

Mendelova univerzita v Brně

Lesnická a dřevařská fakulta

Ústav ochrany lesa a myslivosti

**Infekční biologie *Chalara fraxinea* a faktory ovlivňující
fruktifikaci teleomorfy *Hymenoscyphus pseudoalbidus*
jako zdroje infekce nekrózy jasanu**

Diplomová práce

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem práci: Infekční biologie *Chalara fraxinea* a faktory ovlivňující fruktifikaci teleomorfy *Hymenoscyphus pseudoalbidus* jako zdroje infekce nekrózy jasanu zpracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím 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 vědom/a, 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, 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:..... podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval především svým rodičům Růženě a Petru Rozsypálkovým za jejich výchovu a nemalé citové i finanční prostředky investované do mého života. Byl bych šťasten, kdybych to samé, co jste Vy udělali pro mne, dokázal udělat i pro své děti.

Taktéž bych chtěl poděkovat své dlouholeté přítelkyni a čerstvé manželce Lucii Rozsypálkové za podporu, pochopení, pomoc a lásku v těžkých chvílích, jako byla ta při psaní této diplomové práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval všem kolegům a kolegyním z kanceláře N3044 za vytvoření úžasného tvůrčího kolektivu.

Za vytvoření nadstandardně dobrých podmínek pro můj osobní rozvoj a výzkum na akademické půdě, plus za nesčetné zkušenosti a rady do života děkuji vedoucímu mé diplomové práce prof. Dr. Ing. Liborovi Jankovskému. Za přátelský až mateřský přístup a rady ve věcech akademických i lidských děkuji Ing. Dagmar Palovčíkové Ph.D. Za cenné rady a zkušenosti s psaním vědeckých textů Ing. Petru Martinkovi. Za pomoc s technickým řešením některých výzkumných problémů děkuji Ing. Miloňi Dvořákovi Ph.D. a za pomoc s výzkumem v terénu Milchalů Prouzovi.

Tato práce byla podpořena z projektů: INVID Indikátory vitality dřevin, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0265 je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem ČR. COST LD13020 Infekční biologie Chalara fraxinea a faktory ovlivňující fruktifikaci teleomorfy Hymenoscyphus pseudoalbidus jako zdroje infekce nekrózy jasanu. INOBIO Inovace biologických a lesnických disciplín pro vyšší konkurenceschopnost, reg. č. projektu CZ.1.07/2.2.00/28.0018. IGA LDF MENDELU 30/2013. IRP - Podpora prezentace výsledků tvůrčí práce studentů ve výuce předmětů ochrany lesa (424/1106/IN4140471).

Abstrakt

Jiří Rozsypálek

Infekční biologie *Chalara fraxinea* a faktory ovlivňující fruktifikaci teleomorfy *Hymenoscyphus pseudoalbidus* jako zdroje infekce nekrózy jasanu

Tato diplomová práce se zabývá nekrózou jasanu způsobovanou patogenním agens *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya. Která se za posledních cca dvacet let rozšířila po celé Evropě a je vážnou hrozbou pro místní populaci jasanů (*Fraxinus* spp.). Tato práce se zabývá především symptomatologií choroby ve vazbě na fenologii jasanu. v podmínkách in situ. Byly provedeny umělé infekční pokusy a otestováno několik obranných opatření. Dále byla navržena metodika inokulací askosporami a metodika hodnocení jasanových porostů postižených nekrózou jasanu. Byla sledována rychlost šíření infekce a míra mortality u různě starých porostů jasanu ztepilého. Bylo zaznamenáno, že silná infekce způsobuje výrazné zpomalení jarních fenologických fází jasanu. Bylo objeveno několik faktorů, zodpovědných za významné rozdíly v intenzitě chřadnutí jednotlivých stromů v porostech. Byla sledována fruktifikace teleomorfního stádia v několika odlišných typech prostředí. Infekčními pokusy byla zjištěna náchylnost *F. excelsior*. Infekce propukla u 83,7 % testovaných jedinců. U dalších testovaných druhů *F. pennsylvanica* 14 % a *F. americana* 38 % byla úspěšnost výrazně menší.

Klíčová slova: *Hymenoscyphus fraxineus*, fenologie, *Fraxinus excelsior* L., fruktifikace, inokulace.

Abstract

Jiří Rozsypálek

Infectious biology of *Chalara fraxinea* and factors affecting fructification of teleomorph *Hymenoscyphus pseudoalbidus* as a source of ash dieback infection

The diploma thesis deals with ash dieback caused by pathogenic agent *Hymenoscyphus fraxineus*. This pathogenic fungus has spread across the whole Europe during the last twenty years and became a serious threat for European ash populations (*Fraxinus* spp.). This theses are mainly focused on *H. fraxineus* symptomatology in relation to phenology of *Fraxinus excelsior* L. in situ. Artificial infection experiments were carried out and several control measures were tested. The methodology of inoculation with ascospores and methodology of evaluation of ash stands infected by *H. fraxineus* were designed. Outside the terms of assignment of this thesis, the speed of infection spread and mortality rate in stands of different ages were observed. One of the most interesting results is a finding that severe infection causes significant slowdown of phenological phases of *F. excelsior*. Infectious experiments showed high susceptibility of *F. excelsior* to the infection. The infection broke out in 83.7% of tested individuals. The susceptibility of *F. pensylvanica* 14 % and *F. americana* 38 % was proved to be considerably lower.

Keywords: *Hymenoscyphus fraxineus*, Ash dieback, phenology, *Fraxinus excelsior* L., fructification, inoculation

Obsah

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE.....	3
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
3.1. Historie odumírání jasanů v Evropě	4
3.2. Taxonomie a morfologie původce odumírání jasanů	5
3.3. Životní cyklus <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	6
3.4. Hostitelé <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> v Evropě	8
3.5. Symptomy odumírání jasanů	10
3.5.1. Defoliace	11
3.5.2. Podkorní nekrózy na letorostech.....	12
3.5.3. Bazální nekrózy – odumírání celých stromů	13
3.6. Možnosti ochrany a obrany lesa	14
4. HLAVNÍ HYPOTÉZY PRÁCE	16
4.1. Vliv infekce <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> na fenologii <i>Fraxinus excelsior</i> L.	16
4.2. Faktory ovlivňující intenzitu fruktifikace <i>H. fraxineus</i>	16
4.3. Faktory ovlivňující intenzitu poškození jednotlivých jedinců <i>F. excelsior</i> v porostu.	16
4.4. Otestování citlivosti <i>F. excelsior</i> , <i>F. pensylvanica</i> a <i>F americana</i> k infekci kulturou <i>H. fraxineus</i>	16
4.5. Test patogenity odlišných morfortypů kultur <i>H. fraxineus</i>	16
4.6. Obranná opatření proti infekci v epidemické a postepidemické době	17
5. METODIKA PRÁCE	18
5.1. Izolace kultur <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	18

5.2.	Vliv infekce <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> na fenologii <i>Fraxinus excelsior</i> L.	19
5.2.1.	Charakteristika stanoviště a sledovaných jedinců	20
5.2.2.	Hodnocení fenologických fází	21
5.2.3.	Hodnocení fruktifikace <i>H. fraxineus</i>	23
5.2.4.	Měření intenzity sporulace <i>H. fraxineus</i>	24
5.2.5.	Hodnocení nástupu a intenzity jednotlivých symptomů infekce	25
5.2.6.	Měření klimatických dat	27
5.3.	Inokulační testy	27
5.3.1.	Charakteristika stanoviště, souboru pokusných jedinců a kultur k inokulaci	27
5.3.2.	Laboratorní vyhodnocení inokulačních pokusů	29
5.4.	Testování obraných opatření v infikovaných porostech <i>F. excelsior</i>	31
5.4.1.	Variety pokusných ploch vybudovaných v letech 2013 a 2014	32
5.5.	Metodika inokulace jasanů askosporami	33
5.6.	Metodika hodnocení zdravotního stavu jasanů poškozených infekcí <i>H. fraxineus</i>.	34
5.6.1.	Otestování metodiky hodnocení zdravotního stavu jasanů poškozených infekcí <i>H. fraxineus</i>	35
5.7.	Hodnocení rychlosti šíření infekce a mortality	36
5.8.	Statistické vyhodnocení dat	37
6.	VÝSLEDKY PRÁCE	38
6.1.	Izolace kultur <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	38
6.2.	Vliv infekce <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> na fenologii <i>Fraxinus excelsior</i> L.	38
6.2.1.	Rozdíly v průběhu jarních fenologických fází u silně a slabě symptomatických jedinců	39
6.2.1.1.	Opožděné fenologické fáze – indikátor vážné infekce v kořenové a bazální části rostliny	42
6.2.2.	Délka a intenzita fruktifikace <i>H. fraxineus</i>	43
6.2.3.	Intenzita sporulace <i>H. fraxineus</i> a její korelace s fruktifikací	45
6.2.4.	Defoliace vlivem infekce	45
6.2.4.1.	Typy defoliace	46
6.2.4.2.	Intenzita defoliace u jedinců silně a slabě symptomatických	49
6.2.5.	Tvorba podkorních nekrotů u silně a slabě symptomatických jedinců	51
6.2.6.	Testování rozdílů v průběhu symptomatických fází u silně a slabě symptomatických jedinců	52

6.3.	Výsledky inokulačních pokusů	54
6.3.1.	Vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými druhy jasanů	54
6.3.2.	Rozdíly mezi světlými a tmavými morfotypy kultur <i>H. fraxineus</i>	59
6.3.3.	Ovlivnění přírůstu v důsledku infekce.....	61
6.4.	Výsledky obranných opatření v porostech <i>F. excelsior</i>	64
6.5.	Otestování metodiky inokulace askosporami	64
6.6.	Silné a slabé stránky metodiky hodnocení zdravotního stavu jasanů infikovaných <i>H. fraxineus</i>	
	67
6.6.1.	Zhodnocení míry poškození zdravotního stavu jednotlivých dřevin v porostu	67
6.6.1.1.	Mladí jedinci	68
6.6.1.2.	Dospívající jedinci	70
6.6.1.3.	Dospělí jedinci	72
6.6.2.	Hodnocení porostů	74
6.6.2.1.	Inventarizační plocha	74
6.6.3.	Legenda (vysvětlení pojmů)	75
6.7.	Verifikace metodiky hodnocení zdravotního stavu jasanů	80
6.8.	Rychlost šíření infekce a mortalita	82
7.	DISKUSE	84
7.1.	Faktory zodpovědné za rozdíly v odumírání jednotlivých jasanů	84
7.2.	Zhodnocení faktorů ovlivňujících délku a intenzitu fruktifikace <i>H. fraxineus</i>	87
7.3.	Výsledky inokulačních pokusů	87
8.	ZÁVĚR	89
9.	SUMMARY	90
10.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	92

1. Úvod

Evropské lesy jsou charakteristické nízkou druhovou diverzitou dřevin (Svenning a Skov, 2007) a jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) je po buku lesním (*Fagus sylvatica* L.), z hlediska dřevinného zastoupení, druhou až třetí nejhojnější listnatou dřevinou (Kirisits a Cech, 2009). Velkou výhodou, díky níž se jasanů často používají v lesnictví, je jejich vysoká ekologická flexibilita, díky níž mohou být jasanů pěstovány od lužních lesů až po podhorská stanoviště (Dufour a Piégay, 2008). Málokdy jsou pěstovány v monokulturách, ale vzhledem k tomu, že v mládí velmi dobře snáší zastínění, bývají používány často jako dřeviny meliorační a zpevňující. Jeho role je také zásadní pro zvyšování mechanické a ekologické stability břehových porostů (Dobrowolska et al., 2008).

Odumírání jasanu způsobované patogenní houbou *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya se v posledních letech stalo hrozbou pro evropskou populaci jasanů. Ohroženy jsou porosty jasanu ztepilého (*F. excelsior*), choroba také výrazně poškozuje i jiné druhy z rodu *Fraxinus* spp. *Fraxinus angustifolia* Vahl., *Fraxinus americana*, *Fraxinus pensylvanica* Marsh. aj.. Jasan zimář (*Fraxinus ornus* L.) je vůči infekci odolný (Drenkhan & Hanso, 2010; Kirisits et al, 2010, Gross et al, 2014). Onemocnění bylo poprvé pozorováno v roce 1990 v Polsku a v Litvě. Od té doby se velmi rychle rozšířilo po celém území nejen kontinentální Evropy. V současnosti není jen několik evropských zemí zasažených tímto odumíráním.

Podle posledních výzkumů (Kirisits et al, 2009; Timmermann et al, 2011; Kräutler a Kirisits, 2012; Gross et al, 2012) patogen nejprve infikuje jasanové listy, skrze které se dostává do řapíků a následně může infekce expandovat do floému a xylému letorostů a větví. U infikovaných stromů dochází k předčasnému opadu listů, odumírání výhonů a celých větví nad místem vzniku infekce (Kirisits et al, 2009, Gross et al, 2014; McKinney et al., 2011). Výsadba a mladé porosty jsou podstatně více poškozovány infekcí, taktéž mortalita je u mladých porostů mnohem vyšší (Rozsypálek, 2012). Také vzrostlé porosty jsou infekcí poškozovány, ačkoliv snášejí infekci déle a mortalita v těchto porostech je výrazně menší. Patogen tyto stromy oslabuje a činí je náchylné dalším infekcím sekundárních patogenů a škůdců (Kowalski et al, 2010; Skovsgaard et al, 2010; Keßler et al. 2012; Husson et al, 2012; Lygis et al, 2014).

Vzhledem k tomu, že se odumírání jasanů stalo vážnou hrozbou pro lesní školky, rozhodla se European Plant Protection Organization (EPPO) zařadit *H. pseudoalbidus* do EPPO Alert seznamu v roce 2007 (EPPO, 2010),), následně pak byla choroba s ohledem na její nekontrolovatelné šíření ze seznamu vyřazena.

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce je detailně prostudovat interakce mezi hostitelskou rostlinou (*F. excelsior*) a patogenním agens (*H. fraxineus*).

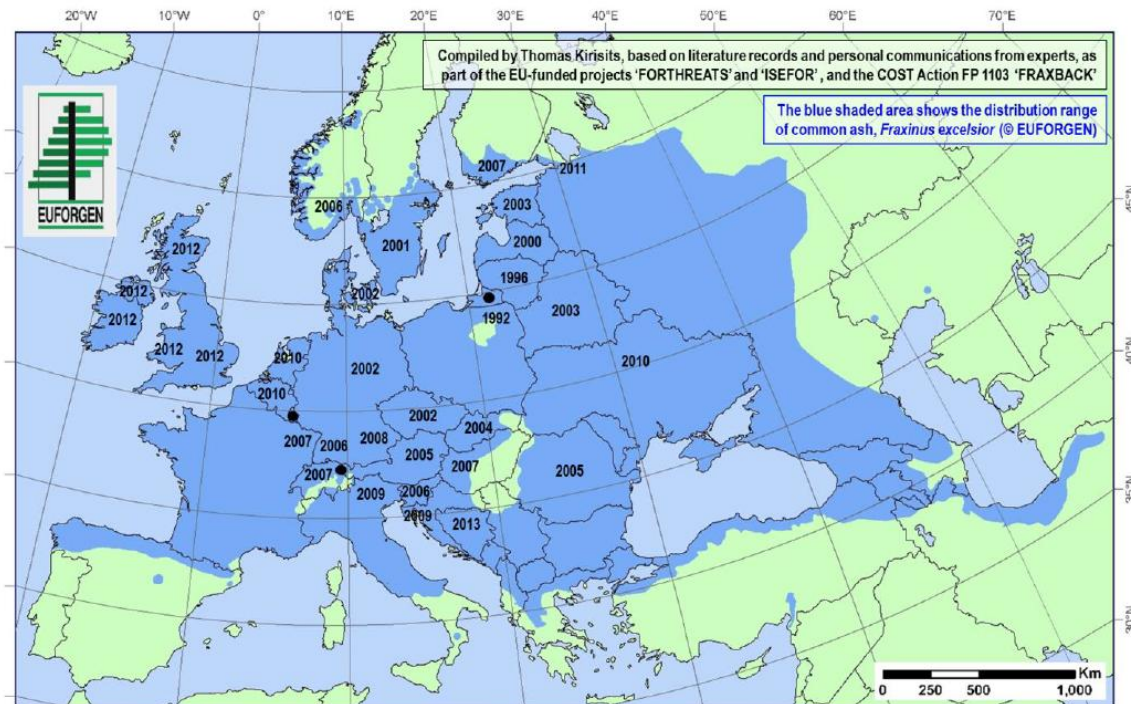
Dalším cílem bylo otestování možných obranných opatření v infikovaných porostech *F. excelsior*. Pro úspěšné zpracování těchto cílů bylo třeba vytvořit a otestovat metodiky inokulací askosporami a kulturou *H. fraxineus*.

Posledním cílem je navržení a otestování metodiky hodnocení zdravotního stavu infikovaných jasanových porostů.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Historie odumírání jasanů v Evropě

První potvrzené příznaky odumírání jasanů byly pozorovány v severovýchodní části Polska a jihozápadní části Litvy v letech 1992 až 1996. Od této doby se nemoc velmi rychle šíří po celé Evropě (Kowalski a Łukomska, 2005). Viz obr. č. 1. Přirozené rozšíření *F. excelsior* a letopočty potvrzeného výskytu *H. fraxineus*.



Obr. č. 1. Přirozené rozšíření *F. excelsior* (modrá barva) a letopočty potvrzeného výskytu *H. fraxineus* v jednotlivých státech (www.euforgen.org, 2014).

Naposledy byl výskyt *H. fraxineus* potvrzen v letech 2010 až 2011 v Belgii (Lustr et al., 2011), v Rusku (Gross et al., 2014), v Nizozemsku (Kopinga & de Vries, 2012), a na Ukrajině (Davyděnko et al., 2013). Ve Velké Británii, Irské republice a Severním Irsku v roce 2011 (Douglas & Ryan, 2012; Forestry Commission, 2013; Sansford, 2013). Naposledy byl patogen potvrzen v Bosně a Hercegovině v roce 2013 (Treštić a Mujezinovic, 2013). Včetně těchto nových záznamů byl *H. fraxineus* potvrzen již v 29 evropských zemích. V několika státech jihozápadní a jižní části Evropského kontinentu nebyl doposud patogen objeven. Stejně tak v oblasti Asie, tedy v místech, kam ještě zasahuje přirozený výskyt *F. excelsior*. Nicméně vzhledem k dosavadním poznatkům o

rychlosti šíření této infekce se dá předpokládat, že se i zde tato patogenní houba brzy objeví (Steinbock, 2013).

Z počátku byla příčina odumírání jasanů v Evropě špatně pochopena. Za původce odumírání byly často považovány jiné druhy patogenních hub, popřípadě saprofytických hub a za primární příčinu odumírání byly považovány špatné abiotické podmínky jako například dlouhá období sucha nebo časně a pozdní mrazy (Przybyl 2002, Cech, 2006). O několik let později bylo zjištěno, že *H. fraxineus* (v té době znám pouze v asexuální formě jako *C. fraxinea*) způsobuje symptomy typické pro odumírání jasanů, a byl tak označen za primární příčinu odumírání jasanů v Evropě (Kowalski, 2006; Bakys et al., 2009; Kowalski & Holdenrieder, 2009; Kirisits et al, 2009).

Vzhledem k rychlému šíření *H. fraxineus* a k vysoké intenzitě odumírání postižených jedinců, což jsou vlastnosti neobvyklé pro původní patogeny, se dá předpokládat, že je tento druh nepůvodní. Do Evropy byl zavlečen a jedná se tedy o invazivní druh (Queloz et al., 2011; Husson et al, 2011). Tato teorie byla nedávno podpořena zjištěním, že se *H. fraxineus* přirozeně vyskytuje na *F. mandshurica* Rupr. v Japonsku a Koreji. Byl zde poprvé popsán již v roce 1993 pod jménem *Lambertella albida* Gillet. (Zhao et al., 2012). Přesto doposud nebyly z asijských druhů jasanů popsány žádné symptomy odumírání typické pro evropské jasanové kolonizované touto houbou. K jasanům, které jsou dosud považovány za rezistentní se řadí druhy *F. mandshurica* a *F. chinensis* Rox. s přirozeným výskytem v Japonsku a Číně, což naznačuje, že je *H. fraxineus* původem z těchto oblastí (Zheng & Zhuang, 2014). Bylo zjištěno, že populace *H. fraxineus* v Japonsku mají větší genetickou diverzitu než populace v Evropě. To tedy posiluje teorii, že *H. fraxineus* pochází z jihovýchodní Asie (Gross et al, 2014). Stále je však zapotřebí další výzkum v této oblasti, aby bylo možné odhalit přesný geografický původ patogenní houby, který doposud není znám (Gross et al., 2012).

3.2. Taxonomie a morfologie původce odumírání jasanů

Hymenoscyphus fraxineus – voskovička jasanová patří do rodu *Hymenoscyphus* – voskovičky, čeledi Helotiaceae – voskovičkovité, řádu Helotiales – voskovičkotvaré, třídy Leotiomycetes – voskovičkoplodé, kmenu Ascomycota – vřeckovýtrusné a říše Fungi – houby. Rod *Hymenoscyphus* celkově obsahuje více než 150 druhů, z nichž většina je dnes považována za saprofyty (rozkládající mrtvou organickou hmotu). Až do evropské epidemie nekrózy jasanu způsobené *H. fraxineus*, nebyl v tomto rodě znám

žádný druh, který by jakýmkoli způsobem parazitoval na rostlinách (Wang et al., 2006). *H. fraxineus* vytváří na infikovaných řapících z předchozí vegetační sezóny četná apothecia bílé barvy, velká v průměru jeden až tři milimetry. Apothecia se vytváří na černých pseudosklerociích pokrývajících řapíky, v apoteciu se vytváří hyalinní jednobuněčné askospory velké $13-21 \times 3,5-5,0 \mu\text{m}$. Anamorfa (*C. fraxinea*) se vyznačuje tvorbou hnědých fyalid ($16-24 \times 4-5 \mu\text{m}$), v nichž jsou uloženy krátké válcovité, hyalinní konidie (Kowalski, 2006). Viz obr. č. 2. Apothecia (vlevo) a konidie ve fyalidách.



Obr. č. 2. Apothecia (vlevo) a konidie ve fyalidách (Rozsypálek, 2012).

3.3. Životní cyklus *Hymenoscyphus fraxineus*

Životní cyklus *H. fraxineus* není zcela objasněn. Pro jeho objasnění je důležité zjistit jeho původ a studovat jeho životní cyklus na původních hostitelských rostlinách. V původním prostředí se pravděpodobně chová tato houba saprofytický a přežívá jako endofyt pouze v jasanových listech. Kdežto u evropských a severoamerických jasanů, s nimiž neprošla společnou evolucí, zasahuje taktéž do dřevnatých částí (floému a xylému) a způsobuje tak závažná poškození charakteristická pro odumírání jasanů (Gross et al., 2014). Výzkum nekrózy jasanu a *H. fraxineus* se zaměřil především na *F. excelsior*, takže životní cyklus této houby a charakteristické symptomy jsou nám známy především ve spojení s tímto hostitelem (Kirisits et al, 2009). Je pravděpodobné, že se životní cyklus ani symptomy infekce nebudou nijak zásadně lišit ani u jiných hostitelů rodu *Fraxinus* spp., u kterých *H. fraxineus* způsobuje odumírání (Piribauer, 2013).

H. fraxineus přezimuje na zčernalých sklerotizovaných řapících infikovaných a opadaných v loňské vegetační periodě. Na začátku léta se na těchto řapících začínají tvořit apothecia, která uvolňují askospory. Ty se následně šíří větrem což infekci usnadňuje přenos i na dlouhé vzdálenosti (Kowalski & Holdenrieder, 2009). Výjimečně se mohou apothecia vyskytovat i na kořenových krčcích mladých rostlin odumřelých vlivem infekce (Kirisits et al, 2012). Sporulace je nejintenzivnější na začátku léta, ale fruktifikace je značně závislá na příznivých klimatických podmínkách, takže ke sporulaci může dojít i v jarním a podzimním období (Hietala et al., 2013; Lustr et al., 2014).

Za vstupní bránu infekce jsou dnes považovány především listy a řapíky listů (Cleary et al., 2013). V místech uchycení askospor na jasanových listech se začínají koncem léta postupně vytvářet malé nekrotické léze (Gross et al, 2014). Tyto léze se postupně šíří na řapíky, způsobují zasychání listů a nevyhnutelně vedou k předčasnému opadu listů v pozdně letních měsících (Freinschlag, 2013). V místech napojení listů na letorost pravděpodobně prochází infekce do dřevnatých částí rostliny (Kirisits et al, 2009). Následně probíhá infekce v dřevnatých částech rostliny (floém a xylém). Ve chvíli, kdy se infekce rozšíří natolik, že zasáhne celou běl a buňky kambia dochází k rychlému vadnutí celých letorostů a větví nad místem infekce (Schumacher, 2007, 2011). Vzhledem k tomu, že výskyt apothecií na mrtvých letorostech v koruně je neobvyklý, dosahuje často životní cyklus *H. fraxineus* "slepé uličky". A to právě v místě infekce dřevnatých částí (Gross et al., 2014). Sporulace na kořenových krčcích mladých rostlin, hrála pravděpodobně významnou roli v šíření *H. fraxineus* za přispění lidské činnosti a to při obchodu s prostokořenným sadebním materiálem na dlouhé vzdálenosti (Timmermann et al., 2011).

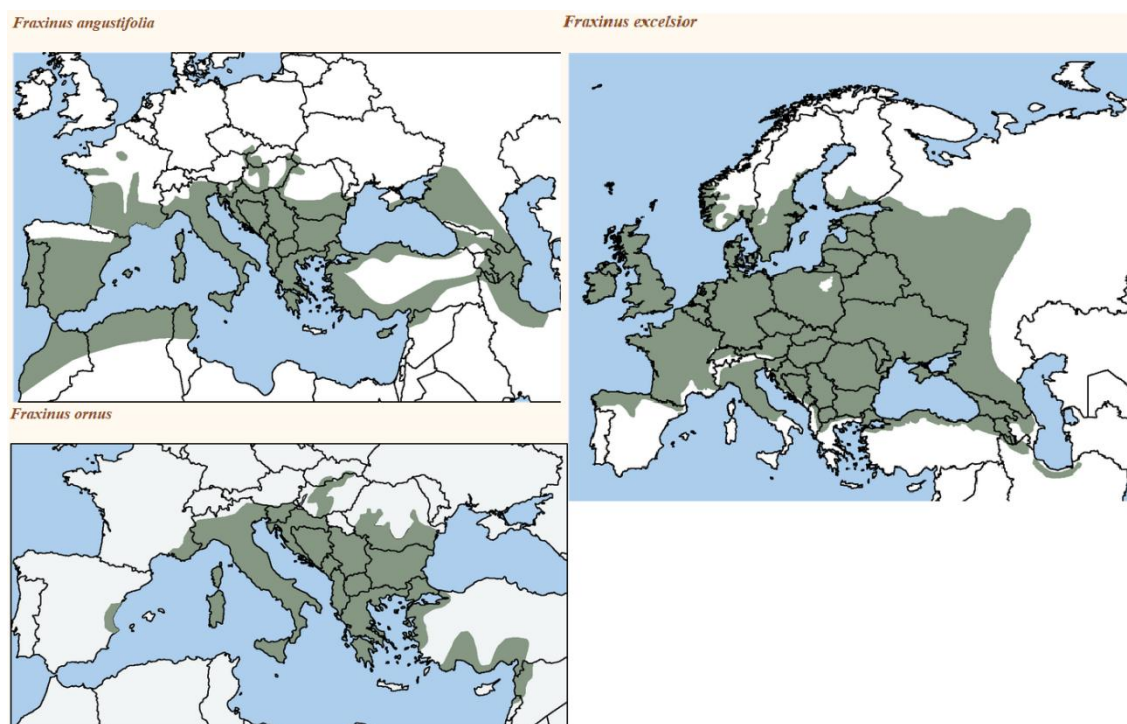
Role anamorfního stádia *Ch. fraxinea*, která vytváří na podzim a v zimě při nízkých teplotách falidy s konidii, v životním cyklu této houby doposud není jasná a stále se o ní diskutuje (Kowalski a Bartnik, 2010). Produkované konidie jsou v současné době považovány za neinfekční, protože při pokusech na agarovém médiu neklíčí (Kirisits et al, 2013).

V poslední době byl pozorován i druhý způsob, jímž patogen vniká do pletiv hostitelského jedince. Kromě infekce skrze listy a řapíky mohou askospory pravděpodobně pronikat také přímo do letorostů, kmene a kořenů. Předpokládá se, že by

tato pletiva mohla být infikována skrze lenticely a poranění. Tento způsob infekce však dosud nebyl experimentálně prokázán (Husson et al., 2012). Ve chvíli, kdy je hostitel oslaben infekcí *H. fraxineus*, stává se často velmi atraktivním pro další patogeny kořenového systému, jako jsou václavky *Armillaria* spp., dřevnatky *Xylaria* spp. a šupinovky *Pholiota* sps., což jsou patogenní organismy napadající sekundárně kořeny oslabených jedinců (Husson et al., 2012). Primární příčina rozsáhlých kořenových a bazálních nekrot je tak stále diskutována, prvotním původcem bazálních nekrot mohou být také původní patogeny kořenového systému jako například václavky *Armillaria* spp. a *H. fraxineus* může být jen sekundární patogen kolonizující zraněné tkáně (Enderle et al., 2013).

3.4. Hostitelé *Hymenoscyphus fraxineus* v Evropě

Jasan ztepilý (*F. excelsior*), jasan úzkolistý (*F. angustifolia* Vahl.) a jasan zimář (*F. ornus* L.), jsou tři původní evropské druhy rodu *Fraxinus* (Úradníček et al., 2009). Největší areál přirozeného rozšíření má v Evropě *F. excelsior*. Sahá od jižního Švédska a Finska na severu po jižní Itálii na jihu a od Portugalska a Irska na západě po Írán na východě (viz obr. č. 3.) (Úradníček et al., 2009). Občas se tento druh jasanu pěstuje v monokulturách (především v Anglii, kde má velmi příznivé podmínky), ale nejčastěji se používá ve smíšených porostech s jinými druhy listnatých dřevin na vlhkých, na živiny bohatých půdách (Frivold, 1994; Roloff & Pietzarka, 2010).



Obr. č. 3. Mapa rozšíření původních evropských druhů jasanu (Fraxigen, 2005).

Zbylé dva druhy jasanu se vyskytují přirozeně spíše v oblastech jižní až střední Evropy. *F. angustifolia* má severní rozšíření na jihu České republiky a ve střední Francii, jižní hranici přirozeného výskytu tvoří státy severní Afriky. Západní a východní hranice rozšíření je srovnatelná s jedinci *F. excelsior* (Portugalsko a Írán). *F. ornus* má nejmenší areál přirozeného výskytu, jeho severní hranice se nachází na jižním Slovensku, západní na východě Španělska, jižní a východní na jihu Turecka (Úradníček et. al., 2009).

Z těchto tří původních evropských druhů jasanu jsou poškozovány infekcí *H. fraxineus* *F. excelsior* a *F. angustifolia* (Bakys et al, 2009; Matlakova, 2009; Kowalski et al, 2010). U *F. ornus* prozatím nebyly v přirozených podmínkách pozorovány žádné symptomy infekce, díky čemuž se zdá být rezistentní (Kirisits et al, 2009). Z mimoevropských druhů jasanů byly objeveny symptomy odumírání u tří amerických druhů jasanu. Jedná se o *F. americana*, *F. pensylvanica* a *F. nigra*. Dále byl *H. fraxineus* odizolován z chřadnoucího *F. mandshurica* v Estonsku (Drenkhan, 2010). Celkem jsou známy další čtyři druhy mimoevropských jasanů, které jsou napadány touto patogenní houbou (Drenkhan a Hanso, 2010).

F. excelsior je jednoznačně nejintenzivněji napadanou a nejvíce poškozovanou hostitelskou rostlinou *H. fraxineus*. Tento fakt může způsobit velké problémy, a to nejen v lesnictví, kde je tento druh jasanu často výrazně zastoupen, ale také v městské a krajinné zeleni (Pautasso a kol., 2013). Jako velký problém se v poslední době ukazuje především úspěšná obnova břehových porostů v krajině a jasanových alejí podél cest. Přestože *H. fraxineus* napadá všechny věkové třídy *F. excelsior*, u mladých jedinců pozorujeme mnohem větší poškození a mortalitu vlivem infekce nežli u jedinců dospělých (Pliūra et al, 2011). Jistou nadějí pro zachování tohoto druhu jasanu v Evropě nám poskytuje zjištění značných rozdílů v intenzitě chřadnutí mezi jednotlivými jedinci tohoto druhu. S velkou pravděpodobností stojí za těmito rozdíly značná diverzita v genetické odolnosti jednotlivých proveniencí *F. excelsior* v Evropě. (Kopinga & de Vries, 2012; Enderle et al, 2013.; Freinschlag, 2013; Stener, 2013).

3.5. Symptomy odumírání jasanů

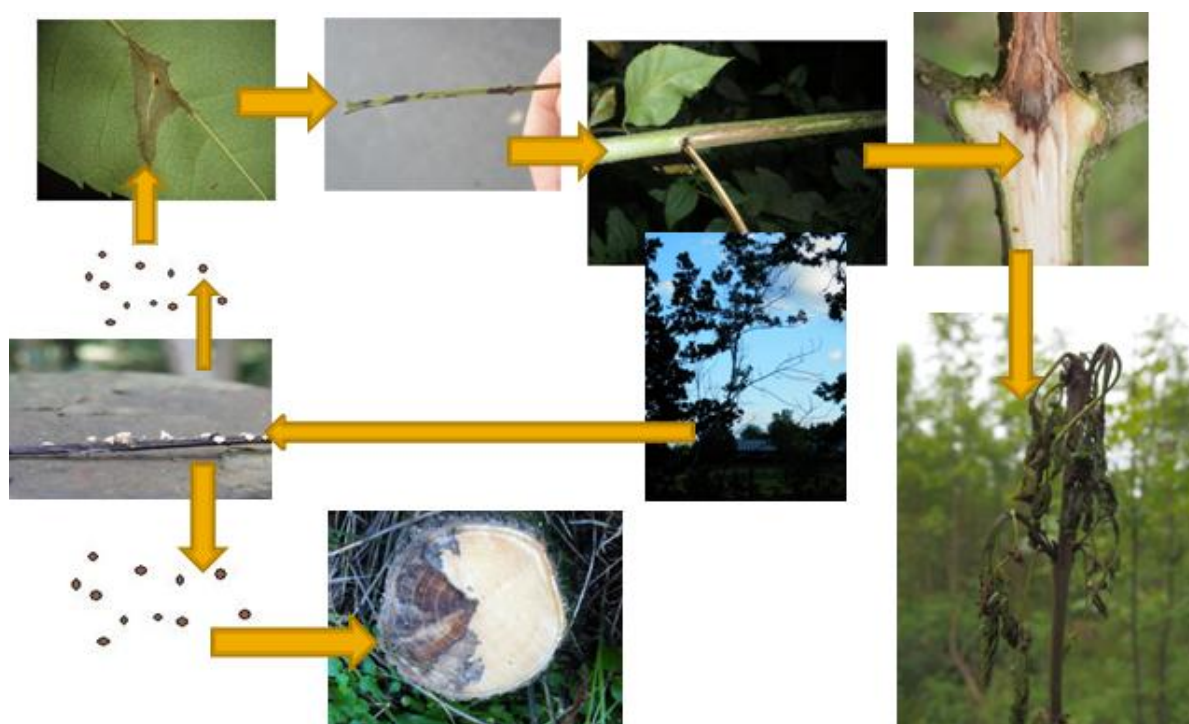
Onemocnění obvykle začíná na nadzemní části hostitelských rostlin, pouze ve výjimečných případech může dojít již v počátečních stádiích k infekci kořenové části (Kowalski a Holdenrieder, 2008). Symptomy objevující se v korunách stromů postižených infekcí vedou v mnoha případech až ke smrti postiženého jedince (Skovsgaard et al., 2010). U mladých stromů bývá průběh onemocnění akutní a k mortalitě dochází již po pár letech od propuknutí infekce, zatímco u dospělých jedinců bývá průběh onemocnění chronický a infikovaný jedinec může často přežít i desítky let (Kowalski & Holdenrieder, 2008).



Obr. č. 4. Mladý jedinec (3 roky) *F. excelsior* dva roky od prvního propuknutí infekce (vlevo). Dospívající jedinec (8 let) *F. excelsior* rovněž dva roky od prvního propuknutí infekce (vpravo) (Rozsypálek, 2012).

H. fraxineus způsobuje na hostitelských dřevinách z rodu *Fraxinus* řadu symptomů. Mezi nejvýraznější patří odumírání letorostů a větví spojené s vadnutím a přisycháním listů nad místem infekce (Halmschlager a Kirisits, 2008). K dalším příznakům patří tvorba podkorních nekrotů žlutočervené a později hnědé barvy. Tento jev je spojen se zčernáním floému, kambia a plamencovitým zabarvením jádrového dřeva (xylému) do šeda až šedočerna (Kowalski a Holdenrieder, 2008). Podkorní nekrózy se začínají vytvářet často okolo, nebo poblíž listové jizvy, což je důkazem toho, že vstupní branou infekce jsou listy a řapíky listů, skrze které se infekce dostává do dřevnatých částí (Kräutler a Kirisits, 2012). Zvětšování podkorních nekrotů je způsobováno odumíráním floému, což vede k odumírání celých výhonů a vadnutí listů v distálním směru od infikované části hostitelské rostliny (Kirisits et al, 2009).

Infikovaní jedinci reagují na tvorbu podkorních nekrotů vytvářením kalusu, kterým se snaží vzniklé poškození izolovat a zabránit další expanzi patogena (Kirisits et al, 2008). Tato reakce je však vzhledem k velkému infekčnímu tlaku patogenní houby často velmi neúčinná a infikovaný jedinec nakonec infekci podléhá (Husson et al., 2012). Další možností zmírňování následků infekce je tvorba sekundárních výhonů jakožto nástroje pro nahrazení ztracené asimilační plochy. Někteří vitální jedinci *F. excelsior* mají schopnost tvorby těchto výhonů velmi silnou a mohou tak mnohem déle odolávat infekci (Kowalski et al, 2010).



Obr. č. 5. Symptomatický cyklus *H.fraxineus* - *F.excelsior* (Rozsypálek, 2014).

3.5.1. Defoliace

Symptomy nekrotů jasanu se poprvé objevují právě na listech. Zachycené askospory pomocí apresoria prorůstají do pletiv listu a začínají vytvářet nekrotů (Steinbock, 2013). Nekrotů postupují po listové žilnatině k centrální listové žilce a řapíku (viz obr. č. 6.). Ve chvíli, kdy se infekce dostává k řapíku, začínají listy postupně schnout a opadávat (Bakys et al, 2009). Někdy se také stává, že opadávají celé listy včetně řapíku ještě v zeleném stavu bez přítomnosti viditelných nekrotů na listové ploše (Kräutler a Kirisits, 2012). Pozorování a experimentální důkazy jasně ukazují, že předčasný opad listů, jakožto důsledek pokročilé infekce v listu, končí velmi často stoprocentní defoliací koruny postižených jedinců (Freinschlag, 2013).



Obr. č. 6. Růst listové nekrózy způsobené infekcí *H. fraxineus* (Rozsypálek, 2013).

3.5.2. Podkorní nekrózy na letorostech

Po opadu listů zasažených infekcí *H. fraxineus* se začínají na letorostech objevovat podkorní nekrózy. K růstu podkorních nekroz velmi často dochází až v podzimních a prvních zimních měsících. Některé podkorní nekrózy se mohou objevit i na jaře příštího roku. (Kirisits et al, 2009). Podkorní nekrózy jsou elipsoidního tvaru. Z počátku mají žlutočervené zbarvení, které postupně tmavne až do tmavě hnědé barvy (Kirisits et al, 2012). Pod kůrou infikovaných letorostů je viditelně tmavě hnědá až černá vrstva infikovaných buněk floému a kambia. Dochází taktéž ke zbarvení jádrového dřeva, přičemž xylémové buňky infikované *H. fraxineus* se zbarvují do šeda až šedočerna (Freinschlag, 2013).



Obr. č. 7. Viditelná podkorní nekróza (vlevo) a diskolorace xylému vlivem infekce (Rozsypálek, 2014).

Vzhledem k faktu, že podkorní nekrózy nevyrostají ze všech listových jizev po infikovaných listech, je možné, že včasný opad infikovaných listů zabraňuje často patogenní houbě v prorůstání do letorostů a ostatních dřevnatých částí hostitele (Gross et al, 2014). Z tohoto pohledu se potom jeví coby nesmyslná teorie, že intenzita defoliace v letních měsících vyjadřuje obecně náchylnost jasanu k infekci (Freinschlag, 2013).

3.5.3. Bazální nekrózy – odumírání celých stromů

V některých případech byl *H. fraxineus* odizolován z kořenového systému jasanových sazenic, na kterých byly viditelné symptomy odumírání na nadzemní části rostliny (Schumacher a kol., 2010). Dříve byly tyto infekce nalézány v kořenových systémech napadených stromků a přisuzovány houbám *Phytophthora* spp. V nedávné době byl ovšem nalezen důkaz potvrzující primární roli *H. fraxineus* v tvorbě bazálních nekróz, způsobujících infekce kořenových a bazálních částí infikovaných jasanů. Teorie o primární roli hub rodu *Phytophthora* v tvorbě bazálních nekróz u chřadnoucích jasanů tak byla vyvrácena (Schumacher et al, 2010, Husson et al, 2012). Nebylo nalezeno spojení mezi infekcí skrze listy - větve a infekcí v bazálních a kořenových částech infikovaných jedinců. Což znamená, že askospory *H. fraxineus* mohou infikovat kambium přes kůru ve spodní části kmene, pravděpodobně přes lenticely (Husson et al., 2012). Po infekci kořenů a báze kmene, na kterých vznikají nekrotické léze, jsou rostliny vystaveny infekci ostatních patogenů kořenového systému, jako jsou václavky *Armillaria* spp., které dále zhoršují jejich zdravotní stav a urychlují odumírání (Kowalski et al, 2010, Husson et al, 2012).



Obr. č. 8. Bazální infekce způsobená patogenní houbou *H. fraxineus* (Rozsypálek, 2014).

3.6. Možnosti ochrany a obrany lesa

Možnosti ochrany a obrany jasanů a jasanových porostů jsou vzhledem k rychlému šíření a velkému infekčnímu tlaku *H. fraxineus* velmi malé. Ve školkařských provozech je možné použít chemické ošetření sadebního materiálu. Tato opatření jsou však neefektivní, neboť rostliny jsou chráněny pouze po dobu setrvání ve školkařském provozu. Po výsadbě do lesa bývají infekcí silně poškozovány a způsobují zvyšování infekčního tlaku na okolní porosty (Gross et al., 2014). Použití chemické ochrany (látek fungicidní povahy) v porostech je nereálné vzhledem k pravděpodobným negativním účinkům na přirozenou mykoflóru lesních stanovišť. Velkoplošné používání fungicidních přípravků by v lesnictví mohlo vést k nerovnováze makro- a mikronutrientů v půdním prostředí, potažmo k eutrofizaci podzemních a povrchových vodních zdrojů (Forestry commission, 2005). Dalším rizikem masivního použití fungicidů je možnost vývinu rezistentních kmenů *H. fraxineus* vůči těmto látkám (Pearson, 2009). Z těchto důvodů je užití fungicidních látek možné pouze pro individuální ochranu cenných dřevin v krajině a ve městském prostředí.

Pravděpodobně jako jediná možnost zachování jasanu v Evropě se jeví vyhledávání a šlechtění jedinců se zvýšenou genetickou odolností vůči infekci. Téměř ve všech porostech *F. excelsior* můžeme najít malé procento jedinců, kteří jsou infekcí jen minimálně zasaženi i přes obrovský infekční tlak (Stener, 2012). Nejlepším způsobem jak zachovat *F. excelsior* je vyhledávat takovéto jedince a pracovat s nimi jak v přirozených lesních porostech, tak ve šlechtitelských programech, díky čemuž bychom mohli získat odolnější jedince (Gross et al., 2014).

Další možností obrany je možné využití mykovirů. Podobně jako u rakoviny kůry kaštanovníku *Cryphonectria parasitica* An.. Tento výzkum je však teprve v počátcích a prozatím pouze víme, že se mykoviry na kulturách *H. fraxineus* vyskytují (Corine et al., 2014). Stále nevíme o jaké mykoviry se přesně jedná, ani zda mají nějaký vliv na agresivitu patogenní houby. Zajímavé výsledky přinesl výzkum Kowalski a Bartnik (2010). Kultury *H. fraxineus* preferují pro svůj růst teploty kolem 20 °C. Při zvýšení teploty na 30 °C se růst kultur značně zpomalil. Prokázali nízkou úspěšnost izolací patogenní houby z infikovaných letorostů, které byly před izolací pět hodin louhovány ve vodě o teplotě 36 °C. Ve výrazně teplých ročních obdobích mohou být teplotní podmínky uvnitř jasanových tkání dostatečně extrémní, aby dokázaly výrazně

snížit životaschopnost *H. fraxineus* v infikovaných rostlinných tkáních (Hauptman et al., 2013).



Obr. č. 9. *Fraxinus excelsior* bez zjevných symptomů *H. fraxineus* v porostu s obrovským infekčním tlakem této patogenní houby (Rozsypálek, 2015).

4. Hlavní hypotézy práce

4.1. Vliv infekce *Hymenoscyphus fraxineus* na fenologii *Fraxinus excelsior* L.

Tato hypotéza vychází z pozorování velkých rozdílů v nástupu jednotlivých fenologických fází (především v jarním období) v porostech *F. excelsior* zasažených infekcí. U silně symptomatických jedinců dochází vlivem infekce ke zpoždění jednotlivých fenologických fází až o několik týdnů.

4.2. Faktory ovlivňující intenzitu fruktifikace *H. fraxineus*

Havrdová (2014), uvádí, že intenzita infekce je silně závislá na vlhkosti prostředí, v němž se vhodný hostitel nachází. Cílem je ověřit, zda má vlhkost prostředí vliv na fruktifikaci *H. fraxineus*. Předpokládáme, že při snížení vlhkosti prostředí (například redukcí bylinného patra, nebo snížením zapojení porostu) klesne také intenzita a délka fruktifikace *H. fraxineus*.

4.3. Faktory ovlivňující intenzitu poškození jednotlivých jedinců *F. excelsior* v porostu.

V porostech *F. excelsior* se srovnatelným infekčním tlakem jsou pozorovány významné rozdíly v intenzitě chřadnutí jednotlivých jedinců. Otázkou zůstává, jaké faktory nejvíce ovlivňují tuto diverzitu. Bude testována hypotéza, že jedinci výrazně symptomatictí jsou infekcí *H. fraxineus* více poškozováni, než jedinci vypadající zdravěji.

4.4. Otestování citlivosti *F. excelsior*, *F. pensylvanica* a *F. americana* k infekci kulturou *H. fraxineus*

Po provedení inokulací kulturou *H. fraxineus* přímo do pletiv kmene vybraného souboru testovaných jedinců, tří druhů jasanů, bude testována citlivost k infekci. Testovány budou následující jasanové druhy: jasan ztepilý *F. excelsior*, jasan pensylvánský *F. pensylvanica* a jasan americký *F. americana*.

4.5. Test patogenity odlišných morfotypů kultur *H. fraxineus*

Čermáková (2014) uvádí, že tmavější morfotypy *H. fraxineus* rostou v kulturách výrazně pomaleji, než morfotypy světlé. Tento výsledek bude testován inokulací identických kultur do pletiv živých jasanů. Předpokládáme, že světlé kultury si udrží

rychlejší růst i v pletivech hostitelské rostliny a způsobí tak mnohem větší poškození než kultury tmavé.

4.6. Obranná opatření proti infekci v epidemické a postepidemické době

Z dosavadního pozorování vyplývá, že v porostech, v nichž je jasan pouze v příměsi do 10 %, jsou jasanové méně poškozovány infekcí, než v porostech s vysokým zastoupením jasanů. Tento fakt může být způsoben překrytím infikovaných řapíků vrstvou opadavých listů z ostatních dřevin, což může významně snížit množství askospor uvolňovaných do ovzduší. Pro potvrzení hypotézy bude upraven půdní kryt za účelem snížení fruktifikace nebo omezení sporulace *H. fraxineus*. Lze očekávat, že na pokusných plochách bude výrazně snížena koncentrace askospor uvolňovaných do ovzduší ve srovnání s kontrolní variantou.

5. Metodika práce

5.1. Izolace kultur *Hymenoscyphus fraxineus*

Vzorky pro záchytné izolace *H. fraxineus* do kultur byly odebírány od 30. 9. 2013 do 31. 12. 2014. z celkem 54 lokalit. Odebrán byl vzorek s aktivní podkorní nekrózou, byl označen a převezen do laboratoře (viz obr. č. 10.). Zde byl nařezán na štěpinky xylému vhodné k izolaci na Petriho miskách. Následně byly vzorky v prostředí flow-boxu sterilizovány a umístěny na živné médium.



Obr. č. 10. Odběr a úprava vzorků před sterilizací (Rozsypálek, 2013).

Kultury houby *H. fraxineus* byly izolovány na živném médiu v Petriho miskách, pro záchytné izolace bylo použito médium sladidový agar (MEA 3,5) s přídavkem streptomycinu.

Složení agaru: pivovarská sladinka sušená	35 g
pepton pro bakterii	0,5 g
agar	13 g
destilovaná voda	1000 ml

Příprava živného média pro záchytné izolace: Nejprve rozsuspendujeme 53 g sušené živné půdy v 1000 ml destilované vody a ponecháme minimálně 30 minut bobtnat. Následně sterilizujeme v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C. Poté vyndáme a směs pomalu ochladíme ve vodní lázni. Při teplotě 60 °C přidáme 50 mg streptomycinu na 1 litr media. Takto připravené medium se rozlije do sterilních petriho misek tak, aby vznikla vrstvička zhruba 4 mm tlustá.

Následná kultivace izolátů probíhá po dobu jednoho měsíce ve tmě v termostatu při teplotě 23 °C. Poté se získané kultury přeočkují na sladínový agar (MEA 3,5) bez streptomycinu.

5.2. Vliv infekce *Hymenoscyphus fraxineus* na fenologii *Fraxinus excelsior* L.

V rámci této části výzkumu byla vybrána skupina jedinců *F. excelsior*, na níž byly v průběhu dvou vegetačních sezón pozorovány a zaznamenávány změny ve fenologických fázích a symptomech vyvolaných infekcí *H. fraxineus*. Zároveň byla na plochách se sledovanými jedinci zjišťována intenzita fruktifikace *H. fraxineus* a měřeno množství askospor uvolňovaných do ovzduší. Taktéž byla měřena základní klimatická data.

Pozorování probíhala od roku 2013 do roku 2014, a to vždy od 1. 4. do 1. 12. v sedmidenním intervalu. Na začátku vegetační doby byl u každého jedince zhodnocen zdravotní stav a změřen průměr kmene ve výčetní výšce. Následně byly každých sedm dní všechny sledované dřeviny důkladně prohlédnuty a byly zaznamenány veškeré změny ve fenologii, nebo vyskytujících se symptomech infekce. Změny byly zaznamenávány do databáze, popřípadě foceny. Celkem bylo za dvě vegetační sezóny získáno 79 pozorování. Cílem těchto pozorování je popsat co nejvíce faktorů, které jsou příčinou velkých rozdílů v chřadnutí jednotlivých jasanů v porostech a detailně popsat bionomii houby *H. fraxineus*.

5.2.1. Charakteristika stanoviště a sledovaných jedinců

Sledování probíhala na lokalitě Vranovický les (N 48°56.63430', E 16°36.09068'). Průměrná roční teplota v této oblasti je 9,42 °C a průměrný roční úhrn srážek zde dosahuje 510 mm. Při srovnání s průměry České republiky 7,5°C a 704 mm (CHMU, 2015) je zřejmé, že teploty v oblasti jsou významně nadprůměrné a úhrn srážek je zde velmi nízký. Srážkový deficit na výzkumné lokalitě vyrovnává přítomnost řek Svratky a Šatavy, díky nimž se zájmové území nachází v prostředí lužního lesa s vysokou hladinou podzemní vody a občasným zaplavováním v jarních měsících. Bylinné patro je tvořeno převážně (cca 90 % plochy) zlatobýlem kanadským (*Solidago canadensis* L.) s příměsí kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica* L.) a svízele přítuly (*Galium aparine* L.), v rámci jarního aspektu se na lokalitě vyskytuje hojně česnek medvědí (*Allium ursinum* L.). Keřové patro je přítomno pouze místy a tvoří jej především svída bílá (*Cornus alba* L.) a bez černý (*Sambucus nigra* L.).

Sledováno bylo celkem 40 jedinců *F. excelsior*. Každý strom z vybrané skupiny byl viditelně označen štítkem (viz obr. č. 11. Označení jedinců pro fenologické pozorování), aby nemohlo dojít k záměně. Sledované jasanové stromy byly pěstovány v monokultuře s řadovou výsadbou. Soubor sledovaných jedinců byl rozdělen na dvě poloviny, přičemž jedna polovina (20 stromů) byla vysazena v roce 1998 a druhá v roce 2008 (viz obr. č. 12.). Sledovány tedy byly dřeviny ve věku 18 a 8 let. Každá polovina byla ještě rozdělena na dvě části po deseti jasanových stromech, přičemž do jedné části byly vybrány dřeviny výrazně symptomatické a do druhé dřeviny mírně symptomatické. Pro toto rozdělení byla použita metodika „Hodnocení zdravotního stavu jasanových porostů zasažených infekcí *H. fraxineus*“ (viz kapitola 5.6. Metodika hodnocení jasanových porostů). Do skupiny mírně symptomatických jedinců byly zařazeny jasanové stromy s hodnocením 1 až 3 a do skupiny výrazně symptomatických jedinců dřeviny ohodnocené stupni 6 až 8. Toto rozčlenění bylo zvoleno pro možnost zjistit rozdíly ve fenologických fázích a intenzitě symptomů mezi jedinci málo a výrazně poškozovanými infekcí.



Obr. č. 11. Označení jedinců pro fenologické pozorování (Rozsypálek 2013).



Obr. č. 12. Sledované porosty *F.excelsior* (Rozsypálek 2014).

5.2.2. Hodnocení fenologických fází

Hodnocení fenologických fází probíhalo od 1. 4. do opadu 100 % listů. Hodnoceny byly především jarní fenologické fáze, neboť podzimní fenologické fáze nemohly být až na jednoho jedince (viz obr. č. 13. Fenologická fáze č. 6. u jediného nesymptomatického jedince) vlivem symptomů infekce (často 100% defoliace koruny už v letních měsících) hodnoceny. Pro hodnocení fenologických fází byla použita zjednodušená osmistupňová metodika.

Hodnocené fenofáze:

-1 – rostlina odumřela v průběhu jarních měsíců

0 - rostlina v dormanci,

1 - aktivace pupenů (jejich zvětšení a rozevírání),

2 - rašení pupenů (na rostlině se nenacházejí žádné vyvinuté listy, více než 50 % pupenů je již rozevřeno),

3 - nedovyvinuté listy (na rostlině je méně než 50 % listů plně vyvinuto),

4 - plně vyvinuté listy (více než 90 % listů je plně vyvinuto),

5 - počátek žloutnutí listů (do 50 % listů ztrácejících chlorofyl a zbarvujících se do žluta),

6 - zbarvení celé koruny (více než 90 % listů ztrácejících chlorofyl a zbarvujících se do žluta),

7 - počátek přirozeného opadu listů (50% defoliace),

8 - celkový opad listů (více než 90% defoliace).



Obr. č. 13. Fenologická fáze č. 6. u nesymptomatického jedince (Rozsypálek, 2014).

5.2.3. Hodnocení fruktifikace *H. fraxineus*

Fruktifikace *H. fraxineus* byla hodnocena na stejných výzkumných plochách, na kterých probíhalo hodnocení vlivu infekce *H. fraxineus* na fenologii *F. excelsior*. Na těchto plochách byly vytyčeny tři plošky o rozměrech 50 x 50 cm. Dvě plošky se nalézaly v 18 let starém porostu *F. excelsior*, přičemž u jedné byla prováděna pravidelná redukce bylinného patra sekáním a na druhé se nechávalo bylinné patro přirozenému vývoji. Třetí ploška byla v osmiletém porostu a i zde bylo bylinné patro ponecháno bez zásahu.

Sledování probíhá od roku 2013 v týdenním intervalu od 1. 4. do 1. 12. Na pokusných ploškách jsou spočítány veškeré infikované (černá barva) řapíky a je vyhodnoceno procento řapíků s přítomností apothecií *H. fraxineus* (viz obr. č. 14. Řapík s přítomností apothecií *H. fraxineus*). Pro jednodušší vyhodnocení získaných dat byla vytvořena pětistupňová škála, do níž byla získaná hodnota zařazena.

Metodika hodnocení fruktifikace:

- 0 - nenalezeny žádné plodnice,
- 1 - plodnice objeveny v malé míře do 10 % řapíků především na vlhčích místech,
- 2 - plodnice nalezeny ve větší míře do 50 % řapíků s plodnicemi,
- 3 - plodnice nalezeny v hojné míře nad 50 % řapíků s plodnicemi,
- 4 - plodnice nalezeny na více než 90 % řapíků.



Obr. č. 14. Řapík s přítomností apothecií *H. fraxineus* (Rozsypálek, 2014).

V sezóně 2014 se vlivem příznivých klimatických podmínek objevily dvě období fruktifikace. Jedno v jarních měsících s vrcholem v polovině června a druhé v létě s vrcholem v polovině srpna. Vzhledem k mírnému překryvu těchto období byla zavedena metoda, jež odlišuje apothecia stará z předchozího období a apothecia nově vytvořená. Za stupeň fruktifikace byla přidána jedna až tři hvězdičky, které vyjadřovaly procento starých apothecií na počítaných řapících * = do 30 % starých plodnic, ** = do 60 % starých plodnic a *** = do 100 % starých plodnic (např: 3 ** znamená nad 50% řapíků s přítomností plodnic, z nichž 30 – 60 % tvoří staré usychající plodnice). Jakožto stará apothecia byla hodnocena ta, která mírně zhnědla a přischla na řapíku (viz obr. č. 15. Stará apothecia na řapíku).

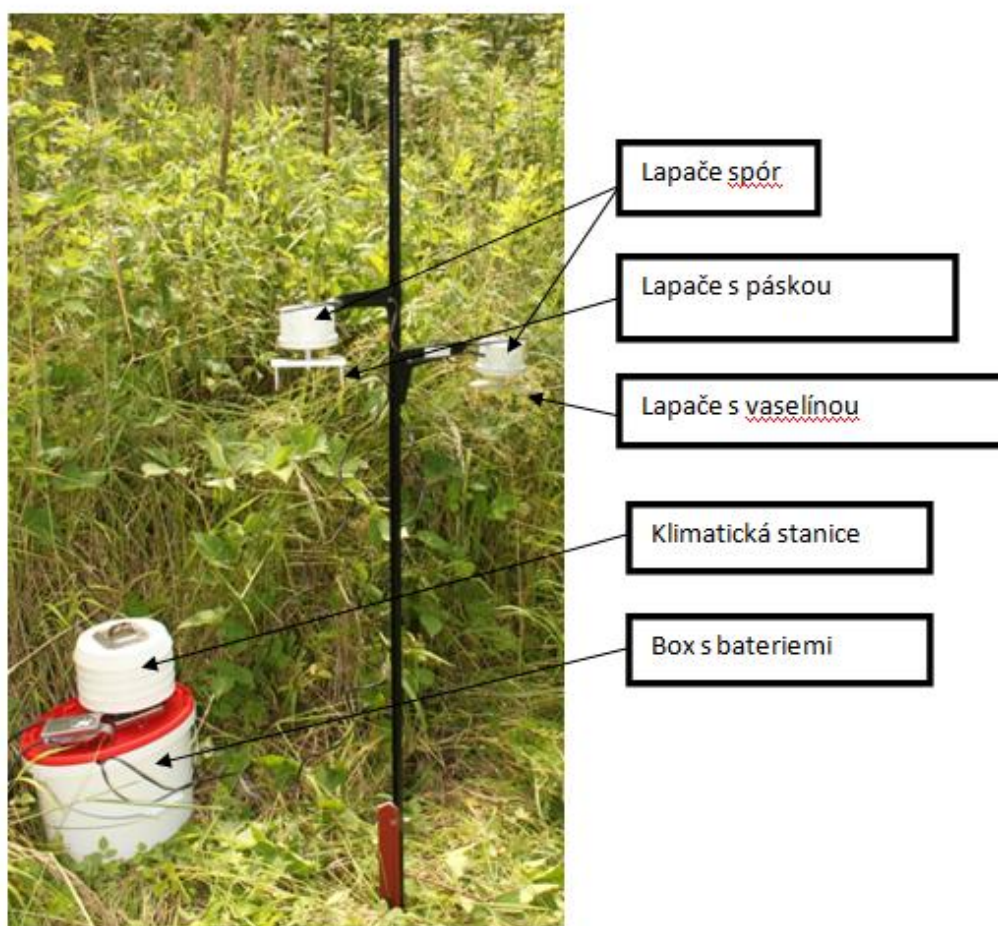


Obr. č. 15. Stará apothecia na řapíku (Rozsypálek, 2014).

5.2.4. Měření intenzity sporulace *H. fraxineus*

Na výzkumné ploše byl umístěn aktivní lapač spor vlastní konstrukce (viz obr. č. 16.), poháněný elektrickou energií z autobaterie. Spory byly lapány pouze v roce 2014 a to od 2. 7. do 29. 8. Lapač byl vystavován v sedmidenním intervalu a doba expozice lapače na ploše byla 48 hodin. Celkem bylo provedeno 12 měření.

Spory byly lapány na oboustrannou lepicí pásku, která byla ihned po konci expozice lapače umístěna do Eppendorf Safe-Lock tuby. Ty byly převezeny do laboratoře, kde byly vzorky uskladněny v teplotě -20°C . Ze získaných vzorků byla následně extrahována DNA a metodami kvantitativní PCA analýzy byl určen počet spor *H. fraxineus* na daném vzorku.



Obr. č. 16. Aktivní lapač spor (Čermáková, 2014).

5.2.5. Hodnocení nástupu a intenzity jednotlivých symptomů infekce

Toto hodnocení probíhalo na všech čtyřiceti jedincích *F. excelsior*, u kterých byly hodnoceny fenologické fáze. Hodnocení probíhalo od 1. 4. 2013 do 1. 12. 2014. Každý jedinec byl jednou za sedm dní pečlivě prozkoumán a veškerá nově objevená poškození, a symptomy odumírání byly zaznamenány.

Pro snadnější zpracování byla vytvořena stupnice desíti symptomatických fází 0 – 9 a ve chvíli, kdy se na zkoumaném jedinci objevil symptom odpovídající některé z těchto

fází, byla tato skutečnost k danému datu kontroly zaznamenána. Od roku 2014 byla vyhodnocována také intenzita projevu jednotlivých symptomů, která byla vyjadřována v procentech koruny zasažené tímto symptomem.

Symptomatické fáze:

- 0 – žádné symptomy se aktuálně neprojevují,
- 1 – reaktivace podkorních nekrotů,
- 2 – odumírání větví v důsledku reaktivace nekrotů,
- 3 – odumírání stromů vlivem bazálních nekrotů,
- 4 – první nekrotózy na listech,
- 5 – začátek chřadnutí listů vlivem infekce *H. fraxineus*,
- 6 – usychání listů od okrajů,
- 7 – začátek defoliace,
- 8 – 50 % a vyšší defoliace,
- 9 – 100 % defoliace,
- 10 – první objevení podkorních nekrotů.

Výjimku tvoří symptomatická fáze 10 – objevení podkorních nekrotů, která není vyjádřena v procentech, ale přímo počtem podkorních nekrotů na 40 listových jizev po odpadlých infikovaných řapících. Na každém infikovaném jedinci, u něž byly pozorovány symptomy na listech, bylo po opadu infikovaných listů označeno 40 listových jizev (viz obr. č. 17. Označení listových jizev po infikovaných řapících), u kterých byl vyhodnocován počet podkorních nekrotů.



Obr. č. 17. Označení listových jizev po infikovaných řapících (Rozsypálek, 2014).

5.2.6. Měření klimatických dat

Na každé výzkumné ploše byla umístěna malá klimatická stanice (viz obr. č. 16. Aktivní lapač spor), která po dobu výzkumu sbírala data o teplotě ovzduší, vzdušné vlhkosti a ovlhčení povrchu.

5.3. Inokulační testy

Inokulační testy probíhaly od 1. 4. 2014 do 15. 3. 2015 v lesní školce Řečkovice (49°15'8.112"N 16°35'49.180"E). Celkem bylo infikováno 150 dvouletých, krytokořenných sazenic osmi kulturami *H. fraxineus*. Rostliny byly pravidelně jednou týdně sledovány a byl měřen růst podkorních nekrot s přesností na 1 mm. Po ukončení vegetační periody a přechodu rostlin do dormance byly všechny rostliny převezeny do laboratoře a podrobeny laboratornímu zkoumání.

5.3.1. Charakteristika stanoviště, souboru pokusných jedinců a kultur k inokulaci

Inokulační pokusy probíhaly v lesní školce Řečkovice. Tato školka se nachází v nadmořské výšce 220 m.n.m.. Rostliny pro infekční pokusy byly umístěny ve foliovníku (viz obr. č. 18.) a pravidelně 2-4x týdně zalévány. Pro sledování základních klimatických charakteristik byla ve foliovníku umístěna automatická měřící jednotka HOBO, sloužící ke sledování teploty a vlhkosti vzduchu v intervalu 60 minut.

Popis čidla HOBO :

teplota: rozsah - 20 až + 70 °C, přesnost 0,7 °C, rozlišení 0,4 °C;

vlhkost: rozsah 5 - 95 % relativní vlhkosti, přesnost 5 %;

výrobce: AMET Bílovice (Martinek, 2012).

Zařízení slouží k zaznamenání průběhu teplot, vlhkosti a zjištění extrémních hodnot obou veličin, které by mohly mít vliv na abnormality v růstu jasanů a patogenní houby.



Obr. č. 18. Foliovník se sazenicemi pro infekční pokusy (Rozsypálek, 2014).

K infekčním testům bylo zakoupeno 150 dvouletých krytokořenných sazenic původem z Nizozemí od firmy ARBOEKO s.r.o. Jednalo se o 50 ks *F. excelsior*, 50 ks *F. pensylvanica* a 50 ks *F. americana*. Sazenice byly umístěny do foliovníku a ponechány 50 dnů na místě pro překonání transportního stresu. Poté bylo přistoupeno k inokulaci.

Pro inokulační pokusy bylo použito celkem osm kultur *H. fraxineus*. Čtyři světlé a čtyři tmavé monotypy. Kultury byly nejprve napěstovány na agar-sladovém médiu (viz kapitola 5.1.). Po dostatečném narostení kultur byly do misek vloženy malé štěpinky xylému *F. excelsior*, které posloužily jakožto nosič patogenní houby pro následnou inokulaci. 16. 6. 2014 byly všichni jedinci nainokulováni kulturou *H. fraxineus* (viz obr. č. 19.). Inokulace byly provedeny ve výšce 30 cm od báze stromu, byla změřena výška a průměr pro pozdější zhodnocení vlivu infekce na přírůst. Všichni jedinci byli pravidelně sledováni v týdenním intervalu. Byl měřen přírůst viditelných podkorních nekrot s přesností na 1 mm a zaznamenávána případná mortalita.



Obr. č. 19. Inokulace kulturou *H. fraxineus* (Rozsypálek, 2014).

31. 12. 2014 byl pokus ukončen. U všech jedinců byla změřena výška a průměr kmínku. Byla změřena konečná velikost viditelné podkorní nekrózy a všichni jedinci byli označeni a odvezeni do laboratoře.

5.3.2. Laboratorní vyhodnocení inokulačních pokusů

U vzorků převezených do laboratoře byla ještě jednou detailně přeměřena velikost viditelné podkorní nekrózy. Poté byly vzorky nafoceny a rozřezány po 0,5 cm, aby bylo možné zjistit rozsah infekce v pletivech dle diskolorace pletiv xylému a floému typické pro infekci *H. fraxineus* (viz obr. č. 20.).

Zjišťovány byly tyto informace:

Označení rostliny: *F. Excelsior* R BB1/1/3 – 2

Výška: 134cm

Průměr v místě inokulace: 1,1cm

Výška místa inokulace od báze: 32-34cm

První zbarvení dřevě: 52 cm

Vystoupení ze dřevě: 49 cm

Kontakt s kambiem: 46 cm

95 % dřevního válce zamořeno: 42 cm – Počátek viditelné podkorní nekrózy

100 % dřevního válce zamořeno: 40 cm

Místo mortality (případně místo nejrozsáhlejší infekce): 33 cm

100 % dřevního válce zamořeno: 32 cm

95 % dřevního válce zamořeno: 31 cm

Konec viditelné nekrózy: 26 cm

Kontakt s kambiem: 25 cm

Vystoupení ze dřevě: 22 cm

Poslední zbarvení dřevě: 20 cm

Jedinci, u kterých nemohla být laboratorní analýza provedena, byli ihned přeneseni a dále uchováváni v chladícím boxu při teplotě 4 °C.



Obr. č. 20. Laboratorní analýza inokulovaných rostlin (Rozsypálek, 2015).

5.4. Testování obraných opatření v infikovaných porostech *F. excelsior*

V roce 2013 bylo ve Vranovickém lese (N 48°56.64992', E 16°36.01407') vytyčeno pět pokusných ploch o rozměrech 5x5 m na nichž bylo provedeno variantní ošetření povrchu půdy za účelem zamezení sporulace *H. fraxineus*. V roce 2014 byly dobudovány další tři plochy. Všech osm ploch bylo ohrazeno ze všech stran fólií širokou 130 cm pro co nejlepší odstínění askospor z okolí výzkumných ploch (viz obr. č. 21.).



Obr. č. 21. Výzkumná plocha ohrazená fólií (Rozsypálek, 2013).

Účinnost opatření byla ověřována pomocí lapače spor umístěného uprostřed každé plochy. V roce 2013 byl pro lapání spor použit pasivní lapač spor (viz obr. č. 22.). Spory byly lapány na mikroskopická sklíčka natřená lékařskou vazelínou. Lapání probíhalo od 1. 5. 2013 do 31. 10. 2013. Expozice lapače byla nepřetržitá a vzorky byly odebírány jednou za sedm dnů. Celkem bylo odebráno 22 sérií vzorků. Vzorky byly vyhodnocovány pomocí mikroskopu. Bohužel bylo zjištěno, že pasivní lapače z neznámého důvodu nezvládnou dostatečně zachytit spory *H. fraxineus*. Pro optimální efektivitu lapání spor *H. fraxineus* jsme začali používat od roku 2014 aktivní lapač spor (viz obr. č. 16. Aktivní lapač spor).



Obr. č. 22. Pasivní lapač spor (Rozsypálek, 2013).

Nové technologii lapání spor byla přizpůsobena i metodika tohoto výzkumu. Zařízení pro lapání askospor jsme umístili do středu každé pokusné plochy. Doba expozice lapače na ploše byla zkrácena na 48 hodin, z důvodu kapacity autobaterie. Sběr vzorků probíhal jednou týdně vždy ve stejnou dobu, od července do září 2014. Vzorky byly bezprostředně po odebrání odvezeny do laboratoře a zamrazeny v teplotě -20°C . Celkem jsme za rok 2014 získali 320 vzorků z 8 pokusných ploch. Ze získaných vzorků byla následně extrahována DNA a metodami kvantitativní PCA analýzy byl určen počet spor *H. fraxineus* na daném vzorku. V prvním pololetí roku 2015 bychom měli z tohoto výzkumu získat první výsledky.

5.4.1. Varianty pokusných ploch vybudovaných v letech 2013 a 2014

Nejprve bylo v květnu 2013 vytyčeno pět pokusných ploch se třemi variantami úpravy půdního povrchu pro dosažení co nejúčinnějšího zamezení fruktifikace a sporulace *H. fraxineus*. Na první ploše bylo prováděno pravidelné odstraňování bylinného patra, což mělo přispět ke snížení vzdušné vlhkosti v přízemní vrstvě vzduchu a omezit tak fruktifikaci *H. fraxineus*. Na druhé a třetí ploše jsme testovali efekt mulčování na omezení distribuce askospor do ovzduší. Jako mulčovací materiál byly použity listy dubu zimního (*Quercus petraea* L.) o mocnosti pět a deset centimetrů. Tato vrstva zhruba odpovídá smíšenému dubojasanovému prorostu 50 na 50 a 80 na 20 ve prospěch dubu. Plochy čtyři a pět posloužily jako blízká a vzdálená kontrola.

V květnu 2014 byly vybudovány další tři plochy, na kterých je testován účinek dusíkatých látek, (dusičnanu draselného, močoviny a dusičnanu amonného) zvýšení koncentrace dusíku v humusové vrstvě půdy by mělo přispět k rychlejšímu rozkladu humusu (tedy i infikovaných jasanových řapíků) a omezit tak fruktifikaci *H. fraxineus*.

5.5. Metodika inokulace jasanů askosporami

V jarním období 2014 bylo odebráno dostatečné množství infikovaných jasanových řapíků a byly umístěny ve vlhkém prostředí vhodném pro fruktifikaci. Po dozrání velkého počtu plodniček byly plodničky odebrány a bylo vytvořeno inokulum z destilované vody a askospor. Za pomoci Bürkerovy komůrky byl určen počet askospor na 1 mm³ inokula (398 000 ks/mm³). Tímto inokulem byly infikovány dvě dvouleté krytokořenné sazenice *F. excelsior*. Inokulaci jsme provedli na kmínek (dvouletý letorost), jedenkrát na každé sazenici (2 x 1). Poté na větve (jednoletý, letošní nevyzrálý letorost) 2 x 2, řapík 2 x 4 a list 2 x 5. Při inokulaci na kmínek, větve a řapík bylo inokulum nasáto do buničité vaty, přiloženo k rostlině a obtaženo parafilmem, aby se omezilo vysychání. Inokulace na list byly provedeny postřikovačem. Polovina listů byla infikována inokulem s destilovanou vodou, druhá polovina byla pouze postříkána destilovanou vodou a ponechána jako kontrolní vzorek. Inokulace byly provedeny 6. 8. 2014. V klimatických komorách (viz obr. č. 23. Inokulační pokusy v klimatických komorách) byl nastaven na dva měsíce cyklus simulující letní dny s rozmezím teplot 18 - 25 °C, vlhkostí vzduchu 55 - 75 % a dlouhou fotoperiodou 14 hodin. 13. 10. byl cyklus změněn na podzimní režim, byly sníženy teploty na 12 - 19 °C, zvýšena vlhkost vzduchu na 65 - 85 % a zkrácena fotoperioda na 9 hodin. Mezi těmito dvěma cykly byl týdenní přechod, kdy jsme hodnoty postupně měnili, aby nedošlo u rostlin k šoku. Po 13. 12. jsme začali přecházet na zimní režim a rostliny byly přivedeny do dormance. 15. 1. 2015 byl pokus ukončen.

Po celou dobu trvání experimentu byly rostliny pozorovány v třídním intervalu a byla vyhodnocována přítomnost symptomů typických pro infekci *H. fraxineus*. Po převedení do dormance byly rostliny v laboratoři podrobeny destruktivní analýze pletiv xylému a floému. Pro zjištění rozsahu případné infekce v pletivech hostitelské rostliny byly veškeré dřevnaté části rozřezány po 0,5 cm a byl změřen rozsah diskolorace pletiv typický pro infekci.



Obr. č. 23. Inokulační pokusy v klimatických komorách (Rozsypálek, 2014).

5.6. Metodika hodnocení zdravotního stavu jasanů poškozovaných infekcí *H. fraxineus*.

Tato metodika byla vytvořena v roce 2013 a vznikla díky potřebě nástroje pro detailnější zhodnocení zdravotního stavu jasanů napadených infekcí *H. fraxineus*. Do vzniku této metodiky byla většina metodik používána pouze pro odlišení zdravých a infikovaných jedinců, což bylo pro potřeby našeho výzkumu málo. Vzhledem k velké diverzitě v intenzitě poškozování jedinců v porostech jsme se rozhodli vytvořit desetistupňovou škálu, která nám pomůže lépe rozlišit intenzitu, s níž jsou jedinci na zájmovém území poškozováni.

Dalším velkým problémem metodik používaných v Evropě pro hodnocení je jejich založení pouze nebo především na defoliaci. Vzhledem k velké reiterační schopnosti jasanů dokážou infikovaní jedinci velmi rychle nahrazovat ztracený asimilační aparát, díky čemuž může i silně napadený jedinec vypadat z pohledu defoliace jako naprosto zdravý. Přesto při bližším pohledu do koruny můžeme pozorovat velké množství symptomů infekce, sekundárních výhonů a naprosto zničenou přirozenou architekturu koruny (viz obr. č. 24.). Z tohoto hlediska používá naše metodika defoliaci pouze jako sekundární ukazatel, ke kterému je přihlíženo u starších dřevin. Hlavními kritérii naší

metodiky jsou proto celková vitalita, architektura koruny, množství sekundárních výhonů a jednotlivé symptomy infekce.



Obr. č. 24. Dle parametru defoliace zdravý jedinec, při bližším pohledu silně infikovaný jasan (Rozsypálek, 2013).

5.6.1. Otestování metodiky hodnocení zdravotního stavu jasanů poškozovaných infekcí *H. fraxineus*

Otestování metodiky probíhalo ve spolupráci se studentem Michalem Prouzou na skupině 502 jedinců *F. excelsior*. Hodnoceno bylo 180 jasanů ve věku osm let, pro kategorii mladí jedinci. 172 jasanů ve věku 18 let bylo hodnoceno v kategorii dospívající jedinci. Tyto dvě skupiny se nachází ve Vranovickém lese. Dále bylo hodnoceno 150 jasanů ve věku 90 let v kategorii dospělí jedinci. Tato skupina se nachází v oboře Bulhary.

Všichni tito jedinci byli hodnoceni nezávisle na sobě třemi stejnými hodnotiteli. Hodnotitelé byli pracovně nazváni: tvůrce – Jiří Rozsypálek (autor metodiky), odborník – Michal Prouza (student bakalářského studijního programu Lesnictví) a laik – Lucie Vaškebová (studentka Filozofické fakulty Masarykovy univerzity). První a druhá skupina byly zhodnoceny třikrát za sezónu. První hodnocení (jarní) proběhlo 14. 4. 2014 ještě před plným olistěním porostů. Druhé hodnocení (letní) proběhlo 23. 7. 2014

za plného olistění před vypuknutím symptomů spojených s infekcí *H. fraxineus*. Třetí hodnocení (podzimní) proběhlo 8. 10. 2014 po projevení symptomů (defoliace) typických pro infekci *H. fraxineus*. Třetí skupina 150 jedinců ve věku 90 let byla zhodnocena jen v rámci podzimního hodnocení. Výsledky hodnocení si každý hodnotitel zapisoval sám do terénního zápisníku.

5.7. Hodnocení rychlosti šíření infekce a mortality

Rychlost šíření patogenní houby *Ch. fraxinea* Kow. je sledována na skupině 2234 jedinců *F. excelsior* L. od roku 2011 do současnosti. Celkem tedy máme již pětileté pozorování. Tyto práce probíhají na lokalitě mlýnský les (N 49°19.58032', E 17°23.04500') - viz obr. č. 30. Výzkumné plochy Mlýnský les. Sledovaní jedinci byli rozděleni do tří skupin dle dosaženého věku v roce 2011: mladá výsadba 2 roky, celkem 2000 jedinců vysazených v roce 2010 (porost byl oplocen, což minimalizuje případný vliv zvěře). Dospívající stromy 8 – 17 let, celkem 38 jedinců, tato skupina byla bohužel velmi málo početná, ale vzhledem k zachování srovnatelných podmínek prostředí nebylo možné nalézt více jedinců v odpovídajícím věku. Dospělé stromy 60 – 70 let, celkem 196 jedinců. Výhodou tohoto terénního experimentu je především fakt, že všechny tři sledované skupiny se nacházejí v těsné blízkosti vedle sebe, takže se vyskytují ve srovnatelných podmínkách prostředí.



Obr. č. 30. Výzkumné plochy Mlýnský les (Rozsypálek 2012).

Pozorování bylo prováděno jednou ročně v přibližně stejnou dobu mezi 31. 3. – 10. 4. formou zhodnocení zdravotního stavu všech jedinců na dané ploše. Stromy při něm byly rozděleny do tří kategorií: zdravý, infikovaný a odumřelý. Dělení probíhalo na základě viditelných symptomů infekce, především pro odumírání typických podkorních nekrotů či zbarvení dřevního válce. Výsledky byly zaznamenávány do terénního zápisníku.

5.8. Statistické vyhodnocení dat

Data získaná v průběhu výzkumné činnosti byla statisticky analyzována statistickým softwarem (STATISTICA 12) od firmy Dell Statistica. V případech vážného porušení podmínek pro užití parametrických metod analýzy rozptylu (Shapiro-Wilksův test – test normality výběru, Levenův test – test homogenity rozptylů) byly data analyzována Kruskal-Wallisovým testem. V případech splnění podmínek byla data analyzována metodou ANOVA. Pro lepší prezentaci dat byl použit stejný software s možností přehledného grafického zobrazení dat. Všechny statistické testy byly prováděny na 5 % hladině významnosti ($\alpha=0,05$).

6. Výsledky práce

6.1. Izolace kultur *Hymenoscyphus fraxineus*

Odizolováno bylo celkem 42 kultur *H. fraxineus*. Tyto kultury byly z Petriho misek přeočkovány do zkumavek a zařazeny do sbírky kultur Ústavu ochrany lesů a myslivosti LDF MENDELU. Kultury byly následně využity pro další výzkum, například pro testování přítomnosti mykovirů (Čermáková, 2014). Dále bylo izolováno 134 kultur endofytních a saprofytních hub, které byly jako vedlejší produkt získány při záchytných izolacích *H. fraxineus* z pletiv jasanů.



Obr. č. 31. Sbíрка kultur endofytních hub doprovázejících infekci *H. fraxineus* (Rozsypálek, 2013).

6.2. Vliv infekce *Hymenoscyphus fraxineus* na fenologii *Fraxinus excelsior* L.

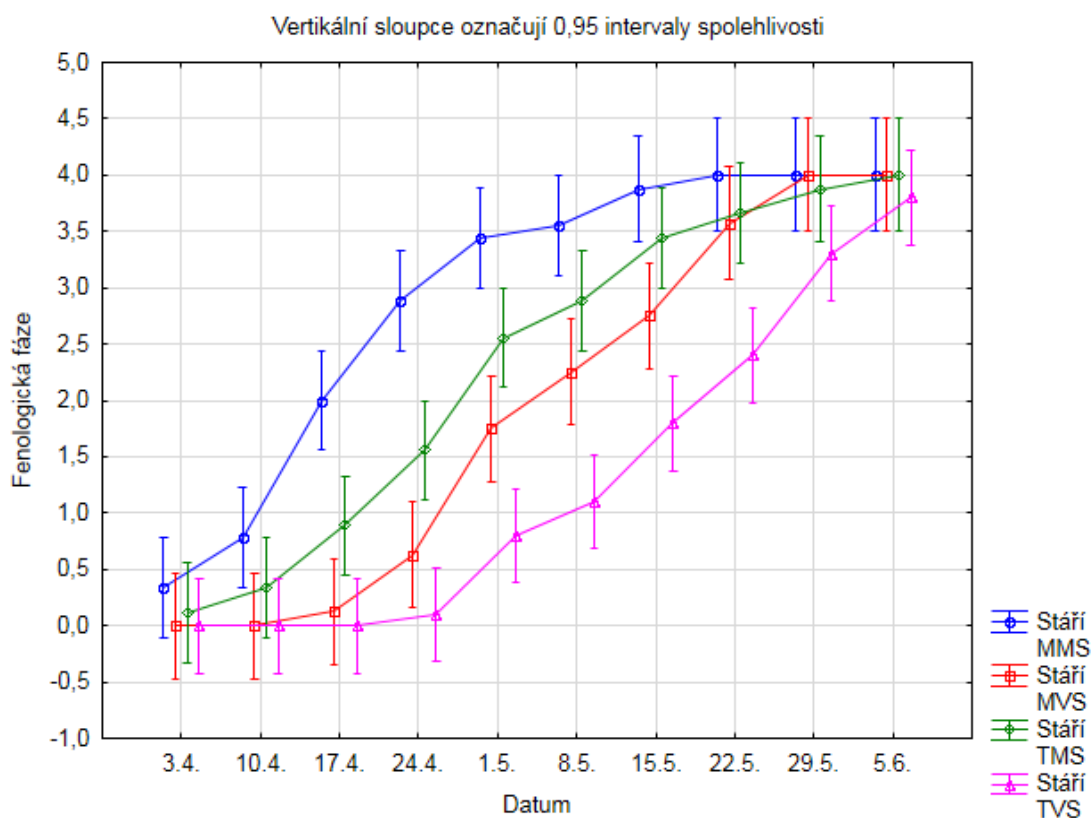
Podářilo se potvrdit hypotézu, že intenzita zasažení jasanu ztepilého infekcí *H. fraxineus* má významný vliv na průběh jarních fenologických fází. Dále byl detailně popsán průběh a intenzita jednotlivých symptomatických fází infekce na. Délka a intenzita fruktifikace teleomorfního stádia je ovlivňována stářím porostu a stavem

bylinného patra. Bylo zjištěno, že u výrazně symptomatických jedinců, se tvoří více podkorních nekrotů na stejný počet infikovaných listů, nežli u jedinců odolnějších vůči infekci.

6.2.1. Rozdíly v průběhu jarních fenologických fází u silně a slabě symptomatických jedinců

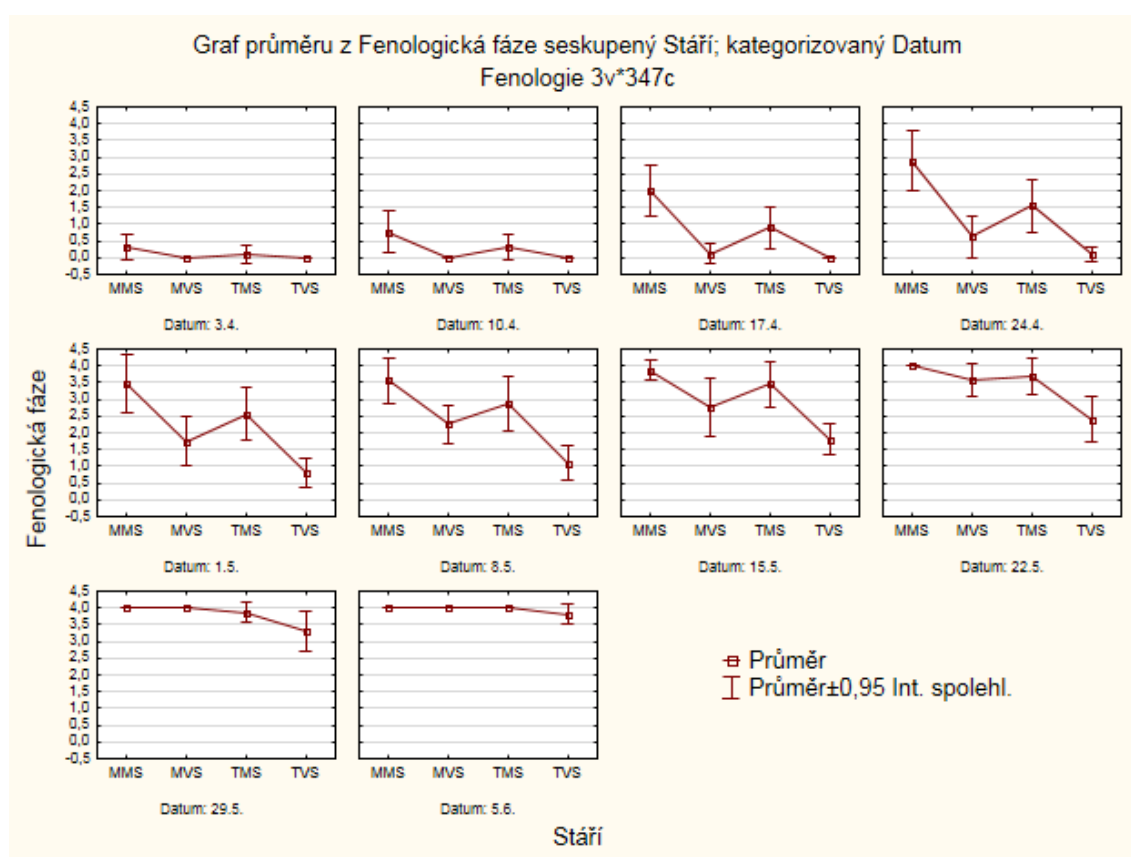
Byl potvrzen významný vliv intenzity infekce *H. fraxineus* na průběh jarních fenologických fází *F. excelsior*. Sledovaní jedinci ve skupině MMS (mlazina málo symptomatická) se od 17. 4. do 1. 5. 2014 statisticky významně lišili průběhem svých fenologických fází od skupiny jedinců MVS (mlazina výrazně symptomatická). Po celou dobu byly sledované jasany ze skupiny MMS o jednu až dvě fenologické fáze před skupinou MVS. Největší rozdíly pak byly pozorovány 24. 4. (viz graf č. 3. a tab. č. 1. Fenologické pozorování 24. 4. 2014) v tomto termínu měli jedinci MMS již z více než 50 % plně vyvinuté listy, zatímco skupina MVS se nacházela teprve ve fázi aktivace pupenů (jejich zvětšení a rozevírání). Jedinci ze skupiny MVS sice v průběhu května rozdíl ve fenologických fázích dorovnali, ale minimálně po dobu jednoho měsíce byl tento rozdíl jasně patrný (viz graf č. 1.).

Graf č. 1. Průběh fenofází u sledovaných jedinců *F. excelsior*.



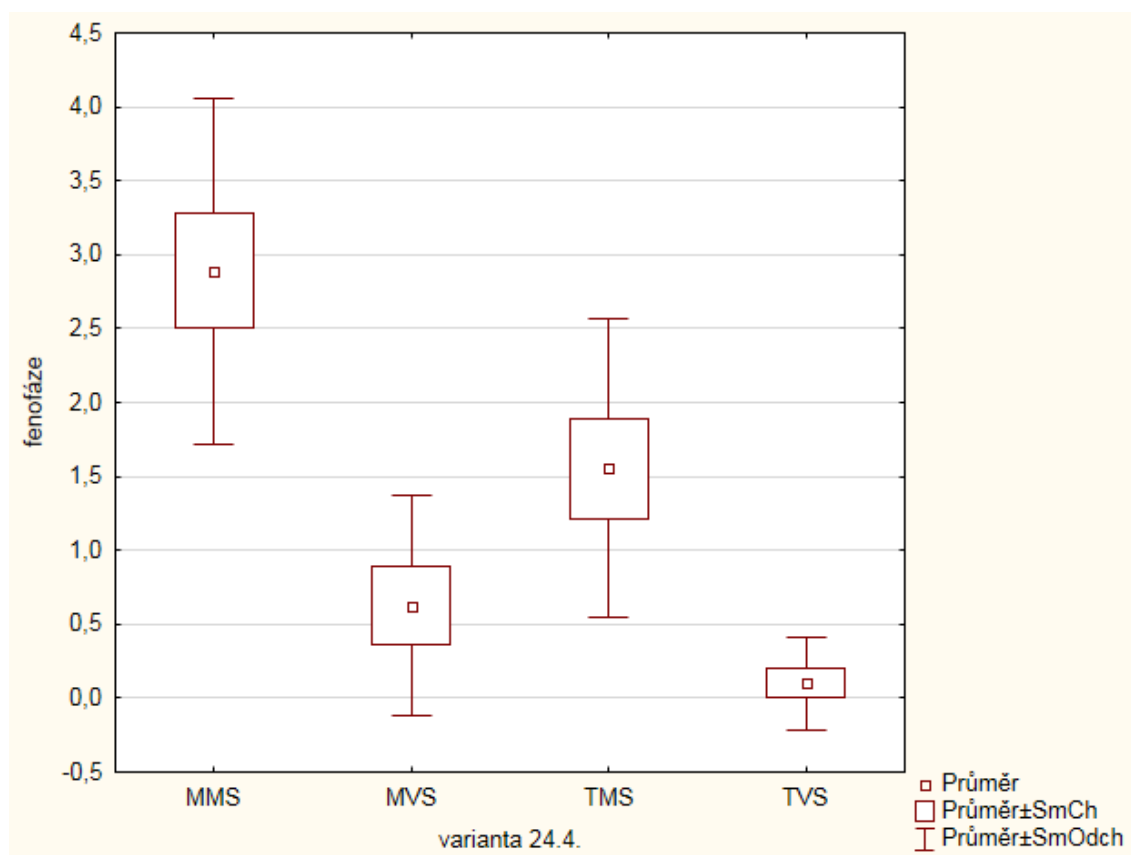
U sledovaných jedinců ve skupinách TMS (tyčovina málo symptomatická) a TVS (tyčovina výrazně symptomatická) byly taktéž pozorovány významné rozdíly v průběhu fenologických fází. Průběh fenologických fází se statisticky významně lišil od 1. 5. do 22. 2. Podobně jako u skupin v mlazině byla TMS po celou dobu až o několik fenologických fází napřed. Největší rozdíl mezi těmito skupinami byl 8. 5. (viz graf č. 4. a tab. č. 2. Fenologické pozorování 8. 5. 2014). Jedinci TMS měli již z více než 50 % rozvinuté listy, zatímco u skupiny TVS došlo pouze k aktivaci pupenů. TVS tento rozdíl srovnala k 15. 6.

Graf. č. 2. Rozdíly ve fenologických fázích v jednotlivých pozorováních.



Při srovnání obou porostů (*F. excelsior* 8 a 18 let), v nichž probíhalo hodnocení, jsme zjistili, že rozdíly mezi výrazně symptomatickými a málo symptomatickými jedinci se shodují. Pouze u starších jedinců, vlivem celkového posunutí fenologických fází ve vyšším věku rostliny, jsou tyto rozdíly posunuty o necelých čtrnáct dnů, což může při hodnocení fenologických fází u skupiny různověkových dřevin významně zkreslit výsledky.

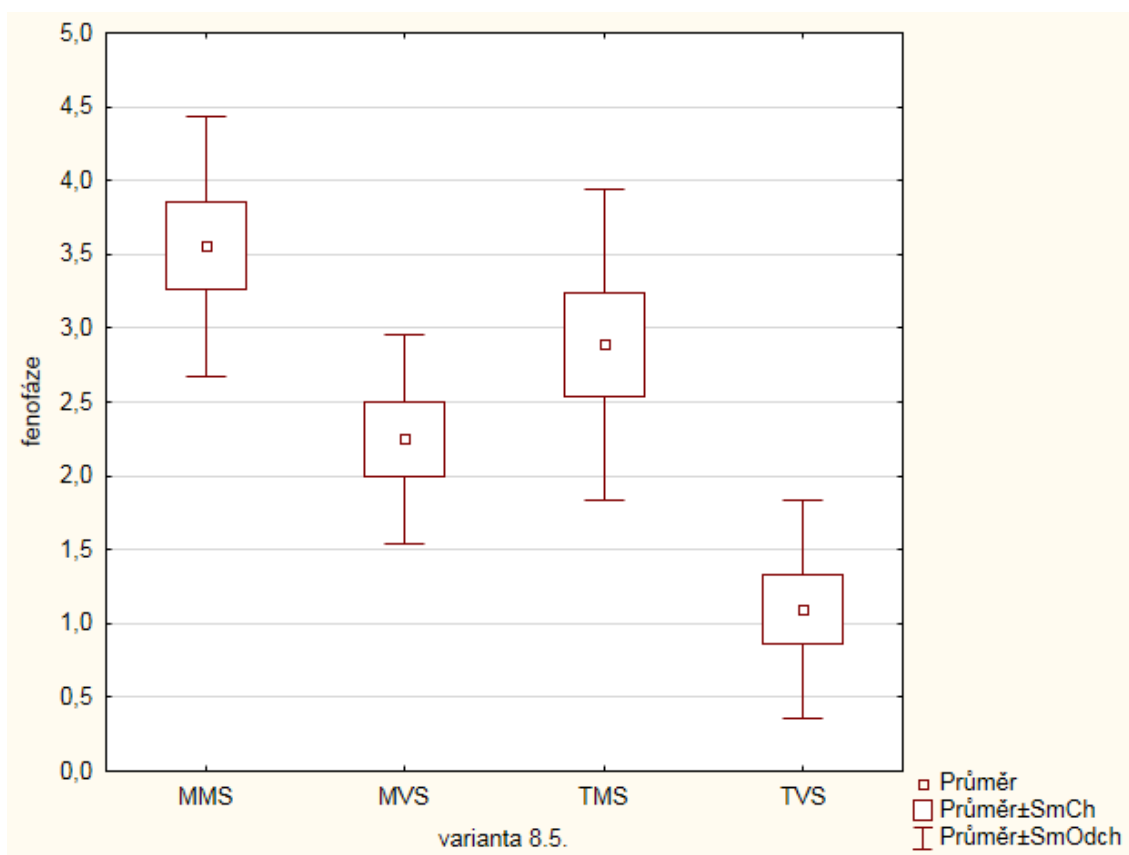
Graf č. 3. Fenologické pozorování 24. 4. 2014



Tab. č. 1. Fenologické pozorování 24. 4. 2014

Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); fenofáze (Fenologie) Nezávislá (grupovací) proměnná: varianta 24.4. Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=36) = 21,97311$ $p = ,0001$				
Závislá: fenofáze	MMS R:29,667	MVS R:14,313	TMS R:21,500	TVS R:9,1000
MMS		0,016241	0,600645	0,000129
MVS	0,016241		0,961965	1,000000
TMS	0,600645	0,961965		0,062522
TVS	0,000129	1,000000	0,062522	

Graf č. 4. Fenologické pozorování 8. 5. 2014



Tab. č. 2. Fenologické pozorování 8. 5. 2014

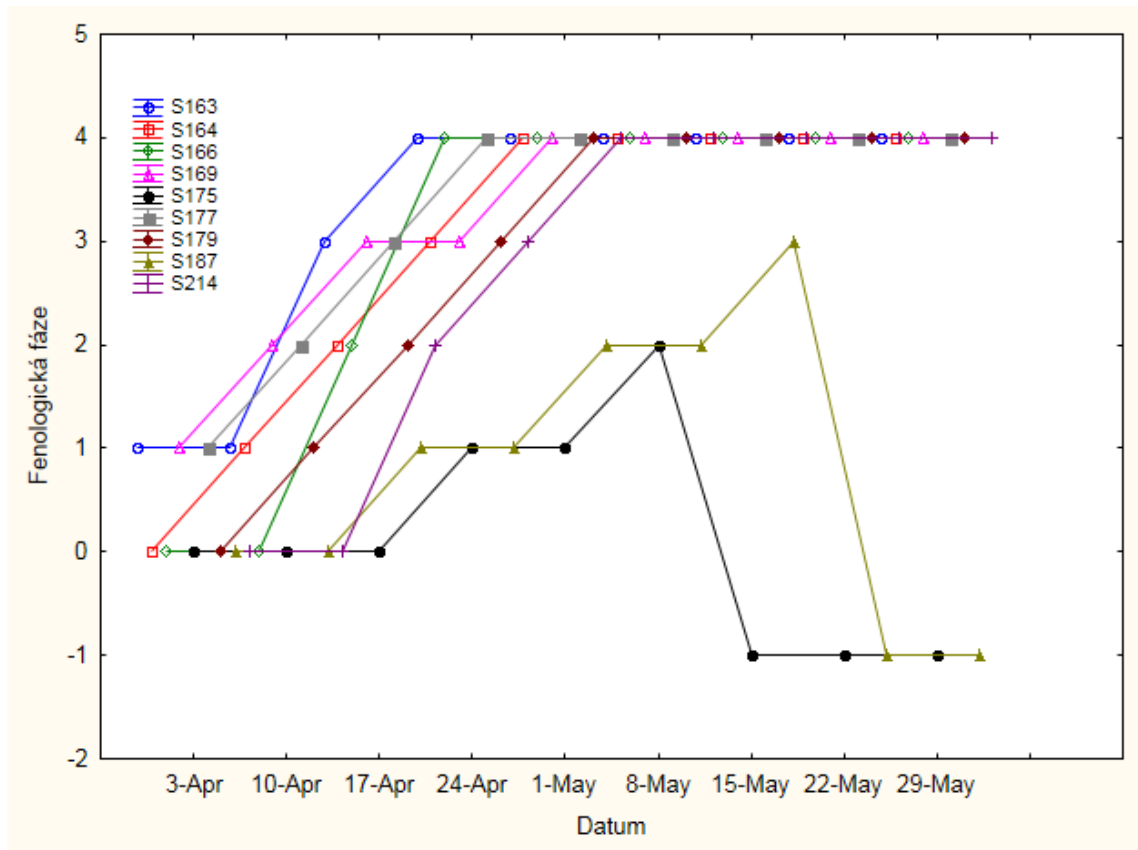
Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); fenofáze (Fenologie) Nezávislá (grupovací) proměnná: varianta 8.5. Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=36) = 19,94209$ $p = ,0002$				
Závislá: fenofáze	MMS R:27,833	MVS R:17,063	TMS R:22,333	TVS R:7,8000
MMS		0,212312	1,000000	0,000210
MVS	0,212312		1,000000	0,382927
TMS	1,000000	1,000000		0,016079
TVS	0,000210	0,382927	0,016079	

6.2.1.1. Opožděné fenologické fáze – indikátor vážné infekce v kořenové a bazální části rostliny

Při vyhodnocování průběhu fenologických fází se vyskytla zajímavá anomálie. Dva jedinci ve skupině mlazina málo symptomatická se průběhem fenologických fází shodovali spíše se skupinou jedinců výrazně symptomatických (viz graf č. 5). I

přestože na jejich nadzemní části bylo patrné jen minimální poškození v důsledku infekce *H. fraxineus* a nebyli ani nijak jinak poškozeni. Ve druhé polovině května oba jedinci odumřeli. Po detailním průzkumu mrtvých jedinců byla nalezena rozsáhlá infekce v bázi a kosterních kořenech těchto rostlin.

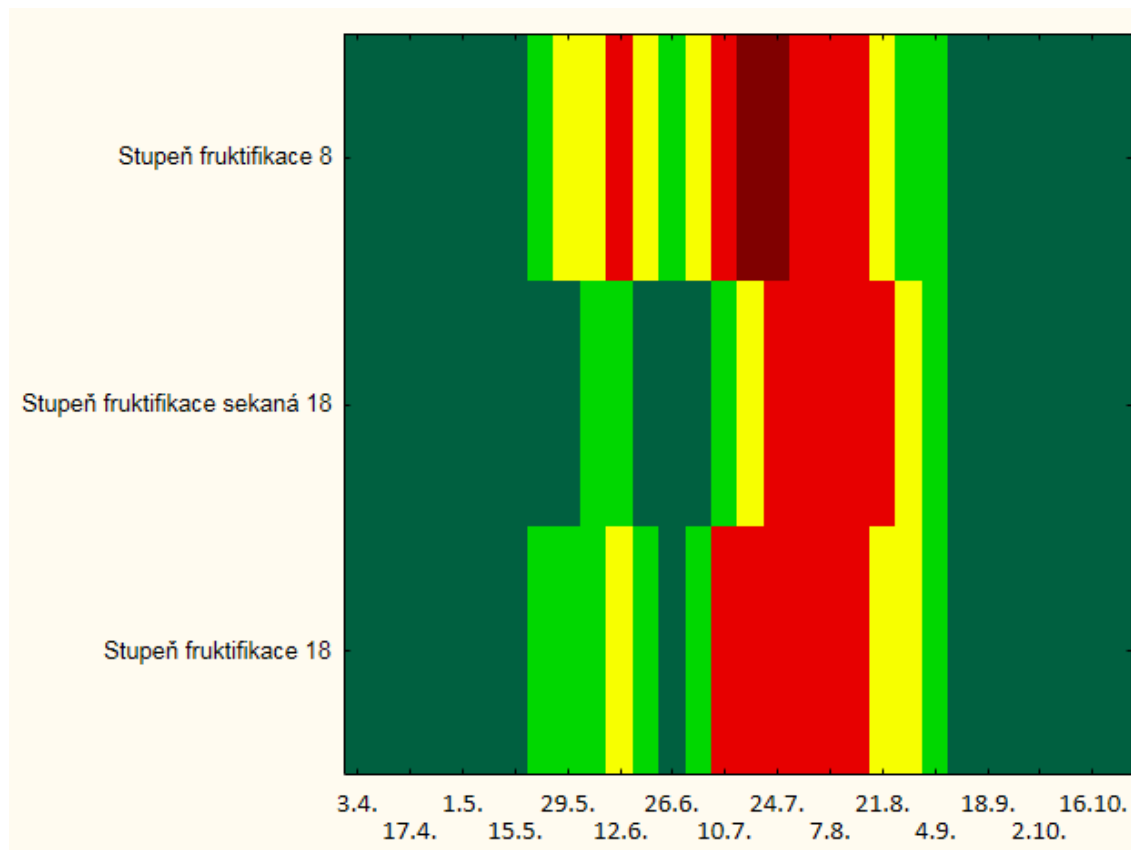
Graf č. 5. Výskyt anomálie ve skupině MMS.



6.2.2. Délka a intenzita fruktifikace *H. fraxineus*

Bylinné patro a struktura porostu mají významný vliv na délku a intenzitu fruktifikace teleomorfního stádia *H. fraxineus*. V roce 2014 bylo na výzkumných plochách ve Vranovickém lese zaznamenáno celkem 122 dní s výskytem apothecií voskovičky jasanové. První výskyt byl zaznamenán 22. 5., poslední 4. 9. 2014. V rámci tohoto období byly zaznamenány dvě periody zvýšené abundance apothecií. První (kratší a méně intenzivní) v časně letním období s kulminací 12. 6. a druhá v létě s vrcholem v týdnu od 17. do 24. 7. (viz graf č. 6.).

Graf č. 6. Výskyt apothecií *H. fraxineus* v roce 2014 (světle zelená barva = výskyt do 10 %, žlutá = do 50 %, červená = nad 50 % a tmavě červená nad 90 %).



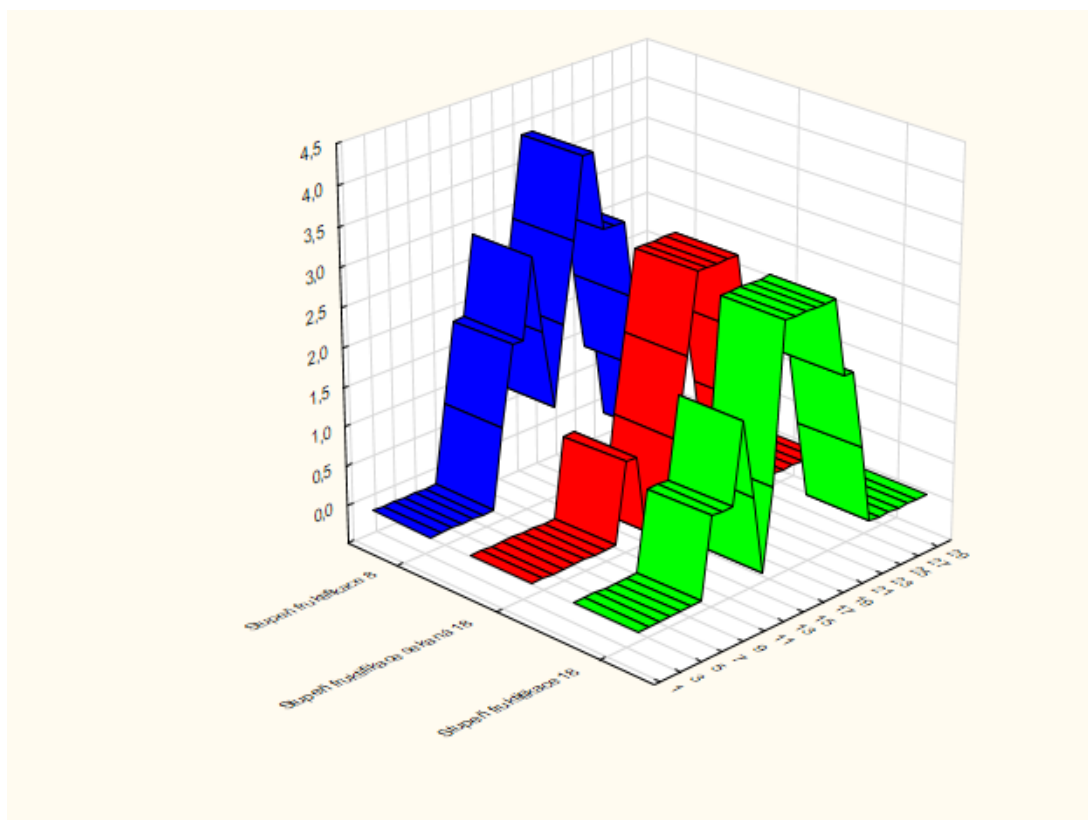
Nejlepší podmínky pro fruktifikaci této patogenní houby, byla hustá, osmiletá jasanová mlazina bez úpravy bylinného patra. Jen v tomto prostředí probíhala fruktifikace nepřetržitě od 22. 5. do 4. 9. 2014. Taktéž intenzita fruktifikace zde byla jednoznačně nejvyšší. Po dobu pěti týdnů se zde vyskytovala apothecia na více než 50 % infikovaných řapíků a 14 dnů byl počet řapíků s plodnicemi dokonce vyšší než 90 % (viz graf č. 7.).

Průměrné podmínky pro fruktifikaci byly v osmnáctiletém porostu bez úpravy bylinného patra. Apothecia se vytvářela ve dvou periodách přerušovaných týdnem od 26. 6. do 3. 7. 2014. Intenzita fruktifikace zde byla o něco nižší. Více než 50 % řapíků s přítomností plodnic zde bylo zaznamenáno po dobu šesti týdnů od 10. 7. do 14. 8. 2014. Více než 90% výskyt zde nebyl pozorován.

Nejkratší dobu probíhala fruktifikace na ploše v osmnáctiletém jasanovém porostu s úpravou bylinného patra sekáním. V této variantě byla délka fruktifikace výrazně kratší. První (časně letní) období fruktifikace zde trvalo jen od 5. 6. do 12. 6. 2014, a to

v intenzitě do 10 % řapíků s přítomností apothecií. Druhé období fruktifikace začalo 10. 7. 2014 s dvoutýdenním zpožděním ve srovnání s první variantou. Intenzita fruktifikace zde byla pět týdnů s výskytem apothecií na více než 50 % infikovaných řapíků a to od 24. 7. do 14. 8. 2014.

Graf č. 7. Intenzita fruktifikace dle jednotlivých variant prostředí (modrá = osmiletý porost bez úpravy bylinného patra, červená = 18 let starý porost se sekáním bylinného patra a zelená = 18 let starý porost bez úpravy bylinného patra).



6.2.3. Intenzita sporulace *H. fraxineus* a její korelace s fruktifikací.

Tento dílčí cíl bohužel prozatím nemohl být splněn, vzhledem k tomu, že získané vzorky z lapačů spor nebyly doposud vyhodnoceny. Lapače byly umístěny na všech třech plochách, na kterých byla hodnocena fruktifikace. Celkem bylo za rok 2014 odebráno 156 vzorků. Ty jsou v současné době vyhodnocovány metodami molekulární biologie (qPCR) ve spolupráci s Přírodovědnou fakultou Masarykovy univerzity a výsledky by měly být známy v druhém pololetí roku 2015.

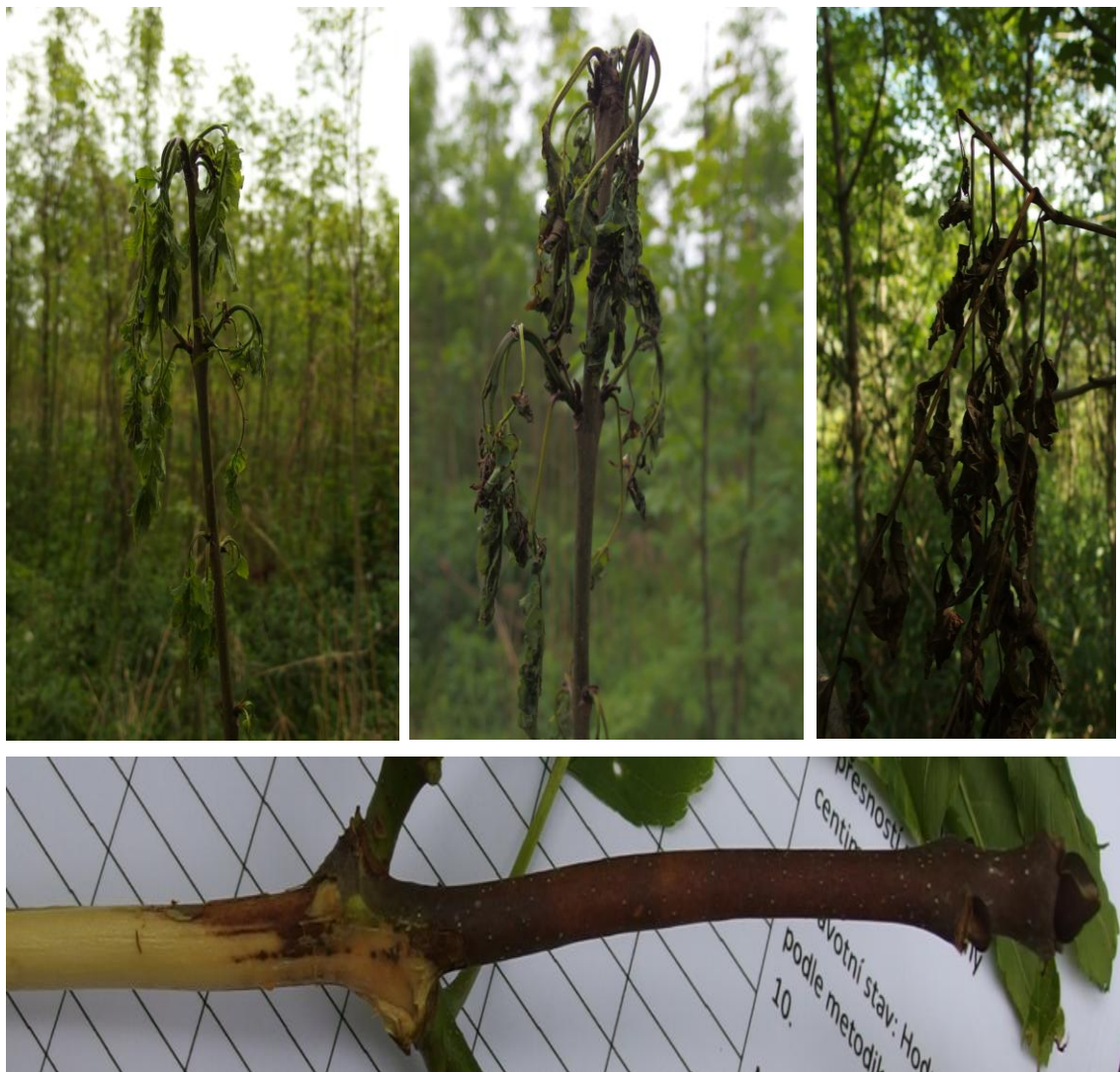
6.2.4. Defoliace vlivem infekce

Na sledované skupině dřevin byly zaznamenány tři odlišné typy defoliace způsobované infekcí *H. fraxineus*. Byl popsán jejich průběh v čase a intenzita. Taktéž byly zjištěny

rozdíly v nástupu defoliace. U jedinců silně poškozovaných infekcí začíná defoliace dříve, než u jedinců slabě symptomatických.

6.2.4.1. Typy defoliace

Vadnutí a zasychání letorostů se poprvé objevilo 1. 5. a projevilo se do 15. 6. 2014. Jedná se o zasychání nově vyrašených listů vlivem reaktivace loňských podkorních nekróz. Tento jev postihuje v průměru 5 až 30 % koruny a je typický tím, že uschlé listy neopadávají z mrtvých letorostů na zem, ale zůstávají zde přischlé viset po celou vegetační sezónu (viz obr. č. 32.).



Obr. č. 32. Zasychání listů na letorostu vlivem reaktivace podkorní nekrózy (Rozsypálek, 2014).

Druhým pozorovaným typem defoliace je opadávání celých, ještě zelených listů. Tento jev můžeme v jasanových porostech pozorovat na začátku hlavní fáze defoliace způsobované *H. fraxineus*. V roce 2014 byl pozorován od 17. 7. do 14. 8., přičemž největší část - cca 80 % - zelených listů opadla v prvních dvou týdnech tohoto období, tedy do 31. 7. Tímto způsobem opadává z infikovaných stromů cca 10 % jejich listové plochy. Při bližším zkoumání opadaných listů jsou na spodní části řapíku jasně viditelné drobné 1 až 3 mm velké oválné nekrózy.



Obr. č. 33. Opad celých listů v zeleném stavu, v důsledku infekce řapíků 24. 7. 2014 (Rozsypálek, 2014).

Třetí typ defoliace vlivem infekce *H. fraxineus* způsobuje postupné chřadnutí listů. Nejprve se objevuje na listech velké množství malých 0,5 – 1 mm kulovitých nekrot. Po 7 až 10 dnech se začínají některé nekrózy zvětšovat, dostávají se k listové žilnatině a list začíná postupně od okrajů usychat. Ve chvíli kdy se nekrózy dostanou k centrálnímu řapíku složeného listu, list usychá a opadává. Toto je znak typický pro tento druh defoliace. Listy neopadávají vcelku, ani nepřisychají na letorostech, ale dochází k postupnému opadávání jednotlivých lístků lichožpeřeného listu. Centrální řapík zůstává na letorostu. Postupně se i na něm začínají objevovat kulovité nekrózy a řapík opadává po pěti až patnácti dnech od ztráty listů. Od prvních pozorovaných symptomů (nekrózy na listech) po opad infikovaného řapíku uplyne 20 až 30 dnů, v roce 2014 byl pozorován od 17. 7. do 9. 10. Tento typ defoliace je zodpovědný za cca 80% defoliace jasanů infikovaných voskovičkou jasanovou.

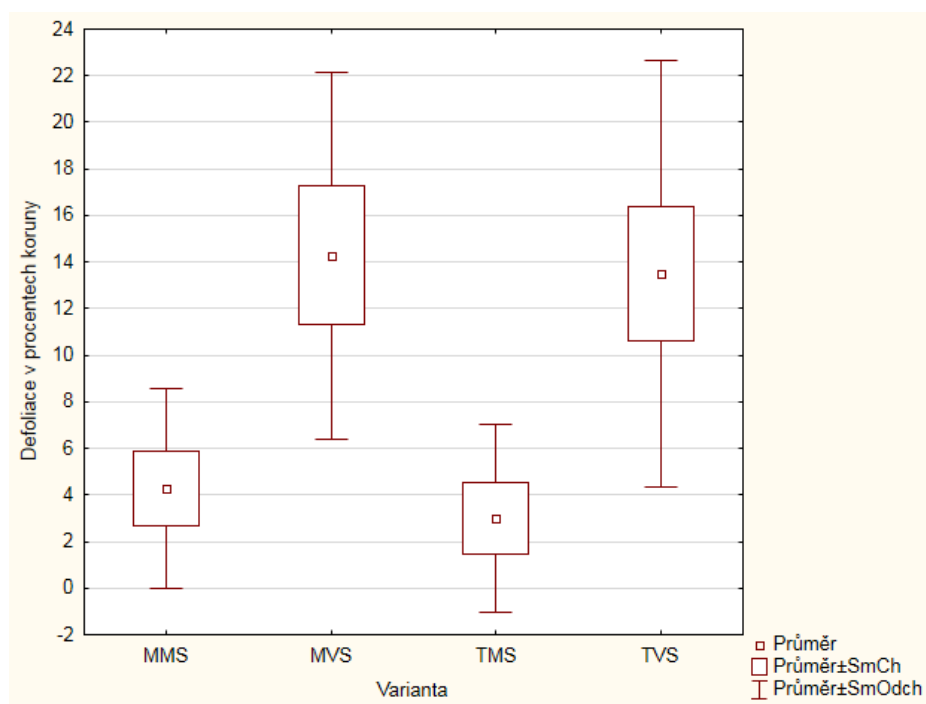


Obr. č. 34. Postupná defoliace listů vlivem infekce voskovičkou jasanovou (Rozsypálek, 2014).

6.2.4.2. Intenzita defoliace u jedinců silně a slabě symptomatických

Při srovnání intenzity defoliace prvního typu (defoliace způsobovaná reaktivací loňských nektróz) u silně a slabě symptomatických jedinců nebyla nalezena statisticky průkazná odlišnost. Ovšem z grafu č. 8. Intenzita defoliace způsobené reaktivací loňských nektróz můžeme vidět, že silně poškozovaní jedinci jsou více poškozováni i tímto symptomem. Skupina MMS přišla v průměru vlivem této defoliace o 4,3 % asimilačního aparátu, TMS o 3 %. Zatímco skupiny silně symptomatických jedinců MVS a TVS přišli v průměru o 14,3 % a 13,5 % asimilační plochy. Nejvíce poškozeným jedincem byl S751 ze skupiny TVS, který utrpěl ztrátu 30 % listové plochy.

Graf č. 8. Intenzita defoliace způsobené reaktivací loňských nektróz.

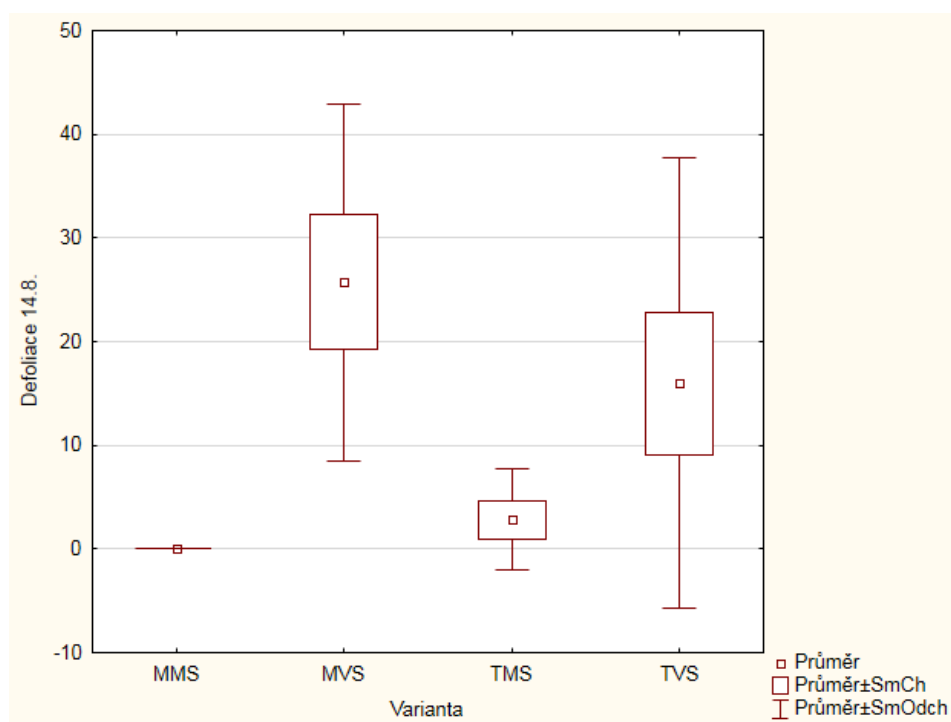


Tab. č. 3. Intenzita defoliace způsobené reaktivací loňských nektróz.

Závislá: Defoliace v procentech koruny	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Defoliace v procentech koruny (Fenologie) Nezávislá (grupovací) proměnná: Varianta Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 31) =11,96819 p =,0075			
	MMS R:10,714	MVS R:21,714	TMS R:9,2143	TVS R:20,450
MMS		0,141666	1,000000	0,178755
MVS	0,141666		0,060660	1,000000
TMS	1,000000	0,060660		0,072930
TVS	0,178755	1,000000	0,072930	

V intenzitě hlavní fáze defoliace byla nalezena statisticky významná odchylka mezi skupinami MMS a MVS v pozorování 14. 8. 2014 (viz graf č. 9. Intenzita hlavní fáze defoliace, pozorování 14. 8. 2014). Tento rozdíl spočívá především v dřívějším opadu listů u silně infikovaných jedinců. Ve srovnání celkové výsledné intenzity hlavní fáze defoliace nebyly nalezeny významné rozdíly. Téměř u všech sledovaných jedinců dosáhla intenzita defoliace 100 %. Jen u jednoho jedince ze skupiny MMS s číslem S166 dosáhla defoliace pouze 50 %, a u tří jedinců z TMS, z nichž dva (S674 a S671) ztratili 60 a 80 % listové plochy a jeden jedinec (S692) neprojevil vůbec žádné známky chřadnutí vlivem infekce.

Graf č. 9. Intenzita hlavní fáze defoliace, pozorování 14. 8. 2014



Tab. č. 4. Intenzita hlavní fáze defoliace, pozorování 14. 8. 2014

Závislá: Defoliace 14.8.	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Defoliace 14.8. (Fenologie) Nezávislá (grupovací) proměnná: Varianta Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=30) = 12,46183$ $p = ,0060$			
	MMS R:8,5000	MVS R:22,786	TMS R:11,500	TVS R:17,400
MMS		0,021220	1,000000	0,301564
MVS	0,021220		0,098815	1,000000
TMS	1,000000	0,098815		1,000000
TVS	0,301564	1,000000	1,000000	

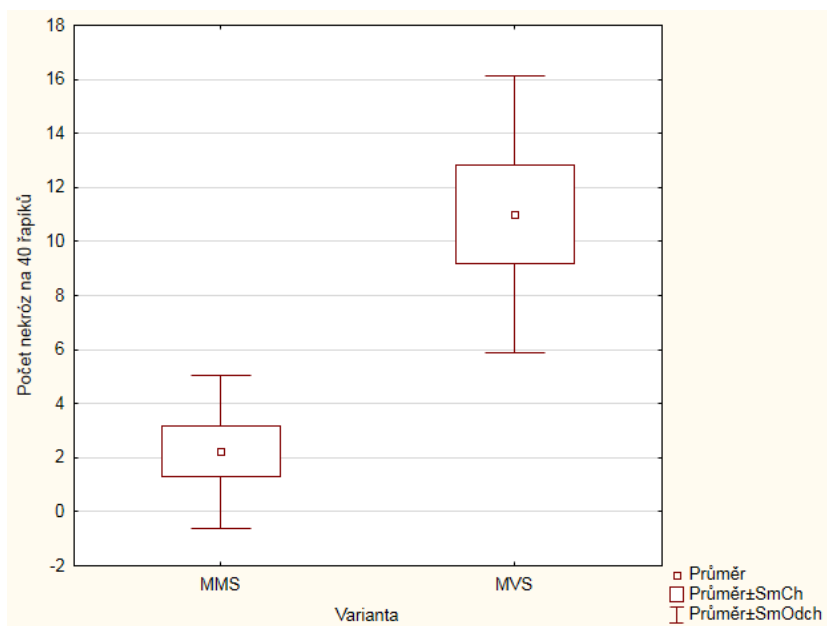
6.2.5. Tvorba podkorních nekróz u silně a slabě symptomatických jedinců

U jedinců silně symptomatických se při pozorování stejného počtu listových jizev, po infikovaných řapících, vytvořilo výrazně více podkorních nekróz, než u jedinců slabě symptomatických (viz graf č. 10. a tab. č. 5. Počet podkorních nekróz, slabě vs. silně symptomatických jedinců).

Úspěšnost proniknutí infekce do pletiv letorostu (vytvoření podkorní nekrózy) byla u slabě symptomatických jedinců pouze 6 %. V průměru vyrostlo 2,4 podkorních nekróz na 40 infikovaných listů. Jedincem s největším počtem podkorních nekróz ve skupině slabě symptomatických jedinců byl jedinec S169. Celkem u něj bylo pozorováno 8 podkorních nekróz, tedy 20% úspěšnost v pronikání infekce do letorostů. U jedinců S166 a S214 nebyla do 15. 12. 2014 pozorována žádná nově vytvořená podkorní nekróza.

U silně symptomatických jedinců byla úspěšnost pronikání infekce do dřevnatých částí rostliny 27,5 %. V průměru v této skupině vyrostlo 11 podkorních nekróz na 40 infikovaných listů. Jedincem s nejvíce pozorovanými podkorními nekrózami byl S172 s 22 nekrózami na 40 listových jizev (55 %). Tento jedinec byl v pozorování jediný s hodnotou úspěšnosti infekce letorostů nad 50 %. Ve skupině silně symptomatických jedinců nebyl žádný jedinec, u nějž by nebyla pozorována žádná nová podkorní nekróza. Jedinec s nejméně nekrózami byl S270, na kterém jich bylo pozorováno šest (15 %).

Graf č. 10. Počet podkorních nekróz, slabě vs. silně symptomatictí jedinci.



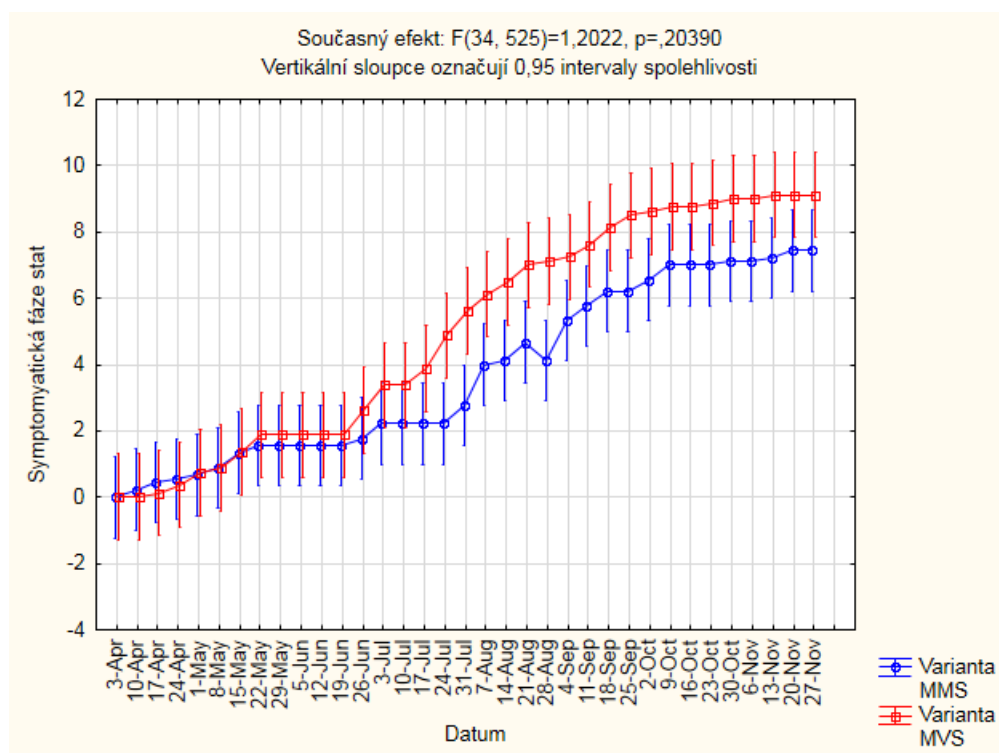
Tab. č. 5. Počet podkorních nekróz, slabě vs. silně symptomatictí jedinci.

		Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Počet nekróz na 40 řapíků (Fenologie) Nezávislá (grupovací) proměnná : Varianta Kruskal-Wallisův test: $H(1, N=17) = 10,52013$ $p = ,0012$	
Závislá: Počet nekróz na 40 řapíků	MMS R:5,2778	MVS R:13,188	
MMS			0,001266
MVS	0,001266		

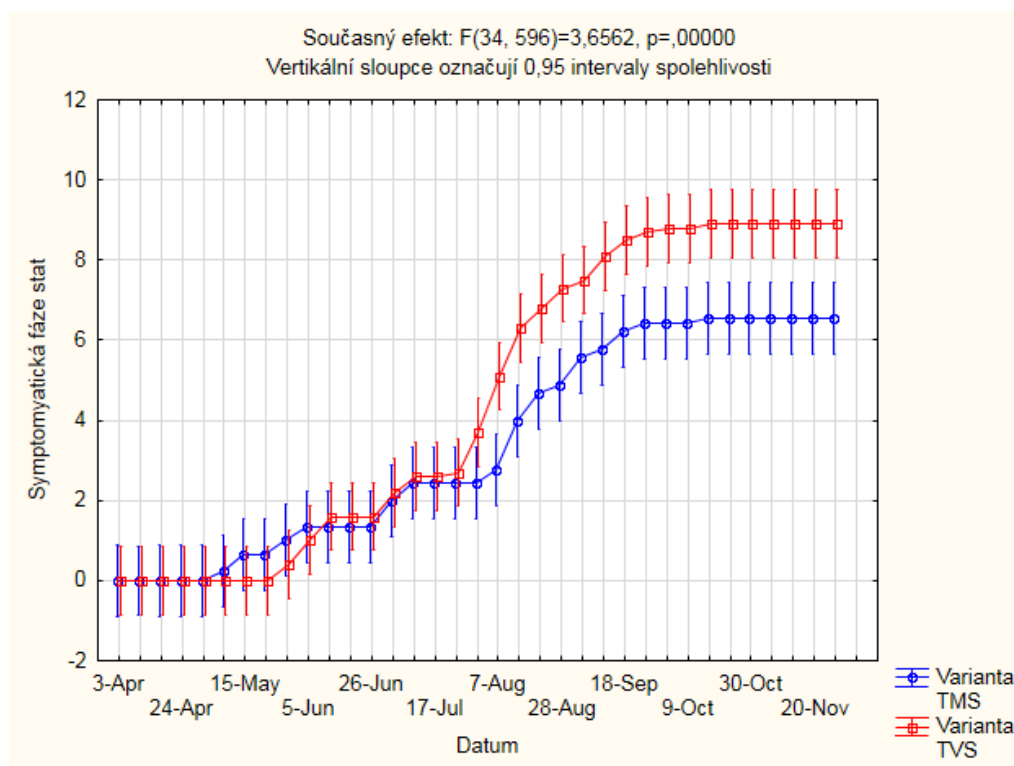
6.2.6. Testování rozdílů v průběhu symptomatických fází u silně a slabě symptomatických jedinců

Bylo nalezeno velké množství statisticky významných rozdílů v nástupu jednotlivých symptomatických fází a celkové intenzitě defoliace mezi skupinami silně a slabě symptomatických jedinců (viz graf č. 11. Nástup jednotlivých symptomatických fází, mlazina 8 let a graf č. 12. Nástup jednotlivých symptomatických fází, tyčovina 18 let). Hlavní rozdíly spočívají v dřívějším nástupu některých symptomatických fází (např. defoliace a počátek růstu podkorních nekróz) u silně poškozených jedinců. Rozdíl mezi začátkem defoliace u MMS a MVS byl průměrně 9 dnů, u skupin TMS a TVS to bylo 17 dnů.

Graf č. 11. Nástup jednotlivých symptomatických fází, mlazina 8 let.



Graf č. 12. Nástup jednotlivých symptomatických fází, tyčovina 18 let.



6.3. Výsledky inokulačních pokusů

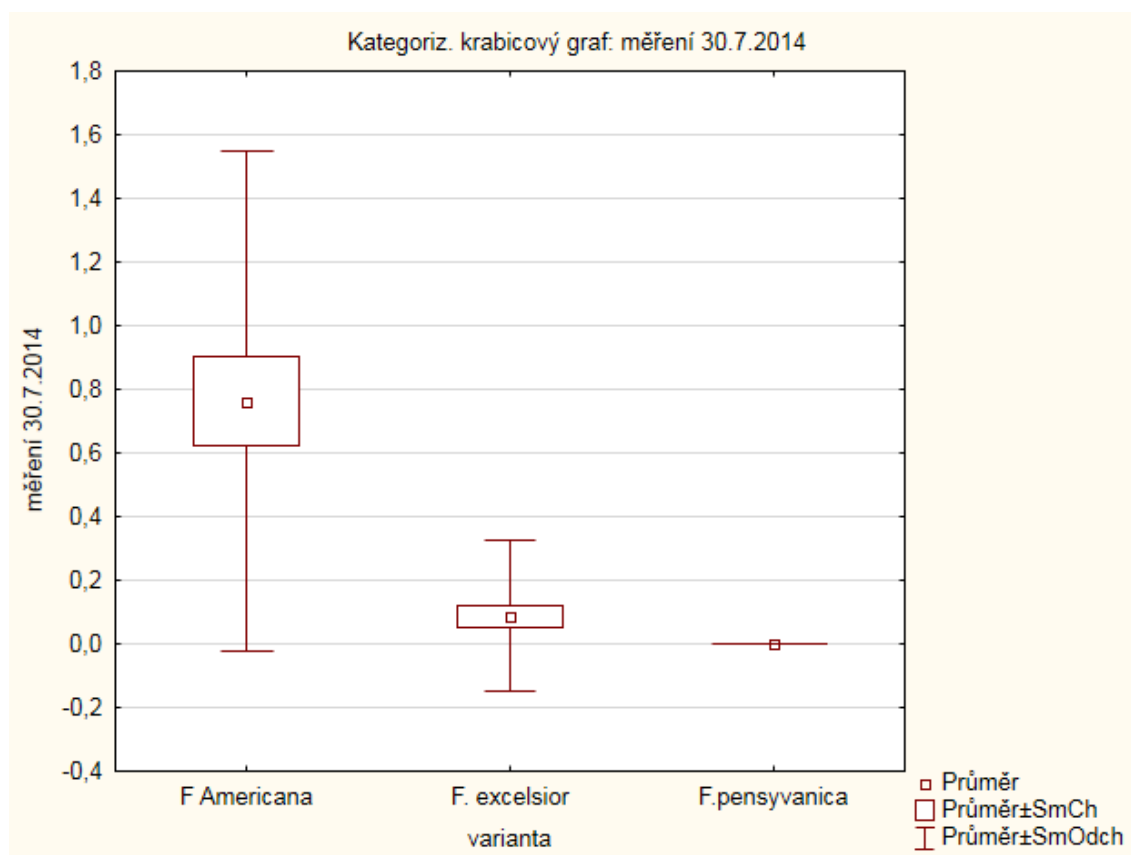
Díky inokulačním pokusům provedeným 16. 6. 2014 byly zjištěny zajímavé rozdíly v růstu podkorních nekróz. První zjevná podkorní nekróza byla zaznamenána 9. 7. na *F. americana*. Nejúspěšnější byly inokulace *F. excelsior* – viditelná podkorní nekróza se objevila u 36 z 50 jedinců. Největší rozsah podkorních nekróz a největší mortalita (6 z 50 jedinců) byla zaznamenán rovněž u *F. excelsior*. U *F. pensylvanica* byla zjištěna nejvyšší míra odolnosti vůči inokulaci. Viditelná nekróza se objevila jen u 7 z 50 inokulovaných jedinců. Po ukončení vegetační doby byly všechny inokulované stromy opět změřeny a převezeny k laboratornímu zpracování. Laboratorní rozbor potvrdil výsledky průběžného pozorování. Rozsah infekce pletiv bývá často dva- až třikrát větší, než je viditelná podkorní nekróza. V jednom případě byl u jedince s viditelnou nekrózou 1,6 cm zjištěn rozsah infekce v pletivech dokonce 31,5 cm.

Byla zjištěna statisticky významná odlišnost mezi virulencí světlých a tmavých morfotypů *H. fraxineus*. Světlé morfotypy způsobovaly na hostitelských rostlinách výrazně větší poškození, nežli morfotypy tmavé. Například kultura B2/1 patřící mezi skupinu tmavých kultur byla prakticky avirulentní, ani u jednoho jedince nezpůsobila viditelnou podkorní nekrózu.

6.3.1. Vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými druhy jasanů

První viditelná nekróza byla pozorována na *F. americana* po 24 dnech infekce. Z měření 30. 7. 2014 je zřejmé, že infekce byla nejdříve pozorována u *F. americana*, na kterých byly pozorovány malé (0,6 – 1,4 cm) podkorní nekrózy (viz graf č. 13.). Zhruba se čtrnáctidenním zpožděním se začaly tvořit podkorní nekrózy i u *F. excelsior* a začaly svým rychlým růstem postupně dohánět *F. americana* (viz graf č. 14.). 20. 8. byly poprvé pozorovány také nekrózy na *F. pensylvanica*. Nekrózy měly rychlejší růst než u *F. americana*, ale úspěšně infikováno bylo pouze 7 z 50 jedinců. 3. 9. byly již nekrózy na *F. excelsior* výrazně větší než nekrózy na *F. americana*, které přirůstaly velmi pomalu (cca 1 – 3 mm za 7 dní) nebo vůbec. Při ukončení terénní části experimentu byl nejčastěji infikovaným (36 z 50 jedinců) hostitelem *F. excelsior*. Tento druh vykazoval i největší rychlost růstu podkorních nekróz (viz graf č 15.).

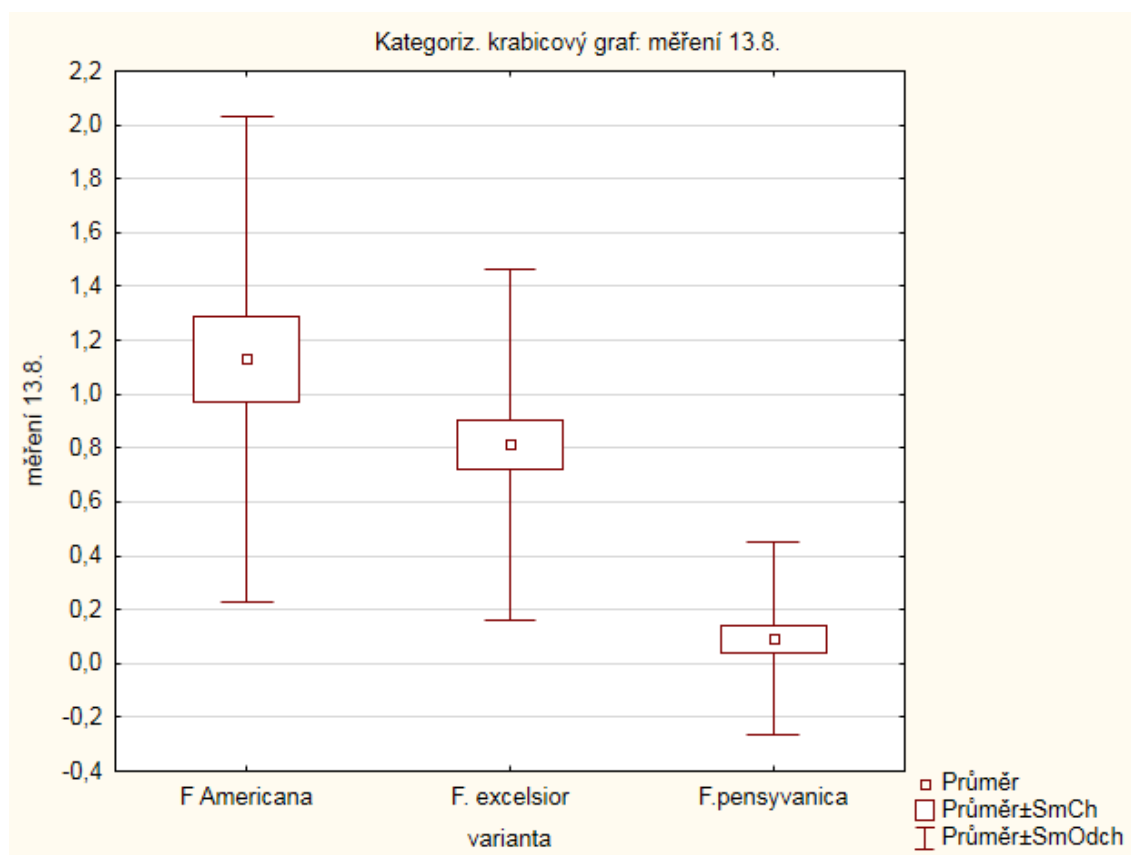
Graf č. 13. Měření přírůstu podkorních nekróz 30. 7. 2014



Tab. č. 6. Měření přírůstu podkorních nekróz 30. 7. 2014

LSD test; proměnná: měření 30.7.2014 (Výsledky) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$			
varianta	{1} M=,76250	{2} M=,08750	{3} M=0,0000
F Americana {1}		0,000000	0,000000
F. excelsior {2}	0,000000		0,306300
F.pensylvanica {3}	0,000000	0,306300	

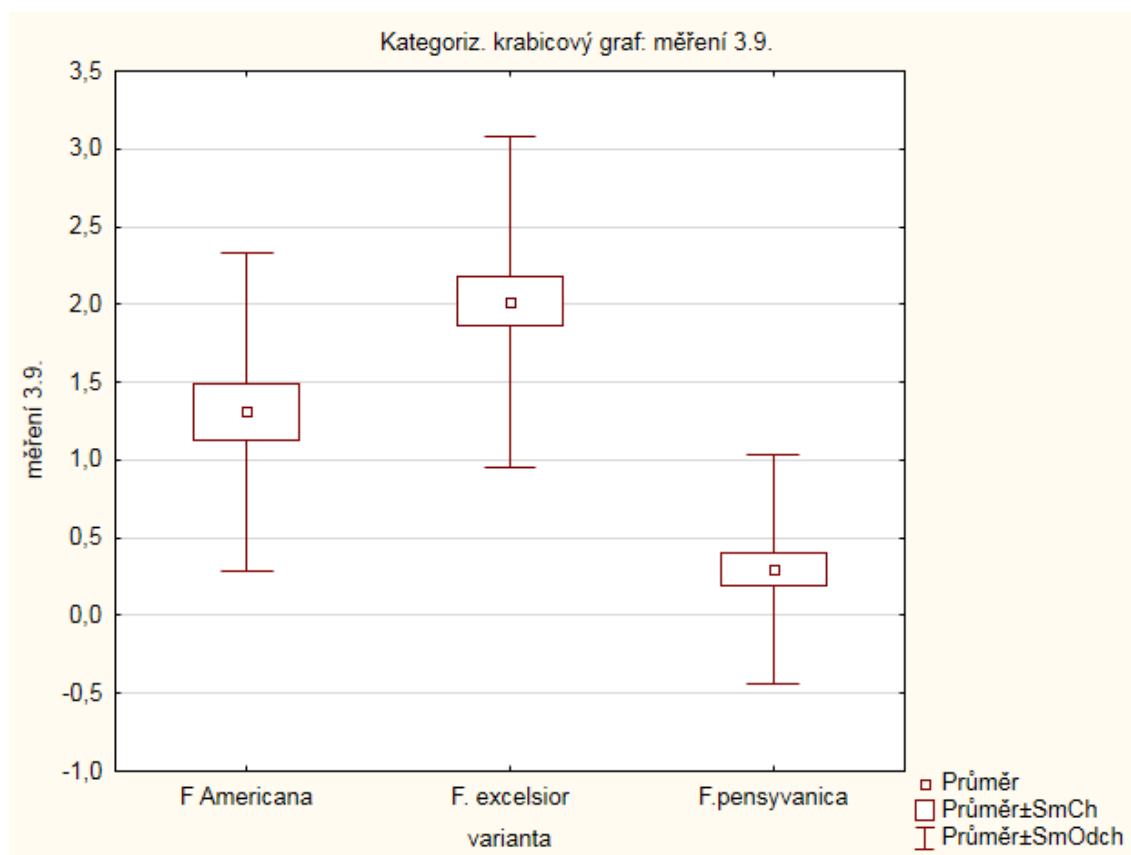
Graf č. 14. Měření přírůstu podkorních nekróz 13. 8. 2014



Tab. č. 7. Měření přírůstu podkorních nekróz 13. 8. 2014

LSD test; proměnná: měření 13.8. (Výsledky) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$			
varianta	{1} M=1,1313	{2} M=,81250	{3} M=,09167
F Americana {1}		0,031241	0,000000
F. excelsior {2}	0,031241		0,000000
F.pensylvanica {3}	0,000000	0,000000	

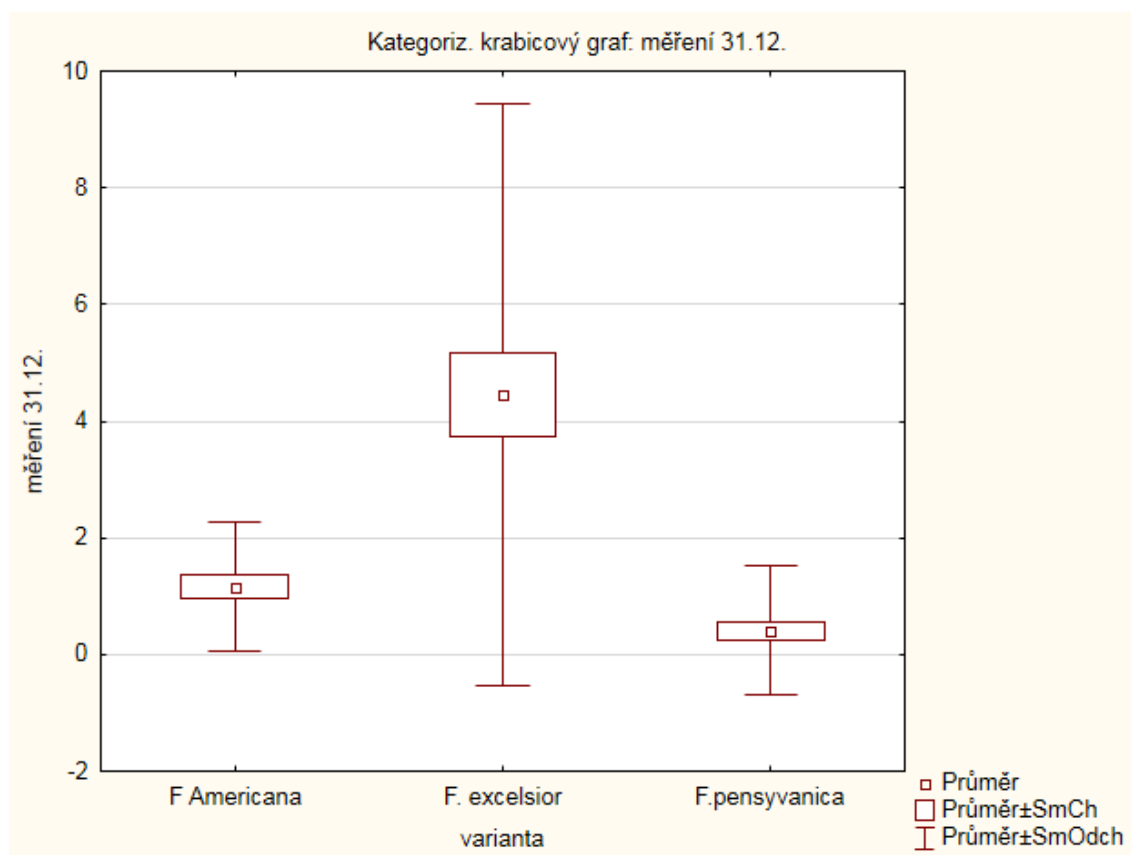
Graf č. 15. Měření přírůstu podkorních nekróz 3. 9. 2014



Tab. č. 8. Měření přírůstu podkorních nekróz 3. 9. 2014

varianta	LSD test; proměnná: měření 3.9. (Výsledky) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$		
	{1} M=1,3094	{2} M=2,0208	{3} M=,30000
F Americana {1}		0,001262	0,000007
F. excelsior {2}	0,001262		0,000000
F.pensylvanica {3}	0,000007	0,000000	

Graf č. 16. Měření přírůstu podkorních nekróz 31. 12. 2014 ukončení měření.



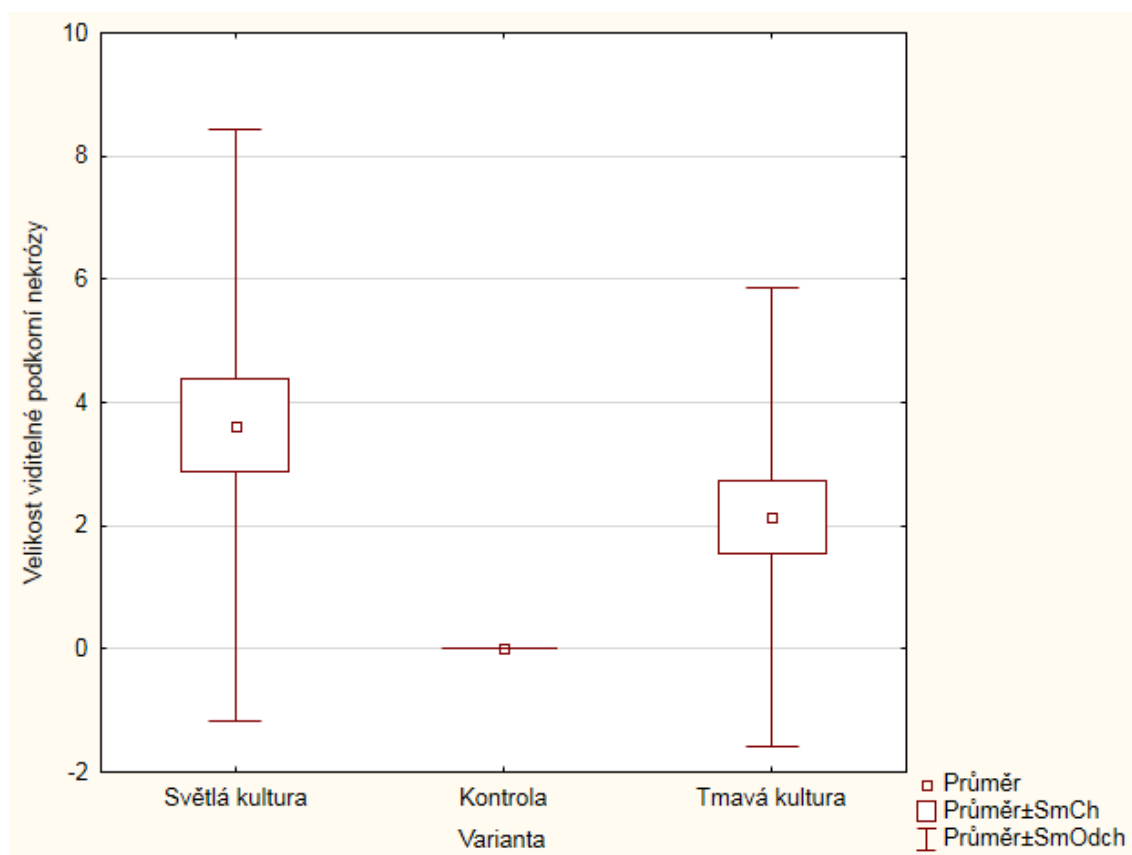
Tab. č. 9. Měření přírůstu podkorních nekróz 31. 12. 2014 ukončení měření

varianta	LSD test; proměnná: měření 31.12. (Výsledky) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$		
	{1} M=1,1563	{2} M=4,4542	{3} M=,40417
F Americana {1}		0,000013	0,301648
F. excelsior {2}	0,000013		0,000000
F.pensyvanica {3}	0,301648	0,000000	

6.3.2. Rozdíly mezi světlými a tmavými morfotypy kultur *H. fraxineus*

Světlé kultury *H. fraxineus* se chovaly v infekčních testech agresivněji než kultury tmavé. Podkorní nekrózy vzniklé infekcí světlými kulturami rostou rychleji (viz graf č. 17. Srovnání velikosti viditelné podkorní nekrózy u jedinců infikovaných světlým a tmavým morfotypem po ukončení pokusu 31. 12. 2014) a způsobují i větší mortalitu infikovaných sazenic. Z 50 jedinců infikovaných světlým morfotypem odumřelo již v průběhu infekčních pokusů 10 jasanů. U tmavého morfotypu to byly pouze 3 jedinci. Dále byl porovnáván rozsah infekce uvnitř pletiv infikovaných jedinců. V rozsahu infekce v pletivech byla nalezena signifikantní odchylka. Světlé morfotypy mají větší rozsah infekce v pletivech než morfotypy tmavé (viz graf. č. 18. Rozsah infekce v pletivech u jedinců infikovaných světlým a tmavým morfotypem po ukončení pokusu).

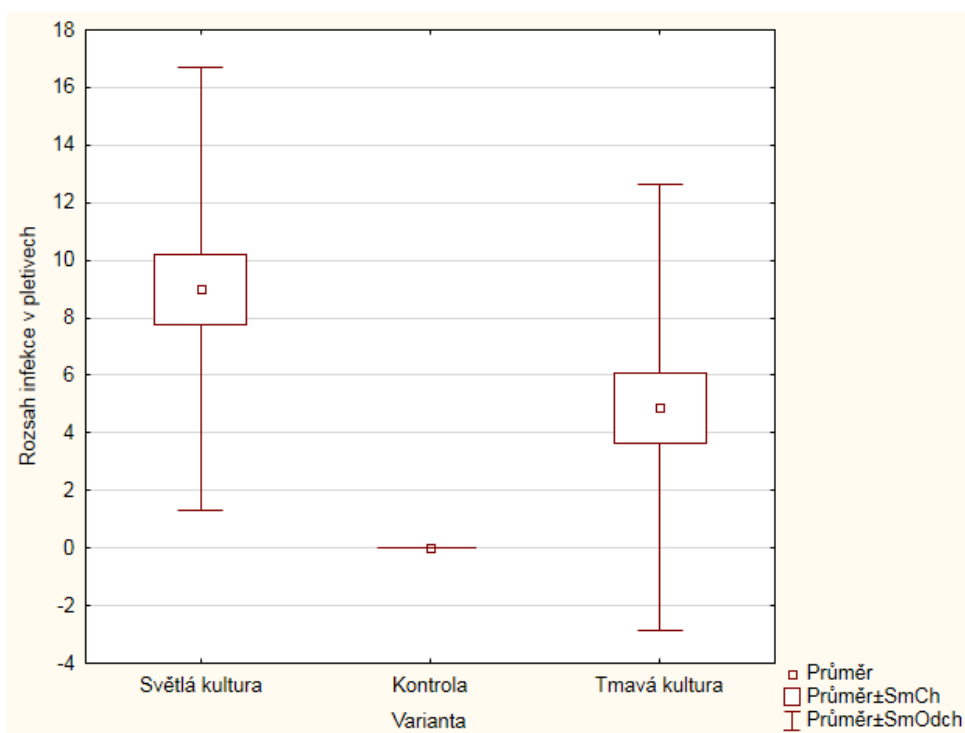
Graf č. 17. Srovnání velikosti viditelné podkorní nekrózy u jedinců infikovaných světlým a tmavým morfotypem po ukončení pokusu 31. 12. 2014



Tab. č. 10. Srovnání velikosti viditelné podkorní nekrózy u jedinců infikovaných světlým a tmavým morfortypem po ukončení pokusu 31. 12. 2014

Závislá: Velikost viditelné podkorní nekrózy	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Velikost viditelné podkorní nekrózy (Výsledky) Nezávislá (grupovací) proměnná: Varianta Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=96) = 21,12110$ $p = ,0000$		
	Světlá kultura R:59,700	Kontrola R:24,500	Tmavá kultura R:46,900
Světlá kultura		0,000058	0,119661
Kontrola	0,000058		0,019680
Tmavá kultura	0,119661	0,019680	

Graf. č. 18. Rozsah infekce v pletivech u jedinců infikovaných světlým a tmavým morfortypem po ukončení pokusu.



Tab. č. 11. Rozsah infekce v pletivech u jedinců infikovaných světlým a tmavým morfortypem po ukončení pokusu.

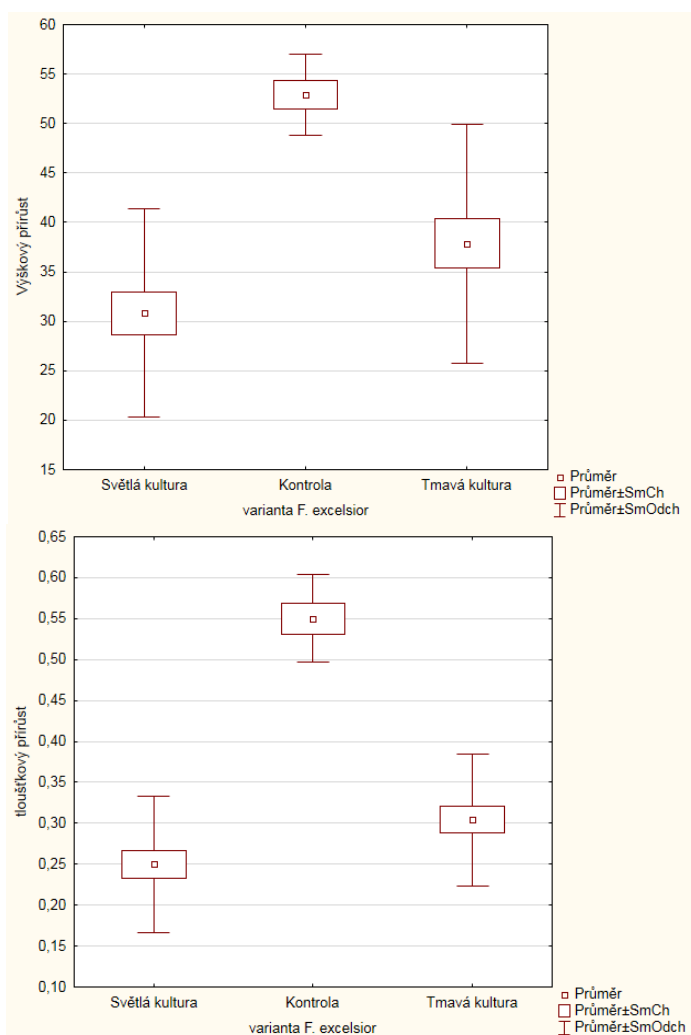
Závislá: Rozsah infekce v pletivech	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Rozsah infekce v pletivech (Výsledky) Nezávislá (grupovací) proměnná: Varianta Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=96) = 33,88564$ $p = ,0000$		
	Světlá kultura R:64,612	Kontrola R:19,500	Tmavá kultura R:43,987
Světlá kultura		0,000000	0,002787
Kontrola	0,000000		0,008884
Tmavá kultura	0,002787	0,008884	

6.3.3. Ovlivnění přírůstu v důsledku infekce

Z měření tloušťkového a výškového přírůstu všech jedinců zapojených do inokulačních testů vyplývá, že infekce voskovičkou jasanovou má významný vliv na přírůst *F. excelsior* a *americana*. Jasan pensylvánský *F. pennsylvanica* nebyl vyhodnocen, vzhledem k malému počtu úspěšně infikovaných jedinců. Přírůst inokulovaných jedinců byl porovnáván s kontrolními jedinci, u nichž byla poškozena pletiva stejně jako při inokulaci, ale nebyli inokulováni kulturou *H. fraxineus*.

Na grafu č. 19. můžete vidět rozdíly ve výškovém a tloušťkovém přírůstu u *F. excelsior*. Hodnocen byl také vliv rozdílných morfortypů kultury *H. fraxineus*. Byl zde pozorován trend, že hostitelské rostliny infikované tmavými kulturami přirůstaly lépe. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný. Na grafu č. 20. můžete vidět rozdíl ve výškovém a tloušťkovém přírůstu u *F. americana*. Přírůst jedinců tohoto druhu byl pomalejší než u *F. excelsior*. Výsledky ovšem potvrzují zjištění naměřená u *F. excelsior*.

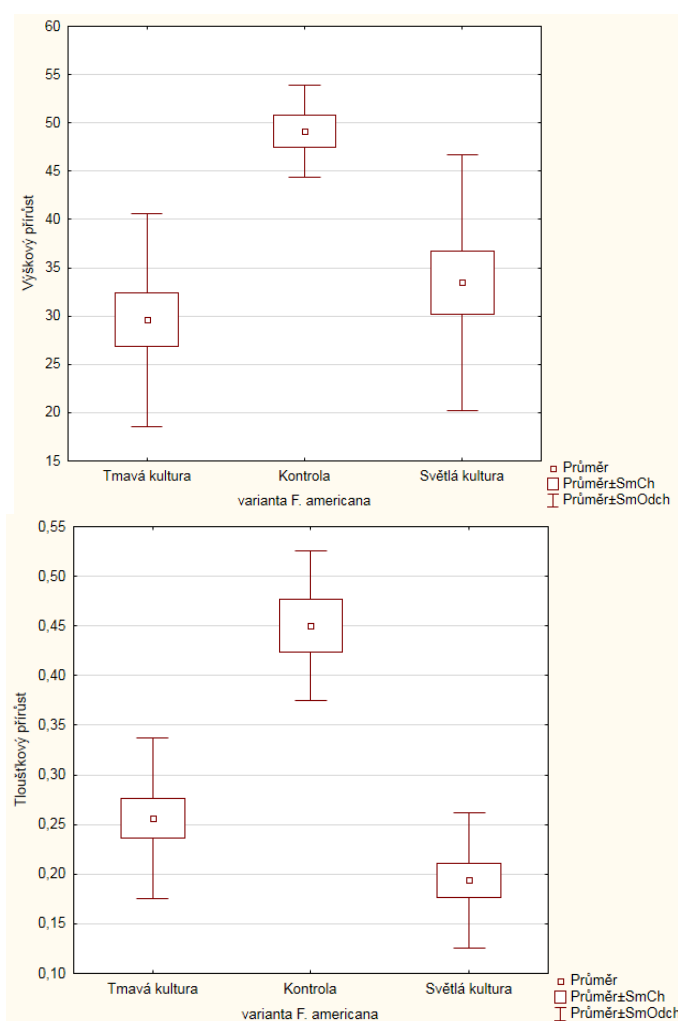
Graf. č. 19. Rozdíly ve výškovém (nahore) a tloušťkovém přírůstu u *F. excelsior*.



Tab. č. 12. Rozdíly ve výškovém (nahore) a tloušťkovém přírůstu u *F. excelsior*.

Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Výškový přírůst (Výsledky) Nezávislá (grupovací) proměnná: varianta F. excelsior Kruskal-Wallisův test: H (2, N= 56) = 18,27390 p =,0001			
Závislá: Výškový přírůst	Světlá kultura R:21,021	Kontrola R:49,438	Tmavá kultura R:29,000
Světlá kultura		0,000059	0,270365
Kontrola	0,000059		0,006433
Tmavá kultura	0,270365	0,006433	
Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); tloušťkový přírůst (Výsledky) Nezávislá (grupovací) proměnná: varianta F. excelsior Kruskal-Wallisův test: H (2, N= 56) = 24,53944 p =,0000			
Závislá: tloušťkový přírůst	Světlá kultura R:20,604	Kontrola R:52,500	Tmavá kultura R:28,396
Světlá kultura		0,000005	0,293815
Kontrola	0,000005		0,000883
Tmavá kultura	0,293815	0,000883	

Graf. č. 20. Rozdíly ve výškovém (nahore) a tloušťkovém přírůstu u *F. americana*.



Tab. č. 13. Rozdíly ve výškovém (nahore) a tloušťkovém přírůstu u *F. americana*.

Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Výškový přírůst (Výsledky) Nezávislá (grupovací) proměnná: varianta <i>F. americana</i> Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=40) = 10,93076$ $p = ,0042$			
Závislá: Výškový přírůst	Tmavá kultura R:16,063	Kontrola R:32,438	Světlá kultura R:18,969
Tmavá kultura		0,003652	1,000000
Kontrola	0,003652		0,023394
Světlá kultura	1,000000	0,023394	
Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Tloušťkový přírůst (Výsledky) Nezávislá (grupovací) proměnná: varianta <i>F. americana</i> Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=40) = 20,64283$ $p = ,0000$			
Závislá: Tloušťkový přírůst	Tmavá kultura R:20,125	Kontrola R:35,875	Světlá kultura R:13,188
Tmavá kultura		0,005587	0,279759
Kontrola	0,005587		0,000022
Světlá kultura	0,279759	0,000022	

6.4. Výsledky obranných opatření v porostech *F. excelsior*

Výsledkem tohoto dílčího cíle je vybudování osmi výzkumných ploch ve Vranovickém lese. Na každé z osmi výzkumných ploch ve Vranovickém lese byla testována jedna varianta úpravy půdního povrchu (bylinného patra), s cílem omezit fruktifikaci nebo sporulaci *H. fraxineus*. Na těchto plochách byla v letech 2013 a 2014 provedena měření účinnosti jednotlivých variant úpravy půdního povrchu formou lapání spor. Data z roku 2013 bohužel nemohla být vyhodnocena díky použití pasivního typu lapačů, které nedokázaly askosporu efektivně zachytávat. Ze sezóny 2014, kdy byl již použit aktivní lapač, bylo získáno z deseti měření celkem 360 vzorků, které jsou nyní zpracovávány a výsledky tohoto experimentu by měly být hotovy v druhém pololetí roku 2015.



Obr. č. 35. Lapání spor v roce 2014 na ploše č. 3 (Rozsypálek, 2014).

6.5. Otestování metodiky inokulace askosporami

Metodika inokulace askosporami byla otestována na dvou dvouletých krytokořenných sazenicích *F. excelsior*. Inokulace na list, řapík, letorost a kmínek byly provedeny 6. 8. 2014. Od této doby byly rostliny pravidelně kontrolovány. První symptomy podobné

nekróze jasanu (nekrózy na listech) se začaly objevovat 4. 10. 2014 (viz obr. č. 36. První nekróza na listu infikovaném askosporami *H. fraxineus*). Do 8. 11. 2014 se vyskytovaly symptomy infekce na 6 z 10 inokulovaných listů. Neinokulované listy nevykazovaly žádné známky infekce. Bohužel se nám nepodařilo z infikovaných listů v laboratoři zpětně odizolovat kulturu *H. fraxineus* a dokázat tak, že za vznik těchto nekróz je zodpovědná tato patogenní houba. Na řapících, letorostech ani kmíncích nebyly za celou dobu sledování zpozorovány žádné viditelné symptomy infekce (viz obr. č. 37. Testované rostliny po ukončení pokusu 15. 1. 2015). Pokus byl ukončen 15. 1. 2015, rostliny byly přeneseny do laboratoře a podrobeny detailnímu zkoumání. Ani to však neodhalilo žádné symptomy naznačující úspěšnou inokulaci askosporami *H. fraxineus* skrze tato pletiva.



Obr. č. 36. První nekróza na listu infikovaném askosporami *H. fraxineus* (Rozsypálek, 2014).



Obr. č. 37. Testované rostliny po ukončení pokusu 15. 1. 2015 (Rozsypálek, 2015).

6.6. Silné a slabé stránky metodiky hodnocení zdravotního stavu jasanů infikovaných *H. fraxineus*

Hlavními výhodami této metodiky je zhodnocení více kritérií nežli jen defoliace, což nám umožňuje přesněji zhodnotit zdravotní stav posuzovaného jedince. Dále také rozdělení do tří kategorií (dle věku a růstových parametrů) a deseti stupňů poškozování infekcí od zdravého jedince až po odumřelý strom. Další výhodou této metodiky je, že byla otestována s velmi pozitivním výsledkem (viz výsledky). Je doplněna o metodiku hodnocení porostů a v roce 2015 bude doplněna i o aplikační část pro praktické lesnictví (jak pracovat s porostem v určitém stupni napadení) a fotografické zobrazení jednotlivých stupňů poškození.

K hlavním nevýhodám této metodiky patří delší čas pro její zvládnutí a zažití (cca 4 – 8 hodin). A také velký rozsah metodiky, vzhledem k velké škále faktorů, které bylo třeba pro dostatečnou přesnost hodnocení zohlednit. Taktéž byly zjištěny mírné nepřesnosti u jasanů v podúrovni (změny v architektuře koruny vlivem kompetice o světlo) a málo vitálních jedinců (často nulová tvorba sekundárních výhonů).

6.6.1. Zhodnocení míry poškození zdravotního stavu jednotlivých dřevin v porostu

Vzhledem k výrazně odlišným možnostem kontroly a závažnosti jednotlivých symptomů infekce v závislosti na věku hodnocených dřevin, byla metodika hodnocení jednotlivých dřevin rozdělena do tří kategorií (viz obr. č. 25.): Mladí jedinci – jedná se o dřeviny ve věku od 1 do 10 let, u nichž je možné vzhledem k jejich vzrůstu vyhodnotit detailně veškerá poškození a jednotlivé symptomy infekce. Dospívající jedinci – od 11 do 30 let, u těchto jedinců již není možná detailní kontrola jednotlivých výhonů, stále však můžeme pozorovat symptomy infekce a začínáme se zaměřovat na hodnocení změn v architektuře koruny a množství sekundárních výhonů, které by u těchto jedinců v přirozeném stavu neměly být vůbec přítomny. Dospělí jedinci – od 31 do X let, u těchto jedinců již není možná detailní kontrola. Hodnocení je založeno především na změnách v architektuře koruny, celkové vitalitě a defoliaci. Sekundární výhony hodnotíme, ale přikládáme jim menší váhu, neboť u senescentních jedinců se již mohou vyskytovat bez vazby na infekci *H. fraxineus*.



Obr. č. 25. Rozdělení do tří kategorií dle věku dřevin (Rozsypálek, 2014).

6.6.1.1. Mladí jedinci

1) Strom bez zjevného narušení vitality s přirozenou architekturou koruny a nenarušeným průběhem růstu. Na kmínku ani na větvích nejsou pozorovány poškození ani podkorní nekrózy.

2) Strom bez zjevného narušení vitality s mírně narušenou architekturou koruny (následkem zjevného poškození, odumření terminálu, nebo některé z kosterních větví v minulosti). Na kmínku ani na větvích nejsou pozorovány letošní podkorní nekrózy, mohou být pozorovány nekrózy z předešlých let.

3) Strom bez zjevného narušení vitality s narušenou architekturou koruny (vlivem odumření velké části terminálu nebo několika kosterních větví v dřívějších letech, přítomnost suchých větví nebo pahýlů v koruně). Na kmínku ani na větvích nemusí být (max. do 2 kusů) pozorovány letošní podkorní nekrózy, jsou zde však patrné nekrózy z předešlých let.

4) Strom s mírně narušenou vitalitou a silně narušenou architekturou koruny (vlivem několikanásobného odumírání terminálu a letorostů v dřívějších letech, korunka mírně zdeformována a zahuštěna, přítomnost suchých větví nebo pahýlů v koruně). Na větvích mohou být v malém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (řádově do 5 kusů, pouze na koncích větví a bázích malých větviček na kmeni), na větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

5) Strom se zřetelně narušenou vitalitou a silně narušenou architekturou koruny (vlivem několikanásobného odumírání terminálu a letorostů v dřívějších letech, korunka

zdeformovaná a silně zahuštěná, tvořena velkým množstvím kodominantních výhonů, absence průběžného kmene v koruně, přítomnost suchých větví nebo pahýlů v koruně). Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví a v horní části kmínku), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

6) Strom s výrazně sníženou vitalitou a se zničenou architekturou koruny (původní korunka stromu z velké části - cca 60 % - suchá, přežívá pouze ve formě několika posledních živých větví ve spodní části koruny, strom se tuto ztrátu snaží kompenzovat vytvářením sekundárních výhonů ze zdravé části kmene pod nasazením původní korunky). Na větvích mohou být pozorovány ve velkém rozsahu letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví a kmínku), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

7) Strom s výrazně sníženou vitalitou. Korunka tvořena pouze sekundárními výhony (korunka tvořena jen několika, zpravidla dvěma až třemi silnými výhony, které vyrostly z nejvýše položené zdravé části kmene). Na těchto výhonech mohou být pozorovány letošní nekrózy ve velkém rozsahu (nekrózy se objevují i na bázích větví a na kmínku), na suchých větvích a kmeni jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

8) Strom se zbytkovou vitalitou přežívající pomocí výmladků na zbytku zdravé části kmene (jak primární, tak sekundární koruna stromu odumřely díky postupujícím podkorním nekrózám, strom přežívá díky výmladkům na spodní až bazální části kmene). Na výmladcích mohou být pozorovány letošní nekrózy na odumřelé koruně a kmeni jsou patrné loňské nekrózy.

9) Odumřelý strom vlivem celkového vyčerpání a postupného zhoršování zdravotního stavu. Infekce dosáhla báze kmene, díky čemuž strom přišel o veškerý asimilační aparát a celkově odumřel. Někdy může strom odumřít i v některé z dřívějších fází (8, 7), na celkové vyčerpání, kdy většinou na jaře nevyraší.

10) Odumřelý strom bez vnějších příznaků odumírání v koruně či na kmeni, které by mohly být natolik vážné, aby zapříčinily celkové odumření stromu (pravděpodobná příčina odumření stromu vlivem problémů v kořenové části stromu).

6.6.1.2. Dospívající jedinci

1) Strom bez zjevného narušení vitality, s přirozenou architekturou koruny (na stromě nejsou pozorována žádná poranění či suché větve, vyjma přirozeného vyvětřování zastíněných větví v koruně). Na stromě nejsou pozorovány letošní ani loňské podkorní nekrózy.

2) Strom bez zjevného narušení vitality, s mírně narušenou architekturou koruny (na stromě se vyskytují místy (do 10 %) suché větve posledního řádu (IV.) především na periferii koruny, u starších kultur prosychají větve spíše ve spodní části koruny). Na stromě nejsou pozorovány letošní ani loňské podkorní nekrózy.

3) Strom s mírně narušenou vitalitou a s narušenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve III. (místy do 10 %) a IV. (v malé míře do 25 %) řádů, především na periferii koruny, u starších kultur prosychají větve spíše ve spodní části koruny. V koruně se taktéž začínají (do 5 %) vyskytovat adventivní výhony především na větvích IV. řádu.). Na kmeni ani na větvích nejsou pozorovány letošní podkorní nekrózy, mohou se však objevit nekrózy z předešlých let.

4) Strom se zřetelně narušenou vitalitou a narušenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve II. (místy do 10 %), III. (v malé míře do 25 %), a IV. (hojně do 50 %) řádů, začíná ústup a deformace především periferie koruny, absence terminálního výhonu. U starších kultur prosychají větve spíše ve spodní části koruny, terminál tedy může zůstat zachován. V koruně se taktéž (do 25 %) vyskytují adventivní výhony především na větvích IV. a III. řádu.). Na větvích mohou být v malém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (především na větvích IV. a III. řádu), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

5) Strom se zřetelně narušenou vitalitou a silně narušenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve II. (v malé míře do 25 %), III. (hojně do 50 %), a IV. (převážně nad 50 %) řádů, zřetelný ústup a deformace především periferie koruny, absence terminálního výhonu. U starších kultur prosychání prostupuje od spodních částí koruny až k vrcholu, terminál nezřetelný. V koruně se v hojné míře (do 50 %) vyskytují adventivní výhony především na větvích III. a II. řádu.). Primární koruna začíná být postupně nahrazována korunou sekundární. Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví IV. řádu), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

6) Strom s výrazně sníženou vitalitou a se zničenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve I. (místy do 10 %), II. (v malé míře do 25 %), III. (převážně nad 50 %), řádů. Větve IV. řádu se již v koruně nevyskytují. Koruna silně zdeformována a zahuštěna v celém rozsahu. Tvořena převážně (nad 50 %) výmladky sekundárního charakteru, které se vyskytují už i na větvích I. řádu. Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví II. řádu), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

7) Strom s výrazně sníženou vitalitou a převážně sekundární korunou (koruna tvořena výmladky rostoucími z větví I. a II. řádu, částečně také výmladky rostoucími z horní části kmene pod úrovní kosterního větvení primární koruny. Koruna tvořená nepravidelnými shluky výmladků, živé větve IV. a V. řádu se již téměř nevyskytují. Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví I. řádu a na kmeni), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

8) Strom se zbytkovou vitalitou, přežívající pouze díky výmladkům na kmeni (celá primární koruna i výmladky na větvích I. řádu odumřely vlivem rozšíření podkorních nekróz pod úroveň koruny a na kmen. Strom přežívá jen pomocí výmladků na kmeni. Na kmenových výmladcích mohou být pozorovány letošní nekrózy, na suchých větvích a kmeni jsou patrné nekrózy z předešlých let.).

9) Odumřelý strom vlivem celkového vyčerpání a postupného zhoršování zdravotního stavu (infekce dosáhla báze kmene, díky čemuž strom přišel o veškerý asimilační aparát a celkově odumřel. Některé stromy mohou ještě chvíli přežít pomocí bazálních výmladků. Někdy může strom odumřít i v některé z dřívějších fází, na celkové vyčerpání, kdy většinou na jaře nevyraší).

10) Odumřelý strom bez vnějších příznaků odumírání v koruně či na kmeni, které by mohly být natolik vážné, aby zapříčinily celkové odumření stromu (pravděpodobná příčina odumření stromu vlivem problémů v kořenové části stromu).

6.6.1.3. Dospělí jedinci

1) Strom bez zjevného narušení vitality s přirozenou architekturou koruny (na stromě nejsou pozorována žádná poranění či suché větve, vyjma přirozeného vyvěttování zastíněných větví v koruně). Na stromě nejsou pozorovány letošní ani loňské podkorní nekrózy.

2) Strom bez zjevného narušení vitality s mírně narušenou architekturou koruny (na stromě se vyskytují místy (do 10 %) suché větve posledního řádu (V.) především na periférii koruny, v hustě zapojených porostech prosychají větve spíše ve spodní části koruny). Na stromě nejsou pozorovány letošní ani loňské podkorní nekrózy.

3) Strom s mírně narušenou vitalitou a narušenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve IV. (místy do 10 %) a V. (v malé míře do 25 %) řádů, především na periférii koruny, v hustě zapojených porostech prosychají větve spíše ve spodní části koruny. V koruně se taktéž začínají (do 5 %) vyskytovat adventivní výhony, především na větvích IV řádu.). Na kmeni ani na větvích nejsou pozorovány letošní podkorní nekrózy, mohou se však objevit nekrózy z předešlých let.

4) Strom se zřetelně narušenou vitalitou a narušenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve III. (místy do 10 %), IV. (v malé míře do 25 %), a V. (hojně do 50 %) řádů, začíná ústup a deformace především periferie koruny. U hustě zapojených porostů prosychají větve spíše ve spodní části koruny. V koruně se taktéž (do 25 %) vyskytují adventivní výhony především na větvích IV. a III. řádu.). Na větvích mohou být v malém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (především na větvích V. a IV. řádu), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

5) Strom se zřetelně narušenou vitalitou a silně narušenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve III. (v malé míře do 25 %), IV. (hojně do 50 %), a V. (převážně nad 50 %) řádů, zřetelný ústup a deformace především periferie koruny. U hustě zapojených porostů prosychání postupuje od spodních částí koruny až k vrcholu. V koruně se v hojné míře (do 50 %) vyskytují adventivní výhony, především na větvích IV. a III. řádu.). Primární koruna začíná být postupně nahrazována korunou sekundární. Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví IV. řádu), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

6) Strom s výrazně sníženou vitalitou a se zničenou architekturou koruny (v koruně se vyskytují suché větve I. (místy do 10 %), II. (v malé míře do 25 %), III. (hojně do 50 %), IV. (převážně nad 50 %), řádů. Větve V. řádu se již v koruně nevyskytují. Koruna silně zdeformována a zahuštěna v celém rozsahu. Tvořena převážně (nad 50 %) výmladky sekundárního charakteru, které se vyskytují už i na větvích I. řádu.) Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví II. řádu), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

7) Strom s výrazně sníženou vitalitou a převážně sekundární korunou (koruna tvořena výmladky rostoucími z větví I. a II. řádu, částečně také výmladky rostoucími z horní části kmene pod úrovní kosterního větvení primární koruny. Koruna tvořená nepravidelnými shluky výmladků, živé větve IV. a V. řádu se již téměř nevyskytují.) Na větvích mohou být ve velkém rozsahu pozorovány letošní podkorní nekrózy (nekrózy se objevují i na bázích větví I. řádu a na kmeni), na suchých větvích jsou patrné také nekrózy z předešlých let.

8) Strom se zbytkovou vitalitou, přežívající pouze díky výmladkům na kmeni (celá primární koruna i výmladky na větvích I. řádu odumřely vlivem rozšíření podkorních nekróz pod úroveň koruny a na kmen. Strom přežívá jen pomocí výmladků na kmeni. Na kmenových výmladcích mohou být pozorovány letošní nekrózy, na suchých větvích a kmeni jsou patrné nekrózy z předešlých let).

9) Odumřelý strom vlivem celkového vyčerpání a postupného zhoršování zdravotního stavu (některé stromy mohou ještě chvíli přežít pomocí bazálních výmladků. Někdy může strom odumřít i v některé z dřívějších fází, na celkové vyčerpání, kdy většinou na jaře nevyraší).

10) Odumřelý strom bez vnějších příznaků odumírání v koruně či na kmeni, které by mohly být natolik vážné, aby zapříčinily celkové odumření stromu (pravděpodobná příčina odumření stromu vlivem problémů v kořenové části stromu).

6.6.2. Hodnocení porostů

Před samotným hodnocením je třeba zjistit z lesnické dokumentace zastoupení jasanů v hodnoceném porostu, jejich věk a rozlohu hodnoceného porostu. Při příchodu do porostu hodnotitel nejprve zjistí typ smíšený porostu (nejedná-li se o jasanovou monokulturu).

Následně v porostu vytyčí inventarizační plochy (viz níže kapitola 6.6.2.1.) v hustotě 1 plocha na 0,4 ha rozlohy porostu. Inventarizační plochy by měl hodnotitel umisťovat tak, aby co nejlépe pokryly hodnocený porost a spadal do nich co největší počet jasanů. V porostech s malou rozlohou hodnocení probíhá vždy minimálně na dvou plochách. U skupinovitě smíšených porostů umisťuje hodnotitel inventarizační plochy pouze do jasanových skupin, jako by se jednalo o porost se zastoupením jasanu 100 %.

V porostech se 100% - 90% zastoupením jasanu (taktéž u porostů se skupinovitým smíšením porostu) probíhá hodnocení pomocí inventarizačních ploch 1 na 0,4 ha (u porostů skupinovitě smíšených se počet inventarizačních ploch odvozuje nikoli od rozlohy porostu, ale od rozlohy jasanu v porostu).

V porostech smíšených, v nichž je hlavní dřevinou jasan (min zastoupení 90 % - 60 %) probíhá hodnocení pomocí inventarizačních ploch 1 na 0,3 ha.

V porostech smíšených, v nichž je jasan vedlejší dřevinou (zastoupení od 30 % - 60%) probíhá hodnocení pomocí inventarizačních ploch 1 na 0,2 ha.

V porostech smíšených, v nichž je jasan přimíšenou dřevinou (pod 30 % zastoupení) hodnotitel projde celým porostem a zhodnotí zdravotní stav všech nalezených jasanů dle metodiky pro hodnocení jednotlivých stromů.

6.6.2.1. Inventarizační plocha

Inventarizační plocha se skládá ze dvou soustředných inventarizačních kruhů o poloměrech 12 m a 3 m. V menším kruhu je hodnoceno jasanové zmlazení (je-li v porostu přítomno). Do hodnocení jsou zahrnuty jasanové od 0,5 m výšky, není tedy hodnoceno zmlazení v podobě semenáčků. Hodnoceno je maximálně 50 jedinců na porost. Ve větším kruhu jsou hodnoceni jedinci z hlavní etáže porostu. Maximálně je hodnoceno 100 až 150 jedinců na porost. Pokud nastane situace (např. v mladých porostech), že bude možné dosáhnout maximálního počtu jedinců pro porost již na jedné inventarizační ploše, je hodnotitel povinen vytvořit a zhodnotit minimálně ještě jednu inventarizační plochu pro lepší zachycení pravděpodobné diverzity porostu.

6.6.3. Legenda (vysvětlení pojmů)

Fyziologická vitalita:

Nenarušená – strom se bez problému vyrovnává s vnějšími vlivy prostředí, kontinuálně přirůstá a v koruně se nevyskytují suché větve (kromě větví přirozeně odumírajících vlivem zastínění v koruně), ani výmladky (větve sekundární koruny vzniklé z adventivních pupenů).

Mírně narušená – strom se bez problému vyrovnává s vnějšími vlivy prostředí, přírůst začíná být nepravidelný (v některých letech strom vytváří abnormální přírůsty, čímž kompenzuje vzniklá drobná poškození), a v koruně se vyskytují suché větve (do 20 %, především větve vyšších řádů). Výmladky (větve sekundární koruny vzniklé z adventivních pupenů) se na stromě objevují jen zřídka.

Zřetelně narušená – strom oslabený, může mít problém vyrovnat se se silnějšími negativními vnějšími vlivy prostředí, díky čemuž může v ojedinělých případech dojít k náhlému odumření. Přírůst nepravidelný v rámci koruny (zdravé větve infikovaných stromů přirůstají mnohem více než u zdravých stromů, infikované větve mají vlivem oslabení minimální přírůst. Přírůst taktéž začínají zkreslovat objevující se výmladky sekundární koruny), v koruně se vyskytují suché větve (do 40 %, především větve vyšších řádů, místy větve I., II. a III. řádu). Výmladky (větve sekundární koruny vzniklé z adventivních pupenů) se na stromě objevují ve větším množství.

Výrazně snižená – strom zřetelně oslabený, má problém vyrovnat se se silnějšími negativními vnějšími vlivy prostředí, díky čemuž může dojít k náhlému odumření. Přírůst výrazně nepravidelný v rámci koruny (zdravé větve infikovaných stromů přirůstají mnohem více než u zdravých stromů, infikované větve mají vlivem oslabení minimální přírůst. Přírůst taktéž zkresluje výmladky sekundární koruny), v koruně se vyskytují suché větve (do 60% veškeré větve vyšších řádů a místy i kosterní větve). Výmladky (větve sekundární koruny vzniklé z adventivních pupenů) se na stromě objevují ve velkém množství a začínají v koruně převažovat, přirozeně tak nahrazují úbytek způsobený schnutím primární koruny.

Zbytková – strom přežívající výrazně oslabený, bez schopnosti vyrovnat se se silnějšími negativními vlivy prostředí, díky čemuž v této fázi často dochází k náhlému odumření. Výrazně nepravidelný přírůst tvořen především výmladky na kmeni a větvích I. řádu

(zdravé větve infikovaných stromů přirůstají mnohem více než u zdravých stromů, infikované větve mají vlivem oslabení minimální přírůst. Přírůst taktéž zkresluje výmladky sekundární koruny), v koruně se vyskytují suché větve (do 80 % usychá i většina kosterních větví, převážná část zelené koruny tvořena výmladky). Výmladky (větve sekundární koruny vzniklé z adventivních pupenů) se na stromě objevují ve velkém množství a prakticky tvoří zbytek zelené části koruny.

Odumřelý strom – strom bez známek fyziologické vitality.

Architektura koruny:

Přirozená – koruna tvořena primárními výhony s průběžným kmenem a větvemi I. až V. řádu (dle stáří hodnoceného jedince: u mladé výsadby tvoří přirozenou architekturu např. jen větve I. a II. řádu ale u dospělého porostu, by měl mít každý jedinec hojně i větve V. řádu). U mladých a dospívajících stromů můžeme zřetelně pozorovat terminál. Koruna nezahuštěná s přirozenou stavbou.

Mírně narušená – koruna tvořena primárními výhony s průběžným kmenem a větvemi I. až V. řádu (dle stáří hodnoceného jedince: u mladé výsadby tvoří přirozenou architekturu např. jen větve I. a II. řádu ale u dospělého porostu, by měl mít každý jedinec hojně i větve V. řádu). U mladých a dospívajících stromů můžeme zřetelně pozorovat terminál. Koruna mírně zahuštěná díky nahrazování usychajících větví posledních řádů.

Narušená – koruna tvořena převážně primárními výhony, ale mohou se postupně objevovat i sekundární výmladky (reakce na ztrátu nadzemní biomasy). Stále je v koruně patrný průběžný kmen a větve I. až IV. řádu (dle stáří hodnoceného jedince: u mladé výsadby tvoří přirozenou architekturu např. jen větve I. a II. řádu ale u dospělého porostu, by měl mít každý jedinec hojně i větve V. řádu), větve V. řádu ve velké míře usychají a jsou postupně nahrazovány sekundárními výmladky, díky tomu je koruna v periferních částech silně zahuštěná. Terminální výhon bývá zpravidla nahrazen dvěma až třemi sekundárními výmladky a tak se již v této fázi nedá zřetelně odlišit terminál.

Silně narušená – koruna tvořena primárními i sekundárními výhony v poměru cca 1:1 (reakce na ztrátu nadzemní biomasy). Stále je v koruně patrný průběžný kmen a větve I. až III. řádu, větve V. řádu se v koruně již téměř nevyskytují a větve IV. řádu ve velké

míře usychají a jsou postupně nahrazovány sekundárními výmladky. Díky tomu je koruna silně zahuštěná, bez přítomnosti terminálního výhonu.

Zničená – koruna tvořena převážně sekundárními výhony rostoucími na kosterních větvích a kmeni (reakce na ztrátu nadzemní biomasy). V koruně již není patrný průběžný kmen a korunu tvoří pouze větve I. řádu, na nichž shlukovitě vyrůstají sekundární výmladky. Koruna je proto silně fragmentovaná a zahuštěná.

Sekundární – koruna již téměř neexistuje, je tvořena pouze sekundárními výmladky na kmeni a u báze kmene (viz obr. č. 26.).



Obr. č. 26. Sekundární výhony na kmeni (Rozsypálek, 2014).

Nekrózy:

Letošní nekróza – jedná se o podkorní nekrózu, která je elipsoidního tvaru, zpravidla je v jejím středu listová jizva nebo suchá větev vyššího řádu. Má žlutočervenou až tmavě hnědou barvu. Hlavní rozdíl mezi letošní a loňskou podkorní nekrózou je v okolí této nekrózy. Letošní nekróza má po obvodu zdravou hladkou kůru zelenošedé barvy s nepozměněnou stavbou dřeva. Celý letorost nebo větev, na níž se nekróza vyskytuje, má na průřezu přirozenou geometrii (viz obr. č. 27.).



Obr. č. 27. Letošní podkorní nekróza (Rozsypálek, 2014).

Loňská nekróza – jedná se o podkorní nekrózu, která je nepravidelně ohraničena, zpravidla je v jejím středu listová jizva, nebo suchá větev vyššího řádu a má tmavě hnědou až hnědočernou barvu. Hlavní rozdíl mezi letošní a loňskou podkorní nekrózou je v okolí této nekrózy. Loňská nekróza je ohraničena zduřeninami kalusu, který je šedohnědé barvy a má hrubý povrch. Letorost nebo větev, na níž se nekróza vyskytuje, má na průřezu přirozenou geometrii pouze v místě bez podkorní nekrózy. V místě nekrózy je geometrie silně pozměněna růstem kalusu. Taktéž je možné, že dřevina kolem starých nekroz kalusový val nevytvoří (většinou u silně oslabených dřevin), v tomto případě je potřeba do letorostu v místě nekrózy říznout a odstranit kůru. Pokud je

pod ní černá vrstvička odumřelého felogénu a kambia, je nekróza letošní, pokud je tato vrstva již zahnědlá, jde o nekrózu loňskou (viz obr. č. 28.).



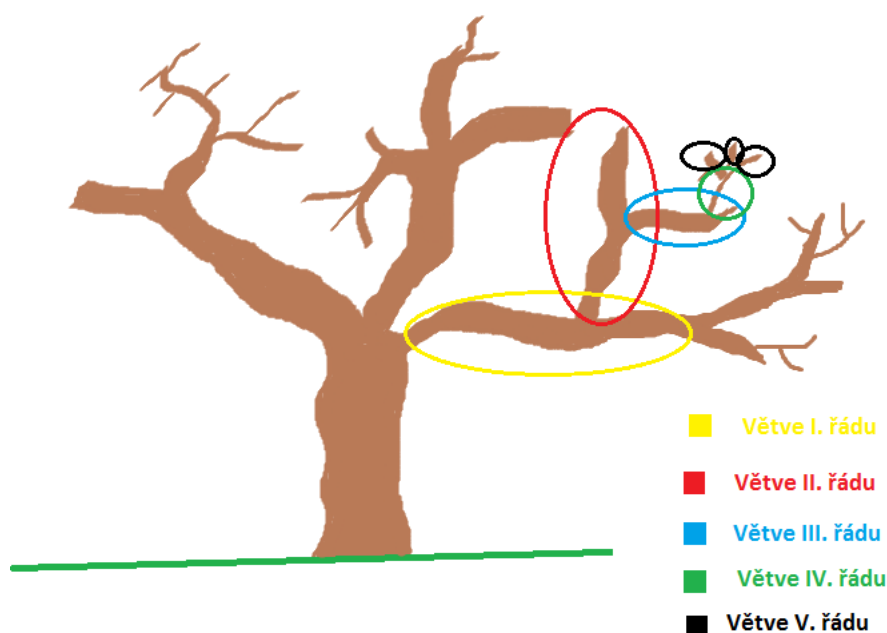
Obr. č. 28. Loňská a starší podkorní nekróza (Rozsypálek, 2012 a 2014).

Terminál: Jedná se o dominantní vzrůstový vrchol stromu, tedy nejvyšší vertikálně rostoucí letorost. U zdravého vitálního stromu by měl být pouze jeden takovýto letorost, na první pohled snadno rozlišitelný.

Primární výhony: Jsou větve tvořené přirozeně v průběhu růstu stromů.

Sekundární výhony/výmladky: Jako sekundární (proventální) výhony označujeme ty výhony, které vznikají vyrašením spících či adventivních pupenů. Tento typ výhonů se nejčastěji vytváří jako reakce na určitý stres (ztráta části koruny, snížení vitality).

Větve I., II., III., IV., V. řádu: (viz obr. č. 29.).

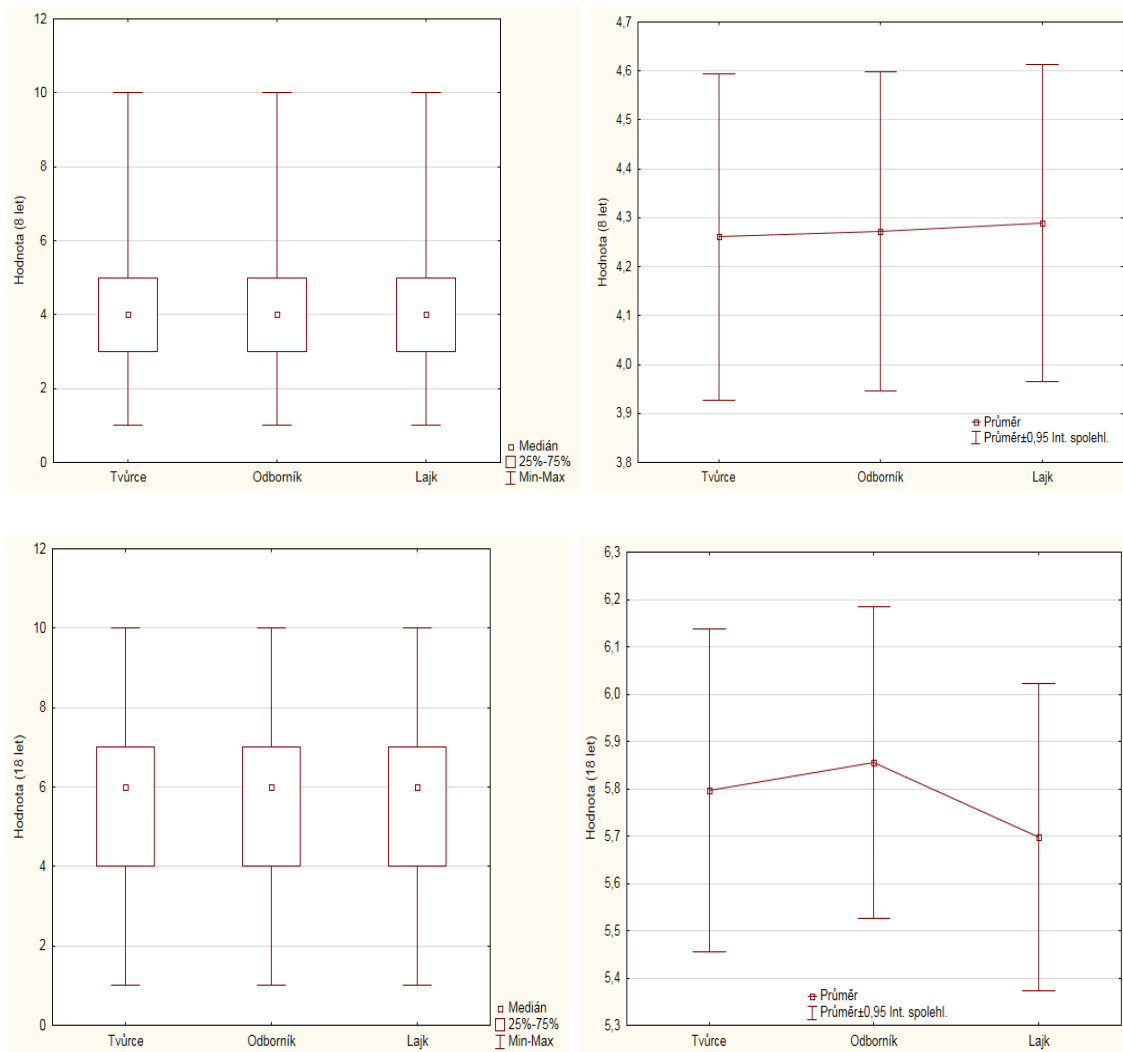


Obr. č. 29. Větve I. až V. řádu (Rozsypálek, 2015).

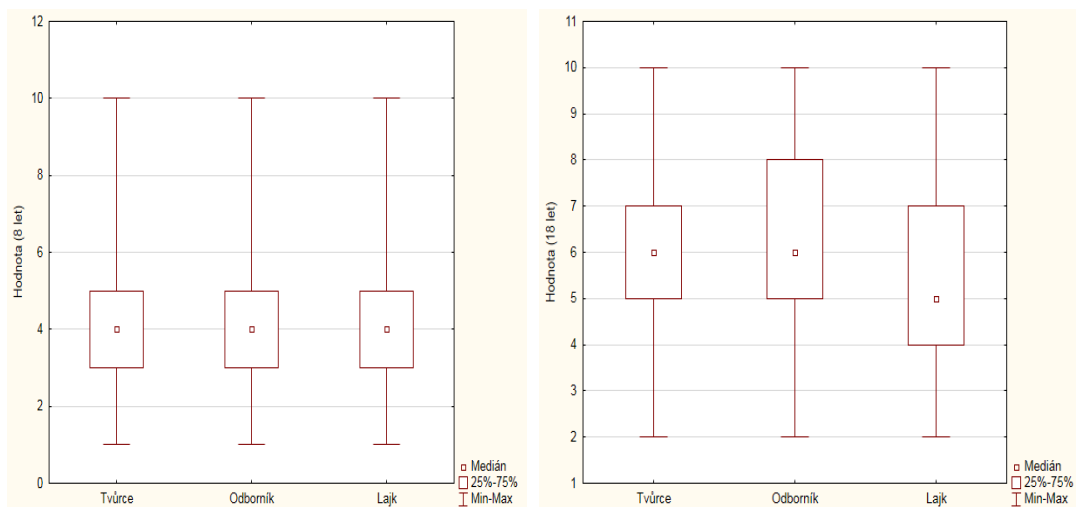
6.7. Verifikace metodiky hodnocení zdravotního stavu jasanů

Otestováním metodiky jsme zjistili, že největší přesnosti v hodnocení s testovanou metodikou je dosahováno v jarním období před plným olistěním korun. V tomto období byly odchylky ve zhodnocení modelového porostu všemi třemi hodnotiteli 0,02 stupně u osmiletého porostu a 0,15 u 18let starého porostu. Při srovnání hodnocení tvůrce metodiky a odborníka (za předpokladu, že s metodikou budou pracovat osoby s přírodovědným vzděláním), byly odchylky ve zhodnocení porostů jen 0,01 pro mladý porost a 0,05 pro porost dospívající (viz graf č. 21.). Při letním hodnocení za plného olistění byla odchylka v hodnocení všech tří hodnotitelů 0,16 u mladého porostu a 0,44 stupně. Toto mírné zvýšení odchylky v hodnocení bylo zapříčiněno sníženou viditelností v plně olistěných porostech. Při srovnání hodnocení tvůrce a odborníka byla odchylka 0,16 a 0,19 stupně (viz graf č. 22.).

Graf č. 21. Jarní hodnocení v mladém a dospívajícím porostu.



Graf č. 22. Letní hodnocení v mladém a dospívajícím porostu.



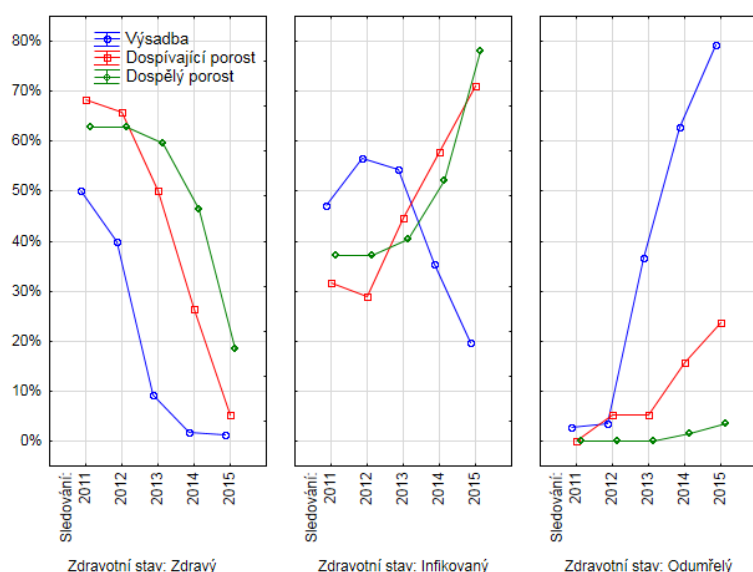
Výsledky podzimního hodnocení z 8. 10. 2014 byly téměř srovnatelné s přesností výsledků jarního hodnocení. Odchyly v hodnocení modelových porostů při hodnocení všech tří hodnotitelů byly v tomto období 0,09 stupně u osmiletého a 0,12 u osmnáctiletého porostu. U devadesátiletého porostu byla odchylka v hodnocení 0,11 stupně.

Z výše popsaných výsledků vyplývá, že metodika hodnocení zdravotního stavu jasanů poškozovaných infekcí *H. fraxineus* je v praktickém hodnocení velmi přesná především v ročních obdobích kdy nejsou jasanové plně olistěny. Při plném olistění korun je přesnost hodnocení mírně snížena.

6.8. Rychlost šíření infekce a mortalita

Infekce *H. fraxineus* se nejrychleji šíří v mladém porostu po výsadbě. V sledovaném porostu jasanu ztepilého postihla infekce během šesti let od výsadby 98,8 % jedinců. V porostu s průměrným věkem 12 let vzrostl počet infikovaných jedinců během pěti let sledování z 31,6 % na 94,7 % infikovaných jedinců. A v dospělém porostu 60 – 70 let se rozšířila infekce během pěti let z 37,2 % na 81,6 % infikovaných jedinců (viz graf č. 23. Rychlost šíření infekce a mortalita). Rychlost šíření infekce byla v letech 2011 až 2013 nejvyšší u mladé výsadby. V roce 2012 dosáhla vrcholu a následně začala klesat, pravděpodobně vlivem nedostatku nových neinfikovaných hostitelských rostlin na sledované lokalitě. Rychlost šíření u starších porostů byla zpočátku minimální, postupně akcelerovala a svého vrcholu dosáhla pravděpodobně právě v roce 2015.

Graf č. 23. Rychlost šíření infekce a mortalita.



Mortalita byla rovněž nejvyšší u mladého porostu. U sazenic vysazených v roce 2010 činila v roce 2015 79,2 %. Ve starších porostech sledovaných v rámci šetření byla mortalita 23,7 % u dospívajících jedinců a 3,6 % u jedinců dospělých. I v těchto porostech však mortalita začala v posledních třech letech sledování výrazně vzrůstat.

7. Diskuse

7.1. Faktory zodpovědné za rozdíly v odumírání jednotlivých jasanů

Přestože jsou do výzkumu nekrózy jasanu v posledních letech investovány velké finanční i lidské zdroje, nejsou stále dostatečně objasněny faktory, které nesou zodpovědnost za velké rozdíly v intenzitě odumírání jednotlivých jasanů v jasanových porostech zasažených infekcí. Z velké škály faktorů, které by pravděpodobně mohly mít vliv na tento jev, můžeme s velkou pravděpodobností vyřadit abiotické podmínky stanoviště. Tento faktor můžeme vyřadit především proto, že k velkým rozdílům v intenzitě chřadnutí dochází velmi často i na malé ploše (např: v rámci dvou sousedních jedinců v porostu), na níž je vliv abiotických faktorů stanoviště téměř identický.

Významným faktorem, který by mohl hrát důležitou roli v individuální citlivosti jasanů, je velká variabilita v genetické struktuře populací *H. fraxineus*. Této problematice se v poslední době věnuje velká pozornost. Z výzkumů (Gross, 2012, 2014) vyplývá, že genetická variabilita populací *H. fraxineus* v Evropě je nižší než v Asii, odkud tato houba pochází. V důsledku pohlavního rozmnožování je však genetická diverzita vysoká, zvláště ve srovnání s patogeny, kteří se rozmnožují nepohlavně, či převážně nepohlavně jako je např. *Dothistroma septosporum*. Kirisits (2013, 2014) uvádí, že různé kultury *H. fraxineus* se mohou významně lišit svou patogenitou vůči *F. excelsior*. Je ovšem značně nepravděpodobné, že by byly dvě vedle sebe rostoucí hostitelské dřeviny napadeny každá jiným jedincem *H. fraxineus* s odlišnou patogenitou. Pokud uvážíme množství uvolňovaných askospor jedinou plodnicí a fakt, že se choroba šíří vzduchem bez potřeby vektora je zřejmé, že ani genetická variabilita *H. fraxineus* nevysvětluje velkou diverzitu v chřadnutí jasanů.

Dalším významným faktorem by mohla být genetická predispozice nebo naopak přirozená odolnost jedinců *F. excelsior* vůči infekci. Tento zajímavý faktor je dnes taktéž hojně zkoumán (Dobrowolska, 2008 a Forestry commission, 2013) a z doposud publikovaných prací na toto téma se zdá, že genetická diverzita jasanových populací a následná rozdílná citlivost vůči infekci v Evropě bude do budoucna jednou z hlavních možností, jak zachovat populaci jasanů. Ovšem ani tento činitel nevysvětluje dostatečně výrazné rozdíly v infekci jasanů. Především kvůli faktu, že se tyto rozdíly velmi často vyskytují i v uměle vysazených jasanových porostech. Vzhledem k nedostatku

semenných sadů pro *F. excelsior* v České republice bylo osivo pro tyto porosty velmi často sbíráno pouze z jednoho či dvou mateřských jedinců, takže genetická diverzita *F. excelsior* v takovýchto porostech je velmi zúžená.

Z výše popsaných důvodů jsme se v této práci pokusili detailně prozkoumat vztah mezi patogenní houbou a hostitelskou dřevinou v jejich přirozeném prostředí. Tato pozorování probíhala na 40 (20 výrazně symptomatických a 20 málo symptomatických) jedincích rostoucích na malém území v uměle založené jasanové monokultuře s velkým infekčním tlakem patogenní houby. Toto prostředí bylo vybráno pro co nejefektivnější eliminaci výše popsaných faktorů. Na těchto jedincích bylo v průběhu roku 2014 pozorováno hned několik zajímavých rozdílů, které by mohly být jednou z příčin rozdílů v chřadnutí.

Nejprve bylo zjištěno, že výrazně symptomatictí jedinci mají v některých případech až o 30 dnů zpomalený průběh jarních fenologických fází. To znamená, že narozdíl od jedinců málo symptomatických, kteří mají mnohem déle plně vyvinuté listy, mají tyto jasany výrazně zkrácenou vegetační sezónu a dokáží vyprodukovat menší množství asimilátů. Otázkou zůstává, zda je toto zpoždění jarních fenologických fází důsledkem silné infekce voskovičkou jasanovou, nebo se jedná o geneticky vrozenou vlastnost, kterou měly tyto jasany již před příchodem této patogenní houby. Taktéž by mohlo zpomalení jarních fenologických fází poukazovat na silnou infekci v kořenové části hostitelských rostlin. V roce 2014 byly ve skupině MMS (mlazina málo symptomatická) pozorováni dva jedinci, jejichž fenologické fáze byly shodné spíše se skupinou silně symptomatických jedinců. Přesto tito jedinci vykazovali jen minimální poškození infekcí *H. fraxineus* na jejich nadzemní části. Po vyrašení pupenů začali tito jedinci v rámci celé koruny vadnout a v druhé polovině května tito jedinci odumřeli. Po prozkoumání obou jedinců byla nalezena silná infekce *H. fraxineus* a dalších patogenních hub v bazální a kořenové části těchto dřevin. Takovýmto symptomem náhlého zaschnutí v jarních měsících odumírá v infikovaných jasanových porostech přibližně 10 – 20 % dřevin. Zajímavé je, že se velmi často jedná právě o dřeviny, které na své nadzemní části vykazují minimum symptomů odumírání.

Dalším zajímavým rozdílem byly větší ztráty asimilačního aparátu vlivem reaktivace loňských nekrotů a zasychání výhonů. Jedinci slabě symptomatictí ztratili v rámci tohoto symptomu odumírání v průměru 3 % listové plochy, zatímco jedinci silně

symptomatictí 14 %. Tento rozdíl jsme očekávali, vzhledem k tomu, že na výrazně symptomatických jedincích bývá z předchozího roku vyšší počet nekróz. Takže pokud předpokládáme, že na všech jedincích je přibližně stejné procento nekróz, které v jarním období obnoví svůj růst, muselo být poškození silně symptomatických jedinců vyšší.

U hlavní fáze defoliace způsobované infekcí *H. fraxineus* byl pozorován dřívější nástup defoliace u silně symptomatických jedinců. U mladých jedinců (8 let) byl tento rozdíl přibližně 9 dnů, u starších (18 let) jedinců dokonce cca 17 dnů. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben snížením a zahuštěním korun u silně symptomatických jedinců. Díky tomu byly dřívě a ve větší intenzitě vystaveny askosporám uvolňovaným z apothecií rostoucích na opadaných řapících. V celkové intenzitě defoliace nebyly nalezeny žádné významné rozdíly, všichni jedinci až na čtyři byly zasaženi 100% defoliací.

Nejzajímavější rozdíl byl pozorován v růstu podkorních nekróz. Na každém jedinci bylo pravidelně sledováno 40 listových jizev po opadu infikovaných listů. Tímto pokusem jsme chtěli zjistit, kolika procentní je úspěšnost pronikání patogena z infikovaných listů do pletiv letorostu. Zjistili jsme však i existenci významného rozdílu mezi silně a slabě napadanými jedinci. U slabě napadaných jedinců byla úspěšnost pronikání v průměru 6 %. Kdežto u silně symptomatických jedinců byla tato úspěšnost 27,5 %. Jedná se o významný vliv, který by mohl částečně objasnit velké rozdíly v odumírání. Neboť teprve pronikáním patogenní houby do lignifikovaných pletiv hostitelské rostliny vzniká na hostiteli největší poškození. Předčasnou ztrátu listového aparátu vlivem infekce *H. fraxineus* v letních měsících by dokázaly jedinci *F. excelsior* snadno kompenzovat. Až následné odumírání letorostů a celých větví je vliv, který většina rostlin nedokáže plně nahradit a dochází tak k postupnému odumírání. Otázkou zůstává, co je příčinou tohoto rozdílu. Je zřejmé, že v místě listové jizvy leží významná obranná zóna, skrze kterou patogen proniká jen v méně než 20 % případů. Toto zjištění by si rozhodně zasloužilo další výzkum.

Celkově bylo zjištěno, že výrazně symptomatictí jedinci se dostávají do jakési spirály poškození, z níž vlivem opožděného rašení a dřívějšího nástupu defoliace nemají šanci uniknout. Otázkou je, jaký bude v budoucnu vývoj mírně symptomatických jedinců. Je možné, že odolnost těchto jedinců bude postupně překonána a i tito jedinci skončí vlivem periodicky se opakujících infekcí jako jedinci výrazně symptomatictí. Velmi

povzbudivá však byla skutečnost, že ve skupině sledovaných jedinců byl přítomen i jeden jedinec, který nevykazoval žádné známky infekce způsobované *H. fraxineus*. Přestože byl tento jedinec *F. excelsior* uprostřed monokulturního porostu, jenž se vlivem silného infekčního tlaku dostával do stádia rozpadu, nevykazoval žádné poškození vlivem infekce. Hledání a ochrana takovýchto jedinců pro jejich přirozenou reprodukci jsou pravděpodobně jedinou možností jak zachránit populaci jasanů v evropských lesích.

7.2. Zhodnocení faktorů ovlivňujících délku a intenzitu fruktifikace *H. fraxineus*

Fruktifikace teleomorfního stádia *H. fraxineus* na opadaných jasanových řapících je zásadní pro rychlé šíření této patogenní houby. Touto fází životního cyklu voskovičky jasanové se zabývá především Kirisits (2008, 2009, 2012) uvádí, že patogen vytváří na infikovaných řapících apothecia s askosporami, které se následně šíří větrem a infikují nové jedince. Taktéž zjistil, že patogenní houba je schopná v řapících přečkat i několik let, dokud nenastanou vhodné klimatické podmínky pro tvorbu plodnic. Z těchto informací vyplývá, že množství infikovaných řapíků a prostředí, v němž se tyto řapíky vyskytují, výrazně ovlivňuje infekční tlak vyvíjený na okolní hostitelské rostliny.

V této práci jsme pozorovali tři varianty prostředí, v němž se přirozeně vyskytovalo velké množství infikovaných řapíků a hodnotili jsme délku a intenzitu fruktifikace *H. fraxineus*. Zjistili jsme, že nejdelší a nejvíce intenzivní fruktifikace probíhá v mladých, hustě zapojených porostech s hustým nijak neudržovaným bylinným patrem. Zatímco nejkratší doba fruktifikace s minimální četností apothecií na řapík byla ve starším rozvolněném porostu s pravidelně sekaným bylinným patrem. Tyto výsledky poukazují na velký význam vzdušné vlhkosti a vlhkosti povrchu, na kterém řapíky leží, pro úspěšnou fruktifikaci.

7.3. Výsledky inokulačních pokusů

Pomocí inokulačních pokusů se nám podařilo potvrdit výsledky z Rakouska (Kräutler, 2015) o velké náchylnosti *F. excelsior* k infekci. I v našich testech bylo u tohoto druhu jasanu zaznamenáno největší procento úspěšně infikovaných jedinců (36 z 50). Tento druh vykazoval také největší rozsah poškození způsobených infekcí a mortalitu. Dalšími druhy, u kterých jsme testovali jejich predispozici k infekci, byly druhy *F. americana* a *F. pensylvanica*.

Zajímavé výsledky přinesl laboratorní rozbor inokulovaných jedinců. Přestože viditelné nekrózy u *F. americana* dosahovaly při ukončení pokusu 31. 12. 2014 průměrné délky 1,4 cm, byl rozsah infekce v pletivech u tří jedinců nepoměrně větší. První z těchto jedinců byl očkovan kulturou 1653, délka viditelné nekrózy byla 1,6 cm a rozsah infekce v pletivech byl 31,5 cm. Druhý byl očkovan kulturou WOR1/1/3/, viditelná nekróza byla 2,1 cm a rozsah infekce v pletivech 19 cm. U třetího jedince byla použita kultura B1/1/3/, viditelná nekróza byla 2,9 a infekce v pletivech 22 cm. První dva jedinci byli očkováni tmavým a třetí světlým morfotypem kultury *H. fraxineus*. Zajímavý byl především průběh infekce v pletivech u těchto jedinců. Infekce až na místo průniku (kde vytvořila malou viditelnou nekrózu) zůstávala ve dřeni a jen mírně zasahovala do pletiv xylému. Pletiva kambia a floému zůstala zachována, takže infikovaný jedinec nebyl infekcí nijak vážně poškozován. Otázkou zůstává, čím byla tato neobvyklá situace způsobena. Již delší dobu je známo, že patogenní houba po průniku do pletiv letorostu kolonizuje velmi rychle dřev. Tou se poté dále šíří, vystupuje zpět do xylému, dostává se ke kambiu a způsobuje růst podkorní nekrózy. Ovšem případ, kdy byla dřev infikována v obrovském rozsahu a patogen zůstával pouze v pletivech dřevě a xylému, ještě pozorován nebyl. Mohlo by se jednat o ojedinělou obranou reakci dřeviny, které se podařilo houbu v pletivech xylému izolovat. Bylo by dobré, pokud se takovýto průběh infekce pletiv ještě někdy vyskytne, jej podrobněji prozkoumat a pokusit se odhalit jeho příčiny.

8. Závěr

Tato práce poskytuje detailní popis průběhu symptomatických fází způsobovaných nekrózou jasanu v přirozených podmínkách lesního porostu jasanu ztepilého. Pomocí infekčních testů byla testována predispozice několika druhů jasanu vůči infekci a byl ověřován rozdíl v růstu světlých a tmavých morfortypů kultur *H. fraxineus*, inokulacemi na živé hostitele *jasanu ztepilého*.

Bylo zjištěno, že u jedinců výrazně poškozovaných infekcí *H. fraxineus* dochází ve srovnání s méně poškozovanými jedinci ke zpomalení jarních fenologických fází až o 30 dnů. Dále byl u výrazně symptomatických jedinců pozorován o 13 dnů dřívější nástup defoliace než u jedinců méně poškozovaných infekcí. Rozdíly byly pozorovány také v množství vytvořených podkorních nekróz na 40 listových jizev po infikovaných listech. U slabě symptomatických jedinců byla úspěšnost proniknutí infekce do dřevnatých částí rostliny pouze 6 %, zatímco u skupiny silně symptomatických jedinců to bylo 27,5 %.

Inokulačními pokusy, v nichž byla testována odolnost *F. excelsior*, *F. americana* a *F. pensylvanica* vůči infekci, jsme potvrdili velkou vrozenou predispozici u *F. excelsior*. Infekce propukla u 36 z 50 inokulovaných jedinců. Největší rozsah poškození podkorními nekrózami a nejvyšší mortalita (6 z 50 jedinců) byla zaznamenána rovněž u tohoto druhu. U *F. pensylvanica* byla zjištěna nejvyšší míra odolnosti, viditelná podkorní nekróza se objevila jen u 7 z 50 inokulovaných jedinců. Byla prokázána vyšší agresivita světlých morfortypů *H. fraxineus* v pletivech *F. excelsior*. Infekce světlých kultur této patogenní houby se v pletivech hostitelské rostliny šířila rychleji než infekce vyvolaná tmavými kulturami.

Infekce *H. fraxineus* se šíří nejrychleji a zároveň způsobuje nejvyšší mortalitu v mladých porostech po výsadbě. V sledovaném porostu *F. excelsior* postihla infekce během šesti let od výsadby 98,8 % jedinců. Mortalita v tomto porostu dosáhla za stejnou dobu 79,2 %. V dospělém porostu bylo za stejnou dobu sledování infikováno 81,6 % jedinců a mortalita dosáhla 3,6 %.

Byly vytvořeny a úspěšně otestovány metodiky - metodika hodnocení zdravotního stavu jasanů poškozovaných infekcí *H. fraxineus* a metodika inokulace jasanů askosporami *H. fraxineus*.

9. Summary

During the last years ash dieback has become serious threat for autochthonous ash populations in Europe, especially *Fraxinus excelsior*. In order to find methods how to protect this ash species against infection, it is important to investigate this very issue of relations between host and pathogen. Despite long-term research of this illness we still face considerable lack of relevant information.

This is the first work bringing a detailed description of symptomatic phases caused by the infection of *H. fraxineus* on *F. excelsior* under the natural conditions of forest stand. It tries to describe as many factors possible that are responsible for significant differences in dieback of individual ashes in ash stands. By means of infection trials a predisposition of several ash species to the infection was tested and results of Ing. Čermáková's experiment has been verified by inoculations on live trees of *F. excelsior*. Last but not least we continued in monitoring a speed of infection spread and mortality in three even-aged stands of *F. excelsior* (6 years, 12 years, 60 years).

It has been found out that highly susceptible species show delay of spring phenological phases of up to 30 days and their prolongation compared with less predisposed ones. It has been proven that duration length and intensity of fructification of teleomorph stage is dependent on canopy density and herb layer condition. In young-growth stand with high canopy density

(8 years old) with not well maintained herb layer apothecia of *H. fraxineus* were observable 45 days longer and in much higher number than in older stand (18 years) with cut weed. Defoliation of highly symptomatic specimens occurred 13 days earlier compared with less susceptible ones. There were also clear differences in a number of under-bark necroses per

40 leaf scars after infected leaves. On slightly symptomatic individuals the successfulness of infection penetration into woody parts was only 6%, whereas on highly symptomatic it counted 27.5%.

Infection trials that tested a resistance of *F. excelsior*, *F. americana* and *F. pennsylvanica* against the infection have proven high susceptibility of *F. excelsior* to the infection. The infection broke out in 36 out of 50 inoculated individuals. The greatest extent of damage by under-bark necroses and the highest mortality (6 out of 50 individuals) were also

noticed on *F. excelsior*. *F. pensylvanica* showed the highest level of resistance; visible under-bark necrosis appeared only in 7 out of 50 inoculated individuals. Experiments have also proven higher aggressiveness of light morphotypes of anamorph stage of *H. fraxineus* in tissues of

F. excelsior. The infection caused by light cultures spread faster in tissues of host plant than that caused by dark ones.

It has been ascertained that the infection of *H. fraxineus* spread the most rapidly and causes the highest mortality in young stands after planting. In the observed *F. excelsior* stand the infection affected 98.8% of all trees over the course of 6 years. A mortality in this stand reached 79.2% during the same time period. In mature stand 81.6% of tree individuals were infected in the course of the same period and mortality was 3.4%.

Two methodologies have been successfully tested: Methodology of health state assessment of ashes susceptible to the infection caused by *H. fraxineus* and Methodology of inoculation of ashes by ascospores of *H. fraxineus*.

10. Literární přehled

BAKYS, R., VASAITIS R., BARKLUND P., THOMSEN I., STENLID J., 2009. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *Eur J Forest Res* (2009) 128:51–60

BAKYS, R., VASAITIS, R., BARKLUND, P., IHRMARK, K., STENLID, J. 2009. Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, 58: 284-292.

CECH, T. L., 2006. Auffallende Schadfaktoren an Waldbäumen im Jahr 2005. *Forstschutz Aktuell*, Wien, (35): 6–7.

CECH, T. L., 2006. Eschenschäden in Österreich. *Forsts. Akt.* 37, 18–20.

ČERMÁKOVÁ, v., 2014. Occurrence of Putative dsRNA Mycoviruses in Ash Dieback Causal Agent. *MENDELU*, 47s.

CLEARY, M., DANIEL G., STENLID J., 2013. Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* 62, 1294–1301.

CORNIE, N.S., ZOLLER, S., RIGLING, D., 2014. Detection and genetic characterisation of a novel mycovirus in *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback. *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 28, December 2014, Pages 78-86

DAVYDENKO, K., VASAITIS R., STENLID J., MENKIS A., 2013. Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology* 43, 462–467.

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/>.

DRENKHAN, R., Hanso M., 2010. New host species for *Chalara fraxinea*. *New Disease Reports* 22, 16.

- DOUGLAS, G., RYAN, C., 2012. Situation with ash in Ireland: stand characteristics, health condition, ongoing work and research needs. In: Vasaitis R (ed.), Meeting program and abstracts of country presentations, COST Action FP1103 FRAXBACK 1st Management Committee / Working Group Meeting, 13–14 November 2012, Vilnius, Lithuania, pp. 24–25.
- DRENKHAN, R., HANSO, M., 2010. New host species for *Chalara fraxinea*. *New Dis. Rep.* 22. 16.
- DUFOUR, S., PIÉGAY, H., 2008. Geomorphological controls of *Fraxinus excelsior* growth and regeneration in floodplain forests. *Ecology*. 89. 205–215.
- ENDERLE, R., PETERS F., NAKOU A., METZLER B., 2013. Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. *European Journal of Forest Research* 132, 865–876.
- EUFORGEN, 2009. Distribution map of Common ash (*Fraxinus excelsior*). Available at: http://www.euforgen.org/distribution_maps.html [10.04.2014].
- EUROPEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION, 2010. *Chalara fraxinea*, AshDieback. Available at: http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/fungi/Chalara_fraxinea.htm.
- FORESTRY COMMISSION, 2005. Using Chemicals in the Forest. Operational Guidance Booklet. 15. <http://www.opsi.gov.uk/click-use/index>.
- FORESTRY COMMISSIONS, 2013. National Forest Inventory (NFI) survey of the incidence of *Chalara fraxinea* infection of ash (*Fraxinus excelsior*) in Great Britain. Available at: [http://www.forestry.gov.uk/pdf/NFI_survey_of_incidence_of_Chalara_fraxinea_infection_of_ash.pdf/\\$FILE/NFI_survey_of_incidence_of_Chalara_fraxinea_infection_of_ash.pdf](http://www.forestry.gov.uk/pdf/NFI_survey_of_incidence_of_Chalara_fraxinea_infection_of_ash.pdf/$FILE/NFI_survey_of_incidence_of_Chalara_fraxinea_infection_of_ash.pdf) [10.03.2014].
- FREINSCHLAG, C., 2013. Untersuchungen zum Eschentriebsterben in Eschen-Samenplantagen in Österreich [Investigations Enderleon ash dieback in ash seed plantations in Austria]. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Austria, Master thesis, 110 [+18] pp.

- FRIVOLD, L., 1994. Trær i kulturlandskapet [Trees in the cultural landscape]. Landbruksforlaget, Oslo, Norway, 224 pp.
- HALMSCHLAGER, E., KIRISITS T., 2008. First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology* 57, 1177.
- HAUPTMAN, T., et al., 2013. Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method O. Holdenrieder. *Forest Pathology*. 43.
- 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* 6, 302–308.
- HUSSON, C., SCALA, B., PASCAL, C., PASCAL, O., FREY, N., 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France *Eur J Plant Pathol* (2011) 130: 311–324 DOI 10.1007/s10658-011-9755-9
- HUSSON, C., CAËL, O., GRANDJEAN, JP., NAGELEISEN, LM., MARCAIS, B., 2012. Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathology* 61, 889–895.
- GROSS, A., et al., 2012. Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal genetics and biology*. 49. 977–86.
- GROSS, A., GRÜNIG CR., QUELOZ V., HOLDENRIEDER O., 2012. A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology* 42, 252–264.
- GROSS, A., et al., 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular plant pathology*. 15. 5–21.
- GROSS, A., HOSOYA T., QUELOZ V., 2014. Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Molecular Ecology* 23, 2943–2960.
- KEßLER M., CECH TL., BRANDSTETTER M., KIRISITS T., 2012. Dieback of ash (*Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*) in Eastern Austria: Disease development on monitoring plots from 2007 to 2010. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 4, 223–226.

- KIRISITS, T., HALMSCHLAGER, E., 2008. Eschenpilz nachgewiesen [Ash fungus detected. In German.]. Forstzeitung 2, 32–33.
- KIRISITS, T., MATLAKOVA, M., MOTTINGER-KROUPA, S., HALMSCHLAGER, E., 2008. Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Österreich? Forstschutz Aktuell, Wien, (43): 29-34.
- KIRISITS, T., CECH, T., 2009. Beobachtungen zum sexuellen Stadium des Eschentriebsterben-Erregers *Chalara fraxinea* in Österreich. Forstschutz Aktuell. 48. 21–25.
- KIRISITS, T., MATLAKOVA, M., MOTTINGER-KROUPA, S., CECH, T., L., HALMSCHLAGER, E., 2009. The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. Proceedings of the Conference of IUFRO Working. 97–119.
- KIRISITS, T., MATLAKOVA, M., MOTTINGER-KROUPA, S., HALMSCHLAGER, E., LAKATOS, F., 2010. *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). Plant Pathol. 59.411.
- 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 4, 230–235.
- KIRISITS, T., DÄMPFLE L., KRÄUTLER K., 2013. *Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and displays slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media. Forest Pathology 43, 386-389.
- KOPINGA J., DE VRIES S, 2012. Ash dieback in the Netherlands. In: Vasaitis R (ed.), Meeting program and abstracts of country presentations, COST Action FP1103 FRAXBACK 1st Management Committee/Working Group Meeting, 13–14 November 2012, Vilnius, Lithuania, pp. 28–30.
- KOWALSKI, T., ŁUKOMSKA, A., 2005. Studies on *Fraxinus excelsior* L. dieback in Włoszczowa Forest Unit stands. Acta Agrob. 59. 429–440.
- KOWALSKI, T., 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. For. Path. 36: 264-270.

- KOWALSKI, T., Holdenrieder, O. 2008. Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa. [A new fungal disease of ash in Europe]. Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen, 159, č. 3, s. 45 - 50.
- KOWALSKI, T., HOLDENRIEDER, O. 2009: The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology*, 39: 304-308.
- KOWALSKI, T., BARTNIK, C., 2010. Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. *Acta Agrobot.* 63. 99–106.
- KOWALSKI, T., SCHUMACHER J., KEHR R., 2010. Das Eschensterben in Europa – Symptome, Erreger und Empfehlungen für die Praxis [Ash dieback in Europe – symptoms, causes and prognosis]. In: Dujesiefken D (ed.), *Jahrbuch der Baumpflege 2010*. Haymarket Media, Braunschweig, Germany, pp. 184–195.
- KRÄUTLER, K., & KIRISITS, T. 2012. The ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is associated with leaf symptoms on ash species (*Fraxinus* spp.). *Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 4: 261–265.
- LYGIS, V., BAKYS, R., GUSTIENE, A., BUROKIENE, D., MATELIS, A., VASAITIS, R., 2014. Forest self-regeneration following clear-felling of dieback-affected *Fraxinus excelsior*: focus on ash. *European Journal of Forest Research* 133, 501–510.
- MARTINEK, v., 2012. Vliv stresu na vývoj fytofágů břízy. *MENDELU*, 111s.
- MATLAKOVA, M., 2009. Untersuchungen zum gegenwärtigen Zurücksterben der Eschen [Studies on the current ash dieback]. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Austria, Master thesis, 73 pp.
- MCKINNEY, L., V., NIELSEN, L., R., HANSEN, J., K., KJAER, E., D., 2011. Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. *Heredity.* 106. 788–797.
- MCKINNEY, L., V., NIELSEN, L., R., COLLINGE, DB., THOMSEN, IM., HANSEN, JK., KJÆR, ED., 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology* 63, 485–499.

- PAUTASSO, M., AAS G., QUELOZ V., HOLDENRIEDER O., 2013. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – a conservation biology challenge. *Biological Conservation* 158, 37–49.
- PEARSON, M., BEEVER, R., BOINE, B., ARTHUR, K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 10. 115-128.
- PRZYBYL, K., 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology* 32, 387–394.
- 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: 17–34.
- QUELOZ, V., GRÜNIG C., BERNDT R., KOWALSKY T., SIEBER T., HOLDENRIEDER O., 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *For. Path.* 41 (2011) 133–142.
- ROLOFF, A., PIETZARKA, U., 2010. *Fraxinus excelsior* Linné, 1753. In: Roloff A, Weisgerber H, Lang U & Stimm, B (eds.), *Bäume Mitteleuropas. Von Aspe bis Zirbel-Kiefer. Mit den Portraits aller Bäume des Jahres von 1989 bis 2010.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland, pp. 159–173. [In German].
- SANSFORD, C., 2013. Pest Risk Analysis for *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorph *Chalara fraxinea*) for the UK and the Republic of Ireland. Forestry Commission. Available at: <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/hymenoscyphusPseudoalbidusPRA.pdf> [13.08.2014].
- SCHUMACHER, J., WULF, A., LEONHARD, S., 2007. Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Eschen. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 59 (6): 1–3.
- SCHUMACHER, J., KEHR R., LEONHARD S., 2010. Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology* 40, 419–429.

- SCHUMACHER, J., 2011. The general situation regarding ash dieback in Germany and investigations concerning the invasion and distribution strategies of *Chalara fraxinea* in woody tissue. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 41, 7–10.
- SKOVGAARD, J., THOMSEN I., SKOVGAARD I., MARTINUSSEN T., 2010. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *For. Path.* 40 (2010) 7–18.
- STEINBÖCK, S., 2013. Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in Norway: Phenology and etiology of leaf symptoms and ascospore dispersal distances. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Austria, Master thesis, 120 pp.
- STENER, L., 2012. Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 28: 205–216.
- SVENNING, J., C., SKOV, F., 2007. Ice age legacies in the geographical distribution of tree species richness in Europe. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 16, 234–245.
- TIMMERMANN, V., BØRJA I., HIETALA A. M., KIRISITS T., SOLHEIM H., 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 41, 14–20.
- TREŠTIC, T., MUJEZINOVIĆ O., 2013. Ash dieback in Bosnia and Herzegovina?! In: Vasaitis R., Cleary MR (eds.), Program and abstracts, COST Action FP1103 FRAXBACK 4th Management Committee Meeting and workshop ‘Frontiers in ash dieback research’, 4–6 September, Malmö, Sweden, 2013, pp. 30–31.
- ÚRADNÍČEK, L., et. al. 2009. *Dřeviny České republiky*. 2. Brno, přeprac. vyd. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce. 365 s. ISBN 978-808-7154-625.
- WANG, Z., BINDER, M., SCHOCH, C., JOHNSTON, P., SPATAFORA, J., HIBBETT, D., 2006. Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): a nuclear rDNA phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41. 295–312.
- ZHAO, Y., HOSOYA T., BARAL H.-O., HOSAKA K., KAKISHIMA M., 2012. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon* 122, 25–41.

ZHENG, H., ZHUANG, W., 2014. *Hymenoscyphus albidoides* sp. nov. and *H. pseudoalbidus* from China. *Mycological Progress* 13, 625–638.