině řezu ve zdi lapače. Vnitřní konec trubice je dokonale připojen k bubnu uvnitř lapače, vzdálenost mezi nimi je 0,6 mm. Na druhé straně je otvor o průměru 7 mm, do kterého je přiletována trubka, jež je připojena k vakuové pumpě. Otevřený konec pouzdra je uzavřen šroubovacím víkem s gumovým těsněním (Dhingra a Sinclair,1995).

3.8.7. Manuálně ovládaný přenosný lapač spor

Tento lapač se používá v případech, kdy není k dispozici elektřina a lapání spor trvá 2 – 3 hodiny. Lapač je ovládán pomocí ruční pumpy. Vakuový měřič připojený k lapači je významný pro spolehlivé určení rychlosti proudění vzduchu v lapači. Lehce a mírně posuvné lamelové čerpadlo je spojeno s podtlakovou nádrží a otáčí se pomocí odnímatelné kliky (Dhingra a Sinclair,1995).

3.8.8. Czabatarův a Scottův lapač spor

V neznečištěných oblastech může tento lapač shromažďovat spory po dobu 5, 10, 15, 20, 30 nebo 60 - ti minut předtím, než je sběrný povrch upraven. Každá doba může být opakována až 74 krát. To zabraňuje hustému překrývání nahromaděných spor. Tento mechanismus je uzavřen v lapači o velikosti 12, 7 x 15, 2 x 22, 9 cm. Větrák o průměru 12 cm je zasazen do otvoru na jedné ze stěn, strana protější je vybavena otvorem ve tvaru obdélníku pro odběr vzorků s vnitřními rozměry 2 x 14 mm. Spory se zachytávají na průhlednou plastovou pásku pokrytou lepidlem o rozměrech 2, 5 x 29 cm. Páska je připevněná na plastický buben o průměru 9, 3 cm a tloušťce 3 cm. Buben je umístěn na hřídeli hodin a drží tam díky matici. Vzdálenost mezi stěnou lapače a sběrným povrchem je 1 mm. Buben se otáčí po 3, 65 mm. Zařízení se otáčí na hřídeli kuličkového ložiska. Toto ložisko je uzavřeno v krátkém kousku železné trubky o velikosti 3 cm a šroubuje se do příruby nebo jiné trubky v zemi. Větrná lopatka je připojena ke straně ventilátoru v lapači (Dhingra a Sinclair, 1995)

3.8.9. Morrisův lapač spor

Morrisův lapač je užitečný tam, kde je možné využít elektrického napájení, protože lapač není na baterie. Mezi hlavní části patří převodový motor 1/24 rph, lapač 120 mm vysoký se dnem o rozměrech 230 x 215 mm, kartonový buben o průměru 200 mm a hloubce 15 mm. Motor je připevněn do středu víka lapače, elektrické připojení prochází otvorem vyvrtaným na boční straně spodku lapače. Otvor je vzduchotěsný, zajištěn gumovým těsněním. Hřídel motoru je připevněna k středu bubnu. Po obvodu bubnu je umístěna oboustranná lepicí páska. Dále jsou na pásku připevněna mikroskopická sklíčka s rozměry 38 X 15 mm a jsou umístěna kolem obvodu bubnu. Lapač je umístěn na bok tak, že jedna z jejich stran tvoří přední část. Vyříznutý otvor 7 mm vysoký a 22 mm široký, je zarovnaný přesně do středu sklíčka na pásce. Poté, co je buben uložen na své místo dovnitř lapače, při otáčení bubnu se sklíčka pohybují kolem

lapacího otvoru. Takto se ukládají spory na šířku sklíčků po dobu dvaceti čtyř hodin.

Spory se na jednotlivých sklíčcích ukládají po hodině. Na boční straně lapače, naproti vyříznutého otvoru jsou vyvrtány čtyři otvory, 1 cm na boku lapače, aby mohl unikat vzduch. Rotace větráku je obrácena tak, že je vzduch vháněn směrem nahoru. Celý lapač je umístěn pod přístřeškem ve výšce dvou metrů, aby mohl být porovnán s meteorologickými daty. Postup uvedení do provozu: sklíčko je potřeno tenkou vrstvou lepidla, zakryto víkem lapače a utěsněno PVC páskou. Motor a ventilátor pracuje 24 hodin. Díky vzduchu vháněného ventilátorem do otvoru se spory zachycují na sklíčku. Rychlost vzduchu může být měřena anemometrem. Protože se rychlost vzduchu během provozu nemění, je odběr vzorků isokinetický (Dhingra a Sinclair, 1995).

4. Metodika

Metodika se skládá ze čtyř praktických částí. První částí je instalace meteorologické stanice, lapače a také sběr dat ve Vranovickém lese, který probíhal od května do listopadu 2015. Druhou částí je uchování a zpracování vzorků před aplikací molekulárních biologických metod v laboratoři. Třetí částí je extrakce DNA laboratoři na Lesnické a dřevařské fakultě, Mendelovy univerzity a kvantifikace DNA pomocí qPCR na Ústavu experimentální biologie, Masarykovy univerzity.

4.1. Popis lapače spor

Použit byl objemový sedmidenní automatický lapač spor Burkardova typu (AMET, Velké Bílovice) (viz. Obrázek č. 5). Díky otáčivému bubnu uvnitř lapače, který se otáčí o 360° po dobu 7 dní, jsou spory lapány nepřetržitě po celou dobu. Otáčení je řízeno pomocí hodinového strojku, který je při každé výměně opětovně natažen. Každých 7 dní ve stejnou hodinu, se páska přilepená na válec musí vyměnit, aby se spory nepřekrývaly. Štěrbinou ve stěně lapače je nasáván vzduch i se sporami, které jsou zachyceny na pásce. Hrdlo lapače bylo umístěno 30 cm nad povrchem půdy. Lapač byl

dobíjen 12V autobaterií dobíjenou solárním panelem. (Viz obrázek) Lapač se díky větrné lopatce otáčel proti směru větru.

Na stanovišti byla také meteorologická stanice (AMET, Velké Bílovice). Stanice měřila teplotu, vlhkost vzduchu a ovlhčení listů na povrchu půdy (viz. Obrázek č. 4).



Obrázek 4: Meteorologická stanice a měřič vlhkosti listu (Foto: Smetanová, VII/ 2015, Vranovický les)



Obrázek 5: Lapač spor Burkardova typu, ve Vranovickém lese (Foto:Smetanová, VII/ 2015, Vranovice)

4.2. Postup při výměně pásky v lapači

Výměna probíhala každých 7 dní ve stejnou hodinu. Nejdříve byl vytažen válec, na který se lepila páska, a natáhl se hodinový strojek, díky kterému se válec otáčel nepřetržitě po dobu sedmi dnů. Válec se očistil papírovým kapesníkem a to z důvodu, aby se na nově vyměněnou pásku nedostaly spory z předchozího lapání. Jako nosné médium byla použita melinexová páska, která se pomocí oboustranné lepicí pásky nalepila na otáčivý válec lapače. Kousek pásky se nechal přechýlat asi 0,5 cm, kde bylo napsáno datum a hodina dne výměny a také z důvodu jednoduššího odlepení pásky při výměně (viz. Obrázek č. 6). Na celý povrch lapačí pásky se rovnoměrně nanasla tenká vrstva lékařské vazelíny, Dále se zkontroloval, případně očistil sací otvor i ventilátor a válec se zasunul zpět do lapače tak, aby začátek pásky mířil k sacímu otvoru. Po uplynutí sedmi dní, se páska vyměnila. Odlepila se z válce a přišpendlila na připravený polystyrenovou desku, tak aby se vazelínou natřená strana ničeho nedotýkala. Vložila se do uzavíratelné krabice z důvodu převozu a také, aby se spory dále nepřichycovaly na pásku.

Při dalším kroku bylo nutné pásku rozřezat na malé kousky pro pozdější zpracování v laboratoři. Páska se položila a přišpendlila na polystyren, na kterém byly znázorněny půlnoci a poledne jednotlivých dnů, 24 hodin znamenalo 55,1 mm na pásce. Čepelkou skalpelu se páska postupně rozřezávala, podle vyznačených čar na polystyrenu (viz. Obrázek č. 8). Jednotlivé části byly rozděleny (vzorek A 0:00 – 12:00 h; vzorek B 12:00 – 24:00 h). Tyto půldenní kousky pásky byly pinzetou vloženy do 2 ml mikrozkušavek (viz. Obrázek č. 7). Každá zkumavka musela být nadepsána datem a písmenem A nebo B, podle části dne. Zkumavky se uchovávaly v -20°C po celou dobu, než byly zpracovány v laboratoři.



Obrázek 6: Výměna pásky v lapači
(Foto: Smetanová, V/2015, Vranovice)



Obrázek 7: Mikrozkumavky
(Foto: Smetanová, IV/2015, Brno)



Obrázek 8: Polystyrenová podložka, sloužící k rozřezání pásky (Foto: Smetanová, IV/ 2016, Brno)

4.3. Postup zpracování vzorků v laboratoři

DNA vzorků byla extrahována v laboratoři na Lesnické a dřevařské fakultě Mendelovy univerzity. Po zpracování byly dále zkumavky poslány do ústavu Experimentální biologie Masarykovy univerzity za účelem kvantifikace DNA.

V prvním kroku se každý vzorek A i B rozstříhl podélně na půl a jedna polovina se vrátila zpět do zkumavky a druhá vyhodila. Tento postup optimalizoval využití reagentů pro extrakci DNA.

Vzorky byly zpracovány s DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Do zkumavek se přidaly balotinové kuličky 400 mg o velikosti 0,1 µm a Nonidet P40 – 250 µl. Mikrozukavky se vložily do homogenizátoru Mixer Mill MM400 (Retsch, Haan, Germany) na 10 minut s frekvencí 30 Hz. Připravila se vodní lázeň na 65 °C. Dále se přidal pufer AP1 - 400 µl, RNasa - 4 µl a zvortexovaly se na 5 vteřin. Mikrozukavky se vložily do vodní lázně na 60 minut. Pouze v těchto krocích se postup lišil, dále se však postupovalo dle návodu v příloze.

4.4. Metoda qPCR

Metoda real time PCR slouží pro kvantifikaci DNA. Umožňuje zjistit výchozí množství amplifikovaného fragmentu (templátu) ve vzorku: a to buď relativně (poměry koncentrací mezi různými vzorky) nebo absolutně (přesná hodnota koncentrace templátu, na základě znalosti koncentrace standardu). Sledován je nárůst koncentrace produktu v čase pomocí fluorescenčních látek (prób), které se spojí se vznikajícími fragmenty. Reakce probíhá ve speciálním přístroji (real time cycler), který je kombinací klasického termo - cycleru a fluorescenčního scanneru. Výsledkem je graf změn fluorescence v závislosti na počtu amplifikačních cyklů, z něž lze hledané hodnoty koncentrací vypočítat, což provede připojený počítač (Lenz, 2016).

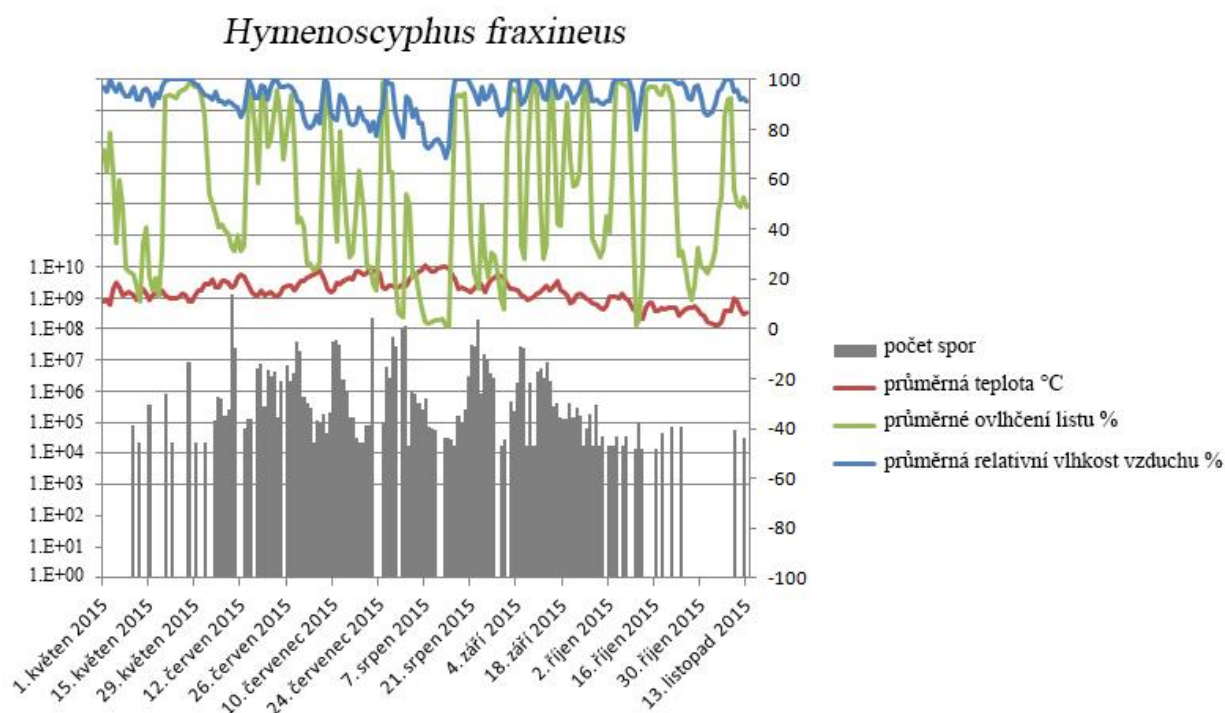
Zpracování vzorků proběhlo dodavatelsky na Ústavu experimentální biologie MU. Nastavení cycleru, primery a sondy byly použity podle Dvořák et al. (2016).

4.5. Popis lokality

Výzkum proběhl ve smíšeném listnatém lese na jižní Moravě u obce Vranovice, kde byl lapač spor umístěn. Nedaleko této výzkumné plochy, zhruba ve vzdálenosti jednoho kilometru, se nachází vodní tok řeky Svatky ze strany jedné a vodní tok říčky Šatava ze strany druhé. Oblast patří do Dyjsko-svrateckého úvalu.

Nadmořská výška této oblasti je 177 m.n.m. Za rok 2015 činí úhrn srážek v V Jihomoravském kraji 430 ml a průměrná teplota vzduchu byla 10,5 °C (chmi.cz, 2016)

5. Výsledky



Obrázek 9: Grafické zobrazení výsledku (Graf: Smetanová IV/ 2016, Brno)

Sběr dat probíhal v lesním porostu od 1. 5. do 13. 11. 2015. První výskyt spor se objevil 10. 5. a poslední 12. 5. Hlavní sporulační doba začíná kolem poloviny června, kdy jsou pozorovány optimální podmínky pro výskyt spor ve vzduchu. Zdá se, že *H. fraxineus* příznivě reaguje na vyšší teplotu a zvýšenou vlhkost. Dle grafu je nejvyšší koncentrace spor ve vzduchu od července až do konce září. V polovině srpna je v grafu (viz. Obrázek č. 9) vidět velmi nízký výskyt spor a to z důvodu náhlého poklesu ovlhčení listu, ale i vlhkosti vzduchu. Těchto výkyvů je zde vidět více a je to opět díky nižší vlhkosti.

Dále v grafu (viz. Obrázek č. 9) jde vidět, že ovlhčení listů a vlhkost vzduchu spolu souvisí, přitom úměra výskytu spor je viditelná zejména k hodnotám vlhkosti listu. Teplota vzduchu také ovlivňuje četnost výskytu spor ve vzduchu – toto lze v grafu (viz. Obrázek č. 9) pozorovat obzvlášť v měsících říjen a listopad, kdy běžná průměrná denní teplota byla kolem 7 °C

Z výsledků je dalším důležitým zjištěním odezva reakce zvýšené četnosti spor na zvýšení vlhkosti. Tato odezva je v našich datech pozorovatelná běžně v rozmezí jednoho až tří dnů. Čili zvýšila-li se výrazně vlhkost vzduchu i listu (obzvlášť po dnech s nízkými hodnotami vlhkosti), tak se obvykle do tří dalších dnů významně zvýšil výskyt spor ve vzduchu.

V grafu jsou vidět období, kdy jsou dobré podmínky pro vysokou koncentraci spor, zejména 100% vlhkost a vysoké teploty, ale skutečný výskyt spor byl ve velmi nízkých hodnotách

V srpnu 11. - 12. 8. jsou viditelné pauzy ve výskytu spor, a to díky snížení vlhkosti listu, opět asi s dvoudenním zpožděním.

6. Diskuze

V tomto prostředí lužního lesa je napadení nekrózou viditelné. Výsledky ukazují na ovlivnění výskytu spor vlhkostí vzduchu a ovlhčení listu. Je tedy možné, že ve vlhkém prostředí a vyšší hustotou dřevin, jako bylo stanoviště umístění lapače, se nekróze jasanů daří. Tento zjištěný poznatek je shodný s výsledky výzkumu (Černý et al. 2014), který uvádí, že nejmenší poškození bylo pozorováno v kategorii solitérní výsadba (2,33 %), kde byla zároveň zjištěna nejnižší průměrná vlhkost vzduchu (78,64 %). Naopak největší poškození se vyskytovalo u břehových porostů (17,02 %) a jasanových olšin (12,22 %), kde byly zjištěny velmi vysoké hodnoty vzdušné vlhkosti (82,49 %, resp. 84,66 %).

Zjištění, že se ve vlhkém a hustém porostu nekróze jasanů daří, koresponduje s procesem uzrávání a uvolňování spor, kdy se při zvýšené vlhkosti v plodnicích vytváří askospory, které se uvolňují do ovzduší (Dvořák et al., 2016, Gross et al., 2012).

To že je vlhkost důležitým faktorem při vzniku spor se dá například pozorovat u dalšího výzkumu, kdy je u solitérní výsadby evidentně poškození nekrózy jasanů nižší, naproti tomu v lesním porostu nebo jasanové olšině je poškození vyšší. Rozdíl mezi nejsušším a nejvlhčím typem porostu byl 6,02 % (Havrdová a Černý, 2013).

Četnost výskytu spor ve vzduchu je také ovlivněna teplotou vzduchu – obecně vyšší teplota zlepšuje podmínky pro výskyt spor.

Zároveň je z výsledků pozorovatelná zpožděná reakce nárůstu spor ve vzduchu v závislosti na zvýšení vlhkosti listu. Tato odezva se pohybuje v rozmezí jednoho až tří dnů. Tímto se naše výsledky shodují s výsledky práce (Dvořák et al. 2016) kdy autoři uvádějí zpožděnou reakci na ovlhčení listu jednoho až dvou dnů.

Období, kdy jsou dobré podmínky pro vysokou koncentraci spor, ale nevyskytují se, je možné, že všechny tyto „anomálie“ jsou z důvodu deště a je tedy možné, že byly poletující spory „zachyceny deštěm“.

Nekróza jasanů není jedinou hrozbou. Krasec *Agrilus planipennis* je významným podkorním škůdcem a napadené stromy tímto broukem jsou odsouzeny k rychlému odumření. Krasec pochází z Asie, ale již byl zaznamenán v USA, Severní Americe, Kanadě a v evropské části Ruska (Spurná et al. 2010).

Je tedy nejspíše otázkou času, kdy se tento invazivní druh dostane i do ostatních zemí Evropy včetně České republiky a přispěje tak ještě k větší zkáze jasanů.

7. Závěr

Výsledky práce korespondují s výsledky autorů, kteří prováděli obdobné výzkumy. Potvrzují, že je vlhkost a ovlhčení listu velmi důležitým faktorem při vzniku spor. Spory reagují na období s vyšší vlhkostí listů se zpožděním 1-3 dny. Také v porostech s hustší výsadbou, jsou jasanů více napadány, díky vlhku, které se v tomto prostředí drží. V současné době se provádí různé výzkumy na zjištění biologického chování tohoto patogenu a také z důvodu vyvození obrany proti této chorobě. Zatím ale bohužel neexistuje dlouhodobé efektivní řešení, které by mohlo zkázu jasanů zastavit. Čili je zde předpoklad, že se nekróza jasanů bude nadále rozšiřovat a jasanů budou postupně odumírat.

Zatím by byla možná řešení, které by šíření nekrózy jasanů alespoň zpomalilo a to především ve městech. Pokud jsou výsadby ve městech napadené ve větším měřítku, bylo by vhodné tyto dřeviny odstranit i s opadanými větvemi a listím, aby se co nejvíce předcházelo rozšiřování nekrózy jasanů. Napadené části dřevin by měli být spáleny, aby se spory nemohly nadále šířit. Dále bude vhodné v městských parcích (lesoparcích, bytových zástavbách apod.), pokud je zde hustá výsadba jasanů, učinit prořezávku, z důvodu snížení vlhkosti, na kterou spory reagují vyšší koncentrací v ovzduší. Pokud by stav dřevin ohrožoval okolí, bylo by nutností jasanů postupně nahrazovat jinými druhy dřevin. Další možnou obranou jsou injektáže, které jsou ale velmi nákladné a musí se opakovat.

V lesním prostředí by mohly být opatřením také prořezávky a likvidace napadených větví a listí spálením. Možností je i kácení napadených dřevin, ovšem to s sebou nese různé komplikace, např. zhutnění půdy při těžbě nebo přístup těžké techniky.

Zatím nejsou vyvinuty prostředky na úplnou likvidaci nekrózy jasanů. Další výzkumy by se tedy měli zaměřit na vývoj látek, které by mohly nekrózu jasanů zastavit, alespoň ve městech či lesních školkách, aby se dále nerozšiřovala ve městském prostředí.

8. Summary

The ashes have been declining because of *Hymenoscyphus fraxineus* in recent years. This pathogen spreads very quickly and infects both urban planting and forest. There is no long-term solutions for this problem in these days. Therefore, there is an assumption that ash population will gradually disappear in our territory and in Europe. The aim of this research was to determine the presence and response of spores to climatic conditions, humidity, leaf wetting and temperature.

The results of the research showed that humidity plays an important part during maturation and releasing spores into the air. The leaf wetting is another important factor. It has been observed that if the wetting leaf is increased, the presence of spor also increased but with the delay of 1-3 day. Also the other authors, who deals with similar issue, confirm higher presence of spores when air moister and leafs are wet. It means that there is a low concentration of spores in the air in winter. These effects have also been reported by other authors who deal with this issue.

Arboricultural suggestions: collection of infected tree parts, their disposal and pruning of dense undergrowth in order to reduce humidity. Furthermore, it is essential to gradually replace the ash tree by another kind of tree, It is needed mainly in the urban environment, where the infected and withered ashes could endanger their surroundings. If there is not find out an effective method, which destroy the ash necrosis, it is possible that the ashes will continue withering and dying in Czech republic as well as in Europe.

9. Použitá literatura

BARAL Hans-Otto, Valentin QUELOZ, and Tsuyoshi HOSOYA. *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe, IMA FUNGUS 2014, s. 79-80.

BERÁNEK Jan. *zahradaweb.cz* [online]. 2013 [cit. 2016-04-23]. Dostupné na World Wide Web: <<http://zahradaweb.cz/dutilka-jasanova-prociphilus-bumeliae/>>.

CAUDULLO G. D. de Rigo. *Fraxinus ornus* in Europe: distribution, habitat, usage and threats, European Atlas of Forest Tree Species, Tree species, 2016, s. 100 – 101.

CAUDULLO Giovanni, *researchgate.net* [online]. 2016 [cit. 2016-05-20]. Dostupné na World Wide Web: <<https://researchgate.net/publication/299468775>>.

DHINGRA O. D., SINCLAIR J. B., Basic Plant Pathology Methods, CRC Press 1995, 448 stran, ISBN 9780873716383.

DOBROWOLSKA, D., HEIN, S., OOSTERBAAN, A., SKOVSGAARD, J., P., WAGNER, S., P., 2008. Ecology and growth of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). 35. <http://www.valbro.uni-freiburg.de/>."

DOBROWOLSKA Dorota, HEIN Sebastian, OOSTERBAAN Anne, WAGNER Swen, CLARK Jo, SKOVSGAARD Jens Peter. A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. publikoval Forestry Advance Access 2011. s. 1 – 11.

DVOŘÁK Miloň. *profipress* [online]. 2013 [cit. 2016-05-3]. Dostupné na World Wide Web: < <http://profipress.cz/archiv/zahradnictvi-92013/#page/58>>.

DVOŘÁK Miloň, KOUKOL Ondřej, *researchgate.net* [online]. 2016 [cit. 2016-05-19]. Dostupné na World Wide Web: < <https://researchgate.net/publication/287798758>>.

DVORAK Milon, ROTKOVA Gabriela, BOTELLA Leticia. Detection of Airborne Inoculum of *Hymenoscyphus fraxineus* and *H. albidus* during Seasonal Fluctuations Associated with Absence of Apothecia. *Forests* 2016. s. 1 – 12.

FRAXIGEN, *Fraxinus angustifolia* – Chapter 5. *herbaria.plants.ox.ac.uk* [online]. [cit. 2016-05-3]. Dostupné na World Wide Web: <http://herbaria.plants.ox.ac.uk/fraxigen/pdfs_and_docs/book/fraxigen_c5.pdf>. s. 64 – 86.

HALMSCHLAGER, E., KIRISITS, T., 2008. First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. Ndrs.org [online]. Citováno 27. 4. 2016. Dostupný na World Wide Web: <<http://www.ndrs.org.uk/article.php?file=2008-25.asp>>

HAVRDOVÁ Ludmila, ZÁBRANSKÝ Petr, ČERNÝ Karel. Extrémní rozvoj nekrózy jasanu v břehových porostech je podmíněn vysokou vlhkostí jejich prostředí. Vodní hospodářství 11/2014. s. 1 - 9.

HIETALA, A., TIMMERMANN V., BØRJA I., SOLHEIM H., 2013. The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. *Fungal Ecology*.

CHANDELIER, A., ANDRE, F., and LAURENT, F. 2010. Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real-time PCR. *For. Path.* 40: s. 87-95.

JANKOVSKÝ, L., HOLDENRIEDER, O., 2009. *Chalara fraxinea* – Ash dieback in the Czech Republic. *Plant Prot. Sci* 45; 74-78.

JANKOVSKÝ, L., ŠTASTNÝ, P., PALOVČÍKOVÁ, D., 2009. Nekróza jasanů *Chalara fraxinea* v ČR. *Lesnická práce* 88 (1); 16-17. ISSN 0322-9254.

KIRISITS, T., KRITSCH P., KRÄUTLER K., MATLAKOVA M., 2012. Ash dieback associated with *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in forest nurseries in Austria. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*.

KIRISITS, T., CECH, T., 2009. Beobachtungen zum sexuellen Stadium des Eschentriebsterben-Erregers *Chalara fraxinea* in Österreich. *Forstschutz Aktuell*.

KOŠTÁLOVÁ, V., SÁZELOVÁ, D., 2010. Chřadnutí a odumírání jasanů. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, Praha. 8 s.

KOUKOL Ondřej a HAVRDOVÁ Ludmila. Vřeckovýtrusná zkáza jasanů, živa 1/2014, č.1, s. 7 – 10.

KOUKOL Ondřej, HAŇÁČKOVÁ Zuzana, DVOŘÁK Miloš, HAVRDOVÁ Ludmila, 2015. Unseen, but still present in Czechia: *Hymenoscyphus albidus* detected by real-time PCR, but not by intensive sampling. *German Mycological Society and Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2015.

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

KOWALSKI, T., 2006. *Chalara fraxinea* sp. Nov. Associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *For. Pathol.* 36; 264-270.

KRAUTLER K., TREITLER R., KIRISITS T. Hymenoscyphus fraxineus can directly infect intact current-year shoots of Fraxinus excelsior and artificially exposed leaf scars. Forest Pathology 2015. s. 1 – 7.

LACEY Maureen E., WEST Jonathan S., The Air Spora, Springer Science & Business Media 2007, 156 stran, ISBN 0387302530.

LENZ O. *alfa.bc.cas.cz* [online]. [cit. 2016-04-10]. Dostupné na World Wide Web: <<http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/RealTime.pdf>>.

LONGAUEROVÁ Valéria, Miriam MAĽOVÁ, Andrej KUNCA a Roman LEONTOVYČ. *los.sk* [online]. 2002 [cit. 2016-05-23]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.los.sk/asfeu/longauerova_2013.pdf>.

MODLINGER, R., KNÍŽEK, M., 2012. Lýkohubi na jasanu. Lesní ochranná služba. Lesnická práce 11; 1-3.

NÁROVEC, V., TREJTNAROVÁ, J., JANČAŘÍK, V., 2008. Čeká jasaný chřadnutí? [Are ash stands expected to decline?]. Lesu zdar 5.

ORGIS N., HAUPTMAN T., JURC D. *ndrs.org.uk* [online]. 2009 [cit. 2016-04-10]. Dostupné na World Wide Web: <<http://ndrs.org.uk/article.php?id=019015>>.

PAUTASSO Marco, AAS Gregor, QUELOZ Valentin, HOLDENRIEDER Ottmar. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge, publikoval Biological Conservation 2012, s. 37 – 49.

PLIURA, A., LYGIS V., SUCHOCKAS V., & BARTKEVIČIUS E., 2011. Performance of twenty four European *Fraxinus excelsior* populations in three Lithuanian progeny trials with a special emphasis on resistance to *Chalara fraxinea*. Baltic Forestry 17.

REBEC J. Eric, *researchgate.net* [online]. 2016 [cit. 2016-05-20]. Dostupné na World Wide Web: <<https://researchgate.net/publication/5503290>>.

researchgate.net [online]. [cit. 2016-03-20]. Dostupné na World Wide Web: <https://www.researchgate.net/publication/227728837_Ash_dieback_Pathogen_spread_and_diurnal_patterns_of_ascospore_dispersal_with_special_emphasis_on_Norway/figures?lo=1>.

ROZSYPÁLEK, Jiří. Infekční biologie *Chalara fraxinea* a faktory ovlivňující fruktifikaci teleomorfy *Hymenoscyphus pseudoalbidus* jako zdroje infekce nekrózy jasanu. Brno, 2015. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce prof. Dr. Ing. Libor Jankovský.

SEIFERTO VÁ, Petra. Diverzita, výskyt a fylogeneze zástupců anamorfního rodu *Chalara*. Praha, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

SPURNÁ, J., KAPITOLA, P., RŮŽIČKA, T., 2010. Nebezpečný škůdce jasanů krasec *Agrilus planipennis*. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, Praha.

10. Přílohy

Quick-Start Protocol

DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the DNeasy Plant Handbook, which can be found at www.qiagen.com/handbooks.

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrates.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser II, or a mortar and pestle.

2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.

Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130 μ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.

4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.

-
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.

April 2012

Sample & Assay Technologies

7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. Discard the flow-through.
9. Add another 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g.
12. Repeat step 11.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, TissueRuptor® (QIAGEN Group). 1071299
04/2012 © 2011–1012 QIAGEN, all rights reserved.

Sample & Assay Technologies