

Mendelova univerzita v Brně

Lesnická a dřevařská fakulta

Ústav ochrany lesa a myslivosti

**Hodnocení patogenity *Hymenoscyphus fraxineus* in vitro
na různých živných médiích**

Bakalářská práce

(Práce obsahuje samostatnou přílohu ve formě CD-ROM; Příloha 10.2; Soubor Botella et al. a Příloha 10.3; Soubor Primární data, umístěnou na deskách vazby)

2015/2016

Aneta Bačová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Hodnocení patogenity *Hymenoscyphus fraxineus* in vitro na různých živných médiích** zpracovala 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 vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, 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 27. 4. 2016

Podpis studenta

Poděkování

Mé poděkování za významnou pomoc při zpracování bakalářské práce patří především Ing. Vendule Čermákové, které děkuji za pomoc při laboratorních pracích a cenné rady k dané problematice. Také bych ráda poděkovala Ing. Miloni Dvořákovi Ph.D a Ing. Petru Martinkovi za pomoc při vyhodnocování dat v programu Statistica. Dále Dr. Leticii Botelle Sánchez za vedení práce, odborný dohled a konzultace. Dík patří taktéž celému týmu fytopatologické laboratoře za předané zkušenosti, především Ing. Dagmar Palovčkové za odborné rady a konzultace, a v neposlední řadě mé rodině, kamarádům a příteli Adamovi za trpělivost, podporu a pomoc při studiu.

Práce byla podpořena z projektů IGA 30/2013 a COST LD 13020/2013 Infekční biologie *Chalara fraxinea* a faktory ovlivňující fruktifikaci teleomorfy *Hymenoscyphus pseudoalbidus* jako zdroje infekce nekrózy jasanů. Oba spolufinancované Evropským sociálním fondem a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Aneta Bačová

Hodnocení patogenity *Hymenoscyphus fraxineus* in vitro na různých živných médiích

Evaluation of the pathogenity of *Hymenoscyphus fraxineus* on different nutrient media

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá patogenem *Hymenoscyphus fraxineus*, který způsobuje vážné chřadnutí jasanů v celé Evropě. V první části práce jde o shrnutí dosavadních poznatků o dané problematice, které jsou dostupné v literatuře. Hlavním směrem výzkumu je pak laboratorní zkoumání 15 kmenů této houby, se snahou najít nejlepší médium pro její růst. Základem je tedy pět různých médií (MEA, AMEA, MOS, PDA, ADA), na které byl patogen naočkován, a kde byla zkoumána rychlost jeho růstu v průběhu šesti týdnů. Jedno z médií, agar s jasanovými pilinami, přitom bylo použito pro tento patogen poprvé. Vedlejším směrem zkoumání byla dále závislost rychlosti růstu na barvě mycelia, kdy byly vybrány skupiny kmenů s mycelii tmavými, světlými a kmeny s viry. Nejlepší růst byl zjištěn na nově vytvořeném médiu ADA, kdy se jedná o piliny získané z jasanových větvíček, přidané do klasického agarového média. Závislost rychlosti růstu na barvě mycelia potvrzena nebyla. Celý tento výzkum může přispět ke zlepšení laboratorních postupů určených ke studiu tohoto patogenu, a tak pomoci pro vývoj ochrany jasanů proti napadení.

Klíčová slova: *Hymenoscyphus fraxineus*, médium, mycelium, rychlost růstu

Abstract

This thesis deals with the pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* causing the serious dieback of ash trees throughout Europe. In the first part, a summary of the state-of-art literature is presented. The main research is based on an *in vitro* examination of 15 strains of *H. fraxineus*, with the aim of finding the best medium for its growth. The five different nutrient media (MEA, AMEA, MOS, PDA, ADA) were chosen to cultivate the pathogen and examine its growth rate during six weeks. The medium ADA, composed of agar with of ash dust was designed and firstly used for this pathogen in our study. In addition, the relationship between the growth rate and the colour of mycelia was examined in three groups of strains (dark mycelium strains, light mycelium strains and strains with viruses). The fastest growth was found on the newly created ADA medium, which was obtained from ash twigs sawdust added to the classical agar medium. Dependence of the growth rate on mycelium colour has not been confirmed. This research contributes to the improvement of laboratory techniques designed to study *H. fraxineus*.

Keywords: *Hymenoscyphus fraxineus*, medium, mycelium, growth rate

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	3
3. Současný stav řešené problematiky	4
3.1. Charakteristika napadaných druhů.....	4
3.1.1. <i>Fraxinus excelsior</i> L.	4
3.1.2. <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.	5
3.1.3. Společenstvo tvrdého luhu.....	6
3.2. Nekróza jasanů <i>Chalara fraxinea</i>	6
3.2.1. Historie a šíření.....	6
3.2.2 Chřadnutí jasanů v ČR.....	8
3.2.3 Symptomy.....	8
3.2.4 Taxonomie a morfologie.....	11
3.2.5 Životní cyklus	13
3.3. Význam odumírání jasanů v lesním hospodářství	14
3.4. Metody ochrany proti chřadnutí jasanů.....	15
3.5. Výběr a dělení živných médií pro kultivaci houbových organismů in vitro....	17
4. Metodika	18
4.1. Izoláty.....	18
4.2. Kultivační média	19
4.3. Očkování a kultivace.....	21
4.4. Měření	22
4.5. Statistické analýzy.....	23
5. Výsledky	24
5.1. Primární data a průběh růstu	24
5.2. Srovnání médií	25
5.3. Barva mycelia a její souvislost s rychlostí růstu	26

6. Diskuze	28
7. Závěr	30
8. Summary	31
9. Literatura.....	33
10. Přílohy.....	40
10.1. Průběh růstu kmenů na jednotlivých médiích	40

Seznam obrázků

Obr. 1: Mapa areálu přirozeného rozšíření <i>Fraxinus excelsior</i> L.	5
Obr. 2: Mapa areálu přirozeného rozšíření <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.	6
Obr. 3: Mapa šíření chřadnutí jasanů.....	7
Obr. 4: Léze na listech	10
Obr. 5: Eliptické nekrózy na kmínku jasanu.....	10
Obr. 6: Infekce ve dřevní části.....	10
Obr. 7: Suché listy zůstávající na větvích.....	11
Obr. 8: Apothecia na řapících opadlých listů	12
Obr. 9: a) askospora, b) klíčící askospory na médiu MEA.....	12
Obr. 10: Fialidy se shluky spor na vrcholu	12
Obr. 11: Schéma životního cyklu nekrózy jasanů	14
Obr. 12: Médium AMEA v baňce vyjmuté z autoklávu.....	20
Obr. 13: Média v Petriho miskách	21
Obr. 14: Kmen NOR/1/23 na médiu PDA	22
Obr. 15: Značky pro měření.....	22
Obr. 16: Graf plochy mycelia po 6 týdnech kultivace	26
Obr. 17: Kmen 1653 na médiu.....	27
Obr. 18: Kmen VER 2 na médiu.....	27
Obr. 19: Variabilita mycelia kmene VER 2 na médiu MOS	27
Obr. 20: Textura mycelia na médiu ADA.....	27
Obr. 21: Mycelium s šedým okrajem značícím sporulaci	29

Seznam tabulek

Tab. 1: Seznam izolátů.....	18
-----------------------------	----

1. Úvod

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) byl ještě donedávna považován z hlediska ochrany lesa za bezproblémový druh, který nebyl provázen žádnými závažnými zdravotními problémy. Je rozšířen téměř po celé Evropě, s výjimkou nejzazšího severu a severovýchodu. Na severu zasahuje do teplé části Skandinávie a roste i v jižním Finsku. Dále jeho areál postupuje přes evropskou část Ruska k Uralu. Poté postupuje k Černému moři a vyskytuje se také v oblasti Kavkazu a Malé Asie. V oblasti Středomoří je nejjižněji rozšířen ve středu Pyrenejského a Apeninského poloostrova, dále pak v jižní polovině poloostrova Balkánského. Na západě obsazuje celou Francii a Britské ostrovy (Úradníček a kol. 2014). Tento druh tvoří tři ekotypy: lužní, horský a vápencový, přičemž se všechny tři vyskytují v České republice. Najdeme ho tedy téměř ve všech vegetačních stupních. Největší význam u nás má ekotyp lužní, který je rozšířen v nížinách podél toků velkých řek, a tvoří zde společně s dalšími dřevinami tzv. tvrdý luh (Úradníček a kol. 2014).

Na počátku devadesátých let dvacátého století však začaly porosty těchto dříve bezproblémových stromů, a také porosty příbuzného druhu, jasanu úzkolistého (*F. angustifolia* Vahl.), z neznámých příčin chřadnout a odumírat, bez ohledu na vývojové stádium nebo stanoviště. První známky chřadnutí byly zaznamenány v Polsku (Przybyl 2002) a Litvě (Lygis et al. 2005), a příznaky nákazy se nadále šířily přes Lotyšsko, Estonsko (Rytkönen et al. 2011), Německo (Nárovec a kol. 2007), Dánsko (Thomsen et al. 2007) a Švédsko (Bakys et al. 2009b). Z toho je patrné, že bylo už pouze otázkou času, kdy se toto onemocnění vyskytne v České republice. Symptomy, ke kterým patří prosychání korun, odumírání letorostů a rozvoj podkorních lézí zde byly pozorovány od roku 2004 (Jankovský a kol. 2010). Zde vyvstal problém především v již zmiňovaném tvrdém luhu, jehož dřeviny byly již dříve napadány různými houbovými patogeny. Jednalo se nejprve o patogen *Ophiostoma ulmi* Buisman a později o její následovnici *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, které způsobují grafiózu jilmů a tento druh v České republice téměř vyhladily. Dále se ve tvrdém luhu také vyskytlo chřadnutí olší způsobené patogenem *Phytophthora alni* Brasier & S. A. Kirk, a došlo tak k dalšímu oslabování těchto lužních ekosystémů.

V roce 2006 byl za možného původce chřadnutí jasanových porostů označen patogen *Chalara fraxinea*. Poprvé ho popsal T. Kowalski v Polsku v roce 2001, kde

byla nákaza zaznamenána, jako v jednom z prvních států Evropy (Kowalski 2006). Následně byl patogen potvrzen i v jiných státech. Za sexuální stádium patogenu byl Kowalskim, Holdenriederem (2009), nejprve na základě morfologických poznatků označen *Hymenoscyphus albidus*. Nicméně Queloz et al. (2011), na základě molekulárních dat, popsali patogen jako nový druh a jeho teleomorfní, tedy sexuální stádium nazvali *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Dle pozdějšího výzkumu bylo zjištěno, že tento patogen byl do Evropy zavlečen s největší pravděpodobností z Jižní Asie.

Díky nedávné době popsání tohoto houbového patogenu, zůstává *H. pseudoalbidus* stále ne příliš probádaným původcem onemocnění jasanů (*Fraxinus sp.*). Pro lepší pochopení celkových souvislostí odumírání jasanů je nezbytné dokonale prozkoumat celý životní cyklus, patogenitu a způsob napadání stromů tímto patogenem. K tomu v neposlední řadě slouží laboratorní metody, kde je patogen pěstován *in vitro*, a dále jsou zkoumány jeho vlastnosti. Je tedy důležité stále zlepšovat podmínky a samotné metody pěstování a zkoumání *H. fraxineus*, aby mohlo být dokonale pochopeno fungování celého systému této nákazy. Právě proto se v této práci zabývám živnými médii a tím, které je optimální pro růst mycelia houby. Okrajově také zasahuji do kmenů houby, které jsou nakaženy viry, což by dále mohlo vést k biologické ochraně proti této houbě.

2. Cíl práce

Práce je zaměřena na možnost zlepšení efektivity pěstování patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* s využitím různých živných médií. Experimentální část je zaměřena na zjišťování závislosti rychlosti růstu mycelia na druhu živného média, kdy bylo zvoleno pět různých médií (MEA, AMEA, PDA, MOS, ADA), z nichž jedno (ADA) bylo pro tento patogen zcela nové a do této doby nepoužité. Dále je záměr zjistit závislost rychlosti růstu mycelia na jeho barvě, přičemž je zde teze, že tmavé mycelium roste pomaleji a je tedy méně patogenní. Okrajovým cílem této práce je také zjistit, zda kmeny, které jsou nakaženy viry, rostou pomaleji, což by poté vedlo k další možnosti výzkumu biologické ochrany. Hlavním zájmem při výzkumu bude tedy rychlost růstu, která bude pravidelně měřena, zaznamenávána a dále porovnávána, jak mezi jednotlivými médii, tak uváděna do vztahu s barvou mycelia.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Charakteristika napadaných druhů

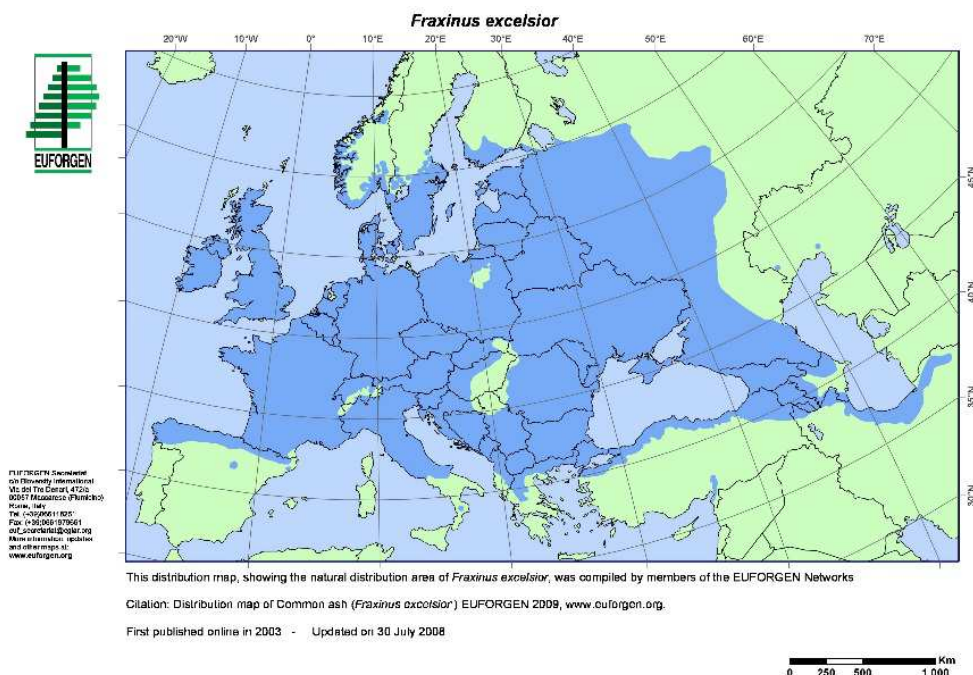
Patogen *Hymenoscyphus fraxineus* napadá druhy u nás se vyskytujícími jasanů, a to jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) a jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* Vahl.).

3.1.1. *Fraxinus excelsior* L.

Jasan ztepilý má evropský areál rozšíření, zabírající téměř celý kontinent s výjimkou nejzazšího severu a severovýchodu. Zasahuje do Skandinávie, přes Karelskou šíji do Ruska až k Uralu. Dále k Černému moři, na Pyrenejský, Apeninský a jih Balkánského poloostrova (Úradníček a kol. 2014). Tento poměrně velký areál poukazuje na snadné šíření chřadnutí jasanů do téměř všech koutů Evropy (viz. Obr. 1).

Díky třem různým ekotypům (lužní, horský a vápencový) má tato dřevina poměrně velké výškové rozpětí, a proto má význam nejen v nízko položených lužních lesích (kde vykazuje největší kvalitu dřeva), ale i v chlumních polohách a v pásnu bučin ve vyšších nadmořských výškách (Úradníček a kol. 2014).

Ještě v roce 2008 byl jasan naší šestou nejrozšířenější dřevinou s celkovým plošným zastoupením 3,5% (Nárovec a kol. 2007). Dle MZe (2015) je nynější zastoupení jasanu pouhých 1,4%, přičemž doporučené zastoupení je ještě menší - 0,7%. Dřevo se používá k výrobě nábytku, dých sportovního nářadí, parket, hudebních nástrojů apod. Podíl jasanu v celkovém množství těžného dřeva je však nepatrný (Úradníček a kol. 2014), nicméně má svůj podstatný význam z hlediska vodohospodářské funkce lesa a stabilizace břehů (Šimíček 1999).

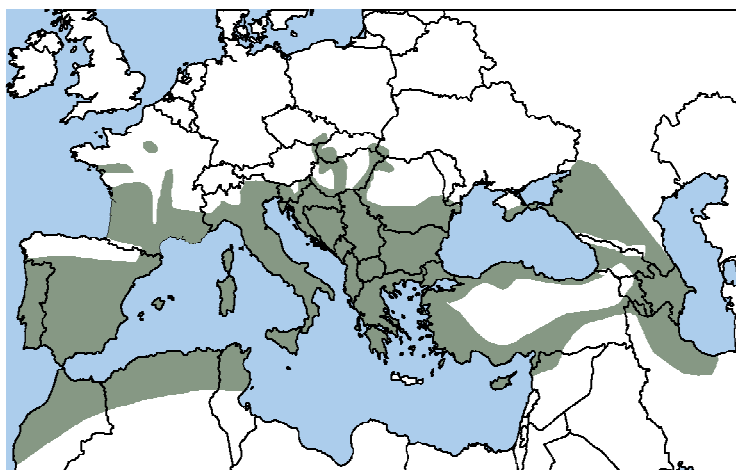


Obr. 1: Mapa areálu přirozeného rozšíření *Fraxinus excelsior* L. (Euforgen 2015)

3.1.2. *Fraxinus angustifolia* Vahl.

Jasan úzkolistý je dřevina, která má areál spíše jihoevropského rozšíření a je zastoupena ve všech zemích kolem Středoziemního moře. Na jihu dále zasahuje do Maroka, Alžíru a Tunisu a areál vybíhá přes Malou Asii až na sever Sýrie. K severu je pak rozšířen na jih Francie, sever Chorvatska do Maďarska, dále do nejteplejších částí Slovenska a České republiky (Úradníček, Chmelař 1995) (viz. Obr. 2). V lužních lesích jižní Moravy je tato dřevina tzv. panonským elementem (Úradníček 2014), přičemž se s největší pravděpodobností jedná o poddruh jasan úzkolistý podunajský (*F. angustifolia* subsp. *danubialis*).

Dřevo má velmi kvalitní, zpracovávané společně se dřevem jasanu ztepilého a dávající v mnoha směrech i stejný užitek. Stejně tak je i jeho plošné rozšíření v České republice zahrnováno do procentuálního podílu s jasanem ztepilým. Pokud jde o jeho význam pro lesní hospodářství, jde především o funkci vodohospodářskou, jelikož přímo vyžaduje blízkou hladinu vody a dobře snáší záplavy (Úradníček, Chmelař 1995).



Obr. 2: Mapa areálu přirozeného rozšíření *Fraxinus angustifolia* Vahl. (Fraxigen 2016)

3.1.3. Společenstvo tvrdého luhu

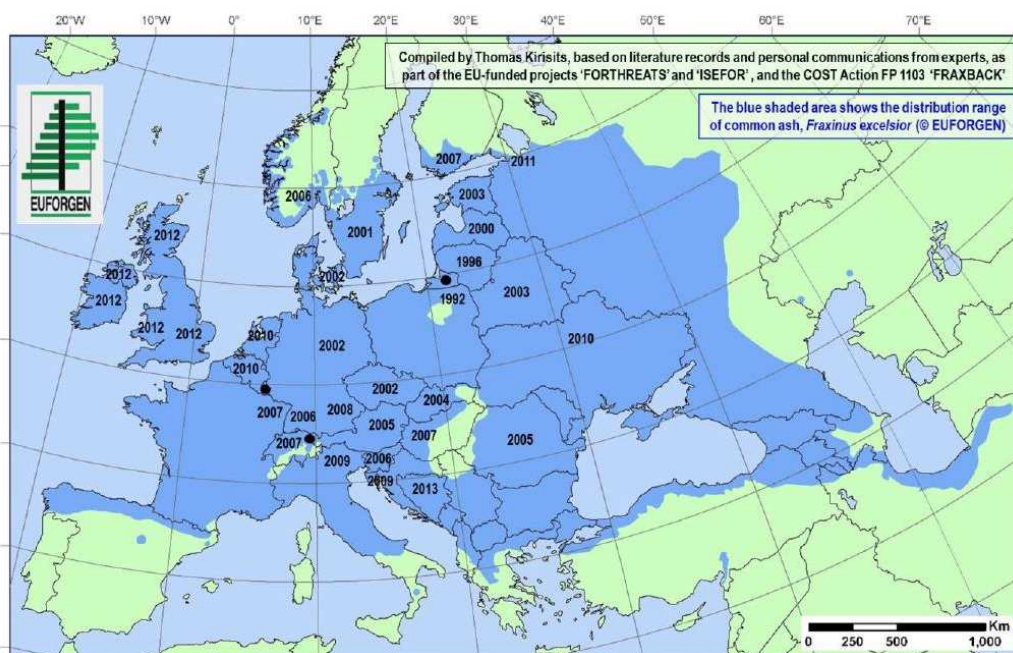
Výše zmíněné dřeviny jsou v České republice nedílnou součástí tzv. tvrdého luhu, kde rostou společně především s dubem letním (*Quercus robur* L.). Nepravidelnou příměs zde také tvoří jilm vaz (*Ulmus laevis* Pall.) a jilm habrolistý (*Ulmus minor* Mill.), které bývaly dříve mnohem častější, než dnes, a to především díky zdecimování těchto druhů tracheomykózní grafiózou. (Úradníček a kol. 2014). V současné době se lužní lesy, konkrétně tvrdý luh, vyskytují především na Moravě, a to na soutoku řek Dyje a Moravy, a tvoří zde často přirozená společenstva s pralesovitými zbytky (Úradníček a kol. 2014). Proto jsou tyto biotopy nedílnou součástí naší přírody a v neposlední řadě vedou k rozšiřování její biodiverzity.

3.2. Nekróza jasanů *Chalara fraxinea*

3.2.1. Historie a šíření

Již na konci 20. století byly popsány případy výrazného chřadnutí jasanů, které se dotýkaly zdravotního stavu a často vedly až k hromadnému hynutí těchto stromů. Například ve Velké Británii byl jasan ohrožován již v padesátých a osmdesátých letech. Na konci 80. let bylo zhoršování zdravotního stavu jasanů pozorováno i v Nizozemsku (Nárovec a kol. 2007). Na počátku 90. let 20. století byly v severovýchodním Polsku poprvé pozorovány silné příznaky odumírání jasanů (Przybyl 2002). V tomto období byly příznaky pozorovány i na jasanech v Litvě (Lygis et al. 2005), od poloviny 90. let také v Lotyšsku a Estonsku a po roce 2000 dále ve Finsku (Rytkönen et al. 2011), Norsku (Talgø et al. 2008), Dánsku (Thomsen et al. 2007), Švédsku (Bakys et al. 2009),

a na severovýchodě Německa (Nárovec a kol. 2007). Další známky odumírání dřevin byly pozorovány i v České republice (Jankovský, Holdenrieder 2009). Šíření pokračovalo v Maďarsku (Szabo 2008), Rumunsku, Rakousku 2005 (Halmschlager, Kirisits 2008), Slovinsku 2006 (Ogris et al. 2009). Dle výsledků Hussona et al. (2011) se tento patogen vyskytl už i ve Francii. Dle Euforgen (2015) byla dále nákaza potvrzena v roce 2012 i ve Velké Británii. První příznaky odumírání byly v roce 2010 pozorovány na jasanu ztepilém (*F. excelsior*) na východní Ukrajině (Davydenko et al. 2013), a také v Rusku nedaleko Petrohradu (Selikhov Kin et al. 2013). Nyní lze předpokládat, že odumírání jasanů je rozšířeno i do ostatních částí Evropy a sleduje přirozený výskyt svých hostitelských dřevin (Rozsypálek 2012). V dnešní době hlásí výskyt odumírání jasanů více než 25 zemí Evropy, a očekává se, že se tato nákaza postupně rozšíří i do v současné době nepostížených oblastí (Cleary et al. 2013) (viz. Obr. 3).



Obr. 3: Mapa šíření chřadnutí jasanů (Euforgen 2015)

Hosoya et al. (1993) představuje *Lambertella albida* (syn. *H. albidus*), která byla objevena na řapících rozkládajícího se listí *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*, jako nový druh v Japonsku. Zhao et al. (2012) však dokázal, že *L. albida* je ve skutečnosti srovnatelná s *H. albidus*, což vedlo k závěru, že tento patogen byl do Evropy zavlčen z východní Asie.

Kowalski, Holdenrieder (2009) popsali, že *Ch. fraxinea* je anamorfním (nepohlavním) stádiem *H. albidus*, což je rozšířený nepatogenní endofyt, vyskytující se na řapících listů jasanu po jejich opadu a podílející se na rozkladu tohoto opadaného listí. V roce 2011 došlo pomocí genetických testů ke zjištění, že se na jasanu vyskytují dva morfologicky velmi podobné druhy rodu *Hymenoscyphus* sp. Houba vyskytující se na řapících napadených jasanů tedy není *H. albidus*, ale nově popsáný taxon *H. pseudoalbidus* Queloz (Queloz et al. 2011). Za houbu způsobující chřadnutí jasanů byl tedy označen *H. pseudoalbidus*, který se při výzkumech vyskytoval na nemocných jasanech, zatímco *H. albidus* se vyskytoval pouze ve zdravých jasanových porostech (Husson et al., 2011; Queloz et al., 2011).

V červenci 2011 bylo Mezinárodním botanickým kongresem stanoveno, že houby s pleomorfním životním cyklem (v životním cyklu se vyskytují dvě a více odlišných forem, například anamorfa a teleomorfa, jako je tomu zde) mohou mít pouze jeden vědecký název (McNeill et al. 2012). Do té doby používané názvy *Chalara fraxinea* a *H. pseudoalbidus* bylo tedy nutné sloučit pod jeden společný název. Z poznatků získaných výzkumem bylo vyvozeno, že odumírání jasanů úzce souvisí s rodem *Hymenoscyphus* (Zhao et al. 2012), a proto byl za správný název houby stanoven *H. fraxineus* (Baral et al. 2014).

3.2.2 Chřadnutí jasanů v ČR

V České republice docházelo lokálně k různým projevům chřadnutí již od 90. let. K výraznému rozvoji nákazy došlo v roce 2003 a mezi lety 2004-2008 byly symptomy pozorovány na řadě míst – Beskydy, Jeseníky, Krkonoše, Šumava, okolí Prahy, východní Čechy, Českomoravská vrchovina, Hostýnské vrchy, Chřiby atd. (Jankovský a kol. 2009).

První ověřená identifikace *Chalara fraxinea* v ČR byla provedena v roce 2007 laboratorně O. Holdenriederem ze vzorku odebraného ze stromu *F. excelsior* cv. „*Pendula*“, který se nachází v arboretu ve Křtinách. Zanedlouho byla potvrzena z Hradčan u Tišnova, Lomnice u Brna, Ochozu u Brna atp. (Jankovský a kol. 2009).

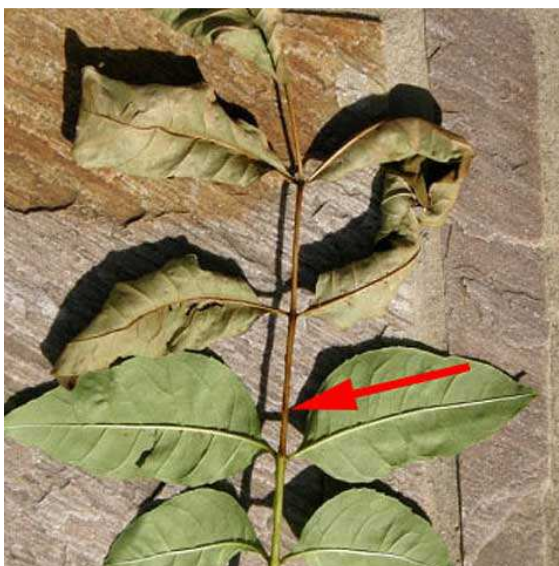
3.2.3 Symptomy

Chřadnutí jasanů je smrtící chorobou, která napadá všechny vývojové fáze jasanů od semenáčků až po zralé stromy. Košťálová, Sázellová (2010) však konstatují, že nejčastěji dochází k odumírání mladých stromků. Rozvoj symptomů na vnímavých

hostitelích začíná pozdě v létě tvorbou hnědých nekrotických lézí na listových řapících (viz. Obr. 4). Léze se poté šíří podél nejbližších žilek listu (Gross et al. 2014). Na první pohled je tak napadení patrné díky zasychání letorostů a terminálních výhonů (Košťálová, Sázelová 2010). Léze dále postupují do větví a šíří se jak ve směru asimilačním, tak i transpiračním. Zpočátku jsou okrouhlé a později tvoří elipticky protáhlé a propadené nekrózy (viz. Obr. 5), kdy je pod kůrou zjevné odumření kambia. Infekce proniká do dřevní části, kterou zbarvuje do šedo hněda (Jankovský a kol. 2009) (viz. Obr. 6). Podle Schumachera et al. (2010) opadávají nejsilněji napadené listy už před tím, než infekce dosáhne až do kmínku nebo větve. V září a říjnu také dochází k tomu, že doposud zelené listy nad nekrotickými náhle hynou a zůstávají na větvích (viz. Obr. 7). Všechny tyto skutečnosti pak mohou vést k zakládání proventitivních výhonů pod uhynulými letorosty a ke tvorbě tzv. vlků (Jankovský a kol. 2009).

U starších stromů pak odumírají spíše jednoleté a méně často starší výhony, přičemž infikované stromy jsou často schopné regenerovat a nákazu přežít. Proschlé jasanů poté raší na kmeni a tvoří čarověňky a podobné útvary (Jankovský a kol. 2009). Patogen však může napadat nejen řapíky a kmeny, ale kolonizuje také části kořenového systému (Schumacher et al. 2010), kdy byl *H. fraxineus* izolován i z mrtvých kořenů živých jasanů. Dále bylo zaznamenáno odumírání dvou až tříletých jasanů v případech, kdy se nekrózy objevily na jejich kmínku. Na některých lokalitách byl také pozorován nástup chřadnutí jasanů po předchozím poškození mrazem. Souvislost mezi těmito dvěma skutečnostmi však stále není potvrzená (Jankovský, Palovčíková 2009).

Symptomy této choroby na listech však nejsou specifické a mohou být zaměňovány například s padlím jasanovým (*Phyllactinia fraxini* (DC.) Fuss) (Jankovský, Palovčíková 2009), popřípadě mohou být příznaky podobné již zmiňovanému poškození mrazem. Proto stále jediným spolehlivým způsobem identifikace této nákazy zůstává mikrobiologický rozbor nekrotických (Jankovský, Palovčíková 2009).



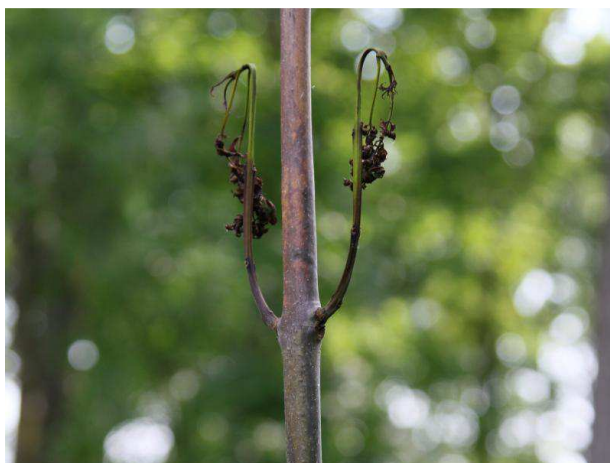
Obr. 4: Léze na listech (Forestry commission 2015)



Obr. 5: Eliptické nekrózy na kmínku jasanu (Atlas poškození dřevin 2014)



Obr. 6: Infekce ve dřevní části (Forestry commission 2015)



Obr. 7: Suché listy zůstávající na větvích (Atlas poškození dřevin 2014)

3.2.4 Taxonomie a morfologie

Rod *Hymenoscyphus* patří do čeledi Helotiaceae (voskovičkovité), řádu Helotiales, podtřídy Leotiomyetidae, třídy Leotiomyetes, podkmenu Pezizomycotina a kmenu Ascomycota, tedy houby vřecokvýtrusné (Cabi 2015). Jedná se o celosvětově rozšířený rod, který zahrnuje více než 150 druhů, z nichž většina je považována za saprotrofní rozkladače rostlinného materiálu. Před objevením nekrózy jasanů nebyl žádný z těchto druhů považován za původce jakéhokoliv onemocnění (Wang et al. 2006).

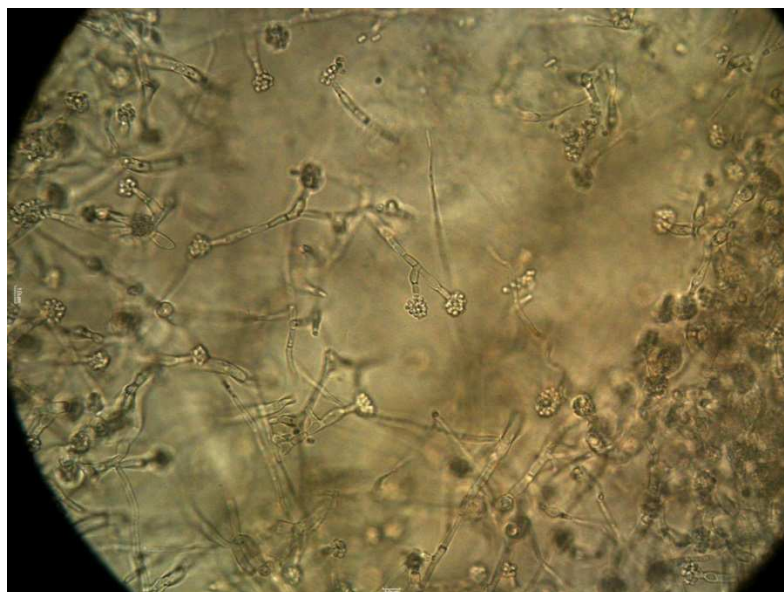
Hymenoscyphus fraxineus je houba tvořící množství bíle stopkatých apothecií (maximálně 3 mm v průměru, méně často 8 mm) na řapících listů opadaných v minulém roce (viz. Obr. 8). Hymenium vytváří jednobuněčné askospory velké $13\text{--}21 \times 3.5\text{--}5.0$ μm (viz. Obr. 9). Asexuální (anamorfní) stádium (*Ch. fraxinea*) je charakteristické hnědými fialidami velkými $16\text{--}24 \times 4\text{--}5$ μm , které tvoří krátké válcovité jednobuněčné konidie (Kowalski 2006) (viz. Obr. 10).



Obr. 8: Apothecia na řapících opadlých listů (Kirisits a kol. 2012)



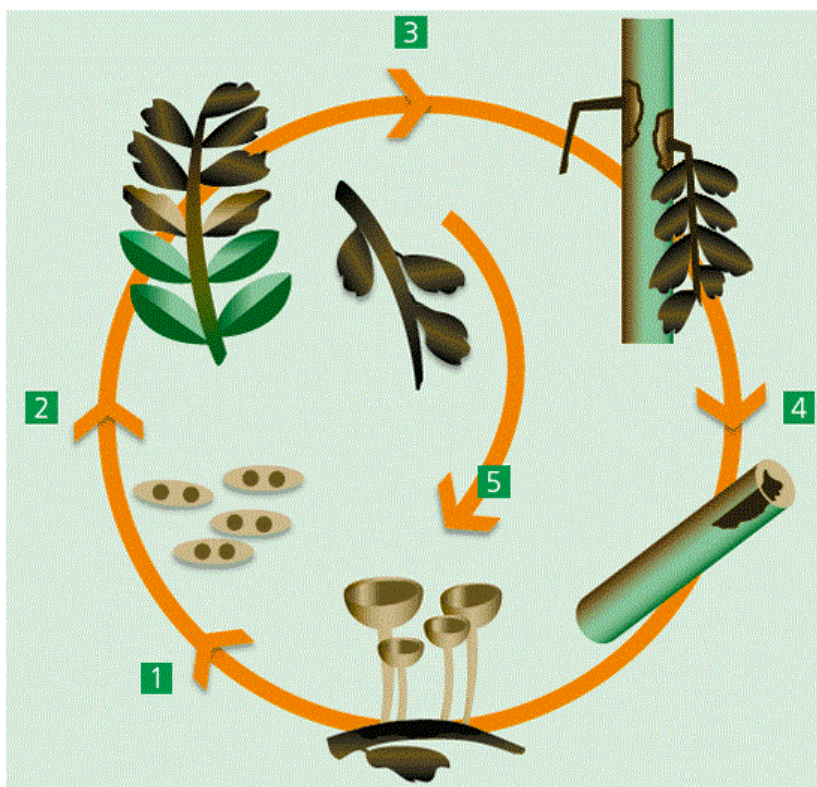
Obr. 9: a) askospora, b) klíčící askospory na médiu MEA (Kowalski, Holdenrieder 2009)



Obr. 10: Fialidy se shluky spor na vrcholu (archiv autorky, 8.4.2015)

3.2.5 Životní cyklus

Životní cyklus patogenu je v této době známý jen částečně a stále existují ještě ne příliš jasné skutečnosti. Nejpravděpodobnější průběh životního cyklu je následovný: *H. pseudoalbidus* napadá listy patrně askosporami (Rytkönen et al. 2011), kdy hlavní sporulační perioda probíhá od června do počátku září (viz. Obr. 11, část 2). Za příznivých podmínek však může sporulace začít dříve a trvat až do října. Tyto askospory se šíří větrem z apotecí (teleomorfní stadium), která se objevují na začátku léta na listech opadlých v minulém roce, přičemž většina apotecí roste na jejich řapících (viz. Obr. 11, část 1), ve kterých patogen přezimoval ve formě pseudosklerocií (mycelium se zásobními látkami stmelené s částčkami půdy či pletivem hostitele) (Kirisits, Cech 2009). Nicméně, občas se mohou apotecia vyskytovat i na malých zdřevnatělých větvích jasanu, ležících na zemi (Kowalski, Holdenrieder 2009). Askospory ulpívají na povrchu listů za pomoci sekretu, kterým jsou obaleny, vyklíčí v hyfu, a dále pronikají do listu, pravděpodobně skrze průduchy v listech (Kowalski, Holdenrieder, 2009). Ve většině případů dochází ke tvorbě lézí na listech jasanových semenáčků přibližně 2 týdny po inokulaci (Cleary et al. 2013). Poté, co spora vyklíčí v hyfu a pronikne do hostitele, se začne vyvíjet mycelium (anamorfní stadium), a tak se tvoří nekrotické léze, usychají listy a letorosty (Kirisits, Cech 2009) (viz. Obr. 11, část 3). Následuje opad listů (viz. Obr. 11, část 5), tvorba pseudosklerocia a konidií během zimy, čímž se celý vývojový cyklus uzavírá a v létě mohou být vytvořena nová apotecia (Kirisits et al. 2009).



Obr. 11: Schéma životního cyklu nekrózy jasanů: (1) apothecia *H. fraxineus* rostoucí na řapících opadlýč listů, (2) askospory šířící se větrem a infikující listy, (3) tvorba anamorfního stádia *Ch. fraxinea* a projev typických symptomů, (4) infekce proniká do dřeva, (5) listy opadávají a uzavírá se vývojový cyklus (Schumacher a kol. 2007)

3.3. Význam odumírání jasanů v lesním hospodářství

Dle Havrdové a kol. (2013) může patogen *H. fraxineus* způsobit, díky široké ekologické valenci jasanu a jeho různorodému využití, problémy v různých typech porostů a výsadb. Napadány jsou totiž stromy všech věkových tříd i různých typů stanovišť - od přirozených lesů, přes lesní výsadby a břehové porosty, až po aleje, remízky a okrasné výsadby.

Z hlediska typologického představuje největší hrozbu v edafických kategoriích lužní a údolní, tedy soubory lesních typů 1L, 2L, 3L, 5L a 1U, 3U a 5U a částečně i v nižších vegetačních stupních řady vlhké, SLT 1V a 2V. Značný problém může nastat v obnově břehových porostů s vysokým zastoupením olše a jasanu, za současného napadení olše patogenní houbou *Phytophthora alni*, která již dříve způsobovala odumírání olší v oblasti lužních lesů. Díky tomu, že nejčastěji odumírají mladé stromky, může docházet k výrazným ztrátám v lesním školkařství a vést i k tomu, že školkaři přestanou jasan pěstovat. (Košťálová, Sázellová 2010). Jelikož je jasan v některých

porostech veden jako MZD (meliorační a zpevňující dřevina), bude muset být i tato funkce zvážena, jelikož by pak mohlo docházet ke zbytečnému rozvratu těchto porostů. Dle pohledu některých autorů na tuto záležitost hrozí až možnost kolapsu celých populací jasanu (Havrdová a kol. 2013).

3.4. Metody ochrany proti chřadnutí jasanů

Ochrana dřevin v oblasti houbových chorob je poměrně problematickou záležitostí a v mnoha případech ani účinná ochrana neexistuje. Musíme se proto často spokojit pouze s jakousi ochranou preventivní, která případně zabraňuje šíření choroby dále do rostliny již po jejím napadení a nebrání přímo napadení samotné rostliny.

Jelikož má životní cyklus patogenu *H. fraxineus* stále neobjasněné mezery, je ochrana proti němu i nadále velmi diskutovaným tématem. Jako prozatimní preventivní ochrana mohou sloužit pěstební opatření, jako pěstování jasanů ve směsi s jinými dřevinami a odstraňování již napadených výhonů. Tato opatření jsou ale stále pouze opatřeními preventivními a nezaručují stoprocentní úspěšnost, především tehdy, je-li napadení stromu již v pokročilém stádiu (Košťálová, Sázelová 2010). Dále se jako důležité zdá být ponechávání fenotypově odolnějších jedinců, kteří by byli nositeli odolnějšího genofondu. Také se jako vhodné řešení jeví snížit zastoupení jasanu v porostech s vlhčím mikroklimatem a používat zde jasan jako dřevinu vtroušenou, nikoliv hlavní. Pro brzké zachycení rozvíjející se nákazy je důležité provádět kontroly především v okolí lesních školek, ve výsadbách, kulturách a mlazinách (Havrdová a kol. 2013). Kontrola lesních porostů je však poměrně komplikovaná a lesnická doporučení jsou omezena, aby se zabránilo ztrátám v cenných zralých jasanových porostech (DEFRA 2013).

Dle Havrdové a kol. (2013) v současné době probíhá testování fungicidních přípravků a lze říci, že při objevení prvních příznaků nákazy se doporučuje použití širokospektrálních fungicidů. Obecně by k prvnímu postřiku mělo dojít začátkem léta (konec června) a měl by být opakován dle situace po celý vrchol léta. Dle Grosse et al. (2014) by byl chemický postřik možný u mladých rostlin, nicméně by to bylo kontraproduktivní, protože nemá smysl zachovávat náchylné rostliny, které by po jejich výsadbě mohly posílit epidemii.

Co se opatření pro lesní školky týče, je jednoznačné, že napadený materiál musí být odstraněn. Dále se doporučuje hrabání a pálení, či kompostování opadanky, případně její zapravení do půdy, aby se dosáhlo jejího rychlejšího rozkladu, jelikož je to materiál, ve kterém houba přezimuje. Pěstební plochy je vhodné umisťovat mimo oblasti s trvalým vysokým výskytem infekce a měly by být chráněny vzrostlými porosty bez výskytu jasanu. Pokud to prostředí a provoz školky dovolí, je vhodné pěstovat mladé jasanu na větším počtu menších a od sebe vzdálenějších ploch a co nejvíce snížit vzdušnou vlhkost, která umožňuje klíčení spor (Havrdová a kol. 2013).

Z hlediska biologické ochrany se nabízí možnost výběru rezistentních jedinců a jejich množení a pěstování ve směsích s jinými dřevinami. Byl by tak zabezpečen přenos genetické predispozice odolnosti na další generace (Forestry Commission 2015b). Možností by mohlo být i pěstování nepůvodních, například severoamerických (*Fraxinus americana* L., *Fraxinus nigra* Marsh., *Fraxinus pensylvanica* Marsh.) nebo asijských druhů (*Fraxinus mandhurica* Rupr.) jasanů, ale i u nich byly pozorovány projevy infekce (Kirisits et al. 2012).

Nedávno byla věnována pozornost i rozdílnosti virulence u jednotlivých kmenů *H. fraxineus* (Gross et al. 2014). Mykoviry, které tlumí patogenitu rostlinných patogenních hub, totiž poskytují vynikající modelové systémy pro základní studie vývoje nových biologických kontrolních metod (Ghabrial, Suzuki 2009). Nelze totiž vyloučit, že jasanu budou trpět stejným poškozením, jako kaštanovníky v Severní Americe po zavlečení plísně *Cryphonectria parasitica* (Anagnostakis 1982). V roce 1960 bylo však pozorováno snížení množství poškozených stromů v některých oblastech Itálie. Byla shromážděna a popsána mycelia *C. parasitica*, která se vyznačovala nižší dynamikou růstu a sníženou virulencí a následně bylo zjištěno, že tyto skutečnosti nastaly v následku viru, který zodpovídal za hypovirulenci tohoto patogenu. Hypovirulentní kmeny se pak začaly používat jako prostředek biologické ochrany proti této nákaze a inokula různých ras hypovirulentních kmenů *C. parasitica* byla použita pro úspěšnou léčbu rakovin kaštanovníků (Anagnostakis 1982; Nuss 1992).

Košťálová, Sázelová (2010) uvádějí, že pokud nebudou objasněny otázky způsobu cesty a šíření a také bionomie houby *Ch. fraxinea*, zůstává jediným, pro praxi doporučitelným opatřením, provádění negativních zdravotních výběrů v postižených porostech.

3.5. Výběr a dělení živných médií pro kultivaci houbových organismů in vitro

Živná půda neboli kultivační médium je nejčastějším prostředkem pro kultivaci mikroorganismů v laboratorních podmínkách. Tato média musí odpovídat všem nárokům příslušného mikroorganismu na výživu, pH, osmotický tlak a další fyzikálně-chemické podmínky. Základní složkou všech živných médií je voda, neboť životní pochody probíhají jen ve vodném prostředí, a mimo ni musí být přítomny potřebné živiny ve vhodných koncentracích, které slouží jako zdroj energie, uhlíku, dusíku, fosforu a ostatních biogenních i stopových prvků (Biomikro 2016)

Média lze dělit podle několika hledisek:

Podle konzistence rozlišujeme tekutá média, vhodná pro rozmnožení, nahromadění a oživení kultur, ztužená média, na kterých vytváří mikroorganismy kolonie a média tuhá (brambor, mrkev). Ke ztužování médií se nejčastěji používá agar (přírodní polysacharid z mořských řas), méně často pak želatina nebo křemičitý gel.

Podle původu se dělí na přirozená a umělá. Přirozená média (chléb, mrkev, mléko) se dnes již používají minimálně a jen ke zcela specifickým účelům. Umělá média pak obsahují chemicky definovatelné látky (organické substráty a anorganické soli) a dále i různé extrakty, nebo výluhy některých přírodních materiálů jako zdroj živin, vitamínů či aminokyselin.

Nejvýznamnějším dělením živných půd je však podle účelu jejich použití. Dělíme je tedy na všeobecné, na nichž se rozmnožují velké skupiny mikroorganismů, selektující, které zvýhodňují růst určité skupiny mikroorganismů, nebo půdy diagnostické, na nichž roste jen velmi úzká skupina mikroorganismů. (Purkrťová 2014, Biomikro 2016, Uiozp 2016)

4. Metodika

Metodika této práce je založena na pěti hlavních částech. První část bude věnována izolátům, které byly v experimentální části práce použity, jejich původ a rok získání do ústavních sbírek. Dále budou uvedena živná média, která byla při kultivaci patogenu *H. fraxineus* použita, a jejich příprava. Poté bude zmíněna metodika očkování hub na Petriho misky a jejich kultivace a růst. Ve čtvrté podkapitole budou uvedeny postupy měření a získávání dat pro výzkum a v poslední části budou popsány statistické analýzy použité pro vyhodnocení výsledků.

4.1. Izoláty

V této práci bylo testováno 15 různých, nezávislých kmenů patogenu *H. fraxineus*, které byly odebrány z nekrotických lézí na jedenácti lokalitách. Pět lokalit se nachází v České republice, dále jsou to lokality v Rakousku, Norsku, Belgii a Lotyšsku (viz. Tab. 1). Tyto izoláty byly již dříve využívány ve výzkumu Čermákové (2014), a proto bylo rozhodnuto, že se bude pokračovat v jejich zkoumání, jelikož v předešlých experimentech měly dobrou vitalitu a rychlost růstu. Jednotlivé kmeny byly děleny na světlé a tmavé podle toho, jakou barvu mycelia měly v předešlém výzkumu Čermákové (2014), která se ve své práci, mimo jiné, zabývala také barvou mycelia. Dále jsou zde přidány kmeny s viry.

Každý izolát byl očkován v pěti opakováních na pět různých živných médií a vzniklo tedy 375 kultur. Všechny kmeny pocházejí ze sbírek Ústavu ochrany lesa a myslivosti.

Tab. 1: Seznam izolátů

Označení	Doba odběru	Lokalita	Mycelium
1653	Jaro 2013	Brno, Česká republika	Světlé
1656	Zima 2012	Brno, Česká republika	S viry
1657	Zima 2012	Brno, Česká republika	S viry
1714	Jaro 2013	Třemošnice-Počátky, Česká republika	Světlé
1721	Jaro 2013	Seč-Javoroka, Česká republika	S viry
1723	Jaro 2013	Seč-Javoroka, Česká republika	Světlé
1731	Jaro 2013	Lužické hory, Česká republika	Tmavé
1732	Jaro 2013	Lužické hory, Česká republika	Světlé

Označení	Doba odběru	Lokalita	Mycelium
1734	Jaro 2013	Podolí, Česká republika	S viry
1762	Léto 2013	Belgie	Světlé
BB/1/19	Jaro 2009	Bisamberg, Rakousko	Tmavé
B/Z/1	Podzim 2010	Bizau, Rakousko	Tmavé
LIE/1/7/2	Jaro 2008	Liepaja, Lotyšsko	S viry
NOR 1/23	Léto 2009	Oslo, Norsko	Tmavé
VER 2	Léto 2010	Verditz, Rakousko	tmavé

4.2. Kultivační média

Pro tuto práci bylo využito pět různých živných médií s cílem zjištění, které se nejlépe hodí pro kultivaci *H. fraxineus*. Byla použita média s názvy MEA, AMEA, MOS, PDA a ADA, kdy poslední jmenované bylo vytvořeno poprvé právě pro tento výzkum.

Před výzkumem bylo nutné všechna média připravit, sterilizovat a rozlít do Petriho misek.

Médium MEA (Malt extract agar) [HiMedia, Mumbai, Indie] je používáno pro kultivaci *H. fraxineus* již od jeho prvního výskytu v Evropě a je také nejčastěji používanou kultivační půdou (Botella et al. 2016). Na přípravu 1l tohoto média je třeba smíchat 50g malt extract agaru v prášku s 1l sterilní destilované vody. Médium AMEA bylo připraveno podle Kirisitse et al. (2013), a je modifikací MEA, které bylo pouze obohaceno o 50g sušených jasanových listů (tyto listy však mohou být i čerstvé nebo zmražené). MOS, tedy Modified orange serum bylo připraveno dle Müllera et al. (1994) z 8g malt extraktu [Sigma-Aldrich, USA], 8g dextrózy [Sigma-Aldrich, USA], 9g technického agaru No. 3 [Oxoid, Hampshire, UK], 30g orange séra [Sigma-Aldrich, USA] a opět 1l destilované vody. Médium PDA (Potato dextrose agar) [HiMedia, Mumbai, Indie] vzniklo smícháním 39g PDA prášku a 1l destilované vody. A konečně médium ADA, tedy Ash dust agar, které má svůj základ v médiu ESA (elm sapwood agar) podle Brasiera (1981), které bylo používáno pro kultivaci patogenu *Ophiostoma ulmi*. Bylo zde použito 30g technického agaru No. 3, 50g najemno pomletých jasanových větví a 1l destilované vody.

Médium ADA se však od média ESA liší tím, že nebylo použito pouze bělové dřevo, ale i kůra větví. Ty měly začerstva průměr přibližně 5 mm a poté byly sušeny 12 hodin v 80 °C a rozemlety mlýnkem Retsch SM300 (Retsch, Haan, Německo) na velikost částic přibližně 0,5 mm.

Po navážení a namíchání následuje sterilizace v autoklávu. Proto byly baňky, ve kterých byla média namíchána, překryty silnou aluminiovou fólií (viz. Obr. 12) a sterilizovány při teplotě 120 °C po 20 minut.

Po sterilizaci byla média rozlita do Petriho misek o průměru 90 mm, kdy na každou misku připadá přibližně 20 ml média (viz. Obr. 13). V případě média ADA bylo toto v baňce při nalévání neustále promícháváno, aby se jasanová drť rovnoměrně rozprostřela po celém objemu média. Celé nalévání probíhalo v tzv. flow-boxu, který udržuje aseptické prostředí, a to proto, aby se zamezilo jakékoliv kontaminaci média cizorodými mikroorganismy.



Obr. 12: Médium AMEA v baňce vyjmuté z autoklávu (archiv autorky, 8. 1. 2015)



Obr. 13: Média v Petriho miskách (archiv autorky, 8. 1. 2015)

4.3. Očkování a kultivace

Veškeré očkování probíhalo ve flow-boxu. Nejprve bylo nutné tzv. oživit izoláty, které byly uchovány ve sbírkách. Proto byl každý izolát nejprve ve dvou opakovaných naočkováních na médium MEA, aby se rozrostl a dalo se z něj poté odebrat více mycelia pro další opakování na všech médiích.

Po přibližně dvou týdnech, kdy se všechny izoláty dostatečně rozrostly, bylo možno přistoupit k samotnému očkování na jednotlivá média. Proto bylo vybráno vždy 5 misek od každého média a do jejich středu bylo naočkováno inokulum mycelia o průměru 7 mm, vykrojeného speciálním očkovačím nástrojem. Všechny nástroje přitom musely být neustále sterilizovány, aby nedošlo ke kontaminaci mezi jednotlivými miskami. Po naočkování byla vždy miska uzavřena parafilmem a označena názvem izolátu, média a datem očkování (viz. Obr. 14).

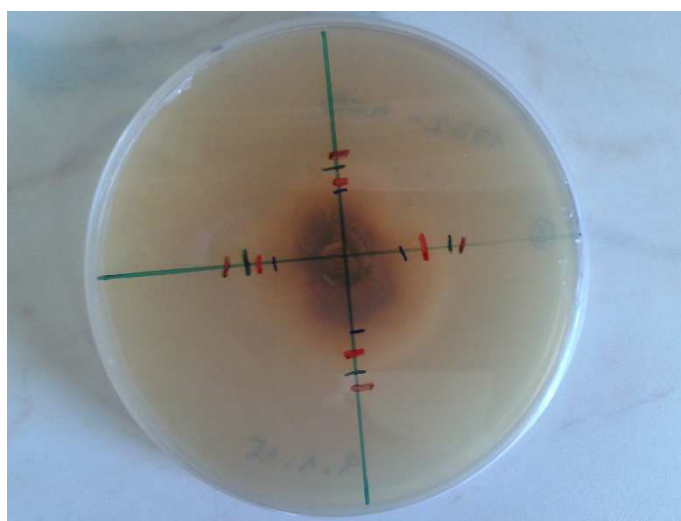
Po naočkování všech misek byly tyto uloženy do termostatu a zde byly potmě kultivovány při teplotě 25 °C. Protože *H. fraxineus* patří spíše k pomalu rostoucím patogenům, začalo mycelium narůstat přibližně kolem 2. až 3. týdne kultivace, kdy započalo měření. V této teplotě zůstaly misky po dobu 6 týdnů, přičemž v této době již došlo v některých případech k dosažení okraje misky.



Obr. 14: Kmen NOR/1/23 na médiu PDA (archiv autorky, 3. 2. 2015)

4.4. Měření

Aby bylo možno přirůstající mycelium měřit, na každou misku byl ze spodní strany nakreslen kříž se středem ve středu naočkovaného kolečka. Měření probíhalo v prvních dvou týdnech pouze jednou za týden, poté, v dalších 4 týdnech byly přírůsty měřeny dvakrát týdně, a to pomocí pravítka. Na kříži byly kresleny různě barevné značky, aby bylo jasně zřetelné místo posledního měření (viz. Obr. 15). Ze změřených hodnot byla počítána plocha přírůstu podle vzorce $\pi (d_1 d_2) 4^{-1}$ (Santamaria et al. 2004), kde d_1 a d_2 jsou dva na sebe kolmé průměry. Hodnoty byly vždy zaznamenávány pomocí programu Excel.



Obr. 15: Značky pro měření (archiv autorky, 3. 2. 2015)

4.5. Statistické analýzy

Média byla porovnávána za pomoci obecného lineárního modelu. V případě vyššího počtu srovnávaných proměnných byl pak proveden Fisherův test významnosti. Statisticky významný rozdíl byl potvrzen nebo vyvrácen pomocí P hodnoty. Data nebyla normální a tak bylo nutné je nejprve transformovat na normální rozdělení pomocí logaritmické funkce tak, aby data vykazovala co možná nejnižší hodnotu d a hodnoty $p > 0,05$. Všechny analýzy byly provedeny pomocí programu STATISTICA 12 (StatSoft). Následně byly v tomto programu vytvořeny grafy průběhu růstu mycelia na jednotlivých médiích, aby bylo dosaženo co možná největší transparentnosti výsledků.

5. Výsledky

5.1. Primární data a průběh růstu

Celkově bylo pozorováno 375 vzorků za použití pěti různých kultivačních médií a patnácti kmenů. Jeden z kmenů NOR/1/23 musel být v průběhu experimentu vyřazen, jelikož nevykazoval žádné, nebo neměřitelné přírůsty, a tak by nepříznivě ovlivnil konečné výsledky.

Tabulky s primárními daty jsou zaznamenány jako příloha 10.3 na CD-ROM s přílohami, soubor Primární data. Již v primárních datech můžeme pozorovat, že na médiu ADA vykazovala mycelia ve většině případů rychlejší růst, než u ostatních médií, a nejčastěji se také stávalo, že mycelium zarostlo celou miskou (dosáhlo tedy průměru 8,5 cm). U některých kmenů byl růst rychlý i na médiích AMEA a MOS. Mycelia na médiu PDA již podle počátečních měření zaostávala za ostatními.

V kapitole 10.1 Průběh růstu kmenů na jednotlivých médiích můžeme pozorovat, jak růst postupoval od počátku měření. Je zde zřetelné, že u kmenů 1653, 1721, BB 1/19, LIE 1/7/2 a VER2 byly měřeny největší přírůsty již od počátku na médiu ADA. U kmene 1656 se nejvyšší přírůsty vyskytovaly současně na médiu ADA i MOS, nakonec však růst na médiu ADA kulminoval ve vyšších hodnotách. Kmen 1657 vykazoval zpočátku nejlepší růst na médiu AMEA, později však byly přírůsty vyšší na médiu MOS. U kmene 1714 byl pozorován poměrně vyrovnaný růst na všech médiích, ve druhé polovině měření však začalo mycelium růst nejlépe na médiu ADA. Průběh růstu kmene 1723 byl v počátcích poměrně vyrovnaný s mírně vyššími přírůsty na médiu AMEA, od počátku třetího týdne měření však kmen na médiích MEA, AMEA a PDA přestal růst, nebo vykazoval jen velmi malé přírůsty, médium MOS vykazovalo přírůsty o něco vyšší a na médiu ADA rostl kmen bez problémů a s poměrně velkými přírůsty ještě více jak týden. Kmen 1731 rostl od počátku nejlépe na médiu MOS. Na médiu ADA byl u tohoto kmene růst z počátku velmi pomalý, od půlky druhého týdne však začala rychlost vzrůstat, až se médium dostalo na druhé místo hned za MOS. Pro kmen 1732 se ukázala zpočátku jako nejlepší média AMEA a ADA, kdy AMEA mělo mírnou převahu, což se změnilo v půlce druhého týdne měření a až do konce pak bylo nejlepším médiem ADA. U kmene 1734 byl růst na všech médiích velmi vyrovnaný. Jako nejlepší se nakonec ukázala média ADA a PDA, na kterých mycelium vytvořilo téměř stejnou křivku růstu. PDA zde bylo jedním z nejlepších médií jako u jediného

kmene. Růst kmene 1762 byl velmi podobný jako u kmene 1732 s prvotně vyšším růstem na médiu AMEA a pozdějším zvýšením přírůstků na médiu ADA. Kmen B/Z/1 vykazoval od počátku nejlepší růst na médiu AMEA.

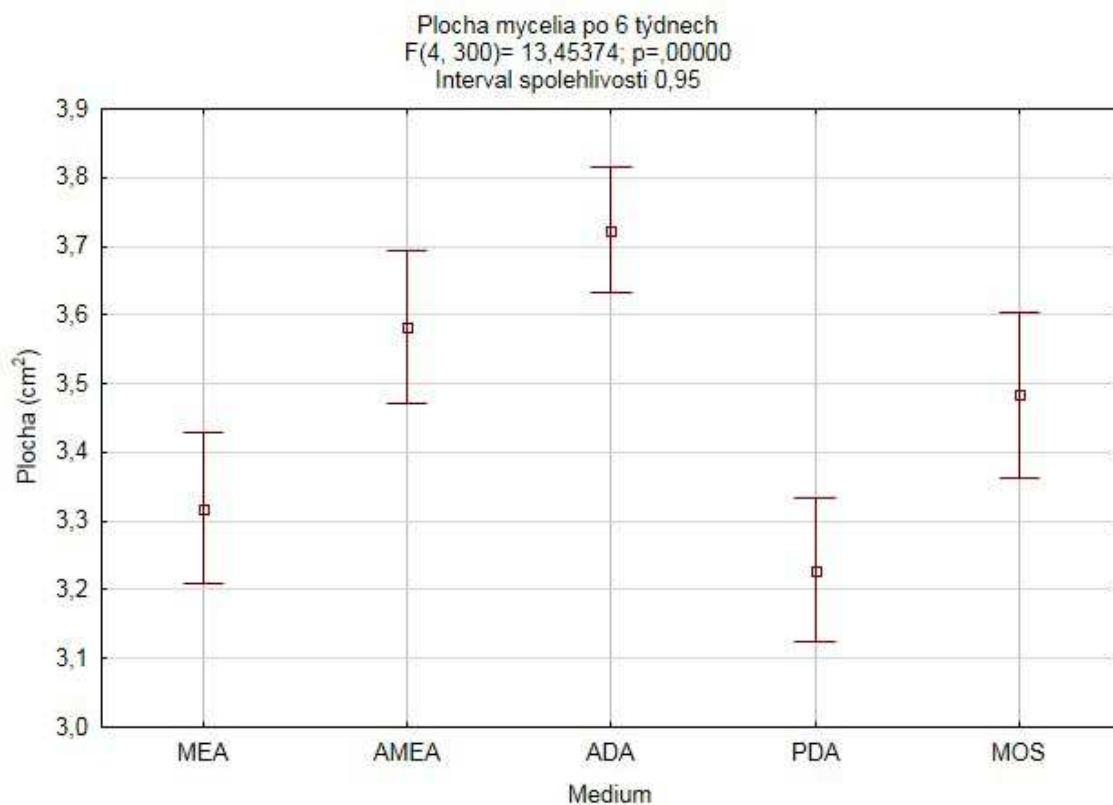
Co se týče kmenů s viry (1656, 1657, 1721, 1734, LIE 1/7/2), nelze podle grafů průběhu růstu ani dle primárních dat říci, že by viry nějakým způsobem ovlivňovaly růst mycelia. Rychlost růstu byla srovnatelná s ostatními kmeny bez virů.

Z grafů průběhu růstu je zřetelné, že médium ADA je kvalitním médiem, kdy na něm houba roste nejlépe od počátku, nebo má výrazný vzestup růstu přibližně po dvou týdnech kultivace. I médium AMEA se zde ukázalo jako velmi vhodné pro přestování patogenní houby *Hymenoscyphus fraxineus*. Obě dvě tato média obsahují rostlinné části jasanu (AMEA sušené listy, ADA rozdrčené větévky), na kterém se tento patogen vyskytuje.

5.2. Srovnání médií

Po vyhodnocení dat pomocí programu STATISTICA došlo ke zjištění, že mezi některými médii jsou statisticky významné rozdíly.

Post-hoc analýza ukázala, že na médiu ADA narostla po 6 týdnech kultivace největší plocha mycelia. Poté následovala média AMEA ($p=0,03$), MOS, MEA a PDA ($p<0,001$) s podstatně menší plochou mycelia (viz. Obr. 16). Nebyly zjištěny významné rozdíly mezi médii AMEA a MOS, které vykazovaly podobnou rychlost růstu, což naznačuje, že MOS by mohl být vhodnou alternativou pro kultivaci *H. fraxineus* v laboratorních podmínkách. Ani mezi médii MEA a PDA nebyla zjištěna významná rozdílnost. Médium PDA se ve výzkumu ukázalo jako spíše nevhodné pro kultivaci této patogenní houby.

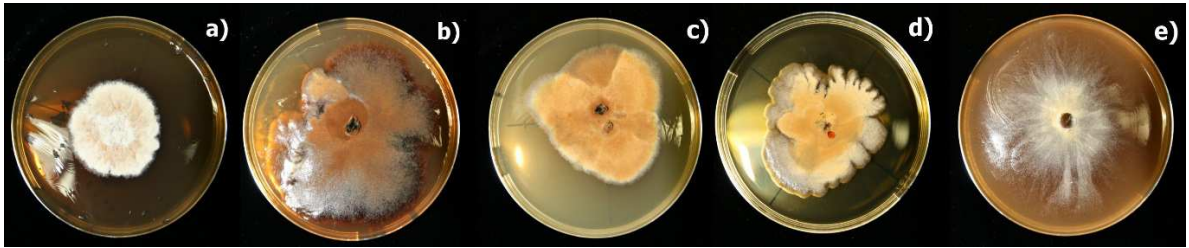


Obr. 16: Graf plochy mycelia po 6 týdnech kultivace

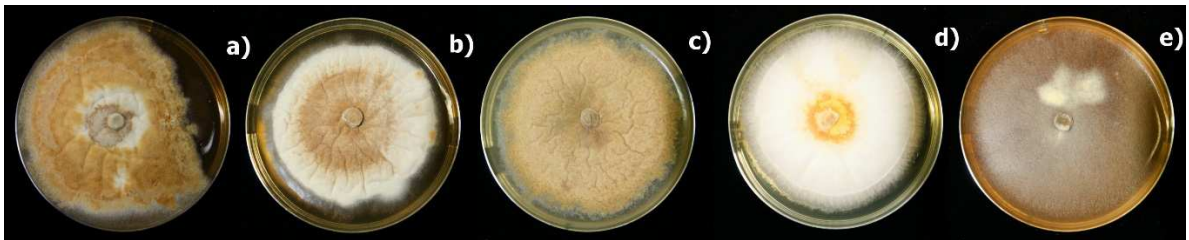
5.3. Barva mycelia a její souvislost s rychlostí růstu

V této práci nebyl zjištěn žádný vliv barvy na rychlost růstu mycelia. Nebyl pozorován ani vztah barvy s použitým médiem, jelikož mycelia vykazovala velkou variabilitu barvy i textury přesto, že všechny vzorky byly inkubovány ve stejných podmínkách. Nebylo tedy možné potvrdit předchozí dělení kmenů na světlé a tmavé (viz. Obr. 17, 18) a tedy i domněnku, že světlé kmeny rostou rychleji, než tmavé. Na těchto obrázcích můžeme pozorovat, že ačkoliv byl kmen 1653 dříve zařazen mezi kmeny se světlým myceliem, vyskytuje se tu celá škála barev od téměř bílé až po tmavě hnědou. Stejně tak je tomu i u kmene VER 2, který byl řazen mezi kmeny s tmavým myceliem. Variabilita se vyskytovala nejen v rámci kmene na různých médiích, ale i v rámci kmene na jednom médiu (viz. Obr. 19). Nicméně na médiu ADA byl pozorován zvláštní růst mycelia, kdy toto tvořilo pouze jemné povlaky na povrchu, s občasně mírně vystupujícími bílými tečkami, a spíše vrůstalo dovnitř média. Barva mycelia se také pohybovala spíše ve světlých barvách, kdy mycelium často až splynulo s barvou

media, ne příliš do hněda (viz. Obr. 20). Byla zde tedy zjištěna největší rovnoměrnost růstu mycelia, co se barvy a textury týče.



Obr. 17: Kmen 1653 na médiu: a) AMEA, b) MEA, c) MOS, d) PDA, e) ADA (archiv autorky, 26. 2. 2015)



Obr. 18: Kmen VER 2 na médiu: a) AMEA, b) MEA, c) MOS, d) PDA, e) ADA (archiv autorky, 26. 2. 2015)



Obr. 19: Variabilita mycelia kmene VER 2 na médiu MOS (archiv autorky, 26. 2. 2015)



Obr. 20: Textura mycelia na médiu ADA (archiv autorky, 26. 2. 2015)

6. Diskuze

Výsledky uvedené v této práci se shodují s výzkumem Kirisitse et al. (2013), který uvedl, že *H. fraxineus* a *H. albidus* vykazovaly vyšší rychlost růstu na médiu AMEA ve srovnání s médiem MEA. Podobná pozorování provedli i Brasier, Webber (2013), kterým většina kultur rostla rychleji na médiu ASA (ash sapwood agar), než na médiu MEA. Na médiu PDA pak kultury rostly pomalu a kompaktně. V této studii však nebyla zjištěna statisticky vyhodnocena. V mém experimentu bylo zjištěno, že médium MOS je, co se růstu kultur týče, srovnatelné s médiem AMEA, tudíž by mohlo být další vhodnou alternativou pro pěstování *H. fraxineus* v laboratorních podmínkách. Média ADA a AMEA obsahují části zdravých stromů *F. excelsior* (ADA větvičky, AMEA suché listy), což by mohlo vést k domněnce, že se zde bude vyskytovat určitý stupeň rezistence média vůči růstu mycelia. Přítomnost částí hostitelského organismu se však jeví jako přínos pro růst mycelia. U některých jedinců *F. excelsior* se projevuje genetická odolnost (Cleary et al. 2014; McKinney et al. 2014), tudíž by mohlo být zajímavé zkoumat, zda tato genová diverzita ovlivňuje růst *H. fraxineus* na těchto dvou médiích. Park et al. (2005) uvádí, že rychlost růstu mohou ovlivňovat viry, kterými je houba nakažena. Proto bylo pro tuto práci vybráno pět kmenů s viry. Nebyl však pozorován výrazně odlišný růst oproti kmenům bez virů. Toto odpovídá poznatkům Čermákové (2014), která nenašla statisticky významný vliv virů na růst mycelia. VanAlfen, Kazmierczak (2008) publikovali, že houbové viry obvykle nejsou spojeny s jasně definovanými příznaky, což může být důvodem, proč se kmeny s viry chovaly v mém experimentu stejně, jako kmeny bez nich. Podle Kowalskiho, Bartnika (2010) rostla většina kolonií lépe při inkubaci ve 20 °C, proto by se další výzkum mohl provádět v nižších teplotách s dalším pozorováním průběhu růstu na různých médiích.

Ve srovnání s popisem morfologických znaků mycelia u Kowalskiho, Bartnika (2010), Kirisitse et al. (2013) a Brasiera, Webbera (2013) se kultury v této práci značně lišily ve tvaru, barvě a textuře mycelia. Nebyl zde však pozorován žádný vztah mezi barvou mycelia a živným médiem, jelikož barvy jednotlivých kultur se měnily nejen s médiem ale i v rámci jednoho média (viz. Obr. 19), ačkoliv byly všechny kultury kultivovány ve stejných podmínkách. Z tohoto důvodu nelze ani potvrdit předešlé dělení kmenů podle Čermákové (2014) na světlé a tmavé, jelikož žádný z kmenů se nevyznačuje pouze světlým nebo tmavým odstínem mycelia. Kowalski, Bartnik (2010) uvádějí, že vliv na barvu mycelia může mít i teplota, ve které je kultivováno, a dokonce

je jedním z hlavních faktorů, ovlivňujících celkovou morfologii mycelia. Zjistili, že téměř bílé mycelium roste spíše v teplotách 5 a 10 °C (z 85 a 75 %), bílo-hnědá mycelia v teplotách 15 a 20 °C (ze 78,3 a 90 %), a hnědá až tmavě hnědá při teplotě 25 °C (z 66,7 %). Tento poznatek by tedy směřoval k závěru, že při kultivaci v 25 °C by převažovala hnědá barva mycelia. Po provedení experimentu se ukázalo, že světlá mycelia se zde vyskytovala v 35%, středně tmavá (bílo-rezavá) v 36 % a tmavá v 29 %. Nevyskytla se zde výrazná převaha ani jednoho typu mycelia a tmavá se dokonce vyskytovala v nejméně případech. Jelikož byly barvy mycelia v této práci, ale i ve výzkumu Čermákové (2014) a Kowalskiho, Bartnika (2010) hodnoceny pouze vizuálně podle zvolené škály, mohlo by být zajímavým přínosem použít k vyhodnocování například přístroj na principu spektrofotometru, který měří skutečnou barvu vzorku na základě pohlcování světla různých vlnových délek. Kowalski, Bartnik (2010) dále uvádějí, že sporulace konidií probíhá spíše v nižších teplotách (5-15 °C), kdy se mycelium zbarví na okraji do šeda, a že kolonie inkubované ve 20 °C začaly sporulovat po jejich přesunu do teploty 5 °C. Při inkubaci ve 25 °C, která probíhala v této práci, došlo ke zbarvení okraje pouze u 1 % mycelií (viz. Obr. 21), tudíž lze předpokládat, že *H. fraxineus* potřebuje ke sporulaci nižší teploty. Tato skutečnost souhlasí s tvrzením Kirisitse et al. (2009), který uvádí, že v přírodních podmínkách se konidie tvoří v zimě, tedy za nízkých teplot.



Obr. 21: Mycelium s šedým okrajem značícím sporulaci (archiv autorky, 26. 2. 2015)

7. Závěr

V bakalářské práci bylo zhodnoceno 375 vzorků patogenu *H. fraxineus* zařazených do 15 kmenů a kultivovaných na pěti různých médiích. Byl zhodnocen jejich růst v závislosti na médiu a barvě mycelia.

Hodnocené kmeny byly získány z nekrotických lézí ze stromů v České republice, Rakousku, Belgii, Norsku a Lotyšsku. Po naočkování na pět živných médií byla po šest týdnů sledována a měřena dynamika růstu mycelií. Z výsledků bylo vyvozeno, že médiem s nejrychlejším růstem mycelia je médium ADA (ash dust agar). Dalšími médii s poměrně rychlým růstem jsou pak AMEA a MOS. Z těchto poznatků vyplývá, že média, která obsahují části jasanu (AMEA listy, ADA nadrcené větévky) jsou vhodným substrátem pro pěstování *H. fraxineus* v laboratorních podmínkách. Médium MOS se pak jeví jako vhodná alternativa, jelikož růst mycelia na něm byl bez statistického rozdílu od média AMEA. Naopak médium PDA se zde jeví jako spíše nevhodné, jelikož růst na něm byl pomalý, především v první polovině doby kultivace.

Mycelium bylo hodnoceno také z hlediska barvy, jelikož kmeny byly do experimentu vkládány jako rozdělené do tří skupin na světlé, tmavé a kmeny s viry. Byla hodnocena závislost rychlosti růstu na barvě mycelia a přítomnosti virů. Během experimentu měla mycelia poměrně vysokou barevnou variabilitu, a proto nemohlo být potvrzeno, že kmeny patří striktně mezi tmavé nebo světlé. Nemohla tak být potvrzena hypotéza, že světlé kmeny rostou rychleji, než tmavé. Také nebyl pozorován vliv virů na růst mycelia, kdy kmeny s viry neměly nijak odlišnou dynamiku růstu oproti kmenům bez nich. Nelze ani usuzovat, že by média AMEA, MEA, MOS a PDA měly vliv na zbarvení mycelia. Nicméně na médiu ADA má mycelium zcela charakteristický růst, kdy je téměř transparentní, nebo má bílou barvu s občasnými tmavšími tečkami. Dále je po vizuálním posouzení patrné, že mycelium prorůstá spíše dovnitř média a neroste po povrchu, jak tomu je u jiných médií.

Zkoumání rychlosti růstu *H. fraxineus* a jeho myceliálních charakteristik na různých živných médiích prohlubuje naši znalost kultivačních metod. Srovnání pěti různých kultivačních médií pak poskytuje cenné informace pro výzkumné pracovníky, kteří tak mohou vybrat nejlepší médium pro různé účely výzkumu. Všechny tyto skutečnosti jsou cenné z důvodu nutnosti dalšího poznání patogenu, který je stále poměrně novým a neprozkoumaným problémem v celé Evropě.

8. Summary

Fifteen independent isolates of the pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* (with five repetitions each) were cultured on five different media. In total, the growth rate and colour of the mycelium were evaluated in 375 strains.

Rated strains were obtained from necrotic lesions of ash trees in the Czech Republic, Austria, Belgium, Norway and Latvia. After inoculation on five nutrient media the rate of growth of the mycelia was monitored and measured for a six weeks. From the results it was concluded that the medium with the fastest growth rate was the medium named ADA (ash dust agar). Other media with relatively fast growth were AMEA and MOS. These results indicate that the media containing parts of ash (AMEA leaves and ADA twigs) are a suitable substrate for the cultivation of *H. fraxineus* in laboratory conditions. MOS medium can be a suitable alternative, because the growth of mycelium has no statistical difference from media AMEA. Conversely, PDA medium seems rather unsuitable, because the growth was slow, particularly in the first half of the experiment.

The colour of *H. fraxineus* mycelium was also evaluated and the strains were divided into three groups - bright, dark and strains with viruses. The dependence of growth rate on the colour of the mycelium and viruses was evaluated. However, during the experiment mycelia had relatively high colour variability, and therefore it could not be strictly confirmed if the strain belonged to dark or light group. Thus, it could not be confirmed the hypothesis that the bright strains were faster-growing than the dark ones, as suggested in previous work. Also, there was no effect of virus presence on the growth of mycelium; strains with virus did not have different growth dynamics compared with strains without them. Nor can it be assumed that the media AMEA, MEA, and PDA MOS should affect the colour of mycelium. Only, on ADA medium the mycelium colour was quite characteristic, nearly transparent, or white colour with occasional darker dots. Furthermore, mycelium seems to penetrate rather into the medium and does not grow on the surface, as it is the case with other media.

The description of *H. fraxineus* growth rate and its mycelial characteristics using different nutrient media furthers our knowledge of cultivation methods. In addition, the comparison of five nutrient media provides information for researchers to be able to properly select one of them for distinct intended purposes. All these facts are valuable

because of the need for further understanding of the pathogen, which is still relatively new and unexplored problem throughout Europe.

9. Literatura

- ANAGNOSTAKIS, S. L., 1982. Biological control of chestnut blight. *Science*. 215. 466e–471.
- ATLAS POŠKOZENÍ DŘEVIN, 2014. *Hymenoscyphus fraxineus*-nekróza jasanu [online]. Citováno 4. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <http://atlasposkozeni.mendelu.cz/atlas/436-nekroza_jasanu/>.
- 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. 284–92.
- BARAL, H. O., QUELOZ, V., HOSOYA, T., 2014. *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus* (International Mycological Association). 5 (1). 79-80.
- BENGTSSON, S. B. K., VASAITIS, R., KIRISITS, K., SOLHEIM, H., STENLIDA, M., 2009. Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. *Fungal Ecology*. 5 (2). 147-153.
- BIOMIKRO, 2016. Laboratoř mikrobiologie [online]. Citováno 17. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://biomikro.vscht.cz/vyuka/lm/skriptalab.pdf>>.
- BOTELLA, L., ČERMÁKOVÁ, V., BAČOVÁ, A., DVOŘÁK, M., 2016. ADA, a fast-growth medium for *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forest Pathology*. 46. 85-87.
- BRASIER, C. M., 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. In: Stipes RJ, Campana, RJ eds. *Compendium of elm diseases*. St. Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society. 76–79.
- BRASIER, C.; WEBBER, J., 2013. Vegetative incompatibility in the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its ecological implications. *Fungal Ecology*. 6. 501– 512.
- CABI, 2015. *Hymenoscyphus fraxineus* (ash dieback) [online]. Citováno 4. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/108083>>.

CLEARY, M. R., 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.

CLEARY, M. R., ANDERSSON, P. F., BROBERG, A., ELFSTRAND, M., DANIEL, G.; STENLID, J., 2014. Genotypes of *Fraxinus excelsior* with different susceptibility to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and their response to the phytotoxin viridiol - A metabolomic and microscopic study. *Phytochem*. 102. 115–25.

ČERMÁKOVÁ, V., 2014. Occurrence of Putative dsRNA Mycoviruses in Ash Dieback Causal Agent. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně: Lesnická a dřevařská fakulta. 47s.

DEFRA, 2013. *Chalara* Management Plan (Department for Environment Food & Rural Affairs, ed.). London: Department for Environment Food & Rural Affairs.

DAVYDENKO, K. et al., 2013. Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus* S. Woodward, ed. *Forest Pathology*. 43. 462–467.

EUFORGEN, 2015. *Fraxinus excelsior* – Distribution map [online]. Citováno 2. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <http://www.euforgen.org/distribution_maps.html>.

FORESTRY COMMISSION, 2015a. *Chalara* ash dieback symptoms [online]. Citováno 4. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.forestry.gov.uk/forestry/inf92ahuk/>>.

FORESTRY COMMISSION, 2015b. *Chalara* dieback - Managing ash trees and woodland [online]. Citováno 3. 4. 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.forestry.gov.uk/forestry/INFD-92PJKX#top>>.

FRAXIGEN, 2016. *Fraxinus angustifolia* – Ash distribution [online]. Citováno 2. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <http://herbaria.plants.ox.ac.uk/fraxigen/ash/ash_distribution.html>.

GHABRIAL, S. A., SUZUKI, N., 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 47. 353–384.

- 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., HOLDENRIEDER, O., PAUTASSO, M., QUELOZ, V., SIEBER, T. N., 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the casual agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*. 15(1). 5-21.
- HALMSCHLAGER, E., KIRISITS, T., 2008. First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology*. 57. 1177.
- HAVRDOVÁ, L., ČERNÝ, K., PEŠKOVÁ, V., 2013. *Hymenoscyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C. R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber et O. Holdenrieder (anamorfa *Chalara fraxinea* T. Kowalski). *Nekróza jasanů. Lesnická práce* 92/6; Příloha 4.
- HUSSON, C., SCALA, B., CAËL, O., FREY, P., FEAU, N., IOOS, R., MARÇAIS, B., 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *Eur. J. Plant Pathology*. 130. 311–324.
- JANKOVSKÝ, L., HOLDENRIEDER, O., 2009. *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. *Plant Protection Science*. 45. 74–78.
- JANKOVSKÝ, L., ŠŤASTNÝ, P., PALOVČÍKOVÁ, D., 2009. *Nekróza jasanů Chalara fraxinea* v ČR. *Lesnická práce*. 88 (1). 16-17.
- JANKOVSKÝ, L., PALOVČÍKOVÁ, D., 2009. Nový příklad chřadnutí dřevin v ČR – nekróza jasanů [online]. Citováno 4. 3. 2016, Dostupný na World Wide Web: <<http://zahradaweb.cz/novy-priklad-chradnuti-drevin-v-cr-nekroza-jasanu/>>.
- JANKOVSKÝ, L., ŠŤASTNÝ, P., PALOVČÍKOVÁ, D., CHLEBICKA, M., 2010. Contemporary situation on Ash dieback in the Czech Republic. EPPO [online]. Citováno 26. 3. 2016. Dostupný na World Wide Web: <http://archives.eppo.int/MEETINGS/2010_conferences/chalara/10_Jankovski/index.html>.

- 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., KRITSCH, P., KRAUTLER, K., MATLAKOVA, M., HALMSCHLANGER, E., 2012. Ash dieback associated with *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in forest nurseries in Austria. Journal of Agricultural Extension and Rural Development. 4(9). 230-235.
- KIRISITS, T.; DAMPFLE, L.; KRAUTLER, K., 2013. *Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and display slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media. Forest Pathology. 43. 386–389.
- KOŠŤÁLOVÁ, V., SÁZELOVÁ, D., 2010. Chřadnutí a odumírání jasanů. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, Praha. 8 s.
- KOWALSKI, T., 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology. 36. 264–270.
- 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 Agrobotany. 63. 99–106.
- LYGIS, V., VASILIAUSKAS, R., LARSSON, K. H., STENLID, J., 2005. Wood inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. Scand. J. Forest Res. 20. 337–346.

- McKINNEY, L. V., NIELSEN, L. R., COLLINGE, D. B., THOMSEN, I. M., HANSEN, J. K., KJAER, E. D., 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology*. 63. 485–499.
- McNEILL, J., et al., 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). [Regnum vegetabile no. 154.] Königstein: Koeltz Scientific Books.
- MÜLLER, M. M., KANTOLA, R., KITUNEN, V., 1994. Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycol. Res.* 98. 593– 603.
- MZE, 2015. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2014, Praha. 107 s.
- NÁROVEC, V., TREJTNAROVÁ, J., JANČAŘÍK, V., 2008. Čeká jasany chřadnutí?. (Are ash stands expected to decline?). *Lesu zdar (Hradec Králové)* č. 5. 14. 4-6.
- NUSS, D., 1992. Biological Control of Chestnut Blight: an Example of Virus- Mediated Attenuation of Fungal Pathogenesis. *Microbiological reviews*. 56. 561–576.
- OGRIS, N., HAUPTMAN, T., JURC, D., 2009. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *New Disease Reports*. 19.
- PARK, Y., CHEN, X., PUNJA, Z. K., 2005. Molecular and biological characterization of a mitovirus in *Chalara elegans (Thielaviopsis basicola)*. *Phytopathology*. 96. 468–479.
- PRZYBYŁ, K., 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology*. 32. 387-394.
- PURKRTOVÁ, S., 2014. Kultivační metody v potravinářské mikrobiologii [online]. Citováno 17. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2014-03-14_Kultivacni_metody.pdf>.
- QUELOZ, V., GRUNIG, C., BERNDT, R., KOWALSKI, T., SIEBER T., HOLDENRIEDER, O., 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*. 41. 133–142.

ROZSYPALEK, J., 2012. Nekróza jasanů *Chalara fraxinea* – fenologie, bionomie, charakteristika symptomů, rozšíření v oblasti Kroměřížska a Zlínska. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně: Lesnická a dřevařská fakulta. 103 s.

RYTKÖNEN, A., LILJA, A., DRENKHAN, R., GAITNIEKS, T., HANTULA, J., 2011. First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. *Forest pathology*. 41. 169–174.

SELIKHOVKIN, A. V., MUSOLIN, D. L., LUKMAZOVA, E. A., 2013. Situation with ash in Russian Federation: stand characteristics, health condition, ongoing work and research needs. In: Interim Report from *Chalara fraxinea*, FRAXBACK Meeting in Vilnius, 13–14 November 2012 (Mainprize, N., Hendry, S. and Weir, J., eds). 34–35. Bristol: Forestry Commission.

SANTAMARIA, O., PAJARES, J. A., DIEZ, J. J., 2004: Physiological and morphological variation of *Gremmeniella abietina* from Spain. *Forest Pathology*. 34. 395–405.

SCHUMACHER, J., WULF, A., LEONHARD, S., 2007. Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski in Deutschland. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 59 s.

SCHUMACHER, J., KEHR, R., LEONHARD, S., 2010. Mycological and historical investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*. 40. 419-429.

SZABO', I., 2008. First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. *New Disease Reports*. 18.

ŠIMÍČEK, V., 1999. Břehové a doprovodné porosty vodních toků, MZe ČR, Agrospoj, Praha. 102 s.

TALGØ, V., SLØRSTAD, T., SLETTEN, A., STENSVAND, A., 2008. Soppen som ein meiner fører til askeskotsjuka i store delar av Europa er no funnen i Østfold. *Bioforsk. Tema*. 3. 1–5.

THOMSEN, I., M., SKOVSGAARD, J., P., BARKLUND, P., VASAITIS, R., 2007. Svampesygdom er årsag til toptørre i ask [A fungal disease is the cause of dieback of ash]. Skoven. 5. 234–236.

UIOZP, 2016. Základy mikrobiologické práce [online]. Citováno 17. 3. 2016. Dostupné na World Wide Web: <uiozp.ft.utb.cz/studmat/2008912142943/Úloha1.doc>.

ÚRADNÍČEK, L., CHMELARŤ, J., 1995. Dendrologie lesnická. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 98 s.

ÚRADNÍČEK, L. 2014. Dendrologie: (společenstva a významné dřeviny ČR). Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 143 s.

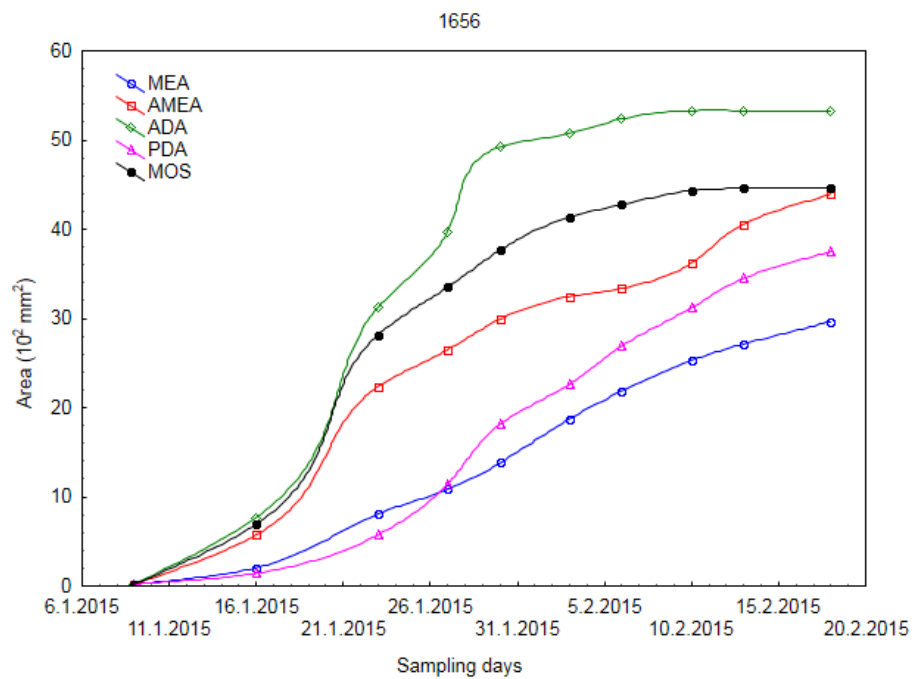
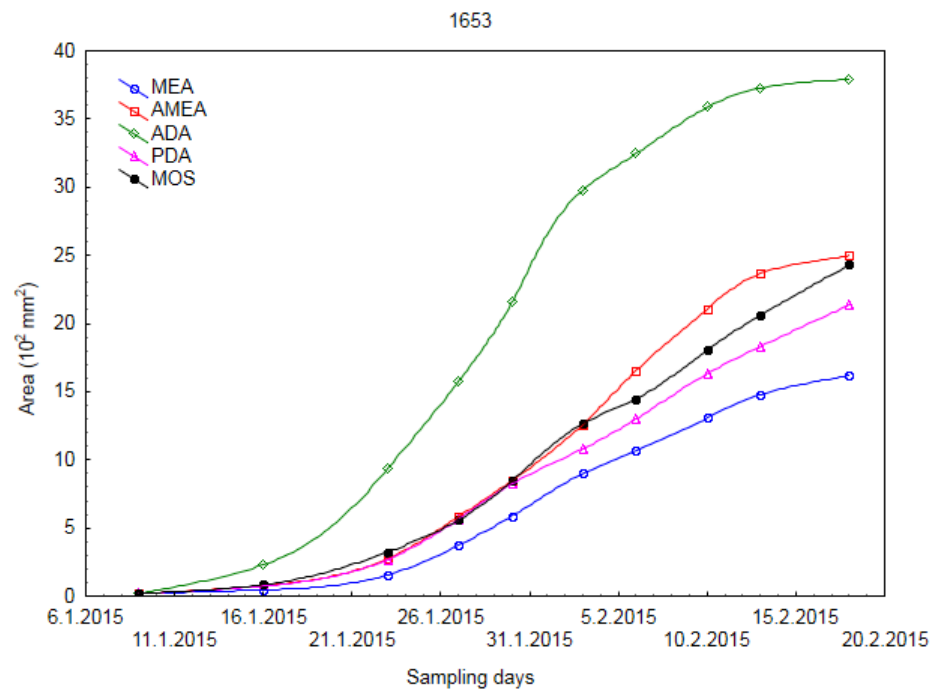
VAN ALFEN, K., N., KAZMIERCZAK, P., 2008. *Hypovirulence*. In MAHY, B. AND REGENMORTEL, M. V. et al. Desk encyclopedia of plant and fungal virology. London, Academic. 530 - 535.

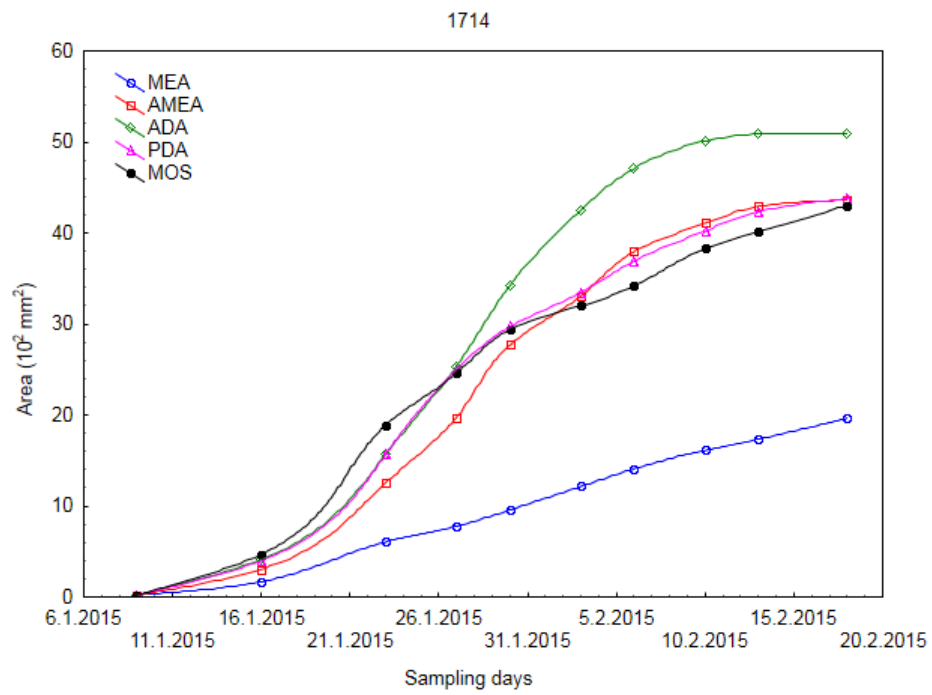
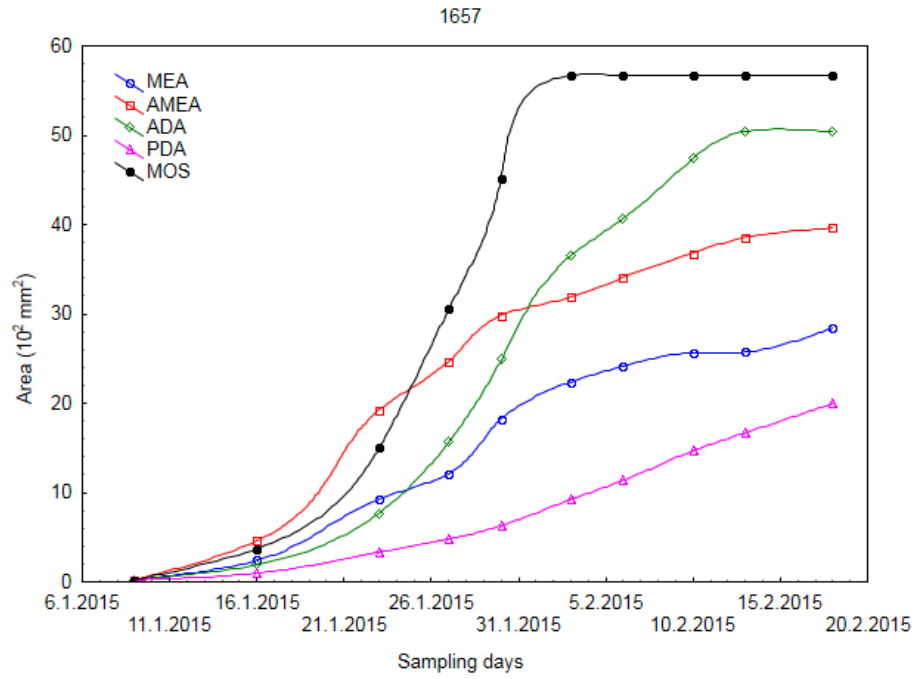
WANG, Z., BINDER, M., SCHOCH, C. L., JOHNSTON, P. R., SPATAFORA, J. W., HIBBETT, D. S., 2006. Evolution of helotialean fungi (*Leotiomyces*, *Pezizomycotina*): a nuclear rDNA phylogeny. Mol. Phylogenet. Evol. 41. 295–312.

ZHAO, Y. J., HOSOYA, T., BARAL, H. O., HOSAKA, KAKISHIMA, M., 2012. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. Mycotaxon. 122. 25-41.

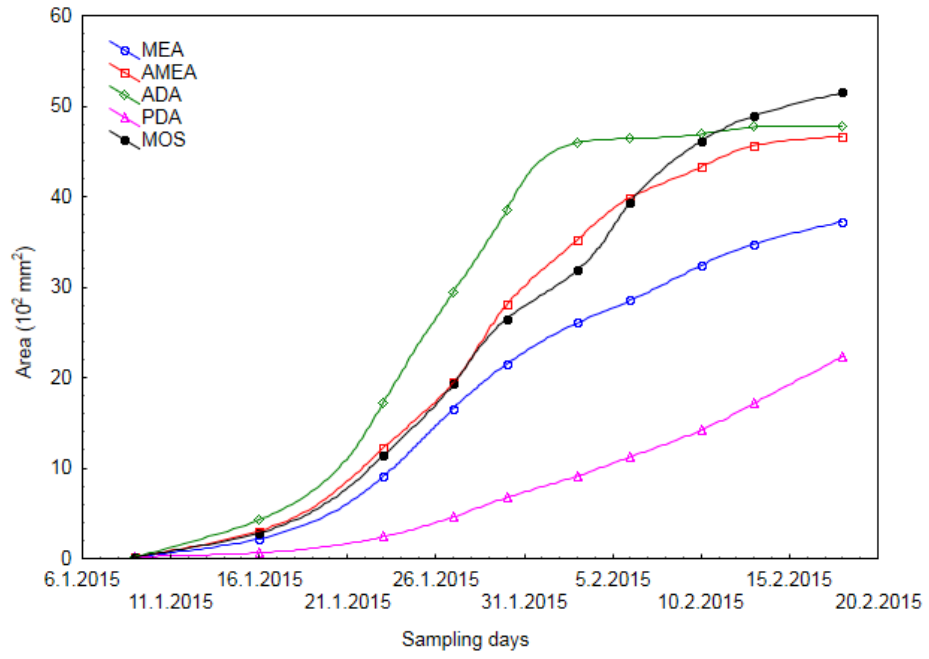
10. Přílohy

10.1. Průběh růstu kmenů na jednotlivých médiích

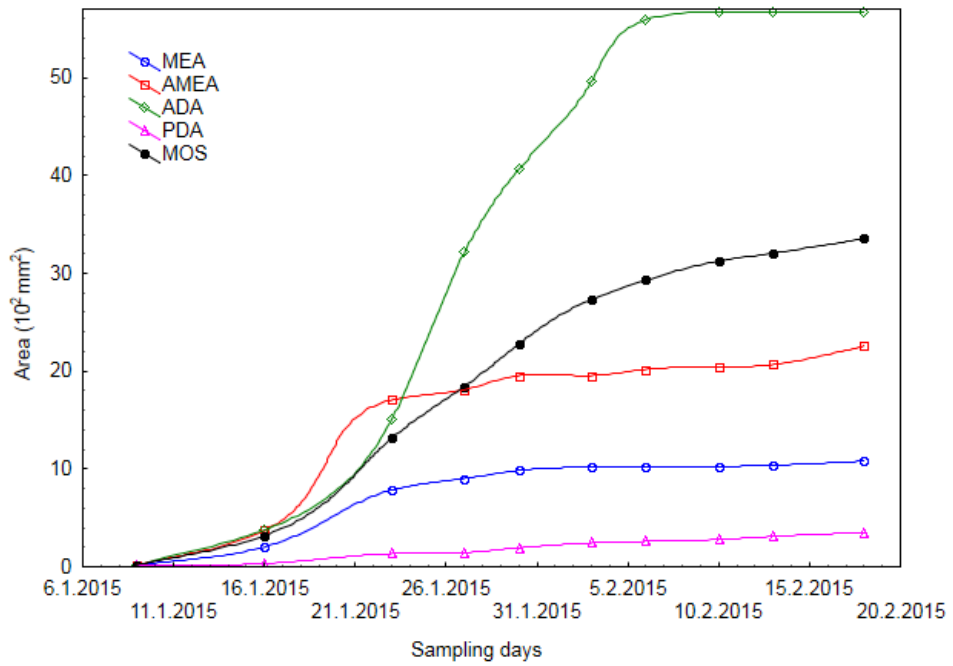




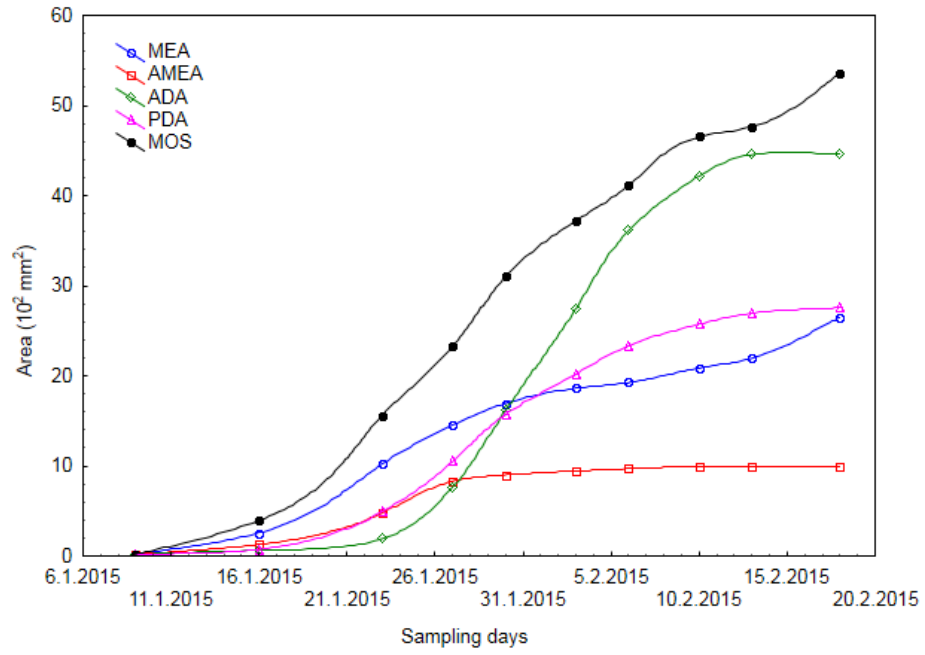
1721



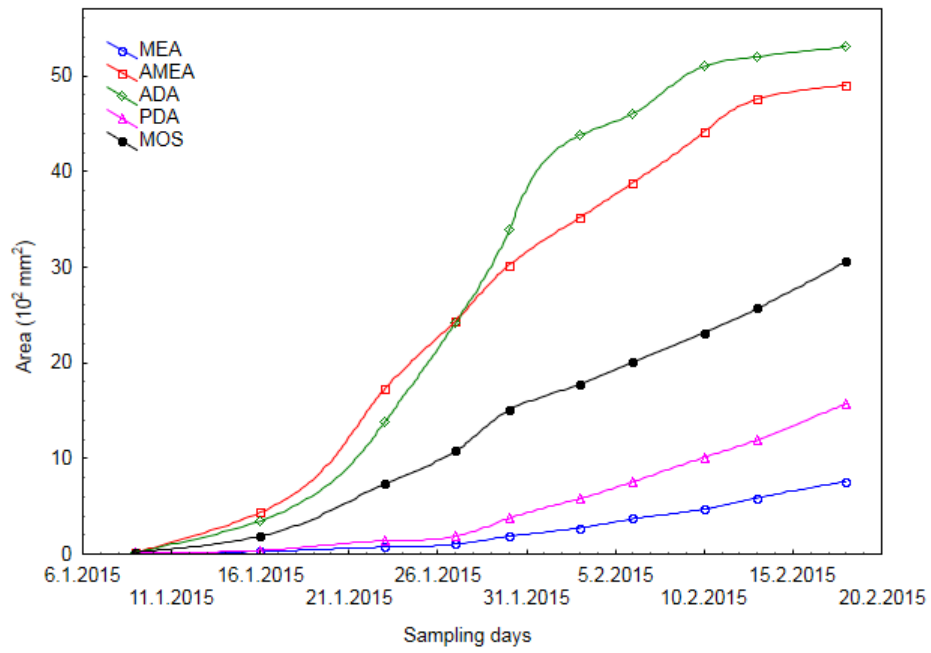
1723



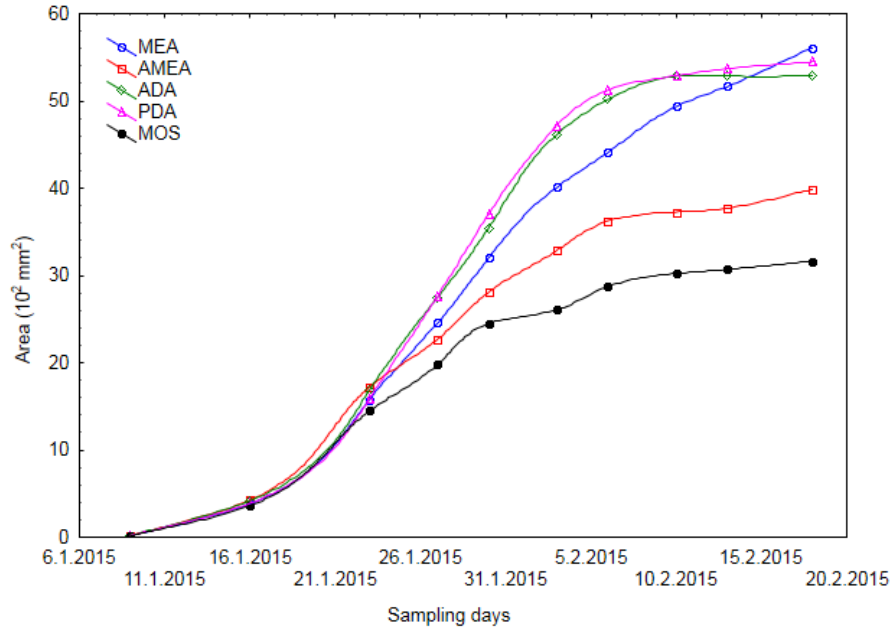
1731



1732



1734



1762

