

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Česká zemědělská
univerzita v Praze

Genetická diverzita jasanu ztepilého

Bakalářská práce

Autor: David Chludil

Vedoucí práce: Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

David Chludil

Lesnictví

Lesnictví

Název práce

Genetická diverzita jasanu ztepilého

Název anglicky

Genetic diversity of European ash

Cíle práce

Cílem bakalářské práce s rešeršním aspektem je provést důkladný rozbor vědeckých publikací zabývajících se posuzováním genetické struktury a diverzity populací jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior* L.). Důraz bude kladen na analýzu genetické diverzity v souvislosti s tzv. odumíráním jasanu, chorobou způsobenou patogenem *Hymenoscyphus fraxineus/Chalara fraxinaea*.

Dalším cílem (analytická část práce) je porovnání variantních přístupů k analýze genetické informace jasanu ztepilého, které byly v minulosti publikovány.

Metodika

Bude proveden důkladný rozbor vědeckých zdrojů týkajících se analýzy genetické diverzity jasanu ztepilého, a to v obecné rovině, a dále s důrazem na posuzování genetické diverzity v souvislosti s chorobou způsobenou houbou *Hymenoscyphus fraxineus/Chalara fraxinaea*.

V analytické části práce budou porovnány jednotlivé metodické přístupy. Budou uvedeny jejich výhody/nevýhody a rozdíly v charakteru generované genetické informace. Budou porovnány vhodné postupy pro analýzu genetické informace neutrální povahy a pro analýzu související s genetickou podmíněností odolnosti vůči patogenu.

Harmonogram práce: Do konce listopadu 2020 bude vypracována literární rešerše bakalářské práce a bude rozpracována osnova analytické části. Do konce ledna 2021 bude sestaven podrobný popis variantních přístupů, které jsou využívány pro analýzu genetické informace rodu *Fraxinus*.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

genetická diverzita, jasan ztepilý, chřadnutí a odumírání jasanu

Doporučené zdroje informací

- Enderle, R., Stenlid, J., & Vasaitis, R. (2019). An overview of ash (*Fraxinus* spp.) and the ash dieback disease in Europe. *CAB Rev*, 14, 1-12.
- Ferrazzini, D., Monteleone, I., & Belletti, P. (2007). Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Ann For Sci*, 64(2), 159-168.
- Fussi, B., & Konnert, M. (2014). Genetic analysis of European common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations affected by ash dieback. *Silvae Genet*, 63(1-6), 198-212.
- Genome-wide epigenetic variation among ash trees differing in susceptibility to a fungal disease
- Heuertz, M., Hausman, J. F., Hardy, O. J., Vendramin, G. G., Frascaria-Lacoste, N., & Vekemans, X. (2004). Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, 58(5), 976-988.
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol*, 11(10), 424-429.
- Lefort, F., Brachet, S., Frascaria-Lacoste, N., Edwards, K. J., & Douglas, G. C. (1999). Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*). *Mol Ecol*, 8(6), 1088-1089.
- McKinney, L. V., Nielsen, L. R., Hansen, J. K., & Kjær, E. D. (2011). Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (*Oleraceae*) to *Chalara fraxinea* (*Ascomycota*): an emerging infectious disease. *Heredity*, 106(5), 788-797.
- Papi, R. M., Spanos, K. A., & Kyriakidis, D. A. (2012). Genetic variation of *Fraxinus angustifolia* natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Eur J For Res*, 131(4), 1151-1161.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B. (2007). *Forest Genetics*. CABI, Wallingford.
-

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 25. 10. 2020

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc., Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 10. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 18. 04. 2021

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Genetická diverzita jasanu ztepilého“ vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, že zveřejněním bakalářské 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 20. 4. 2021

David Chludil

Poděkování:

Chtěl bych touto cestou poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Koreckému, Ph.D. za možnost zpracovávat zajímavé téma. Zároveň mu patří velký dík za ochotu, vstřícnost a trpělivost při vedení mé práce a řešení různých dílčích problémů, které postupem času vyvstaly. Dále bych rád poděkoval doc. Ing. Vítězslavě Peškové, Ph.D. za cenné rady a poskytnutí odborné literatury, týkající se fytopatologické části mé práce. Kromě toho bych rád poděkoval svému příteli Mgr. Robertu Helmovi, Ph.D. za pomoc s odbornou a stylistickou stránkou mé práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu při studiu a vytvoření vhodného zázemí, díky kterému tato bakalářská práce mohla vzniknout.

Abstrakt

Hymenoscyphus fraxineus je zavlečený patogen ohrožující jasan ztepilý, který plní důležitou ekologickou funkci převážně v porostech na březích vodních toků. Nákaza existuje stále relativně krátce a kvůli tomu, že se jí dlouhou dobu nevěnovala větší pozornost, nemáme doposud mnoho dat. Proto není snadné odhadovat budoucnost jejího šíření a dopad na jasanové porosty. Ovšem kvůli tomu, jak rychle se rozšiřuje patogen i celkové chřadnutí stromů lze usuzovat, že bude docházet k úplnému rozpadu porostů a masivnímu úbytku jasanů v evropských lesích. Stěžejní proto do budoucna bude podpora diverzity jasanových porostů a případných geneticky rezistentních jedinců. Toto se jeví jako hlavní nástroje, které mohou jasan v Evropě zachránit.

Cílem práce „Genetická diverzita jasanu ztepilého“ je zhodnotit dosavadní poznatky o genetické podmíněnosti rezistence vůči patogenu *Hymenoscyphus fraxineus*. Kromě toho byla práce zaměřena na porovnání různých metodických postupů, vhodných pro analýzu genetické diverzity a rezistence proti patogenu.

Teoretická část práce byla zpracována rešerší odborné literatury, která byla v minulosti publikována. V analytické části byla zpracována a vzájemně porovnána metodika studií, které využívaly mikrosatelitové a SNP markery a markery založené na rozdílné genové expresi.

Rešerší odborné literatury bylo zjištěno, že populace jasanů mají relativně vysokou genetickou diverzitu, a na druhou stranu *H. fraxineus* má velmi nízkou genetickou diverzitu. Zdá se, že existuje geneticky podmíněná rezistence, která je ovšem individuální a její mechanismus nebyl spolehlivě prokázán. V analytické části byly navrženy metodické postupy, vhodné pro různé typy budoucího výzkumu.

Hlavním zjištěním bakalářské práce tedy je, že existuje geneticky podmíněná rezistence proti *H. fraxineus* u individuálních stromů, a zároveň evropské populace jasanu disponují relativně vysokou genetickou diverzitou. Díky tomu bude možné identifikovat rezistentní stromy. Ty mohou sloužit pro zakládání odolných porostů, které budou mít zároveň vysokou genetickou diverzitu. To umožní adaptaci na případné budoucí hrozby. Zároveň na základě analytické části bude možné sestavit vhodnou metodiku pro mou diplomovou práci.

Klíčová slova: genetická diverzita, jasan ztepilý, *Hymenoscyphus fraxineus*, odumírání a chřadnutí jasanu, molekulární markery

Abstract

Hymenoscyphus fraxineus is the introduced pathogen endangering the European ash, which has a significant role ecology-wise, mainly as a part of riparian forests. There are not many related data available yet, as the disease is known only for a short period of time, and it did not receive much attention since it was discovered. It is therefore difficult to assess the future impact on ash covers. However, the decay of stands and major decline of the *Fraxinus excelsior* in European forests may be expected, considering the rate of pathogenic spreading and the withering of the trees. The support of diversity in the European ash stands and the genetically resistant individuals is crucial to reverse the ash dieback and prevent the ash from becoming extinct in Europe.

The aim of the thesis „Genetical diversity of European ash“ is to evaluate the current findings regarding the genetically induced resistance to pathogen *Hymenoscyphus fraxineus*. This thesis also focuses on comparing various methodical approaches suitable for analysing gene diversity and pathogenic resistance.

The theoretical part of the thesis is based on the compilation of the published scientific literature. For the purpose of solving the analytical part was evaluated and compared the methodology of studies, employing microsatellite and SNP markers and markers based on different gene expression.

The analysis of scientific literature has concluded that the ash populations have relatively high gene diversity, although *H. fraxineus*'s gene diversity is considerably low. It appears that there is genetically induced resistance, which is, however, only individual, and its mechanism has never been reliably proven. In the analytical part were suggested methodical approaches suitable for various types of future research.

The major conclusions of this bachelor's thesis are the existence of genetically induced resistance to *H. fraxineus* found in individual trees and the fact that the European ash tree populations are endowed with relatively high gene diversity. Both resistance to mentioned fungus and high gene diversity would enable the identification of resistant trees. Those may be used for planting resilient stands with high gene diversity, allowing the adaptation to any possible future threats. The eligible methodology for my diploma thesis will also be based on the analytical part of the thesis.

Keywords: gene diversity, European ash, *Hymenoscyphus fraxineus*, dying back and withering of ash, molecular markers

Obsah

1	Úvod	13
2	Cíle práce.....	15
3	Rešeršní část – rozbor problematiky	16
3.1	Historie genetiky a významných objevů	16
3.2	Obecná genetiky a molekulární biologie.....	18
3.2.1	Popis a stavba nukleových kyselin.....	18
3.2.2	Kódující a nekódující nukleové kyseliny	22
3.2.3	Centrální dogma molekulární biologie.....	22
3.2.4	Analytické laboratorní techniky	25
3.2.5	Genetické markery	29
3.3	Jasan ztepilý (<i>Fraxinus excelsior L.</i>)	35
3.3.1	Taxonomické zařazení.....	35
3.3.2	Biologie a základní popis	36
3.3.3	Geografické a vertikální rozšíření	37
3.3.4	Ekologie a enviromentální funkce.....	40
3.3.5	Využití v průmyslu a sadovnictví.....	41
3.4	Genetická diverzita jasanu	43
3.5	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	47
3.5.1	Historie rozšíření a identifikace patogenu.....	47
3.5.2	Faktory zhoršující zdravotní stav a průběh nemoci.....	49
3.5.3	Ekologie a životní cyklus	51
3.5.4	Možná obrana	53
3.6	Genetická diverzita <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	55
3.7	Náchylnost jasanu vůči napadení <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	57
4	Analytická část	62
4.1	Mikrosatelitové markery	62

4.2	Asociativní transkriptomika a identifikace SNP	66
4.3	Návrh metodického postupu pro návaznou diplomovou práci	70
5	Diskuse	72
6	Závěr.....	77
7	Seznam zdrojů a použité literatury	78

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Přirozené zastoupení jednotlivých dřevin v ČR a vývoj skutečného zastoupení v průběhu let	39
Tabulka 2 - Zastoupení různých mikrosatelitů, použitých ve vybraných studiích	63

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Primární struktura DNA	20
Obrázek 2 - Příklad typické sekundární struktury DNA	21
Obrázek 3 - Transkripce a posttranskripční úpravy mRNA	24
Obrázek 4 - Schéma transkripce a translace	25
Obrázek 5 - Zařízení na gelovou elektroforézu a vkládání vzorků do jamek.....	26
Obrázek 6 - Výsledek gelové elektroforézy	27
Obrázek 7 - Schéma PCR	29
Obrázek 8 - Metoda Southern blotting	32
Obrázek 9 - Příklad SNP	34
Obrázek 10 - Areál rozšíření jasanu ztepilého	38
Obrázek 11 - Jasanová pálka Hurl	42
Obrázek 12 - Zastoupení jednotlivých demů v Evropě	45
Obrázek 13 - Životní cyklus <i>H. fraxineus</i>	52
Obrázek 14 – Srovnání poškozeného a zdravého stromu	53
Obrázek 15 - Rozdíly v náchylnosti vůči <i>H. fraxineus</i> (SNP).....	69

Seznam použitých zkratk

A – adenin

Alozymy – aloenzymy. Enzymy, které jsou kódovány různými alelami v rámci jednoho lokusu. Liší se strukturou, ale zastávají stejnou funkci

bp (base pairs) – jednotka vyjadřující jeden pár báze v polynukleotidovém řetězci

C – cytosin

cpDNA – chloroplastová DNA

CTAB – cetrimoniumbromid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouřetězcová DNA

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EID (emerging infectious diseases) – choroby, které díky změně geografického areálu hostitele nebo evolučních změn mají vysokou virulenci

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) – Evropská a Středozevní Organizace Ochrany Rostlin

G – guanin

GEM (gene expression marker) – markery (různé) genové exprese

Indel – označený pro mutace inserce (přidání nukleotidu do řetězce) a delece (odebrání nukleotidu z řetězce)

Isozymy – izoenzymy. Často se zaměňují za aloenzymy (viz aloenzymy). Také mají stejnou funkci, ale jsou kódovány různými geny

mRNA – mediátorová RNA

nDNA (nuclear DNA) – jaderná DNA

PCR (polymerase chain reaction) – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní PCR (v reálném čase)

qRT-PCR – kvantitativní PCR s procesem reverzní transkripce

RAPD (random amplification of polymorphic DNA) – náhodná amplifikace polymorfní DNA

RFLP (restriction fragment length polymorphism) – polymorfismus délky restrikčního fragmentu

RNA – ribonukleová kyselina

RPKM (reads per kilobase million) – readů na kilobázi, vydělených milionem. Jednotka, která udává počet readů, vzniklých ze sekvenování, normalizovaných na stanovenou délku fragmentu. Díky tomu není tato jednotka ovlivněna různou délkou fragmentů.

rRNA – ribozomová RNA

RT-PCR – PCR s procesem reverzní transkripce

SNP (single nucleotide polymorphism) – polymorfismus jednoho nukleotidu

SSR/STR (simple sequence repeat/simple tandem repeat) – označení převážně pro mikrosatelity

T – thymin

TBE pufr – pufr, který obsahuje látky: Tris, kyselinu boritou a EDTA

tRNA – transferová RNA

U – uracil

UTR – nepřekládané části genu při translaci

VNTR (variable number tandem repeats) – variabilita v různém počtu tandemové repetice

1 Úvod

V posledních letech rezonuje ve veřejném prostoru převážně kůrovcová kalamita, která postihuje smrk, což byla dlouhá léta nejoblíbenější a nejrozšířenější hospodářská dřevina. Kvůli tomu byly některé další hrozby, ohrožující lesní porosty, odsunuty do ústraní a zabývají se jimi pouze úzké odborné kruhy. Je pravda, že tyto hrozby ohrožují převážně dřeviny, které nejsou hospodářsky tolik významné, ale jejich ignorování by bylo neuvážené, protože pomáhají zvyšovat biodiverzitu, která se ukazuje jako klíčová pro existenci stabilních lesů, a zároveň tvoří významné porosty s mimoprodukčními funkcemi, např. při zpevnování břehů řek (Rozsypálek *et al.*, 2017). Obzvláště významné hrozby jsou tzv. emerging infectious diseases (EIDs). EIDs, tedy rozvíjející se infekční nemoci, zahrnují patogeny, které dříve nebyly známy nebo nebyly pro danou oblast významné a jsou velmi virulentní. V rozvinutí takto vysoké virulence hraje roli několik faktorů. Těmito faktory může být zavlečení patogenu do nové geografické oblasti, změna hostitele nebo evoluční změny vedoucí k vyšší virulenci (Anderson *et al.*, 2004). Činnost člověka jako zvyšující se globalizace, globální změny klimatu, pěstování monokulturních lesů a s tím spojené snížení biodiverzity, napomáhá k vytvoření vhodných podmínek pro tyto patogeny (McKinney *et al.*, 2011). Jedním z nejznámějších případů epidemie způsobené introdukovaným patogenem je grafióza jilmu, zapříčiněná patogeny z rodu *Ophiostoma*, která decimuje celé porosty jilmů v jejich přirozeném prostředí (Harper *et al.*, 2016).

Ještě nedávno byl jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior L.*) považován za relativně bezproblémovou dřevinu (Havrdová *et al.*, 2013). Jasanu nehrozilo významné riziko, které by mohlo způsobit masivnější odumírání. Mezi některými lesníky dokonce převažoval názor, že se jedná o invazivní a nežádoucí dřevinu (Rozsypálek *et al.*, 2017). Vznikající problém začínal být zaznamenáván na začátku 90. let minulého století v severovýchodním Polsku, kde byly poprvé pozorovány symptomy nově se rozvíjející choroby. Ovšem genetické studie naznačují, že se choroba rozšířila na evropském kontinentu o několik desetiletí dříve (Enderle *et al.*, 2019). Organismus, který způsobuje onemocnění, nejčastěji pojmenované jako chřadnutí nebo odumírání jasanů, nebyl dlouho známý. Původce choroby byl identifikován až v roce 2006 jako anamorfa *Chalara fraxinea* (Kowalski, 2006). Později byl domácí saprofyt jasanů *Hymenoscyphus albidus* označen jako teleomorfní stádium patogenu, způsobující chřadnutí a odumírání jasanů (Kowalski

a Holdenrieder, 2009). Pozdější analýzy ukázaly, že se nejedná o domácí a neškodný organismus, ale o zavlečený patogen původem z dálného východu *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Queloz *et al.*, 2011), následně přejmenovaný na *Hymenoscyphus fraxineus* (Baral *et al.*, 2014).

Častým důvodem, proč mají zavlečené patogeny konkurenční výhodu, a proč jsou velmi virulentní, je ten, že jejich hostitelé se vedle nich nevyvíjeli, nejsou na ně adaptovaní, a proto jsou vůči nim zranitelní. To je případ i patogenu způsobujícího odumírání jasanů. Velmi virulentní *H. fraxineus* a téměř totožný, leč prakticky neškodný, *H. albidus* mají podobný životní cyklus. Oba parazitují na řapících listu. Zásadním rozdílem je, že *H. albidus* postupuje pomalu a díky tomu nezpůsobí jasanu žádné významné škody, kdežto *H. fraxineus* postupuje po řapících velmi rychle a proniká do dřevních částí (Downie, 2017). To má za následek tvorbu nekrot v dřevních pletivech a řídnutí korun, což je nakonec pro strom fatální (Enderle *et al.*, 2019). *H. fraxineus* působí velké škody v jasanových porostech. Významným faktorem zvyšujícím náchylnost vůči patogenu je nízká genetická diverzita, která zhoršuje schopnost adaptace vůči novým patogenům (McKinney *et al.*, 2011).

Od objevu patogenu bylo provedeno mnoho tradičních pokusů k zastavení epidemie odumírání jasanů, které byly většinou neúspěšné (Enderle *et al.*, 2019). Naději skýtají studie, které objevily stromy, jež v oblastech se silným epidemiologickým tlakem nebyly vůbec nebo jen mírně poškozeny. Kdyby tato rezistence byla geneticky podmíněná, a tedy dědičná, bylo by možné založit nové porosty, které by byly odolné vůči tomuto patogenu (McKinney *et al.*, 2014). Jako vhodný nástroj k identifikaci stromů vhodných pro křížení a novou výsadbu, které by přispěly porozumění mechanismu tvorby této rezistence, se jeví molekulární markery (Sambles *et al.*, 2017).

2 Cíle práce

Základním cílem předkládané bakalářské práce bylo shrnout vědecké poznatky týkající se problematiky epidemie odumírání jasanů, způsobené patogenem *H. fraxineus*. Zvláštní důraz byl kladen na roli genetiky v řešení tohoto problému. Bakalářská práce může být dále využita jako náhled pro odbornou i laickou veřejnost do problematiky epidemie *H. fraxineus*. Zároveň bude sloužit jako teoretický základ pro zpracování diplomové práce na obdobné téma, které bych chtěl v navazujícím studiu zpracovávat.

Práce je rozdělena na dvě části. První část obsahuje souhrn poznatků z dosud publikované odborné literatury, popisující biologii hostitelské dřeviny jasanu ztepilého, jeho význam pro různé lesní ekosystémy a možnosti jeho využití pro různé mimoprodukční funkce i využití samotného jasanového dřeva. Jedna z dalších kapitol se zaměřuje na historii šíření, biologii, životní cyklus a možnosti obrany vůči patogenu *H. fraxineus*. Mezi hlavní témata teoretické části patří popis genetické diverzity jasanu ztepilého i *H. fraxineus*, zhodnocení různé náchylnosti jasanu vůči tomuto patogenu a míry genetické podmíněnosti této resistance. Nedílnou součástí též je kapitola pojednávající o souvislostech z obecné genetiky, potřebných pro pochopení více komplexních témat, které se v práci vyskytují.

Druhá část práce je analytického charakteru, zabývá se popisem a porovnáním jednotlivých metodických postupů pro analýzu genetické informace neutrální povahy a analýzu související s rezistencí vůči zkoumané nákaze. Tato kapitola také obsahuje popis konkrétních genetických markerů, využívaných při identifikaci jedinců tolerantních vůči nákaze.

Výsledkem práce je zhodnocení míry genetické podmíněnosti resistance vůči nákaze, návrhy možné aplikace poznatků v praxi a porovnání identifikace rezistentních jedinců za pomoci molekulárních markerů s více tradičními postupy (např. identifikace za pomoci fenotypových znaků). Zásadním výstupem analytické části je návrh metodiky pro navazující diplomovou práci.

3 Rešeršní část – rozbor problematiky

3.1 Historie genetiky a významných objevů

Prvopočátky toho, kdy si lidé uvědomili, že se určité rysy dědí z generace na generaci, sahají až do pravěku. Existují důkazy, že již první civilizace si schovávaly semena s kvalitnějším fenotypem pro sadbu v dalších letech. Díky tomu byli lidé schopni vytvořit odrůdy s lepšími vlastnostmi. Kolem roku 1000 před Kristem byla tímto způsobem domestikována většina důležitých hospodářských plodin. Tyto plodiny byly svým vzhledem velmi podobné těm dnešním. Je pozoruhodné, že toho lidé dosáhli bez větších znalostí genetiky (White *et al.*, 2007). I přes to, že povědomí o přenosu určitých rysů a jeho využití ve šlechtitelství měli naši předci již od pravěku, tak vědy jako genetika nebo molekulární biologie jsou poměrně mladé a dost jejich oblastí je stále neobjasněno. Základy genetiky, jak ji známe dnes, byly položeny v druhé polovině 19. století, kdy několik badatelů zkoumalo procesy křížení. Zásadní výsledky však přinesl moravský kněz a přírodovědec Johann Gregor Mendel, který v roce 1866 publikoval svoji práci „Pokusy s rostlinnými hybridy“. Na základě svého výzkumu stanovil tři zákony popisující pravidla dědičnosti, které se používají dodnes. Mendelovým objevům se dlouhou dobu nevěnovala větší pozornost a za svého života se nedočkal většího uznání. Význam jeho práce si uvědomili až vědci Hugo de Vries, Carl Correns a Erich von Tschermak, kteří nezávisle na sobě znovuobjevili Mendelův výzkum a zákony, které zavedl (Dodson, 1955). Na jejich práci navázal William Bateson, který Mendelovy publikace přeložil do angličtiny a zpopularizoval jeho práci (Keynes a Cox, 2008).

Mendelovská genetika byla bez diskuse zásadní pro pochopení dědičnosti znaků, ovšem neobjasnila uložení genetické informace a principy dědičnosti na buněčné úrovni. Ke konci 19. století začala být morfologie chromozomů a proces mitózy a meiózy obecně známá. Na začátku 20. století začali někteří vědci spojovat chromozomy s variabilitou a dědičností a označili chromozomy jako nositele Mendelovských faktorů (Allen, 2003). Spojení Mendelovské genetiky s chromozomy bylo mnohými vědci nejdříve odmítáno, ale její pochopení na buněčné úrovni vedlo k významným objevům, např. k lokalizaci genů v rámci buňky, hlubšímu porozumění Mendelových zákonů, procesu zvanému crossing-over, který zajišťuje větší variabilitu potomstva nebo principu mutací jako lokální změny chromozomu (Gayon, 2016).

Během první poloviny 20. let bylo uskutečněno mnoho objevů v oblasti genetiky, ovšem molekulární povaha genů stále ještě nebyla objasněna. Někteří vědci se domnívali, že nositeli genů jsou proteiny, protože jsou to komplexní látky s pozoruhodnými katalytickými vlastnostmi (Gayon, 2016). Ve 40. letech si začali vědci uvědomovat důležitost molekuly DNA. O této nukleové kyselině bylo povědomí již od 19. století, ale její funkce zůstávala dlouho neznámá. Prvním významným výzkumem byl Averyho-MacLeodův-McCartyho experiment, kde vědci použili DNA získanou z kmene mrtvých virulentních pneumokoků pro transformaci nevirulentního kmene na virulentní. Tento experiment dokázal, že DNA má roli v přenosu genetické informace. Naprosto zásadní byl objev Jamese Watsona a Francise Cricka, kteří v roce 1953 popsali strukturu dvoušroubovice DNA, za což mimo jiné později obdrželi Nobelovu cenu. Znalost struktury DNA umožnila rychlý rozvoj oboru molekulární biologie a uskutečnění významných objevů na poli genetiky (Gayon, 2016). Brzy poté byla objevena tripletová povaha genetického kódu a způsob, jakým informace obsažená v DNA vede k syntéze proteinů. V 70. a 80. letech bylo zavedeno mnoho molekulárních metod, které se používají dodnes (White *et al.*, 2007). Mezi tyto metody patří použití tzv. restrikčního enzymu nebo polymerázová řetězová reakce (PCR), která se používá téměř ve všech oblastech biologického výzkumu.

3.2 Obecná genetika a molekulární biologie

3.2.1 Popis a stavba nukleových kyselin

Molekula, vhodná k uchování a přenosu genetické informace musí splňovat několik klíčových vlastností. Musí být velmi stabilní, aby genetická informace v rámci přenosu mezi velkým počtem generací zůstala téměř nezměněna. I přes to nesmí být tato molekula stabilní natolik, aby neumožnila mírné změny genetické informace jako reakci na podmínky prostředí. To by mohlo způsobit evoluční znevýhodnění. Zároveň musí být molekula schopna kódovat jedinečný genetický znak. Všechny tyto podmínky dokonale splňují biomolekuly zvané nukleové kyseliny – obzvláště DNA (Eriksson *et al.*, 2006). Stavba a struktura nukleových kyselin je velmi rozmanitá a může obsahovat velké množství nestandardních složek a nezvyklých struktur. Cílem této kapitoly je popsat běžné charakteristiky nukleových kyselin, nutné k pochopení problematiky daného tématu. Popis všech známých modifikací molekul RNA a DNA by vystačil na samostatnou práci.

Nukleové kyseliny jsou biopolymery, tedy přírodní látky, složené z několika (od nízkých desítek až po miliony) jednodušších látek (monomerů), které se za pomoci kovalentních vazeb spojují do složitějších. Monomery tvořící nukleové kyseliny se nazývají nukleotidy. Molekula pentózy a dusíkaté báze se označuje jako nukleosid, jehož fosforylací (přidáním jednoho nebo více zbytků kyseliny fosforečné) vzniká nukleotid. Obecně se tedy nukleotid skládá z pětiuhlíkatého cukru, dusíkaté báze a fosfátu. Hlavními nukleovými kyselinami jsou ribonukleová kyselina (RNA) a deoxyribonukleová kyselina (DNA). Nejvýznamnější molekuly RNA, které vykonávají v živých organismech důležité funkce jsou: mRNA (mediátorová), tRNA (transferová) a rRNA (ribosomální). DNA se může dělit podle místa, ve kterém se nachází v buňce. Mitochondrie a chloroplasty jsou takzvaně semi-autonomní organely a disponují vlastní DNA. Proto DNA nacházející se v eukaryotní buňce dělíme na jadernou DNA (nDNA), mitochondriální DNA (mtDNA) a chloroplastovou DNA (cpDNA).

Molekula pentózy a dusíkaté báze se označuje jako nukleosid, jehož fosforylací (přidáním jednoho nebo více zbytků kyseliny fosforečné) vzniká nukleotid. Obecně se tedy nukleotid skládá z pětiuhlíkatého cukru, dusíkaté báze a fosfátu.

Typ pětiuhlíkatého cukru, který je obsažen v molekule, determinuje druh nukleové kyseliny. V RNA je obsažena ribóza a v DNA deoxyribóza. Ribóza a deoxyribóza mají několik společných znaků. Jsou to monosacharidy, které se skládají z pěti uhlíků a v přírodě se nejčastěji vyskytují jako D-ribóza a D-deoxyribóza. Rozdíl mezi nimi je velmi malý. Deoxyribóza má na uhlíku 2' místo hydroxylové OH skupiny navázaný vodík. RNA je kvůli volné OH skupině reaktivnější a flexibilnější, ovšem nestabilnější (snadno podléhá rozpadu struktury a degradaci působením enzymů). Na druhou stranu díky vysoké reaktivitě mohou působit jako katalyzátor chemických reakcí. Tyto molekuly se nazývají ribozymy (Rossi, 2004).

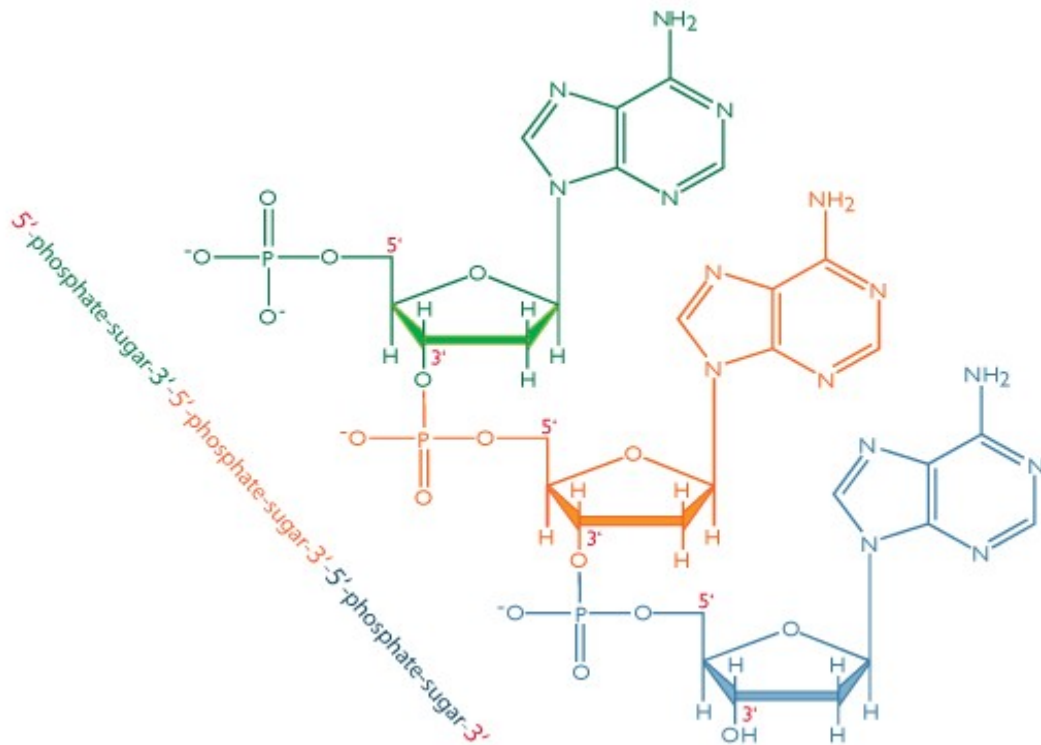
Součástí každého nukleotidu je dusíkatá báze. Jedná se o deriváty heterocyklických sloučenin purinu (adenin, A a guanin, G) a pyrimidinu (cytosin, C, thymin, T a uracil, U). Za normálních okolností spolu tvoří komplementární pár adenin s thyminem (unikátní pro DNA) nebo uracilem (unikátní pro RNA) a cytosin s guaninem. Z důvodu toho, že genom obsahuje víceméně stálý počet komplementárních párů bází (bp), se počet bází v genomu kvantifikuje. Často se používají předpony používané v násobcích jednotek SI, tedy kilobase pair (kbp), megabase pair (Mbp) nebo gigabase pair (Gbp).

Poslední složkou nukleotidu je fosfát. Fosfát je zbytek kyseliny trihydrogen fosforečné, který vznikl odtržením všech tří atomů vodíku. V nukleotidu jako takovém může být různý počet fosfátů. Volný nukleotid, který není součástí žádné sloučeniny, se vyskytuje obvykle ve formě deoxyribonukleotid trifosfátu. Ovšem po zapojení do nukleotidu do DNA se obvykle dvě fosfátové skupiny odštěpí a jednotlivé nukleotidy v řetězci jsou spojeny pouze jedním fosfátem, viz obr. 1.

Strukturu nukleových kyselin lze charakterizovat na několika úrovních, kterými jsou primární, sekundární, terciální, a popř. kvarterní struktura.

Primární struktura je znázorněna na obr. 1. Popisuje stavbu a lineární uspořádání nukleotidů v rámci molekuly. Na uhlíku 1' je navázaná N-glykosidickou vazbou dusíkatá báze. Nukleotidy jsou mezi sebou propojeny na uhlíku 3' a 5' fosfáty za pomoci fosfodiesterové vazby. Molekuly nukleových kyselin jsou direkcionální, jinými slovy se v jejich struktuře se dá rozeznat směr od začátku molekuly k jejímu konci. V souvislosti propojení nukleotidů se v místě uhlíků 3' a 5' konce molekuly nazývají 3' konec a 5' konec. Primární struktura se dá též znázornit jako řada písmen, které

odpovídají dusíkatým bázím. Pořadí nukleotidů může být unikátní nebo repetitivní. Podle konvence se pořadí nukleotidů zapisuje od 5' konce do 3' konce.



Obrázek 1 - Primární struktura DNA (Cyberbridge, 2007)

Sekundární struktura popisuje uspořádání lineárních řetězců. DNA i RNA mohou existovat jako jednovláknové i vícevláknové molekuly a různé druhy struktur. RNA tvoří spíše kratší jednovláknové struktury, které se mohou v rámci jedné molekuly spojovat a vytvářet složitější útvary jako vlásenky, klíčky a pseudouzly (Staple a Butcher, 2005). Pro DNA je typická dvoušroubovice (double helix). V přírodě je nejčastější pravotočivá dvoušroubovice B-DNA (obr. 2), ale existují i další typy jako A-DNA a levotočivá Z-DNA. V určitých situacích může vzniknout i hybridní vlákno DNA-RNA (Shaw a Arya, 2008). Řetězce nukleových kyselin se pojí pomocí vodíkových můstků, které patří mezi tzv. slabé vazebné interakce – jsou slabší než klasické kovalentní vazby. Komplementární báze cytosin s guaninem se mezi sebou typicky párují třemi vodíkovými můstky a adenin s thyminem nebo uracilem dvěma vodíkovými můstky.



Obrázek 2- Příklad typické sekundární struktury DNA – pravotočivá dvoušroubovice B-DNA. Na obrázku je možné vidět nejběžnější Watsonovo-Crickovo párování bází (White et al., 2007)

Terciální struktura popisuje prostorové uspořádání molekuly. U DNA je běžné tzv. nadšroubovicové vinutí (supercoiling), což je šroubovicové stáčení již existující dvoušroubovice. Tímto procesem vzniká nadšroubovice (superhelix). Nadšroubovicové vinutí může probíhat ve směru stáčení dvoušroubovice (pozitivní nadšroubovicové vinutí) nebo proti směru stáčení dvoušroubovice (negativní nadšroubovicové) (Gilbert a Allan, 2014).

Funkční útvary, vzniklé interakcí mezi molekulami DNA nebo molekulou DNA s molekulami jiných látek (například proteiny), vytváří takzvanou kvartérní strukturu. Důvod vytváření těchto struktur je zkrácení a zpevnění DNA. Příklady kvartérní struktury jsou chromatin nebo ribozomy.

3.2.2 Kódující a nekódující nukleové kyseliny

DNA, nebo u některých druhů virů i RNA, je považována za nositelku dědičných znaků, které utvářejí fenotyp daného organismu. Ovšem pouze určitá část genomu (soubor veškeré genetické informace uložené v nukleových kyselinách) obsahuje genetický kód, který je využitý pro syntézu genového produktu, tedy proteinu nebo funkčního RNA (například tRNA). Tato složka genomu se nazývá kódující DNA, případně RNA. Existují ovšem i tzv. nekódující DNA a RNA, které se nepodílejí na syntéze proteinů. Pro tuto složku genetické informace se občas používá i název „junk DNA“ nebo „junk RNA“. Tyto termíny jsou kontroverzní, protože evokují nadbytečnost a nefunkčnost daného typu genetické informace (Gregory, 2005). Jednou z funkcí, kterou zastává nekódující DNA, je regulace genové exprese (například zintenzivněním, oslabením nebo úplným zastavením transkripce daného genu) (Carroll *et al.*, 2008). Příklady nekódující DNA jsou například introny (nekódující oblasti genu) nebo pseudogeny, což jsou geny, které ztratily schopnost kódovat proteiny nebo se dále nepodílí na genové expresi (Tutar, 2012). Obzvláště významná je tzv. satelitová DNA a její dvě podskupiny minisatelity a mikrosatelity. Jedná se o tandemové repetitivní sekvence, které se nacházejí převážně v nekódujících oblastech DNA. Díky své vysoké variabilitě se využívají k identifikaci jedinců nebo pro studium toku genů mezi populacemi (Eriksson *et al.*, 2006). Různé organismy mají odlišný poměr kódující a nekódující DNA.

3.2.3 Centrální dogma molekulární biologie

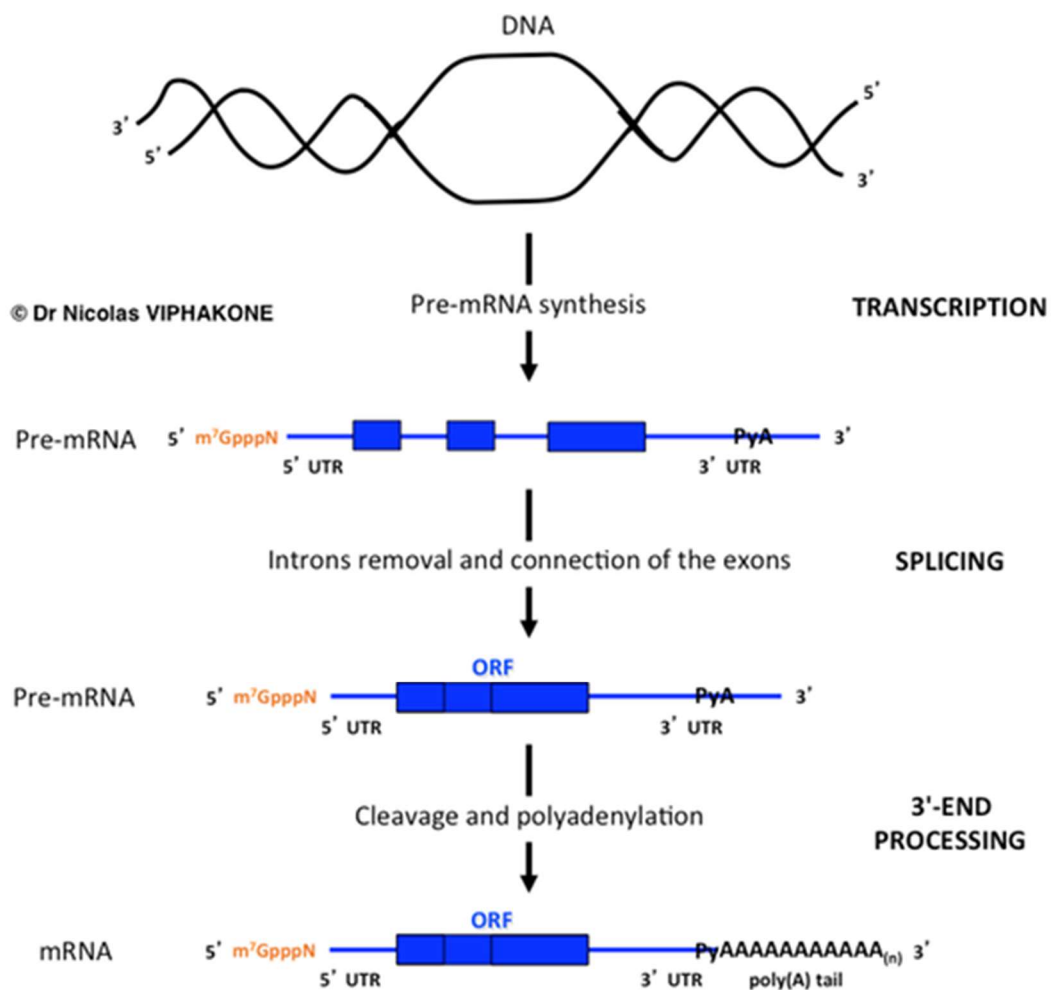
Princip toku genetické informace popsal roku 1957 Francis Crick, který ho nazval centrální dogma molekulární biologie. Centrální dogma popisuje genovou expresi do genových produktů (proteinů nebo funkční RNA), replikaci DNA a RNA nebo například syntézu jednořetězcové DNA z předlohy RNA. V roce 1970 následně dospěl k závěru, že syntéza nukleových kyselin z proteinů se jeví jako nemožná, a proto centrální dogma v této části pozměnil (Crick, 1970).

Elementárním principem genové exprese je existence tzv. genetického kódu. Existuje 20 hlavních aminokyselin tvořících proteiny, které se vyskytují v drtivé většině organismů. Na druhé straně existují pouze čtyři dusíkaté báze, proto musí jednu aminokyselinu kódovat větší počet dusíkatých bází. Dvě dusíkaté báze jsou schopny

vytvořit pouze 16 kombinací, proto jednu aminokyselinu kódují tři dusíkaté báze, které jsou schopny tvořit až 64 kombinací. Tento tzv. triplet dusíkatých bází se nazývá kodon a soubor kodonů kódující aminokyseliny se nazývá genetický kód. Specifickými typy kodonů jsou iniciační kodon a stop kodony, které označují místo, kde začíná a končí translace proteinu. Jak si lze všimnout, existuje mnohem větší množství kodonů než aminokyselin, proto dochází k tzv. degeneraci genetického kódu, tedy k tomu, že jednu aminokyselinu kóduje více kodonů. Kvůli tomu je obvykle aminokyselina determinovaná prvními dvěma bázemi a třetí báze může být libovolná (White *et al.*, 2007).

Genová exprese zahrnuje dva procesy, které se nazývají transkripce a translace. Transkripce je proces, který probíhá v buněčném jádře. Při transkripci dochází, za pomoci enzymu RNA polymerázy, k přepisu genu ve formě jednoho vlákna DNA do mRNA. Nově vzniklá mRNA obsahuje sekvenci bází komplementárních k bázím obsaženým v původní DNA, ovšem RNA neobsahuje thymin, proto je v sekvenci nahrazen uracilem. Transkripce také může vzniknout funkční RNA, která dále nekóduje tvorbu proteinů, ale jedná se o konečný produkt, který plní v buňce různé funkce.

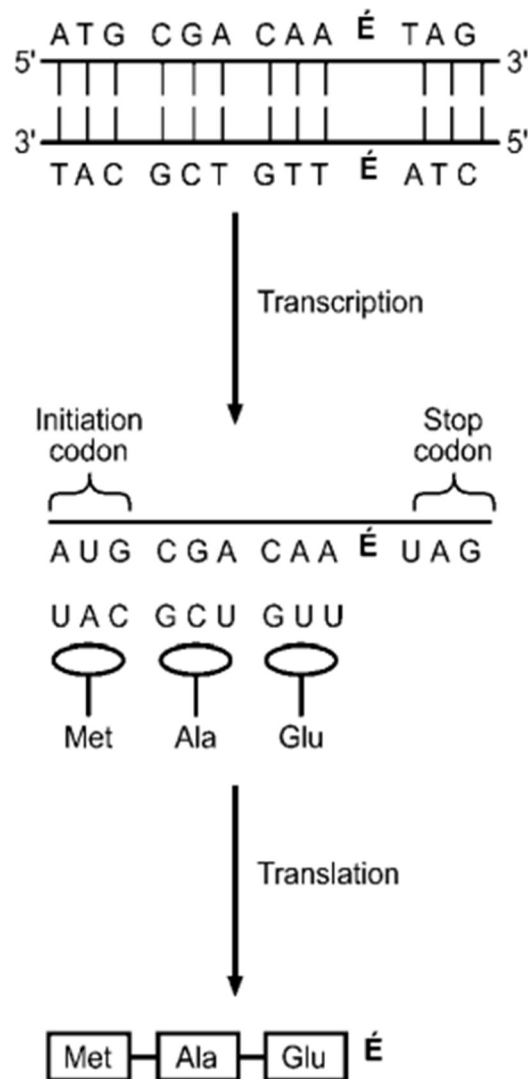
Proces transkripce a posttranskripčních úprav je schematicky znázorněn na obr. 3. Původní gen, potažmo mRNA, se po transkripci skládá z oblastí, které kódují protein (exony) a které protein nekódují (introny, UTR). Introny se nacházejí mezi exony a během posttranskripčních úprav mRNA jsou z molekuly odstraněny tzv. sestřihem RNA a nepodílí se na translaci. UTR (nepřekládané oblasti) se nacházejí před iniciačním a za stop kodonem a podílí se na translaci, kterou pomáhají regulovat. Kromě toho se při posttranskripčních úpravách k mRNA na 5' konec připojí tzv. 5' cap a na 3' konec tzv. poly (A) konec, což je řetězec nukleotidů, který obsahuje pouze adenin. Těmito procesy vznikne stabilní a kompletní mRNA, která se může účastnit translace.



Obrázek 3 – Transkripce a posttranskripční úpravy mRNA (Viphakone, 2020)

Posledním krokem tvorby proteinů je translace (obr. 4), která probíhá v cytoplazmě, potažmo na ribozomech. Při translaci vznikají polypeptidy a jeden nebo více polypeptidů vytváří protein. Translace probíhá při navázání mRNA na ribozom. Molekuly tRNA obsahují sekvenci tří nukleotidů zvanou antikodon, a zároveň obsahují jeden typ aminokyseliny. Antikodon je komplementární k určitému kodonu nacházejícímu se v mRNA, na který se váže, čímž přináší do řetězce polypeptidu specifickou aminokyselinu. Tímto principem ovlivňuje genetická informace stavbu nově vzniklého polypeptidu. Jeden gen může kódovat více druhů proteinů. To je možné díky tzv. alternativnímu sestřihu, při kterém jsou z RNA vystřiženy i některé exony, které

nejdou součástí finální mRNA. Tímto procesem mohou ze stejného genu vzniknout různé izoformy proteinu (Stamm *et al.*, 2005).

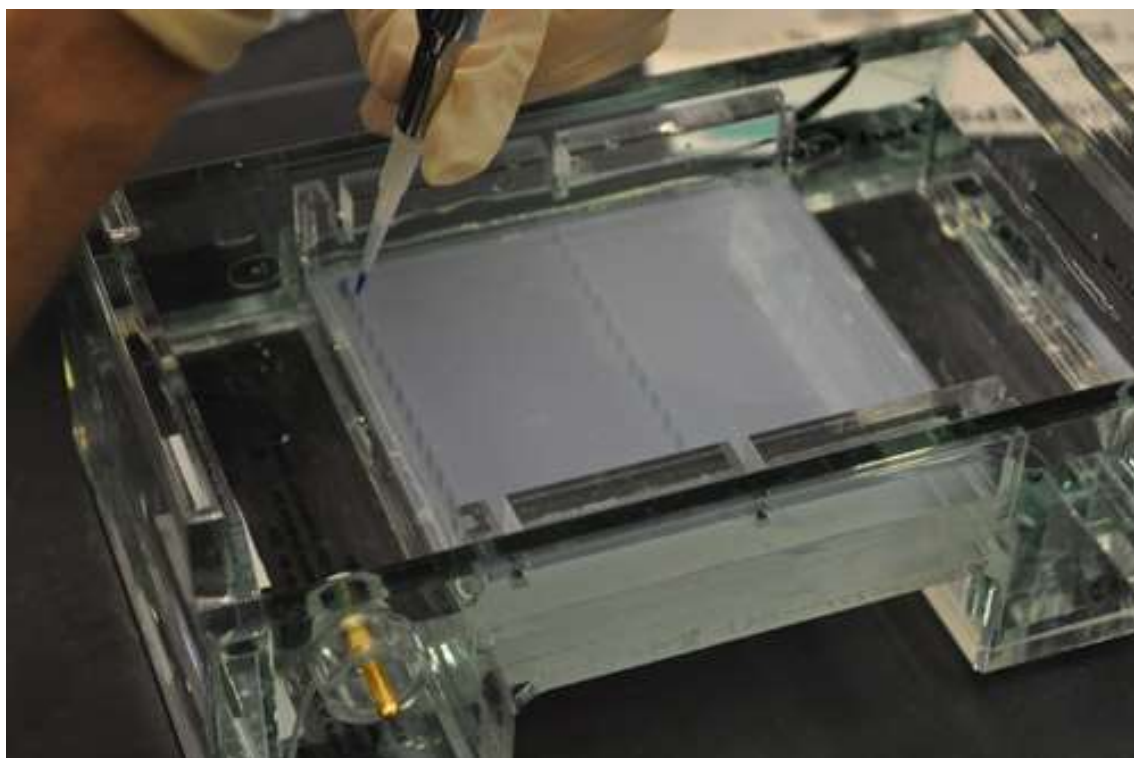


Obrázek 4 - Schéma transkripce a translace (White *et al.*, 2007)

3.2.4 Analytické laboratorní techniky

V genetických laboratořích se používá velké množství různých metodických postupů a technik (Lee a Bahaman, 2012). Tato podkapitola popíše elektroforézu a polymerázovou řetězovou reakci (PCR), což jsou významné laboratorní techniky, které se mimo jiné používají k odhalení genového polymorfismu, který je základem pro genetickou diverzitu.

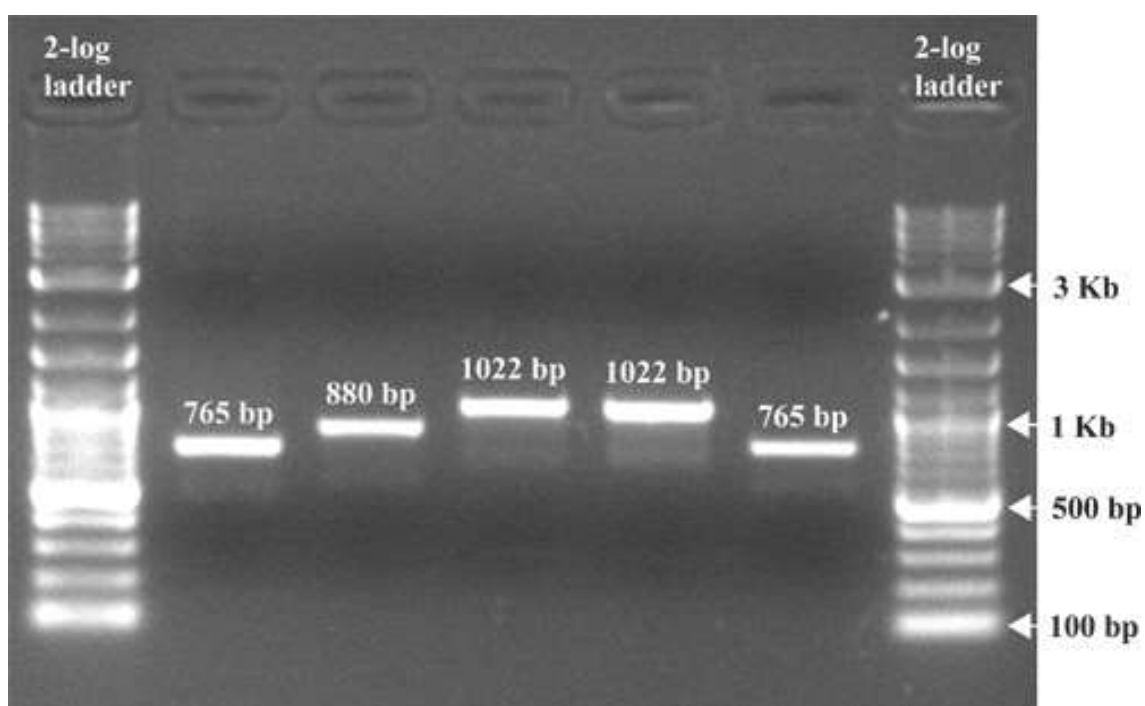
Elektroforéza je označení pro metodu, při které dochází k separaci látek (nabitých částic) na základě jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli (Lee a Bahaman, 2012). V genetickém a biologickém výzkumu se v užším slova smyslu jedná o gelovou elektroforézu, která je založena na rozdílné pohyblivosti daných makromolekul (nukleových kyselin nebo proteinů) v gelu. Nejeftivnějším způsobem je použití agarózového gelu (Lee *et al.*, 2012). Elektroforéza probíhá v zařízení, které se skládá ze samotného média, ve kterém se molekuly pohybují (agarózový gel), a který je ponořen v pufru (roztoku, zamezujícím změně pH, která by negativně ovlivnila elektroforézu). Celý tento systém je připojen k elektrodám s opačným nábojem, díky čemuž dochází k elektrickému proudu. Vzorek se nanáší do jamek, které vznikly v místě, kde byl při nalévání tekutého gelu do nosiče umístěn hřebíček (obr. 5).



Obrázek 5 - Zařízení na gelovou elektroforézu a vkládání vzorku DNA do jamek (Lee et al., 2012)

Po zapojení do elektrického proudu se začnou nabitě molekuly pohybovat k elektrodě s opačným nábojem. Po odpojení od elektrického proudu se budou molekuly, kvůli rozdílné pohyblivosti, nacházet v různých vzdálenostech ve směru proudu iontů, čímž dojde k separaci. Rozdílná pohyblivost molekul může být způsobena jejich různou velikostí a hmotností nebo rozdílným elektrickým nábojem (Rabindra a Raju, 2012).

Rozdílná pohyblivost způsobená různou velikostí se dá využít například pro měření délky (bp) různých fragmentů DNA (kratší fragmenty se dostanou za stejný čas dále než delší fragmenty). Samotnou elektroforézou zjistíme pouze relativní rozdíly v délce daných fragmentů, ale při použití žebříčku DNA, který obsahuje směs fragmentů o známé délce, lze tuto délku i kvantifikovat. Pro vizualizaci DNA v gelu se nejčastěji používá interkalační barvivo ethidium bromid, který při vystavení UV záření fosforeskuje. Při interkalaci ethidium bromidu do DNA se fluorescence zintenzivní, čímž se nukleová kyselina efektivně zvýrazní (obr. 6) (Lee a Bahaman, 2012).



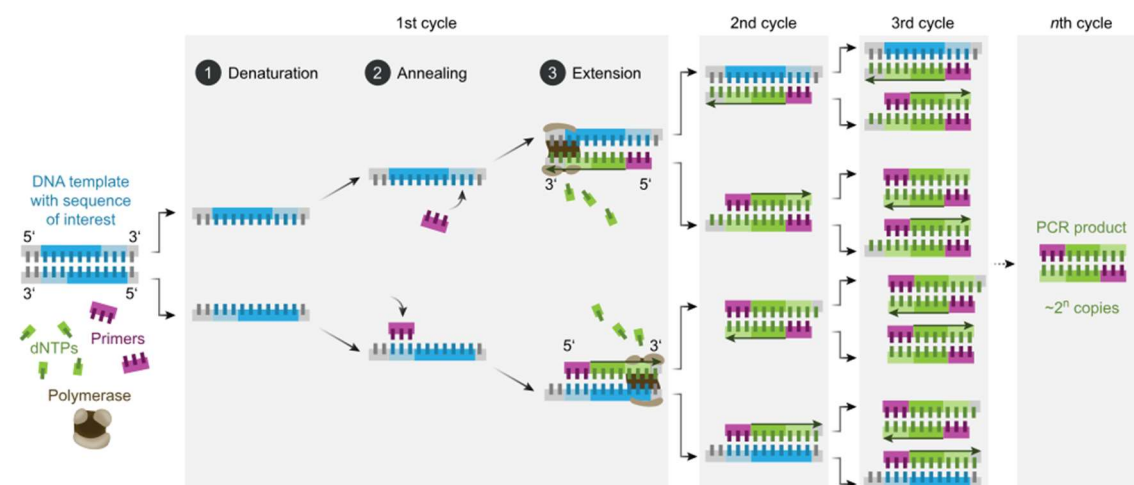
Obrázek 6 - Výsledek gelové elektroforézy s použitím DNA žebříčku a ethidium bromidu (Lee *et al.*, 2012)

DNA je velmi malá molekula. Na druhou stranu metody detailní analýzy specifického úseku DNA vyžadují relativně velké množství genetického materiálu. Pro uskutečnění analýzy specifického úseku DNA bylo většinou nutné izolovaný fragment klonovat a zvětšovat v plazmidech nebo podobných hostitelích (White *et al.*, 2007). To se změnilo v roce 1983, ve kterém americký biochemik Kary Mullis objevil revoluční technologii amplifikace (zmnožení) DNA – PCR. Touto metodou je možné relativně levně a rychle vytvořit miliardy kopií i z velmi malého specifického fragmentu DNA (Mullis, 1990). Za tento objev později obdržel Nobelovu cenu. Kromě amplifikace DNA se později objevilo další využití této technologie jako například kvantifikace množství zájmové sekvence v celém vzorku nebo analýza genové exprese.

V drtivé většině případů je PCR založena na tepelném cyklování, při kterém se v rámci jednoho cyklu mění teploty. Reakční směs tvoří kromě daného vzorku DNA také DNA polymeráza, DNA primery, nukleotidy ve formě deoxyribonukleotid trifosfátů a medium, kterým bývá pufr, v němž mohou být další ionty. Problém s DNA polymerázou byl ten, že se po každém cyklu musela používat nová, protože se kvůli vysokým teplotám znehodnotila. To bylo velmi pracné a časově náročné. Významný byl objev DNA polymeráz odolných vůči vysokým teplotám, jako například Taq (Zhu *et al.*, 2020). Ta je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v blízkosti termálních pramenů, díky čemuž je adaptována na vysoké teploty. DNA polymeráza katalyzuje syntézu dvouvláknové DNA. DNA primery jsou krátké sekvence oligonukleotidů, které jsou komplementární k 3' koncům cílové DNA a vytvářejí místo, na které se může navázat DNA polymeráza. Deoxyribonukleotidy obsahují všechny čtyři báze a vážou se vodíkovými můstky ke komplementárním nukleotidům, čímž vytvářejí dvouvláknovou DNA. Pufr slouží stejně jako u elektroforézy k udržení stabilních podmínek, především pH.

Schéma PCR je znázorněno na obr. 7. Samotný cyklus PCR se skládá ze tří základních fází. První fází je denaturace DNA, při které dochází k zahřátí reakční směsi téměř na bod varu (kolem 96 °C), čímž dojde k rozpojení vodíkových můstků za vzniku dvou řetězců jednovláknové DNA. Tato fáze trvá v průměru 20-30 sekund. Při druhé fázi dochází k nasedání dvou primerů (reprezentující 5' konce) na oba 3' konce denaturované DNA, čímž je následně zajištěna syntéza ve směru 5'-3'. Při této fázi je reakční směs významně zchlazena na teplotu, která je specifická pro použitý primer, a probíhá též průměrně 30 sekund. Posledním krokem je samotná syntéza DNA, kdy na primery nasedá DNA polymeráza, která dosyntetizuje komplementární řetězec. Optimální teplota pro nejvíce využívanou Taq polymerázu je 72 °C (Genetic Science Learning Center, 2018) a délka této fáze závisí na délce samotného fragmentu. Tento cyklus se několikrát opakuje. Počet cyklů je individuální podle charakteru výzkumu, ale většinou se jedná

o 30-50 cyklů. Při dokonalé účinnosti lze počet kopií spočítat vztahem 2^n , ve kterém n značí počet cyklů, čímž by se miliardy kopií dosáhlo po 30 cyklech.



Obrázek 7 - Schéma PCR (Wikipedia, 2021)

Výše byl popsán základní princip PCR. Existuje samozřejmě mnoho mírných úprav a variant PCR. Pro některé studie je vhodné sledovat průběh a měřit produkty PCR v reálném čase, což je možné díky technologii qPCR. Toho lze dosáhnout za použití fluorescenčního barviva, které se váže pouze na dvouvláknovou DNA. Novějším způsobem je použití nukleotidové sondy, která je založena na hybridizaci komplementárního vlákna. Zjednodušeně řečeno tato sonda ztratí při poslední fázi PCR vazbu na DNA, díky čemuž začne vydávat světelný signál (Wang *et al.*, 2012). Technologie RT-PCR se využívá pro zkoumání genové exprese a je podobná klasické PCR, ale předchází jí krok reverzní transkripce. Reverzní transkripce zahrnuje nasednutí primeru na řetězec RNA, který za pomoci enzymu reverzní transkriptázy vytvoří hybridní dvouvláknový RNA-DNA řetězec, který se dále denaturuje za vzniku jednovláknové DNA, která je schopná se účastnit klasické PCR (Freeman *et al.*, 1999). Časté je propojení těchto dvou technologií, které se nazývá qRT-PCR.

3.2.5 Genetické markery

Genetický marker může být určitý znak, produkt genové exprese, gen nebo sekvence DNA. Používá se k identifikaci jedince, populace nebo určitého druhu (Encyklopedia Britannica, 2018). Tato identifikace může být i ve smyslu objevení jedinců s určitým fenotypovým znakem, jakým je například odolnost vůči patogenu. Podstatou

genetických markerů je většinou variabilita daného znaku nebo genu. Ideální marker by měl mít určité vlastnosti. Mělo by být možné marker levně vyrobit a použít, a také by měl být neovlivnitelný prostředím. Dále by měl být průkazný a při použití v jiných vzorcích a laboratořích by měly být výsledky opakovatelné. Kromě toho by měl být polymorfní, tedy schopný odhalit co největší variabilitu alel a kodominantní, což znamená, že by neměl být ovlivnitelný dominancí určitých alel (White *et al.*, 2007). To totiž může dominantního homozygota zaměnit za heterozygota, kvůli stejné genové expresi.

Genetické markery lze rozdělit na tři hlavní typy. Morfologické markery, biochemické markery a molekulární markery.

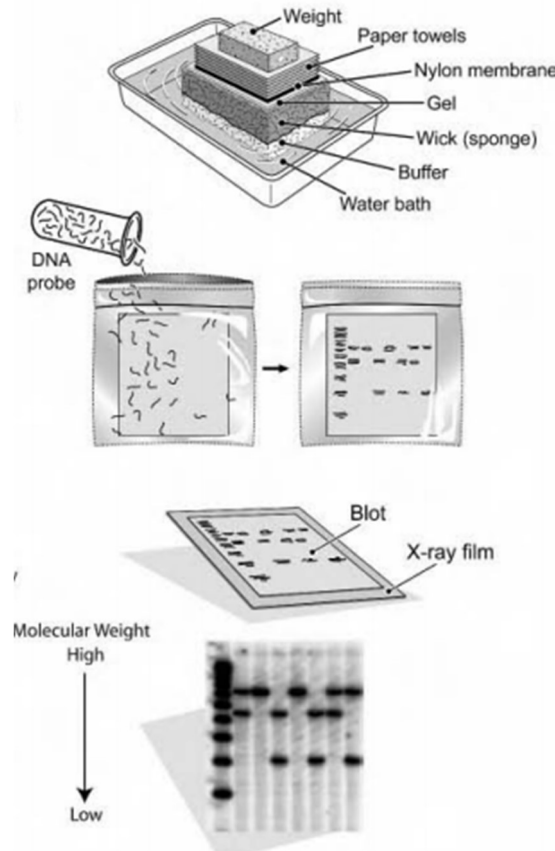
Variabilita morfologických markerů je zajišťována jednoduchými pozorovatelnými znaky a jejich mutacemi. Příkladem může být například jiné zbarvení semen. Morfologických markerů není obzvláště u stromů mnoho, a zároveň jsou mutace pro jedince často letální, což způsobuje jejich malé rozšíření (White *et al.*, 2007). Dalšími problémy morfologických markerů jsou jejich silně dominantní charakter, snadné ovlivnění kvantitativních znaků prostředím nebo absence analýzy nekódující DNA, která u mnoha druhů tvoří většinu genomu. Zároveň posouzení rozdílnosti může být u nejednoznačných znaků ovlivněno subjektivním vnímáním pozorovatele (Jehan a Lakhanpaul, 2006).

Biochemické markery jsou chemické látky, které mají v těle určitou biologickou funkci. Jako biochemické markery se používají například aloenzymy, monoterpeny a další sekundární metabolity, které disponují určitou variabilitou (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Alozymy jsou enzymy, které se liší strukturou, ale ne funkcí a jsou kódovány jinou alelou na stejném lokusu. Pro alozymy se též používá název izozymy, což jsou ovšem enzymy, které mají stejnou funkci, ale jsou kódovány různými geny. K rozlišení různých alozymů a zjištění variability daného markeru se používá elektroforéza (Jarne a Lagoda, 1996). Použití biochemických markerů je relativně levné a nenáročné (Loxdale a Lushai, 1998). Oproti moderním molekulárním markerům mají ovšem nižší polymorfismus, existuje jich omezené množství, díky čemuž nemusí reprezentovat celý genom a poskytují omezené informace o struktuře a mutacích daného genu (White *et al.*, 2007). Stejně jako u morfologických markerů reprezentují pouze kódovací regiony. V případě sekundárních metabolitů jsou zároveň limitovány na druhy, které je obsahují. Díky časové a finanční nenáročnosti jsou i přes zřejmé problémy alozymy hojně používány i v současnosti (Jehan a Lakhanpaul, 2006).

Molekulární markery odhalují polymorfismus na úrovni DNA. Díky tomu lze odhalit variabilitu v samotné sekvenci (Grover a Sharma, 2016), díky čemuž se dá prozkoumat celý genom, včetně nekódující DNA (Jehan a Lakhanpaul, 2006). To je velká výhoda oproti morfologickým i biochemickým markerům. Kromě toho jsou schopny objevovat variabilitu i u DNA organel (mtDNA, cpDNA), jejichž analýza u rostlin dokáže poskytnout nenahraditelné informace (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Existují hlavní tři typy variability na úrovni DNA. Prvním je jednonukleotidový polymorfismus (SNP – single nucleotide polymorphism), tedy variabilita způsobena záměnou jednoho nukleotidu za jiný s jinou bází. SNP je i samostatná kategorie markerů. Druhým typem je variabilita v různém počtu tandemové repetice (VNTR – variable number tandem repeats), která zahrnuje dvě hlavní skupiny: minisatelity a mikrosatelity, a jak její název napovídá, její variabilita závisí na různém počtu (délce) tandemové repetice. Tandemová repetice se většinou skládá ze sekvence několika nukleotidů, která se opakuje. Variabilita je tedy zajištěna různým počtem opakování této sekvence nukleotidů. Poslední skupinou je variabilita způsobená mutacemi, které se souhrnně nazývají indely (Vignal *et al.*, 2002). Indel je akronym pro inzerce/delece, tedy přidání nebo odebrání určitého počtu bází. Molekulární markery se dělí podle toho, zda se pro jejich charakterizaci využívají hybridizace DNA-DNA, PCR nebo obě metody (White *et al.*, 2007). Samostatnou kategorií tvoří již zmíněné markery SNP.

Hlavním markerem, který je založen na hybridizaci DNA, je polymorfismus délky restričního fragmentu (RFLP – restriction fragment length polymorphism). Tento marker byl objeven jako jeden z prvních, a i přes to, že se stále používá, byl objeven PCR postupně nahrazen jinými markery (Grover a Sharma, 2016). RFLP je marker, který rozlišuje dvě variace alely, je kodominantní (Eriksson *et al.*, 2006) a podstatou variability jsou indely v restričním místě (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Při této metodě se za pomoci restričních enzymů (endonukleáz) rozštěpí DNA ve specifických místech na jednotlivé fragmenty. Dalším krokem je elektroforéza, kterou se na základě rozdílné délky oddělí jednotlivé fragmenty. Pomocí metody Southernblot (obr. 8) jsou fragmenty následně přeneseny na nylonovou membránu a hybridizují se komplementárními a často i radioaktivními sondami. Tyto fragmenty se sondami jsou posléze za pomoci rentgenového filmu zvýrazněny (White *et al.*, 2007). Nevýhodou RFLP je potřeba velkého množství vstupní DNA, jedná se o pracnou a časově náročnou metodu a většinou

se používají radioaktivní látky, což vyžaduje zvýšenou bezpečnost (Jehan a Lakhanpaul, 2006).



Obrázek 8 – Metoda Southern blotting, používaná u analýzy RFLP markerů (White *et al.*, 2007)

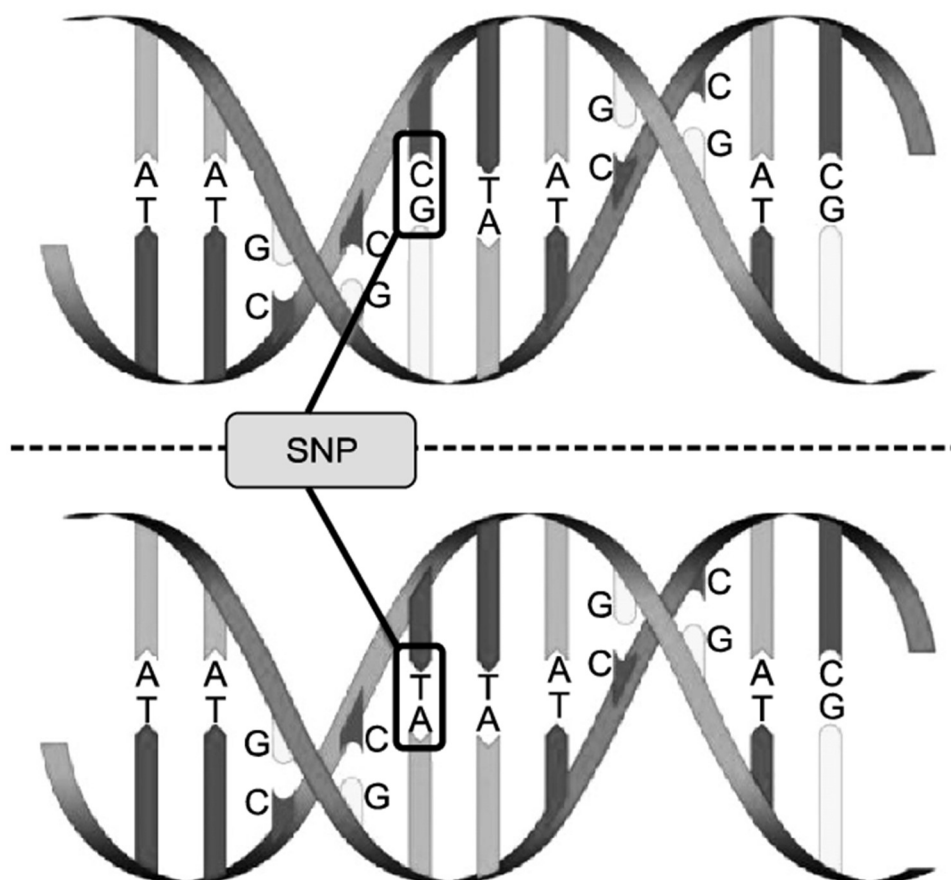
Existuje několik markerů založených na PCR. Ty spadají do dvou hlavních kategorií: metody využívající známou a osekvenovanou část genomu a metody využívající obecné primery, které amplifikují náhodná místa v rámci genomu (Schulman, 2007). Typickým zástupcem druhé kategorie je náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD – random amplification of polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990). Pro použití RAPD je potřeba velmi malé množství vstupní DNA, ke které se přidá primer, obsahující sekvenci deseti bází. Primer nasedne na komplementární řetězce denaturované DNA a proběhne syntéza druhého řetězce. Tento proces se několikrát opakuje. Produkty reakce se následně oddělí za pomoci elektroforézy a vizualizují se např. pomocí ethidium bromidu. Fragmenty, které se nesyntetizovaly, se nezobrazí. Z toho důvodu jsou RAPD markery dvoualelické (existuje/neexistuje produkt syntézy) a dominantní, protože nelze rozlišit homozygota a heterozygota (White *et al.*, 2007). Výhoda RAPD je malé potřebné množství vstupní DNA (Grover a Sharma, 2016) a jedná se o relativně snadnou a levnou

metodu, která nepotřebuje sekvenční informaci o cílovém genomu (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Nevýhoda je, že se jedná o dominantní marker (Eriksson *et al.*, 2006) a výsledky se těžko dají reprodukovat v jiných laboratořích (Vignal *et al.*, 2002). U RAPD též existuje problém, že molekuly se stejnou molekulovou hmotností nemají vždy stejný počet nukleotidů (Jehan a Lakhanpaul, 2006).

V dnešní době se nejčastěji využívají dva typy markerů: mikrosatelity, též známé jako repetice jednoduché sekvence/krátké tandemové repetice (SSR – simple sequence repeat/STR – simple tandem repeat) a nejmodernější jednonukleotidový polymorfismus (SNP). Mikrosatelity jsou tandemové repetice o velikosti 1-6 párů bází a jedná se o nejběžnější typ PCR markerů se známou cílovou sekvencí (Grover a Sharma, 2016). Nejvíce používané jsou repetice di- (např. TA nebo GA), tri- (např. GTG) a tetranukleotidů (např. GATA, GACA) (Jarne a Lagoda, 1996), které se obvykle nachází v nekódujících oblastech DNA (Eriksson *et al.*, 2006). Tyto sekvence často podléhají mutacím (Jehan a Lakhanpaul, 2006) a obtížně se replikují při syntéze DNA, což způsobuje vysoké množství různých alel lišících se různým počtem tandemovým repetice, díky čemuž mají mikrosatelity vysoký polymorfismus (Grover a Sharma, 2016). Zároveň jsou mikrosatelitové markery kodominantní a univerzální. V genomu se vyskytuje velké množství různých mikrosatelitových lokusů a výsledky se dají snadno a přesně reprodukovat (Grover a Sharma, 2016). Míra polymorfismu je u mikrosatelitů nejvyšší ze všech typů markerů, a proto nacházejí uplatnění v identifikaci jednotlivých organismů, populačních studiích, jako je sledování toků genů v populaci (Eriksson *et al.*, 2006), nebo mapování významné části genomu (Zhang *et al.*, 2008). Nevýhodou mikrosatelitů je časová a finanční náročnost identifikace vhodných sekvencí, jejich klonování a sekvenování. Znalost sekvence z okrajových částí mikrosatelitů je nutná pro návrh vhodných PCR primerů (White *et al.*, 2007). Zároveň může být polymorfismus výsledkem přidání nebo odebrání jedné repetice, proto je obvykle nutné použít pro analýzu velmi citlivou elektroforézu nebo sekvenování (Jehan a Lakhanpaul, 2006).

Oproti výše zmíněným markerům se jednonukleotidové polymorfismy (SNP) používají jako genetické markery relativně krátce. Jak název napovídá, jedná o místa v genomu, kde se mohou vyskytovat alely, které se liší záměnou jednoho nukleotidu (viz obr. 9). Podmínkou je, aby frekvence výskytu alely u jedinců byla alespoň 1 % (Vignal *et al.*, 2002). Definice SNP je komplexnější, například inserce nebo delece jedné báze se formálně nepovažuje za SNP. Použití termínu SNP je ale velmi volné a jakýkoliv výskyt

polymorfismu dsDNA na úrovni jedné báze se považuje za SNP (Brookes, 1999). Jak je obecně známo, existují čtyři dusíkaté báze, proto je teoreticky možný výskyt až čtyř alel v daném místě. V praxi je ovšem výskyt více než dvou bází v daném místě velmi nepravděpodobný, proto se SNP považují za bialelické kodominantní markery (Vignal *et al.*, 2002). Bialelické SNP řadíme mezi nejčastější typ polymorfismu v genomu. Proto, i když nejsme schopni pozorovat vysokou variabilitu v rámci daného lokusu, díky jejich abundanci jsme schopni objevit více polymorfních lokusů a sestavit velmi podrobný popis polymorfismu celého genomu. Zároveň díky jejich nízké schopnosti mutovat jsou stabilní, a tedy vhodné pro evoluční studie (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Většina SNP je v nekódujících oblastech, ale mohou se vyskytovat i v genech, kde mohou být příčinou vzniku rozdílného fenotypu (Grover a Sharma, 2016). Existuje mnoho způsobů detekce SNP. Základní a nejintuitivnější je přímé sekvenování DNA, které je časově a finančně náročné. Alternativní metodou je například použití DNA knihoven a databází (Jehan a Lakhanpaul, 2006).



Obrázek 9 - Příklad SNP, konkrétně záměny páru bází CG za AT (Doo a Kim, 2015)

3.3 Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.)

3.3.1 Taxonomické zařazení

Rod *Fraxinus* patří do řádu *Oleales* a její jediné čeledi *Oleaceae*. *Oleaceae*, tedy olivovníkovité, je čeleď převážně krytosemenných dřevin, ale také bylin, které jsou povětšinou opadavé a jen zřídka bývají stálezelené. Listy jsou obvykle vstřícné, květy jsou jednopohlavné i oboupohlavné, obvykle čtyřčetné nebo pětičetné. Plodem je křídlatá nažka (jasan), tobolka (šeřík, zlatice), bobule (ptačí zob) nebo peckovice (olivovník).

Čeleď *Oleaceae* zahrnuje zhruba 30 rodů s 500-600 druhy, které se vyskytují hlavně na severní polokouli a jejich rozšíření sahá od tropů po mírné pásmo. V ČR rostou dva domácí rody: *Fraxinus* a *Ligustrum*. Z introdukovaných rodů se u nás vyskytují nejčastěji *Syringa* a *Forsythia*, vzácněji poté rody *Jasminium*, *Chionanthus*, *Phyllirea*, *Fontanesia*, *Forestiera* nebo *Abeliophyllum* (Musil a Möllerová, 2005).

Hospodářsky nejvýznamnějším druhem čeledi *Oleaceae* je rod *Olea*, tedy olivovník, který roste hlavně v oblasti mediteriánu. Lesnický nejdůležitějším rodem je bezpochyby *Fraxinus* (jasan). V sadovnictví jsou nejvyužívanějšími druhy *Syringa* (šeřík) a *Forsythia* (zlatice).

Fraxinus je název pro rod opadavých stromů (vzácně keřů), které jsou většinou polygamní, popřípadě dvoudomé. Větévky jsou v uzlinách zploštělé. Terminální pupeny jsou velké, pýřité a obvykle se vyskytují s menšími, přídatnými pupeny. Listy jsou lichozpeřené, většinou vstřícné, někdy i po třech v přeslenu. Vzácně jsou listy jednoduché nebo redukované na jediný lístek. Květy bývají bezkorunné. Plodem je křídlatá a podlouhlá nažka. Opylení probíhá většinou větrem, tedy anemogamně, vzácněji se vyskytuje opylení hmyzem (entomogamie).

Na severní polokouli existuje přibližně 60-65 druhů, jejichž rozšíření sahá od mírného po subtropický klimatický pás (Musil a Möllerová, 2005). Jsou pěstovány hlavně pro produkci dřeva. Z rodu *Fraxinus* jsou v ČR dále autochtonní dva druhy, jimiž jsou *Fraxinus excelsior* a *Fraxinus angustifolia*, který roste v blízkosti břehů řek a zaujímá důležité pozice v nivních ekosystémech (Rozsypálek *et al.*, 2017). V Evropě jsou původní další dva druhy. Jedním z nich je *Fraxinus ornus*, malý strom, vyskytující se hlavně v teplejších oblastech, jako je středomoří. V zemích, ve kterých přirozeně roste, má

ekonomický význam a jeho výhodou je relativně nízká náchylnost vůči *Hymenoscyphus fraxineus* (Enderle *et al.*, 2019). Druhým stromem je *Fraxinus pallisiae*, což je druh, který spolu s *Fraxinus excelsior* spp. *Coriariaefolia* vzácně roste na stepích a lesostepích jihovýchodní Evropy.

V průběhu let vzniklo několik fylogenetických kategorií. Podle Wallandera (2008) se rod *Fraxinus* dělí do šesti sekcí: *Dipetalae* (Lingelsh.) E. Nikolaev, *Fraxinus*, *Melioides* (Endl.) Pfeiff, *Ornus* (Boehm.) DC., *Pauciflorae* (Lingelsh.) E. Wallander a *Sciandanthus* (Coss. et Dur.) Lingelsh. Do sekce *Fraxinus* spadají oba autochtonní druhy pro ČR, tedy *Fraxinus excelsior* a *Fraxinus angustifolia*.

3.3.2 Biologie a základní popis

Fraxinus excelsior je strom, který dorůstá velkých rozměrů. Běžná výška se pohybuje kolem 20-35 metrů, ale dosahuje až 40 m. Průměr kmene ve výčetní výšce $d_{1,3}$ je běžně 1 metr, ale může být až 1,5 m. Dožívá se kolem 250 let. V pralesích byly zaznamenány kmeny o průměru 2 m a objemu 20 m³ (Úředníček *et al.*, 2014). Kmen je přímý a koruna má štíhlý, podlouhle vejčitý tvar. Kmen mladších stromů bývá průběžný a mívá pravidelné a vstřícné větvení. Borka je hladká, později se stává mělce podélně brázditá. Listy jsou lichozpeřené, 3-7 jařmé a vstřícné. Listy jsou rozmístěny poměrně řídko a rostou víceméně jen na obvodu koruny, která též působí dosti řídkým dojmem. Listy opadávají na podzim zelené, a tedy se nebarví. Kořenový systém bývá panohový, což znamená, že silné kořeny rostou nejdříve do stran, a až poté do hloubky. Tímto jasan znemožňuje nálet a zakořenění dalších dřevin ve své bezprostřední blízkosti.

Fraxinus excelsior je polygamní a jeho bezobalné květy mohou být oboupohlavné i jednopohlavné a skládají se v nenápadná hroznovitá květenství, která vyrůstají z postranních pupenů ještě před olistěním. Kvete každoročně. Nažky jsou 2–5,5 cm dlouhé a na bázi zaokrouhlené. Důležitým znakem je semenné pouzdro, které je kratší než polovina okřídlené nažky. Volně rostoucí stromy plodí od 20. roku, v porostu je začátek plození posunut a začíná v rozmezí od 30. až 40. roku. Nažky dozrávají na podzim a není neobvyklé, že na stromě zůstávají i přes zimu. Na podzim vysetá semena klíčí z jara, avšak pokud semeno vyschne, klíčí až dalším rokem. Klíčivost je dva až tři roky. Polygamie tohoto druhu, což v praxi znamená, že jeden rok může mít jedinec hlavně pestíkové květy a druhý rok téměř výhradně prašnickové květy, se jako hlavní faktor podílí

na bohatě plodných a neplodných rocích. Lesnicky jsou zajímavé fenologické formy časně nebo pozdně rašící (Musil a Möllerová, 2005).

Dělohy semenáčku jsou jazykovitě protáhlé a primární listy jsou jednoduché, vejčité a pilovité. Zpeřené listy rostou až později a mívají 1-2 jařmy. Nálet semenáčků bývá velice bohatý a semenáčky rostou velmi rychle. Pětileté rostliny dosahují výšky 1-1,5 metru, ale růst zůstává rychlý i v pozdějších letech. Mezi 20.-40. rokem dosahuje výškový přírůst až 0,5 m ročně. Postupně intenzita přírůstu klesá a končí přibližně ve 100 letech. Výmladnost na pařezech a kořenových náběžích je výtečná. Růst výmladků je mnohem rychlejší než u semenáčků. Řízkování je obtížné, ale roubování je možné. Stromky často ožirá i přes hořkou kůru zvěř, hlavně zajíci (Úradníček *et al.*, 2014).

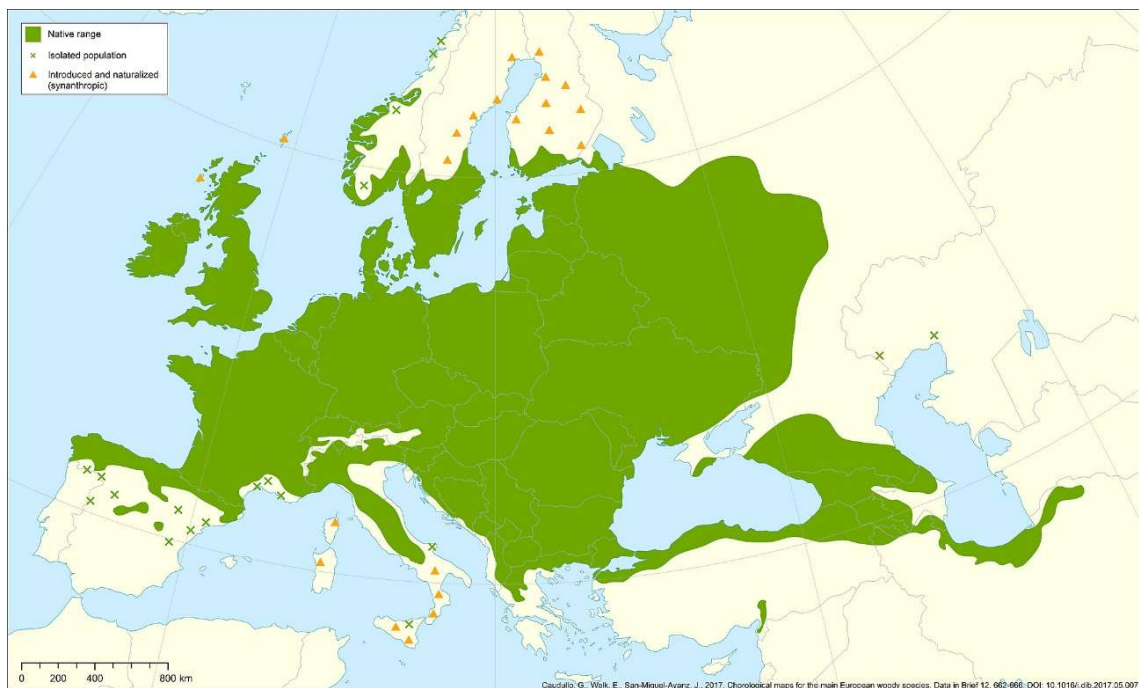
3.3.3 Geografické a vertikální rozšíření

Fraxinus excelsior je nejrozšířenějším druhem v Evropě z celého rodu *Fraxinus*. Vyskytuje se téměř na celém kontinentu a ve všech státech, kromě Islandu, Malty a Portugalska, je alespoň minimálně zastoupen (Enderle *et al.*, 2019). Areál rozšíření jasanu ztepilého je znázorněn na obr. 10. Severní hranice areálu sahá zhruba po 63° s. š., ale ještě zasahuje do teplejších oblastí Skandinávie, včetně jižního Finska. Rozšíření pokračuje přes evropskou část Ruska až k řece Volze a jižnímu Uralu. Hranice areálu sahají na jih až k Černému moři. V Asii se vyskytuje v kavkazské oblasti a pravděpodobně i na poloostrově Malá Asie, kde je ovšem výskyt nejistý. Vyskytuje se i ve středomoří, ale zde je spíše vzácný, protože se prolíná s teplomilnějším druhem *Fraxinus angustifolia*. Na Britských ostrovech se vyskytuje všude s výjimkou Skotska (Musil a Möllerová, 2005; Úradníček *et al.*, 2014).

Často se rozeznávají dva nebo tři ekotypy jasanu ztepilého. Prvním z nich je **lužní** ekotyp, který má těžiště rozšíření v nížinách podél toků velkých řek, a kde se dále vyskytuje *Quercus robur* a *Ulmus minor* a *leavis*. Dále se vymezuje ekotyp **horský**, který je rozšířen zejména v podhorském a horském pásmu bučin, na suťových prameništích, spolu s druhy *Acer pseudoplatanus* a *Ulmus glabra*. Na severu se vyskytuje v nižších nadmořských výškách a směrem na jih ustupuje do vyšších nadmořských výšek. A poslední je **vápencový** ekotyp, který obsazuje chlumní polohy mezi oběma předešlými ekotypy, zejména na jižních expozicích s nedostatkem vláhy, a proto se považuje za odolný ekotyp adaptovaný na sucho. V těchto oblastech se vyskytuje spolu

s druhy *Quercus petraea*, *pubescens* a *Sorbus torminalis*. Na druhou stranu, s pomocí provenienčních testů nebo experimentů reciproční transplantace, nebylo možné rozdělení na ekotypy tímto způsobem nikdy dokázat (Enderle *et al.*, 2019). Rozšíření jasanu sahá od nižších poloh až po 1400-1500 m n. m., v jižnějších pohořích jako příměs spolu s jinými listnáči (Úradníček *et al.*, 2014).

V České republice se vyskytuje roztroušeně od planárního až po submontánní, vzácně montánní stupeň, horní hranice výskytu je 980 m n. m. v Krkonoších a 960 m n. m. v Karpatech. Hojněji se vyskytuje v nížinách, pahorkatinách a v suťových lesích pahorkatin a hornatin. V nížinách je rozšíření jasanu, stejně jako dubu letního, velice redukováno likvidací lesů a jejich přeměnou na pole. Na horských a vápencových stanovištích je jasan poměrně zachován a jeho rozšíření zhruba odpovídá přirozenému stavu. I přes velký tlak, způsobený intenzivní pastvou a pařezovým hospodařením, je jasan v tomto ohledu díky vysoké výmladnosti nedotčen (Úradníček *et al.*, 2014).



Obrázek 10 - Areál rozšíření jasanu ztepilého (Caudullo *et al.*, 2017)

Ve většině zemí zaujímá podíl na zalesněné oblasti 1-2 %. V severských oblastech je podíl, vzhledem k ostatním druhům, menší než ve středoevropských oblastech, kde je podíl významnější. Zvláštní význam má jasan na Britských ostrovech, kde jeho zastoupení sahá v závislosti na oblasti od 4,5 % až po 12,7 % (Enderle *et al.*, 2019). V ČR byl v roce 2019 podíl na zalesněném území 1,4%, přirozený podíl by měl být 0,6%

a doporučený 0,7% (Ministerstvo zemědělství, 2020). V porovnání s rokem 2004, kdy byl jeho podíl v ČR 1,2 % (Ministerstvo zemědělství, 2005) se jedná o zvýšení o 0,2 %. Při porovnání dat zásob jasanu v roce 1990 a 2010 můžeme dokonce vypočítat jejich zvýšení téměř o polovinu. Zde je ovšem nutné poznamenat, že před epidemií chřadnutí a odumírání jasanů byl zařazován dokonce mezi expanzivní druhy, proto nedošlo ke snížení podílu vůči zalesněné ploše (Rozsypálek *et al.*, 2017). Ovšem mezi roky 2004 a 2014 došlo ke zvýšení zásob pouze o 0,2 % a podíly z roků 2014 a 2019 jsou dokonce totožné, což potvrzuje stagnaci rozšiřování i přes silný expanzivní potenciál (Ministerstvo zemědělství, 2005, 2015, 2020).

*Tabulka 1 – Přirozené zastoupení jednotlivých dřevin v ČR a vývoj skutečného zastoupení v průběhu let (Modifikováno podle Rozsypálek *et al.*, 2017) * - méně než 0,1 %*

Druhy	Přirozené zastoupení	2004	2009	2014
Smrk	11,2	53,5	52,15	50,7
Borovice	3,4	17,4	16,8	16,5
Jedle	19,8	0,9	1,0	1,1
Buk	40,2	6,4	7,2	8,0
Dub	19,4	6,5	6,8	7,1
Modřín	0	3,8	3,9	3,9
Bříza	0,8	2,9	2,8	2,8
Olše	0,6	1,5	1,6	1,6
Jasan	0,6	1,2	1,3	1,4
Javor	0,7	1,0	1,2	1,4
Habr	1,6	1,2	1,2	1,3
Lípa	0,8	1,0	1,1	1,1
Jilm	0,3	0*	0*	0*
Ostatní	0,6	1,7	1,9	1,9

3.3.4 Ekologie a environmentální funkce

Jasan ztepilý je světlomilný druh, ovšem do jistého věku snáší zastínění a v mládí ho dokonce vyžaduje. Mladé stromy se dobře vyvíjejí v zástínu a při prosvětlení okolního prostředí nasazují silný růst. Z důvodu řídké koruny a relativně pozdního olistění bývá pro spodní etáž dostatek světla. Tento druh vyžaduje dostatek vláhy po celý rok, výjimkou jsou jedinci rostoucí na vápenci, kteří prospívají i za nedostatku vláhy. Stagnující vodu a záplavy však zvládá pouze krátkodobě. Jasan je citlivý vůči nízkým teplotám a bývá těžce poškozován silnými mrazy. Též špatně snáší pozdní mrazy, které mají často za následek poškození terminálního pupenu. To vede k tvorbě vidlic, což je hospodářsky nežádoucí, protože koruna košatí a kmen není průběžný (Úřadníček *et al.*, 2014). Optimální prostředí pro jasan ztepilý je na velmi výživných, hlubokých a svěžích půdách. Roste na velkém spektru geologických podkladů, pokud jsou dostatečně živné. Důležitý je vysoký obsah dusíku, což je důvod, proč roste hlavně v nivních oblastech a na sutích. Nesnese zasolené nebo zrašelinělé půdy. Je jeden z nejnáročnějších listnáčů, a proto je považován za indikátor nejkvalitnějších půd (Úřadníček *et al.*, 2014). Je odolný vůči silným větrům. Díky této vlastnosti se používá jako větrolam a je vhodným druhem do městských oblastí, například v zástavbě, v alejích a parcích. V městských oblastech je dokonce třetím nejčastějším stromem po javorech a lípách (Rozsypálek *et al.*, 2017).

Významný přínos jasanu je v naplňování vodohospodářské funkce a vodního managementu. Jeho rozvětvený kořenový systém je schopný již od 15 let věku stabilizovat a zpevňovat břehy vodních toků. Kromě toho je schopný díky širokému kořenovému systému odvést velké množství vody, kterou následně vytranspiruje. Ve vegetační sezóně spotřebuje až 200 litrů vody. Díky tomu je vhodný jako meliorační a zpevňující dřevina (Šimíček, 1999). Kromě vodohospodářské funkce je jasan důležitý z hlediska vytváření habitatu a niky pro různé organismy. Velké množství organismů má život spojený s jasanem, a některé z nich jsou na něm přímo závislé. Též produkuje velmi kvalitní opad, čímž zkvalitňuje půdu ve svém okolí. Neméně důležitou funkci zastává jako součást zón proti šíření požárů. V lesnictví je mimo jiné populární z důvodu své robustnosti, toleranci vůči suchu, rychlému růstu a velké výmladnosti (Enderle *et al.*, 2019).

3.3.5 Využití v průmyslu a sadovnictví

V České republice není jasan z hlediska produkce dřeva strategický druh a jeho podíl na celkové těžbě dřeva je nepatrný (Úradníček *et al.*, 2014; Rozsypálek *et al.*, 2017). Jasan měl před příchodem industrializace větší ekonomický význam. Jasanové dřevo bylo nenahraditelné z důvodu pevnosti a pružnosti, a bylo využíváno například pro výrobu nástrojů, zbraní a v dopravě. Jelikož jde o strom s dobrou výmladností, sloužil jako zdroj potravy pro zvířata (Pratt, 2017). V minulém století, s úbytkem významu zemědělství a příchodem nebo zlepšením dostupnosti modernějších materiálů (např. oceli), se zmenšil význam dřeva jako materiálu (Rozsypálek *et al.*, 2017).

Dřevo jasanu je ceněno díky své tvrdosti, pružnosti i houževnatosti a považuje se za velmi kvalitní materiál. Více než polovina zpracovávaného jasanového dřeva je použita na produkci nábytku, dých, hudebních nástrojů (tělo baskytar), sportovních pomůcek a náčiní, násad, topůrek, podlahových krytin, schodů a mnoho dalších. Elasticity tohoto materiálu se využívá při výrobě raket, luků, lodí, lyží a baseballových pálek. Jasanové dřevo se dá vybrousit do téměř hladkého povrchu, a proto se využívá pro výrobu dveří, schodů a podlahových krytin (Rozsypálek *et al.*, 2017). Velmi ceněné bylo „očkové“ dřevo nebo dřevo s vlnitými letokruhy (Úradníček *et al.*, 2014). Okolo 25 % dřeva je zpracováno v papírnictví a 7 % je upotřebeno jako palivo (Rozsypálek *et al.*, 2017). Použití jasanového dřeva má v evropských zemích dlouhou historii, a kromě již výše zmíněného nachází uplatnění jako prémiový materiál pro speciální účely, např. v lidovém truhlářství (Rozsypálek *et al.*, 2017). Dále se z kůry využívalo tříslo, z listů se extrahovaly cenné látky jako třísloviny, éterické oleje a terpeny. Ze semen se rovněž získávaly léčivé látky a tuky. Obecně se produkty z jasanu používaly v lidovém léčitelství. Nenahraditelnou funkci má jasanové dřevo v lidových tradicích (Úradníček *et al.*, 2014). Například v irském národním sportu zvaném hurling (varianta pro muže) nebo camogie (varianta pro ženy) se využívá nástroj nazývaný hurl (obr. 11), což je páčka vyráběná výhradně z jasanového dřeva (McCracken *et al.*, 2017). Nordické mýty též uvádějí, že člověk byl stvořen z jasanového dřeva. Jejich posvátným, stálezeleným stromem je Yggdrasill, což má být podle některých zdrojů právě jasan (Musil a Möllerová, 2005).

Dalším významným odvětvím, kde se jasan využívá, je sadovnictví. V sadovnictví se využívá velké množství kultivarů jako je „smuteční“ jasan (,Pendula‘), ,Nana‘, která se využívá ve stromořadích měst nebo ,Diversifolia‘, což je jednolistý kultivar jasanu (Musil a Möllerová, 2005; Úředníček *et al.*, 2014).



Obrázek 11 - Jasanová pálka hurl (Heritage Hurleys, 2009)

3.4 Genetická diverzita jasanu

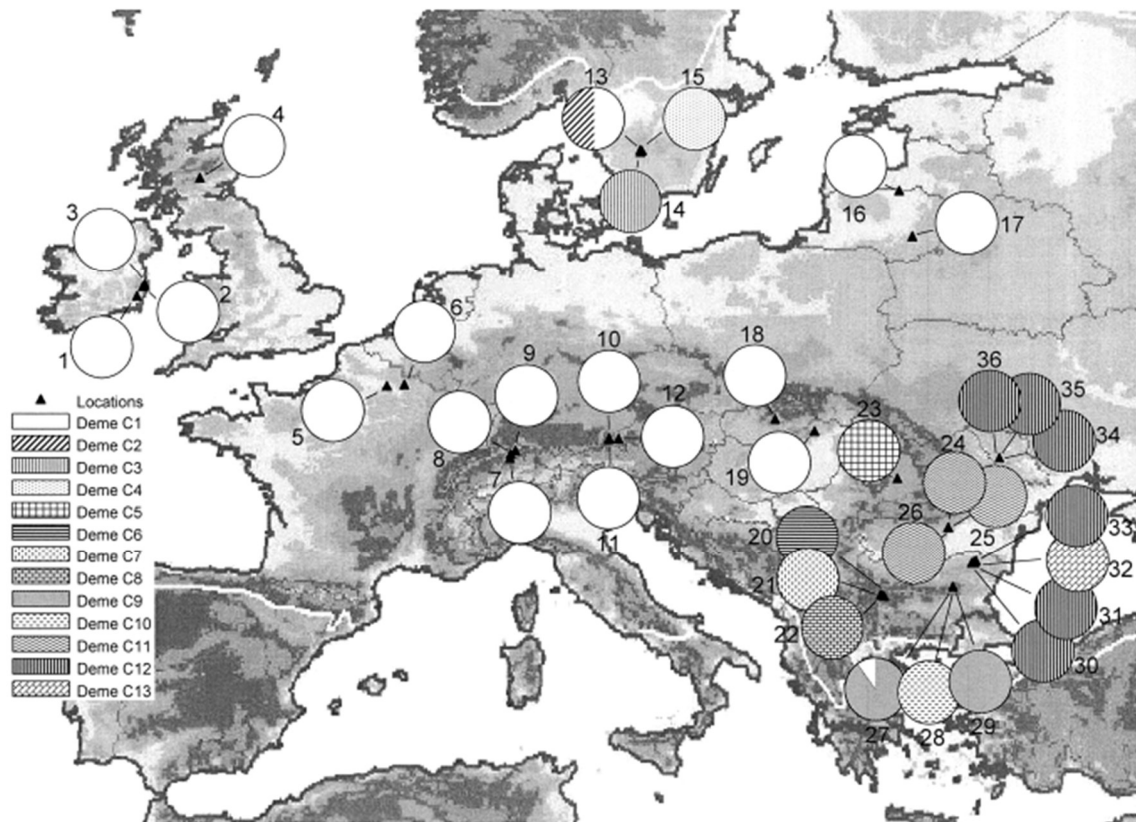
Klimatické podmínky a ráz krajiny ve čtvrtohorách formovaly doby ledové (glaciály), které se střídaly s teplejšími obdobími a dobami meziledovými (interglaciály). Posledním glaciálem byl tzv. Würmský glaciál, který skončil odhadem před necelými 12 000 lety. Glaciály jsou období, která jsou oproti interglaciálům výrazně chladnější a díky nižším srážkám i sušší. Též se vyznačují různě velkým růstem pevninských ledovců. Jedná se tedy o podmínky nepříznivé pro drtivou většinu fauny a flóry, jejichž přirozený areál se postupně zmenšuje. Klimaticky nejprůzračnější místa, která bývají v rámci Evropy v jižnějších oblastech se nazývají refugia.

Areál evropských temperátních lesů, ve kterých přirozeně roste jasan ztepilý, byl výhradně omezen na refugia (Bennett *et al.*, 1991). Existence jednotlivých refugií pro daný druh je těžko prokazatelná a zjišťuje se analýzou fosilního pylu nebo chloroplastové DNA. Refugia, ve kterých se vyskytoval jasan, byla nejčastěji na jihoevropských poloostrovech, tj. Pyrenejském, Apeninském a Balkánském (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004). Pravděpodobně se vyskytovalo refugium i ve východní části Alp. Nejistá je existence refugia v severovýchodní Evropě, kvůli blízkosti kontinentálního ledovce. Dalším neuspokojivě dokázaným refugiem je oblast severního Černého moře (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004). Z důvodu existence refugií docházelo k tvorbě izolovaných populací, a zároveň genetické diferenciaci mezi nimi (Kremer *et al.*, 2002). I přes vysokou schopnost „out-breedingu“, tedy křížení jedinců z odlišných populací, je jasan stále ovlivňován jeho glaciální minulostí (Enderle *et al.*, 2019). To je převážně způsobeno dlouhým životním cyklem, který je typický pro většinu stromových druhů temperátního lesa. To má za následek malé množství generací, a tedy nedostatek času na výraznou změnu genetické struktury (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004).

Po skončení glaciálu docházelo k šíření z refugií a rekolonizaci původních areálů. Zkoumání markerů nDNA ukazují, že na základě lokalizace a vzdálenosti jednotlivých refugií se vytvořila různá genetická struktura v západní a střední Evropě a v jihovýchodní Evropě a Švédsku. V západní a střední Evropě jsou populace jasanu velmi homogenní, s nízkou diferenciací mezi různými populacemi (obr. 12). Oproti populacím v jihovýchodní Evropě u nich též více dochází k inbreedingu, tedy křížení geneticky podobných jedinců. Na druhou stranu disponují vysokou genetickou diverzitou mezi jednotlivými jedinci. To je pravděpodobně zapříčiněno podobnou vzdáleností od různých refugií, díky které se efektivně mísily geny z různých genetických zdrojů, což vedlo

k vytvoření pouze jednoho demu (skupiny jedinců, kteří se kříží mezi sebou a sdílí genofond) (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004). Podobnou charakteristiku mají populace v Irsku (Beatty *et al.*, 2015). Jediná oblast v západní a střední Evropě s významnou diferenciací od ostatních částí této oblasti (ale stále nižší než v jihovýchodní Evropě) bylo jihovýchodní Bavorsko, kde se pravděpodobně mísily populace z velkého množství refugií. Díky tomu mají zdejší populace vyšší genetickou diverzitu (Fussi a Konner, 2014). Nízkou adaptací na lokální podmínky prokázal v západní Evropě též reciproční transplantační experiment, ve kterém byli jedinci z Pyrenejí introdukováni do Skotska, a naopak. Některým populacím se dařilo relativně dobře na všech plochách, ale na žádné ploše nedosáhly výborného růstu (Clark a Webber, 2017).

Genetická struktura jihovýchodních populací souvisí pravděpodobně s výskytem významných refugií v této oblasti. Pravděpodobně existovala minimálně dvě různá refugia na západní a východní části Balkánského poloostrova. Po skončení glaciálu se tyto dobře přizpůsobené autochtonní porosty začaly šířit do okolí, kde měly konkurenční výhodu. To omezilo tok genů (gene flow) a vedlo ke vzniku populací spadajících do různých demů, s nižší genetickou diverzitou, ale významnou genetickou diferenciací (obr. 12). Dalším vysvětlením větší genetické diferenciace mezi populacemi může být izolace jednotlivých populací způsobená hornatým reliéfem. Inbreeding není tak intenzivní jako u populací ve střední a východní Evropě. Tato zjištění podporují hypotézu, že při stabilních podmínkách je omezen gene flow v porovnání s rekolonizací nových území s podobným šířením pylu z různých menších populací. Pravděpodobně byly severní oblasti areálu jasanu kolonizovány z jihovýchodních refugií, což dokazuje i nižší genetická diverzita (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004).



Obrázek 12 - Zastoupení jednotlivých demů v Evropě na základě analýzy nDNA. Ve střední a střední Evropě jsou populace homogenní, a naopak v jihovýchodní Evropě existuje silná diferenciace (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004)

Výsledky studia markerů cpDNA naznačují jiný průběh šíření z refugií, a tedy genetickou strukturu evropských populací. Jak již bylo zmíněno, při studiu markerů nDNA nebyla pozorována výrazná diferenciace mezi populacemi u západoevropských a středoevropských populací, ale spíše jednotný dem s vysokou diverzitou. To je způsobeno nejspíše efektivním šířením pylu na dlouhé vzdálenosti. Markery cpDNA poukazují spíše na silnou diferenciaci mezi populacemi, kde jednotlivé populace jsou spjaty s nejbližším refugiem, a nízkou genetickou variabilitou (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004). To by korespondovalo se spíše kratší disperzí semen a dalšími studiemi, které objevily, že většina pylu se šíří v rámci jednoho porostu (Altman a Dittmer, 1964). Nízká genetická variabilita může být způsobena malou úrovní mutací u cpDNA markerů, což se zdá být typické pro čeled' olivovníkovitých (Besnard *et al.*, 2002), nebo nízkou variabilitou u původních populací z refugií, způsobenou malou efektivní populační velikostí (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004). Na druhou stranu studie cpDNA (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004) neobjevila významnou genetickou diferenciaci mezi populacemi

v jihovýchodní Evropě, na kterou poukázala studie nDNA (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004), a která korespondovala s nálezem fosilního pylu. Podobná genetická struktura byla objevena i u dalších evropských druhů. Diverzita cpDNA byla celkově vyšší než u *F. ornus* a *F. angustifolia* (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004).

Populace ve střední a západní Evropě mají nižší bohatost alel než populace v jihovýchodní Evropě. K této ztrátě docházelo pravděpodobně při rekolonizaci, což potvrzuje hypotéza silných autochtonních populací v jihovýchodní Evropě (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004). Ztráta alel by mohla být vysvětlena tzv. zakladatelským efektem, který byl prokázán u některých druhů (Bennett *et al.*, 1991). Zakladatelský efekt se projevuje při introdukci nebo rekolonizaci nového stanoviště, při němž dochází ke ztrátě genetické variability v důsledku šíření pouze malého množství jedinců z větší populace. Existence zakladatelského efektu podporuje i šíření jasanu z refugií, které proběhlo až po několika dalších druzích stromů. Šíření do krajiny, která již byla obsazena jinými druhy, by vyvolalo konkurenční tlak a ten by způsobil silnou selekci jedinců (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004). Obecným argumentem proti zakladatelskému efektu byla velká diverzita v rámci populací. Omezení zakladatelského efektu mohlo být způsobeno několika faktory jako např. šířením pylu na dlouhou vzdálenost a míšení populací z různých refugií (Comps *et al.*, 2001). Dalším takovým faktorem by mohl být nálet jedinců z okolních populací na novou lokalitu, který by proběhl před zralostí současného porostu, čímž by se populace na novém stanovišti dále diverzifikovala (Austerlitz *et al.*, 2000).

V různých studiích bylo zjištěno, že jasan má pozitivní koeficient inbreedingu, což naznačuje větší množství homozygotů (Ferrazzini *et al.*, 2007). Míra inbreedingu byla v německé studii (Fussi a Konnert, 2014) vyšší než v ostatních. Homozygoti bývají obecně vystaveni konkurenčnímu tlaku, a to vede ke snížení jejich počtu s rostoucím věkem, což se prokázalo i u jasanu. Zvláštní ovšem bylo, že s klesajícím podílem homozygotů koeficient inbreedingu dále vzrostl. Nadbytek homozygotů může být vysvětlen mnoha faktory jako například výskyt nulových alel, Wahlundův efekt (tvorba subpopulačních struktur s různou alelickou frekvencí, což vede k redukci heterozygotů) nebo sebeopylování. Spolehlivé vysvětlení ovšem dosud nebylo nalezeno (Ferrazzini *et al.*, 2007).

3.5 *Hymenoscyphus fraxineus*

3.5.1 Historie rozšíření a identifikace patogenu

Po dlouhou dobu byl jasan ztepilý považován za dřevinu, která nemá významný problém se zdravotním stavem, a kterou kalamitně neohrožoval žádný z jejích patogenů. Mezi vážnější patogeny a škůdce jasanu bylo možno zařadit druhy fytoftora (*Phytophthora spp.*), verticilia (*Verticillium spp.*), padlí jasanové (*Phyllactinia fraxini*), rážovka (*Nectria galligena*), pseudomas (*Pseudomas svastanoi pv. Fraxini*), rezavec štětinatý (*Inonotus hispidus*), lýkohub jasanový (*Hylesinus fraxini*) a lýkohub zrnitý (*Hylesinus crenatus*), dutilka jasanová (*Prociphilus bumeliae*) a některé další organismy (Gregorová *et al.*, 2006). Díky absenci významných patogenů a škůdců a snadnému šíření byl jasan některými odborníky dokonce zařazován mezi expanzivní druhy (Rozsypálek *et al.*, 2017).

Kolem poloviny 90. let minulého století tento příznivý trend pro jasan skončil. Ze severovýchodní Evropy se začala rychle šířit nákaza, která způsobovala nekrózu jasanů (Kowalski, 2006). Podle genetických studií herbářových položek se tato nákaza nejspíše v Evropě objevila mnohem dříve, uvádí se v 80. letech 20. století, ale podle některých pramenů až o 30 let dříve, než byla poprvé zaznamenána v roce 1992 v Polsku, a následně v Litvě (Queloz *et al.*, 2011). Důvodů, proč nákaza nebyla objevena dříve, je několik. Hlavním důvodem je, že jasan nebyl příliš ceněná dřevina, což způsobilo, že lokální odumírání jasanů bylo přehlíženo (Havrdová *et al.*, 2013). Dalším důvodem byl nedostatek odborníků na fytopatologii v některých postižených zemích. Pozdní objevení a popsání této nákazy zapříčinilo to, že nejsou dostupná přesná statistická data a dlouhou dobu nebyl proveden žádný oficiální pokus na omezení šíření nákazy (Enderle *et al.*, 2019). To mimo jiné zapříčinilo, že nyní se nákaza způsobující odumírání jasanů vyskytuje téměř v celé Evropě. Genetické studie naznačují, že se patogen dostal do severovýchodní Evropy z dálného východu Asie. Způsob, kterým se houba pravděpodobně dostala do Polska byl import rostlin a dřevního materiálu jasanu mandžuského (*Fraxinus manchurian*) nebo jasanu čínského (*Fraxinus chinensis*) z dálných oblastí Ruska. Tuto hypotézu potvrzuje skutečnost, že jasan zimnář (*Fraxinus ornus*) je odolnější vůči *H. fraxineus*, protože *F. ornus* je více příbuzný asijským druhům jasanů (Queloz *et al.*, 2011). Analýza dat na základě pozorování příznaků a statistik

výskytu patogenu naznačuje, že nákaza se šíří koncentricky ze svého epicentra v již zmíněných severovýchodních oblastech Polska a Litvy průměrnou rychlostí 30-70 km za rok (Mckinney *et al.*, 2014). Tento jev potvrzují měření například v Norsku a Švýcarsku, která zároveň podporují způsob šíření větrem (Borja *et al.*, 2017; Queloz *et al.*, 2017). V některých státech, například v Německu a Estonsku, bylo pozorováno nepravidelné šíření nebo dokonce šíření v opačném směru, což je přisuzováno antropogennímu faktoru, hlavně převážení sazenic a obchodu se sadebním materiálem (Drenkhan, Agan, *et al.*, 2017; Enderle *et al.*, 2017).

V České republice byl poprvé zaznamenán lokální úbytek jasanů na přelomu tisíciletí (např. na základě zkoumání herbářových položek na střední Moravě v roce 2002). Od roku 2004 se úbytek jasanů významně zvýšil a symptomy infekce byly postupně pozorovány s různou intenzitou na celé ploše ČR. Potvrzení výskytu *Hymenoscyphus fraxineus* na území České republiky bylo uskutečněno v roce 2007 na základě analýzy vzorků kultivaru jasanu ztepilého „*pendula*“, pocházejících z arboreta Křtiny (Jankovský a Holdenrieder, 2009). V dnešní době se patogen *Hymenoscyphus fraxineus* roztroušeně vyskytuje na celém území České republiky (Rozsypálek *et al.*, 2017). Šíření probíhá ze severovýchodu na jihozápad, což je možné pozorovat na relativně lepším zdravotním stavu jasanových porostů v jihozápadní části republiky. Výskyt tohoto patogenu byl potvrzen na obou domácích druzích jasanu, tedy *Fraxinus excelsior* a *Fraxinus angustifolia* (Jankovský a Holdenrieder, 2009).

Organismus způsobující nekrózu jasanů a jejich následné odumírání byl poprvé identifikován v roce 2001 (Kowalski, 2001) a následně popsán v roce 2006 vědeckým názvem *Chalara fraxinea* (Kowalski, 2006). Jedná se o anamorfní, tedy nepohlavní, stádium organismu. V následujících letech byl saprofytický druh vřekovýtrusé houby *Hymenoscyphus albidus* označen jako teleomorfní (pohlavní) stádium patogenu. *H. albidus* se minimálně od roku 1850 běžně vykytuje na jasanovém opadu, na řapících jasanových listů a na odumřelých výhonech jasanu (Kowalski a Holdenrieder, 2009). Problém je, že *Hymenoscyphus albidus* se nikdy neprojevoval patogenicky, proto je nepravděpodobné, že se jednalo o původce chřadnutí, a následného odumírání jasanů. Další molekulární analýzy vzorků izolovaných z nekróz prokázaly existenci dvou morfologicky identických druhů, které se lišily pouze drobnými molekulárními charakteristikami a virulencí vůči jasanům. Jedním druhem byl dlouhodobý saprofyt listů jasanů *Hymenoscyphus albidus*, který nezpůsobuje nekrózu jasanů. Druhý druh byl

pojmenován *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, ke kterému bylo přiřazeno anamorfní stádium *Chalara fraxinea* a byl označen jako původce onemocnění (Queloz *et al.*, 2011). Další zkoumání ukázalo, že *Hymenoscyphus pseudoalbidus* pochází z Asie, kde je znám jako *Lambertella albida* (Zhao *et al.*, 2013). V roce 2011 proběhlo zasedání mezinárodního botanického kongresu IBC zabývající se nomenklaturou. Na tomto zasedání bylo rozhodnuto o opuštění dvojího pojmenování jednoho druhu pleomorfních hub. Do té doby bylo běžné, že různá stádia hub (hlavně anamorfní a teleomorfní) měla svůj unikátní vědecký název. Na základě molekulární fylogeneze třídy *Leotiomycetes* (voskovičkoplodé) typických zástupců rodu *Hymenoscyphus* a *Chalara* bylo rozhodnuto, že tyto dva rodové názvy nejsou synonyma a druh způsobující nekrózu jasanů je spíše příbuzný k typickým druhům rodu *Hymenoscyphus*. Na základě rozhodnutí IBC musí být nové druhové jméno použito z nejstaršího popsání názvu daného druhu, tedy „*fraxinea*“. Jednotný název byl proto určen jako *Hymenoscyphus fraxineus*. Nově je původní název pro anamorfní stádium *Chalara fraxinea* zařazen jako basionym, tedy vědecký název, který byl poprvé použit v literatuře. Původní název pro teleomorfní stádium *Hymenoscyphus pseudoalbidus* je považován za synonymum (Baral *et al.*, 2014). Taxonomicky je *Hymenoscyphus fraxineus* zařazen do vřeckovýtrusých hub (*Ascomycota – fungi*), do třídy voskovičkoplodé (*Leotiomycetes*), řádu voskovičkotvaré (*Helotiales*), čeledi voskovičkovité (*Helotiaceae*). V češtině se pro patogen používá název voskovička jasanová.

3.5.2 Faktory zhoršující zdravotní stav a průběh nemoci

I přes identifikování primárního patogenu způsobující odumírání jasanů nelze označit poškození způsobené biotickým činitelem jako jediný problém, kterému čelí nejen jasanové porosty. V nedávné historii bylo lidskou činností v lesích manipulováno s přírodní rovnováhou, strukturou lesa a druhů v něm žijících. Odlesňování velkých ploch, a jejich následné obhospodařování bez respektu k přírodním zákonitostem, posunulo druhy mimo jejich přirozený habitat. Z tohoto důvodu jsou lesy pod neustálým abiotickým stresem, který vytváří vhodné prostředí pro biotické škůdce. Dále z důvodu globálních změn jsou stromy, lesy i celé krajiny ohrožovány novými vedlejšími faktory, např. suchem. Společné působení těchto činitelů má za následek úbytek nebo odumírání nejen druhů, ale celých ekosystémů a mají nezanedbatelný vliv na kompozici a stabilitu krajiny (Rozsypálek *et al.*, 2017).

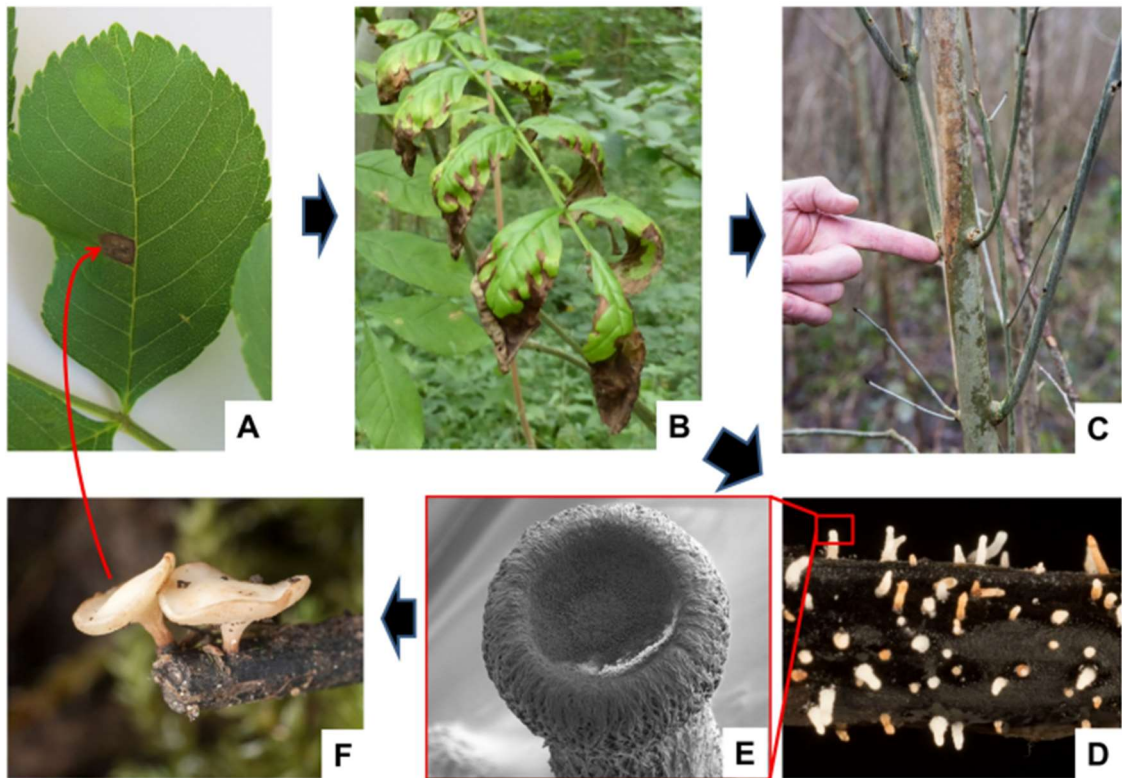
Patogenem jsou napadány porosty na různých stanovištích a porosty splňující různý účel, tedy přírodní a komerční porosty i okrasné výsadby. Ohroženy jsou rovněž soliterně rostoucí stromy, jedinci roztroušeně rostoucí v krajině, větrolamy, stromořadí, stromy v břehových porostech a v ochranných porostech na svazích (Havrdová *et al.*, 2013). Ve vlhčích oblastech je rizikem současný výskyt *Hymenoscyphus fraxineus* a *Phytophthora alni* na jasaněch a olších (Rozsypálek *et al.*, 2017). Vedle toho probíhá trvalá redukce jilmů napadených patogenem *Ophiostoma novo-ulmi* (Dvořák *et al.*, 2007). Důsledkem společného působení těchto činitelů je devastace pobřežního lesa, který je tvořen hlavně jasanem, olšemi a jilmy (Rozsypálek *et al.*, 2017). Kromě jasného problému s postupným ubýváním přirozené druhové skladby stromů pobřežních biotopů existuje minimálně jeden další problém. Tyto druhy stromů zajišťují zpevňování říčních břehů, takže rozpad pobřežních lesů může velmi ovlivnit jejich stabilitu (Šimíček, 1999). Lze předpokládat, že škody způsobené v lesích a břehových porostech se pohybují v řádech desítek milionů korun (Havrdová *et al.*, 2013).

Nekróza jasanů způsobuje největší ztráty na mladých jedincích. U nich choroba postupuje velmi rychle a je v drtivé většině případů letální. To je značnou překážkou při obnově porostů a obecně v mladých výsadbách (Černý, 2011). Tato choroba způsobuje vážné potíže ve školkařství, kde se škody pohybují v řádech milionů korun (Havrdová *et al.*, 2013). Ovšem i přes to, že choroba způsobuje odumírání hlavně mladých jedinců, šíření patogenu probíhá nezávisle na věku porostu (Rozsypálek *et al.*, 2017). Věk však není jediným faktorem, který ovlivňuje závažnost symptomů. Byla prokázána souvislost mezi závažností symptomů a nadmořskou výškou. Se stoupající nadmořskou výškou byly infikované stromy mnohem méně ovlivněny nákazou. V oblasti České republiky a obecně střední Evropy byla na základě výzkumu stanovena hranice 600 m n. m., nad kterou je možné pozorovat významné snížení mortality a projevů symptomů nákazy (Havrdová *et al.*, 2016). Závažnost nemoci závisí na environmentálních faktorech. Stromy v lesích jsou více náchylné vůči nákaze než stromy soliterní (Heinze *et al.*, 2017), což je dááno do souvislosti s vyšší vlhkostí (Enderle *et al.*, 2019). Suché a teplé mikroklima se prokázalo jako nepříznivé pro patogen. Proto se očekává, že by globální oteplování mohlo do určité míry nákazu zmírnit (Grosdidier *et al.*, 2018). Ovšem vliv různých ekosystémů a stanovišť jako takových na šíření nákazy a závažnost symptomů nebyla spolehlivě prokázána (Havrdová *et al.*, 2016).

3.5.3 Ekologie a životní cyklus

Šíření houby *Hymenoscyphus fraxineus* probíhá výhradně větrem, který unáší na velké vzdálenosti askospory, což jsou pohlavní spory. Na rozdíl od ostatních houbových a houbám podobných organismů způsobujících velké epidemie, nebylo u organismu *Hymenoscyphus fraxineus* prokázáno rozmnožování za pomoci nepohlavních spor – konidií. Existuje hypotéza, že nepohlavní šíření může probíhat lokálně na krátké vzdálenosti, což vyvrací skutečnost, že žádný identický klon nebyl zatím objeven (Downie, 2017). Na druhou stranu většina odborníků předpokládá, že konidie hrají svoji roli v úspěšné invazi. Například některé studie předpokládají, že konidie zajišťují funkci spermatí (samčích rozmnožovacích buněk) a zajišťují rozmnožování mezi různými kmeny (Gross *et al.*, 2012).

Životní cyklus *Hymenoscyphus fraxineus* je popsán na obr. 13 a podobá se cyklu příbuzného organismu, který je v Evropě původní – *Hymenoscyphus albidus*. Askospory, které jsou v létě šířeny větrem, dopadají na listy jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior*), kde patogen klíčí a dochází k nekrotizaci pletiv. Nekróza se progresivně šíří po řapíčcích a postupně se přesouvá na hlavní řapík listu. Na podzim opadají listy a patogen přežívá mezi opadankou (Downie, 2017). Příští rok, převážně v letních měsících, se na řapících objevují bělavé miskovité plodničky, které se nazývají apothecia (Wey *et al.*, 2016). Dospělá apothecia rozšiřují za pomoci větru do svého okolí velké množství pohlavních askospor. V místech intenzivního šíření jsou běžné hodnoty 100 000 askospor na metr krychlový vzduchu (Chandelier *et al.*, 2014). Tyto pohlavně vytvořené askospory, které jsou unášeny větrem, kolonizují další listy a cyklus se opakuje. Vzácněji dochází k tvorbě apothecií na výhonech hostitele (Timmermann *et al.*, 2011).



Obrázek 13 - Životní cyklus *H. fraxineus*. A) Askospory, dopadající v létě na listy jasanu, vytvářejí postupně nekrotické léze. B) Mycelium hub se postupně šíří po řapících. C) Mycelium se může dostat až do dřevních částí stromu a může zamezit výměně živin mezi listy a zbytkem stromu. D) Listy opadají převážně na podzim a vytváří se na nich zárodky plodnic, E) které jsou zvětšeny pomocí mikroskopu. F) Z nich se postupně stanou zralé plodnice, které vypouštějí do vzduchu askospory, čímž se uzavírá cyklus. (Downie, 2017)

Nákaza *Hymenoscyphus fraxineus* postupuje velmi rychle, což způsobuje, že se často rozšiřuje až do dřevních pletiv, ve kterých může patogen přezimovat (Downie, 2017). Nejčastěji se mycelium rozšíří z řapíku přes listovou stopu do výhonů a větví. Pravděpodobně může nákaza do xylému proniknout i přes pupeny, lenticely nebo v místech poranění nebo přisátí hmyzem. Rozšíření do xylému způsobuje stromu velké problémy. Na napadených výhonech a větvích následně v podzimních a zimních měsících vznikají nekrózy, které se hlavně v asimilačním směru prodlužují. To postupně způsobuje jejich odumírání a s tím spojené řidnutí koruny. Strom nejčastěji reaguje tvorbou preventivních výhonů, tzv. vlků, což způsobuje typické shlukovité olistění. To může paradoxně urychlit smrt stromu, protože to patogenu poskytne snazší přístup do dřevnatých částí. Postupem let se mycelium rozšiřuje, což spolu s každoročním uvadáním korun (až na 80-90 % původního objemu celé koruny) způsobí smrt stromu (Havrdová *et al.*, 2013). Další faktorů, které způsobují smrt hostitele, je několik. Jedním z nich je nekróza kořenových krčků, která je primárně způsobována tímto patogenem a způsobuje

hnilobu kořenů (Enderle *et al.*, 2019). Dále hraje významnou roli sekundární napadení oslabeného jedince jinou dřevokaznou houbou nebo hmyzím škůdcem. Kromě toho byl tento patogen objeven i v semenech jasanu, kam se mohly rozšířit přímo askosporami nebo prorůstáním mycelia z napadených výhonů (Cleary *et al.*, 2013).



Obrázek 14 – Srovnání dvou sousedících stromů v oblasti se silným infekčním tlakem. Vlevo je silně poškozený jedinec a vpravo jedinec, který probíhající nákazou není příliš ovlivněn. (Enderle *et al.*, 2019)

3.5.4 Možná obrana

Z důvodu pozdní reakce na chřadnutí jasanů je v dnešní době možné prohlásit, že patogen nikdy úplně nezmizí. Opatření, která se používají proti nákaze, jsou spíše preventivní (Enderle *et al.*, 2019). Jde například o kontrolu sadebního materiálu, podporu genetické diverzity, a zvláště důležité je zkoumání a podpora pěstování geneticky rezistentních jedinců. Dalšími opatřeními jsou omezení výsadby v místech s výskytem infekce, ale i obecně používání jasanu jako spíše vedlejší dřeviny (Havrdová *et al.*, 2013; Mckinney *et al.*, 2014; Skovsgaard *et al.*, 2017). Příklady aktivních obranných opatření jsou těžba napadených jedinců, likvidace infikovaného rostlinného materiálu nebo brzké výchovné zásahy. O účinnosti těchto opatření ovšem mnozí autoři pochybují (Havrdová *et al.*, 2013). Ve většině států není pěstování jasanů ve školkách a jejich následné sázení doporučeno a znatelně se od objevu nákazy omezilo (Enderle *et al.*, 2019). V Polsku byla produkce semenáčků dokonce zakázána úplně (Gil *et al.*, 2017).

Na druhou stranu na Slovensku je stále pěstováno a vysazováno velké množství semenáčků (Longauerová *et al.*, 2017) a v některých státech, například Irsku, byla výsadba jasanů dokonce dotována (McCracken *et al.*, 2017). Obecným problémem je nejednotný postup evropských zemí v boji s touto nákazou a malá opora v legislativě a dalších předpisech. Například *Hymenoscyphus fraxineus* byl sice mezi lety 2007 a 2014 zapsán na výstražný seznam (EPPO alert list), ale nikdy nebyl uznán jako regulovaný organismus (European Plant Protection Organisation (EPPO), 2014). Jedním z mála opatření, které bylo zaneseno do legislativy je regulace importu sadebního materiálu na Britské ostrovy a likvidace nakažených semenáčků (Enderle *et al.*, 2019).

3.6 Genetická diverzita *Hymenoscyphus fraxineus*

Hymenoscyphus fraxineus je patogen, který pochází z východní Asie, kde se jedná o relativně neškodného škůdce listů některých druhů jasanů (Drenkhan, Solheim, *et al.*, 2017). Ve východní Asii má tento patogen velkou genetickou diverzitu, a zároveň vysoký tok genů, čímž se populace dále diverzifikuje (Enderle *et al.*, 2019). Jedním z důvodů může být dlouhodobý vztah hostitele a patogenu, který se nazývá efekt červené královny. Ten popisuje stav, kdy se zdá, že organismy jsou ve stejném stavu a nevyvíjí se, ale ve skutečnosti při vyvinutí nové konkurenční výhody jednoho organismu se druhý organismus adaptuje, aby nebyl znevýhodněn (Landolt *et al.*, 2016). Na druhé straně jsou populace v Evropě velmi odlišné od těch z východní Asie. Mají velmi malou diverzitu alel a téměř neexistující genetickou diferenciaci mezi jednotlivými populacemi, což vyvolává téměř uniformní populaci v celé Evropě, včetně Britských ostrovů. Dokonce nebyla zaznamenána ani významná diferenciaci mezi populacemi, které čelí nákaze od samého začátku introdukce v Evropě a populacemi v místech, kde nemá epidemie tak dlouhou historii (Enderle *et al.*, 2019). Jedinou výjimku tvoří mírná populační diferenciaci v Německu (Nguyen *et al.*, 2016), která souvisí s podílem dalších stromových druhů nebo v Polsku, která souvisí s různou nadmořskou výškou (Kraj *et al.*, 2012).

Různé studie dokazují, že evropské populace jsou ovlivněny velmi silným zakladatelským efektem. To až do té míry, že odhady hovoří pouze o dvou haploidních jedincích, jejichž genom tvoří víceméně celý genofond evropské populace (McMullan *et al.*, 2018). To může být dokázáno například na jednom zástupci přirozeného nepřítele *H. fraxineus*, kterým je mykovirus MitoVirus 1. Ten byl přítomen u více než 80 % vzorků z evropské populace, a pouze u 1 % vzorků z japonské populace (Downie, 2017). Kromě toho genetická diferenciaci korelovala pozitivně s diverzitou japonské populace a negativně s diverzitou evropské populace. To znamená, že jedinec z Japonska s větší diverzitou na daném lokusu méně pravděpodobně sdílí alelu na stejném lokusu s jedincem z Evropy, a naopak čím větší diverzitou disponuje na daném lokusu evropský jedinec, tím je větší pravděpodobnost, že tyto alely bude sdílet s japonským jedincem (McMullan *et al.*, 2018).

H. fraxineus je velmi podobný domácímú neškodnému škůdci listů *H. albidus* a oba mají téměř identickou ekologickou niku. Počet záznamů výskytu *H. albidus* se postupem let zmenšoval, což vedlo v některých zemích k úsudku, že virulentnější *H. fraxineus* vyhubil *H. albidus*. Pravděpodobnější vysvětlení je, že kvůli vysoké míře výskytu *H. fraxineus* se dá snáze detekovat než *H. albidus* (Downie, 2017). Zároveň hypotézu křížení *H. albidus* a *H. fraxineus* prozatím vyvrátily laboratorní testy, při kterých bylo křížení in vitro neúspěšné (Wey *et al.*, 2016).

3.7 Náchylnost jasanu vůči napadení *Hymenoscyphus fraxineus*

Existuje několik desítek druhů rodu *Fraxinus*. Různé druhy se od sebe dramaticky liší v síle projevů nákazy a mortalitě. Studie Nielsen *et al.* (2017) zkoumala možnou souvislost mezi fylogenetickou historií rodu *Fraxinus* a odlišnostech v projevu nákazy u různých druhů. V místě původu *H. fraxineus* se jedná o fakultativní patogen listů především druhu *Fraxinus mandshurica*, který patří do fylogenetické sekce *Fraxinus*. U tohoto druhu mohou vzniknout nekrózy listu, které se ale nešíří dále do dřeva. Druhy sekce *Ornus*, do které patří například *Fraxinus chinensis* a evropský druh *Fraxinus ornus*, a která je ve východní Asii též velmi rozšířená, vykazují velmi silnou rezistenci vůči *H. fraxineus*. Na rozdíl od *F. mandshurica* se často nerozvinuly žádné příznaky. Takto vysoká rezistence se objevuje i u jediného zástupce sekce *Ornus* v Evropě, a tedy i v ČR, kterým je *F. ornus*. Tři ze čtyř druhů, které byly napadeny: evropské jasanu *F. excelsior* a *F. angustifolia* a americký jasan *F. nigra*, patří do sekce *Fraxinus*, stejně jako původní hostitel *F. mandshurica*. Na druhou stranu tato skupina není homogenní a v několika studiích bylo prokázáno, že *F. angustifolia* je méně náchylný než *F. excelsior*. Posledním nejvíce napadeným druhem byl americký druh jasanu *F. quadrangulata*, který byl v dřívějších klasifikacích řazen do sekce *Fraxinus*. Americké druhy *F. quadrangulata* a *F. nigra* byly dokonce tak náchylné, že odumřely dříve, než u nich stihl proběhnout test vystavení sporám nebo očkování patogenem *H. fraxineus*. Sekce *Melioides*, do které patří například *F. americana* a *F. pennsylvanica*, a která je nejběžnější v severní Americe, měla větší odolnost vůči nákaze než sekce *Fraxinus*, ale stále byla velmi ovlivněna infekčním tlakem *H. fraxineus*. Výsledky studie tedy naznačují, že čím více jsou noví hostitelé příbuzní původnímu hostiteli, tím více jsou náchylní vůči potenciální nákaze. Hlavním hostitelem v místě původu *H. fraxineus* je *F. mandshurica*. Tyto dva druhy se dlouhodobě vyvíjely vedle sebe a je pravděpodobné, že se u nich projevil efekt červené královny, který bývá důležitou součástí vztahu hostitel-patogen (Landolt *et al.*, 2016). Při rozšíření do nového prostředí je pro patogen nejsnazší napadat fylogeneticky příbuzné druhy, protože se jedná o podobného hostitele. Díky tomu nemusí dojít k výrazné adaptaci, aby tyto nové hostitele mohl efektivně napadnout. Navíc u těchto druhů není vyvinutá žádná adaptace vůči novému patogenu (Nielsen *et al.*, 2017). Rozdílnost v náchylnosti vůči nákaze existuje i u kultivarů *F. excelsior*. Nejvíce ohrožené kultivary jsou *Pendula* a *Altena* a nejméně *Nana* (Rozsypálek *et al.*, 2017).

Ve studiích z různých zemí jsou konstantně objevováni jedinci, kteří i přes vysoký infekční tlak nevykazují žádné nebo jen velmi slabé symptomy nákazy *H. fraxineus*. Obvykle je podíl tolerantních až rezistentních jedinců vůči nákaze kolem 1 % (Enderle *et al.*, 2019). I přes to, že mechanismus této odolnosti vůči nákaze nebyl dokonale vysvětlen (Enderle *et al.*, 2019), lze díky její existenci v různých podmínkách, stanovištích a míře její dědičnosti předpokládat, že je geneticky podmíněná (Downie, 2017). Málo dotčení jedinci se objevují ve všech proveniencích, a proto se předpokládá, že je tato tolerance spíše vyvinuta na individuální úrovni (Havrdová *et al.*, 2016). Zároveň skupina tolerantních jedinců není homogenní a vykazuje genetickou variabilitu (McKinney *et al.*, 2011). Na druhou stranu provenienční studie ukazují na rozdíly v náchylnosti (mortalita a produkční ukazatelé) jedinců pocházejících z různých lokalit (Rozsypálek *et al.*, 2017). Rozdíly byly pozorovány mezi populacemi v rámci jedné země, ale i mezi populacemi z různých států. Například v populacích ze Spojeného království se vyskytovalo více odolných jedinců než v populacích ze Skandinávie (Sollars *et al.*, 2017). Rozdílnost v náchylnosti se objevuje spíše u proveniencí z lokalit s různými klimatickými podmínkami, a spíše nesouvisí s různými ekotypy. Například v české provenienční studii (Havrdová *et al.*, 2016) měly provenience z nadmořské výšky nad 600 m n. m. vyšší odolnost než provenience z nižších poloh.

Nejspolehlivější a nejsnazší metodou identifikace jedinců, kteří jsou rezistentní nebo tolerantní vůči napadení *H. fraxineus*, je dlouhodobý monitoring jedinců, kteří si i přes vysoký infekční tlak dlouhodobě udržují dobrou kondici, tedy jsou téměř bezpříznakoví nebo jsou jen mírně poškozeni (Menkis *et al.*, 2020). To se obvykle posuzuje procentuálním vyjádřením řídnutí korun nebo mírou tvorby nekrotických lézí. Pro posouzení diverzity stromů a odhalení jedinců, odolných vůči nákaze, se používají molekulární markery. S jejich pomocí je možné vybrat nejvhodnější jedince jako zdroj genetického materiálu, se současným udržením genetické variability. Pro posouzení genetické diverzity se používají mikrosatelitové markery. Většina dnes používaných mikrosatelitových markerů pro posouzení diverzity jasanu byla identifikována, a následně popsána v publikaci Lefort *et al.* (1999), která významně rozšířila do té doby úzké portfolio mikrosatelitových lokusů. Počet variabilních alel se pohybuje od 4 do 13 v závislosti na markeru. Pro zkoumání odolnosti vůči nákaze způsobující odumírání jasanů se zpravidla používají markery genové exprese (GEM – genetic expression marker), které posuzují množství různých typů mRNA, z čehož lze odvodit míru exprese

určitého genu (Downie, 2017). Ve studiích zkoumajících nejlepší markery genové exprese se ukazuje, že velké množství těchto genů je součástí tzv. genové rodiny kódující MADS box nebo genů kódující enzym Cinnamoyl-CoA reductázu 2. Genové produkty, vzniklé genovou expresí těchto genů, mohou být důležité v tvorbě tolerance vůči nákaze, protože se pravděpodobně podílí na řízení koncentrace sekundárních metabolitů. Například byly naměřeny různé hladiny iridoid glykosidů, což je skupina látek, které se hojně vyskytují u celé čeledi *Oleaceae* a vytvářejí obranný mechanismus proti herbivorům. Avšak spíše neintuitivně byly tyto hladiny nižší u více tolerantních jedinců, a naopak vyšší u náchylných jedinců. Jedním z vysvětlení se zdá být to, že tolerance vůči herbivorům může existovat na úkor tolerance vůči houbovým patogenům a naopak. To dokládá i *in vitro* experiment, při kterém iridoid glykosidy podporovaly růst hub (Sollars *et al.*, 2017). Další významnou skupinou markerů, které se používají pro posouzení různé tolerance vůči nákaze patogenem *H. fraxineus*, jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP). Při zkoumání tisíců SNP byl vybrán jeden, který nejspolehlivěji předpovídal rezistenci. Jeho spolehlivost potvrzuje i výskyt rezistentní alely v dalších druzích jasanů, které jsou považovány za velmi rezistentní. Vytipované markery se většinou používají současně, čímž se zvyšuje jejich schopnost identifikace odolných jedinců (Harper *et al.*, 2016). Na druhou stranu jich je stále velmi málo, a pro spolehlivou identifikaci odolných jedinců je potřeba objevit další markery. To potvrzují data ze studie Menkis *et al.* (2020), ve které rezistentní stromy s málo prořídnutými korunami, identifikované monitoringem, byly analyzovány za pomoci markerů, které jsou spojovány s nízkou citlivostí. I přes to, že markery byly relativně spolehlivé, výsledky nebyly uspokojivé, a to hlavně z hlediska 40 % stromů, které markery chybně označily jako rezistentní. To může být vysvětleno tím, že tolerance může být polygenní znak, který kóduje více genů (Sollars *et al.*, 2017). Dalším způsobem, kterým se dá objevit variabilita v toleranci vůči nákaze, je zkoumání rozdílů methylace v různých genech. Methylace je proces, který může u rostlin řídit genovou expresi (např. snížení nebo zvýšení syntézy určitého genového produktu). Ve studii Sollars a Buggs (2018) byly objeveny nejvyšší rozdíly v methylaci například u genů spojených s proteiny mscS nebo glykosyl transferázou. Proteiny mscS regulují napětí na cytoplazmatické membráně buněk při osmotickém stresu, který je při napadení patogenem *H. fraxineus* vysoký. Tím mohou jedinci s vysokou genovou expresí těchto proteinů lépe zvládat osmotický stres, a díky tomu se lépe vypořádat s nákazou. Glykosyl transferáza se podílí na tvorbě glykosidických vazeb. Jak již bylo zmíněno, iridoid

glykosidy souvisí s tolerancí vůči patogenu, a proto geny ovlivňující jejich hladinu, mohou být nepřímo zodpovědné za rezistenci vůči nákaze.

Kromě biochemických faktorů jsou spojovány s odolností vůči nákaze *H. fraxineus*, popřípadě zmírňování dopadu na strom, fenotypové znaky. Velká část těchto znaků je geneticky podmíněná, což je důležité pro přenos těchto znaků na další generace (McKinney *et al.*, 2011). Jasan má poměrně dlouhou generační dobu, proto je adaptace na nové podmínky obtížná (Nielsen *et al.*, 2017). Zdá se tedy, že znaky spojené s rezistencí jsou exaptační, tedy že se vyvinuly, aby plnily určitou funkci, ale časem mohou najít uplatnění i plnění jiné funkce. Jednou z hypotéz, která se nabízí je, že se současná rezistence vůči *H. fraxineus* vyvinula koevolucí jako obranný mechanismus proti původnímu patogenu *H. albidus* (Landolt *et al.*, 2016). Zdá se, že působení infekce je v rámci jednoho stromu lokální, nemusí spolu souviset, a zároveň může každá lokální infekce spouštět různou reakci organismu (Enderle *et al.*, 2013). Nejčastější fenotypový znak, se kterým se spojuje odolnost proti patogenu, je doba opadu listů (McKinney *et al.*, 2011). Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, tak i přes to, že infekce listů je důležitá pro rozmnožování patogenu *H. fraxineus*, pokud se nekróza nerozšíří do dřevních částí, tak stromu příliš neškodí. Na druhou stranu rychlost a schopnost šíření infekce do dřeva je závislá na různých faktorech jako na množství dnů vhodných pro šíření mycelia nebo jak blízko k listové stopě se infekce objeví. Proto by i rychlý opad listů nemusel stačit k zamezení rozšíření nekrózy do dřevních částí. Ovšem je možné, že tyto faktory nejsou náhodné a souvisí s rezistencí. Rychlý opad listů pravděpodobně není znak, který by souvisel s adaptací, ale je možné, že dochází k tzv. genetickému draftu (gene hitchhiking), při kterém se dva geny nacházejí v rámci chromozomu blízko sebe, čímž může výskyt jedné alely ovlivnit frekvenci výskytu alely, která se nachází na nedalekém lokusu. Pozitivní selekce jednoho znaku tak může ovlivnit znak druhý. Tento efekt by například mohl ovlivnit souvislost výše popsané rychlosti opadu listů s rychlostí šíření mycelia po listu, a následně do dřevních částí. Díky tomu se může vytvořit efektivní rezistence, která omezí negativní efekty infekce na strom (Landolt *et al.*, 2016). Dalším fenotypovým znakem je vnik a závažnost nekrózy kořenových krčků, která se zdá být ovlivněna genetikou (Muñoz *et al.*, 2016). Celková odolnost vůči infekci patogenem *H. fraxineus* není pouze geneticky podmíněná, a jedná se spíše o soubor částečné geneticky podmíněné rezistence a náhodných variací fenotypu (McKinney *et al.*, 2011). Rozdíly v náchylnosti byly též objeveny v rozdílných pěstebních přístupech a například

věku. Více zapojené stromy jsou více poškozené než stromy ve volném zápoji. Zdá se i, že stromy ve smíšených lesích jsou méně poškozené, ale pro potvrzení této domněnky je potřeba provést další výzkum (Landolt *et al.*, 2016). Mladé stromy jsou o dost více poškozeny než stromy starší (Skovsgaard *et al.*, 2010).

V budoucnu pravděpodobně vznikne určitá adaptace vůči *H. fraxineus*, ale nejspíše se nestane permanentním přirozeným výběrem (Roy a Kirchner, 2000). Rezistence bývá na úkor produkčních vlastností. Stromy, které si musely vyvinout určitý druh rezistence, mají horší produkční vlastnosti a celkový zdravotní stav než stromy, které rostou v místech, kde nemusely těmto hrozbám čelit (Alexander *et al.*, 2014). Proto při snížení infekční zátěže a zlepšení zdravotního stavu pravděpodobně dojde k redukci genů, spojených s vyšší odolností (Roy a Kirchner, 2000). Zároveň vyvinutí unikátní rezistence není ideální, protože patogen má výrazně kratší životní cyklus, rychleji se adaptuje a snáze překoná tuto rezistenci (Carlsson-Granér a Thrall, 2015). Proto je důležitá celková diverzita. Zároveň se zdají heterozygoti odolnější než homozygoti, protože díky vyšší variabilitě disponují větší plasticitou a jsou snáze schopni reagovat na výskyt nových mutací (Fussi a Konnert, 2014). Nejpravděpodobnější situací, která v budoucnu nastane, je vytvoření variabilní tolerance, která nechrání hostitele proti infekci, ale snižuje sílu příznaků a dopad na hostitele (Roy a Kirchner, 2000).

4 Analytická část

4.1 Mikrosatelitové markery

Mikrosatelitové markery byly nejčastějším typem markeru, který se používal pro posouzení genetické diverzity jasanu ztepilého. Pro potřebu této práce byla posouzena metodika osmi vybraných studií mezi lety 2004-2018, které používaly mikrosatelitové markery. Všechny studie, kromě jedné, se zaměřovaly na mikrosatelitové markery nDNA, popřípadě kombinaci jaderné (nDNA) a chloroplastové (cpDNA) nukleové kyseliny. Studie Heuertz, Fineschi, *et al.* (2004) zkoumala variabilitu čistě na úrovni chloroplastových mikrosatelitů. V této studii bylo použito šest univerzálních primerů pro amplifikaci chloroplastových mikrosatelitů, obsahujících repetice A nebo T. Jedná se o primery ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp6, ccmp7 a ccmp10, které byly popsány ve studii Weising a Gardner (1999). Všechny studie mikrosatelitů nDNA se zabývaly mikrosatelitovými lokusy FEMSATL, které byly popsány ve studii Lefort *et al.* (1999). Ve všech studiích byly použity lokusy FEMSATL11, FEMSATL16 a FEMSATL 19. Kromě jedné studie byl též ve všech studiích použit lokus FEMSATL4. Často se ve studiích zkoumal lokus M2-30, poprvé popsán ve studii Brachet *et al.* (1999). Pouze ve dvou studiích byly využity lokusy FR639485 a FR646655, ale to může být přisuzováno tomu, že byly poprvé použity v relativně nedávné studii Beatty *et al.* (2015). Jediná studie genetické diverzity jasanu ztepilého, která používala všechny nejzastoupenější markery (viz tabulka 2), byla Heuertz, Hausman, *et al.* (2004), a proto bude dále analyzována její metodika a výsledky. Dalších šest studií bude stručně popsáno, včetně vybraných metodických rozdílů.

Tabulka 2 - Zastoupení různých mikrosatelitů, použitých ve vybraných studiích. Zvýrazněny jsou nejvíce zastoupené markery.

Lokus	Počet studií	Zastoupení (%)
FEMSATL4	6	86
FEMSATL8	1	14
FEMSATL10	3	43
FEMSATL11	7	100
FEMSATL12	4	57
FEMSATL14	1	14
FEMSATL16	7	100
FEMSATL18	1	14
FEMSATL19	7	100
M2-30	5	71
FR639485	2	29
FR646655	2	29

DNA použitá pro analýzy v práci Heuertz, Hausman, *et al.* (2004) byla izolována z listů a pupenů jasanu ztepilého. Pupy byly přepravovány na větvičkách, obaleny ve vlhkých ubrouscích, zbaveny šupin, rozřezány a uskladněny při teplotě -70 °C. Listy byly usušeny a uskladněny při pokojové teplotě. Následná extrakce DNA proběhla za pomoci DNeasy Plant mini kit od firmy Qiagen a CTAB (cetrimoniumbromid) procedure of the NucleoSpin Plant kit od firmy Macherey Nagel. Pro extrakci DNA bylo použito 60-90 mg suchých listů a 50-70 mg pupenů, které byly rozdrčeny ručně nebo rozemlety pomocí mlýnku. Alternativně byla provedena vysokoobjemová extrakce DNA za použití 192 vzorků suchých listů po 20 mg, s použitím DNeasy 96 Plant kit od firmy Qiagen.

V této studii použila autorka podobnou metodiku analýzy mikrosatelitů jako ve své dřívější práci Heuertz *et al.* (2001). Nejdříve byla provedena PCR s pěti typy párů „forward“ a „reverse“ primerů amplifikující oblast mikrosatelitových lokusů, konkrétně

FEMSATL4, FEMSATL11, FEMSATL16, FEMSATL19 a M2-30. Tyto mikrosatelity byly vybrány kvůli jejich vysoké polymorfii. Samotná PCR probíhala v mixu, který obsahoval 2,5 mM MgCl₂, 0,2 U Taq polymerázy na cyklus od firmy Gibco v pufru PCR, 0,4 μM každého primeru, 0,2 mM každého dNTP a 30 pg vstupní DNA (1 μL extrakt, který byl 100x zředěný). Celkový objem mixu byl 10 μL. Počáteční denaturace probíhala při 95 °C 4 minuty. Amplifikační krok se opakoval v 35 cyklech. Jeden cyklus se skládal ze 3 kroků: zahřátí na 94 °C na 30 sekund, ochlazení na 52 °C (FEMSATL) nebo 56 °C (M2-30) a zahřátí na 72 °C na 1 minutu. Konečné prodlužování trvalo 5 minut při 72° C. Ve studii Heuertz, Hausman, *et al.* (2004) byly dále vzorky, které se špatně amplifikovaly, amplifikovány znovu za pomoci LA Taq polymerázy od firmy TaKaRa. PCR reakce probíhala v přístrojích Biometra® UNO II thermocycler nebo Perkin Elmer GeneAmp® PCR System 2400. „Forward“ primery byly na 5' koncích značeny fluorescenční značkami od firmy Applied Biosystem, což umožnilo detekci produktů PCR v automatickém DNA sekvenátoru ABI PRISM 377 DNA (Applied Biosystems). Pro elektroforézu a detekci PCR produktů byly v původní studii (Heuertz *et al.*, 2001) použity denaturační polyakrylamidové gely od firmy Biorad, které byly ve studii (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004) nahrazeny gelovými roztoky LongRanger gel solution od firmy FMC Bioproducts. Elektroforéza a detekce PCR produktů proběhla v již zmíněném přístroji ABI PRISM 377 DNA sequencer po dobu 2 hodin, při 3000 V, a za použití pufru TBE (obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA). Data byla analyzována programy Genescan 3.1 a Genotyper 2.5 od společnosti Applied Biosystems a byla porovnána s DNA žebříčkem Genescan-350 Rox.

Pro každý mikrosatelitový lokus bylo spočítáno celkové množství alel K , rozpětí velikostí alel a celková genetická diverzita H_T , která vyjadřovala celkový polymorfismus. Byl vypočítán Wrightův koeficient inbreedingu F_{IS} , který poskytl informace o inbreedingu, populačních substrukturách a potenciálních nulových alelách. Diferenciace mezi populacemi byla spočítána na základě alelické diverzity F_{ST} nebo porovnání jejich velikosti R_{ST} . Pro výpočty byl použit software SPAGEDI.

Ve všech vzorcích bylo dohromady objeveno 275 alel, jejichž počet v jednotlivých lokusech byl mezi 16 až 83. Velikost produktů PCR, korespondující s alelami, byla 142-298 nukleotidů. Celková genetická diverzita (H_T) byla relativně vysoká u všech lokusů kromě FEMSATL16, jehož diverzita byla poloviční. Variabilita ukazatelů F_{IS} , F_{ST} a R_{ST} byla počítána procentuálním variačním koeficientem. Mírná

variabilita byla vypočtena u F_{ST} (25,9 %) a vysoká u R_{ST} (93,5 %) a F_{IS} (168,8 %). Diferenciace mezi populacemi byla vyšší při porovnání velikosti alel R_{ST} než na základě alelické diverzity F_{ST} .

Studie Ferrazzini *et al.* (2007) zkoumala diverzitu jasanů v severních oblastech Itálie. Jediný výrazný rozdíl oproti popsané studii bylo použití zmražených listů místo sušených.

Studie Fussi a Konnert (2014) použila rostlinný materiál z registrovaných zdrojů reprodukčního materiálu z Německa, Rakouska a Slovinska. Kromě toho použily stromy použité v dřívější provenienční studii, která probíhala v Bavorsku. Stromy pocházely z německých, švýcarských a rumunských proveniencí. Poslední rostlinný materiál pocházel z trvalých zkusných ploch, založených v roce 2010 v Bavorsku. V této studii vědci použili jako rostlinný materiál semenná embrya, pupeny a kambiové pletivo, které 24 hodin lyofilizovali. Pomocí fluorescence kvantifikovali koncentraci DNA, kterou následně naředili 20 ng/ μ l. Kromě nDNA zkoumali též cpDNA. Při amplifikaci používali směs několika primerů, čímž amplifikovali více mikrosatelitů najednou. K analýze dat byl použit software GenAEx 6.41.

Studie Papi *et al.* (2012) zkoumala genetickou strukturu řeckých populací jasanu úzkolistého (*F. angustifolia*). Byla stejná metodika jako u podrobně popsané studie. Na rozdíl od ní pro izolaci DNA byly vzorky zmrazeny v tekutém dusíku. Zároveň byla provedena lýza buněk při 65 °C, po dobu 30 minut. Pro analýzu dat byl použit software FSTAT V2.9.3.2.

Ve studii McKinney *et al.* (2011) byly použity klony, reprezentující své mateřské stromy (ortety). Klony pocházely z Dánska. Rostlinný materiál byl uchován při teplotě -20 °C. Následně byl zmražen v tekutém dusíku a rozdrcen tloučkem ve třecí misce. Stromy byly rozděleny do tříd podle poškození korun, čímž se kvantifikovala tolerance vůči patogenu. V této studii byl použit primer pro amplifikaci mikrosatelitu FEMSATL12, který byl ovšem upraven oproti původnímu primeru ze studie Lefort *et al.* (1999).

Ve studii Beatty *et al.* (2015) byly zkoumány vzorky listů, pocházející převážně ze Severního Irsku, a v omezené míře i Irské republiky. Z většiny lokalit byla provedena hrubá analýza, při které byly odebrány vzorky ze 30 stromů. Ve dvou lokalitách byla provedena podrobná analýza, při které byly sebrány vzorky ze všech plodících stromů

a vybraných odrostků stromů na dané lokalitě. U obou metod byly vzorky uchovány v silicovém gelu a zaznamenány GPS souřadnice místa odběru. DNA byla extrahovaná metodou CTAB. Bylo zkoumáno 8 nDNA a 10cpDNA mikrosatelitových lokusů. Tato studie je významná použitím lokusů FR639485 a FR646655, které byly autory objeveny. Pro testování linkage disequilibria (blízkosti v rámci chromozomu, díky čemuž se obvykle 2 lokusy dědí společně) byl použit program GENEPOP. Dalším použitým softwarem byly například programy FSTAT nebo ARLEQUIN.

V poslední vybrané studii Wohlmuth *et al.* (2018) byly použity jako rostlinný materiál listy a kambiální pletivo z ploch, nacházejících se v Rakousku. V této studii byla diverzita srovnávaná s pozorovatelnými symptomy. Stromy byly rozděleny do šesti tříd na základě hustoty koruny. U odrostků bylo místo korun posuzováno poškození větví. Zároveň se měřila výška a výčetní tloušťka stromů. Do studie byly zahrnuty pouze stromy vyšší než 60 cm. Před homogenizací byl materiál dvě minuty mražen v tekutém dusíku a další dvě minuty mlet v třepacím mlýnku. Vibrace byly nastaveny na frekvenci 25 Hz. Pro extrakci DNA byl použit Invisorb Spin Plant Mini Kit, kromě lyzačního pufru P, který byl nahrazen směsí 800 μL 2x pufru CTAB (20 g/L CTAB, 100 mM Tris-HCL pH 8,0, 1,4 M NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0), 1,6 μL β -merkaptoethanolu a proteinázy K. Tato směs byla pořízena od firmy Qiagen a využita pro lýzu buněk. Dále bylo do každého vzorku přidáno μL RNAzy A (10 mg/mL), též od firmy Qiagen. Pro determinaci koncentrace DNA byl použit přístroj NanoDrop 1000 Spectrophometer od firmy Thermo Fischer Scientific. Přístroj CEQ 8000 Beckman-Coulter byl použit pro vizualizaci produktů PCR na základě polymorfismu délky fragmentu v porovnání s DNA žebříčkem CEQ DNA Size Standard Kit-400 od firmy Beckman-Coulter. V této studii též zkoumali souvislost mezi poškozením rodičovských stromů a poškozením jejich potomků.

4.2 Asociativní transkriptomika a identifikace SNP

Většina stromových druhů byla dlouhodobě z hlediska genetiky málo studována. Mapování genomu nebo propojení kvantitativních znaků může trvat desetiletí. Zároveň sekvenování genomu jasanu ztepilého začalo až v roce 2012 a analýza genomu může trvat ještě několik let. Na druhou stranu odumírání jasanů je aktuální problém a je nutné zkoumat geny, které jsou zodpovědné za rezistenci. Jednou možností je použití genomu z blízkce příbuzného stromu. Problémem je, že stromy jsou většinou vzdáleně příbuzné

stromům nebo rostlinám s použitelnými daty ohledně genomu. Je tedy nutné nějak omezit rozsah genomu, který je nutný sekvenovat. K tomu může přispět analýza pouze sekvencí mRNA. Jinými slovy se soustředíme pouze na sekvence, které se účastní genové exprese. Díky tomu jsme schopni zkoumat zároveň variabilitu genové exprese a zároveň i variabilitu genové sekvence. Sekvenováním mRNA je možné i z mála dat poskládat funkční genotyp na základě různě intenzivní genové exprese (GEM – markery genové exprese) a identifikace SNP. Studie, která použila metodu asociativní transkriptomiky pro studování tolerance jasanu ztepilého, objevila několik významných markerů, které v dalších studiích byly použity pro odhalení rezistentních jedinců (Harper *et al.*, 2016). Proto v této kapitole bude zjednodušeně popsána její metodika a výsledky.

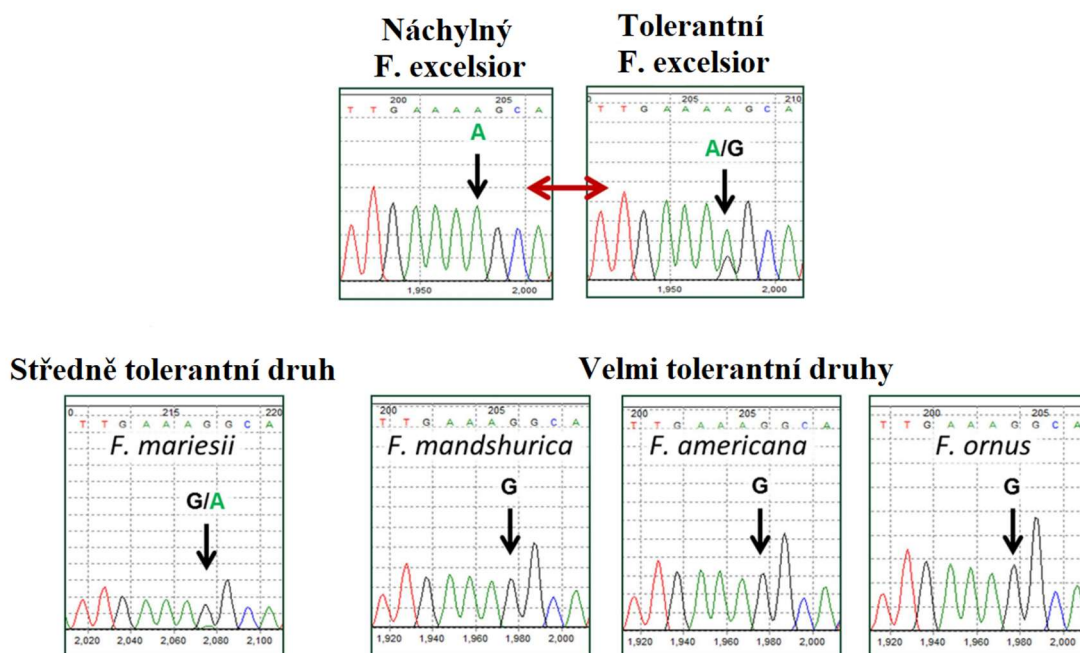
Pro tuto studii bylo vybráno několik ploch, které se nacházely v Dánsku. Jednalo se o lokality, ve kterých čelily stromy silnému infekčnímu tlaku. Bylo vybráno 23 silně nakažených stromů a 96 relativně zdravých dospělých stromů. Byly upřednostněny zdravé stromy, v jejichž těsné blízkosti byly silně nakažené stromy. Z vybraných stromů byly následně odříznuty štěpy, které byly do doby sběru listu naroubovány na podnož ve skleníku. Některé štěpy zdravých stromů byly zasazeny v experimentální školce, kde byly podrobeny přirozenému infekčnímu tlaku. Tím bylo možné ověřit, že jejich dobrý zdravotní stav nebyl dílem náhody. Nakažené stromy byly zařazeny do sedmi tříd na základě poškození koruny. V porostech byla vysoká mortalita, a proto do studie nebyly pravděpodobně zařazeny nejvíce náchylné stromy.

Před extrakcí RNA byly listy zmrazeny v tekutém dusíku a rozmělněny v hmoždíři za pomoci tloučku. Pro extrakci RNA byl použit komerční kit Omega Biotek E.Z.N.A Total RNA. Extrahovaná RNA byla za pomoci reverzní transkripce převedena na DNA a použita pro vytvoření genomické knihovny určené pro sekvenaci. Následně byla provedena sekvenace na platformě Illumina. Výsledky sekvenace byly porovnány s referenčním transkriptomem, který zahrnoval 41 521 unigenů z projektu British Ash Tree Genome Project. Dalšími kroky bylo postupně dokončeno mapování readů sekvencí mRNA. Pro kvantifikaci míry genové exprese byl použit ukazatel RPKM (read per kilobase milion – počet readů na 1 kbp vydělený milionem). Díky přepočtu na 1 kbp není výsledek ovlivněný různou délkou fragmentů. Zároveň bylo detekováno 470 494 SNP. Dále proběhlo filtrování genů, které produkovaly méně než 0,4 RPKM mRNA a SNP s menší alelickou frekvencí než 5 %. Po filtrování zbylo 174 346 SNP markerů a 32 441 markerů genové exprese (GEM), vhodných pro asociativní transkriptomiku. Následně byl

vybrán 1 SNP a 13 GEM, při hladině spolehlivosti ($\alpha=0,05$). Jako markery, které nejspolehlivěji odhadují rezistenci proti patogenu byl SNP (Gene_22343_Predicted_mRNA_scaffold3139) a dva GEM (Gene_19216_Predicted_mRNA_scaffold2427 a Gene_23247_Predicted_mRNA_scaffold3380).

Ty byly převedeny na klasické PCR markery pro testy SNP a qRT-PCR markery pro testy GEM. V dalších testech se dále potvrdila dobrá schopnost predikovat fenotyp.

Pro vytvoření prediktivních markerů založených na PCR testech, byly SNP i GEM markery testovány za pomoci cDNA. Ta byla vytvořena z RNA, která byla extrahovaná z listů. Hodnoty genové exprese, získané z qRT-PCR, dobře korelovaly u obou GEM markerů s RPKM hodnotami, získanými v předchozích krocích ($R^2=0,81$ a $0,89$; $p < 0,001$). Jak je možné vidět na obr. 15, u SNP markeru je alela spojená se zvýšenou citlivostí vůči nákaze A, a na druhé straně alela G indikuje toleranci. U tolerantních jasanů ztepilých se nevyskytuje samostatná alela G, ale mix alel A a G. Variabilita podílů těchto dvou alel pravděpodobně řídí různou toleranci vůči nákaze. Tyto hodnoty jsou konzistentní i při různých expresích alel, proto ho autoři nazývají jako SNP, založený na cDNA, zkráceně cSNP. Vědci testovali zároveň i jiné druhy jasanu, které vykazují silnou toleranci vůči nákaze, a jak je vidět na obr. 15, tak u všech těchto druhů se vyskytovala alela G, indikující toleranci. Markery byly dále testovány na dalších vzorcích. V těchto testech měly GEM markery slabou schopnost předpovídat poškození korun ($p < 0,05$) a cSNP marker byl relativně dobrý v předpovídání poškození korun ($p < 0,01$). Komplexní znaky, jakými je tolerance vůči nákaze, bývají kvantitativní, proto byly všechny tři markery spojeny do jednoho modelu předpovědi, který se prokázal jako velmi dobrý ($R^2 = 0,24$, $p < 0,001$)



Obrázek 15 - Rozdíly v náchylnosti vůči *H. fraxineus*, objevené pomocí SNP markeru. Alela A je indikátorem náchylnosti a G tolerance (modifikováno podle Harper *et al.*, 2016)

Pro identifikaci SNP se dá samozřejmě použít metoda sekvenování genomu. Většina studií navazovala na SNP identifikované pomocí asociativní transkriptomiky, která je popsána výše. Víceméně jediná studie, která použila pro identifikaci SNP sekvenování genomu byla Sollars *et al.* (2017). Tato studie byla velmi rozsáhlá. Kromě sekvenování genomu byla provedena i asociativní transkriptomika nebo analýza SSR markerů. Metodika sekvenace a identifikace SNP byla velmi podobná jako u asociativní transkriptomiky. Též bylo použito paired-end Illumina sekvencování, které umožňuje sekvenovat oba konce daného fragmentu DNA. Díky tomu je možné přesněji mapovat genom, obzvláště repetitivní regiony. Vstupní fragmenty DNA měly velikost 100 až 700 bp. Délka readů byla 150 bp. Sekvenování vygenerovalo průměrně 63,6 milionů readů na strom. Filtrováním a dalšími úpravami zbylo průměrně 55,3 milionů readů. To je průměrně 85,8% pokrytí referenčního genomu. Zároveň byly staženy ready z databáze Open Ash Dieback. Jedná se o 250 bp paired-end ready a vstupní fragmenty byly velké od 200 bp do 400 bp. Ready byly dále upravovány a filtrovány, z čehož zbyly regiony s celkovou velikostí 20,6 Mbp, což zahrnuje 2,3 % genomu. Z toho bylo identifikováno 468 237 SNP a následně dalšími metodami postupně vyselektováno 394 885 vysoce kvalitních SNP, které byly dále použity pro zkoumání populační struktury a genetické diverzity jasanu ztepilého v Evropě.

4.3 Návrh metodického postupu pro návaznou diplomovou práci

- Odebrání vzorků, především listů a pupenů, ze zkusných ploch. Zkusné plochy budou převážně v lesích, které byly založeny přirozenou obnovou
 - Listy a pupeny jsou části rostlin, vhodné pro extrakci DNA. Pupy by měly být preferovány. Jejich výhodou je vyšší akumulace DNA na jednotku hmoty, juvenilnější stádium vývoje a vyšší čistota materiálu, které je možné dosáhnout odstraněním krycí šupiny před zpracováním. Alternativně může být použito kambiální pletivo, získané z kůry, jako ve studii Wohlmuth *et al.* (2018)
 - Analýza vzorků z umělé výsadby by mohla být ovlivněna úzkou genetickou variabilitou mateřských stromů
- Zařazení stromů do tříd na základě poškození korun
 - Výsledky je možné po analýze porovnat s mírou náchylnosti stromů vůči chorobě
- Uchování odebraného rostlinného materiálu v silika gelu. Po návratu z terénu bude materiál do extrakce DNA uchován v ledničce
 - Silika gel byl např. použit ve studii Beatty *et al.* (2015). Pomáhá konzervovat vzorky tím, že pohlcuje přebytečnou vodu
 - Ve studiích byly vzorky úspěšně uchovávány při pokojové teplotě. Na druhou stranu využití ledničky vzorky nepoškodí a může je napomoci udržet déle v dobrém stavu
- Zmražení vzorku v tekutém dusíku, a následné rozdrcení tloučkem v třecí misce
 - Zmražení tekutým dusíkem usnadňuje drcení pevných látek, obsažených v rostlinách, a zároveň zabraňuje enzymům v rozkladu DNA
 - Drcení tloučkem v třecí misce je snadná, levná a funkční metoda. Alternativně lze použít třepací mlýnek (např. Wohlmuth *et al.* (2018))
- Izolace pomocí kitu Qiagen nebo CTAB metodou
 - Studie (např. Heuertz, Hausman, *et al.* (2004), McKinney *et al.* (2011) a Beatty *et al.* (2015)) využívají pro izolaci DNA izolační kit výrobce Qiagen či CTAB metodu izolace s uspokojivými výsledky. Proto je upřednostňují před kity, které nebyly prověřeny, byť budou pravděpodobně též uspokojivě fungovat

- Použití nDNA primerů, amplifikující mikrosatelity FEMSATL4, FEMSATL11, FEMSATL16, FEMSATL19 a M2-30 a cpDNA primerů, amplifikující mikrosatelity ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp6, ccmp7 a ccmp10. Provedení PCR, přizpůsobené individuálním primerům
 - Navrhují použití mikrosatelitových markerů. Byly prověřeny v několika studiích (např. Heuertz, Fineschi, *et al.* (2004), Heuertz, Hausman, *et al.* (2004) nebo McKinney *et al.* (2011)), mají vysoký polymorfismus a jejich použití je snadné. Bylo prokázáno, že současným použitím nDNA i cpDNA mikrosatelitů je možné získat přesnější výsledky (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004). Proto je vhodné použít oba typy mikrosatelitů. Byly vybrány nejprověřenější nDNA mikrosatelity (viz tabulka 2). Na druhou stranu je možné využít mikrosatelity FR639485 a FR646655, které byly popsány v novější studii Beatty *et al.* (2015). Ty nejsou tolik prověřené, ale jejich analýzou bude možné získat komplexnější výsledky. Mikrosatelity cpDNA nebyly identifikovány přímo pro jasan ztepilý, ale byly zkoumány univerzální markery krytosemenných rostlin. Proto nechávám otevřenou možnost použití i jiných markerů.
- Označení „forward“ primerů fluorescenčními značkami, a následná analýza v DNA sekvenátoru. Provedení gelové elektroforézy
 - Označením „forward“ primerů, a následnou analýzou v DNA sekvenátoru je možné získat informace o produktech PCR. Díky tomu je možné získat více informací o genetické struktuře. Pro elektroforézu lze použít polyakrylamidový gel jako ve studii Heuertz, Hausman, *et al.* (2004). Na druhou stranu se zdá, že použití klasického agarózového gelu přináší také uspokojivé výsledky
- Analýza výsledků za pomoci softwaru
 - Nebyl objeven žádný software, který by byl používán ve větším množství studií. Navrhují použití některého z již vyzkoušených softwarů, kvůli možnosti přesnějšího porovnání výsledků. Příkladem je Genescan (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004), Genepop (Ferrazzini *et al.*, 2007) nebo GenALEx (Fussi a Konnert, 2014)

5 Diskuse

Jasanové dřevo je kvalitní a může být použito na výrobu různého sortimentu (např. sportovních potřeb a ve stavebnictví) (Rozsypálek *et al.*, 2017). Kresba jasanového dřeva je unikátní, a proto se dá jasanové dřevo popsat jako prémiový materiál. Význam pěstování jasanu souvisí zároveň s podporou lokální kultury. Často se využívá v tradičním truhlářství a např. v Irsku jsou výhradně z jasanového dřeva vyráběny pálky pro hraní irského národního sportu hurlingu (McCracken *et al.*, 2017). Na druhou stranu, jasan ztepilý není strategickým druhem z pohledu produkce dřeva (Rozsypálek *et al.*, 2017). Vlastnosti jasanového dřeva (např. pružnost a pevnost) z něho dělaly v minulosti nepostradatelný materiál. V dnešní době je možné vyrobit materiály, které mají stejné nebo lepší vlastnosti než jasanové dřevo. Typickým materiálem, který postupně nahradil jasanové dřevo, byla ocel (Enderle *et al.*, 2019). Na základě těchto informací tedy vyplývá, že se nevyplatí pěstovat dřevinu s nejistou návratností investic. Skutečně je jasan často nahrazován jinými dřevinami. Tento přístup by byl ovšem krátkozraký. Obzvláště s aktuální kůrovcovou kalamitou si lidé začínají uvědomovat důležitou roli druhové diverzity. Stromová biodiverzita zaručuje obecně vyšší stabilitu porostu a ochranu proti biotickým škodám. Např. pěstování listnatých dřevin je důležité, protože listnaté stromy lépe snášejí poškození zvěří a poskytují větší objem kvalitnější potravy. Tím efektivně snižují škody zvěře v měřítku celého porostu. Zároveň zvěř upřednostňuje vtroušené dřeviny, čímž by se mohlo omezit poškození cílových listnatých dřevin (Havránek *et al.*, 2010). Zásadní je ekologická funkce jasanu. Vedle olší a jilmů je jasan nedílnou součástí pobřežních lesů, které napomáhají zpevňovat břehy a díky transpiraci odvádějí přebytečnou vodu (Šimíček, 1999). Ovšem jasan i jilm jsou decimovány houbovými patogeny, což způsobuje rozpad pobřežních porostů, a to může narušit stabilitu břehů (Rozsypálek *et al.*, 2017). Vyšší diverzita stromů zároveň napomáhá ke zvýšení celkové biodiverzity lesa. Na základě těchto argumentů by měla být snaha podporovat druhy s minoritním zastoupením, obzvláště těch, které plní nenahraditelnou ekologickou funkci jako jasan.

Stromy rostou v podmínkách, které se mění v prostoru a čase. Činností člověka dochází k jevům jako je změna klimatu nebo fragmentace lesa (Ferrazzini *et al.*, 2007). Zároveň kvůli globalizaci dochází k introdukci organismů do nového prostředí. Též jsou stromy kvůli působení různých faktorů oslabovány, čímž dochází k silnějším kalamitám, způsobených škůdci. Stromy jsou organismy s dlouhou generační dobou, proto je

existence velké genetické diverzity klíčová pro adaptaci vůči různým stresorům (Nielsen *et al.*, 2017). Kromě toho patogeny, včetně *H. fraxineus* mají neporovnatelně krátkou generační dobu. Proto rezistence, řízená jedním nebo menším počtem genů, by byla snadno překonána (Landolt *et al.*, 2016). Ve studiích bylo prokázáno, že jasan je druhem, který má relativně vysokou genetickou diverzitu (např. Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004). Zároveň rezistence se objevuje spíše u individuálních stromů než u celých populací (Beatty *et al.*, 2015). To dává příležitost k použití sadebního materiálu, získaného od rezistentních jedinců, při současném zachování genetické diverzity. Díky tomu budou nově založené porosty schopné čelit nadcházejícím hrozbám, např. globální změně klimatu nebo rozvíjejícímu se problému s polníkem *Agrilus planipennis* (Landolt *et al.*, 2016).

Symptomy chřadnutí jasanů byly poprvé zaznamenány v Evropě v 90. letech minulého století (Downie, 2017). Patogen, zodpovědný za toto chřadnutí a následné odumírání jasanů, byl identifikován až o mnoho let později (Kowalski, 2006). Jasan není strategický druh, a proto nebyla tomuto problému věnována větší pozornost. Díky tomu jsme se dostali do situace, kdy už není možné se nákazy zbavit (Enderle *et al.*, 2019). Existují určitě pokusy, které mají za cíl omezení šíření nákazy jako např. těžba nakažených stromů nebo kontrola přijímaných sazenic. Pomocí podobných opatření lze pravděpodobně snížit budoucí dopad choroby a omezit škodám, ale někteří autoři o efektivnosti těchto opatření pochybují (Havrdová *et al.*, 2013). Ve většině zemí se objevuje malé procento stromů, které i v oblastech s vysokým infekčním tlakem vykazují malé poškození. Mechanismus této rezistence není v této době spolehlivě popsán (Enderle *et al.*, 2019). Na základě publikovaných studií může rezistence souviset s brzkým opadem listů nebo celkovým zpomalením postupu nákazy a omezením pronikání nekrotických lézí do dřevních částí (McKinney *et al.*, 2011). Další studie Sollars *et al.* (2017) nastínila molekulární podstatu této rezistence, která může souviset se skupinou genů kódující proteinovou doménu MADS box nebo geny, které ovlivňují hladiny Iridoid glykosidů. Iridoid glykosidy jsou látky, které u čeledi olivovníkovité mají roli v obranném mechanismu proti herbivorům. Na druhou stranu se zdá, že vyšší odolnost proti houbovým patogenům je na úkor odolnosti proti herbivorům. To může ztížit výběr vhodných mateřských stromů pro zakládání odolných porostů v místech, kde existuje současná hrozba napadení houbou *H. fraxineus* i herbivorním broukem *A. planipennis*. Podle studie Nielsen *et al.* (2017) existuje spojitost mezi příbuzností

druhů s původním hostitelem patogenu (*F. mandshurica*) a rezistencí proti tomuto patogenu. Jako nejodolnější se jeví druhy ze sekce *Ornus*. Proto by mohlo být řešením vysazování jasanu zimnáře (*F. ornus*), který již byl v minulosti v České republice vysazován, a zároveň vykazuje vysokou odolnost proti patogenu. Tato studie dále ukazuje na silnou náchylnost amerických druhů jasanů, pocházejících ze sekce *Fraxinus*. Jasan byl navíc v Severní Americe v minulosti vysazován, ale sadební materiál pocházel pouze z omezeného množství mateřských stromů. Proto existuje obava, že při masivním rozšíření *H. fraxineus* do Severní Ameriky by mohlo dojít k totální destrukci jasanových porostů. U jiných druhů, než je jasan ztepilý, navíc není jistá existence individuální rezistence. Kmeny *H. fraxineus* v Evropě mají téměř nulovou diverzitu. Oproti tomu v místě původu mají velmi vysokou diverzitu. Proto by křížení těchto kmenů, a následné zvýšení genetické diverzity, mohlo vést ke vzniku více virulentních a odolných kmenů. Na druhou stranu míšení genů několika kmenů nemusí vést k vyšší virulenci. I přes to je možné doporučit neintrodukovat další kmeny z východní Asie.

Pro studii genetické diverzity, diferenciací mezi populacemi a podobných charakteristik, jsou nejvíce prověřené mikrosatelitové markery. Identifikace nových mikrosatelitů a vytvoření nových primerů je časově a finančně náročné. Na druhou stranu je použití existujících primerů a analyzování známých lokusů relativně nenáročné (White *et al.*, 2007). Pro zkoumání genetické struktury je vhodné použít nDNA i cpDNA mikrosatelitové markery. Ve studii Heuertz, Fineschi, *et al.* (2004) byla a pomocí cpDNA mikrosatelitů zkoumána genetická struktura evropských populací. Při porovnání výsledků s předchozí studií nDNA mikrosatelitů Heuertz, Hausman, *et al.* (2004) bylo naznačeno, že analýza nDNA i cpDNA přináší přesnější výsledky než použití pouze nDNA nebo cpDNA markerů. Nejspolehlivější nDNA mikrosatelity se zdají lokusy, poprvé popsané ve studiích Lefort *et al.* (1999) a Brachet *et al.* (1999). Konkrétně FEMSATL4, FEMSATL 11, FEMSATL 16, FEMSATL 19 a M2-30. Není velké množství publikací, ve kterých byly použity cpDNA mikrosatelitové markery. Jediné cpDNA markery, které byly testovány, jsou neutrální markery krytosemenných rostlin, poprvé použité pro analýzu diverzity jasanů ve výše zmíněné studii Heuertz, Fineschi, *et al.* (2004). Jedná se o lokusy ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp6, ccmp7 a ccmp10. V nedávné době byly identifikované nové mikrosatelitové markery FR639485 a FR646655 (Beatty *et al.*, 2015) a dá se uvažovat o jejich využití. Pro analýzu mikrosatelitových markerů byla nejčastěji

použita elektroforéza. Zároveň byly „forward“ primery označeny fluorescenční barvou, díky čemuž bylo možné analyzovat produkty PCR v DNA sekvenátoru.

Genetická diverzita se dá zjistit za pomoci SNP markerů. Těch se nachází v genomu mnohem větší množství než mikrosatelitů, díky čemuž jejich analýza poskytuje větší informaci o genomu jako celku (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Analýza SNP markerů se zdá být náročnější a zahrnuje vytvoření genomové knihovny a sekvenování DNA, čímž získáme tzv. *ready*. *Ready*, získané sekvenováním, nejsou použitelné pro další zpracování (např. se překrývají), proto musí dojít k jejich filtrování a dalším úpravám. Získaná informace se poté srovnává s referenčním genomem, čímž dochází k mapování a identifikaci SNP. Takto identifikované markery se s použitím programů dále selektují, čímž získáme vhodné SNP markery. V minulosti neproběhlo velké množství analýz genomových SNP markerů. Příkladem je studie Sollars *et al.* (2017), která byla publikována teprve před čtyřmi lety.

Pro identifikaci markerů, spojených s odolností proti patogenu, byla použita metoda zvaná asociativní transkriptomika, která byla poprvé použita pro jasan ztepilý ve studii Harper *et al.* (2016). Tato metoda analyzuje pouze část genomu, který se účastní transkripce. Tím se zbavíme části genomu, která se přímo nepodílí na tvorbě sledovaných znaků. Při této metodě jsou výsledkem markery genové exprese (GEM), založené na různé genové exprese jednotlivých alel. Touto metodou se dají identifikovat i SNP markery podobnou metodikou jako při identifikaci genomových SNP markerů. Ve studii Harper *et al.* (2016) byly identifikovány 1 SNP a 2 GEM markery. Komplexní znak jako rezistenci kóduje pravděpodobně několik genů. Proto se pro identifikaci rezistentních jedinců používá model, který využívá všechny markery. To potvrzuje i studie Menkis *et al.* (2020), která podrobila stromy, vykazující dlouhodobou rezistenci, analýze těmito markery. Hlavním zjištěním této studie bylo, že tyto markery byly schopny relativně dobře identifikovat rezistentní a náchylné stromy vůči nákaze. Ovšem stále velké množství zdravých stromů zůstalo neidentifikováno, a naopak ještě větší množství silně poškozených stromů bylo identifikováno jako rezistentní. Proto tato studie poznamenává, že pro spolehlivou identifikaci rezistentních stromů je nutné objevit další markery. Studie autorů Sollars a Buggs (2018) zkoumala různé hladiny methylace u jasanů. Methylace je pojem, který označuje připojení methylového zbytku na báze adeninu nebo cytosinu. U rostlin bylo popsáno, že různé hladiny methylace mohou ovlivňovat genovou expresi.

V této studii bylo objeveno několik genů, které mohou být zapojeny v mechanismu rezistence proti *H. fraxineus*.

6 Závěr

V bakalářské práci byla zpracována podrobná rešerše odborné literatury. Byly zpracovány základy genetiky, které se týkaly zkoumané problematiky. Dalším tématem bylo zhodnocení významu jasanu ztepilého, který byl vyhodnocen jako významná dřevina, která plní důležité ekologické funkce. Jedním z hlavních témat bylo zhodnocení genetické diverzity jasanu. Prokázalo se, že jasan má relativně vysokou genetickou diverzitu. Kromě toho byla popsána biologie, životní cyklus patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* a možné pěstební opatření k omezení šíření *H. fraxineus*. Význam těchto opatření byl ovšem některými autory zpochybněn. Stěžejním tématem byl popis geneticky podmíněné odolnosti. V Evropě se stabilně objevují jedinci, kteří si i přes vysoký infekční tlak udržují dobrou kondici. Jejich identifikace se zdá jako klíčová k zachování jasanových porostů. Je totiž možné využít reprodukční materiál, získaný z těchto jedinců k tvorbě odolných porostů. Nejméně náročná a nejspolehlivější metoda je v současné době identifikace na základě fenotypu (různého stupně poškození). Ovšem budoucností je identifikace spolehlivých markerů. Molekulární markery zajistí zachování genetické diverzity nových porostů, a zároveň výběr ideálních jedinců, vhodných jako zdroj reprodukčního materiálu. Výstupem analytické části byl návrh vhodné metodiky navazující diplomové práce.

7 Seznam zdrojů a použité literatury

Alexander, H. K. *et al.* (2014) „Evolutionary rescue: linking theory for conservation and medicine", *Evolutionary applications*, 7(10), s. 1161–1179.

Allen, G. E. (2003) „Mendel and modern genetics: The legacy for today", *Endeavour*, 27(2), s. 63–68. doi: 10.1016/S0160-9327(03)00065-6.

Altman, P. L. a Dittmer, D. S. (1964) *BIOLOGY DATA BOOK*. FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY BETHESDA MD.

Anderson, P. K. *et al.* (2004) „Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers", *Trends in Ecology and Evolution*, 19(10), s. 535–544. doi: 10.1016/j.tree.2004.07.021.

Austerlitz, F. *et al.* (2000) „Effects of colonization processes on genetic diversity: Differences between annual plants and tree species", *Genetics*, 154(3), s. 1309–1321. doi: 10.1093/genetics/154.3.1309.

Baral, H. O., Queloz, V. a Hosoya, T. (2014) „Hymenoscyphus fraxineus, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe", *IMA Fungus*. 2014/05/23, 5(1), s. 79–80. doi: 10.5598/ima fungus.2014.05.01.09.

Beatty, G. E. *et al.* (2015) „Lack of genetic structure and evidence for long-distance dispersal in ash (*Fraxinus excelsior*) populations under threat from an emergent fungal pathogen: implications for restorative planting", *Tree Genetics and Genomes*, 11(3), s. 53. doi: 10.1007/s11295-015-0879-5.

Bennett, K. D., Tzedakis, P. C. a Willis, K. J. (1991) „Quaternary Refugia of North European Trees", *Journal of Biogeography*, 18(1), s. 103. doi: 10.2307/2845248.

Besnard, G. *et al.* (2002) „*Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism", *Theoretical and Applied Genetics*, 104(8), s. 1353–1361. doi: 10.1007/s00122-001-0832-x.

Børja, I. *et al.* (2017) „Ash dieback in Norway—current situation", *Dieback of European Ash (*Fraxinus spp.*)—Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, s. 166–175.

Brachet, S. *et al.* (1999) „Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*", *Molecular Ecology*, 8(1), s. 160–163.

- Brookes, A. J. (1999) „The essence of SNPs", *Gene*, 234(2), s. 177–186. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00219-X.
- Carlsson-Granér, U. a Thrall, P. H. (2015) „Host resistance and pathogen infectivity in host populations with varying connectivity", *Evolution*, 69(4), s. 926–938.
- Carroll, S. B., Prud'homme, B. a Gompel, N. (2008) „Regulating evolution", *Scientific American*, 298(5), s. 60–67. doi: 10.1038/scientificamerican0508-60.
- Caudullo, G., Welk, E. a San-Miguel-Ayanz, J. (2017) „Chorological maps for the main European woody species", *Data in Brief*, 12, s. 662–666. doi: 10.1016/j.dib.2017.05.007.
- Černý, K. (2011) „Nebezpečné patogeny lesních dřevin *Phytophthora alni* a *Chalara fraxinea*: rozšíření, význam a možná rizika vyplývající z jejich zdomácnění", *Zpravodaj ochrany lesa*, 15, s. 71–75.
- Chandelier, A. *et al.* (2014) „Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays", *Plant Pathology*, 63(6), s. 1296–1305. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12218>.
- Clark, J. a Webber, J. (2017) „The ash resource and the response to ash dieback in Great Britain", in *Dieback of European Ash*, s. 228–237.
- Cleary, M. R. *et al.* (2013) „Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*", *Forest Pathology*, 43(1), s. 83–85.
- Comps, B. *et al.* (2001) „Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech", *Genetics*, 157(1), s. 389–397. doi: 10.1093/genetics/157.1.389.
- Crick, F. (1970) „Central dogma of molecular biology", *Nature*, 227(5258), s. 561–563. doi: 10.1038/227561a0.
- Dodson, E. (1955) „Mendel and the Rediscovery of His Work", *The Scientific Monthly*, 81(4), s. 187–195. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/21999>.
- Doo, M. a Kim, Y. (2015) „Obesity: Interactions of genome and nutrients intake", *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(1), s. 1–7. doi: 10.3746/pnf.2015.20.1.1.
- Downie, J. A. (2017) „Ash dieback epidemic in Europe: How can molecular technologies help?", *PLoS Pathogens*, 13(7), s. 1–6. doi: 10.1371/journal.ppat.1006381.

- Drenkhan, R., Solheim, H., *et al.* (2017) „Hymenoscyphus fraxineus is a leaf pathogen of local Fraxinus species in the Russian Far East", *Plant Pathology*, 66(3), s. 490–500.
- Drenkhan, R., Agan, A., *et al.* (2017) „Overview of ash and ash dieback in Estonia", *Dieback of European ash*, s. 115–124.
- Dvořák, M. *et al.* (2007) „Contribution to identify the causal agents of Dutch elm disease in the Czech Republic", *Plant Protection Science*, 43(4), s. 142–145. doi: 10.17221/2243-pps.
- Encyklopedia Britannica (2018) *Genetic marker*. [cit. 2021-04-11] Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/genetic-marker>.
- Enderle, R. *et al.* (2013) „Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of Fraxinus excelsior", *European journal of forest research*, 132(5), s. 865–876.
- Enderle, R. *et al.* (2017) „Ash dieback in Germany: research on disease development, resistance and management options", *Dieback of European ash (Fraxinus spp.): consequences and guidelines for sustainable management*, s. 89–105.
- Enderle, R., Stenlid, J. a Vasaitis, R. (2019) „An overview of ash (Fraxinus spp.) and the ash dieback disease in Europe", *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 14(025). doi: 10.1079/PAVSNNR201914025.
- Eriksson, G., Clapham, D. a Ekberg, I. (2006) *An introduction to forest genetics*. 2nd ed. Uppsala : SLU. Dostupné z: <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001839301>.
- European Plant Protection Organisation (EPPO) (2014) *Mini data sheet on Chalara fraxinea*. [cit. 2021-04-18] Dostupné z: https://gd.eppo.int/download/doc/991_%0Aminids_CHAAFR.pdf.
- Ferrazzini, D., Monteleone, I. a Belletti, P. (2007) „Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (Fraxinus excelsior L.)", *Annals of Forest Science*, 64(2), s. 159–168. doi: 10.1051/forest:2006100.
- Freeman, W. M., Walker, S. J. a Vrana, K. E. (1999) „Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential", *BioTechniques*, 26(1), s. 112–125. doi: 10.2144/99261rv01.
- Fussi, B. a Konnert, M. (2014) „Genetic analysis of European common ash (Fraxinus

- excelsior L.) populations affected by ash dieback", *Silvae Genetica*, 63(5), s. 198–212. doi: 10.1515/sg-2014-0026.
- Gayon, J. (2016) „From Mendel to epigenetics: History of genetics", *Comptes Rendus - Biologies*, 339(7–8), s. 225–230. doi: 10.1016/j.crv.2016.05.009.
- Genetic Science Learning Center (2018) *PCR*. Dostupné z: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>.
- Gil, W. *et al.* (2017) „Ash dieback in Poland—history of the phenomenon and possibilities of its limitation", *Die-back of European ash (Fraxinus spp.). Consequences and guidelines for sustainable management (eds.: R. Vasaitis, R. Enderle)*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, s. 176–184.
- Gilbert, N. a Allan, J. (2014) „Supercoiling in DNA and chromatin", *Current Opinion in Genetics and Development*, 25(1), s. 15–21. doi: 10.1016/j.gde.2013.10.013.
- Gregorová, B. *et al.* (2006) *Poškození dřevin a jeho příčiny*. Praha: VÚKOZ.
- Gregory, R. T. (2005) *The Evolution of the Genome, The Evolution of the Genome*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-301463-4.X5000-1.
- Grosdidier, M., Ioos, R. a Marçais, B. (2018) „Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France?", *Forest Pathology*, 48(4), s. e12426.
- Gross, A. *et al.* (2012) „Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*", *Fungal genetics and biology*, 49(12), s. 977–986.
- Grover, A. a Sharma, P. C. (2016) „Development and use of molecular markers: Past and present", *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), s. 290–302. doi: 10.3109/07388551.2014.959891.
- Harper, A. L. *et al.* (2016) „Molecular markers for tolerance of European ash (*Fraxinus excelsior*) to dieback disease identified using Associative Transcriptomics", *Scientific Reports*, 6(1), s. 19335. doi: 10.1038/srep19335.
- Havránek, F., Bukovjan, K. a Czudek, R. (2010) [cit. 2021-04-19] *Snižování škod zvěří na lese, Asociace profesionálních myslivců České republiky*. Dostupné z: <http://www.profimysl.cz/clanek/301/snizovani-skod-zveri-na-lese>.
- Havrdová, L. *et al.* (2016) „Differences in susceptibility to ash dieback in Czech

- provenances of *Fraxinus excelsior*", *Forest Pathology*, 46(4), s. 281–288. doi: 10.1111/efp.12265.
- Havrdová, L., Černý, K. a Kowalski, T. (2013) „Nekróza jasanu – přehled současných znalostí", s. 56–63.
- Heinze, B. *et al.* (2017) „Ash dieback in Austria—history, current situation and outlook", *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.)—Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, s. 33–52.
- Heritage Hurleys (2009) [cit. 2021-04-11] *Old Celtic Ireland souvenir gift hurl*. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/66617307@N04/6066364816>.
- Heuertz, M. *et al.* (2001) „Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Molecular Ecology*, 10(7), s. 1615–1623. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01300.x>.
- Heuertz, M., Fineschi, S., *et al.* (2004) „Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe", *Molecular Ecology*, 13(11), s. 3437–3452. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02333.x.
- Heuertz, M., Hausman, J. F., *et al.* (2004) „Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Evolution*, 58(5), s. 976–988. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb00432.x.
- Jankovský, L. a Holdenrieder, O. (2009) „*Chalara fraxinea*—ash dieback in the Czech Republic", *Plant Protection Science*, 45(2), s. 74–78.
- Jarne, P. a Lagoda, P. J. L. (1996) „Microsatellites, from molecules to populations and back", *Trends in Ecology and Evolution*, 11(10), s. 424–429. doi: 10.1016/0169-5347(96)10049-5.
- Jehan, T. a Lakhanpaul, S. (2006) „Single nucleotide polymorphism (SNP) - methods and applications in plant genetics: A review", *Indian Journal of Biotechnology*, 5(4), s. 435–459.
- Keynes, M. a Cox, T. M. (2008) „William Bateson, the rediscoverer of Mendel", *Journal of the Royal Society of Medicine*, 101(3), s. 104. doi: 10.1258/jrsm.2008.081011.

- Kowalski, T. (2001) „O zamieraniu jesionów", *Trybuna Leśnika*, (04), s. 6–7.
- Kowalski, T. (2006) „Chalara fraxinea sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland", *Forest Pathology*, 36(4), s. 264–270. doi: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- Kowalski, T. a Holdenrieder, O. (2009) „The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback", *Forest Pathology*, 39(5), s. 304–308. doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x.
- Kraj, W., Zarek, M. a Kowalski, T. (2012) „Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Mycological Progress*, 11(1), s. 37–45.
- Kremer, A. *et al.* (2002) „Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks?", *Forest Ecology and Management*, 156(1–3), s. 75–87. doi: 10.1016/S0378-1127(01)00635-1.
- Landolt, J. *et al.* (2016) „Ash dieback due to *Hymenoscyphus fraxineus*: what can be learnt from evolutionary ecology?", *Plant Pathology*, 65(7), s. 1056–1070. doi: 10.1111/ppa.12539.
- Lee, P. Y. *et al.* (2012) „Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments", *Journal of Visualized Experiments*, (62), s. e3923. doi: 10.3791/3923.
- Lee, S. V. a Bahaman, A. R. (2012) „Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis", in *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. doi: 10.5772/36891.
- Lefort, F. *et al.* (1999) „Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*)", *Molecular Ecology*, 8(6), s. 1088–1089. doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00655_8.x.
- Longauerová, V. *et al.* (2017) „The ash and ash dieback in Slovakia", *Dieback of European ash*, s. 209–219.
- Loxdale, H. D. a Lushai, G. (1998) „Molecular markers in entomology", *Bulletin of Entomological Research*. 2009/07/10, 88(6), s. 577–600. doi: 10.1017/s0007485300054250.

- McCracken, A. R. *et al.* (2017) „Ash dieback on the island of Ireland", in. Swedish University of Agricultural Sciences. Dostupné z: [https://stor.teagasc.ie/bitstream/11019/1224/1/Ash diebaack on island of Ireland.pdf](https://stor.teagasc.ie/bitstream/11019/1224/1/Ash%20diebaack%20on%20island%20of%20Ireland.pdf).
- Mckinney, L. V. *et al.* (2014) „The ash dieback crisis: Genetic variation in resistance can prove a long-term solution", *Plant Pathology*, 63(3), s. 485–499. doi: 10.1111/ppa.12196.
- McKinney, L. V. *et al.* (2011) „Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): An emerging infectious disease", *Heredity*. 2010/09/08, 106(5), s. 788–797. doi: 10.1038/hdy.2010.119.
- McMullan, M. *et al.* (2018) „The ash dieback invasion of Europe was founded by two genetically divergent individuals", *Nature Ecology and Evolution*, 2(6), s. 1000–1008. doi: 10.1038/s41559-018-0548-9.
- Menkis, A. *et al.* (2020) „Identifying *Fraxinus excelsior* tolerant to ash dieback: Visual field monitoring versus a molecular marker", *Forest Pathology*, 50(1), s. e12572. doi: 10.1111/efp.12572.
- Ministerstvo zemědělství (2005) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky k 31.12.2004*. Praha.
- Ministerstvo zemědělství (2015) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky k 31.12.2014*.
- Ministerstvo zemědělství (2020) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství v České republice v roce 2019*. Praha.
- Mullis, K. B. (1990) „The unusual origin of the polymerase chain reaction", *Scientific American*, 262(4), s. 56–65. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.
- Muñoz, F. *et al.* (2016) „Rising out of the ashes: additive genetic variation for crown and collar resistance to *Hymenoscyphus fraxineus* in *Fraxinus excelsior*", *Phytopathology*, 106(12), s. 1535–1543.
- Musil, I. a Möllerová, J. (2005) *Listnaté dřeviny*. první. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Nguyen, D. T. *et al.* (2016) „Analyses of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, suggest role of tree species diversity on colonization and population structure

differentiation", *Forest Pathology*, 46(1), s. 82–84.

Nielsen, L. R. *et al.* (2017) „The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history", *European Journal of Forest Research*, 136(1), s. 59–73. doi: 10.1007/s10342-016-1009-0.

Papi, R. M., Spanos, K. A. a Kyriakidis, D. A. (2012) „Genetic variation of *Fraxinus angustifolia* natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers", *European Journal of Forest Research*, 131(4), s. 1151–1161. doi: 10.1007/s10342-011-0586-1.

Pratt, J. (2017) „Management and use of Ash in Britain from the prehistoric to the present: some implications for its preservation", in Vasaitis, R. a Enderle, R. (ed.) *Dieback of European ash (Fraxinus spp.) – Consequences and Guidelines for Sustainable Management*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, s. 1–14.

Queloz, V. *et al.* (2011) „Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*", *Forest Pathology*, 41(2), s. 133–142. doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x.

Queloz, V. *et al.* (2017) „Ash dieback in Switzerland: history and scientific achievements", *Dieback of European ash*, s. 68–78.

Rabindra, P. a Raju, N. (2012) „Gel-Electrophoresis and Its Applications", in Magdeldin, N. R. E.-S. (ed.) *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Rijeka: IntechOpen, s. Ch. 2. doi: 10.5772/38479.

Rossi, J. J. (2004) „Ribozyme diagnostics comes of age", *Chemistry and Biology*, 11(7), s. 894–895. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.07.002.

Roy, B. A. a Kirchner, J. W. (2000) „Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance", *Evolution*, 54(1), s. 51–63.

Rozsypálek, J. *et al.* (2017) „Ash and ash dieback in the Czech Republic.", in *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.): Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, s. 79–88.

Sambles, C. M. *et al.* (2017) „Data Descriptor: Ash leaf metabolomes reveal differences between trees tolerant and susceptible to ash dieback disease", *Scientific Data*, 4(1), s. 170190. doi: 10.1038/sdata.2017.190.

- Schulman, A. H. (2007) „Molecular markers to assess genetic diversity", *Euphytica*, 158(3), s. 313–321. doi: 10.1007/s10681-006-9282-5.
- Shaw, N. N. a Arya, D. P. (2008) „Recognition of the unique structure of DNA:RNA hybrids", *Biochimie*, 90(7), s. 1026–1039. doi: 10.1016/j.biochi.2008.04.011.
- Šimíček, V. (1999) *Břehové a doprovodné porosty vodních toků –součást lužních ekosystémů*. Praha.
- Skovsgaard, J. P. *et al.* (2010) „Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Forest Pathology*, 40(1), s. 7–18.
- Skovsgaard, J. P. *et al.* (2017) „Silvicultural strategies for *Fraxinus excelsior* in response to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*", *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 90(4), s. 455–472.
- Sollars, E. S. A. *et al.* (2017) „Genome sequence and genetic diversity of European ash trees", *Nature*, 541(7636), s. 212–216. doi: 10.1038/nature20786.
- Sollars, E. S. A. a Buggs, R. J. A. (2018) „Genome-wide epigenetic variation among ash trees differing in susceptibility to a fungal disease", *BMC Genomics*, 19(1), s. 502. doi: 10.1186/s12864-018-4874-8.
- Stamm, S. *et al.* (2005) „Function of alternative splicing", *Gene*, 344. doi: 10.1016/j.gene.2004.10.022.
- Staple, D. W. a Butcher, S. E. (2005) „Pseudoknots: RNA structures with diverse functions", *PLoS Biology*, 3(6), s. 0956–0959. doi: 10.1371/journal.pbio.0030213.
- Timmermann, V. *et al.* (2011) „Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway", *EPPO Bulletin*, 41(1), s. 14–20.
- Tutar, Y. (2012) „Pseudogenes", *Comparative and Functional Genomics*. Editoval H. Heng, 2012, s. 424526. doi: 10.1155/2012/424526.
- Úřadníček, L. *et al.* (2014) *Dendrologie (společenstva a významné druhy ČR)*. first. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 61300 Brno.
- Vignal, A. *et al.* (2002) „A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics", *Genetics Selection Evolution*, 34(3), s. 275–305. doi: 10.1051/gse:2002009.
- Viphakone, N. (2020) [cit. 2021-04-11] *pre mRNA 3 end processing*. Dostupné z:

- <http://www.mnexploration.com/research-topics/pre-mrna-3-end-processing.html>.
- Wallander, E. (2008) „Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy", *Plant Systematics and Evolution*, 273(1–2), s. 25–49. doi: 10.1007/s00606-008-0005-3.
- Wang, C., Kaltenboeck, B. a D. Freeman, M. (2012) *Veterinary PCR Diagnostics*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. doi: 10.2174/97816080534831120101.
- Weising, K. a Gardner, R. C. (1999) „A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms", *Genome*, 42(1), s. 9–19.
- Wey, T. *et al.* (2016) „MAT–gene structure and mating behavior of *Hymenoscyphus fraxineus* and *Hymenoscyphus albidus*", *Fungal Genetics and Biology*, 87, s. 54–63.
- White, T. L., Adams, W. T. a Neale, D. B. (2007) *Forest Genetics*. CABI Pub. (CABI Publishing Series). Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=Ose2QgAACAAJ>.
- Wikimedia Commons contributors (2021) [cit. 2021-04-11] File:Polymerase chain reaction-en.svg, *Wikimedia Commons, the free media repository*. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Polymerase_chain_reaction-en.svg&oldid=512201078 (accessed April 19, 2021).
- Williams, J. G. K. *et al.* (1990) „DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucleic Acids Research*, 18(22), s. 6531–6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531.
- Wohlmuth, A., Essl, F. a Heinze, B. (2018) „Genetic analysis of inherited reduced susceptibility of *Fraxinus excelsior* L. seedlings in Austria to ash dieback", *Forestry*, 91(4), s. 514–525. doi: 10.1093/forestry/cpy012.
- Zhang, Y. *et al.* (2008) „Genome-wide identification of microsatellites in white clover (*Trifolium repens* L.) using FIASCO and phpSSRMiner", *Plant Methods*, 4(1), s. 19. doi: 10.1186/1746-4811-4-19.
- Zhao, Y.-J. *et al.* (2013) „*Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan", *Mycotaxon*, 122(1), s. 25–41.
- Zhu, H. *et al.* (2020) „PCR past, present and future", *BioTechniques*, 69(4), s. 317–325. doi: 10.2144/btn-2020-0057.