

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA LESNICKÁ A DŘEVAŘSKÁ
KATEDRA OCHRANY LESA A
ENTOMOLOGIE**



**Zhodnocení rizikovosti ponechání nezpracovaného klestu
ve smrkových porostech z hlediska možného dozrávání a
uvolňování spor kloubnatky smrkové (*Gemmamyces
piceae*)**

Diplomová práce

Autorka: Bc. Radka Starová

Vedoucí: doc. Ing. Vítězslava Pešková Ph.D

2020 ČZU v Praze



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka práce:	Bc. Radka Starová
Studijní program:	Lesní inženýrství
Obor:	Lesní inženýrství
Vedoucí práce:	doc. Ing. Vítězslava Pešková, Ph.D.
Garantující pracoviště:	Katedra ochrany lesa a entomologie
Jazyk práce:	Čeština
Název práce:	Zhodnocení rizikovosti ponechávání nezpracovaného klestu ve smrkových porostech z hlediska možného dozrávání a uvolňování spor kloubnatky smrkové (<i>Gemmamyces piceae</i>)
Název anglicky:	Evaluation of the risk of leaving unprocessed branches in spruce forests from the perspective of possible ripening and release of <i>Cucurbitaria Bud Blight</i> (<i>Gemmamyces piceae</i>) spores
Cíle práce:	Cílem diplomové práce je posoudit možnost ponechání nezpracovaného klestu smrku ztepilého napadeného kloubnatkou smrkovou v porostech vzhledem k riziku následného šíření infekce na zdravé stromy.
Metodika:	Na třech lokalitách na území Lesů České republiky, s. p., lesní správy Litvínov budou v průběhu vegetační sezony opakovaně káceny vzorníky smrku ztepilého napadeného kloubnatkou smrkovou. Z pokácených stromů budou ihned odebrány pupeny napadené patogenem. Klest bude ponechán na místě a v měsíčních intervalech pak budou opakovaně odebrány nové vzorky z již ponechaného klestu. V laboratoři bude sledován vývoj spor z čerstvě pokácených stromů a z již ponechaného klestu. Dále budou odebrány vzorky infikovaných pupenů ze

stojících smrků zteplilých, na nichž bude rovněž zjišťována přítomnost konidií a askospor. Podle rozvoje spor bude stanoveno, zda je možné ponechávat klest s napadenými pupeny. V průběhu výzkumu bude pořizována fotodokumentace.

Doporučený rozsah práce: 50-60

Klíčová slova: Gemmamyces piceae, Picea abies, Picea pungens, houbový patogen, sporulace, konidie, askospora, klest

Doporučené zdroje informací:

1. Borthwick A. W. 1909. A new disease of Picea. Notes Roy. Botan. Garden, Edinburg, 4: 259-261.
2. Butin H. 1995. Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity trees. Oxford Univerzity Press, New York, Tokyo: 252.
3. Černý K., Pešková V., Soukup F., Havrdová L., Strnadová V., Zahradník D., Hrabětová M. 2016. Gemmamyces bud blight of Picea pungens: a sudden disease outbreak in Central Europe. Plant Pathology, 65 (8): 1267-1278.
4. Petrzik K., Kolonium I., Sarkisova T., Hrabáková L. 2016. Detection and genome sequence of a new betapartitivirus associated with Cucurbitaria piceae Borthw. fungus causing bud blight of spruce in the Czech Republic. Archives of Virology. Doi: 10.1007/s00705-015-2692-8.
5. Sinclair W., Lyon H. H. 2005. Diseases of Trees and Shrubs. Comstock Pub. Associates: 660.
6. Soukup F., Pešková V. 2009. Gemmamyces piceae (Borthw.) Casagr. kloubnatka smrková. Lesnická práce, 88 (12), Příloha: 1-4.
7. Yuan Z.-Q., Wang X.-W. 1995. A taxonomic study of fungi associated with spruce bud blight in China. Mycotaxon, 53: 371-376.
8. Zúbrik M., Kunca A., György C. et al. 2013. Insects and diseases damaging trees and shrubs of Europe. N. A. P. Éditions: 535.

Předběžný termín obhajoby: 2018/19 LS - FLD

Elektronicky schváleno: 6. 2. 2019
prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.
Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno: 8. 2. 2019
prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.
Děkan

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Zhodnocení rizikovosti ponechávání nezpracovaného klestu ve smrkových porostech z hlediska možného dozrávání a uvolňování spor kloubnatky smrkové (*Gemmamyces piceae*) vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Vítězslavy Peškové Ph.D a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. O vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne.....

Bc. Radka Starová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Vítězslavě Peškové, Ph.D. vedoucí mé diplomové práce za odborné vedení, vstřícnost, cenné rady, které mi pomohly při vypracování práce. LČR, s. p., LS Litvínov za umožněný a pomoc realizovat výzkum na jejich území. Děkuji i mé nejbližší rodině a přátelům za podporu, kterou mi poskytovali za podporu během celého studia. Mé díky patří i České zemědělské univerzitě v Praze za to, že mi umožnila se vzdělávat v oboru, který jsem si zvolila.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnocení rizika ponechání napadeného klestu smrku ztepilého (*Picea abies*) kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*).

Houba kloubnatka smrková se od počátku nového tisíciletí výrazně rozšiřovala v Krušných horách, zpočátku byla nacházena v porostech náhradních dřevin, které jsou tvořeny severoamerickým smrkem pichlavým (*Picea pungens*). Od roku 2015 se tento patogen začal rozšiřovat na autochtonním smrku ztepilém (*Picea abies*). Houba napadá pupeny, které zdeformuje, následně jim znemožní další růst a může dojít až k defoliaci koruny. U pupenů, které jsou infikovány, ale nejsou zcela porostlé plodnicemi může dojít k typickému vykloubení výhonu, který charakterizuje napadení stromů kloubnatkou smrkovou.

Výzkum probíhal na třech lokalitách na území Lesů České republiky, s. p., lesní správy Litvínov, kde byly opakovaně káceny vzorníky smrku ztepilého napadené kloubnatkou smrkovou. Z pokácených stromů byly ihned odebírány napadené pupeny. Klest byl ponechán na místě a v měsíčních intervalech pak byly opakovaně odebírány nové vzorky z již ponechaného klestu.

V laboratoři byl hodnocen rozvoj spor z čerstvě pokácených stromů a z již ponechaného klestu. Dále byly odebírány vzorky infikovaných pupenů ze stojících smrků ztepilých především z oblasti Krušných hor a dalších náhodných lokalit v rámci Česka, na nichž byla rovněž zjišťována přítomnost konidií a askospor. Podle rozvoje spor bylo stanoveno, zda je možné ponechávat klest s napadenými pupeny. Získané výsledky potvrdily, že nejvhodnější odstranění napadeného klestu je nejvhodnější před začátkem sporulace, tedy na začátku července až koncem září za účelem snížení infekčního tlaku.

Klíčová slova: *Gemmamyces piceae*, *Picea abies*, *Picea pungens*, houbový patogen, sporulace, konidie, askospora, klest

Abstract

The aim of this thesis was to evaluate the risk of leaving the infected brushwood spruce (*Picea abies*) spruce (*Gemmamyces piceae*).

Since the beginning of the new millennium, the fungus pathogen has been extensively spread in the Ore Mountains and was initially found in stands of substitute tree species consisting of North American blue spruce (*Picea pungens*). Now we are more likely to encounter our autochthonous Norway spruce. The fungal pathogen distorts buds after infection, thereby deforming them and consequently preventing them from growing further and the greatest risk is due to insufficient needle renewal. In buds that are infected but are not completely covered with fruiting bodies, the shoot is typically dislocated, which is characterized by spruce infestation.

The research was carried out at three localities in the territory of the Forests of the Czech Republic, p. P., The Litvínov Forest Administration and were repeatedly cut down by samplers of Norway spruce attacked by Norway spruce. The felled trees were immediately taken from buds attacked by arthropods. The brush was left in place and new samples were taken at monthly intervals from the brush.

In the laboratory, the development of spores from freshly felled trees and from already retained brushwood was monitored. In addition, infected buds were sampled from standing Norway spruces, which were also tested for conidia and ascospores. According to the development of spores it was determined whether it is possible to leave the brush with the infected buds. The obtained results confirmed that the most suitable removal of the infected forceps is the most suitable before the beginning of sporulation, ie at the beginning of July to the end of September in order to reduce the infectious pressure.

Keywords: *Gemmamyces piceae*, *Picea abies*, *Picea pungens*, fungal pathogen, sporulation, conidia, ascospores, brushwood

Obsah

1	ÚVOD	12
2	CÍL PRÁCE	14
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	14
3.1	Kloubnatka smrková – <i>Gemmamyces piceae</i>	14
3.2	Životní cyklus patogenu	16
3.3	Konidie a askospory patogenu	17
3.4	Monitoring kloubnatky smrkové	20
3.5	Metody uchování hub	23
3.6	Ponechávání těžebních zbytků v lese z hlediska sporulace a následného napadání stromů	26
4	METODIKA PRÁCE	28
4.1	Způsob odběru vzorků pupenů	29
4.2	Hodnocení napadení pupenů	32
4.3	Zpracování dat	33
5	VÝSLEDKY	35
5.1	Zhodnocení rizik ponechání nezpracovaného klestu ve smrkových porostech	35
5.2	Hodnocení sporulace kloubnatky smrkové na pupenech napadených smrků ztepilých	38
5.3	Hodnocení sporulace kloubnatky smrkové na pupenech napadených smrků pichlavých	38
6	DISKUZE	47
6.1	Rozšíření kloubnatky smrkové	47
6.2	Metody hodnocení použitých dat	48

7	ZÁVĚR.....	51
8	SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ	55
9	PŘÍLOHY	60

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obr. 1:	Místa prokázaného výskytu kloubnatky smrkové (převzato bez úprav z práce ZÝKA et al., (2018)	16
Obr. 2:	Přehledová mapa odběrů vzorků z živých stromů (2009-2019) a umístění klestu pro opakované odběry (2018, 2019) (zdroj podkladové mapy: ESRI et al., 2020)	28
Obr. 3:	Ponechaný klest smrku ztepilého napadeného houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Samek)	29
Obr. 4:	Ponechaný klest smrku ztepilého napadený houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Samek).....	30
Obr. 5:	Smrk ztepilý napadený houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Pešková)	31
Obr. 6:	Pupeny smrku ztepilého napadené houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Modlinger)	31
Obr. 7:	Plodnice houby <i>Gemmamyces piceae</i> na pupenu smrku ztepilého (Foto autorka).....	32
Obr. 8:	Červovité nepohlavní spory - konidie houby <i>Gemmamyces piceae</i> (mikroskop Nikon Eclipse Ci, 20x zvětšeno) - (Foto autorka)	33
Obr. 9:	Vřečka s askosporami houby <i>Gemmamyces piceae</i> (mikroskop Nikon Eclipse Ci, 20x zvětšeno) - (Foto autorka)	34

Obr. 10: Červovitá nepohlavní spora – konidie a Zd'ovitá pohlavní spora - askospora houby <i>Gemmamyces piceae</i> (mikroskop Nikon Eclipse Ci, 20x zvětšeno) - (Foto autorka).....	34
Obr. 11: Červovitá nepohlavní spora – konidie (20 x zvětšeno) - (Foto autorka).....	39
Obr. 12: Zd'ovitá pohlavní spora askospora kloubnatky smrkové (20 x zvětšeno) – (Foto autorka).....	39
Obr. 13: Zjištěný výskyt konidií na smrku ztepilém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt).....	41
Obr. 14: Zjištěný výskyt askospor na smrku ztepilém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt)...	41
Obr. 15: Porost smrků pichlavých napadených houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Pešková)	43
Obr. 16: Pupeny smrku pichlavého napadené houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Pešková)	44
Obr. 17: Zjištěný výskyt konidií na smrku pichlavém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt)...	46
Obr. 18: Zjištěný výskyt askospor na smrku pichlavém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt).....	46
Obr. 19: Klest se smrku ztepilého napadený houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Samek).....	60
Obr. 20: Pupeny smrku ztepilého napadené houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Pešková)	60
Obr. 21: Porost smrku pichlavého napadený houbou <i>Gemmamyces piceae</i> (Foto Pešková)	61
Obr. 22: Plodnice houby <i>Gemmamyces piceae</i> na pupenu smrku pichlavého (Foto Pešková)	62

Obr. 23: Červovitá nepohlavní spora – konidie (20 x zvětšeno) - Vyfoceno pod mikroskopem Nikon Eclipse Ci (Foto autorka) 62

Obr. 24: Zd'ovitá pohlavní spora askospora kloubnatky smrkové (20 x zvětšeno) – Vyfoceno pod mikroskopem Nikon Eclipse Ci (Foto autorka) 63

Obr. 25: Červovité konidie se zd'ovitými askosporami kloubnatky smrkové (20 x zvětšeno) –Fotografováno pod mikroskopem Nikon Eclipse Ci (Foto autorka)..... 63

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Tabulka se značením stupňů napadení..... 33

Tab. 2: Přehled sporulace kloubnatky smrkové z pokácených vzorníků v roce 2018, včetně odběrů z roku 2019..... 36

Tab. 3: Přehled sporulace kloubnatky smrkové z pokácených vzorníků v roce 2019..... 37

Tab. 4: Přehled sporulace kloubnatky smrkové na smrku ztepilém v roce 2015 a 2016 (konidie/askospory – slabý výskyt x, středně silný výskyt xx, silný výskyt xxx) 40

Tab. 5: Přehled sporulace kloubnatky smrkové na smrku pichlavém v roce 2015 a 2016 (konidie/askospory – slabý výskyt x, středně silný výskyt xx, silný výskyt xxx, velmi silný výskyt xxxx)..... 45

1 Úvod

Na počátku 21. století se v Krušných horách objevila pro lesnický sektor nová výzva. V rámci jednoho decennia došlo k rozšíření houby kloubnatky smrkové, která nenávratně poškodila porosty smrku pichlavého především v centrální části přírodní oblasti Krušné hory. Roku 2009 začaly být reportovány nálezy na domácím smrku pichlavém (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Míra poškození a počty napadených stromů od té doby výrazně rostly. Z důvodu klimatických změn a dalších stresových faktorů to může mít v budoucnu vážný dopad na produkci porostů. Vzhledem k závažnosti hrozby s šířením patogenu na smrku ztepilém Grantová služba, LČR, s. p. vypsal v roce 2016 projekt, který byl zaměřený na výzkum patogenu, fenologii a působení na fyziologii hostitele, tak na monitoring progresu napadání.

S kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*), která je významný houbový patogen jehličnatých dřevin, nejčastěji smrků se setkáváme v oblastech s vyššími srážkami a vyšší vzdušnou vlhkostí. Patogen je znám především z oblastí severní a severozápadní Evropy (Dánsko, Finsko, Německo, Rusko a Velká Británie – Skotsko) v střední, vzácně v jižní Evropě jsou nálezy spíše v horských oblastech (nálezy v České republice, Itálii, Rakousku a Švýcarsku) (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Houba byla platně popsána v roce 1909 ve Skotsku, kde ji A. W. Borthwick přiřadil do rodu *Cucurbitaria* Gray (1821) pod jménem *Cucurbitaria piceae*. Anamorfu (konidiové stadium) popsal ruský badatel N. A. Naumov, který se intenzivně této patogenní houbě věnoval, jako *Megaloseptoria mirabilis* Naumov (1925) (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009).

Osobní motivací pro výběr tématu diplomové práce bylo, že lesnictví a lesy neustále stojí před velkými výzvami týkajícími se změn ze strany hmyzích škůdců, houbových patogenů a v neposlední řadě člověka. Tímto výzkumem bych ráda přispěla k rozšíření znalostí využitelných pro lesnickou praxi.

2 Cíl práce

S ohledem na šíření kloubnatky smrkové na území České republiky i s ohledem na potenciální nebezpečí pro domácí i introdukované druhy smrku je nyní věnována pozornost lesnickému hospodaření v napadených a ohrožených porostech. Cílem této práce je přispět k tomuto výzkumu zhodnocením rizikivosti ponechání klestu napadeného smrku ztepilého v porostech vzhledem k riziku následného šíření na zdravé stromy. Pro splnění tohoto hlavního cíle byly provedeny odběry napadených pupenů a bylo provedeno vyhodnocení výskytu spor v laboratoři. Dílčím cílem práce bylo obohatit dosavadní data o fenologii patogenu. Data o výskytu spor získaných v rámci zpracování vzorků byla agregována s dosavadními zjištěními a bylo vytvořeno schéma vývoje v průběhu roku.

3 Literární rešerše

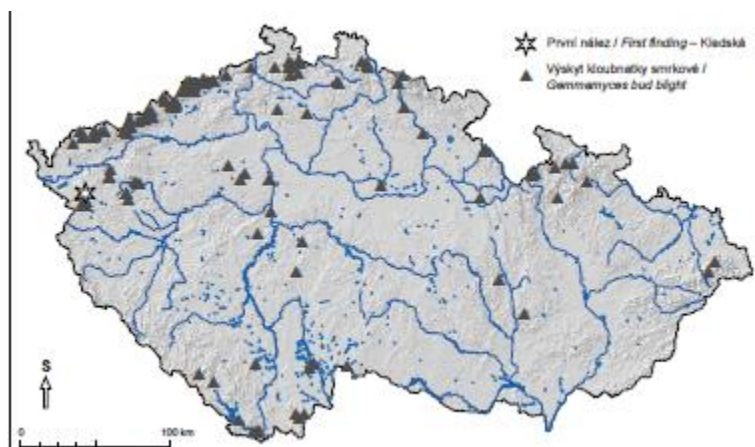
3.1 Kloubnatka smrková – *Gemmamyces piceae* (Borth.) Casagrande

Kloubnatka smrková *Gemmamyces piceae* (syn.: *Cucurbitaria piceae* BORTHW., anamorfa *Megaloseptoria mirabilis* NAUMOV) je v současném taxonomickém pojetí řazena mezi vřekovýtrusné houby řádu Pleosporales, čeledi Melanommatacea (JAKLITSCH et al., 2017). Borthwick ji poprvé popsal roku 1909 jako *Cucurbinata picea* (BORTHWICK, 1909). V této práci jsou rovněž uvedena nejstarší doložená napadení kloubnatou smrkovou na smrku *Picea pungens* var. *glauca* v Abercairney (Perthshire, Skotsko) z roku 1906. Anamorfní stádium *Megaloseptoria mirabilis* bylo popsáno v roce 1925 (NAUMOV, 1925). Vazba mezi oběma stádii byla potvrzena Casagrandem při experimentálním výzkumu roku 1969 (CASSAGRANDE, 1969). Na podkladě jeho práce byla kloubnatka smrková zařazena do nového rodu *Gemmamyces*. Patogen náleží spíše k chladnomilným druhům, který se vyskytuje především v lokalitách s vysokými srážkami a trvale vysokou vlhkostí. Šíření je pravděpodobně vázáno na periody deštivého počasí (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Původní domovinou kloubnatky je východní Asie. Výskyt byl popsán v pohoří Ťan-šan na *Picea schrenkinana*, vyskytuje se zde také jediný zástupce rodu *Gemmamyces*, *Gemmamyces piceicola* na *P. schrenkinana* (YUAN a WANG, 1995). V současné době se patogen šíří v dalších zemích, výskyt byl zaznamenán v evropských zemích – Česká republika, Dánsko, Finsko, Irsko, Rakousko, Rusko, Spojené království Velké Británie a Severního Irsku, Slovinsko, Švédsko, Švýcarsko (ČERNÝ et al. 2016).

Největší poškození byla zaznamenána v dánském Brorupu a v severoněmeckém Rostocku vždy na *Picea pungens*. Relativně časté bylo napadení na domácím *Picea abies*, ale poškození nebylo označeno za vážné (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Další výrazné poškození bylo registrováno v jihovýchodním Skotsku a v severní Anglii, kde patogen napadl 13 ploch starších *Picea abies* (REDFERN et al., 1997). V České republice poprvé o patogenu

kloubnatky smrkové informoval Köck v roce 1918, který zmiňuje, že podobné příznaky se na dřevinách vyskytly již v roce 1909. Köck ve své práci uvádí, že patogen mohl být introdukován s rostlinami importovanými z Německa a Nizozemí (KÖCK, 1918 in ČERNÝ et al., 2016). V České republice se houba objevuje na nepůvodních druzích smrku *Picea asperata* a *Picea engelmannii* a na hybridech *P. engelmannii* x *glauca*, *P. glauca*, *P. omorica*, *P. pungens*, *P. schrenkiana*, *P. sitchensis* (ČERNÝ et al., 2016; PEŠKOVÁ et al., 2016). Méně se vyskytuje na jedlích *Abies alba* a *Abies nordmanniana* (SOUKUP et PEŠKOVÁ, 2009). Ve vzorcích bazálního stromatu získaného z *Picea pungens* v Krušných a Orlických horách byl zjištěn mykovir rodu *Betapartitivirus* z čeledi Partitiviradea (PETRZIK et al., 2015). Vztah mezi kloubnatou a virem není dosud prozkoumán, není zřejmé, zda se jedná o symbionta či patogena. Výskyt kloubnatky smrkové byl v České republice opět hlášen na smrku pichlavém (*Picea pungens*) v roce 2008 (POSPÍŠIL a POSPÍŠIL, 2011). Následně došlo k dalšímu šíření. Hlavním ohniskem napadení byly Krušné hory, ale patogen se rovněž vyskytoval na Šumavě, Jizerských horách, Krušných horách, Orlických horách, Králickém sněžníku a v Jeseníkách (ČERNÝ et al., 2016). Od roku 2013 bylo hlášeno napadení také na *P. pungens* (PEŠKOVÁ a SOUKUP, 2013).

Kromě České republiky bylo šíření kloubnatky v posledních letech hlášeno také na Aljašce. WINTON (2017) uvádí, že na většině ploch zde byly stromy napadené jen mírně (do 5 % pupenů), ale vyskytly se i jedinci s napadením 100 % pupenů. Šetření později ukázalo, že v některých případech se nejednalo pouze o *G. piceae*, ale také o *Camarosporium* sp. a *Dichomera gemmicola*.



Obr. 1: Místa prokázaného výskytu kloubtnatky smrkové (převzato bez úprav z práce ZÝKA et al., 2018)

3.2 Životní cyklus patogenu

Životní cyklus patogenu je poměrně komplikovaný a má pravděpodobně dvouletý vývoj (ČERNÝ et al., 2016). Pro úspěšné šíření patogenu je nutný soulad s přírodními podmínkami, protože nepříznivé podmínky šíření tlumí nebo dokonce zamezí. Napadení pupenů v prvním roce se projeví na přelomu jara a léta jako pokrytí hnědým pavučinovým krytím, později se vytvoří, tuhé černé bazální stroma (ŠEFL, 2013). Záhy se od konce jara, resp. začátkem léta na napadeném odumřelém pupenu vytváří plodnice anamorfního stádia (pyknidy), poté, plodnice telomorfního stádia (perithecium) (PEŠKOVÁ a ČÍŽKOVÁ, 2015). Při pokusu o vyrašení dochází u napadených pupenů často k viditelným deformacím („vykloubení“) (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Plodnice teleomorfního stádia, které produkují askospory se obvykle tvoří na stejném místě, jako pyknidy, většinou na přelomu léta a podzimu (PEŠKOVÁ et al., 2016). Pokud je v koruně stromů počet napadených a odumřelých pupenů více než $\frac{3}{4}$, a to několik let po sobě, dojde následně k vyrašení spících pupenů. Tyto pupeny jsou rovněž napadeny a zasychají, strom přestává rašit, neobnovuje svůj asimilační aparát a odumírá (PEŠKOVÁ a ČÍŽKOVÁ, 2015). PEŠKOVÁ a SOUKUP (2013) ve své práci uvádějí, že v Krušných horách při terénním průzkumu se podařilo nalézt fertilní plodnice

obsahující konidie i askospory. Tato skutečnost se shoduje s publikovanou informací ČERNÝ et al. (2016), který uvádí, že teleomorfy se vyvíjí následující rok po napadení a produkci konidií. Infikování pupenů může být způsobeno jak konidiemi, tak askosporami (CASAGRANDE, 1969, SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Konidie jsou produkovány celou vegetační sezónou, ale na jednotlivých stanovištích je obvyklé, že pouze krátkou dobu (PEŠKOVÁ et al., 2016). Vrcholná sporulace konidií dle terénních šetření byla v roce 2015 koncem července a askospor v srpnu (ČERNÝ et al., 2016). Šíření konidií je pravděpodobně způsobeno rozstříkáním dešťových kapek. V malé míře pohybem živočichů, zvláště bezobratlých. Askospory jsou charakterizovány poměrně tlustými stěnami, proto dokáží přežívat v nehostinných podmínkách a jsou šířeny především větrem. Sporulace vrcholí v létě, tedy k největšímu napadení dochází v tomto období, ale nelze vyloučit ani jarní napadení z důvodu nově vyrostlých jarních pyknid. Patogen může přežít ve formě mycelia ve tkáni pupenů (DAEBELER, 1968 in ČERNÝ et al., 2016) nebo je možné, že přežívá za šupinami pupenů v podobě askospor (ČERNÝ et al., 2016). Patogen může růst v periodách teplých zim, ale jeho růst je pomalý, protože optimální teplota růstu je 13–18 °C, to znamená, že patogen má psychrofilní povahu (ČERNÝ et al., 2016).

3.3 Konidie a askospory patogenu

Stejně jako ostatní zástupci řádu Ascomycetes se kloubnatka smrková vyznačuje výskytem dvou typů spor, které vyrůstají ve dvou typech plodnic. Plodnice anamorfního stadia – pyknidy – produkují konidie a plodnice teleomorfního stadia produkují askospory.

Pyknidy kloubnatky smrkové jsou duté, malé černé uzavřené plodnice ve které vznikají konidie. Velikost pyknid se pohybuje okolo 400 μm - 600 μm s kruhovitým otvorem, který má průměrnou velikost 40 μm – 60 μm . Stěny pyknid bývají silné 35 μm – 55 μm , jsou tvořeny 8 – 12 tenkostěnnými vrstvami hnědými buňkami (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009).

Konidie, jsou mitospory vzniklé nepohlavním způsobem tvořena na konci hyf (fialidách), které jsou na konidioforu (nosiči) (SHOEMAKER, 1967). Konidie lze obecně dělit:

a) podle barvy: dematiové x hyalinní.

b) podle tvaru: amerospory, didymospory, phragmospory, dictyospory, scolecospory, helicospory, staurospory.

c) podle způsobu vzniku: konidiogeneze.

Konidie se vyskytují prakticky celou sezonu, ale výskyt askospor je omezen převážně na konec léta a podzim (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). Podle (PEŠKOVÁ a ČÍŽKOVÁ, 2015) jsou konidie i askospory schopny infikovat výhony s právě se utvářejícími pupeny. (PEŠKOVÁ a MODLINGER, 2015) uvádí, že pokud je infekce silná a opakuje se po více letech, je možné napadení prakticky všech pupenů.

Dle výše uvedeného dělení lze konidie kloubnatky smrkové klasifikovat podle barvy a tvaru. Konidie kloubnatky smrkové jsou žluté barvy s rozměry 220 – 315 x 5 – 7 μm s 31 – 46 μm velkou přepážkou v intervalu 7 – 14 μm s mírnou úzkostí na povrchu a zaoblenými konci se zkosenou bází. Uvnitř plodnic nalezneme tenkovrstvé hyalinní palisádovitě uspořádané konidiofory o velikosti 8 – 15 μm . Hyfa je houbové vlákno, které tvoří plodnice a mycelium (SHOEMAKER, 1967). Konidie kloubnatky smrkové jsou hyalinní a scolecospory.

SHOEMAKER (1967) uvádí, že perithecium je typ plodnice lahvicovitého nebo kulovitého tvaru. Obvykle je vnořen do stromatu. Výtrusy se z peritecia dostávají úzkým otvorem zvaným ostiol. Pokud se jedná o erysifální perithecium (kleistothecium), je primitivní obal naplněný vřecky (výtrusy) bez otevíracího aparátu, který se otevírá rozpadem stěny. Perithecium má na bazální části vřeka s výtrusy mezi nimi i sterilní buňky (parafýzy). U ústí vřeka se nachází sterilní buňky, vlákna (perifýzy), stroma (nosič). V peritheciu jsou často nacházeny pseudoparafýzy (SOUKUP et PEŠKOVÁ, 2009). Haploidní vlákna, která vnikají mezi vyvíjející se vřeka jsou pravé parafýzy. U perithecií nacházíme i další typy

vláken: vlákna vytvářející se v ostiolu jsou perifýzy a vlákna vyrůstající shora, která se tvoří dříve než vřecka jsou pseudoparafýzy.

SOUKUP a PEŠKOVÁ (2009) uvádí, že askospory jsou protáhlé kuželovité až vřetenovité mnohobuněčné výtrusy ve středu mnohdy zaškrčené s jednou podélnou přepážkou a s příčným zaškrčením, které je 5 – 8 x. Jsou to výtrusy tmavě hnědého zbarvení, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 35 – 50 x 12 – 15 μm . Vyskytují v bitunikátním kuželovitém vřecku o rozměrech 180 – 250 x 25 – 30 μm .

Důležitými vlastnostmi spor z hlediska rizikovosti šíření je jejich schopnost přežít. V souvislosti s kloubnatkou smrkovou nebyl doposud podobný výzkum publikován. U jiných druhů fytopatogenních organismů se ukazuje, že hlavními faktory pro přežití spor a jejich schopnost klíčit na hostiteli jsou podmínky prostředí. ROTEM a AUST (1991) publikovali studii, ve které srovnávali schopnost přežití u *Alternaria macrospora* Zimm., *Aspergillus niger* Tiegh., *Botrytis cinerea* Pers., *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Vesterg. a *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr v různých podmínkách, například ve tmě při teplotě 45 °C, vystavené slunečními záření nebo pod zdrojem UV záření. Testovali také vliv těchto faktorů na spory stále uložené ve stromatu a rovněž zda má v tomto případě vliv velikost vzorků. Výsledky ukázaly, několik závislostí, které lze považovat za obecné. Čím větší byla tloušťka tkáně, velikost shluku spor tím menší vliv byl vnějších podmínek. Samostatné spory tak měly vždy větší úmrtnost než spory ještě uložené v plodnicích. Potom, co byla infikována hostitelská tkáň snížil se opět vliv vnějších podmínek na přežití. Pro přežití spor lze tak za nejrizikovější považovat období od uvolnění ze sporokarpu po průnik do hostitele. Studie ROTEM a AUST (1991) ukázala, že sledované druhy vydrží oslunění nebo osvit UV zdrojem záření v nejodolnějším případě několik dní (*A. rolfsii*) a v případě nejnáchylnější *B. cinerea* pouze několik minut. Přestože zatím nebyla publikována práce podrobněji se zabývající přežitím spor kloubnatky smrkové lze předpokládat, že negativní působení slunečního záření se bude platné i pro její spory. Autoři ROTEM a AUST (1991) uvádí příklady studií, které

prokázali vliv barevné pigmentace na přežití na slunci. Vzhledem k barvě plodnic kloubnatky smrkové lze konstatovat, že spory uložené v pyknidech a periteciích budou dobře chráněny proti slunečnímu záření.

3.4 Monitoring kloubnatky smrkové

Zvýšená pozornost začala být kloubnatce smrkové věnována od roku 2008, kdy bylo detekováno pracovníky Ústavu pro hospodářskou úpravu lesů (ÚHÚL) v rámci terénního šetření výrazné zhoršení zdravotního stavu smrku pichlavého v některých lokalitách Krušných hor (POSPÍŠIL a POSPÍŠIL, 2011).

Po tomto zjištění se sledováním patogenu začal zabývat Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti (VÚLHM, v. v. i.) a v roce 2009 vyšel první článek o kloubnatce smrkové od doby jejího útlumu výskytu ve druhé polovině 20. století (SOUKUP a PEŠKOVÁ, 2009). V práci autorů je uvedeno, že se kloubnatka vyskytuje nejvíce na lokalitách s trvale vyššími srážkami a trvalou vzdušnou vlhkostí. Článek vychází z poznatku, že výskyt ve střední a jižní Evropě je hlášen z vyšších nadmořských výšek. Vlastní šetření neprokázalo preferenci lokalit na *Picea pungens* podle stáří, expozice či nadmořské výšce. Téměř žádný rozdíl nebyl zaznamenán ani mezi přehoustlými nebo rozvolněnými porosty.

V roce 2011 na semináři Škodliví činitelé v lesích Česka, Průhonice prezentovali POSPÍŠIL a POSPÍŠIL (2011) referát o kloubnatce smrkové. Stupně poškození stromů rozdělili do dvou fází. Bylo zjištěno, že v počáteční fázi jsou napadeny spodní části koruny do 1/2 - 2/3, přičemž špička stromu má normální barvu i větvení. V pokročilé fázi byl napaden celý strom s patrným výrazným prosvětlením koruny, kdy větvení nemá standardní tvar. Silně poškozený strom se nachází ve fázi pokročilého napadení, které zasahuje až k vrcholu a má poškozeno 90 – 100% pupenů.

V roce 2008 bylo provedeno pomocí této stupnice hodnocení šetření na 85 plochách v lesních hospodářských celcích (LHC) Červený Hrádek, Litvínov a Telnice. Poškození bylo zjištěno na 74 plochách (stupeň 1 34 %, stupeň 2 13 % a stupeň 3 40 %). V roce 2010 bylo šetření zopakováno na 36 stejných plochách a dále na 203 odlišných plochách na LHC Klášterec, Červený Hrádek, Jezeří, Košťany, Litvínov, Telnice. Městské lesy Jirkov a Městské lesy Chomutov.

Autoři se mimo jiné věnovali také hledisku geografickému a porostnímu vlivu na napadení smrku pichlavého. Největší výskyt napadených stromů byl na rovinách a vrcholech. Největší množství poškozených stromů bylo ve třetím stupni v oblastech s výskytem mlhy 90 – 120 dní (12 %), u prvního stupně bylo největší poškození zaznamenáno v oblastech s výskytem mlhy 120 – 150 dní (27 %), v obou oblastech byl shodný druhý stupeň poškození (8 %). V oblastech, kde byl výskyt mlhy kratší než 90 dní bylo poškození ve všech stupních pouze 2 %, nad 150 dní u všech stupňů jen 7 %. V práci POSPÍŠIL a POSPÍŠIL (2011) je dále uvedeno, že faktorem pro vznik poškození by mohly být vysoké srážky a vysoká vzdušná vlhkost nad vrstevnicí 700 m, to jsou místa, kde oblačnost často dosahuje až k zemi. Detekcí napadení bylo určeno těžiště v třetím věkovém stupni u mladších i starších porostů a podíl napadených jedinců byl nižší. Hodnocení napadení dle expozice daného stanoviště neprokazovalo existenci trendu nebo vzorce napadení.

Roku 2013 pokračovali PEŠKOVÁ a SOUKUP (2013) v monitorování rozšíření a škod způsobených kloubnatkou na *Picea pungens*.

Hodnocení bylo prováděno v letech 2009 – 2013 ve 20 porostech na LS Litvínov a 14 na LS Klášterec. U jednotlivých porostů bylo na třiceti jedincích hodnocena intenzita napadení stromů kloubnatkou smrkovou. V některých porostech v průběhu hodnocení již docházelo k rekonstrukcím porostů. Situace se postupně zhoršovala na obou lesních správách, jak uvádí PEŠKOVÁ a SOUKUP (2013) na LS Litvínov bylo poškození silnější. V roce 2013 se míra poškození na LS Klášterec nad Ohří přiblížila poškození LS Litvínov.

Šetření bylo rovněž zaměřeno i na napadení smrku ztepilého, v roce 2013 byly nalezeny pouze jednotlivé napadené pupeny a silně napadené stromy byly pouze dva. Jeden strom byl nalezen na LS Klášterec a druhý strom na LS Litvínov. Monitoring za rok 2014 je shrnut v práci PEŠKOVÁ a SOUKUP (2015). Monitorování *Picea pungens* bylo rozšířeno na 24 porostů LS Litvínov a 15 porostů LS Klášterec. Z výsledků vyplynulo, že došlo k mírnému zlepšení na *Picea pungens*, ale k nárůstu napadených stromů *Picea abies*. V práci ZAHRADNÍK et al. (2014) je uvedeno, že *Gemmamyces piceae* významně poškodila cca 50 % ploch náhradních porostů *Picea pungens*. Roku 2016 informuje PEŠKOVÁ et al. (2016) o postupujícím nárůstu napadení na smrku ztepilém. Hodnocení probíhalo ve 49 porostech (LS Klášterec nad Ohří a LS Litvínov) hodnoceno 1427 jedinců pomocí stupnice o 5 kategorií:

- 0. kategorie** - bez napadení
- 0. kategorie** - napadeny jednotlivé pupeny maximálně 1 větev
- 1. kategorie** - napadení do 1/3 koruny
- 2. kategorie** - napadení do 2/3 koruny
- 3. kategorie** - strom napaden z více než 2/3 a objevuje se počínající defoliace

Po tomto zhodnocení napadení bylo zjištěno, že 48 % stromů vykazovalo známky napadení: kat. 1. – 320 stromů (22 %), kat. 2. – 244 stromů (17 %), kat. 3. – 99 stromů (7 %), kat. 4. – 24 stromů (2 %).

Výzkumy rovněž ukázaly, že vyšší procento napadených pupenů *P. abies* se nachází ve vrcholových partiích koruny stromů. Tím se liší od *P. pungens*, kdy byly patogenem primárně napadány spodní partie koruny PEŠKOVÁ et al. (2016). V roce 2016 byl uveřejněn článek ČERNÝ et al. (2016), kde jsou shrnuty dosavadní znalosti o této houbě. Výzkumy rozsahu napadení na smrku ztepilém pokračovaly i v následujících letech (PEŠKOVÁ a SOUKUP; 2016; PEŠKOVÁ et al., 2016; MODLINGER a PEŠKOVÁ (2017).

3.5 Metody uchování hub

Na počátku výzkumu byla věnována pozornost i metodám izolace hub za účelem získání čistých kultur. V rámci zpracování a vyhodnocování vzorků z Krušných hor byla proto zahájena izolace patogenu kloubnatky smrkové z infikovaných pupenů. V současné době probíhají opakovaná kultivace pro získání čisté kultury.

Podle SMITH et ONIONS (1994) je nejběžnější metodou uchovávání hub je **subkultivace**, která pracuje na principu, že živá kultura je uchovávána na agarovém živném mediu a po vyčerpání živin v mediu dochází k přeočkování na čerstvé medium uchovávané většinou při nižších teplotách. Metoda je výhodná díky své dostupnosti a levnosti, ale nevýhodná ve své krátkodobosti, nutnosti přeočkování, možnosti ztráty vlastní kultury, možnosti kontaminace ze vzduchu a roztočů.

Ve svém díle SMITH et ONIONS (1994) zmiňuje další poměrně často využívaná metodu uchovávání kultury na **šikmém agaru pod parafinovým olejem**. Kultura po svém nárůstu na šikmém agaru je přelita sterilním minerálním olejem. Metoda je poměrně levná, odpadá kontaminace roztoči, dlouhodobá životnost uchovávaných kultur, možnost využití u druhů, které netolerují jiný způsob uchovávání. Avšak i tato metoda má své nevýhody, a to možnost kontaminace sporami ze vzduchu, možnost změn vlastností kultury během uložení a problém při oživování kultur.

Zřídka užívanou metodou je podle SMITH et ONIONS (1994) **metoda ve sterilním písku**. Suspenze spor je naočkována do sterilního písku, po inkubaci se uchovává při teplotách v rozmezí 4 – 7 °C. Metoda je levná, eliminuje infekce způsobené roztoči a je možné opakované přeočkování z 1 konzervy. Naproti tomu má možnosti změn vlastností u některých druhů nebo nízké tolerance tohoto způsobu uchování a riziko kontaminace při přeočkování.

Málo využívanou metodou je v díle SMITH et ONIONS (1994) **metoda ve sterilní půdě**. Suspenze spor se naočkuje do sterilní půdy a po inkubaci je

uchovávána při teplotách v rozmezí 4 – 7 °C. Metoda je levná, eliminuje infekce způsobené roztoči s možností opětovného přeočkování. Nevýhodná je v tom, že má možnosti změny vlastností u některých druhů nebo nízké tolerance k jejich uchovávání a rizikovost kontaminace při přeočkování.

SMITH et ONIONS (1994) také zmínil metodu s malým využitím, a to **metodu ve sterilní vodě**. Kousky agarového media s živou kulturou jsou uchovávány ve sterilní destilované vodě. Výhody má pouze v tom, že se jedná o levnou metodu. Malé využití je z důvodu, že je vhodná jen pro některé skupiny hub a není vhodná pro dlouhodobé uchovávání.

Snadno použitelnou, ale málo využívanou metodou je SMITH et ONIONS (1994) zmíněna **metoda na alginátových peletech**. Suspenze spor se smíchává s alginátem a otrubami a poté se kape do roztoku CaCl₂ a vytváří se tam peletky, které se uchovávají v chladničce při teplotě 4 – 7 °C nebo v mrazničce při -20 °C. Výhodná levná metoda s opětovným přeočkováním z 1 konzervy s nevýhodou možné změny vlastností u některých druhů, hodí se především pro druhy vytvářející spory.

HUBÁLEK (1996) zmínil forma **zamražených disků z kultur mikroorganismů** která je snadná, ale málo používaná. Z kultury rostoucí na agarovém mediu jsou vykrajovány disky, které se uchovávají v lahvičkách v mrazničce. Výhodná levná metoda pro svoji levnost, možného opakovaného vyočkování z 1 konzervy a využití i u druhů nevytvářející spory. Malá využitelnost je připisována pro možnost změny vlastností u některých druhů, možnost kontaminace při skladování, nebezpečí snížení životaschopnosti při opakovaném ohřívání (až rozmrazování) při vyočkování.

Standartní metodou v kvalitních sbírkách je podle HUBÁLEK (1996) **lyofilizace**. Metoda pracuje na principu sušení, během kterého ze zmražené suspenze spor nebo buněk je odpařována voda ve vakuu, riziko poškození lyofilizovaných buněk snižuje přídavek ochranného media – sušené mléko nebo

inositol. Uchováváme v ampulích nebo lahvičkách tzv. penicilínkách. Spolehlivě ochraňuje před kontaminací, poměrně dlouhá životnost kultur, snadná distribuce lyofilizátů. Nedostatkem je, že je vhodná jen u hub pouze pro sportující kmeny, pro některé kultury nevhodná, technicky náročnější, možnost genetických změn.

HUBÁLEK (1996) ještě zmínil **forma kryokonzervace uložení při – 70 °C** pracuje na principu adsorpce buněčné suspenze na povrchu skleněných kuliček nebo korálků v hlubokomrazícím boxu. Výhody spočívají v jednoduchosti, rychlosti a možnosti opětovného vyočkování z 1 konzervy. Nevýhodná je ve finanční náročnosti u počátečního uložení, riziku kontaminace při vyočkování a nutnosti nepřetržitého mražení.

Forma kryokonzervace kapalným dusíkem je v díle HUBÁLEK (1996) optimální metoda dlouhodobého uchovávání v kapalném dusíku při teplotě – 196 °C. Kultura je pozvolně ochlazována na cílovou teplotu, čímž je eliminováno riziko poškození buněk rychlým zchlazením, ukládáme přímo do kapalného dusíku nebo do par tohoto plynu. Materiál následně ukládáme do polyetylenových slámek, skleněných a polyetylenových ampulí. Metoda je výhodná pro využívání u širokého spektra mikroorganismů včetně těch, které nesnášejí jiné metody uchovávání (např. lyofilizaci). Zajistí dlouhodobé přežívání buněk se zachováním vysoké životaschopnosti, bez nutnosti pasážování kultur a podstatně omezí riziko kontaminace. Genotyp a fenotyp zůstává stabilní, zachování původních fyziologických, biochemických a dalších vlastností. Kvalitně uskladní typové a patentové kmeny a zajistí primokultury (izobáty z původních zdrojů). Avšak velkou nevýhodou je pravidelné dodávání kapalného dusíku a s tím souvisí i vysoké finanční a materiálové náklady. V neposlední řadě s tím souvisí zdravotní rizika při práci, a to vznik omrzlin, anoxie, exploze skleněných ampulí a kontaminace obsahu kryokonzervací nádob.

3.6 Ponechávání těžebních zbytků v lese z hlediska sporulace a následného napadání stromů

Autoři článku BRENT W. OBLINGET et al., (2011) se zabývali řešením problematiky napadení z těžebních zbytků ve vztahu k *Diplodia pinea* (Desm.) J.J. Kickx. Onemocnění způsobené tímto patogenem je označované jako prosychání výhonů borovic. *D. pinea* je významná houba, která způsobuje rozsáhlá poškození. Podobnost s kloubnatkou je v tom, že také napadá více druhů jehličnanů, ale na rozdíl od kloubnatky jde o druhy borovic, kdežto kloubnatka napadá smrky a méně často jedle. Rod *Diplodia* může na svém hostiteli stejně jako kloubnatka přetrvávat bez vyvolání symptomů. *D. pinea* produkuje pyknidy a sporuluje vně nebo uvnitř mrtvých hostitelských orgánů jako jsou šišky, jehličí, kmeny a je šířena opadem na rozdíl od kloubnatky, která spory uvolňuje výlučně do prostoru a je šířena dešťovými kapkami.

V metodice je uvedeno, že byl proveden výzkum sazenic nebo zbytků dřeva ponechaných po sklizni na plantážích borovice smolné (*Pinus resinosa*) na veřejných i soukromých půdách roku 2007 centrálního a západně centrálního Wisconsinu. U každé plně zásobené plantáže byly vybrány exempláře borovic smolné ve věku 55 – 75 let a v těsné blízkosti jejich zbytků byly vysazeny semenáčky. Jak uvádí MORAN a HOPKINS (2002) klima v této oblasti je vlhké kontinentální s nízkou až střední úrovní srážek, teplými léty a chladnými zimami. CURTIS, 1959 uvedl, že studovaná místa byla na rovinatém nebo mírně svažitém terénu s nadmořskou výškou větší než 400 m.

Jedna nebo dvě pyknidy *D. pineae* z různých míst byly umístěny do mikrocentrifugačních zkumavek s 0,5 ml PDB obsahující ampicilin (100 mg / l) a zkumavky byly poté inkubovány při pokojové teplotě po dobu 7–10 dní. DNA byla extrahována podle postupu SMITH a STANOSZ (1995) a druhy rodu *Diplodia* byly stanoveny pomocí druhově specifických PCR primerů (SMITH and STANOSZ, 2006). Tyto PCR primery pomáhají při rozlišování mezi *D. pinea*, *D. scrobiculata* a určitými jinými druhy Botryosphaeria (BRENT W. OBLINGET et al., 2011).

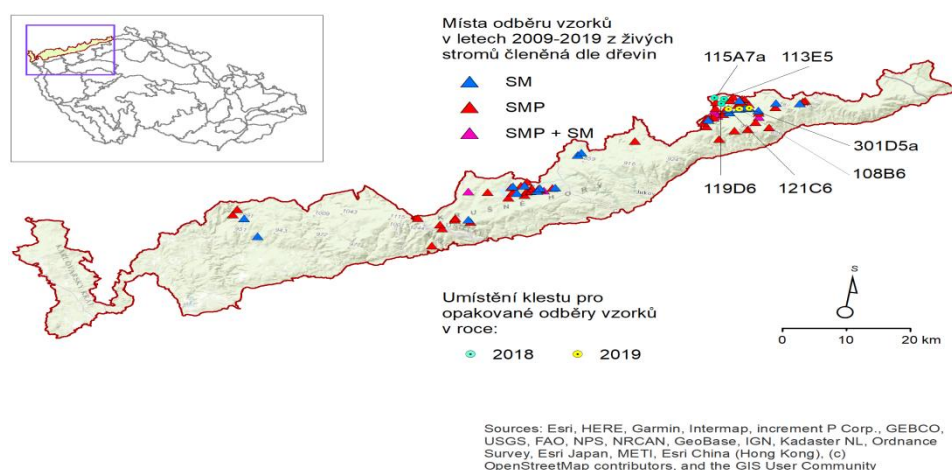
Výzkum probíhal na lokalitě Adams country (okres ve státě Pensylvánie) na šesti stanovištích na stromech vysazených 3 roky před výzkumem. Na každé plantáži bylo vybráno 10 libovolných živých nebo mrtvých sazenic. Podle PUNITHALINGAM a WATERSON, (1970) byly sazenice vyšetřeny na přítomnost pyknid rodu *Diplodia*. Konidie, které se shodovaly s *D. pinea* a *D. scrobiculata* byly poté identifikovány složeným mikroskopem (BRENT W. OBLINGET et al., 2011).

Na pěti plantážích byly třikrát za podzim sbírány těžební zbytky roku 2007 a začátkem léta roku 2008 a podzimu 2008 přibližně 6, 12 a 18 měsíců po těžbě. Začalo se libovolně na každé plantáži. Libovolně vybrané zbytky z borovice byly rozděleny do 4 bodů a to tak, že jeden ke každému světovému směru. Byly shromážděny kmeny, kůra z větví o průměru 2,5 cm, jehličí a stonky výhonků. Toto rozdělení se dále rozčlenilo na to, které přišlo do kontaktu s půdou a které nikoliv. Následně vše bylo rozděleno do papírových sáčků. Sáčky byly převezeny do laboratoře, kde byly uloženy ve tmě v ochranné atmosféře. Na podzim roku 2008 (když výše uvedené vzorky byly odebírány přibližně 18 měsíců po sklizni), byly také vzorky odebrané z plantáží ve větších intervalech po sklizni. Bylo jich šest sklizeno o 2–3 roky dříve a sklizeno šest plantáží o 4–5 let dříve. Byly nalezeny dílčí vzorky a byly shromážděny materiály a uloženy do zpracování, jak je popsáno výše (BRENT W. OBLINGET et al., 2011).

Patogen *D. pinea* byl jediným druhem zjištěný u mladších stromů plantáže na pěti místech, které přinesly výsledky nejméně pro jeden rod: *Diplodia*. *D. pinea* byla detekována z převážné většiny testovaných vzorků a pouze jeden vzorek obsahoval *D. scrobiculata*. Tento výsledek byl z jednoho kmenu a jehlic shromážděných nad zemí.

4 Metodika práce

Předmětem diplomové práce bylo vyhodnocení ponechaného klestu smrku ztepilého na třech lokalitách na území LČR, s. p., lesní správy Litvínov revír Český Jiřetín. Během vegetační sezony od 25. 7. do 30. 9. 2018 byly opakovaně káceny vzorníky smrku ztepilého napadené kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*). Jednalo se o 3 porosty 115A7a, 119D6, 113E5. Po pokácení stromů byly ihned odebrány větve s pupeny napadené kloubnatkou. Zbývající klest byl následně na jednotlivých lokalitách ponechán a odebírán v opakovaných měsíčních intervalech. Nové vzorky byly vyhodnocovány z již ponechaného klestu. V laboratoři byl sledován vývoj spor z čerstvě pokácených stromů a z již ponechaného klestu. Dále byly odebrány vzorky infikovaných pupenů ze stojících stromů smrku, na nichž byla rovněž zjišťována přítomnost konidií a askospor. Podle rozvoje spor bylo stanoveno, zda je možné ponechávat klest s napadenými pupeny. Nové vzorníky byly káceny roku 2019 v porostech 121C6 (C9), 108B6, 301D5a v období od 25. 7. do 20. 11.



Obr. 2: Přehledová mapa odběrů vzorků z živých stromů (2009-2019) a umístění klestu pro opakované odběry (2018, 2019) (zdroj podkladové mapy: ESRI et al., 2020)

4.1 Způsob odběru vzorků pupenů

V měsíčních intervalech byly opakovaně odebírány napadené větve z kácených vzorníků nemocných stromů. Z každého stromu byla odebrána větev s napadenými pupeny a následně označena. Po odebrání a označení byly větve transportovány do laboratoře, kde byly následně zpracovány. Z každé větve bylo odebráno 10 až 20 napadených pupenů a preparační jehlou odebrány plodnice, ty byly následně přeneseny na podložní sklíčko, kde byly následně rozdrčeny tupým koncem preparační jehly. Vzorek byl rozkapán destilovanou vodou a následně překryt krycím sklíčkem. Tyto jednorázové vzorky byly následně hodnoceny pod mikroskopem. Každá větev byla zpracovávána 1 hodinu až 2 hodiny podle množství a velikosti napadených pupenů, kde z každého pupenu byl vytvořen 1 vzorek. V roce 2018 bylo celkově vyhodnoceno 34 vzorků a roku 2019 60 vzorků.



Obr 3: Ponechaný klest smrku ztepilého napadeného houbou *Gemmamyces piceae* (Foto Samek)



Obr. 4: Ponechaný klest smrku ztepilého napadený houbou *Gemmamyces piceae* (Foto Samek)



Obr. 5: Smrk ztepilý napadený houbou *Gemmamyces piceae* (Foto Pešková)



Obr. 6: Pupeny smrku ztepilého napadené houbou *Gemmamyces piceae* (Foto Modlinger)



Obr. 7: Plodnice houby *Gemmamyces piceae* na pupenu smrku ztepilého (Foto autorka)

4.2 Hodnocení napadení pupenů

K vyhodnocení sporulace patogenu byl použit stereomikroskop Olympus SZ 61 a optický mikroskop Olympus BX 41 se zvětšením 10x – 20x a byly stanoveny 3 úrovně množství výskytu konidií a askospor (Tab. 1).

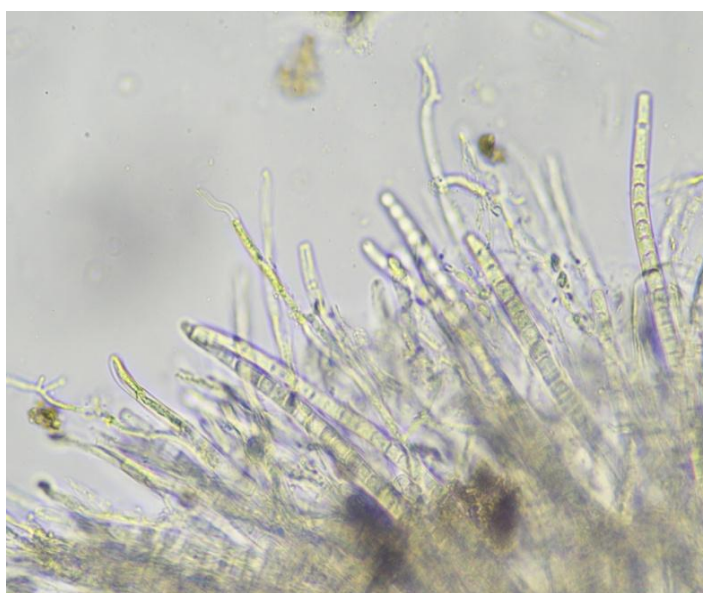
V mé diplomové práci bylo mikroskopováno 34 vzorků za rok 2018 a 60 vzorků za rok 2019. Bylo hodnoceno zhruba 380 pupenů za rok 2018 a zhruba 640 pupenů za rok 2019, s tím, že z každého vzorku bylo odebráno povětšinou 10 pupenů, ale v některých případech, zvláště pokud byl daný vzorek silně napaden patogenem, tak jsem vyhodnotila 20 pupenů z daného vzorku. Vzorky nebyly barveny žádným barvivem, byly pouze rozkapány destilovanou vodou.

Tab. 1: Tabulka se značením stupňů napadení

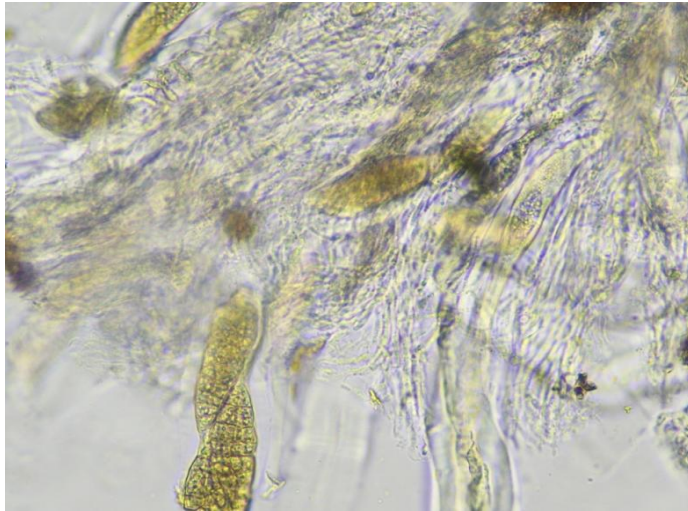
1. stupeň X	slabé napadení
2. stupeň XX	střední napadení
3. stupeň XXX	silné napadení
4. stupeň XXXX	velmi silné napadení

4.3 Zpracování dat

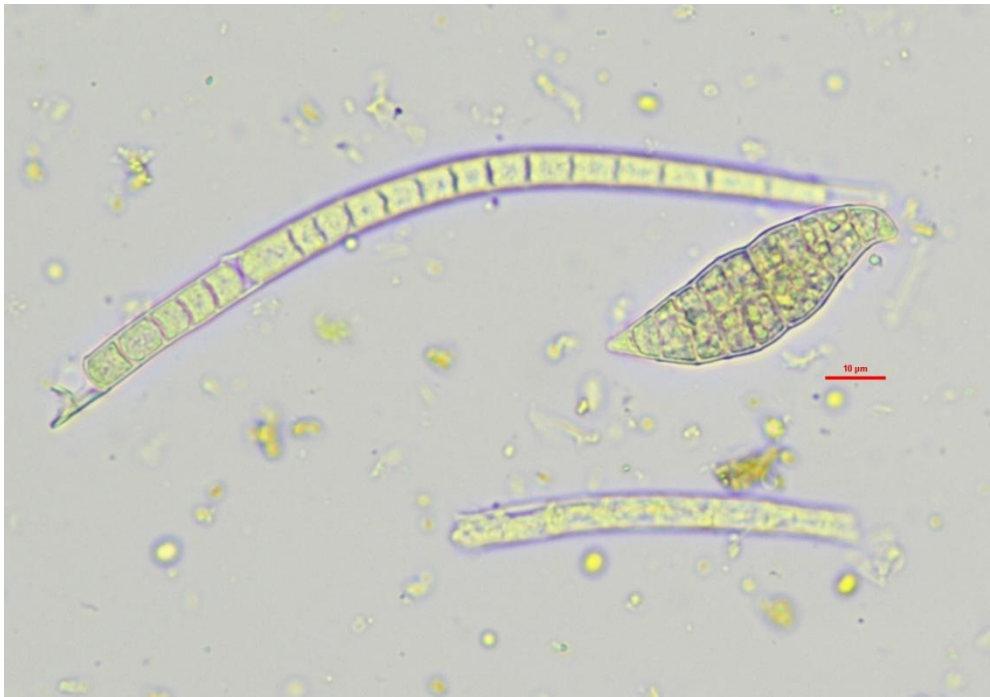
Při práci v laboratoři byla jednotlivá data zapisována do sešitu a posléze průběžně zanášena do počítače. Ke zpracování dat byl použit Microsoft Office Excel 2007, kde byly vytvářeny jednotlivé tabulky, které jsou uvedena v kapitole Výsledky. Následně byly pořizovány fotografie vybraných vzorků za využití mikroskopu Nikon Eclipse Ci, které jsou uvedeny v kapitole Příloha.



Obr. 8: Červovité nepohlavní spory - konidie houby *Gemmamyces piceae* (mikroskop Nikon Eclipse Ci, 20x zvětšeno) - (Foto autorka)



Obr. 9: Vřečka s askosporami houby *Gemmamyces piceae* (mikroskop Nikon Eclipse Ci, 20x zvětšeno) - (Foto autorka)



Obr. 10: Červovitá nepohlavní spora – konidie a zdřovitá pohlavní spora - askospora houby *Gemmamyces piceae* (mikroskop Nikon Eclipse Ci, 20x zvětšeno) - (Foto autorka)

Výsledky

Tato kapitola obsahuje vyhodnocení výsledků odebíraného klestu smrku ztepilého a infikovaných pupenů smrku pichlavého ve zmíněných lokalitách a zhodnocení fenologických údajů pořízených průběžným desetiletým monitoringem, který je prováděn specialisty ČZU v Praze a pracovníky VULHM, v. v. i.

5.1 Zhodnocení rizik ponechání nezpracovaného klestu ve smrkových porostech

Na ponechaném klestu v roce 2018 a 2019 byly konidie zjišťovány v měsíčních intervalech od pokácení stromů. Následně po dvou i čtyřech měsících od založení klestu tj. i na odběrech z listopadu 2018. Ze získaných výsledků sporulace kloubnatky smrkové v roce 2018 vyplývá, že stromy pokácené v červenci, v srpnu a září 2018 vyprodukovaly slabý, středně silný až silný výskyt konidií. Kontrola klestu po roce od pokácení (19. 9. 2019) prokázala slabý až středně silný výskyt konidií na klestu z kácení v červenci a srpnu 2018 (Tab. 2). U všech třech vzorníků byl zjištěn slabý výskyt askospor v měsíci kácení vzorníků. Na klestu byly askospory ve slabém počtu zjištěny i jeden, dva i čtyři měsíce od pokácení. Produkce spor (konidie, askospory) byla největší od července do září, jak na čerstvě pokácených stromech, tak na klestu.

Tab. 2: Přehled sporulace kloubnatky smrkové z pokácených vzorníků v roce 2018, včetně odběrů na ponechaném klestu v roce 2019 (konidie/askospory – slabý výskyt x, středně silný výskyt xx, silný výskyt xxx).

č.porostu/vzorník	Datum kácení	25.07.2018 konidie	25.07.2018 askospory	21.08.2018 konidie	21.08.2018 askospory	28-30.09.2018 konidie	28-30.09.2018 askospory	02.11.2018 konidie	02.11.2018 askospory	14.11.2019 konidie	14.11.2019 askospory
115A7a											
I/1	25.07.2018	x	x	xx	x			x	x	nic	nic
I/2	21.08.2018	/	/			xx	x	nic	x	nic	nic
I/3	28.09.2018	/	/	/	/	xx	xx	x	x	nic	nic
119D6											
II/1	25.07.2018	xxx	x	xxx	xx	xxx	x	nic	x		
II/2	21.08.2018	/	/			xx	xx	x	x		
II/3	29.09.2018	/	/	/	/	xx	x	xx	nic		
113E5a											
III/1	25.07.2018	xx	x	xxx	xx	xx	nic			nic	nic
III/2	21.08.2018	/	/			xxx	xx	x	x	nic	nic
III/3	30.09.2018	/	/	/	/			x	nic	nic	nic

Na čerstvě pokácených stromech v roce 2019 byl zjištěn silný výskyt konidií v červenci a září, středně silný a slabý výskyt konidií na čerstvě pokácených stromech v srpnu a září (Tab. 3). V rámci jednoho porostu byl zjištěn slabý výskyt konidií v listopadovém odběru u čerstvě pokáceného smrku. Na ponechaném klestu byl slabý výskyt konidií zjištěn po jednom i dvou měsících. Při listopadovém odběru nebyly na ponechaném klestu zjištěny žádné konidie ani v jednom ze vzorků. Výskyt askospor byl zjištěn v měsíci kácení u všech třech vzorníků v červenci, srpnu a září ve slabém a středně silném stupni výskytu askospor. Na klestu jeden dva měsíce po kácení byly askospory ve slabém

množství rovněž potvrzeny. V listopadovém odběru v rámci jednoho porostu na čerstvě pokáceném smrku byl zjištěn slabý výskyt askospor. Největší produkce spor (konidie, askospory) byla zaznamenána v roce 2019 od července do září u čerstvě pokácených stromů i na klestu.

Tab. 3: Přehled sporulace kloubnatky smrkové z pokácených vzorníků v roce 2019 (konidie/askospory – slabý výskyt x, středně silný výskyt xx, silný výskyt xxx).

č.porostu/vzorník	Datum kácení	25.07.2019 konidie	25.07.2019 askospory	15.08.2019 konidie	15.08.2019 askospory	19.09.2019 konidie	19.09.2019 askospory	14.11.2019 konidie	14.11.2019 askospory
121C6									
	25.07.2019	xxx	x	x	x	x	x	nic	nic
	15.08.2019	/	/	nic	x	xx	nic	nic	nic
	19.09.2019	/	/	/	/	xx	xx	nic	nic
	14.11.2019	/	/	/	/	/	/	nic	nic
108B6									
	25.07.2019	xxx	xx	xxx	1 askospora	x	1 askospora	nic	nic
	15.08.2019	/	/	xx	nic	x	xx	nic	nic
	19.09.2019	/	/	/	/	x	xx	nic	2 askospory
	14.11.2019	/	/	/	/	/	/	nic	nic
301D5a									
	25.07.2019	xxx	x	x	x			nic	nic
	15.08.2019	/	/	xx	x	nic	4 askospory	nic	nic
	19.09.2019	/	/	/	/	xxx	xx	2 konidie	2 askospory
	14.11.2019	/	/	/	/	/	/	x	x

5.2 Hodnocení sporulace kloubnatky smrkové na smrku ztepilém z vývrátů a zlomů

V časovém období 2016 – 2019 byly odebírány vzorky napadených pupenů smrku ztepilého. Z celé oblasti Krušných hor bylo celkem odebráno 59 vzorků, a to většinou z LS Litvínova a Klášterec. Odběry probíhaly od března do listopadu, s jedním odběrem v lednu 2019. Jednalo se o vzorky napadených pupenů z ležících větví většinou z vývrátů či zlomů smrků v důsledku silných větrů. Vzorky byly ve fytopatologické laboratoři vyšetřovány a byla u nich stanovena přítomnost spor (konidie, askospory) a jejich kvantifikace (slabý výskyt, středně silný, silný). Přítomnost spor byla prokázána na 25 vzorcích z 59 vzorků. Konidie byly na pupenech nacházeny v období od března do srpna se silným výskytem v červenci, u pupenů vrcholového zlomy porostu 111E8 (LS Litvínov, Český Jiřetín) byl zjištěn silný výskyt konidií v březnu 2019, rovněž na pupenech při lednovém odběru v porostu 111E8 2019 byl potvrzen středně silný výskyt konidií. V průběhu tří let byl silný výskyt zaznamenán od května do srpna.

5.3 Hodnocení sporulace kloubnatky smrkové na pupenech napadených smrků ztepilých

Tabulka 4 ukazuje na rozsah napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou v letech 2015 a 2016 při odběrech ze stojících stromů z různých lokalit Česka. V roce 2015 na smrku ztepilém bylo provedeno 18 odběrů a v roce 2016 14 odběrů (Obr. 13 a 14). Z tabulky je patrné, že na smrku ztepilém je největší výskyt spor patogenu zaznamenán v období července 2015, a to ve stádiu konidií, kdežto askospory v tomto měsíci daného roku nebyly zaznamenány vůbec.

V měsíci srpnu roku 2015 byly askospory ve středně silném výskytu zaznamenány na smrku ztepilém, který se nacházel na Borové Ladě na Šumavě. V září roku 2015 byl zaznamenán slabý výskyt konidií u smrku na Klínovci a

Hoře Svatého Šebestiána bez výskytu askospor. Z tabulky je patrné, že nejsilnější výskyt konidií byl v červenci roku 2015, ale askospory nebyly vůbec. V srpnu roku 2015 konidie nebyly nalezeny, ale askospory ve středně silném výskytu ano.

V roce 2016 na smrku ztepilém byl zaznamenán středně silný výskyt a silný výskyt konidií v měsíci srpnu a výskyt askospor pouze dvakrát, a to jednou v slabém výskytu na SM 125 C6 a středně silném výskytu na SM 41B 06/01P. V měsících září a říjnu roku 2016 konidie a askospory zaznamenány nebyly.



Obr. 11: Červovitá nepohlavní spora – konidie (20 x zvětšeno) - (Foto autorka)



Obr. 12: Zd'ovitá pohlavní spora askospora kloubnatky smrkové (20 x zvětšeno) – (Foto autorka)

Tab. 4: Přehled sporulace kloubnatky smrkové na smrku ztepilém v roce 2015 a 2016 z odběrů různých lokalit Česka, především z Krušných hor (konidie/askospory – slabý výskyt x, středně silný výskyt xx, silný výskyt xxx).

Č.porostu/vzorník	Konidie červenec 2015	Askospory červenec 2015	Konidie srpen 2015	Askospory srpen 2015	Konidie září 2015	Askospory září 2015	Konidie srpen 2016	Askospory srpen 2016	Konidie září 2016	Askospory září 2016	Konidie říjen 2016	Askospory říjen 2016
SM 504 F28	xxx	nic										
SM 102 D3	xxx	nic										
SM 122 D2a	xxx	nic										
SM 129 D4	xxx	nic										
SM 417 C4	0 Siroccocus	nic										
SM 128 B1	xxx	nic										
SM 404 D4a	xxx	nic										
SM 107 E4	xx	nic										
SM 101 C3a	xxx	nic										
SM 224 B3	xxx	nic										
SM 123 C3a	xxx	nic										
SM 416 B7/1p	xxx	nic										
SM 417 D2a	xxx	nic										
SM ŠUMAVA BORO VÁ LADA			nic	xx								
SM KLÍNOVEC					x	nic						
HORA SV ŠEBESTIÁNA					x	nic						
SM LS KLÁŠTEREC					nic	nic						
SM 116 E04							xx	nic				
SM 116 E05								0	nic			
SM 312 A06							xxx					
SM 417 B07							xxx					
SM 408C							xxx					
SM 125 C6								0	x			
SM 104 C5							xxx		0			
SM 111 C 3/2/1b								0	0			
SM 184 C 6/4/1R							xxx		0			
SM 41B 06/01P					nic	nic	xx	xx				
SM 306 A6							nic	nic	nic	nic		
SM 113 B5a											nic	nic
SM 403 D2/1											nic	nic



Obr. 13: Zjištěný výskyt konidií na smrku ztepilém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt)



Obr. 14: Zjištěný výskyt askospor na smrku ztepilém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt)

5.4 Hodnocení sporulace kloubnatky smrkové na pupenech napadených smrků pichlavých

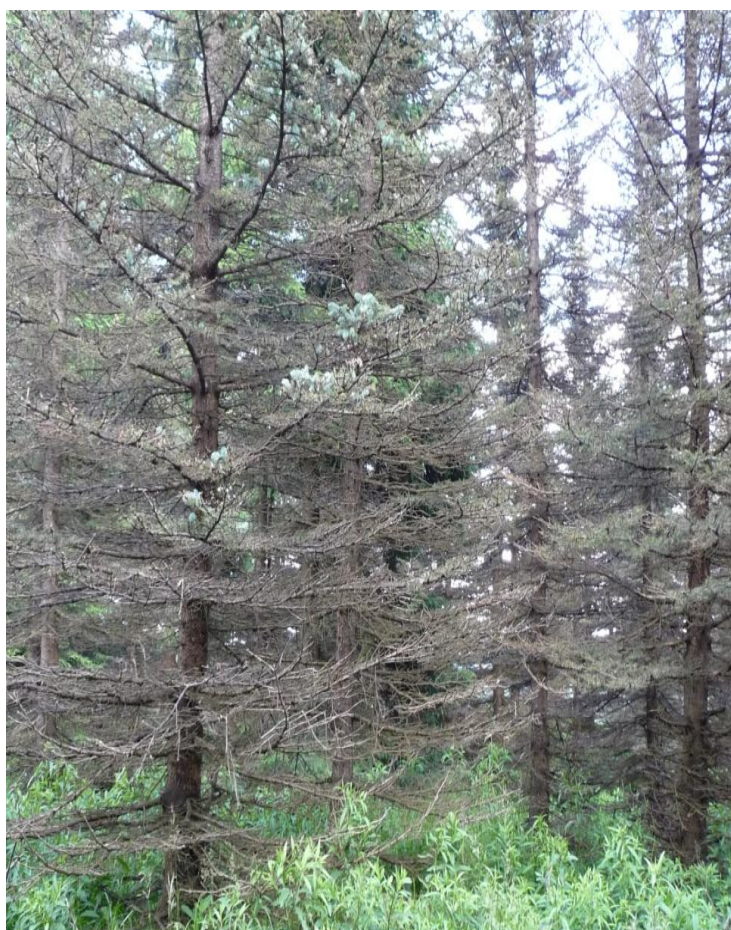
Tabulka 5 ukazuje na výskyt spor napadených smrků pichlavých kloubnatkou smrkovou v letech 2015 a 2016. Roku 2015 proběhlo 22 odběrů a roku 2016 8 odběrů. V tabulce 5 je rovněž prokázáno, že k produkci spor kloubnatky smrkové docházelo o měsíc dříve než u smrku ztepilého (Obr. 15 a 16).

V měsíci červnu roku 2015 jsme zaznamenali slabý, středně silný, silný a v jednom případě dokonce velmi silný výskyt konidií konkrétně na vzorcích SMP pocházející z Krásné Lípy, ale nález konidií byl nulový. V červenci 2015 jsme našli silný výskyt konidií na pupenech smrku pichlavého, ale askospory opět žádné, konkrétně na Strnadech, SMP 122 D2a, SMP 129 C2, SMP 105 D3, SMP 160 B3, SMP 419 D2a a SMP 276 C2. Konidie byly rovněž nalézány v silném výskytu i v srpnu bez výskytu askospor. V září byl prokázán pouze jeden slabý výskyt konidií i askospor na smrku pichlavém konkrétně ve Vyšším Brodě Hrudkov.

Roku 2016 v srpnu byl prokázán středně silný a jeden silný výskyt konidií bez askospor. Silný výskyt byl na SMP 314 B5. V září 2016 byl zaznamenán středně silný výskyt konidií bez askospor na SMP Malá Hraštica a silný výskyt konidií bez askospor na SMP Krušné hory. V říjnu 2016 konidie a askospory prokázány nebyly.

V tabulce 5 je rovněž prokázáno, že k produkci konidií kloubnatky smrkové dochází o měsíc dříve než u smrku ztepilého. V měsíci červenci roku 2015 není prokázána žádná askospora na smrku pichlavém stejně jako u smrku ztepilého. Oproti tomu byly konidie smrku pichlavého nacházeny v silném počtu v měsíci srpnu 2015, ale u smrku ztepilého tento měsíc nebyly nalezeny vůbec.

V měsíci září roku 2015 byl nalezen ve dvou případech slabý výskyt konidií a askospor u smrku pichlavého, ale u smrku ztepilého jen slabý výskyt konidií a askospory žádné. V roce 2016 v srpnu u smrku pichlavého byl prokázán jednou silný výskyt a dvakrát střední výskyt konidií bez askospor, ale u smrku ztepilého ve stejný měsíc byl prokázán pětkrát silný výskyt a dvakrát střední výskyt konidií, ale na rozdíl od smrku pichlavého jedenkrát slabý a jedenkrát střední výskyt askospor. V měsíci září roku 2016 byly konidie u smrku pichlavého prokázány jednou v silném a jednou ve středním výskytu bez přítomnosti askospor. Na smrku ztepilém v září roku 2016 nebyly prokázány konidie ani askospor. V měsíci říjnu roku 2016 na smrku pichlavém nebyly prokázány konidie ani askospor stejně jako v případě smrku ztepilého.



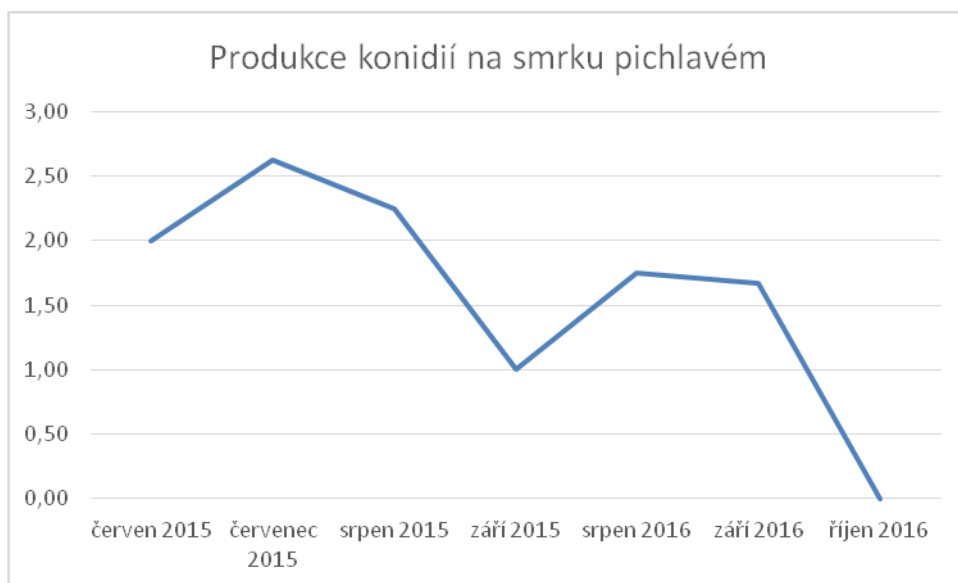
Obr. 15: Porost smrků pichlavého napadený houbou *Gemmamyces piceae* (Foto Pešková)



**Obr. 16: Pupeny smrku pichlavého napadené houbou *Gemmomyces piceae*
(Foto Pešková)**

Tab. 5: Přehled sporulace kloubnatky smrkové na smrku pichlavém v roce 2015 a 2016 z různých lokalit Česka, především z Krušných hor (konidie/askospory – slabý výskyt x, středně silný výskyt xx, silný výskyt xxx, velmi silný výskyt xxxx).

č.porostu/vzorník	Konidie červen 2015	Askospory červen	Konidie červenec 2015	Askospory červenec 2015	Konidie srpen 2015	Askospory srpen 2015	Konidie září 2015	Askospory září 2015	Konidie srpen 2016	Askospory srpen 2016	Konidie září 2016	Askospory září 2016	Konidie říjen 2016	Askospory říjen 2016
RYBNÍČEK SMP	x	nic												
NOVÁ VES SMP	xxx	nic												
PŘÍSEČNICE SMP	xxx	nic												
KRÁSNÁ LÍPA SMP	xxxx	nic												
ČETÍN ODBOČ. SMP	neuvolněné	nic												
KŘIVNOV SMP	xx	nic												
ČETÍN ODB. II SMP	x	nic												
HORA SV. ŠEBESTIÁNA SMP	xxx	nic												
MALÁ HROŠTICE SMP	xxx	nic												
STRNADY			xxx	nic										
STRNADY SMP			nic	nic										
SMP 122 D2a			xxx	nic										
SMP 129 C2			xxx	nic										
SMP 105 D3			xxx	nic										
SMP 160 B3			xxx	nic										
SMP 419 D2a			xxx	nic										
SMP 276 C2			xxx	nic										
M. HRAŠTICE SMP					xxx	nic								
STRNADY SMP					xxx	nic								
M. HRAŠTICE SMP					0	nic								
STRNADY SMP					xxx	nic								
VYŠŠÍ BROD HRUDKOV							x	x						
SMP 116 E05									xx	nic				
SMP 312 A05									xx	nic				
SMP 125 C7									nic	nic				
SMP 314 B5									xxx	nic				
MALÁ HRAŠTICE SMP											xx	nic		
KRUŠNÉ HORY SMP											xxx	nic		
MALÉ HRAŠTICE SMP											nic	nic	nic	nic
MALÁ HRAŠTICE SMP														



Obr. 17: Zjištěný výskyt konidií na smrku pichlavém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt)



Obr. 18: Zjištěný výskyt askospor na smrku pichlavém ve sledovaném období (0 – žádný výskyt, 1 – slabý výskyt, 2 – střední výskyt, 3 – silný výskyt)

6 Diskuze

6.1 Rozšíření kloubnatky smrkové

Výzkumy PEŠKOVÁ et SOUKUP (2013) uvádí, že kloubnatka smrková je nejvýznamnější houbový patogen na smrku pichlavém v Krušných horách. Výskyt patogenu od roku 2013 byl také zaznamenáván v porostech smrku ztepilého. Příčinou velkého rozšíření patogenu kloubnatky může být dlouhodobé imisní zatížení Krušných hor a také nepříznivé půdní a klimatické podmínky, které mohou ovlivnit zdárný růst dřevin. PEŠKOVÁ a MODLINGER (2014) uvádí, že v Krušných horách i přes pokles imisního impaktu jsou porosty náhradních dřevin trvale stresovány a zvýšené infekci houby nedokáží vzdorovat, a to dokládá rozvoj kloubnatky na smrku pichlavém. Rovněž výsledky mého výzkumu ukazují na silnou sporulaci patogenu na smrku pichlavém v měsíci červnu a červenci v Krušných horách, které vede k rozšiřování houby na další jedince. Podle PEŠKOVÁ a MODLINGER (2015) v roce 2014 docházelo k nárůstu počtu stromů, které vykazovaly vyšší podíl napadení, hlavně na LS Litvínov. PEŠKOVÁ et al., (2019), poukazují v oblasti Krušných hor na nejvyšší napadení jedinců od nadmořské výšky 700 – 850 m a s rostoucí nadmořskou výškou se množství napadených jedinců snižuje. BAŤA (2018) ve své práci uvedl vztah mezi nadmořskou výškou a vliv na napadené stromy neprokázal. Objevil ale dva rozdíly, první rozdíl v nadmořské výšce 700 – 750 m n. m. a druhý okolo 900 m n. m., kde se změnil maximální stupeň napadení. Předpoklad, že větší poškození kloubnatkou hrozí stromům stresovaných suchem, jak uvádí PEŠKOVÁ et al., (2019) ve výzkumu v Krušných horách, že v letech 2017 – 2018 došlo k výraznému zvýšení podílu napadených stromů. KNÍŽEK et al., (2016) uvedl, že z hlediska regionálního rozložení je nejhorší situace na LS Litvínov. Zde byla kloubnatka smrková zjištěna na smrku pichlavém a následně smrku ztepilém.

Výzkumy, které řeší problematiku ponechávání těžebních zbytků na místě, z hlediska infekce nového hostitele uvádí např. u patogenu *Diplodia pinea* (OBLINGER et al. 2011), že konidie mohou být přítomny 6 až 18 měsíců po těžbě,

jejich klíčivost se sice snižuje, avšak mohou být klíčení schopné i do 5let po ponechání těžebních zbytků. Klíčivost a možná infekce spor závisí na řadě dalších faktorů, jako je průběh počasí, zda jsou plodnice v kontaktu s půdou nebo na hromadě klestu atd. To koresponduje s výsledky našich hodnocení sporulace na ponechaném klestu, kde jsme zjistili, že houba obsahuje konidie i po jednom až dvou měsících ve slabém výskytu. Poslední listopadový odběr ponechaného klestu už žádné konidie neprokázal. Askospory byly prokázány po jednom, dvou, ale i čtyřech měsících na ponechaném klestu ve slabém výskytu.

6.2 Sporulace patogenu na pupenech smrku pichlavého a smrku ztepilého

Z našich výsledků vyplývá, že u smrku pichlavého skutečně dochází k produkci konidií kloubnatky smrkové o měsíc dříve než u domácího smrku ztepilého. Toto je potvrzeno i v práci PEŠKOVÁ et SOUKUP (2013). ZÝKA et al. (2018) ve své práci uvádí, že na smrku pichlavém se na pupenech pyknidy objevují v průběhu června, a v červenci dochází k maximální produkci konidií, která se postupně do září snižuje. Naše výsledky na smrku ztepilém ukazují na silný výskyt konidií i v září. V našich odběrech byly askospory detekovány rovněž od dubna do srpna se silným výskytem v červnu a červenci. Při lednovém odběru v roce 2019 v porostu 111E8 na vrcholovém zlomu byl nalezen sporadický výskyt askospor.

U smrku pichlavého roku 2015 začala největší produkce konidií v měsíci červnu a následuje v měsíci červenci. Askospory v měsíci červnu a červenci u smrku pichlavého nebyly zaznamenány vůbec. (PEŠKOVÁ a SOUKUP, 2011) ve své práci o patogenu *Cenangium ferruginosum* uvádějí, že tento patogen, který napadá oslabené borovice zakládá plodnice teleomorfního stádia v jarním období většinou v dubnu až červnu, tedy měsíc červen koresponduje s kloubnatkou smrkovou pokud jde o smrk pichlavý. (PEŠKOVÁ a SOUKUP, 2001) ve své práci uvádějí také

další brzké uvolňování konidií u jiného patogenu oproti kloubnatce smrkové. Jde a houbu *Mycosphaerella pini* nebo-li červenou sypavku borovic, které v našich podmínkách uvolňuje konidie od poloviny května. Askospory se ale na infikovaných jehlicích většinou vytváří v následujícím roce. (PEŠKOVÁ a SOUKUP, 2004) v této práci uvedli další patogen, který má jarní výskyt konidií, avšak teleomorfní (pohlavní stádium) není známo. Jedná se o houbu *Sphaeropsis sapinea* nebo-li prosychání borovic a napadá rod *Pinus*. V srpnu roku 2015 na smrku pichlavém byl ve třech případech zaznamenán silný výskyt konidií. Produkce askospor u smrku pichlavého z měsíce srpna roku 2015 zaznamenána nebyla. Odběr z měsíce září roku 2015 zaznamenal v jednom případě slabý výskyt konidií na smrku pichlavém. V měsíci září roku 2015 byl poprvé v jednom případě na smrku pichlavém zaznamenán slabý výskyt askospor.

Roku 2016 v měsíci srpnu následovaly další odběry na smrku pichlavém a ve dvou případech byl zjištěn středně silný výskyt a jednou silný výskyt konidií. Askospory v měsíci srpnu roku 2016 na smrku pichlavém nebyly prokázány. V porovnání s jinými patogeny velkou produkci askospor uvádí i práce (HAVRDOVÁ et al., 2013) na houbě *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, nebo-li nekróze jasanů, kde je nejvíce askospor v měsíci červenci až v srpnu. V měsíci září roku 2016 byly konidie na smrku pichlavém zaznamenány jednou se středně silným výskytem a jednou se silným výskytem. Nález askospor v září roku 2016 na smrku pichlavém nebyl potvrzen. V měsíci říjnu roku 2016 na smrku pichlavém nebyly prokázány konidie ani askospory.

Výzkum, který byl realizován na ponechaných těžebních zbytcích poukazuje, že v pyknidách jsou konidie přítomné zhruba stejnou dobu jako na živém hostiteli. Podobnost s kloubnatkou smrkovou byla prokázána u houby rodu *Diplodia*. V tomto případě nešlo o těžební zbytky smrků ale borovic. Výzkum začal na pěti plantážích borovic, kde byly třikrát za podzim odebrány těžební zbytky roku 2007 a počátkem léta a podzimu 2008 cca 6, 12 a 18 měsíců po těžbě. Časový interval odběru byl podobný jako v případě kloubnatky smrkové. V našem výzkumu bylo prokázáno, že na ponechaných těžebních zbytcích byly

spory uvolňovány ve stejné míře, jako na živých hostitelích a byly uvolňovány po stejnou dobu. Takovýto závěr byl prokázán i v případě patogenu rodu *Diplodia*. V případě dalších výzkumů by bylo vhodné doplnit meteorologické pozorování, protože pupeny poškozené abiotickými činiteli mohou být náchylnější vůči patogenu kloubnatky smrkové. Náchylnost k poškození mrazem je rovněž uvedena v práci URBAN (2014), kde uvádí, že hodnoty -2 až -3 °C po dobu 3 až 4 hodin mohou poškozovat a dehydratovat pletiva zvláště smrku ztepilého. Práce LANGVALL et al. (2001) zmiňuje, že fenologická pozorování mají probíhat od počátku fyziologické aktivity, kdy délka nových letorostů je alespoň 5 centimetrů. Podle tohoto autora od této délky dojde k zlepšování odolnosti u smrku ztepilého proti mrazu. SCHOŘÁLKOVÁ (2015) uvádí, že je dobré věnovat pozornost teplotě vzduchu na podzim kvůli častějšímu výskytu mrazů, zejména v září, kdy nemusí být pletiva ještě dostatečně vyztřelé a hůře, tak odolávají časným podzimním mrazům.

7 Závěr

V mé diplomové práci bylo provedeno hodnocení sporulace houby kloubnatka smrková (*Gemmamyces piceae*) na pupenech smrku ztepilého z klestu na záměrně pokácených vzornících, kde byly odběry realizovány v pravidelných měsíčních intervalech viz Tab. 2 a Tab. 3 uvedené v kapitole Výsledky. Dále byla provedena analýza sporulace napadených pupenů v porostech smrku ztepilého a smrku pichlavého, které byly odebírány z větví stromů po větrných kalamitách především v Krušných horách. Na ponechaném klestu byly konidie nacházeny i ve slabém výskytu nalezeny po měsíčním až dvouměsíčním intervalu od pokácení. Výskyt askospor byl u ponechaného klestu rovněž prokázán po jednom až dvou měsících od pokácení ve slabém výskytu.

Z mých výsledků vyplývá, že těžební zbytky uvolňují spory stejně jako stojící stromy. Doba uvolňování spor smrku ztepilého a smrku pichlavého byla prokázána ve stejném časovém období. Výzkum byl obohacen výsledky z ročního monitoringu sporulace kloubnatky smrkové a díky tomu došlo ke zpřesnění fenologických údajů pro kloubnatku smrkovou.

U smrku pichlavého viz Tab. 5 uvedená v kapitole Výsledky byla prokázána nejvyšší produkce konidií v červnu a červenci roku 2015. Askospory se roku 2015 začaly objevovat pouze v jednom případě na smrku pichlavém v slabém množství v měsíci září. V srpnu roku 2016 byl prokázán rovněž výskyt konidií na smrku pichlavém. Další výskyt konidií na smrku pichlavém byl zaznamenán v září roku 2016. Askospory v tomto roce nebyly zaznamenány.

V případě smrku ztepilého viz Tab. 4 uvedená v kapitole Výsledky byla prokázána největší produkce spor v červenci roku 2015, konkrétně konidií bez výskytu askospor. Askospory se objevily až v srpnu roku 2015 v jednom případě se středním výskytem na smrku ztepilém – Šumava, Borová Lada. Další výskyt konidií byl prokázán ve dvou případech v září roku 2015. Askospory v měsíci září roku 2015 nebyly zaznamenány. V srpnu roku 2016 byl zjištěn z celého roku

nejsilnější výskyt konidií. Askospory byly zaznamenány ve dvou případech ve slabém a středním množství. V září a říjnu roku 2016 již nebyly konidie a askospory prokázány.

Doporučení, která z uvedených závěrů plynou jsou, že v případě odstraňování stromů za účelem snížení infekčního tlaku je nejvhodnější provést zásah před začátkem sporulace, tedy do července. Pokud se toto odstranění nestihne do července, bude mít pozitivní dopad na snížení infekčního tlaku, i odstranění provedená později, nejlépe však do konce září. Následně jsou plodnice většinou prázdné a největší infekční tlak již odezněl.

Odstraňování těžebních zbytků je tak nutné pro úplnou eliminaci rizika infekce patogenem. Takové opatření má největší význam v oblastech s menším infekčním tlakem, kde má ještě smysl tímto zásahem snížit napadení čerstvých pupenů. Odstranění klestů s napadenými pupeny se sníží potenciální zdroj inokula patogenu.

8 Seznam literatury a použitých zdrojů

Ariyawansa, H. A.; Hyde, K., D.; Subashini, C. Jayasiri; et al. (2015): Fungal diversity notes, 274 s.

Bařa, D. (2018): Analýza prostorové distribuce napadení porostů smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách. Diplomová práce, Praha, ČZU, 79 s.

Borthwick, A. W. (1909): A new disease of Picea. Notes Roy. Botan. Garden, Edinburg 4, 259–261s.

Brent, W.; Oblinger, Denise R.; Smith, Glen, R., Stanosz. (2011): Red pine harvest debris as a potential source of inoculum of Diplodia shoot blight pathogens, 8 s.

Butin, H. (1995): Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity trees. Oxford University Press, New York, Tokyo: 252 s.

Crous, P. W.; Groenewald, J. Z. (2017): The genera of Fungi - G4 Camarosporium and Dothiora, 22 s.

Černý, K.; Pešková, V.; Soukup, F.; Havrdová, L.; Strnadová, V.; Zahradník, D.; Hrabětová, M. (2016): *Gemmamyces* bud blight of *Picea pungens*: a sudden disease outbreak in Central Europe. *Plant Pathology*, č. 65 (8): 1267–1278 s.

Dantigny, P.; Bensoussan, M.; Vasseur, V.; Lebrihi, A.; Buchet, C.; Ismaili-Alaoui, M.; Devlieghere, F.; Roussos, S. (2005): Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report, 6 s.

Doidge, D.F.; Koot H.P. (1977): West insect and disease conditions, British Columbi, 12 s.

Donald, E. (1997): Aylor and Soumaila Sanogo Germinability of *Venturia inaequalis* Conidia Exposed to Sunlight, 6 s.

Evans, J.; Youngquist, J.A. (2004): Encyclopedia of Forest Sciences. Academic Press, 240 s.

Hannes, Luidalepp,; Arvi, Joers,; Niilo, Kaldalu and Tanel, Tenson. (2004): Age of Inoculum Strongly Influences Persistence Frequency and Can Mask Effects of Mutations Implicated in Altered Persistence, 8 s.

Havrdová, L.; Černý, K.; Pešková, V. *Hymenoscyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C.R. Grünig, T.Kowalski, T.N. Sieber et O. Holdenrieder (anamorfa *Chalara fraxinea* T. Kowalski) *Nekróza jasanu*. Lesní ochranná služba, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Praha, 2013, 4 s.

Hubálek, Z. (1996): Cryopreservation of microorganisms at ultra-low temperatures, Praha, Academia, 286 s.

Chetverikov, P.E. (2015): Confocal Microscopy reveals uniform male reproductive anatomy in eriophyoid mites (Acariformes, Eriophyoidea) including spermatophore pump and paired vasa deferentia, 20 s.

Ivanovová et al. (2017): Morphological features of *Camarosporium pini* – the fungus associated to health state degradation in Austrian and Ponderosa pine. *Folia Oecologica*, 44: 54–57 s.

Jaklitsch, W.M. (2009): European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species, 91 s.

Jaklitsch, W.M.; Checa, J.; Blanco, M.N.; Olariaga, I.; Tello, S.; and Voglmayr, H. (2018): A preliminary account of the Cucurbitariaceae, 48 s.

Knížek, M.; Liška, J.; Modlinger, R. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2015 a jejich očekávaný stav v roce 2016. *Zpravodaj ochrany lesa*. 2017, 65 s.

Kupková L.; Potůčková, M.; Lhotáková, Z.,; Albrechtová, J. (2018): *Forest cover and disturbance changes, and their driving forces: A case study in the Ore*

Mountains, Czechia, heavily affected by anthropogenic acidic pollution in the second half of the 20th century. 2018. Environmental Research Letters, 20 s.

Matthew, D.; Duwall, David F.; Grigal. (2011): Effects of timber harvesting on coarse woody debris in red pine forests across the Great Lakes states, U.S.A, 10 s.

Mizra. (1968): Taxonomic Investigation of the Ascomycetous Genus Cucurbitaria, 67 s.

Ostry, M.E.; Moore M.J.; Kern,C.C.; Venette, R.C.; Palik B.J. (2012): Multiple diseases impact survival of pine species planted in red pine stands harvested in spatially variable retention patterns, 7 s.

Paul, A.; BARBER, Treena, J.; BURGESS, Giles, E.; St.J. HARDY,; Bernard, SLIPPERS,; Philip, J. KEANE and Michael, J.; WINGFIELD (2005): Botryosphaeria species from Eucalyptus in Australia are pleoanamorphic, producing Dichomera synanamorphs in culture, 17 s.

Pešková, V.; Soukup, F.: Současná situace v porostech smrku pichlavého v Krušných horách. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 2013, 92 (10): 46–47 s.

Pešková, V.; Modlinger, R.; Soukup, F.; Ručková, J.(2016): Nárůst napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou v Krušných horách. *Lesnická práce* 95 (2), 46–47 s.

Pešková, V.; Modlinger, R.; Tomášková, I.; Samek, M.; Baťa, D.; Lorenc, F.; Dušek, D.; Kacálek, D. (2019): Vliv faktorů na napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou a návrh praktických postupů omezujících její šíření. Praha, ČZU, 53 s.

Pešková, V.; Tomášková, I.; Modlinger, R.; Lorenc, F.; Dušek, D.; Kacálek, D.; Vlniešková, T.; Samek, M.; Vliv faktorů prostředí na napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou a návrh praktických postupů omezující její, Dílčí technická zpráva za rok 2017. 2018.

Petrzik, K.; Kolonium, I.; Sarkisova, T.; Hrabáková, L. (2016): Detection and genome sequence of a new betapartitivirus associated with *Cucurbitaria piceae* Borthw. fungus causing bud blight of spruce in the Czech republic. Springer-Verlag Wien, vol. 161, no. 5: 1405–1409 s.

Phillips, D.H.; Burdekin, D.A. (1992): Diseases of Forest and Ornamental Trees. Palgrave Macmillan UK, 581: 148–149 s.

Pospíšil, F.; Pospíšil, J. *Poškození smrku pichlavého kloubnatkou v Krušných horách*. In: Knížek, M. (Ed.) *Škodliví činitelé v lesích Česka 2010/2011*. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí Průhonice, 12. 4. 2011. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 2011, 78 s.

Rossmann et al. (2015): Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes, 17 s.

Rotem, J., Aust, J. (1991): The Effect of Ultraviolet and Solar Radiation and Temperature on Survival of Fungal Propagules. *Journal of Phytopathology* 133, 76–84 s.

Shoemaker, R. A. (1967): *Cucurbitaria piceae* and associated Shearopsidales parasitic on spruce buds. *Canadian Journal of Botany* 45: 1243–1248 s.

Schořálková, I. *Ekologická studie houbového patogena, kloubnatky smrkové (*Gemmamyces piceae* [Borthw.] Casagr.) v porostech smrku pichlavého v oblasti Flájské přehrady*. Diplomová práce, Ústí nad Labem: Fakulta životního prostředí, Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, 2015, 69 s.

Sinclair, W.; Lyon, H. H. (2005): Diseases of Trees and Shrubs. Comstock Pub. Associates: 660 s.

Slodičák, M.; Balcar, V.; Novák, J.; Šrámek, V. a kolektiv. *Lesnické hospodaření v Krušných horách*. 2008, 477 s. ISBN 978-80-86945-04-0.

Smith, D.; Onions, A. H. S. (1994): The preservation and maintenance of living fungi. 2nd edition. - 132 p., Kew, CABI Publishing.

Soukup, F.; Pešková, V. *Cenangium ferruginosum Fr. Kornice borová*. Lesní ochranná služba, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Praha, 2011, 4 s.

Soukup, F.; Pešková, V. *Gemmamyces piceae (Borthw.) Casagr. kloubnatka smrková*. Lesní ochranná služba, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Praha, 2009, 4 s.

Soukup, F.; Pešková, V. *Mycosphaerella pini Rostrub ap. Munk červená sypavka borovic*. Lesní ochranná služba, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Praha, 2001, 4 s.

Soukup, F.; Pešková, V. *Sphaeropsis sapinea (Fr.) Dyko et Sutton prosychání borovic*. Lesní ochranná služba, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Praha, 2004, 4 s.

Strejčková, M. (2013): Indukce supresivity půdy pomocí introdukce mykoparazitických hub proti významným původcům onemocnění rostlin. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 90 s.

Šrámek, V.; Novotný, R.; Fiala, P.; Neudertová Hellebrandová, K.; Reininger, D.; Samek, T.; Čihák, T.; Fadrhonsová, V. (2014): *Vápnění lesů v České republice*. Praha: Ministerstvo zemědělství ve spolupráci s Výzkumným ústavem lesního hospodářství: 91 s. ISBN 978-80-7434-150-2

Tomášková, I. (2018): Water use efficiency of Norway spruce with bud blight disease, 133–136 s.

Tuffen, M. G.; Grogan, H. M. (2018): Current, emerging and potential pest threats to Sitka spruce, 16 s.

Vejpustková, M.; Čihák, T. (2015): Růstová reakce smrku na extrémní imisně-klimatický stres, 7 s.

Vlniešková, T. (2017): Vybrané fyziologické parametry smrku ztepilého po napadení kloubnatkou smrkovou. Diplomová práce, Praha, ČZU, 89 s.

Walter, M.; Jaklitsch, W.M.; Hermann, Voglmayr. (2017): Three former taxa of Cucurbitaria and considerations on Petrakia in the Melanommataceae, 17 s.

Wanasinghe, D.N.; Hyde, K.D.; Jeewon, R.; Crous, P.W.; Wijayawardene, N.N.; Jones, E.B.G.; Bhat, D.J.; Phillips, A.J.L.; Groenewald, J.Z.; Dayarathne, M.C.; Phukhamsakda, C.; Thambugala, K.M.; Bulgakov, T.S.; Camporesi, E.; Gafforov, Y.S.; Mortimer, P.E. and Karunarathna, S.C. (2017): Phylogenetic revision of Camarosporium (Pleosporineae, Dothideomycetes) and allied genera, 50 s.

Yuan, Z.-Q.; Wang, X.-W. *A taxonomic study of fungi associated with spruce bud blight in China*. Mycotaxon, 1995, vol 53: 371–376 s.

Zahradník, P.; Holuša, J.; Knižek, M., Liška, J.; Lubojacký, J.; Pešková, V.; Velé, A.; Zahradníková, M. Výsledky výzkumu útvaru LOS uplatnitelné v praxi. *Škodliví činitelé v lesích Česka*. 2014, 47–58 s.

Zúbrik, M.; Kunca, A.; György, C. (2013): Insects and diseases damaging trees and shrubs of Europe. N. A. P. Éditions: 535 s.

Zýka, V.; Černý, K.; Strnadová, V.; Zahradník, D.; Hrabětová, M.; Havrdová, L.; Romportl. (2018): *Predikce poškození porostů smrku pichlavého kloubnatkou smrkovou v Krušných horách*. Mapa s odborným obsahem, VÚKOZ, v. v. i. Certifikováno Ministerstvem zemědělství ČR dne 21. 12. 2018 Osvědčením č. 74672/2018-MZE-16222/MAPA681. VÚKOZ, v. v. i., Průhonice, 48 s.

Esri, H.; Garmin, I.; Increment, P.; GEBCO, U. F.; NPS, N.; GeoBase, I.; Kadaster, NL.; Ordnance, S.; Esri, J.; Meti, Esri China (Hong Kong), ©

OpenStreetMap contributors. *World Topographic map* [podkladová mapa]. Vytvořeno 14. 6. 2013. Aktualizováno 14. 1. 2020 [cit. 26.2.2020] Dostupné na WWW

<https://services.arcgisonline.com/ArcGIS/rest/services/World_Topo_Map/MapServer>

Šrámek, V. *Význam meteorologických faktorů při poškození břízy v Krušných horách v roce 1997*. [online] Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 1998, vol. 77, no. 4. [cit. 26.2.2020] Dostupné na WWW <<http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-infocopy>.

[nsf/da28f37425da72f7c12569e600723950/f09718a421b7a3e080256833003cddd3?OpenDocument](http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-infocopy)>

Šrámek, V.; Balcar, V.; Buriánek, V.; Havránek, F.; Jurásek, A.; Liška, J.; Novák, J.; Slodičák, M. *Lesnické hospodaření v Krušných horách .Aktualizace studie*. [online] Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 2015, 196 s. [cit. dne 26. 2. 2020] Dostupné na WWW <http://www.vulhm.cz/sites/File/Informatika/studie_krusne_hory.pdf>

Woolsey, R. (2017): A tale of two fungi, 3 s. [cit. dne 26. 2. 2020] Dostupné z WWW: <<https://www.kcaw.org/2017/08/31/tale-two-fungi-southeast-spruce-blight-mistaken-harmless-twin/>>

9 Přílohy



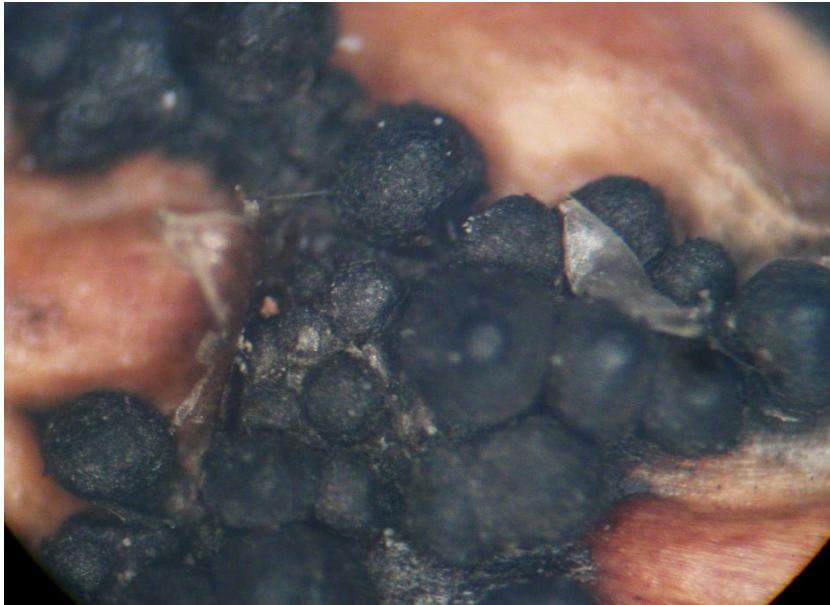
Obr. 19: Klest se smrku ztepilého napadený houbou *Gemmamyces piceae*
(Foto Samek)



Obr. 20: Pupeny smrku ztepilého napadené houbou *Gemmamyces piceae*
(Foto Pešková)



**Obr. 21: Porost smrku pichlavého napadený houbou *Gemmomyces piceae*
(Foto Pešková)**



Obr. 22: Plodnice houby *Gemmamyces piceae* na pupenu smrku pichlavého (Foto Pešková)



Obr. 23: Červovitá nepohlavní spora – konidie (20 x zvětšeno) - Vyfoceno pod mikroskopem Nikon Eclipse Ci (Foto autorka)



Obr. 24: Zdvovitá pohlavní spora askospora kloubnatky smrkové (20 x zvětšeno) – mikroskop Nikon Eclipse Ci (Foto autorka)



Obr. 25: Červovité konidie se zdvovitými askosporami kloubnatky smrkové (20 x zvětšeno) – mikroskop Nikon Eclipse Ci (Foto autorka)