

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

Studijní program: Biologie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Botanika



Bc. Ivana Kelnarová

Rozšíření a význam latentního patogenu *Cryptostroma corticale* na *Acer pseudoplatanus* v Praze

Distribution and importance of latent pathogen *Cryptostroma corticale* on *Acer pseudoplatanus* in Prague

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 4. 5. 2015

.....
Ivana Kelnarová

Poděkování

Respekt a poděkování patří v první řadě mému školiteli Ondrovi Koukolovi, na jehož rady a pomoc jsem se mohla vždy stoprocentně spolehnout. Nadšení pro vědu a bezedná trpělivost z něj dělají nejlepšího školitele, jakého bych si mohla přát.

Dále děkuji všem členům našeho myko-lichenobryo oddělení za přátelskou atmosféru a četné rady. Velký dík patří všem kolegům a přátelům, kteří byli ochotní se podílet na odběru vzorků. Zejména pak mému příteli, který se mnou absolvoval většinu odběrů a i to přes své zjevné antipatie k houbám.

Dále bych chtěla tomto místě vyzdvihnout pomoc všech, kteří byli ochotni si práci přečíst a svými připomínkami ji posunuli do finální podoby. Děkuji rovněž Matěji Pánkovi a Martinu Weiserovi za konzultaci statistických metod.

Projekt byl finančně podpořen grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 420214.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1 Motivace a cíle.....	8
2 Literární úvod.....	10
2.1 <i>Cryptostroma corticale</i>	10
2.1.1 Původ a současný výskyt	10
2.1.2 Morfologie a taxonomie.....	12
2.1.3 Životní cyklus a symptomy onemocnění	13
2.1.4 Stresové faktory podmiňující výskyt SDB	15
2.1.5 Management péče o napadené dřeviny	15
2.2 Původci zbarvení v pletivech javoru klenu	16
2.3 Metody brzké detekce fytopatogenních hub z pletiv hostitele.....	18
3 Metodika	20
3.1 Lokality a dřeviny	20
3.2 Terénní odběry	20
3.3 Izolace a kultivace hub.....	21
3.4 Identifikace kultur	22
3.4.1 Extrakce a sekvenace DNA	22
3.5 Izolace DNA z vývrtů	23
3.6 Detekce <i>C. corticale</i> pomocí specifických primerů	23
3.7 Vyhodnocení dat	25
4 Výsledky	26
4.1 Terénní odběry	26
4.2 Vnější symptomy poškození dřevin	26
4.2.1 Proschnutí koruny	26
4.2.2 Zbarvení v pletivech	27
4.2.3 Poškození kůry stromů.....	28
4.3 Diverzita kultivovatelných hub v pletivech	29
4.4 Nové nálezy <i>C. corticale</i>	31
4.4.1 Závislost výskytu <i>C. corticale</i> na vnějších faktorech	31
4.4.1.1 Grafická znázornění faktorů korelující výskyt infekce <i>C. corticale</i>	32
5 Diskuze	34

5.1	Brzká detekce <i>C. corticale</i>	34
5.1.1	Nové lokality.....	37
5.1.2	Rizika SBD v Praze	37
5.1.3	Faktory podmiňující infekci <i>C. corticale</i>	38
5.1.3.1	Proschnutí koruny.....	38
5.1.3.2	Zbarvení pletiv.....	38
5.1.3.3	Poškození kůry	39
5.1.3.4	Faktory prostředí.....	39
5.2	Kultivace hub z vývrťů	41
6	Závěr	45
7	Seznam použité literatury	46
8	Přílohy.....	52

Abstrakt

Sazná nemoc kůry (*sooty bark disease*) způsobená fytopatogenní houbou *Cryptostroma corticale* je jednou z aktuálních hrozeb pro populaci javoru klenu v Evropě. Od prvního nálezu v Praze v roce 2005 bylo zaznamenáno několik desítek jedinců uhynulých v důsledku nákazy tímto patogenem, ale lze předpokládat vyšší míru nákazy přetrvávající v latentní nesymptomatické fázi. Hlavním cílem práce bylo kvantifikovat latentní výskyt *C. corticale* v Praze na základě brzké detekce v pletivech stromů bez vnějších symptomů, identifikovat ekologické nároky tohoto patogenu a stresové faktory podmiňující rozvoj infekce. Dalším cílem bylo na základě získaných dat predikovat rizika pro pražskou populaci javoru klenu a vytipovat další ohrožené lokality v Praze. Sekundárně bylo v práci hodnoceno i spektrum hub kolonizujících xylém javoru klenu. Vzorky pletiv odebrané pomocí Presslerova nebozezu byly podrobeny: a) izolací kultivovatelných hub na sladínový agar a b) detekcí DNA *C. corticale* na základě *nested* PCR s druhově specifickými primery. Latentní nákaza byla detekována ve 28 vývrtech. Z 27 pozitivních případů detekce pomocí *nested* PCR se specifickými primery bylo 10 podpořeno i izolací *C. corticale* na agar. Pouze v jednom případě nebyla pozitivní izolace *C. corticale* na agar potvrzena pomocí *nested* PCR. Přítomnost patogenu byla zaznamenána na všech lokalitách s předchozím výskytem SBD a dále na třech nových lokalitách v Praze. Infekce byla signifikantně častěji pozorována u stromů, u kterých bylo zjištěno zbarvení pletiv, a které rostly na okraji porostu na lokalitách s vyššími koncentracemi imisí v ovzduší. Z celkových 112 vývrtů bylo získáno 94 izolátů náležících do 50 různých taxonů hub z 15 řádů. Spektrum izolátů zahrnovalo mimo *C. corticale* další patogenní či endofytní druhy. Většina izolátů byla vázána na zbarvené zóny v pletivech, ve kterých mohou být přítomny jako původci tohoto defektu či sekundární kolonizátoři. Zbarvení pletiv či hniloby byly přítomny v 72 % všech vývrtů a spolu s prosycháním koruny a poraněním kůry patřily mezi nejčastější poškození stromů.

Klíčová slova: *Cryptostroma corticale*, *Acer pseudoplatanus*, brzká detekce, *nested* PCR, specifické primery

Abstract

Sooty bark disease (SBD) caused by pathogen *Cryptostroma corticale* is one of the current risks to the population of sycamores in Europe. A few dozen individuals were fallen death due to sooty bark disease from the first record in Prague in 2005. However a higher rate of infection in a latent non-symptomatic stage can be assumed. The main goal of the thesis was to quantify the extent of infection *C. corticale* in Prague on the basis of early detection in tissues of symptomless trees and identify its environmental requirements and stress factors conditioning the progression of the disease. Another goal was to predict the risk for Prague's population of sycamore based on obtained data and identify other vulnerable sites in Prague. A secondary aim was to assess the spectrum of fungi inhabiting xylem of sycamore. Tissue samples collected with an increment borer were subjected to: a) isolation of cultivable fungi on malt agar and b) detection of the DNA *C. corticale* based on *nested* PCR with species-specific primers. Latent infection was detected in 28 of the cores. Of 27 positive detections with primer specific *nested* PCR 10 were supported by isolation of *C. corticale* on agar plates. Only in one case positive isolation of *C. corticale* on agar plate was not confirmed by *nested* PCR. Occurrence of *C. Cortical* was recorded in all of parks with a known incidence of the disease and also in 3 new sites in Prague. The infection has occurred significantly more frequently in trees with tissue discoloration growing at the edge of vegetation in localities with higher concentration of pollutants in the air. Out of 112 cores 94 isolates belonging to 50 different taxa of 15 orders were obtained. The spectrum of cultivated fungi included, among target pathogen *C. corticale*, other pathogenic or endophytic species. The occurrence of fungi was bound to cores with discoloured tissues in which they can be present as secondary colonizers or causal agents of this defect. Discoloration or decay appeared in 72% of all the cores and was the most frequent tree damage recorded together with crown dieback and bark cracks.

Keywords: *Cryptostroma corticale*, *Acer pseudoplatanus*, early detection, *nested* PCR, specific primers

1 Motivace a cíle

Javor klen je u nás přirozeně rostoucí dřevinou v lesích a významnou parkovou dřevinou. V posledních letech byl zaznamenán zhoršený zdravotní stav této dřeviny, a to zejména v městském prostředí. V roce 2005 se v Praze objevila nová hrozba pro tento druh v podobě *Sooty bark disease* (SBD), onemocnění způsobeném oportunním patogenem *Cryptostroma corticale* (Xylariales, Pezizomycotina). Toto onemocnění je známé působením vln vymírání javorů kleny postihujících stovky jedinců v souvislosti se stresem z extrémně horkých a suchých měsíců během léta. Pod vlivem představy o oteplování klimatu a zvýšeném výskytu klimatických extrémů patří toto onemocnění mezi potenciální hrozby profitující z klimatických změn. Aktuálně toto onemocnění vykazuje šíření ze západní Evropy do východních a severních zemí. Rozšíření patogenu v Evropě se projevuje několika lépe či obtížněji vysvětlitelnými trendy. Za prvé postup šíření je pomalý a výskyt je pouze lokálního charakteru. Zatímco ve Velké Británii se patogen úspěšně rozšířil, jeho postup do dalších částí Evropy byl velmi pozvolný a to přesto, že patogen produkuje velké množství konidií, které se snadno šíří na dlouhé vzdálenosti a předurčují jej k epidemickému šíření. Za druhé projev onemocnění na dané lokalitě je striktně závislý na vnějších podmínkách a k odumírání jedinců dochází pouze po vystavení stresu. Za třetí výskyt vymírání javorů kleny jsou vázány na městské populace javoru kleny. Na základě pozorování ve Velké Británii a Francii houba buď mimo města není přítomná, nebo zde roste na odumřelých pletivech jako saprotrof anebo parazituje na silně oslabených jedincích. Letální působení na zdravé jedince však mimo města nebylo pozorováno.

Druh *C. corticale* byl intenzivně studován ve Velké Británii již v druhé polovině minulého století, tedy v době, kdy nebyly k dispozici molekulárně-genetické metody. Teprve nedávno byla na základě kultur z napadených stromů v Praze provedena první molekulárně fylogenetická studie druhu *C. corticale*, která vedla k novým poznatkům o taxonomii tohoto druhu. Onemocnění je nyní v Praze zřejmě ve fázi šíření. Použitím metod brzké detekce založených jak na tradiční metodě izolace, tak na moderní detekci pomocí druhově specifických primerů, můžeme detekovat *C. corticale* nejen v nemocných stromech, ale také ve zdravých nesymptomatických jedincích, ve kterých je houba přítomná v latentní fázi. Znalost rozšíření *C. corticale* v endofytní fázi nám může poskytnout lepší představu o ekologii tohoto patogenu.

V České republice bylo doposud toto onemocnění zaznamenáno pouze na čtyřech lokalitách v Praze v počtu několika desítek napadených jedinců. Je u nás toto onemocnění skutečně tak vzácné nebo se jedná jen o pomyslnou špičku ledovce a houba je už rozšířená v pražských

klenech jako latentní patogen? Víme, že přechod *C. corticale* do patogenní fáze je vázán na oslabení hostitele stresem z nedostatku vody, ale mohou existovat nějaké faktory podmiňující samotnou infekci hostitele? Na tyto a další otázky se snaží nalézt odpověď tato diplomová práce, jejíž cíle lze shrnout v pěti bodech:

- Na základě metod brzké detekce zmapovat **rozšíření *C. corticale*** ve vybraných parcích v Praze
- zhodnotit **význam patogenu *C. corticale*** pro pražskou populaci javoru klenu
- vyhodnotit **vliv faktorů** prostředí a zdravotního stavu hostitele na infekci *C. corticale*
- predikovat další **lokality se zvýšeným rizikem** nákazy tímto patogenem
- zhodnotit **diverzitu a význam dalších hub** přítomných v pletivech javoru klenu jako endofyté

2 Literární úvod

2.1 *Cryptostroma corticale*

2.1.1 Původ a současný výskyt

C. corticale je považována za původní v Severní Americe. Poprvé byla popsána jako saprotrof na javorovém dřevě v kanadském Londonu pod jménem *Coniosporium corticale* (Ellis a Everhart, 1889). Tato houba byla běžně nalézána v javorových monokulturách zejména při opracovávání dřeva javoru cukrového (*Acer saccharum*). Záznamy o výskytu tohoto druhu jsou známy ze států Wisconsin, Michigan a jižní Ontario, kromě javoru byl údajně nalezen i na zástupcích *Carya* sp. a *Tilia* sp. Patogenní působení vůči javorům či jiným dřevinám zde nebylo zaznamenáno (Gibbs, 1997).

První výskyt v Evropě byl zaznamenán v roce 1945 ve Wansteadském parku v Londýně, Velké Británii. Dle prvního nálezu na starém odumřelém javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*) byl považován za saprotrofa, další nálezy však potvrdily silně patogenní působení vůči javoru klenu. Gregory a Waller (1951) podrobili tento druh morfologické a etiologické studii, popsali symptomy onemocnění, které způsobuje na javoru klenu, a nazvali jej *Sooty bark disease* (SBD). Na základě porovnání stromat s herbářovými položkami potvrdili totožnost houby s americkým druhem *Coniosporium corticale*, který záhy přeřadili do nového rodu *Cryptostroma* s jediným druhem *Cryptostroma corticale* (Gregory a Waller, 1951).

První hromadné úhyny klenů postihující stovky jedinců byly pozorovány v padesátých letech ve Wansteadském parku a posléze v dalších částech Londýna. Gregory a Waller (1951) uvedli každoroční ztráty až 20% z celkové populace javoru klenu. V následujících letech se však zdála být nákaza na ústupu, objevilo se jen pár výskytů v Oxfordu, Somersetu, Norfolkku a Hampshiru. Ovšem v letech 1976 a 1977 došlo k vypuknutí hromadného vymírání javorů klenů v okolí Londýna a na jihovýchodě Anglie, které se v menší míře opakovalo v letech 1989-1990.

Mimo Velkou Británii je výskyt SBD v současnosti znám z dalších osmi států střední a jižní Evropy (Tab. 1). Hromadné úhyny javoru klenu a méně často i javoru babyky (*A. campestre*) a javoru jasanolistého (*A. negundo*) byly pozorovány také v Paříži a jejím okolí od roku 1950 (Cazaubon, 2012). Výrazný nárůst onemocnění v souvislosti s obdobím sucha a vysokých letních teplot byl zaznamenán v letech 1950, 1991-1992 a 2005. Míra nákazy *C. corticale* zde byla dle anglických vědců diskutabilní, protože Francouzi určili jako teleomorfu druh *Eutypa maura*, což je běžný saprotrof na odumřelých větvích javorů, a mohlo tak dojít k nadhodnocení míry výskytu

(Gibbs, 1997). V nedávné době byla houba zaznamenána v městě Castres v Pyrenejích (Cazaubon, 2012), což je spolu s blíže nespecifikovaným nálezem *C. corticale* na *Acer* sp. v Itálii nejjižnější známý výskyt tohoto onemocnění (Wilkins, 1952).

Za centrum výskytu posledních dvou dekád můžeme považovat střední Evropu. Zejména Německo, kde se nemoc poprvé objevila v roce 2005 v městě Karlsruhe nedaleko francouzských hranic. Hromadné úhyny javoru kleny byly pozorovány v Lipsku, v Drážďanech a v Kolíně nad Rýnem, kde muselo být v roce 2010 odstraněno z porostu na 500 jedinců v důsledku onemocnění SBD (Metzler, 2006; Robeck, 2007). V menší míře bylo onemocnění zaznamenáno v Rakousku v okolí Vídně (Cech, 2004) a ve Švýcarsku v kantonu Ticino (Meier et al., 2008). Recentně byl ve Švýcarsku pozorován výskyt SBD také v Ženevě (Cochard et al., 2015)

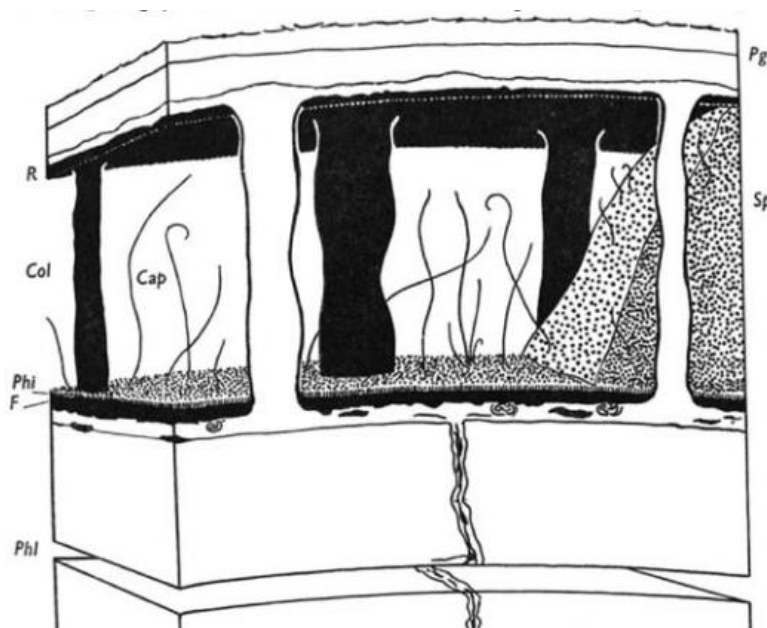
Nejsevernější známou lokalitou tohoto patogenu je Nizozemí, kde byla nalezena stromata *C. corticale* na palivovém dříví z javoru kleny vyprodukovaného v severním Holandsku. (EPPO Reporting Service, 2014). Recentně byla *C. corticale* zaznamenána v Bulharsku na několika javorech mléčích v parcích a zahradách residenčních čtvrtí Druzha a Mladost v Sofii (Bencheva, 2014). V České republice bylo onemocnění poprvé zaznamenáno v roce 2005. Mezi lety 2005 a 2013 bylo nalezeno několik desítek javorů klenů odumřelých v důsledku onemocnění SBD, a to na čtyřech lokalitách v Praze (Koukol et al., 2014).

Tab. 1: Přehled historie nálezů a rozšíření SBD v Evropě

1. nález	Země	Lokality	Hostitelské dřeviny	Zdroj
1945	Velká Británie	Londýn, Oxford, Somerset, Norfolk, Hampshire	<i>A. pseudoplatanus</i>	Gregory a Waller 1950, Gibbs 1997
1950	Francie	Paříž a okolí, France-Comté, Pays de la Loire	<i>A. pseudoplatanus</i> , <i>A. negundo</i> , <i>A. campestre</i> , <i>A. platanoides</i>	Cazaubon 2012
1952	Itálie		<i>Acer</i> sp.	Wilkins 1952
2003	Švýcarsko	Ticino, Ženevské jezero	<i>A. pseudoplatanus</i>	Maier et al. 2008 Cochard et al. 2015
2004	Rakousko	Vídeň	<i>A. pseudoplatanus</i>	Cech 2004
2005	Německo	Karlsruhe, Lipsko, Drážďany, Kolín nad Rýnem	<i>A. pseudoplatanus</i>	Metzler 2006, Robeck 2012
2005	Česká republika	Praha	<i>A. pseudoplatanus</i> , <i>A. platanoides</i>	Koukol et al. 2014
2013	Nizozemsko	Severní Holandsko	<i>A. pseudoplatanus</i>	Eppo/Oepp 2014
2014	Bulharsko	Sofie	<i>A. platanoides</i>	Bencheva 2014

2.1.2 Morfologie a taxonomie

Pro *C. corticale* je typická tvorba rozlitych stromat, která jsou zprvu zanořena pod kůrou (Obr. 1). Mezi vrstvami kůry vzniká dutina ohraničená bazálním a svrchním stromatem (*floor stroma*



Obr. 1: Průřez stromatem *C. corticale*. R, svrchní stroma (*roof stroma*); Cap, kapilicium; Col, sloupek vyztužující dutinu; SP, spory; Ph, fialidy; F, bazální stroma (*floor stroma*); Phl, floém. Zvětšeno 40×. Převzato a upraveno dle Gregory a Waller (1951).

a *roof stroma*) propojeným stromatickými sloupky. Na bazálním stromatu vyrůstá vrstva vzpřímených nevětvených konidioforů. Konidiofory jsou tvořené 3 až 5 buňkami, bazální buňky jsou tmavé, distální jsou hyalinní. Konidie vznikají fialidicky v řetízcích, nejprve jsou hyalinní a zhranatělé, postupně tmavnou a zaoblují se. Jsou drobné o rozměrech 4-6,5 × 3,5-4 μm, lehké a suché což jim umožňuje snadné uvolnění ze stromatu a šíření větrem. Ve zralosti se svrchní stroma odlupuje

spolu s kůrou a odhaluje masu spor připomínající nánosy sazí (odtud pojmenování *Sooty bark disease* = sazná nemoc kůry). Postupné uvolňování spor po dobu několika týdnů umožňuje přítomnost kapilicia tvořeného systémem lepivých nevětvených vláken vyrůstajících z bazálního stromatu v počtu až 100 000 na cm² (Gregory a Waller, 1951).

Taxonomické zařazení *C. corticale* bylo dlouho nejasné, protože nikdy nebyla pozorována tvorba teleomorfy. Ellis a Everhart (1889) předpokládali příslušnost mezi Amerosporae (Dematiaceae, Moniliales), uměle vytvořenou skupinu zahrnující tmavě zbarvené anamorfní askomycety s jednobuněčnými konidii. Četné nálezy stromat na mrtvém dřevě vedly k názoru, že se jedná o anamorfní saprotrofní stádium některého oportunního patogenu. C. Thom považoval *C. corticale* za možnou anamorfu rodu *Nummularia* (dnes *Biscogniauxia*) na základě morfologické podobnosti stromat (Gregory a Waller, 1951)

Další studie tohoto druhu se taxonomickým zařazením nezabývaly, a tak byla houba řazena mezi anamorfní Pezizomycotina (Index Fungorum), Ascomycota (Mycobank) či Ascomycetes, Incertae sedis (USDA Fungal Database). Teprve recentní fylogenetická studie založená na

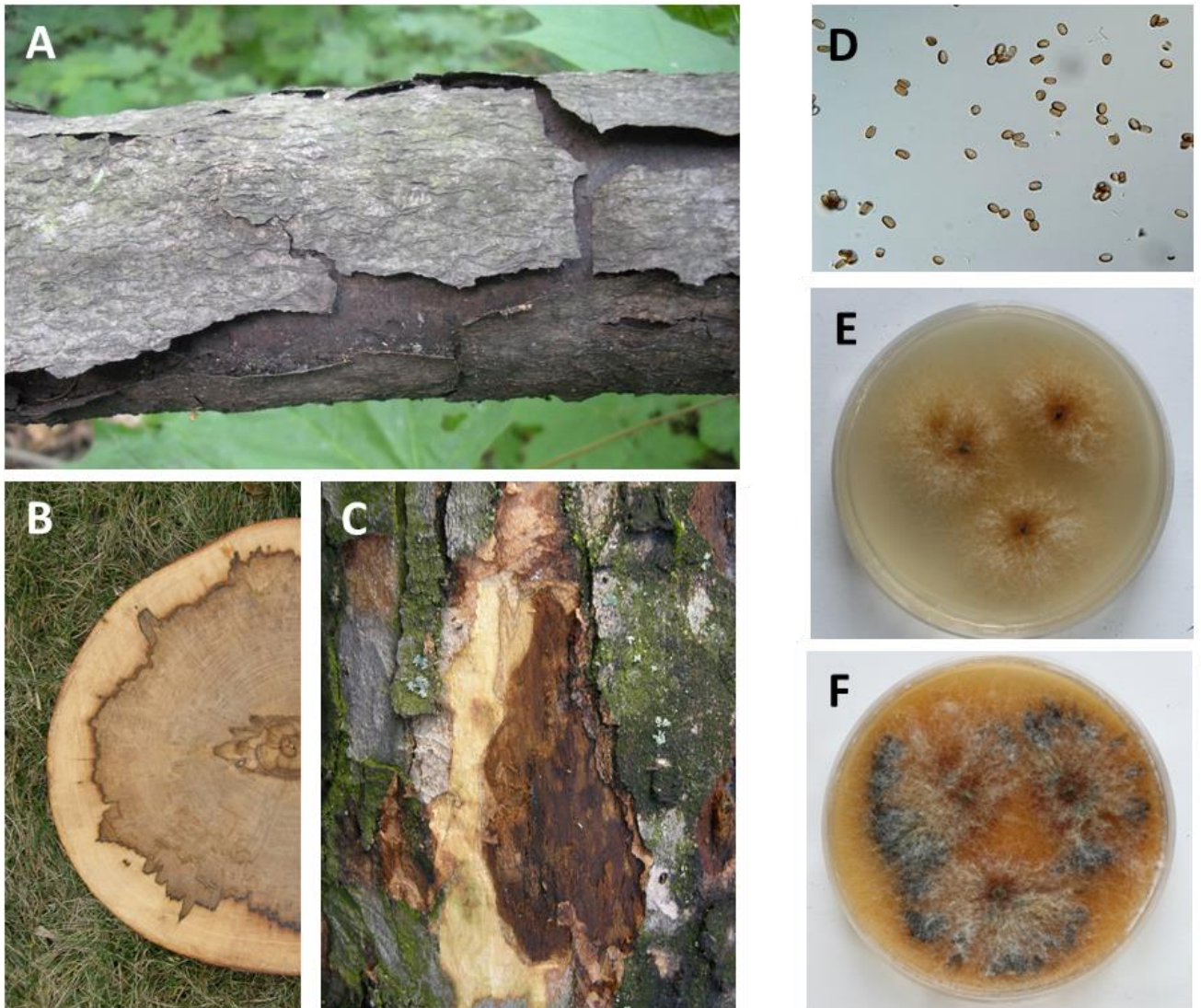
sekvencích čtyř genů (ITS rDNA, aktin, RNA polymeráza II podjednotky B2, a β -tubulin) ukázala příslušnost *C. corticale* do čeledi Xylariaceae (řád Xylariales) do rodu *Biscogniauxia*. Jako nejbližší příbuzné druhy se ukázaly být *B. bartholomei* a *Graphostroma platystoma*. Anamorfy, jež jsou známy u těchto nejpříbuznějších druhů (*Virginella*-like u *B. bartholomei* a *Nodulisporium* u *G. platystoma*), jsou morfologicky odlišné od *C. corticale*, jediným společným morfologickým znakem je tvorba stromat. Naproti tomu v ekologických nárocích existuje podoba *C. corticale* s patogenními zástupci rodu *Biscogniauxia*. Společnými znaky je například hostitelská specifita jednotlivých druhů, slabý parazitismus podmíněný oslabením hostitele, schopnost přežít jako endofyt ve zdravých pletivech a saprotrofně se žít na odumřelých pletivech (Koukol et al., 2014).

2.1.3 Životní cyklus a symptomy onemocnění

Cryptostroma corticale se šíří pomocí drobných konidií (Obr. 2D) které se tvoří ve velkém množství a umožňují efektivní šíření na velké vzdálenosti. Do hostitele vniká skrze poranění kůry, např. ořezané či ulomené větve v koruně, poškození borky okusem či mrazové trhliny. Po infekci prorůstá vodivými pletivy hostitele a může zůstat dlouho v latenci bez vnějších příznaků. Přejít do patogenní fáze je vázán na oslabení hostitele stresem zejména nezvykle suchými a horkými měsíci během léta (Gregory a Waller, 1951; Lonsdale a Gibbs, 1996).

Přejít do patogenní fáze se obvykle projeví na podzim prosycháním větví v koruně a usycháním listů. Prosychání není druhově specifickým symptomem, může vznikat přímo v důsledku sucha, zastínění či působením jiných patogenů. V případě SBD dochází v důsledku kolonizace pletiv houbou k ukládání difúzních látek dávající pletivu typicky nazelenalé hnědé až žluté zbarvení (Obr. 2B). Toto zbarvení prostupuje dlouhé úseky kmene či větví obvykle v blízkosti jádra. V místech, kde barevná zóna dosáhne až k okraji kmene, dochází k tvorbě korových nekrot. Nekrózy se tvoří na odumřelých větvích či na kmeni, jsou typicky vertikálně protáhlého tvaru a mohou měřit od desítek centimetrů až po dva metry. V prvotní fázi se pod kůrou vytváří dutina, která se projeví z vnějšího pohledu puchýřovitou strukturou kůry. Ve zralosti se svrchní vrstva kůry odlupuje a odhaluje masu konidií (Obr. 2C). Podle tloušťky kůry se buď tvoří stromata jednodílná nebo ostrůvkovitá, morfologie ale zůstává nezměněna (Gregory a Waller, 1951).

V konečném stádiu strom odumře, téměř veškerá kůra je odloupána a po uvolnění konidií zůstává obnažené bazální stroma se zbytky stromatických sloupků (Obr. 2A). Nekrotizovaná



Obr. 2: Symptomy SBD a *C. corticale*. **A)** Nekrotizovaná větev, odlupující se svrchní kůra odhaluje stromata *C. corticale*. **B)** Průřez kmene se skvrnitostí způsobenou *C. corticale* (foto: K. Černý). **C)** Čerstvá léze pod kůrou (foto: K. Černý). **D)** Konidie *C. corticale*, zvětšeno 100×. **E)** Kultura *C. corticale* na 2°SL, stáří 7 dní **F)** stáří 14 dní.

kůra je kolonizována řadou bezobratlých živočichů, kteří ji využívají jako úkryt či jako zdroj potravy, jejich výskyt je však sekundární a nepřispívají k šíření onemocnění (Jones, 1993). Jako možný vektor přenosu byla zvažována veverka popelavá (*Sciurus carolinensis*), jež je v britských parcích přemnožená a poškozují dřeviny okusem. Samotný okus stromů hraje roli jako zdroj vstupních bran pro infekci. Mimo to veverky okusují stromata *C. corticale* a přenášejí tak konidie na svých zubech, drápech a v trávicím traktu, čímž mohou přispívat k šíření onemocnění v rámci lokality (Abbott a Rayner, 1977).

2.1.4 Stresové faktory podmiňující výskyt SDB

Původně byly za spouštěcí faktor považovány vysoké teploty v letních měsících, protože hromadné úhyny javorů následovaly po nezvykle horkých létech. Dle studie Young (1978) se akutní projevy SDB objevily v letech s nejméně dvěma měsíci s průměrným teplotním maximem nad 23°C. Rovněž experimentální pokusy s javory uměle infikovanými *C. corticale* prokázaly rychlejší kolonizaci pletiv při 25°C než při 15°C (Dickenson a Wheeler, 1981). Nicméně porovnání záznamů výskytu *C. corticale* ve Velké Británii s klimatickými daty ukázalo, že ne všechna nadměrně teplá léta byla doprovázena úhyny javorů. Rozhodujícím faktorem se ukázalo být množství srážek v daném roce (Gibbs, 1997). Obdobně byl v Praze pozorován zvýšený výskyt SDB v roce 2005 patrně v důsledku nadstandardně horkých a suchých měsíců v roce 2003. Podobně vysoké teploty, ale bez snížených srážkových úhrnů, byly přítom naměřeny i v letech 1992 a 1994 kdy výskyt SDB nebyl zaznamenán (Koukol et al., 2014).

V Praze bylo paradoxně zaznamenáno nejvíce případů SDB v parku Stromovka, který leží v aluviální oblasti řeky Vltavy a celoročně disponuje vysokou hladinou podzemní vody. Téměř celá plocha parku byla dokonce po několik týdnů zaplavená během povodní v roce 2002. Odumírání kořenů v důsledku anoxie a zvýšený výskyt kořenových hnilob vedly k redukcí kořenového systému, jež se projevila v nedostatečném zásobení nadzemních částí stromu vodou podobně jako při nedostatku vláhy a mohla tak podnítit rozvoj SDB (Koukol et al., 2014). Souvislost výskyt SDB s vysokými srážkami uvádí i Bencheva (2014) v Sofii, kde projevům SDB předcházela léta extrémně suchá následovaná léty nezvykle bohatými na srážky.

Kromě klimatických faktorů mají záznamy SDB v Evropě ještě jeden společný trend a tím je výskyt ve městech (Gibbs, 1997). Zejména první nálezy onemocnění na jednotlivých lokalitách a náhlá rozsáhlá odumírání v důsledku SDB jsou zaznamenávána ve velkých městech. Příkladem může být výskyt SDB v Paříži, kde v roce 2005 muselo být odstraněno z porostu na 600 jedinců javoru klenu (což činí přibližně 1% z pařížské populace javoru klenu), přičemž v blízkých smíšených lesích na severu a severovýchodě Francie nebyl zaznamenán jediný případ SDB (Douzon, 2007).

2.1.5 Management péče o napadené dřeviny

Časové oddělení infekce hostitele a přechodu do patogenní fáze znemožňuje likvidaci nákazy v jejím zárodku. Prvními viditelnými symptomy je prosychání koruny a tvorba nekrotů na větvích. Vzhledem k tomu, že nekrózy většinou nevznikají v místě vstupu, ale až po kolonizaci vodivých pletiv, nelze infekci zastavit odstraněním postižených částí. Nicméně ořez

nekrotizovaných větví a odstranění napadených jedinců z porostu je žádoucí kvůli zamezení šíření infekce. Při manipulaci s nekrotizovaným materiálem se uvolňuje velké množství spor, a proto je vhodné dodržovat bezpečnostní opatření. Zejména je důležité provádět ořez ve vegetačním klidu za vlhkého chladného počasí a nekrotizovaný materiál bezprostředně likvidovat, nejlépe spálit. Pro zamezení přenosu infekce na další stromy je vhodné používané přístroje pravidelně dezinfikovat 70% etanolem (Cazaubon, 2012). Rovněž při zpracovávání či skladování nekrotizovaného dřeva je vhodné zajistit vyšší vzdušnou vlhkost kvůli zamezení uvolňování spor. Inhalace velkého množství spor může u lidí způsobovat alergické reakce, proto je vhodné během práce používat roušku (Robeck, 2007). Tato alergická reakce se nazývá *Bark strippers lung*, protože byla popsána u pracovníků pily a továrny pražce v Michiganu, kteří se nadýchali spor při opracovávání nekrotizované kůry z kmenů. Příznaky onemocnění jsou podobné jako při nachlazení: kašel, únava, horečka, zimnice či bolesti hlavy. Při pobytu na čerstvém vzduchu symptomy odezní během několika týdnů či měsíců (Tewksbury et al., 1968; Robeck, 2007).

Na lokalitách s výskytem SBD je vhodné provádět pravidelný monitoring a průběžně odstraňovat jedince se symptomy onemocnění. Vykácené stromy je ideální nahradit jinými druhy. Při vysazování javoru klenu na nové lokality je vhodné dbát na stanovištní požadavky dřeviny, zejména zajistit propustnou půdu, dostatek vláhy a polostín (Douzon, 2007; Cazaubon, 2012).

2.2 Původci zbarvení v pletivech javoru klenu

Jedním ze symptomů je SBD je zelenohnědé až žlutavé zbarvení pletiv, které prostupuje dlouhými úseky kmene obvykle v blízkosti jádra. Toto zbarvení předchází tvorbě korových nekrot, které vznikají v místě, kde se skvrna přiblíží až okraji kmene. Po odumření stromu se zbarvení vytrácí a pletiva dostávají světle šedý odstín (Gregory a Waller, 1951).

Samotnou přítomnost zbarvení ovšem nemůžeme pokládat za důkaz infekce *C. corticale*. Javor klen je relativně náchylný ke vzniku zbarvení pletiv a může k němu docházet z různých biotických i abiotických příčin. Nejčastěji je zbarvení přítomno ve střední části kmene, ale ve většině případů zasahuje také do báze kmene a rozpíná se i směrem do koruny. Na průřezu kmenem má pak zbarvení největší průměr u báze a směrem do koruny se postupně zmenšuje. Co do tvaru může být kulovité, paprscité (Obr. 3) či oblakovité. V případě mnohonásobné či postupné kolonizace patogenem může vznikat kompartmentované zbarvení (Kadunc, 2007). Zbarvení má nejčastěji nazelenalé, šedé, hnědé či oranžové odstíny a je způsobeno fenolickými

látkami naakumulovanými v místě poranění nebo infekce houbovými či bakteriálními patogeny (Gregory, 1982; Kadunc, 2007; Kowalski a Materniak, 2007). V místě aktivní interakce mezi patogenem a hostitelem se vytváří reakční zóna. Na příkladu javoru klenu infikovaného *C. corticale* byla tato reakční zóna popsána jako zelená linka o šířce 0,5 – 2 mm oddělující zdravá pletiva od infikovaných (Pearce, 2000); stejná reakční zóna se utvořila i u javorů klenů infikovaných patogeny *Kretzschmaria deusta* a *Ganoderma adspersum* (Pearce et al.1997).

Zbarvení se může tvořit lokálně v místě poranění kůry, v mrazových lištách či v podobě klínů tmavého dřeva pod korovými nekrózami způsobenými např. *Necria coccinea*. Ohraničené skvrny ve tvaru písmene T mohou zůstat po zahojení drobných nekróz způsobených *Fusarium solani* (Kowalski a Materniak, 2007). Rovněž Langer et al. (2013) uvádí *Fusarium* sp. jako původce šedohnědých či šedo zelených skvrn v pletivech javoru klenu. Dále jsou v této studii popsány případy zbarvení pletiv zástupci *Phytophthora* sp., *Neonectria* sp. a *Verticillium dahlie*. Zbarvení pletiv doprovázející hnilobu způsobují u javoru klenu dřevokazné houby jako například *Ganoderma adspersum*, *Kretzschmaria deusta* či *Chondrostereum purpureum* (Pearce et al., 1997).



Obr. 3: Zbarvení způsobené kolonizací neurčeným patogenem na průřezu větvi javoru klenu.

Dle studií zabývajících se pěstováním javoru klenu roste pravděpodobnost přítomnosti zbarvení pletiv s věkem stromu, průměrem kmene a rozlohou koruny. Patrná je souvislost mezi zbarvením a přítomností odumřelých větví v koruně a mrazových trhlin (Hein et al., 2008). Rovněž prořezávání větví může způsobit zbarvení pletiv, a to zejména ořez silnějších větví u starších stromů. Aby nedocházelo k znehodnocení dřeva, je vhodné prořezávat mladé stromy s hustou korunou a odstraňovat větve o průřezu maximálně 5-6 cm (Dănescu et al., 2015). Z hlediska

těžařského je nejuvhodnější těžít stromy s maximálním obvodem 45 cm (měřeným standardně ve výšce hrudníku), u nichž je minimální pravděpodobnost zbarvení (Kadunc, 2007).

2.3 Metody brzké detekce fytopatogenních hub z pletiv hostitele

Pojmem brzká detekce rozumíme identifikaci patogenu v latentní fázi bez přítomnosti vnějších symptomů (Narayanasamy, 2011). Odhalení patogenu již v latentní fázi umožňuje efektivně eliminovat projevy onemocnění a redukovat další šíření patogenu odstraněním infikovaných rostlin či jejich částí (Narayanasamy, 2011; Capote et al., 2012). Velký význam má brzká detekce dřevokazných hub v dřevinách, jež snižují tržní cenu dřeva, a zejména v městské prostředí ovlivňují tzv. provozní bezpečnost stromů. V lesnictví a arboristice je používána celá řada metod odhalení hniloby, jejích původců, a zejména rozsahu poškození. V arboristické praxi se běžně používají k detekci jednoduché nástroje (např. impulzní kladivo, Presslerův nebozez) či sofistikované přístroje založené na fyzických a mechanických odlišnostech zdravého a rozloženého dřeva. Mezi nejběžněji používané patří akustický tomograf modelující hnilobu v kmeni na základě rychlosti šíření akustické signálu a penetrometr, který zaznamenává změnu v kvalitě dřeva na základě odporu, který klade vůči tenkému vrtáku (Kolařík, 2006). Jiné přístroje využívají ultrazvukových vln, magnetické rezonance, rentgenu či radarového signálu (Larsson et al. 2004). Nevýhodou těchto metod je časová a finanční náročnost testů, výsledky navíc mohou být ovlivněny i dalšími faktory (např. vodní nasyceností pletiv). Dalším nedostatkem je nemožnost určit původce hniloby a uvádí se i neschopnost detekovat hnilobu v raných fázích infekce (Clausen, 1997). Tradičním používaným postupem pro detekci patogenů v pletivech je izolace z pletiv hostitele do kultury. Nevýhodou této metody je opět relativní časová náročnost (doba od zpracování vzorků po determinaci patogenu může trvat v rámci dní až týdnů), nutná znalost taxonomie, vysoké riziko kontaminace, nemožnost kvantifikovat míru nákazy, a především neschopnost růstu *in vitro* u některých druhů hub (Capote et al. 2012). Citlivější a rychlejší jsou imunologické metody detekující v pletivech protilátky více či méně specifické pro konkrétní patogeny či skupiny patogenů. Výhodou těchto metod je i možnost kvantifikace nákazy. K detekci fytopatogenních hub byla nejčastěji použita metoda ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) založená na imunoenzymatické reakci a její modifikace (Clausen, 1997). V současné době jsou nejvíce používány moderní molekulární metody brzké detekce fytopatogenů, které mohou být využity jak k samotné detekci, tak i k identifikaci patogenu a kvantifikaci míry nákazy v pletivech hostitele. Tyto metody jsou rychlejší (obvykle méně než 24 hodin), přesnější a citlivější než metody izolační. Nevyžadují taxonomické vzdělání

a umožňují detekovat i nekultivovatelné patogeny. K brzké detekci fytopatogenních hub v pletivech pletiv jsou nejčastěji používané přístupy založené na PCR se specifickými primery (Capote et al., 2012)

Základní metodou je konvenční PCR se specifickými primery, které nasedají na konkrétní úsek v genomu cílového organismu, jež může být specifický na úrovni rodu, druhu či dokonce kmenu. Produkt reakce je následně vizualizován na elektroforézním gelu. Ve fytopatologické praxi se ale častěji používají odvozené metody, které mají větší citlivost, případně umožňují kvantifikaci množství DNA v templátu.

Zvýšení citlivosti lze dosáhnout pomocí *nested PCR*, která je složená ze dvou po sobě provedených PCR reakcí. Při první reakci jsou použity univerzální houbové primery a produkt této reakce slouží jako templát pro druhou PCR se specifickými primery. Nevýhodou této metody je větší časová náročnost a vyšší riziko vzájemné kontaminace vzorků při opakovaném pipetování (Narayanasamy, 2011). Rychlejší variantou této metody je *co-PCR* (kooperační PCR) kdy jsou externí i interní primery přidány do jedné reakce. Nevýhodou této varianty může být větší citlivost na inhibiční látky (Necas, 2006).

Pro detekci více patogenů najednou lze použít *multiplex PCR*, při které v jedné reakci probíhá amplifikace několika různými primery specifickými pro různé patogeny. Nevýhodou této metody je relativně náročná optimalizace PRC, která musí zaručit, že primery spolu nebudou navzájem interagovat a amplikony budou podobné délky, aby nedocházelo k přednostní amplifikaci kratších úseků (Capote, 2012).

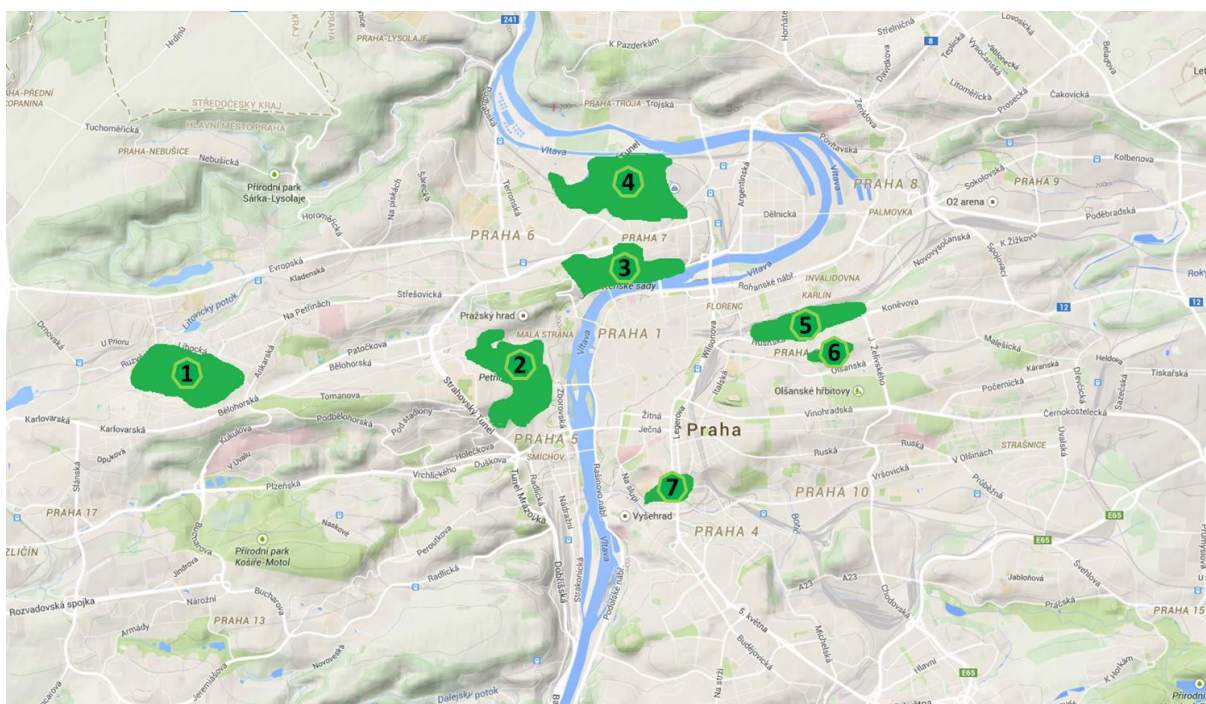
V současnosti je ve fytopatologii nejčastěji používaná *real-time PCR* neboli kvantitativní PCR. Při této metodě dochází nejen k detekci, ale rovněž i ke kvantifikaci množství DNA patogenu v pletivech hostitele. Navíc při ní odpadá vizualizace produktů na elektroforézním gelu při níž je nutno manipulovat s ethidium bromidem, jež má mutagenní účinky (Scheda, 2013). Princip metody spočívá ve fluorescenčním značení DNA (barvivem či sondou), jehož intenzita je zaznamenána v každém cyklu PCR. Vzhledem k exponenciálnímu průběhu amplifikace lze zpětně odvodit množství DNA v templátu (Capote, 2012)

3 Metodika

3.1 Lokality a dřeviny

Cílovými lokalitami (Obr. 4) byly parky celopražského významu (dříve nazývané parky 1. kategorie) zahrnující Stromovku, komplex zahrad vrchu Petřína, zahradu Kinských, Letenské sady, park na vrchu Vítkově a oboru Hvězda. Správa parků náleží Odboru městské zeleně a odpadového hospodářství Magistrátu hlavního města Prahy. V roce 2013 bylo požádáno o povolení k odběru vzorků, jež nám bylo následně vystaveno.

Dále byly vzorky odebírány na lokalitách, kde již byl výskyt patogenu zaznamenán, tj. v parcích Parukářka a Folimanka. Vybrané lokality jsou vhodné z hlediska zastoupení javoru klenu a velké diverzity stanovištních podmínek. Cílovou dřevinou byl javor klen, který je hlavním hostitelem *C. corticale*. Případy výskytu SBD na jiných druzích javoru jsou spíše výjimečné.



Obr. 4: Mapa Prahy s cílovými lokalitami. 1) Obora Hvězda, 2) Petřínské sady, 3) Letenské sady, 4) Stromovka, 5) Vítkov, 6) Parukářka, 7) Folimanka

3.2 Terénní odběry

Terénní odběry byly prováděny od března 2013 do listopadu 2014. Na každé lokalitě bylo odebráno 15 – 25 vzorků podle rozlohy a zastoupení javoru klenu. Při výběru stromů bylo dbáno na obsáhnutí všech typů stanovišť a zahrnutí jedinců s různými stupni poškození. U každého stromu byl zaznamenán obvod kmene ve výšce odběru, odhadnut stupeň proschnutí koruny (Tab

2), popsán zdravotní stav a poškození stromu (dle Uhlířová a Kapitola (2004)), průměr koruny a její deformace (např. v důsledku zastínění, prořezu větví).

Tab 2: Stupnice míry prosychání dle Gregorová et al. (2006).

Stupeň poškození	Charakteristika	% prosychání
(0)	strom zdravý	0
1	mírně poškozený	> 0 – 25
2	středně poškozený	> 25 – 50
3	silně poškozený	> 50 – 75
4	odumírající	> 75
(5)	suchý	100

Pro odběry vzorků z vnitřku kmene byl zvolen Presslerův nebozez, což je specializovaný dutý vrták využívaný zejména v dendrochronologii k určení stáří stromů, měření přírůstu stromů a datování období růstu stromu (Grissino-Mayer, 2003). V arboristické praxi se používá pro stanovení rozsahu infekce dřeva či k měření zbytkové stěny dutin (Kolařík, 2006). Odběry se provádí standardně ve výšce 120 cm a dosahují ideálně do středu kmene. V případě podezření na přítomnost hniloby či dutiny, kde hrozí uvíznutí vrtáku, je vhodné během vrtání kontrolovat kvalitu dřeva, např. průběžným odebíráním vývrty. Výsledkem odběrů je váleček dřeva o průměru 0,5 cm. Výhodou oproti neinvazivním metodám detekce hnilob je zejména možnost dodatečné identifikace původce defektů a finanční nenáročnost.

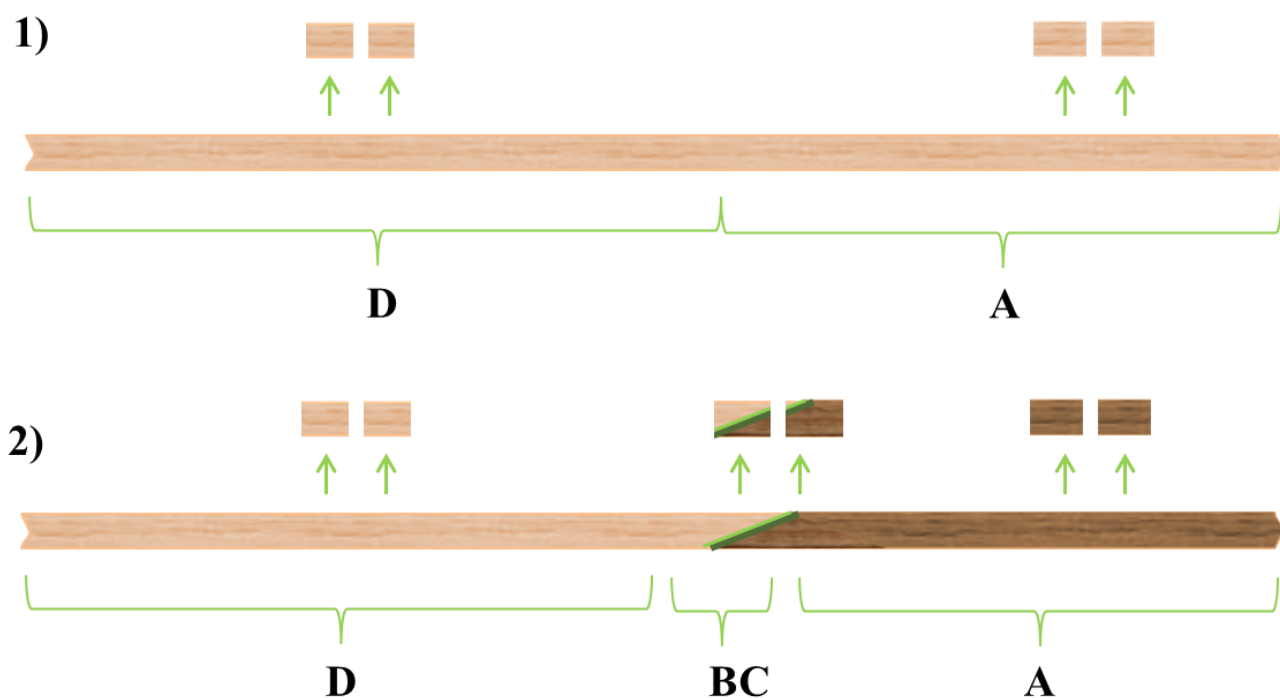
Vzorky pletiv byly odebírány Presslerovým nebozezem MORA-PV400 (Haglöf, Švédsko). Vývrty o délce 15 až 25 cm byly na místě vizuálně hodnoceny na přítomnost defektů (zbarvení pletiv, hniloba, praskliny či dutiny v kmeni) a uschovány do papírových sáčků. Presslerův nebozez a vnější pletiva v okolí vrtu byla před i po odběru povrchově sterilizována 96% etanolem z rozprašovače.

Na lokalitě byla zaznamenána také její charakteristika (zpevnění a sklon plochy, zapojení porostu, přítomnost stresových faktorů).

3.3 Izolace a kultivace hub

V laboratoři byly v nesterilním prostředí z vývrťů vyříznuty 0,5 cm segmenty, dva z oblasti jádrového dřeva (A) a dva z okrajové části kmene (D). V případě vývrťů s barevnou zónou byly získány duplicitní segmenty ze středu barevné zóny, z aktivní přechodové zóny a z okrajové části kmene (Obr. 5). Ve flowboxu byly segmenty povrchově sterilizovány postupně v 96 % etanolu a v 0,5 % roztoku chlornanu sodného (SAVO), vždy po dobu 50 sekund, a následně opláchnuty

v destilované vodě, osušeny na filtračním papíru a umístěny na Petriho misky se 2° sladivým agarem (2° SL) připraveným ze sladivového výtažku (Sladovna Bruntál, ČR) přidávaného na hustotu 2° Balinga a 22 g agaru na litr destilované vody s přidavkem antibiotika Streptomycin (cca 3 mg/l). Vzorčky byly kultivovány při pokojové teplotě, jednotlivé izoláty byly průběžně odebírány do čistých kultur na 2°SL.



Obr. 5: Schéma odebrání segmentů z vývrtů. 1) vývrt bez defektů: a – pletiva ze středu kmene, B – pletiva z okrajové části kmene. 2) vývrt se zbarvenými pletivy: a - zbarvená pletiva jádrového dřeva ve středu kmene, BC – přechodová zóna, D – nezbarvená pletiva v okrajové části kmene. Z každé části byly odebrány 2 segmenty o velikosti 0,5 cm.

3.4 Identifikace kultur

Izoláty byly na základě fenotypických znaků kolonií rozřazeny do morfotypů. Sporulující izoláty byly určeny na základě morfologických znaků dle relevantní taxonomické literatury. Sterilní izoláty byly určeny na základě porovnání sekvencí ITS rDNA (případně i 28S rDNA) s databází GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Většina izolátů byla uschována minimálně v jednom exempláři na šikmeném agaru pro případnou potřebu přesnější identifikace.

3.4.1 Extrakce a sekvenace DNA

DNA byla extrahována z čerstvých kultur na 2°SL pomocí kitu ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, Kalifornie, USA) za dodržení doporučeného postupu výrobce s výjimkou posledního kroku, kdy byla DNA vymyta 28 µl elučního pufru ohřátého na 65°C.

Vybrané úseky DNA byly amplifikovány v termocykléru Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Německo). Pro určování druhů byla amplifikována oblast ITS rDNA zahrnující ITS1 - 5,8S - ITS2 pomocí párů primerů ITS1F a NL4 nebo ITS1F a ITS4 (Tab. 3). Reakce probíhala ve směsi o objemu 20 µl (10 µl destilované vody, 0,5 µl forward a 0,5 µl reverse primeru o koncentraci 10 pmol/l, 1 µl templátové DNA). Polymeráza, reakční pufr a nukleotidy byly součástí mastermixu 5 PRIME MasterMix (5Prime, Německo), který byl do reakční směsi dodán v objemu 8 µl. Sekvence ITS je v GenBank hojně zastoupená a využívána pro determinaci řady druhů, taxonomie některých skupin hub je ale založena na jiných markerech. Proto musela být např. pro zástupce řádu Pleosporales amplifikována oblast 28S rDNA pomocí primerů NL1 a NL4.

Tab. 3: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci ITS1 - 5,8S - ITS2 a 28S rDNA.

Název	Sekvence (5' - 3')	Zdroj
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA	White et al. (1990)
NL1	GCAATATCAATAAGCGGAGGAAAA	O'Donnell (1993)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATG	White et al. (1990)
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)

Úspěšnost reakce byla ověřena vizualizací produktu PCR elektroforézou na 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Produkty PCR byly přečištěny purifikačním kitem GeneAid (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) a připraveny na sekvenaci v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK v Praze. Sekvence byly upraveny v programu Geneious (Biomatters, Auckland, Nový Zéland) a porovnány se sekvencemi v databázi GenBank pomocí algoritmu Blast (Altschul, 1990)

3.5 Izolace DNA z vývrtů

Každý vývrt byl v laboratoři zbroušen po celé své délce rašplí a získané piliny byly uchovány v mikrozkuvkách Eppendorf při teplotě -20°C. K extrakci DNA byl použit ZR Plant/Seed DNA Kit (Zymo Research, Kalifornie, USA) za dodržení doporučeného postupu od výrobce s mírným navýšením objemu Lysis Solution (760 µl) vzhledem k nízkému vodnímu potenciálu pilin. DNA byla vymyta 30 µl elučního pufru ohřátého na 65°C.

3.6 Detekce *C. corticale* pomocí specifických primerů

Primery specifické pro druh *C. corticale* byly navrženy v programu PrimerBLAST na základě sekvencí úseku ITS rDNA a fragmentů genů kódujících aktin, RNA polymeráza II podjednotky

B2 (RPB2) a β -tubulinu (TUB), získaných z předchozí studie (Koukol et al., 2014). Pět nejvhodnějších párů (Tab. 4) bylo zkonstruováno (Sigma-Aldrich, Německo).

Tab. 4: Sekvence pěti párů specifických primerů navržených na základě tří různých markerů (ITS, TUB, RPB2).

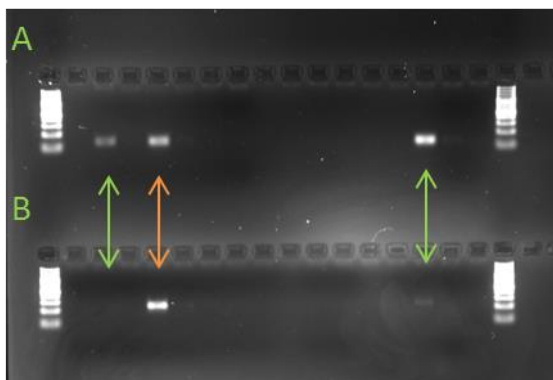
gen a příslušný pár primerů	sekvence (5' - 3')	teplota nasedání
ITS rDNA		
ccITS1f	TCTGAGTATAACACAAAAATAAG	55°C
ccITS1r	TACAGTAACGTAAATTCCCA	
ccITS2f	AGGTTGTGCTGTCCGGTG	60°C
ccITS2r	CAGTAGATTCAGAGTTTGGGGG	
TUB		
ccTUB1f	GGGAACAAGAGCTTTCCCTAA	55°C
ccTUB1r	AATGCGTAAGTGCTATCCTC	
ccTUB2f	GAGGATAGCACTTACGCATT	55°C
ccTUB2r	GTCATGTAAACACAGCATCG	
RPB2		
ccRPB2f	CGAACTAGCTGTGAAGCCCA	60°C
ccRPB2r	TCTCTTCCTACGGGGGTGTT	

Pro optimalizaci PCR se specifickými primery byla použita reakční směs o objemu 15 μ l (7,5 μ l destilované vody, 6 μ l mastermixu 5Prime, 0,875 μ l forward a 0,875 μ l reverse primeru o koncentraci 10 pmol/l, 0,75 μ l templátové DNA). Programy v termocykléru Eppendorf Mastercycler byly nastaveny pro každou reakci dle programu pro daný gen, na základě kterého byl primerový pár navržen.

V první fázi byla optimalizována teplota nasedání na 10°C gradientu teplot v okolí teploty doporučené od výrobce. Dále se testovala závislost na koncentraci templátové DNA a specifitě primerů. Specifita byla testována na templátové DNA z čistých kultur *C. corticale* a jí blízké příbuzných druhů *Biscogniauxia simplicior* a *Graphostroma platystoma*. Jako nevhodný byl vyhodnocen primerový pár ccTUB1f a ccTUB1r, který produkoval velmi slabé proužky.

PCR se specifickými primery na DNA z vývrtů byla optimalizována pro různé koncentrace templátové DNA. Jako pozitivní kontroly byly použity vývrti, z nichž byla *C. corticale* úspěšně izolována na agar, a DNA extrahovaná z čisté kultury *C. corticale* (CCF 5115). Jak se ukázalo, koncentrace DNA *C. corticale* jsou v DNA extraktu z vývrtů příliš nízké, navíc je ve směsné DNA přítomno zřejmě příliš mnoho inhibičních látek, které brání nasednutí primerů

(Narayanasamy, 2011). Protože nepomohlo ani silné zředění templátové DNA, přistoupilo se k využití *nested* PCR, jež je běžně využívána pro silně znečištěné environmentální vzorky (Jacquit et al., 2000; Zang et al., 2012). Vzhledem k tomu, že se v optimalizaci dobře osvědčily specifické primery z úseku ITS, byl tento úsek vybrán i pro *nested* PCR. V první fázi *nested* PCR se naamplifikovala celá oblast ITS pomocí primerů ITS1F a ITS4. Výsledný produkt byla směs DNA různých hub oprostěná od inhibičních látek a DNA javoru. Tato DNA se naředila v poměru 1:500 s destilovanou vodou a použila jako templát pro druhou PCR reakci se specifickými primery (reakční směs 15 7,5 µl destilované vody, 6 µl mastermixu 5Prime, 0,875 µl forward a 0,875 µl reverse primeru o koncentraci 10 pmol/l, 0,75 µl templátové DNA). Pro snížení rizika vzniku falešně pozitivních výsledků v důsledku nespecifického nasednutí primerů byly využívány obě dvojice primerů založených na ITS sekvenci ve dvou simultánně probíhajících reakcích. Jako pozitivní byl považován vzorek s pozitivními shodami v obou reakcích. V případě pouze jedné pozitivní reakce byla u daného vzorku PCR opakována (Obr. 6). Pro ověření specifity reakce bylo několik výsledných produktů druhé reakce osekvenováno a porovnáno se sekvencí *C. corticale* v databázi GenBank.



Obr. 6: Příklad vyhodnocení výsledků *nested* PCR na agarozovém gelu. A, B – dvě paralelně probíhající reakce stejného setu vzorků s různými primery. Pozitivní shoda v obou reakcích vyšla pouze u jednoho vzorku (oranžová šipka). U vzorků s pozitivním výsledkem pouze v reakci A, byly obě reakce opakovány (zelená šipka).

3.7 Vyhodnocení dat

Rozdíly v míře proschnutí stromů na jednotlivých lokalitách byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem. Pro testování závislosti mezi proměnnými s binomickým rozdělením byl použit chí-kvadrát test nezávislosti. Pro všechny zaznamenané faktory byl spočten Spearmanův pořadový koeficient determinace za vzniku korelační matice. Statistické testování a konstrukce boxplotů byly provedeny v programu R 2.15.0.

Sloupcové a výšečové grafy byly zkonstruovány v programu Microsoft Excel 2010.

4 Výsledky

4.1 Terénní odběry

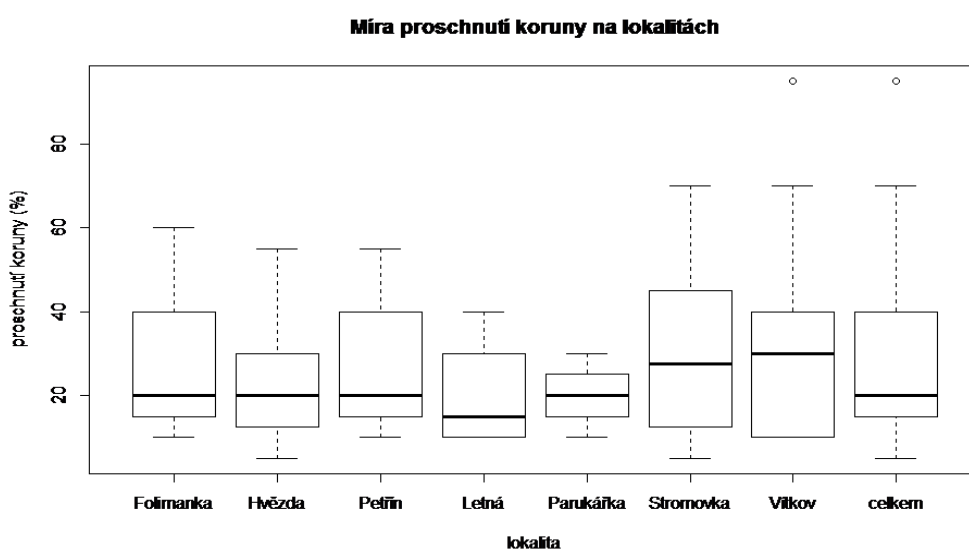
Celkem bylo od března 2013 do listopadu 2014 odebráno 136 vývrtů. Z toho prvních 15 vývrtů na území Stromovky sloužilo pro optimalizaci metodiky kultivace hub z vývrtů na agar. Dalších 9 vývrtů bylo testováno pouze metodou kultivace hub na agar. Celkem tak byla infekce *C. corticale* detekována oběma metodami pouze u 112 vývrtů (viz příloha 1).

Počet odběrů na lokalitě (Tab. 6.) byl závislý zejména na počtu jedinců cílové dřeviny a proměnlivosti prostředí. Nejnižší hustota odběrů (1 odběr na cca 5 ha) byla v oboře Hvězda, kde je javor klen pouze doplňkovou dřevinou v relativně stálém prostředí s omezeným působením stresových faktorů. Naopak s nejvyšší hustotou byly odebrány vzorky v parcích Vítkov a Folimanka, kde je vyšší zastoupení javoru kleny v porostu a větší různorodost stanovišť.

4.2 Vnější symptomy poškození dřevin

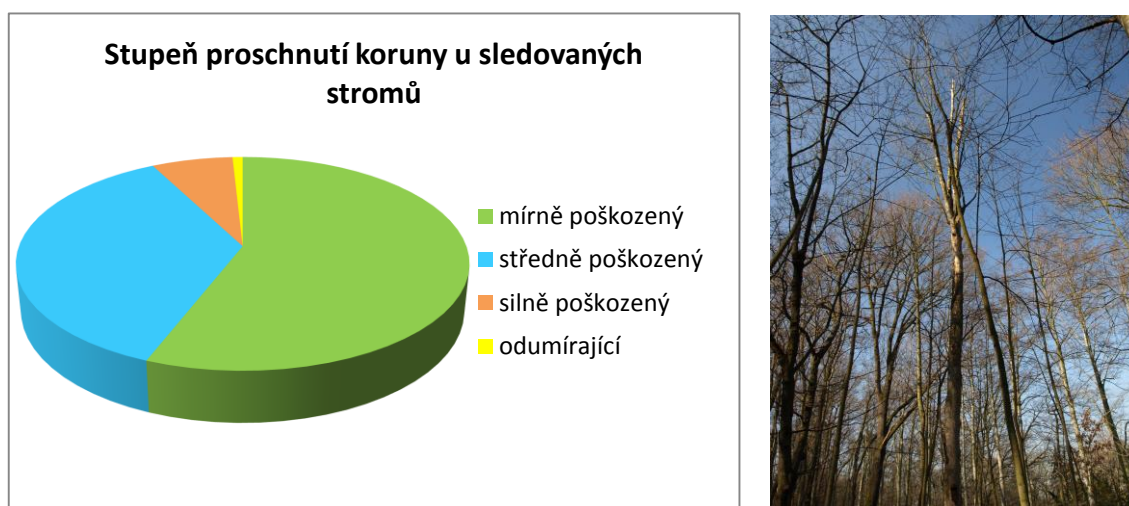
4.2.1 Proschnutí koruny

Míra proschnutí koruny se u vrtaných stromů pohybovala na škále od 5 do 90 % z celkového počtu větví. Mezi jednotlivými lokalitami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v míře proschnutí sledovaných stromů (Kruskal Wallis test, p-hodnota = 0.6434). Lehce nadprůměrné proschnutí vykazovaly stromy v parcích Vítkov a Stromovka (Obr. 7).



Obr. 7: Míra proschnutí koruny javorů klenů pro jednotlivé lokality.

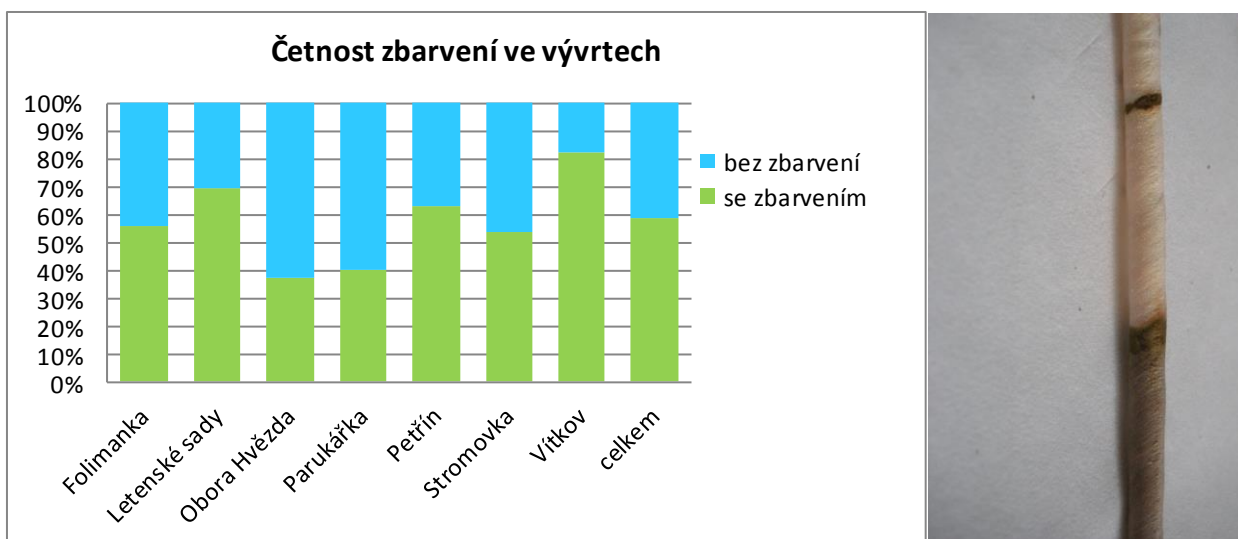
Celkem 56 % procent všech vrтанých stromů vykazovalo mírné poškození. Ve většině případů se jednalo o proschnutí tenkých větví v důsledku zastínění. U 36 % stromů bylo středně poškozených s proschnutím silnějších větví a v menší míře i s proschnutím terminálu. Silné poškození se symptomy odumření terminálu a proschnutím silných větví vykazovalo jen 7 % stromů. Odumírající strom s proschnutím nad 75 % byl zaznamenán jen v jednom případě (Obr. 8).



Obr. 8: Míra proschnutí koruny javorů klenů. Souhrnně přes všechny lokality (vlevo). Příklad stromu se silným poškozením koruny proschnutím (vpravo).

4.2.2 Zbarvení v pletivech

Přítomnost zbarvení v pletivech byla zaznamenána v 74 % ze všech vývrtů. V rámci jednotlivých lokalit se procentuální zastoupení odběrů se zbarvením či hnilobou ve vývrtu pohyboval od nejnižšího výskytu v Oboře Hvězda (37,5 %) až po nejvyšší na Vítkově (82%) (Obr. 9). Signifikantní rozdíl v četnosti vývrtů se zbarvením nebyl prokázán (Chí-kvadrát test: 8.6652, $df = 6$, p -hodnota = 0.1933). Rozsah zbarvení pletiv se pohyboval v rozmezí od několika mm po několik desítek cm. Ve většině případu se zbarvení vyskytovalo v blízkosti jádra. Spektrum zaznamenaných defektů v pletivech bylo velice široké. Nejčastějším defektem bylo zbarvení pletiv nabývající od světle hnědých a zelených odstínů po tmavě hnědou až černou barvu. Zdravá a zbarvená pletiva byla ve většině případů oddělena reakční zónou ve formě zelené linky. Jen 7 % vzorků se zbarvením vykazovalo i rozklad hnilobou. V malém počtu byly zaznamenány praskliny či dutiny v kmeni či úseky suchých pletiv.



Obr. 9: Zastoupení vzorků se zbarvením pletiv. Souhrn pro jednotlivé lokality a pro všechny odběry (vlevo).

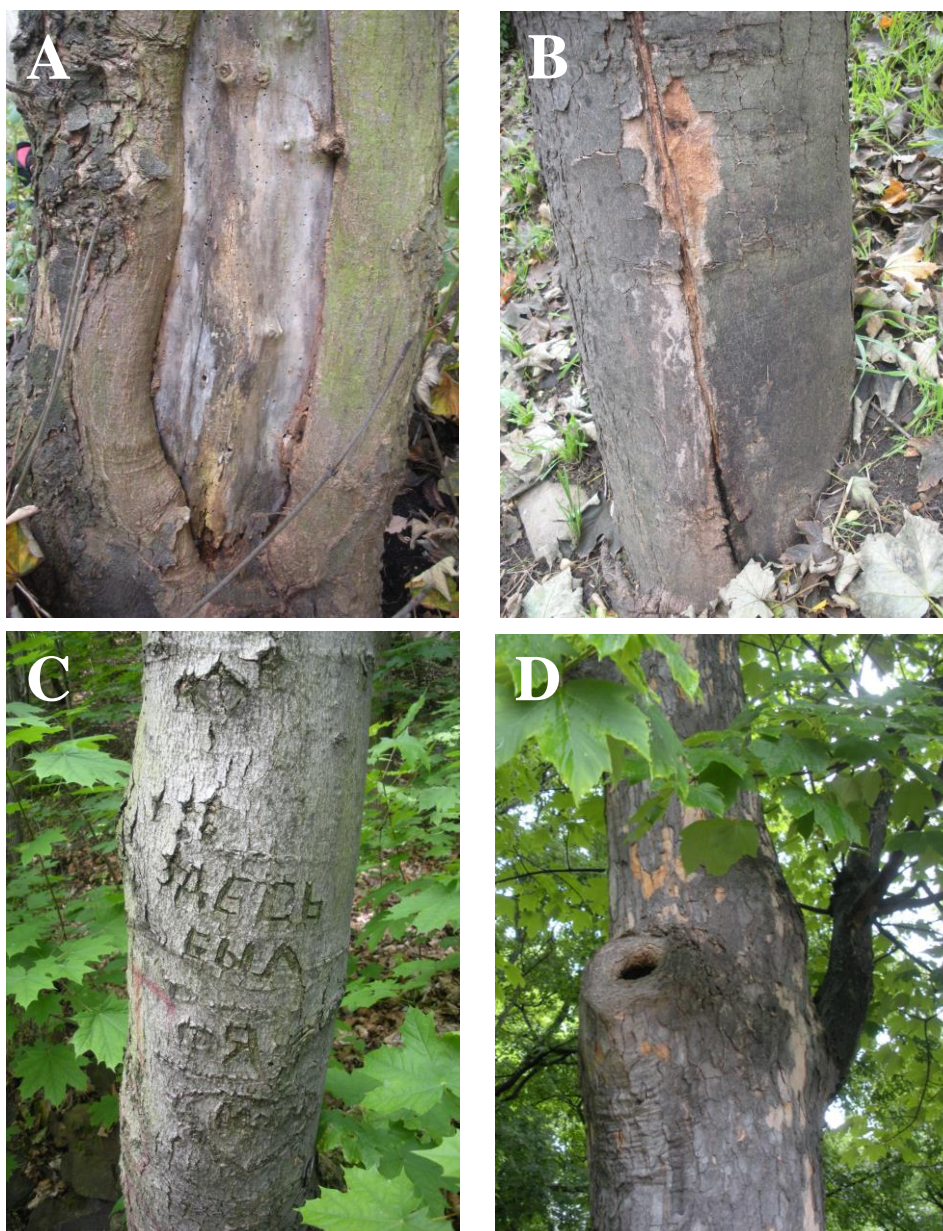
Příklad zbarvení ve vývrstu (vpravo)

4.2.3 Poškození kůry stromů

Poškození kůry na kmeni bylo pozorováno u 49 % stromů. U většiny stromů bylo zaznamenáno více typů poškození najednou (Tab. 5). Jako poškozený byl vyhodnocen strom s alespoň jedním druhem poškození kůry. Nejčastěji se jednalo o mrazové trhliny či mrazové lišty nebo o mechanická poškození vzniklá při pravidelné údržbě parků či působením vandalů (Obr. 10). V menší míře bylo pozorováno poškození sluneční spálou a přítomnost dutin způsobených špatným hojením po ořezu silných větví či vedlejších kmenů. Poškození kůry živočišného původu nebylo pozorováno. Vzácně bylo zaznamenáno působení datla. Na kmeni a v koruně byly zaznamenány špatně zhojené rány po ořezu silných větví (Obr. 10D), v některých případech infikované dřevokaznými houbami či kolonizované hmyzem. V koruně stromů byl nejčastějším případem ořez či zlámání větví, v menší míře přítomnost prasklin.

Tab. 5: Četnosti jednotlivých druhů poškození kmene a koruny spojených s porušením kůry

Druh poškození	Počet případů
Prořez v koruně	53
Mrazové praskliny	32
Mechanické poškození	12
Mrazové lišty	10
Dutiny	7
Sluneční spála	2
Jiné	17



Obr. 10: Příklady poškození kůry kmene javoru klenu. A) Mrazová prasklina, částečně zavalená kalusem, sekundární invaze organismů. B) Mrazová lišta. C) Zhojená rytba nožem. D) Dutina vzniklá po špatně zhojeném ořezu vedlejší větve.

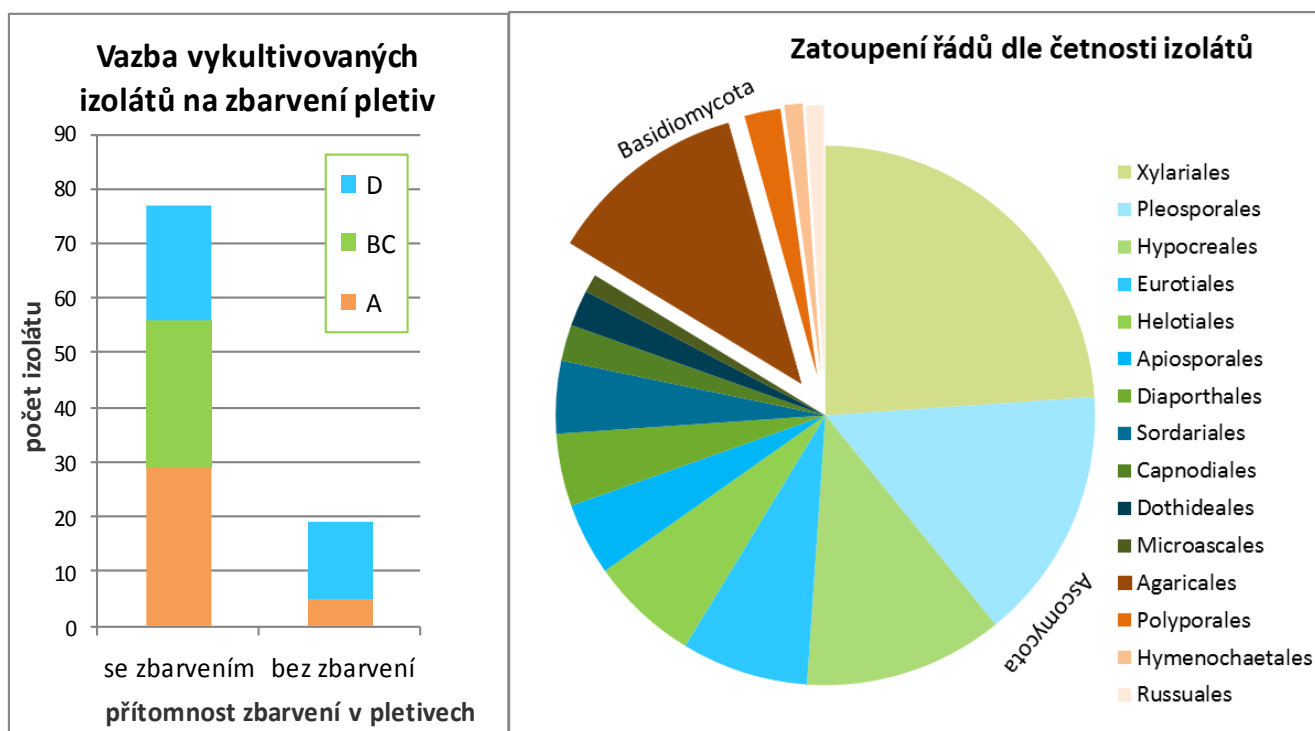
4.3 Diverzita kultivovatelných hub v pletivech

Celkem 121 vývrtů bylo zpracovááno na 268 agarových půdách obsahujících vždy po dvou výsecích z vývrtů. Celkem se podařilo izolovat do čisté kultury 94 izolátů. Většina izolátů (79 %) byla získána z vývrtů se zbarvenými pletivy (Obr. 11). Mezi těmito izoláty byly rovnoměrně zastoupeny izoláty získané přímo ze zbarvených pletiv, z přechodové zóny a z nezbarveného dřeva u okraje kmene. Oproti tomu u izolátů z vývrtů bez zbarvených pletiv byla signifikantně odlišná distribuce v rámci vývrtu (Chí-kvadrát test: 4.3348, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.03734$). Výrazné

bylo navýšení počtu izolátů z okrajové části kmene, které dosahovalo 74 % zatímco u izolátů z vývrtů se zbarvením dosahovalo pouze 27 % (Obr. 11).

Z 94 izolátů se 56 podařilo určit do druhu, zbytek byl určen do rodu či do řádu (sedm izolátů *Pleosporales*).

Spektrum izolovaných hub bylo velmi široké. Získaných 94 izolátů náleželo do 50 taxonů z 15 řádů (Příloha 1). Mezi izoláty převládali zástupci Ascomycota (84 %) nad Basidiomycota (16 %). Nejčetnější zastoupení bylo v řádech *Xylariales*, *Pleosporales*, *Hypocreales*, *Agaricales* a *Eurotiales* (Obr. 12). Opakovaně byly izolovány druhy *Cryptostroma corticale* (14 ×), *Schizophyllum commune* (4 ×), dále zástupci rodů *Fusarium* (6 ×), *Cadophora* (4 ×) a řádu *Pleosporales* (7 ×). Ve třech izolátech byl získán izolát *Penicillium pancosmium*. V počtu dvou izolátů byly získány druhy *Acrostalagmus luteoalbus*, *Apiospora montagnei*, *Arthrinium arundinis*, *Biatrispora* sp., *Cadophora melinii*, *Chondrostereum purpureum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Corynespora* sp., *Diaporthe eres*, *Eurotium* sp., *Kretzschmaria deusta* a *Phialemonium* sp. Většina taxonů (33 izolátů) byla izolována unikátně.



Obr. 11: Porovnání počtu izolátů z jednotlivých částí vývrtu (A, BC, D) u vzorků se zbarvením pletiv a bez zbarvení (vlevo).

Obr. 12: Zastoupení řádů dle četnosti izolátů (vpravo).

4.4 Nové nálezy *C. corticale*

Vnější symptomy onemocnění SBD v podobě korových nekrotů byly nalezeny na dvou lokalitách ve Stromovce a na Vítkově (Tab. 6). Ze dvou čerstvých stromat se podařilo izolovat jeho původce do kultury, starší stromata byla uschována jako herbářové položky. Příslušnost k *C. corticale* následně potvrdilo srovnání ITS rDNA.

Metodou izolace hub z vývrťů na agar se podařilo získat 11 izolátů *C. corticale*. Ve všech případech byla *C. corticale* vázána na vývrty se zbarvením pletiv, ve třech vývrtech byla pletiva rovněž postižena hnilobou. Izoláty byly získány jak ze zbarvené části vývrťu, tak z přechodové zóny a ze zdravých pletiv z okrajové části kmene.

Metodou *nested* PCR se specifickými primery byla *C. corticale* detekována ve 27 vývrtech. Z toho 22 pocházelo z vývrťů se zbarvením či hnilobou.

Všechny vývrty, ze kterých byla *C. corticale* izolována, měly i pozitivní nález pomocí specifických primerů – s výjimkou jednoho vzorku, kde byla *C. corticale* detekovaná pouze izolací. Jako infikované byly vyhodnoceny vzorky jak s pozitivní detekcí specifickými primery, tak izolací na agar. Ze 112 stromů byla tedy infekce *C. corticale* zaznamenána celkem ve 28 případech.

Tab. 6: Výskyt *C. corticale* na sledovaných lokalitách

Lokalita (rozloha)	počet vzorků	pozorované SBD	izolace <i>C. corticale</i> na agar	<i>nested</i> PCR
Folimanka (25 ha)	16	0	0	2
Letenské sady (52 ha)	13	0	3	3
Obora Hvězda (86 ha)	16	0	0	0
Parukářka (20 ha)	5	0	0	2
Petřín (43 ha)	19	0	1	2
Stromovka (85 ha)	26	2	1	6
Vítkov (31 ha)	17	2	6	12
Celkem	112	4	11	27

4.4.1 Závislost výskytu *C. corticale* na vnějších faktorech

U stromů s detekovanou infekcí *C. corticale* a u stromů bez infekce byl porovnáván rozdíl v charakteristikách zdravotního stavu stromů a některých faktorů prostředí. Vzájemné vztahy všech faktorů jsou zobrazeny v korelační matici (Tab. 7). Jak je z ní patrné, vztahy mezi proměnnými jsou velmi slabé, respektive žádné. U infekce *C. corticale* byla zjištěna signifikantní vazba na zbarvení v pletivech. Z faktorů prostředí na ni mělo vliv znečištění ovzduší oxidy dusíku a zapojení v porostu.

	infekce <i>C. corticale</i>	poškození kůry	zaplavení	svah	asymetrie koruny	prořez	zápoj porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí	zpevnění půdy	NO _x
infekce <i>C. corticale</i>	1.00	0.14	-0.05	0.15	-0.01	0.09	-0.24	0.24	-0.08	0.12	-0.12	0.34
poškození kůry	0.14	1.00	0.01	0.10	-0.15	0.13	0.05	0.25	-0.29	0.13	-0.21	0.28
zaplavení	-0.05	0.01	1.00	-0.02	-0.26	0.12	0.00	-0.12	0.06	-0.03	-0.06	-0.19
svah	0.15	0.10	-0.02	1.00	0.02	0.06	0.13	0.01	-0.10	0.00	-0.16	0.24
asymetrie koruny	-0.01	-0.15	-0.26	0.02	1.00	0.17	0.24	0.07	0.10	0.09	0.00	-0.21
prořez	0.09	0.13	0.12	0.06	0.17	1.00	-0.03	0.14	0.01	0.40	0.11	-0.05
zápoj porostu	-0.24	0.05	0.00	0.13	0.24	-0.03	1.00	-0.08	0.09	-0.01	-0.22	-0.27
zbarvení pletiv	0.24	0.25	-0.12	0.01	0.07	0.14	-0.08	1.00	-0.21	0.14	0.07	0.17
obvod kmene	-0.08	-0.29	0.06	-0.10	0.10	0.01	0.09	-0.21	1.00	-0.05	0.05	-0.31
proschnutí	0.12	0.13	-0.03	0.00	0.09	0.40	-0.01	0.14	-0.05	1.00	0.03	0.05
zpevnění půdy	-0.12	-0.21	-0.06	-0.16	0.00	0.11	-0.22	0.07	0.05	0.03	1.00	-0.10
NO _x	0.34	0.28	-0.19	0.24	-0.21	-0.05	-0.27	0.17	-0.31	0.05	-0.10	1.00

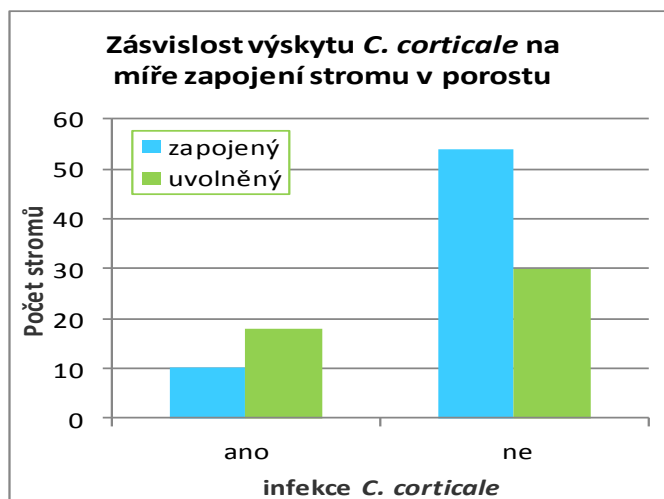
Tab. 7: Korelační matice zobrazující Spearmanův koeficient pořadové závislosti (r_s) mezi všemi dvojicemi proměnných. Červené označení označuje signifikantní vztah na hladině alfa 0,05 mezi proměnnými na hladině alfa.

4.4.1.1 Grafická znázornění faktorů korelujících výskyt infekce *C. corticale*

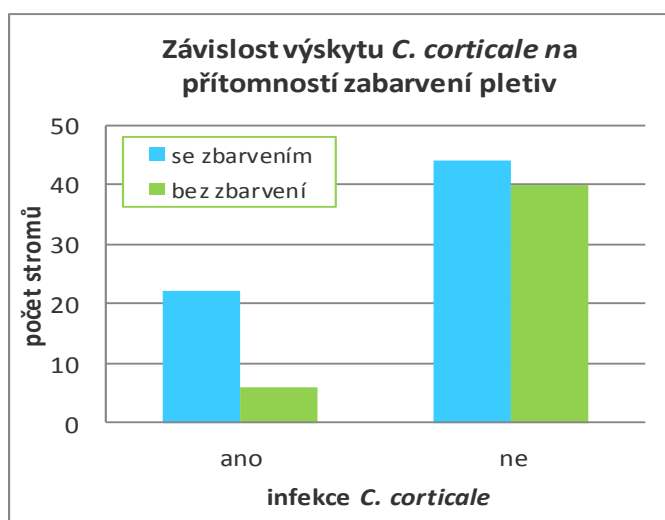
Závislost výskytu *C. corticale* na vnějších faktorech byla rovněž vyjádřena graficky jako rozdíl hodnot mezi infikovanými a neinfikovanými stromy. Signifikance závislosti byla testována chí-kvadrát statistikou (Tab. 8). Závislost tří faktorů korelovaných s výskytem *C. corticale* je znázorněna na Obr. 14 – 15.

Tab. 8: Přehled výsledků chí kvadrát testu nezávislosti pro faktory korelující výskyt *C. corticale*. X² = hodnota testové statistiky chí-kvadrát, Df = počet stupňů volnosti, Signifikance testu = *- p<0,05; ** p<0,01.

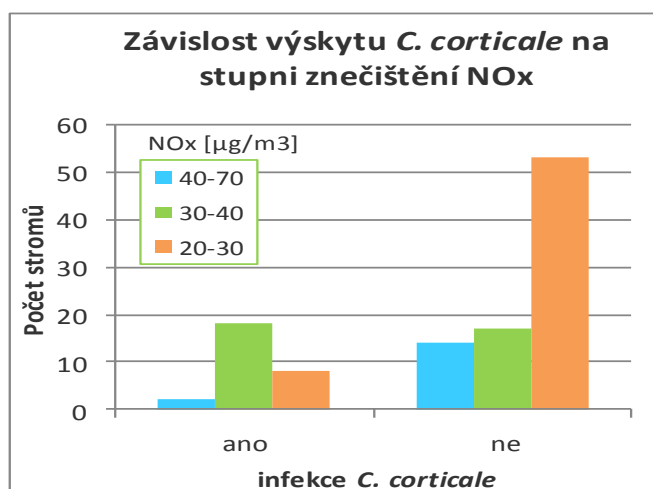
Typ faktoru	X ²	Df	p-hodnota	signifikance testu
Zbarvení pletiv	4.9188	1	0.02657	*
Zapojení v porostu	5.8819	1	0.0153	*
Stupeň znečištění NO _x	18.9671	2	7.609e-05	**



Obr. 13: Rozdíl v míře zapojení stromů v porostu u infikovaných a neinfikovaných stromů.



Obr. 15: Rozdíl v počtu odběrů se zbarvením pletiv u infikovaných a neinfikovaných stromů.



Obr. 14: Rozdíl v průměrné koncentraci oxidů dusíku na lokalitě u infikovaných a neinfikovaných stromů.

5 Diskuze

5.1 Brzká detekce *C. corticale*

Metody brzké detekce patogenů v endofytní fázi životního cyklu jsou ve fytopatologii často s úspěchem používány. Jak izolace patogenů z pletiv na agar, tak specifická detekce založená na PCR jsou považovány za relevantní metody (např. Guglielmo et al., 2007; Luchi et al., 2006; Nicolotti et al., 2009). Poněkud kontroverzní je odebírání pletiv Presslerovým nebozezem. Existuje mnoho prací diskutujících negativní efekt odebírání dřevních vývrtů z kmene na zdravotní stav stromu (Grissino-Mayer, 2003; Wunder et al., 2013). Jak shrnuje Grissino-Mayer (2003), vrtání má různý vliv na různých druzích dřevin a v různém období. Všeobecně jej lépe snášejí jehličnany než listnaté stromy. U listnatých stromů se často v okolí vývrtu objeví zbarvení pletiv. Největším rizikem je infekce dřevokaznými houbami, ke které může dojít kontaminací při samotném odběru či posléze skrz ránu po odběru. Dle nedávné experimentální studie na smrku ztepilém (*Picea abies*) však nebyla míra nákazy dřevokaznými houbami u vrtaných stromů vyšší než u nevrtaných (Wunder et al., 2013). Někteří autoři uvádějí pozitivní redukci poškození při používání voskových zátek (Lenz a Oswald, 1971), celkově ale není pozitivní efekt zátkování signifikantní a v některých případech může být dokonce negativní (Grissino-Mayer, 2003).

Ačkoli jsou potenciální rizika odběrů známá, metoda je stále běžně využívána v dendrochronologii a existuje i řada recentních fytopatologických studií využívajících dřevní vývrty ke studiu endofytních či dřevokazných hub (Arhipova et al., 2012; Nicolotti et al., 2009). Jedná se sice o metodu invazivní, ale stále je to jediný způsob jak získat pletiva z xylému kmene živých stromů. K izolaci *C. corticale* z kmenů javoru klenu tuto metodu úspěšně použil Robeck (2007). Vzhledem k tomu, že k infekci *C. corticale* dochází pravděpodobně ve vyšších částech koruny, odkud se šíří do spodních částí kmene, je logické hledat ji právě v kmeni, kde její přítomnost znamená pokročilou nákazu. Alternativní způsob detekce patogenu v xylému větví je nevhodný, protože není důvod se domnívat, že houba v endofytní fázi kolonizuje všechny větve stromu, a mohlo by tak dojít k falešně negativním výsledkům detekce.

Ke snížení negativního vlivu vrtání Presslerovým nebozezem byly odběry prováděny ve vegetační sezóně, kdy je strom schopen rány rychleji uzavřít (Grissino-Mayer, 2003); pletiva stromu a nebozez byly před odběrem i po odběru sterilizovány 96 % etanolem. Ačkoli Grissino-Mayer (2003) považuje vliv sterilizace na pravděpodobnost vzniku hniloby za nevýznamný, bylo k ní přistoupeno minimálně z důvodu zamezení vzájemné kontaminace mezi odebranými vývrty.

Rány po odběrech nebyly nijak ucpávány. Jak se ukázalo při monitoringu stromů vrtaných na jaře 2013, stromy byly schopné ránu částečně zhojit během jednoho roku (Obr. 16).



Obr. 16: Částečně zhojená rána jeden rok po odběru Presslerovým nebozezem.

Vývrty byly uschovány v papírových sáčcích a během několika hodin zpracovány v laboratoři. Na rozdíl od podobných studií (Arhipova et al., 2012; Oses et al., 2008) vývrty nebyly na místě sterilizovány, případné povrchové kontaminace vývrtů byly odstraněny až sterilizací segmentů před umístěním na agar.

Kultivace hub z dřevních vývrtů získaných ze stojících stromů se ve fytopatologii používá zejména k detekci dřevokazných hub. Dostupné studie se liší zejména v postupu sterilizace vývrtů, oproti kterým byl postup

použitý v této práci (50 s 96% etanol, 50 s 10% SAVO) značně agresivní. Nejčastěji byla použita sterilizace ponořením do 70 % etanolu s následným ožehnutím nad kahanem (Arhipova et al., 2011; Oses et al., 2008; Vasiliauskas a Stenlid 1998). Robeck (2007) dokonce uvedl sterilizaci 96% etanol po dobu jen 10 vteřin. Odlišné techniky vychází především z podstaty studie. Vasiliauskas a Stenlid (1998) a Robeck (2007) kultivovali patogeny ze silně kolonizovaného dřeva, ve kterém převládalo mycelium cílového druhu, tudíž byl vliv kontaminace zanedbatelný. Oses et al. (2008) použili v první fázi kultivace selektivní médium pro Basidiomycota, čímž eliminovali běžné kontaminanty náležící do Ascomycota (jako např. *Penicillium* či *Aspergillus*), nicméně omezili tak i nekontaminující Ascomycota.

Samotná kultivace bývá prováděna na sladínovém agaru (Robeck, 2007; Oses et al., 2008) či Hagemově agaru (Vasiliauskas a Stenlid, 1998; Arhipova et al., 2011) při teplotě od 19°C do 25°C. Vzhledem k růstovým nárokům *C. corticale* v kultuře popsaných v práci Alcock a Wheeler (1983) byla použita metoda kultivace na 2 °SL agaru při pokojové teplotě.

Detekce pomocí specifických primerů je často využívanou metodou, kterou lze aplikovat na směsné vzorky DNA různého původu. V DNA extrahované z xylému jsou specifické primery používány zejména k detekci dřevokazných hub. Jako templát pro PCR se specifickými primery

se používá buď přímo zředěný směsný extrakt DNA z pletiv (Guglielmo et al., 2007) nebo produkt PCR s univerzálními houbovými primery v případě *nested* PCR (Parfit et al., 2010; Zang et al., 2012). Na základě optimalizace PCR byla k detekci *C. corticale* využita *nested* PCR, čímž byly získány informace o tom, zda je v pletivech přítomna DNA sledovaného druhu houby. Alternativně by mohla být použita metoda *real-time* PCR (Higuchi et al., 1993) jež poskytuje informaci i o množství DNA v pletivech. Tato metoda je však náročnější než klasická PCR a na pracovišti Katedry botaniky PřF UK není zavedena. Navíc účelem detekce specifickými primery bylo zaznamenat výskyt aktuálně se šířící nákazy nikoli míru nákazy v jednotlivých vývrtech.

Na základě metod brzké detekce patogenů ze dřeva se podařilo nalézt 28 stromů infikovaných *C. corticale*. Pouze u čtyř z těchto stromů byly pozorovány vnější symptomy patogenního působení *C. corticale* v podobě korových nekrot. Metodou izolace kultivovatelných hub z dřevních vývrstů na agar se podařilo zaznamenat pouze 11 izolátů *C. corticale*, čímž nedosahuje ani poloviční úspěšnosti detekce pomocí specifických primerů. Vyšší účinnost detekce fytopatogenních hub specifickými primery než při využití tradiční izolace na agar je běžná (Luchi et al., 2006; Sikdar et al., 2014). Např. Zang et al. (2012) uvádí v nesymptomatických pletivech jabloní míru detekce patogenu *Valsa mali* var. *mali* 20,6 % metodou izolace oproti 64,7 % dosažených *nested* PCR se specifickými primery.

Všechny izoláty *C. corticale* z vývrstů byly potvrzeny i detekcí pomocí specifických primerů kromě jednoho vývrstu odebraného v Letenských sadech. Z tohoto vývrstu byla *C. corticale* izolovaná pouze z přechodové zóny, zatímco z jádrového dřeva byl získán izolát *Granulobasidium vellerum* a z nezbarveného dřeva z okraje kmene *Peniophora* sp. Tento případ svědčí o tom, že ani detekce specifickými primery není stoprocentně účinná. Nicolotti et al. (2009) uvádí dokonce jen 66% úspěšnost detekce dřevokazných hub z dřevních vývrstů odebraných v okolí plodnic daných patogenů. Ve zbylých vzorcích detekovali autoři jiné patogenní druhy nebo vůbec žádné. Za možnou příčinu navrhli ostrůvkovitou lokalizaci hub ve dřevě způsobující různé složení hub v každém vzorku. Vzhledem k tomu, že v daném vývrstu byla *C. corticale* přítomna spolu s ostatními kolonizátory, mohla být koncentrace její DNA nižší než ostatních hub. Primery pro amplifikaci úseku ITS v první reakci *nested* PCR tak mohly nasednout přednostně na DNA jiné houby. Ve výsledném produktu, navíc pětisetnásobně zředěném, pak byla DNA *C. corticale* v příliš malém množství znemožňujícím efektivní nasednutí specifických primerů. Přítomnost hned tří potenciálně patogenních hub v jednom vývrstu je nezvyklá a v tomto případě byla pravděpodobně způsobena zhoršeným zdravotním stavem hostitele, zejména přítomností dutiny na bázi kmene a v koruně.

5.1.1 Nové lokality

Metodou brzké detekce byla *C. corticale* nalezena na třech nových lokalitách v Praze (Letenské sady, Petřín, Vítkov) oproti výsledkům Koukol et al. (2014). Na lokalitách se známým výskytem SBD byla také houba detekována ovšem ve výrazně nižším počtu než mezi lety 2005 – 2013 (Tab 9). Tento jev je patrně způsoben tím, že jedinci se symptomy SBD již byli odstraněni z porostu a na lokalitě tak zbyli zdraví jedinci a ti, u kterých ještě nedošlo k projevu symptomů SBD. Pro *C. corticale* je takováto fluktuace ve výskytu charakteristická: na jednotlivých lokalitách ve Velké Británii byla často nákaza pozorována ve zvýšené míře pouze po extrémně suchých a horkých létech a v meziobdobí s mírným klimatem se zdála být na ústupu (Gibbs, 1997).

Tab 9: Porovnání nových nálezů *C. corticale* s nálezy mezi lety 2005 - 2013 (Koukol et al. 2014)

Lokality	SBD 2005 - 2013	Jedinci se symptomy	Brzká detekce	<u><i>n</i> infikovaných</u> <u><i>n</i> celkem</u>
	Folimanka	15 - 20	0	2
Letenské sady	-	0	4	0,30
Obora Hvězda	-	0	0	0
Parukářka	2	0	2	0,4
Petřín	0	0	2	0,15
Stromovka	> 20	2	6	0,25
Vítkov	0	2	12	0,70
Celkem	> 37	4	28	0,25

5.1.2 Rizika SBD v Praze

Prozatímní míra výskytu SBD v Praze je nízká v porovnání s ostatními známými lokalitami v Evropě (Gibbs, 1997; Robeck, 2007). Od prvního nálezu v roce 2005, kdy byla vlna onemocnění pravděpodobně způsobena nadprůměrnými teplotami spolu s podprůměrnými srážkami v létě 2003, se vysoké odchylky teplot a úhrnů srážek od dlouhodobého průměru na území Prahy již neopakovaly. V posledních čtyřech letech byl dokonce zaznamenán nadprůměrný úhrn srážek (ČHMÚ). V parku Stromovka mělo zřejmě vliv i oslabení stromů redukcí kořenového systému v důsledku dlouhodobého zaplavení půdy v roce 2002 (Koukol et al., 2014). Při zaplavení je inhibován růst kořenů a kořenový systém je více náchylný ke kořenovým hnilobám. Výsledkem je snížený poměr biomasy kořenů k nadzemním částem stromu, který následně může vést k nižší toleranci sucha (Kozłowski, 1997). Zaplavení se v parku Stromovka znovu opakovalo na přelomu května a června roku 2013, ale zvýšená míra

výskytu SBD na lokalitě zatím nebyla pozorována. Výskyt SBD v roce následujícím po období vyšších srážkových úhrnů byl zaznamenán i v Bulharsku, nicméně příčinou bylo pravděpodobně předešlé období s extrémně nízkými srážkami a nadprůměrně vysokými teplotami (Bencheva, 2014).

Malý počet pozorovaných symptomů SBD v Praze může být způsoben absencí stresových podmínek, které by aktivovaly přechod *C. corticale* do patogenní fáze. Zároveň byla na šesti ze sedmi pozorovaných lokalit detekována přítomnost *C. corticale* v latentní fázi v počtu minimálně dvou výskytů. Tyto infikované stromy mohou sloužit jako dlouhodobý rezervoár onemocnění, který na lokalitě umožní rozšíření infekce v případě oslabení stresovými podmínkami. Podobně Bevercombe a Rayner (1984) pozorovali snížený výskyt symptomů SBD v letech následujících po rozsáhlém odumírání klenů v důsledku SBD v letech 1975 a 1976.

5.1.3 Faktory podmiňující infekci *C. corticale*

5.1.3.1 Proschnutí koruny

Dle Gregory a Waller (1951) je jedním z prvních příznaků patogenního působení *C. corticale* na hostitele prosychání větví. Můžeme však na základě proschnutí koruny předpokládat přítomnost tohoto patogenu? Z výsledků je patrné, že nikoli; mezi infekcí *C. corticale* a proschnutím koruny neexistuje signifikantní závislost. Proschnutí je sice považováno za symptom zhoršeného zdravotního stavu dřevin, ale je vysoce nespecifickým znakem. K prosychání může docházet i přímo v důsledku sucha, nedostatečné výživy, znečištění půdy či redukcí kořenového systému v důsledku napadení hnilobou či odumření kořenů při dlouhodobém zatopení vodou (Kozłowski, 1997). U javoru kleny je známé i prosychání v důsledku silného okusu kůry veverka popelavou (Mountford, 2006). Symptomy prosychání provázejí často onemocnění spojená s tvorbou korových nekróz, které na javoru kleny působí např. *Dichomera saubinetii* (Bevercombe a Rayner 1980), *Nectria coccinea*, *Diplodina acerina* (Gregory, 1982) či *Phytophthora acerina* (Ginetti et al. 2014).

5.1.3.2 Zbarvení pletiv

Dalším symptomem infekce *C. corticale* je přítomnost zbarvení v pletivech. Metodami brzké detekce z pletiv se podařilo prokázat přítomnost houby převážně ve zbarvených pletivech nicméně i v nezbarvených. Tento výsledek souhlasí se studiemi Gibbs (1997) a Robeck (2007) uvádějícími pozitivní izolace *C. corticale* ze zcela nesymptomatických stromů. Nepřítomnost zbarvení u stromů s pozitivní detekcí *C. corticale* lze vysvětlit dvěma způsoby; buď ještě

nedošlo k reakci pletiv na infekci patogenem, nebo se nebozezem podařilo zbarvení minout. Mimo to Gibbs (1997) popisuje dodatečné zbarvení nesymptomatických pletiv infikovaných *C. corticale* až po jejich postupném vyschnutí, které ovšem nebylo v této práci testováno.

Na druhou stranu pozitivní detekce *C. corticale* ze zbarvených pletiv neidentifikuje tuto houbu jako přímého a jediného původce daného zbarvení, jelikož se jednalo o různé typy zbarvení a spolu s *C. corticale* byli izolováni i další potenciální původci těchto zbarvení (viz kapitola 4.1.3).

5.1.3.3 Poškození kůry

Jako častý druh poškození bylo zaznamenáno porušení kůry stromů. Takové poškození zvyšuje pravděpodobnost nákazy patogenem a zároveň lokálně snižuje obranyschopnost pletiv. Zároveň je známá pozitivní korelace poškození kůry s přítomností zbarvení v pletivech (Dănescu et al., 2015), která byla zaznamenána i na sledovaných lokalitách (Tab. 7:). Závislost výskytu *C. corticale* na přítomnosti poškození kůry se však nepodařilo prokázat. Jak uvedli Gregory a Waller (1951) k nákaze *C. corticale* dochází nejspíš ve vyšších částech koruny.

5.1.3.4 Faktory prostředí

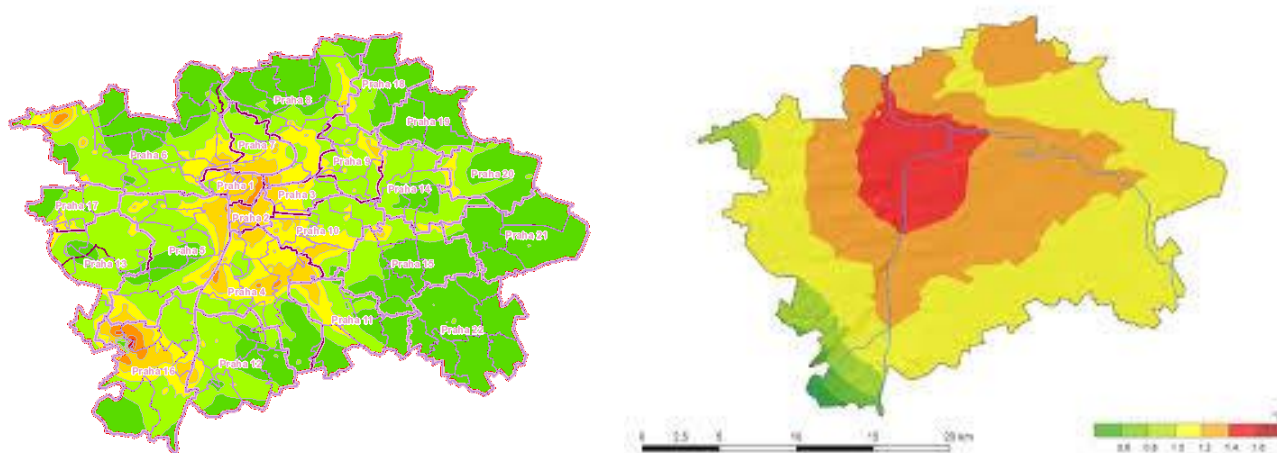
Možné ovlivňující faktory prostředí byly vybrány na základě stanovištních nároků javoru klenu. Záměrně byly vynechány faktory průměrných teplot a úhrnů srážek, které sice ovlivňují výskyt SBD (Gibbs, 1997) ale v rámci vybraných lokalit se významně neliší. V městském prostředí mají větší význam mikroklimatologické jevy, které jsou ovlivněny mírou zástavby, členitostí terénu a imisním znečištěním. Praha patří k městům, u nichž byl pozorován mikroklimatologický jev tepelného ostrova města (*urban heat island*), tedy zvýšení průměrné teploty v centru města oproti okrajovým částem. Tento jev je způsoben zejména městskou zástavbou, která zadržuje teplo a znemožňuje hospodaření s vodou; dále přispívají antropogenní zdroje tepla a imise z automobilové dopravy (Brázdil a Budíková, 1999). Poloha tepelného ostrova v Praze se kryje s oblastí se zvýšenou koncentrací imisí z dopravy (Obr. 17) a dalšími charakteristikami prostředí jako např. celkovou bonitou klimatu. Gregorová (2006) uvádí u javoru klenu zhoršení zdravotního stavu v městském prostředí v souvislosti se zvýšenou koncentrací oxidů dusíku. Rovněž výskyt *C. corticale* byl pozitivně korelovaný s mírou znečištění NO_x. Vzhledem ke zde nastíněné korelaci vlivu imisí a mikroklimatických jevů v Praze je vhodnější pozorovaný trend chápat jako závislost na synergickém efektu městského stresu.

Horší zdravotní stav stromů v městské zeleni je přičítán nestabilitě klimatu, znečištění ovzduší imisemi a prachovými částicemi a zpevnění půdy. Ve městech je typicky zvýšené riziko infekce

houbovými patogeny, které může být způsobeno četnými poraněními vzniklými v důsledku antropogenního působení (Tello, 2000). Korelace mezi výskytem *C. corticale* a přítomností poranění kůry nicméně nebyla signifikantní. Mimo znečištění měla signifikantní, ale velmi slabý vliv pouze míra zapojení v porostu. Jako ohrožené byly vyhodnoceny stromy rostoucí na okraji porostu či soliterně, případně ve stromořadích, tedy opět typ habitatu typický pro městskou zeleň. Za možnou příčinu lze odhadnout větší expozici stromu stresovým faktorům. Javoru klen preferuje spíše polostinná stanoviště, uvolnění z porostu snáší špatně zejména starší jedinci (Gregorová, 2006).

A) Modelová mapa koncentrací oxidů dusíku

B) Model tepelného ostrova Prahy



Obr. 17: A) Modelová mapa průměrných ročních koncentrací oxidů dusíku. Tmavě zelená barva značí nejnižší koncentrace (0 - 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), červená nejvyšší (150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Převzato z www.geoportalpraha.cz. B) Model tepelného ostrova města. Zdroj: www.ekolist.cz

Významným faktorem ovlivňujícím zdravotní stav javoru kleny je dostupnost vody. Javor klen vyžaduje vlhký a propustný substrát, špatně ale snáší stagnující vodu. Mezi sledovanými lokalitami byly dva parky (Stromovka a Folimanka) zaplaveny v roce 2002, což mohlo mít dopad na vlnu SBD v roce 2005 (Koukol et. al., 2014). Zvýšení současného výskytu *C. corticale* na těchto lokalitách nebylo zaznamenáno (zřejmě proto, že stromy poškozené při této povodni byly již z porostu odstraněny). Stromovka byla dále zaplavena na jaře roku 2013 a vzhledem k poloze v aluviálním údolí řeky Vltavy je zde také trvale zvýšená hladina spodní vody, nicméně současný výskyt *C. corticale* zde není vyšší než na ostatních lokalitách. Bencheva (2014) sice uvádí výskyt SBD po roce s extrémně vysokými srážkami, ale ten následoval po třech letech s vysokými teplotami a velmi nízkými úhrny srážek, které pravděpodobně byly příčinou výskytu SBD.

Na základě těchto výsledků lze považovat za více ohrožené javory kleny rostoucí na lokalitách v centru Prahy (např. Riegrovy či Havlíčkovy sady). Nejvíce ohrožené pak budou stromy rostoucí na okraji porostu nebo ve stromořadí. Menší riziko lze předpokládat u stromů rostoucích ve velkých parcích či lesích v okrajových částech města.

Korelace výskytu *C. corticale* se znečištěním ovzduší a malou pokryvností porostu by mohla být jedním z vysvětlení trendu přednostního pozorování výskytu SBD ve městech (Douzon, 2007). Tento trend má na území České republiky již dvě výjimky. První je nález ve Veltruském parku, kde byl nalezen vyvrácený javor mléč se symptomy hniloby způsobené václavkou (*Armillaria*) a rovněž se symptomy SBD v podobě stromat (Karel Černý 2014, pers. comm.). Symptomy SBD byly pozorovány i na několika dalších javorech na lokalitě. Druhým případem je nález výsadby javorů klenů odumřelé v důsledku SBD v remízku nedaleko Šaratic, Slavkov u Brna (Karel Černý 2014, pers. comm.). Tyto dva nálezy jsou od sebe vzdálené 260 km a svědčí o tom, že onemocnění SBD je v České republice zřejmě více rozšířené a doposud bylo přehlíženo. Podobnou situaci popsali Bevercombe a Rayner (1984), kteří na základě genetické variability jednotlivých izolátů zhodnotili pravděpodobnou invazi *C. corticale* dlouho před prvním nálezem v roce 1945. Přehlížení symptomů SBD přisuzovali podobnosti korových nekrot s nánosy sazí, které v té době často způsobovaly zčernání kůry stromů. Houba také může být mimo města rozšířená v endofytní fázi bez vnějších příznaků. Mimopražské nálezy mohou být způsobeny lokálními stresovými podmínkami, které podnítily přechod *C. corticale* do patogenní fáze nebo se zde mohla vyskytnout v roli saprotrofa či sekundárního patogenu na odumřelých stromech. Podobně byl v okolí Londýna pozorován výskyt *C. corticale* pouze na odumřelých či oslabených stromech, zatímco ve městech vykazoval silně patogenní působení i vůči zdravým stromům (Gibbs, 1997).

5.2 Kultivace hub z vývrtů

Metodou kultivace hub z vývrtů na agar bylo získáno 94 izolátů, což činí při celkovém počtu 536 vzorků výtěžnost pouze 17,5 %. Část zbylých vzorků (22 %) byla kontaminována zástupci rodu *Penicillium* či kvasinkami. U 60,5 % vzorků, zejména u těch odebraných v horkých letních měsících, nebyl vůbec žádný myceliální růst zaznamenán. Přesto v porovnání s dalšími studii, které se zabývaly kultivací endofytů ze dřeva, není nízký počet izolátů výjimečný. Dle studie Kowalski a Kehr (1992) je xylém nejméně bohatý na endofyty v porovnání s ostatními částmi dřevin. Xylém javoru kleny zařadili mezi vůbec nejchudší druhy spolu se zástupci *Betula*, *Fraxinus* a *Alnus*. Výnosnost izolátů ze vzorků xylému z bazální části větví javoru kleny

dosahovala jen 8%. Velmi podobnou metodiku kultivace hub z dřevních vývrtů ovšem aplikovanou na detekci endofytů z exotických druhů dřevin (*Prumnopitys andina*, *Podocarpus saligna*, *Drimys winteri*, *Nothofagus obliqua*) použil Oses et al. (2008) s výtěžností pouze 5 %. Oproti tomu Arhipova et al. (2011) uvedli vysoké výnosy kultivací z dřevních vývrtů z olše šedé (*Alnus incana*). Z celkových 658 vývrtů se jim povedlo získat izoláty z 556 (84 %) vývrtů zatímco v této studii byly izoláty získány jen z 50 % vývrtů. Ovšem z hlediska diverzity taxonů bylo u olše šedé získáno jen 0,21 taxonů na vývrt, zatímco u javoru klenu 0,53 taxonů na vývrt, což opět svědčí o relativní chudosti endofytního spektra xylému těchto druhů uváděné v práci Kowalski a Kehr (1992).

Spektrum taxonů izolovaných v této studii bylo velmi rozmanité (50 taxonů z 15 řádů). Pouze šest taxonů bylo izolováno více než 3 ×, dalších 12 taxonů bylo získáno ve dvou izolátech a zbylých 32 taxonů pouze v jednom izolátu. Trendy ve společném výskytu druhů pohromadě či taxony typické pro danou lokalitu nebyly pozorovány. Podobné výsledky uvádí přehledový článek endofytních studií (Sieber, 2007), který popisuje ve složení xyloτροφních endofytů několik častých typických druhů doplněných druhy méně častými. Rozdílné složení endofytů uvádí nejen mezi hostitelskými druhy, ale i mezi jedinci. V rámci jednoho stromu pak závisí složení endofytů i na typu pletiv (listy, kůra, dřevo) a na jejich stáří.

Diverzita a abundance endofytů v xylému je všeobecně nižší než v kůře, výhonech či listech. Jejich životní strategie zahrnuje dlouhé období latence, v kterém houba nevykazuje kolonizaci hostitele. Jejich schopnost růstu je omezena vysokým obsahem vody v pletivech. Pokud obsah vody poklesne, vlivem stresu, poranění či odumření hostitele, odchází k aktivaci kolonizace pletiv. Endofyté v xylému mohou mít životní strategii lignikolních saprotrofů či fakultativních patogenů (Stone et al., 2004).

Celkově u listnatých dřevin včetně javoru klenu převládají endofyté řádu Diaporthales, mezi endofyty v xylému jsou pak nejčastější zástupci řádů Xylariales, Diaporthales, Hypocreales doprovázené několika druhy z pododdělení Agaricomycotina (Sieber, 2007). Izoláty z vývrtů javoru klenu získaných v této studii náležely nejčastěji do řádu Xylariales. Dále byly častí zástupci řádů Pleosporales, Hypocreales a Agaricales (Obr. 11).

Mezi izoláty byly hojně zastoupeny potenciální patogeny (např. *Fusarium* sp., *Hypoxylon* sp., *Diaporthe eres*, *Valsa* sp.), které se běžně vyskytují jako endofyté v pletivech svých hostitelů (Parfitt et al., 2010). Vnější symptomy patogenního působení v podobě plodnic či stromat vyrůstajících na kmenech byly pozorovány mimo *C. corticale* pouze u dvou izolátů *Kretzschmaria deusta* a *Schizophyllum commune*.

Ze všech izolátů bylo 79 % vázáno na zbarvená pletiva. Takto významný rozdíl nebyl v dalších studiích zaznamenán. Například u olše šedé byla abundance a diverzita izolátů získaných ze zbarveného a ze zdravého dřeva velmi podobná (Arhipova et al., 2011). Řada taxonů izolovaných ze zbarvených pletiv je známá i jako původci toho symptomu. Mimo *C. corticale* jsou to např. někteří zástupci rodů *Cadophora*, *Hypoxylon*, *Fusarium*, *Neonectria* či *Aureobasidium* (Cummings a Bergstrom, 2014; Humar a Vek, 2008; Kasson a Livingston, 2009; Shortle a Cowling, 1978). Zejména *Cadophora* sp. a *Cadophora melinii* byly často izolovány z přechodové zóny v pletivech, kde je předpokládán aktivní interakce mezi houbou a hostitelem (Pearce, 2012). V souvislosti se zbarvením pletiv je *Cadophora* známá také například z xylému břízy bělokoré (*Betula pentula*) či olše šedé (Arhipova et al., 2011; Cummings a Bergstrom, 2014). Shortle a Cowling (1978) zaznamenali *Cadophora melinii* a *Phialophora bubakii* ve zbarvených pletivech ambroně (*Liquidambar* sp.) a liliovníku tulipánokvětého (*Liliodendron tulipifera*) – dle jejich závěrů však nemají schopnost zbarvení indukovat, ale jedná se o kolonizátory pletiv zbarvených jinými houbami. Podobnou ekologii popsali i u druhů rodu *Fusarium*, které mohou kolonizovat jak zbarvená tak nezbarvená pletiva. Oproti tomu Kowalski a Materniak (2007) uvedli *Fusarium solani* přímo jako původce zbarvení pletiv javoru klenu. Druhy rodu *Fusarium* jsou také známé jako patogeny či endofyty z různých dřevin (Sieber, 2007). Jejich zastoupení mezi nejčastěji izolovanými druhy z dřevních vývrtů je tedy nepřekvapivé, ale jejich role v případě propuknutí SBD je obtížně hodnotitelná.

Dále byly izolovány taxony známé jako původci hniloby dřeva javoru klenu, například *Merulius tremellosus*, *Chondrostereum purpureum*, *Kretzschmaria deusta* a *Schizophyllum commune* (Pearce, 2000; Reid, 1985; Terho et al., 2007).

Většina hub byla získána v počtu jednoho až dvou izolátů. Mezi těmito vzácnými houbami byly druhy známé jak z javoru klenu (*Prothecium pyriforme*, *Diaporthe eres*) tak z jiných dřevin (*Oxyporus betulinus*) či úplně jiných substrátů včetně člověka (*Pseudallescheria minutispora*) (Gilgado et al., 2005; Voglmayr a Jaklitsch, 2008). Zcela unikátní byl nález nového druhu rodu *Eurotium* (Hubka, nepublikováno) a izolát identický s kmenem *Biatriospora* sp. CCF 437, který byl doposud znám pouze z jednoho izolátu získaného z floému jilmu vazu (*Ulmus laevis*) a série analýz u něj prokázala významné protihoubové aktivity (Stodůlková et al., 2014).

Jak víme z řady endofytních a mykorhizních studií, hodnocení spektra vykultivovaných hub z pletiv je ošemetné, protože je jednak silně ovlivněno metodikou kultivace a za druhé neodpovídá skutečnému složení hub uvnitř živých pletiv (Parfitt et al., 2010; Sieber, 2007). Důvodem je zejména odlišná rychlost kultivace a rozdílná schopnost růstu jednotlivých druhů na

daném mediu. Izolované houby se navíc mohou morfologicky odlišovat od izolátů z jiných substrátů a mnohdy jsou obtížně určitelné i s použitím molekulárních metod. Logickým krokem při studiu složení hub v xylému je využití moderních molekulárních metod založených na technologii masivního paralelního sekvenování.

6 Závěr

- Na základě metod brzké detekce byla potvrzena infekce patogenem *Cryptostroma corticale* u čtvrtiny sledovaných stromů. Kromě čtyř případů se jednalo o infekci v latentní fázi bez vnějších příznaků. Ze sedmi sledovaných lokalit byl patogen nalezen na šesti, mezi nimiž byly i tři lokality s doposud neznámým výskytem tohoto onemocnění. Během studia bylo získáno jedenáct izolátů *C. corticale* v čisté kultuře a osm herbářových položek stromat využitelných pro další studium toho druhu.
- V Praze má patogen aktuálně status rozšířeného patogenu. Přestože výskyt vnějších symptomů onemocnění oproti minulým rokům poklesl, latentní nákaza byla přítomna u čtvrtiny sledovaných stromů a představuje riziko v případě oslabení obranyschopnosti pletiv vlivem stresových faktorů. Současně je v největším ohrožení populace javoru klenu na Vítkově, kde dosahuje podíl napadených dřevin až 70%, a v nedalekém parku Parukářka (40%).
- V prvotní fázi nákazy nelze predikovat přítomnost patogenu ve stromu, a to ani na základě míry proschnutí koruny či přítomnosti potenciálních vstupních bran pro infekci v podobě poranění kůry. Úplně prvním symptomem je zřejmě zbarvení pletiv, které ovšem není dostatečně specifickým znakem pro identifikaci tohoto patogenu. Sledované faktory prostředí mají na infekci stromů *C. corticale* zanedbatelný vliv. Signifikantní korelace byla zaznamenána jen se znečištěním ovzduší oxidy dusíku a uvolněním stromů z porostu.
- Za ohrožené můžeme považovat stromy rostoucí na lokalitách se silným znečištěním imisemi, které v Praze koreluje s mikroklimatickým jevem tepelného ostrova města, tedy oblastí s vyšší průměrnou teplotou vzduchu. Z pražských parků tak přicházejí v úvahu zejména Riegrovy či Havlíčkovy sady. Nejvíce ohrožené pak budou stromy rostoucí na okraji porostu nebo ve stromořadí.
- Navzdory malé výtěžnosti kultivační metody bylo spektrum hub kultivovatelných z pletiv javoru klenu velmi pestré. Většina hub byla vázána na zbarvení v pletivech. Mimo potenciální původce tohoto zbarvení byly přítomné houby známé jako endofyty, saprotrofové i patogeny.

7 Seznam použité literatury

- Abbott, R. J., Bevercombe, G. P. a Rayner, A. D. M. (1977). Sooty bark disease of sycamore and the grey squirrel. *Transactions of the British Mycological Society*, 69, 507–508.
- Alcock, S. a Wheeler, B. (1983). Variability of *Cryptostroma corticale*, the causal fungus of sooty bark disease of sycamore. *Plant Pathology*, 33, 173–176.
- Altschul, S., Gish, W. a Miller, W. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.*, 215, 403–410.
- Arhipova, N., Gaitnieks, T., Donis, J., Stenlid, J. a Vasaitis, R. (2011). Decay, yield loss and associated fungi in stands of grey alder (*Alnus incana*) in Latvia. *Forestry*, 84, 337 – 348.
- Arhipova, N., Gaitnieks, T., Donis, J., Stenlid, J., a Vasaitis, R. (2012). Heart-rot and associated fungi in *Alnus glutinosa* stands in Latvia. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 27, 327–336.
- Bencheva, S. (2014). First report of *Cryptostroma corticale* (Ellis a Everh.) P .H. Greg. a S. Waller on *Acer platanoides* L. in Bulgaria. *Silva Balcanica*, 15, 101–104.
- Bevercombe, G. P. a Rayner, A. D. M. (1980). Diamond-bark diseases of sycamore in Britain. *New Phytologist*, 86, 379–392.
- Bevercombe, G. P. a Rayner, A. D. M. (1984). Population structure of *Cryptostroma corticate*, the causal fungus of sooty bark disease of sycamore. *Plant Pathology*, 33, 211–217.
- Cazaubon, J. L. (2012). Bulletin de santé du végétal. Midi-Pyrénées. *Bulletin de Santé Du Végétal. Midi-Pyrénées*.
- Clausen, C. A. (1997). Immunological detection of wood decay fungi - an overview of techniques developed from 1986 to the present. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39, 133–143.
- Cochard, B., Crovadore, J., Bovigny, P. Y., Chablais, R. a Lefort, F. (2015). First reports of *Cryptostroma corticale* causing sooty bark disease in *Acer* sp. in Canton Geneva, Switzerland. *New Disease Reports*, 31, 8.
- Cummings, J. A. a Bergstrom, G. C. (2014). First report of brown stem rot caused by *Cadophora gregata* in soybean in New York. *Plant Disease*.
- Dănescu, A., Ehring, A., Bauhus, J., Albrecht, A. a Hein, S. (2015). Modelling discoloration and duration of branch occlusion following green pruning in *Acer pseudoplatanus* and *Fraxinus excelsior*. *Forest Ecology and Management*, 335, 87–98.
- Dickenson, S. a Wheeler, B. E. J. (1981). Effects of temperature, and water stress in sycamore, on growth of *Cryptostroma corticale*. *Transactions of the British Mycological Society*, 76, 181–185.

- Douzon, G. (2007). La Suie De L'érable : Un Bon Indicateur D'été Chaud. *Bilan De La Santé Des Forêts En 2006*, 1–2.
- Ellis, J. B. a Everhart, B. M. (1889). New species of hyphomycetous fungi. *Journal of Mycology*, 5, 69.
- EPPO Reporting Service. (2014). First report of *Cryptostroma corticale* in the Netherlands. *EPPO Reporting Service* (Vol. 7).
- Gibbs, J. N. (1997). Fifty Years of Sooty Bark Disease. *Quarterly Journal Of Forestry*, 91(3), 215–221.
- Gilgado, F., Cano, J., Gené, J., Guarro, J. a Gene, J. (2005). Molecular Phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex : proposal of two new species molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex : proposal of two new species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10.
- Ginetti, B., Moricca, S., Ragazzi, A. a Jung, T. (2014). *Phytophthora acerina* sp. nov., a new species causing bleeding cankers and dieback of *Acer pseudoplatanus* trees in planted forests in northern Italy. *Plant Pathology*, 64, 858–876.
- Gregorová, B., Černý, K., Holub, V., Strnadová, V., Rom, J. Šumpich, J. a Kloudová, K. (2006). Poškození dřevin a jeho příčiny. Prague: AOPK ČR, VÚKOZ.
- Gregory, P. H. a Waller, S. (1951). *Cryptostroma corticale* and Sooty bark disease of sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Transactions of the British Mycological Society*, 34, 579–597.
- Gregory, S. (1982). Bark necrosis of *Acer pseudoplatanus* L. in northern Britain. *European Journal of Forest Pathology*, 12, 157–167.
- Grissino-Mayer, H. D. (2003). A manual and tutorial for the proper use of an increment borer. *Tree-Ring Research*, 59(2), 63–79.
- Guglielmo, F., Bergemann, S. E., Gonthier, P., Nicolotti, G. a Garbelotto, M. (2007). A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1490–1507.
- Hein, S., Collet, C., Ammer, C., Goff, N. L., Skovsgaard, J. P. a Savill, P. (2008). A review of growth and stand dynamics of *Acer pseudoplatanus* L. in Europe: implications for silviculture. *Forestry*, 82, 361–385.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. a Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* (Nature Publishing Company).
- Humar, M. a Vek, V. (2008). Properties of blue-stained wood. *Chemical Analysis*, 59, 75–79.
- Jones, A. R. (1993). Sycamore: an underrated pabulum for insects and some beetles associated with it. *The Entomologist's Record and Journal of Variation*.

- Kadunc, A. (2007). Factors influencing the formation of heartwood discolouration in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *European Journal of Forest Research*, 126, 349–358.
- Kasson, M. T. a Livingston, W. H. (2009). Spatial distribution of *Neonectria* species associated with beech bark disease in northern Maine. *Mycologia*, 101, 190–195.
- Kolařík, J. (2006). Přehled přístrojových metod pro hodnocení stromů. *Trendy ve Veřejné Zeleni. Zahradnické Fakulta MZLU, Lednice 19. - 20. 9. 2006.*
- Koukol, O., Kelnarová, I. a Černý, K. (2014). Recent observations of sooty bark disease of sycamore maple in Prague (Czech Republic) and the phylogenetic placement of *Cryptostroma corticale*. *Forest Pathology*, 45, 21–27.
- Kowalski, T. a Materniak, P. (2007). Disease symptoms and their frequency of occurrence in sycamores (*Acer pseudoplatanus* L.) in the Rymanów Forest Unit stands. *Acta Agrobotanica*, 60, 123–133.
- Kozłowski, T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, 1, 1–29.
- Langer, G., Bressemer, U. a Ferner, S. W. (2013). Vermehrt pilzkrankheiten an bergahorn in Nordwestdeutschland, 22–26.
- Larsson, B., Bengtsson, B. a Gustafsson, M. (2004). Nondestructive detection of decay in living trees. *Tree Physiology*, 24, 853–858.
- Lenz, O. a Oswald, K. (1971). Über Schäden durch Bohrspantnahme an Fichte, Tanne und Buche. *Schweizerische Anstalt für d. Forstl. Versuchswesen*, 29.
- Lonsdale, D. a Gibbs, J. (1996). Effects of climate change on fungal diseases of trees. *British Mycological Society Symposium Series*, 20, 1–19.
- Luchi, N., Capretti, P., Vettraino, M., Vannini, Pinzani, P. a Pazzagli, M. (2006). Early detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless European beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 33–8.
- Meier, F., Engesser, R., Forster, B., Odermatt, O. a Angst, A. (2008). Protection des forêts – Vue d'ensemble 2007.
- Metzler, B. (2006). *Cryptostroma corticale* an Bergahorn nach dem Trockenjahr 2003. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft., Berl.-Dahl.*, 400, 161–162.
- Mountford, E. P. (2006). Long-term patterns and impacts of grey squirrel debarking in Lady Park Wood young-growth stands (UK). *Forest Ecology and Management*, 232, 100–113.
- Narayanasamy, P. (2011). Detection of fungal pathogens in plants. *Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis*, 1, 5–199.

- Nicolotti, G., Gonthier, P., Guglielmo, F. a Garbelotto, M. (2009). A biomolecular method for the detection of wood decay fungi: A focus on tree stability assessment. *Arboriculture and Urban Forestry*, 35, 14–19.
- Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A. a Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. *Plant Pathology*, 151202.
- O'Donnell, K. a Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7, 103–116.
- Oses, R., Valenzuela, S. a Freer, J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, 33, 77–86.
- Parfitt, D., Hunt, J., Dockrell, D., Rogers, H. J., a Boddy, L. (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. *Fungal Ecology*, 3(4), 338–346.
- Pearce, B. (2012). Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist*, 132, 203–233.
- Pearce, R. B. (2000). Decay development and its restriction in trees. *Journal Of Arboriculture*, 26(1), 1–11.
- Pearce, R. B., Fisher, B. J., Carpenter, T. a Hall, L. D. (1997). Water distribution in fungal lesions in the wood of sycamore, *Acer pseudoplatanus*, determined gravimetrically and using nuclear magnetic resonance imaging. *New Phytologist*, 135, 675–688.
- Reid, I. D. (1985). Biological delignification of aspen wood by solid-state fermentation with the white-rot fungus *Merulius tremellosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 133–139.
- Robeck, P. (2007). Die Russrindenkrankheit (*Cryptostroma corticale*) des Ahorns in Deutschland. Berlin: Grin Verlag, 29.
- Shortle, W. C. a Cowling, E. B. (1978). Interaction of live sapwood and fungi commonly found in discolored and decayed wood. *Phytopathology*, 68, 617.
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21, 75–89.
- Sikdar, P., Okubara, P., Mazzola, M. a Xiao, C. L. (2014). Development of PCR assays for diagnosis and detection of the pathogens *phacidiopycnis washingtonensis* and *sphaeropsis pyriputrescens* in apple fruit. *Plant Disease*, 98, 241–246.
- Stodůlková, E., Man, P., Kuzma, M., Černý, J., Císařová, I., Kubátová, A., Chudíčková, M., Kolařík a M., Flieger, M. (2014). A highly diverse spectrum of naphthoquinone derivatives produced by the endophytic fungus *Biatriospora* sp. CCF 4378. *Folia Microbiologica*, 60, 259–267.

- Terho, M., Hantula, J. a Hallaksela, M. (2007). Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in the Helsinki City. *Forest Pathology*, 37, 420–432.
- Tewksbury, D., Wenzel, F. J., a Emanuel, D. (1968). An immunological study of maple bark disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 3, 857–863.
- Cech, T. L. (2004). Bemerkenswerte Krankheiten in 2004. *Forstschutz Aktuell*, 32, 31–34.
- Uhlířová, H. a Kapitola, P. (2004). *Poškození lesních dřevin*. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce.
- Vasiliauskas, R. a Stenlid, J. (1998). Discoloration following bark stripping wounds on *Fraxinus excelsior*. *European Journal of Forest Pathology*, 28, 383–390.
- Vitale, S. a Santori, A. (2011). Morphological and molecular analysis of *Fusarium lateritium*, the cause of gray necrosis of hazelnut fruit in Italy. *Mycology*, 101, 679–686.
- Voglmayr, H. a Jaklitsch, W. M. (2008). *Prostheciium* species with *Stegonsporium* anamorphs on *Acer*. *Mycological Research*, 112, 885–905.
- Wilkins, V. E. (1952). *Report of the technical working party*. European Plant Protection Organization. Paris.
- White, T. J., Bruns, S., Lee, S. a Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Ed. by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. San Diego, CA: Academic Press, 315–322
- Wunder, J., Manusch, C., Queloz, V., Brang, P., Ringwald, V. a Bugmann, H. (2013). Does increment coring enhance tree decay? New insights from tomography assessments. *Canadian Journal of Forest Research*, 43, 711–718.
- Young, C. W. T. (1978). *Sooty Bark Disease of Sycamore*. London: H.M. Stationery Office.
- Zang, R., Key, S., Stress, C., Areas, A., Protection, P., a Yin, Z. (2012). A nested pcr assay for detecting *Valsa mali* var. *mali* in different tissues of apple trees. *Plant Disease*, 96, 1645–1652.

Internetové zdroje

- Index Fungorum*. [cit. 13. 4. 2015]. Dostupné z <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- GenBank*. [cit. 13. 4. 2015]. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Geoportál hl. m. Prahy* Imisní mapy. [cit. 20. 3. 2015]. Dostupné z <http://mpp.praha.eu/app/map/atlas-zivotniho-prostredi/cs/imisni-mapy>

ČHMÚ, *Mapy charakteristik klimatu*, [cit. 20. 3. 2015], Dostupné z http://www.chmi.cz/portal/dt?menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/P4_1_Pocasi/P4_1_3_Mapy_char_klim

USDA Fungal Database [cit. 13. 4. 2015]. Dostupné z <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam taxonů izolovaných z dřevních vývrtů.

název	číslo	segment	datum	lokality	zbarvení	řád
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	26	BC	19. 11. 2013	Stromovka	ano	<i>Hypocreales</i>
	28	A	19. 11. 2013	Stromovka	ne	
<i>Apiospora montagnei</i>	129	A	13. 11. 2014	Parukářka	ano	<i>Apiosporales</i>
		D	13. 11. 2014	Parukářka	ano	
<i>Arthrinium sacchari</i>	35	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	<i>Apiosporales</i>
<i>Aspergillus</i>	103	D	10. 8. 2014	Petřín	ne	<i>Eurotiales</i>
	29	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	
<i>Aureobasidium truncatum</i>	2	A	3. 6. 2013	Stromovka	ne	<i>Dothideales</i>
<i>Biatriospora</i> sp.	92	A	29. 9. 2014	Petřín	ano	<i>Pleosporales</i>
		D	29. 9. 2014	Petřín	ano	
<i>Cadophora melinii</i>	105	BC	16. 10. 2014	Folimanka	ano	<i>Helotiales</i>
	114	BC	26. 10. 2014	Petřín	ano	
<i>Cadophora</i> sp.	77	A	3. 6. 2014	Stromovka	ano	<i>Helotiales</i>
		D	3. 6. 2014	Stromovka	ano	
	92	BC	29. 9. 2014	Petřín	ano	
	116	BC	26. 10. 2014	Petřín	ano	
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	28	A	19. 11. 2013	Stromovka	ne	<i>Capnodiales</i>
	31	A	19. 11. 2013	Stromovka	ne	
<i>Clonostachys rosea</i>	36	A	18. 2. 2014	Stromovka	ne	<i>Hypocreales</i>
<i>Coniothyrium palmicola</i>	124	D	11. 7. 2014	Folimanka	ne	<i>Pleosporales</i>
<i>Corynespora</i>	31	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	<i>Pleosporales</i>
	117	BC	26. 10. 2014	Petřín	ano	
<i>Cryptostroma corticale</i>	54	A	16. 4. 2014	Vítkov	ano	<i>Xylariales</i>
	55	A	16. 4. 2014	Vítkov	ano	
	56	A	16. 4. 2014	Vítkov	ano	
	57	D	16. 4. 2014	Vítkov	ano	
	58	A	16. 4. 2014	Vítkov	ano	
		BC	16. 4. 2014	Vítkov	ano	
	60	A	30. 4. 2014	Vítkov	ano	
	62	D	30. 4. 2014	Vítkov	ano	
	68	D	5. 5. 2014	Letná	ano	
	74	BC	28. 5. 2014	Letná	ano	
	78	BC	3. 6. 2014	Stromovka	ano	
	102	BC	10. 8. 2014	Petřín	ano	
	<i>Diaporthe eres</i>	66	BC	5. 5. 2014	Letná	ano
119		A	28. 10. 2014	Folimanka	ano	
<i>Fusarium</i> sp.	2	A	6. 3. 2013	Stromovka	ano	<i>Hypocreales</i>

název	číslo	segment	datum	lokality	zbarvení	řád
<i>Fusarium</i> sp.	6	BC	6. 3. 2013	Stromovka	ano	
	26	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	
	40	D	27. 2. 2014	Stromovka	ano	
	47	A	1. 4. 2014	Vítkov	ano	
<i>Geniculosporium</i> sp.	128	BC	19. 11. 2013	Parukářka	ano	Xylariales
<i>Humicola</i> sp.	6	A	6. 3. 2013	Stromovka	ano	Sordariales
<i>Hypoxylon howeanum</i>	120	A	28. 10. 2014	Folimanka	ano	Xylariales
<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	102	A	10. 8. 2014	Petřín	ano	Xylariales
<i>Hypoxylon</i> sp.	83	A	26. 10. 2014	Hvězda	ne	Xylariales
<i>Chaetomium funicola</i>	47	D	1. 4. 2014	Vítkov	ano	Sordariales
<i>Kretzschmaria deusta</i>	39	A	27. 2. 2014	Stromovka	ano	Xylariales
	49	A	1. 4. 2014	Vítkov	ano	
<i>Neonectria ramulariae</i>	2	BC	6. 3. 2013	Stromovka	ano	Hypocreales
<i>Penicillium brevicompactum</i>	40	D	27. 2. 2014	Stromovka	ano	Eurotiales
<i>Penicillium chrysogenum</i>	26	BC	19. 11. 2013	Stromovka	ne	Eurotiales
<i>Penicillium pancosmium</i>	28	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	Eurotiales
	31	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	
	34	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	
<i>Phaeoisaria sparsa</i>	121	D	28. 10. 2014	Folimanka	ano	incertae sedis
<i>Phialemonium</i> sp.	71	D	28. 5. 2014	Letná	ne	Sordariales
	100	D	10. 8. 2014	Petřín	ano	
<i>Phoma</i> sp.	26	BC	19. 11. 2013	Stromovka	ne	Pleosporales
<i>Pleosporales</i> sp.	36	D	28. 2. 2014	Stromovka	ne	Pleosporales
	88	A	9. 7. 2014	Hvězda	ano	
	104	A	10. 8. 2014	Petřín	ano	
		D	10. 8. 2014	Petřín	ano	
	116	D	26. 10. 2014	Petřín	ano	
	126	BC	11. 7. 2014	Folimanka	ano	
		D	11. 7. 2014	Folimanka	ano	
<i>Prosthecium pyriforme</i>	4	BC	6. 3. 2013	Stromovka	ano	Diaporthales
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	122	A	11. 7. 2014	Folimanka	ano	Microascales
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	131	D	13. 11. 2014	Parukářka	ne	Pleosporales
<i>Trichoderma</i> sp.	4	D	6. 3. 2013	Stromovka	ano	Hypocreales
<i>Valsa</i> sp.	75	BC	28. 5. 2014	Letná	ano	Diaporthales
<i>Xylaria hypoxylon</i>	120	D	28. 10. 2014	Folimanka	ano	Xylariales
<i>Bjerkandera adusta</i>	48	D	6. 3. 2014	Vítkov	ano	Polyporales
<i>Coprinellus</i> sp.	26	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	Agaricales
<i>Coprinopsis radiata</i>	113	BC	27. 10. 2014	Petřín	ano	Agaricales
<i>Flammulina velutipes</i>	116	A	27. 10. 2014	Petřín	ano	Agaricales
<i>Granulobasidium vellereum</i>	74	A	28. 5. 2014	Letná	ano	Agaricales

název	číslo	segment	datum	lokalita	zbarvení	řád
<i>Granulobasidium vellereum</i>	74	BC	1. 4. 2014	Vítkov	ano	
<i>Merulius tremellosus</i>	131	D	19. 11. 2013	Stromovka	ne	<i>Polyporales</i>
<i>Oxyporus betulinus</i>	40	BC	27. 2. 2014	Stromovka	ano	<i>Hymenochaetales</i>
<i>Pachylepyrium carbonicola</i>	118	A	28. 10. 2014	Folimanka	ano	<i>Agaricales</i>
<i>Peniophora</i> sp.	74	D	28. 5. 2014	Letná	ano	<i>Russiales</i>
<i>Schizophyllum commune</i>	40	A	27. 2. 2014	Stromovka	ano	<i>Agaricales</i>
		BC	27. 2. 2014	Stromovka	ano	
		D	27. 2. 2014	Stromovka	ano	
	45	A	6. 3. 2014	Vítkov	ano	

Příloha 2: Charakteristiky jednotlivých odběrů

Lokalita	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Stromovka	5	1	1	1	0	1	1	1	1	148	70	0	25
Stromovka	26	0	1	1	0	0	1	0	0	114	35	0	25
Stromovka	27	0	0	1	0	0	1	0	0	72	15	1	25
Stromovka	28	1	0	1	0	0	1	1	0	135	5	0	25
Stromovka	29	0	1	1	0	0	1	1	0	113	45	0	25
Stromovka	30	0	1	1	0	0	1	0	0	215	40	0	25
Stromovka	31	0	0	1	0	0	0	0	0	145	40	0	25
Stromovka	32	0	1	1	0	0	0	0	1	27	5	0	25
Stromovka	33	1	0	1	1	0	0	0	0	155	20	0	25
Stromovka	34	0	1	1	1	0	0	1	0	180	10	0	25
Stromovka	35	0	0	1	1	0	0	1	0	119	10	0	25
Stromovka	36	0	0	1	0	0	1	0	0	215	20	0	25
Stromovka	37	0	0	1	0	1	1	1	0	135	45	0	25
Stromovka	38	0	1	1	0	0	1	1	1	121	25	0	25
Stromovka	39	1	0	1	0	0	0	1	1	146	45	0	25
Stromovka	40	0	0	0	0	1	0	0	1	200	45	1	25
Stromovka	41	0	0	1	0	1	0	0	1	152	20	0	25

lokality	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Stromovka	42	0	0	1	1	1	1	1	1	115	20	0	25
Vítkov	43	0	1	0	0	0	0	0	0	89	20	0	50
Vítkov	44	0	1	0	0	1	1	0	1	90	45	0	50
Vítkov	45	0	1	0	0	1	0	1	1	112	10	0	50
Vítkov	46	0	1	0	0	0	0	0	1	137	10	0	50
Vítkov	47	1	0	0	1	0	1	0	1	65	95	0	50
Vítkov	48	1	1	0	1	0	1	0	1	161	45	0	50
Vítkov	49	1	1	0	1	1	1	0	1	55	30	0	50
Stromovka	50	0	1	1	0	0	1	0	1	84	40	0	25
Stromovka	51	0	0	1	0	1	0	0	1	111	10	0	25
Stromovka	52	0	0	1	0	0	1	0	1	105	10	0	25
Stromovka	53	0	1	1	0	0	0	1	1	131	30	0	25
Vítkov	54	0	1	0	0	0	0	1	1	75	40	0	50
Vítkov	55	1	1	0	1	0	1	0	1	73	20	0	50
Vítkov	56	1	1	0	1	0	0	1	1	117	10	0	50
Vítkov	57	1	1	0	0	0	0	1	1	112	70	0	50
Vítkov	58	1	1	0	1	0	0	0	1	70	40	0	50
Vítkov	59	1	1	0	1	1	0	1	0	54	10	0	50

lokality	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Vítkov	60	1	1	0	0	0	0	0	1	108	10	0	50
Vítkov	61	1	0	0	1	0	0	0	0	80	40	0	50
Vítkov	62	1	1	0	1	1	1	0	1	110	30	0	50
Vítkov	63	1	1	0	1	0	0	0	1	68	20	0	50
Letná	64	0	1	0	1	1	0	1	1	111	40	0	35
Letná	65	1	0	0	0	1	1	1	0	175	10	0	35
Letná	66	0	0	0	0	0	0	0	1	101	10	0	35
Letná	67	0	0	0	0	1	0	0	0	210	40	0	35
Letná	68	1	1	0	0	1	1	0	1	110	40	0	35
Letná	69	0	1	0	0	1	1	0	1	93	20	0	35
Letná	70	0	0	0	1	0	0	0	0	169	10	0	35
Letná	71	0	0	0	0	0	0	0	0	215	10	0	35
Letná	72	0	0	0	0	0	0	1	1	167	30	0	35
Letná	73	0	0	0	0	1	0	0	1	75	10	0	35
Letná	74	1	1	0	1	1	1	0	1	141	30	0	35
Letná	75	0	1	0	0	1	0	1	1	105	10	0	35
Letná	76	1	0	0	0	1	0	0	1	135	15	0	25

lokality	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Stromovka	77	1	1	1	0	1	0	1	1	142	25	0	25
Stromovka	78	1	0	1	1	1	0	0	1	118	15	0	25
Stromovka	79	0	1	1	1	0	0	0	0	110	10	0	25
Stromovka	80	0	1	1	0	1	0	1	1	192	10	0	25
Hvězda	81	0	0	0	0	1	1	1	1	86	30	0	25
Hvězda	82	0	1	0	0	1	1	1	0	151	10	0	25
Hvězda	83	0	1	0	0	1	1	1	0	119	55	0	25
Hvězda	84	0	1	0	0	0	1	1	0	112	30	0	25
Hvězda	85	0	0	0	0	1	0	1	0	100	45	0	25
Hvězda	86	0	0	0	0	0	0	1	0	162	5	0	25
Hvězda	87	0	1	0	0	0	0	1	0	81	20	0	25
Hvězda	88	0	0	0	0	1	1	1	1	81	45	0	25
Hvězda	89	0	1	0	0	0	0	1	1	74	10	0	25
Hvězda	90	x	0	0	0	0	1	1	1	80	10	0	25
Hvězda	91	0	0	0	0	1	0	1	1	130	20	0	25
Petřín	92	1	1	0	0	1	1	0	1	177	10	0	25
Petřín	93	0	0	0	0	1	1	0	0	241	30	0	25

lokality	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Petřín	94	0	1	0	1	1	1	1	1	111	45	0	25
Petřín	95	0	0	0	1	1	0	1	1	113	15	0	25
Petřín	96	0	1	0	1	1	1	1	1	116	20	0	25
Petřín	97	0	0	0	0	1	0	1	0	145	15	0	25
Petřín	98	0	1	0	0	1	0	1	0	91	40	0	25
Petřín	99	0	1	0	1	0	0	1	1	112	15	0	25
Petřín	100	0	0	0	1	0	0	1	1	245	10	0	25
Petřín	101	0	0	0	1	1	0	1	0	95	10	0	25
Petřín	102	1	1	0	1	1	1	1	1	165	55	0	25
Petřín	103	0	0	0	1	1	1	1	0	131	40	0	25
Petřín	104	0	0	0	1	1	1	1	1	120	20	0	25
Folimanka	105	0	1	1	0	0	0	1	1	141	20	0	35
Folimanka	106	0	0	1	0	0	0	0	0	91	15	0	35
Folimanka	107	0	1	1	0	0	1	0	1	87	55	0	35
Folimanka	108	0	0	1	1	1	1	1	1	136	15	0	35
Folimanka	109	0	1	1	1	0	0	1	0	133	10	0	35
Folimanka	110	1	1	1	1	1	1	1	1	98	40	0	35

lokality	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Folimanka	111	0	0	1	1	0	1	1	0	127	15	0	35
Petřín	112	0	0	0	1	1	0	1	0	182	15	0	35
Petřín	113	0	0	0	0	0	1	0	1	156	30	1	35
Petřín	114	x	1	0	1	1	0	1	1	92	45	1	25
Petřín	115	x	0	0	1	0	1	1	0	128	30	1	25
Petřín	116	0	1	0	1	1	1	1	1	125	20	0	25
Petřín	117	0	0	0	1	1	1	1	1		50	0	25
Folimanka	118	0	1	0	1	0	1	0	1	153	40	0	35
Folimanka	119	x	1	0	1	1	1	1	1	75	15	0	35
Folimanka	120	0	1	1	1	0	0	0	0	123	30	0	35
Folimanka	121	0	1	1	1	0	0	1	1	71	15	0	35
Folimanka	122	1	0	1	0	0	1	0	1	123	60	0	35
Folimanka	123	0	1	1	1	1	1	1	0	92	20	0	35
Folimanka	124	0	0	1	1	1	1	1	0	153	45	0	35
Folimanka	125	0	1	1	1	1	1	1	0	157	20	0	35
Folimanka	126	0	1	1	1	0	1	1	1	85	25	0	35
Parukářka	127	0	0	1	1	1	0	1	0	88	15	0	35

lokality	číslo vývrtu	detekovaná Cryptostroma	poškození borky	zaplaveno 2012	svah	nepravidelnost koruny	prořez v koruně	uvolnění z porostu	zbarvení pletiv	obvod kmene	proschnutí (%)	zpevnění půdy	NOx
Parukářka	128	0	1	1	0	0	1	1	1	120	30	0	35
Parukářka	129	1	1	1	0	1	1	0	1	96	20	0	35
Parukářka	130	1	0	1	0	0	0	0	0	117	10	0	35
Parukářka	131	0	1	0	1	0	0	0	0	81	25	0	35
Hvězda	132	0	0	0	0	1	0	1	0	113	20	0	25
Hvězda	133	0	0	0	0	1	0	1	0	211	15	0	25
Hvězda	134	0	0	0	0	1	1	0	1	115	15	1	25
Hvězda	135	0	0	0	0	1	0	0	0	165	15	0	25
Hvězda	136	0	0	0	0	1	0	1	0	126	30	0	25