

Mendelova univerzita v Brně

Lesnická a dřevařská fakulta  
Ústav ochrany lesů a myslivosti



Lesnická  
a dřevařská  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



Detekce výskytu *Hymenoscyphus fraxineus* pomocí  
lapačů spor a molekulárně biologických metod  
v Hackerově školce

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci - Detekce výskytu *Hymenoscyphus fraxineus* pomocí lapačů spor a molekulárně biologických metod v Hackerově školce - vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona. 111/1998 Sb. O vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně, dne: 2. 5. 2016

.....

podpis

## **Poděkování**

Mé poděkování patří mému vedoucímu Ing. Miloňovi Dvořákovi Ph.D., který odborně vedl moji práci, zahrnoval mě literaturou, cennými radami a trpělivým přístupem.

Dále bych chtěla poděkovat budoucímu manželovi Tomáši Zbořilovi, jež mi aktivně pomáhal s výzkumem, zpracováním, korekcí textu a byl mi oporou při dokončování práce.

Práce byla podpořena z projektu QJ1220218 Vývoj efektivních opatření eliminujících dopad invaze *Chalara fraxinea* v lesním školkařství a v navazujících aspektech lesního a vodního hospodářství.

Jana Hrnčířiková

Detekce výskytu *Hymenoscyphus fraxineus* pomocí lapačů spor a molekulárně biologických metod v Hackerově školce.

Detecting the occurrence of *Hymenoscyphus fraxineus* using spore traps and molecular biological methods in Hacker's tree nursery.

**Abstrakt:**

Bakalářská práce se zabývá patogenní houbou *Hymenoscyphus fraxineus*, způsobující onemocnění zvané nekróza jasanů, které v České republice od roku 2004 způsobuje velké problémy v porostech, u jedinců rostoucích v městském prostředí i ve volné krajině. Vlastní výzkum probíhal v lokalitě Hackerovy školky ve smíšeném porostu s podílem napadených jasanů. Lapač byl umístěn u jedince *Fraxinus excelsior*. K zachycení spor byl použit volumetrický lapač. Lapání probíhalo od 25. 4. 2015 do 15. 11. 2015. K následné kvantifikaci množství spor bylo využito molekulárně biologických metod. Výzkum byl zaměřen na hledání souvislostí mezi vývojem počasí zahrnujícím teplotu, vlhkost vzduchu a ovlhčení listů a výskytem spor v průběhu sezóny.

**Klíčová slova:** nekróza jasanů, objemový lapač spor, lapání spor, detekce spor, extrakce DNA, qPCR.

**Abstract:**

Bachelor thesis deals with the pathogenic fungus *Hymenoscyphus fraxineus*, casual agent of a disease called ash dieback, which is causing major problems in stands in Czech Republic on trees growing in urban environment and in open landscape since 2004. Research in this thesis was performed in Hacker's tree nursery in mixed stand with infected ash trees. The spore trap was under an individual *Fraxinus excelsior*. The volumetric spore trap was used to catch the spores. Trapping took place from April 25. to November 15. 2015. Molecular biological methods were used to the subsequent quantification of the amount of spores. The research was focused on finding connections between the weather variables i.e. air temperature, air humidity and leaf moisture and the occurrence of spores during the season.

**Keywords:** Ash dieback, volumetric spore trap, spore trap, spore detection, DNA extraction, qPCR.

## **Obsah práce:**

<b>1. Úvod</b>	<b>01</b>
<b>2. Cíl práce</b>	<b>02</b>
<b>3. Literární přehled</b>	<b>03</b>
3. 1. Rod Fraxinus .....	03
3. 1. 1. Fraxinus excelsior .....	03
3. 1. 2. Fraxinus excelsior, vybrané kultivary .....	04
3. 1. 3. Fraxinus angustifolia.....	05
3. 1. 4. Fraxinus angustifolia, vybrané kultivary .....	06
3. 1. 5. Další druhy rodu Fraxinus .....	07
3. 2. Aerobiologie a její historie .....	08
3. 3. Sledování a kvantifikace výskytu mikroorganismů ve vzduchu .....	09
3. 3. 1. Typy lapačů .....	09
3. 3. 1. 1. Pasivní lapače .....	09
3. 3. 1. 2. Aktivní lapače .....	09
3. 3. 1. 2. 1. Podložní sklíčka a válcové tyče .....	10
3. 3. 1. 2. 2. Volumetrické lapače spor .....	10
3. 3. 1. 2. 3. Štěrbínové lapače spor .....	11
3. 3. 1. 2. 4. Nárazové lapače spor .....	11
3. 3. 1. 2. 5. Vířivé lapače spor .....	11
3. 3. 1. 2. 6. Silnoproudé lapače spor .....	12
3. 3. 1. 2. 7. Muslinovy tkaninové lapače spor .....	12
3. 4. Vývoj a taxonomie .....	12
3. 5. Šíření nekrózy jasanů .....	14
3. 6. Výskyt nekrózy jasanů v ČR .....	15
3. 7. Symptomy infekce .....	15
3. 8. Životní cyklus a šíření infekce .....	16

3. 9. Obrana .....	19
<b>4. Metodika</b>	<b>20</b>
4. 1. Stanoviště .....	20
4. 1. 1. Geomorfologie území .....	21
4. 1. 2. Klimatické podmínky .....	22
4. 1. 3. Historické souvislosti .....	22
4. 2. Lapání spor .....	23
4. 3. Sběr klimatických dat .....	24
4. 4. Práce v laboratoři .....	24
4. 4. 1. Příprava vzorku .....	24
4. 4. 2. Extrakce DNA .....	24
4. 4. 5. Kvantifikace DNA .....	25
4. 5. Statistická analýza .....	26
<b>5. Výsledky</b>	<b>27</b>
5. 1. Detekce <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	27
5. 2. Období sporulace .....	28
5. 3. Pauzy v období sporulace .....	28
5. 4. Sporulace podmíněná teplotou .....	28
5. 5. Zpoždění výskytu spor .....	28
<b>6. Diskuse</b>	<b>29</b>
6. 1. Období sporulace .....	29
6. 2. Pauzy v období sporulace .....	30
6. 3. Sporulace podmíněná teplotou .....	30
6. 4. Zpoždění výskytu spor .....	30
<b>7. Závěr</b>	<b>31</b>
<b>8. Summary</b>	<b>33</b>
<b>9. Seznam použité literatury</b>	<b>35</b>
<b>10. Přílohy</b>	<b>41</b>

Příloha č. 1: Protokol výrobce .....	41
Příloha č. 2: Tabulky výsledků .....	43



## 1. Úvod

Jasan je vznešený majestátný strom, dosahující výšky až 40 metrů. Vyskytuje se od nížin až po nízké horské polohy. Nejlépe se mu daří ve vlhkých a podmáčených lesích nebo na sutích. Jeho dřevo rychle vysychá a nepodléhá pozdější deformaci. Je známé pro svou houževnatost a vysokou odolnost v ohybu. Až do nedávné historie byl považán za jednu z posledních bezproblémových dřevin.

Vleklé problémy se zdravotním stavem jasanů a jejich celoevropským chřadnutím v lesních porostech jsou popisovány od 90. let 20. století. Hromadné odumírání jasanů (tzv. nekróza jasanů) se objevilo v severovýchodní Evropě a jeho původce *Chalara fraxinea* byl poprvé identifikován v Polsku v roce 2006 T. Kowalskim. K výraznému rozvoji choroby v České republice došlo po roce 2003, i když je pravděpodobné, že se vyskytovala tady, jakož i v dalších státech, dříve. Choroba napadá naše domácí druhy: jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.), jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* L.) a jejich kultivary. Napadány jsou bez výjimky jasanové všechny věkových kategorií na všech typech stanovišť ať už jde o lesy, stromořadí, výsadby ve městech i volně rostoucí jedince.

Pro nekrózu jasanů je typický velmi rychlý nástup, který jde společně s rozvojem nekrotických lézí, prasklinami v kůře, zasycháním letorostů a listů. Stromy se snaží o regeneraci prostřednictvím vlků, které rostou na kmeni a u paty kmene často nahloučené – připomínající čarověniky, anebo zcela odumírají. Šíření spor je velmi rychlé a probíhá pomocí větru a v ideálních podmínkách doslova geometrickou řadou. Největší četnost spor je v letních měsících při optimálních vlhkostních podmínkách. Na opadaném materiálu patogen přezimuje a další rok se cyklus opět opakuje.

Poškození lze v krajním případě zaměnit s poškozením mrazem. Ochrana jedinců i porostů je téměř nemožná, zatím nebyla vyvinuta účinná a plošně aplikovatelná metoda. Snad s rozvojem, zatím poměrně nákladných, injektáží se nám otevrou nové obzory a jasanové v budoucnu nebudou problémové dřeviny naší republiky.

## **2. Cíl práce**

Cílem práce bylo pomocí moderních metod molekulární biologie sledovat vývoj výskytu vzdušného unokula během sezóny 2015 a interpretovat vztahy v závislosti na meteorologických veličinách.

Detekcí inokula osvětlit životní cyklus *Hymenoscyphus fraxineus* a zaměřit se na rizikové období vývoje.

Prostřednictvím těchto poznatků a literárních zdrojů poukázat na možnosti ochrany a obrany před tímto patogenním organismem nejen v arboristické praxi.

### 3. Literární přehled

#### 3. 1. Rod *Fraxinus*

Rod *Fraxinus* sp. patří do čeledi olivníkovitých (*Oleaceae*). Jedná se o opadavé listnaté stromy. Stromy tohoto rodu patří k vyšším dřevinám naší republiky a dorůstají až 40 metrů. Na území České republiky rostou dva původní druhy, jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) a jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia*), (Úradníček *et al.* 2009).

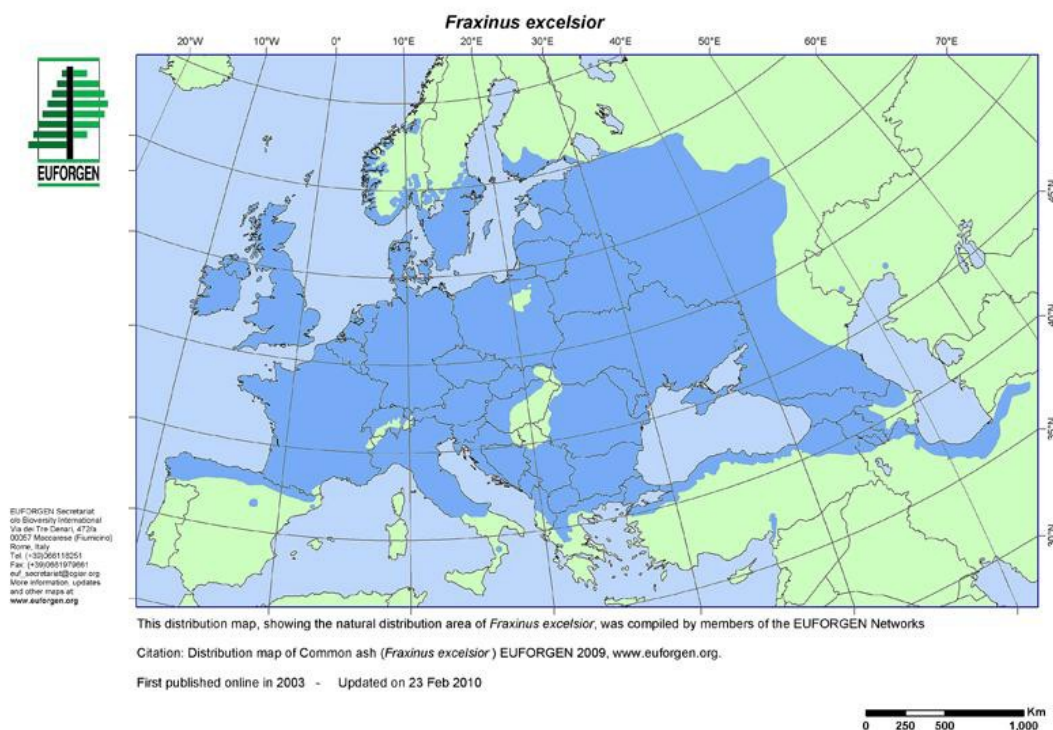
##### 3. 1. 1. *Fraxinus excelsior*

Jasan ztepilý byl do roku 2008 naší šestou nejrozšířenější dřevinou s plošným podílem 3,5 % (Nárovec *et al.* 2008).

Strom dosahuje výšky až 40 m, průměru kmene přes 1,5 m a dožívá se až 250 let (Úradníček *et al.* 2009). Kmen má přímý, korunu podlouhle vejcovitou, poměrně řídkou, větve tlusté. Květy jsou mnohomanželné a skládají nenápadná hroznovitá květenství, vyrůstající z postranních pupenů ještě před olistěním. Kvetे každoročně (Musil a Möllerová 2005). Nápadný je vstřícnými černými pupeny (Úradníček *et al.* 2009). Listy má lichozpeřené, 3–7jařmé, vstřícné, rozmístěné převážně jen na obvodu koruny (Musil a Möllerová 2005). Na podzim se listy nebarví a opadávají zelené (Úradníček *et al.* 2009). Zjara se velmi pozdě olistňuje, a proto hrozí po náhlém osvětlení kmenů nebezpečí korní spály (Leugnerová, 2007a).

V dospělosti je jasan světlomilnou dřevinou, v mládí však slabé zastínění vyžaduje. Rozlišujeme obvykle 3 ekotypy jasanu: lužní, horský a vápencový. Nároky na vláhu se u jednotlivých ekotypů různí, lužní a horský vyžadují dostatek vláhy po celý rok, vápencový je připůsoben nedostatku vody a vysychavým podkladům. Jasany nesou stagnující vodu, zasolenou půdu, rašeliné podklady a silné mrazy. Rostou na rozličných geologických podkladech, avšak podmínkou je jejich dostatečná živnost. Přirozený výskyt jasanu ztepilého bývá indikátorem nejlepších půd

(Úradníček *et al.* 2009). Dřevo jasanu je tvrdé, pružné a houževnaté. Používá se při výrobě násad, topůrek, sportovního nářadí, hudebních nástrojů i v nábytkářství (Musil a Möllerová 2005).



Obr. 1. Mapa přirozeného rozšíření *Fraxinus excelsior* (Euforgen, 2015)

### 3. 1. 2. *Fraxinus excelsior*, vybrané kultivary

*Fraxinus excelsior* 'Pendula' – nižší, široce rozkladitě a kaskádovitě polokulovité stromy s větvemi obloukovitě nebo vodorovně odstávajícími a často až k zemi nícími větévkami, výška a šířka 10–15 m; listy normální, zpeřené. Dobře roste ve vzdušných, vlhčích, živných půdách na plně osluněném místě až v polostínu, vysazuje se do travnatých ploch s dostatečným prostorem, do zpevněných ploch se téměř nevysazuje, může trpět suchem, kořeny mohou narušovat podzemní sítě, toleruje zasolení (Horáček, 2006a).

*Fraxinus excelsior* 'Heterophylla Pendula' – nižší, široce rozkladitě a kaskádovitě polokulovité stromy s větvemi obloukovitě nebo vodorovně odstávajícími a často až k zemi nícími větévkami, jako *Fraxinus excelsior* 'Pendula' (Horáček, 2006a).

*Fraxinus excelsior 'Diversifolia'* – strom řídkěji větvený, koruna užší a úzce oválná nebo široce pyramidální, 15–20 × 10–15 m velký; listy 14–18 cm dlouhé, jednoduché, většinou tak sestávají pouze ze zvětšeného terminálního lístku, nebo až trojčetné a pak jsou postranní lístky mnohem menší než středový, obvykle hluboce a ostře zastříhovaně pilovité. Dobře roste na vlhčích a na živiny bohatých půdách na plně osluněném stanovišti až v polostínu, v městském prostředí, zvláště vysazený ve zpevněném povrchu, často trpí suchem a proto jsou tyto podmínky nevhodné (Horáček, 2006a).

*Fraxinus excelsior 'Nana'* – zakrslý, keřovitý, poměrně hustě stavěný polokulovitý typ, pokud není šlechtěný na kmínek, 150–300 cm vysoký; listy menší než původní druh, asi 3–8 cm dlouhé, ne více než 15(–20) cm dlouhé, mají (9–)11–15 nahloučených lístků (Horáček, 2006a).

### 3. 1. 3. *Fraxinus angustifolia*

Dosahuje výšky 20–40 m, průměr kmene do 1 m, koruna vejcovitá, podobající se jasanu ztepilému. Kvete před rašením listů, květy vyrůstají z postranních pupenů v hroznech. Listy má vstřícné, často i přeslenité, lichozpeřené. Lístky kopinaté, 4–8 cm dlouhé, řídce pilovité. Na podzim se listy barví do žluta až červenofialova (Úradníček *et al.* 2009). Má skořicově hnědé pupeny.

Je teplomilný a světlomilný, v mládí snáší zástin. Optimální podmínky mu poskytují půdy vlhké, plné živin (Musil a Möllerová 2005). Jeho zastoupení je mezernaté v pásech lužních lesů, podél vodních toků v nížinách. Jasan úzkolistý je citlivý na silné mrazy, které způsobují praskliny v dřevním válci (Úradníček *et al.* 2009). Dřevo se zpracovává společně se dřevem jasanu ztepilého. Nařezáním kůry se získává cukerná šťáva, tzv. „mana“ (Musil a Möllerová 2005).



Obr. 2. Mapa přirozeného rozšíření *Fraxinus angustifolia* (Úradníček *et al.* 2001)

### 3. 1. 4. *Fraxinus angustifolia*, vybrané kultivary

*Fraxinus angustifolia* 'Raywood' - robustní a silný vzpřímený vzrůst, kmen rovně až do špičky koruny průběžný, koruna řidší, 15–20 × 10–15 m velký; listy zprvu tmavě zelené, mají 5–7 úzce vejčitých, lesklých, tmavozelených lístků, ty jsou na podzim jasně červenopurpurové nebo fialovopurpurové. Nemá zvláštní nároky, dobře roste na půdách vlhčích na plně osluněném stanovišti až v polostínu, vhodný do stromořadí, parků. Do zpevněných ploch v ulicích vhodný pouze za předpokladu, že má dostatek vody, lépe je vysadit ho do travnatých pásů nebo travnatých ploch, kořeny mohou poškozovat podpovrchové konstrukce, toleruje používání posypových solí (Horáček, 2006b).

*Fraxinus angustifolia* 'Elegantissima' - strom sotva 8 m vysoký, pupeny černohnědé a často po 3 v přeslenu, listy mají většinou 11 lístků, ty jsou úzce kopinaté světle zelené, 4–6 cm dlouhé, dlouze zašpičatělé, jemně a ostře pilovité, naspodu lysé; květy v hroznech (Horáček, 2006b).

*Fraxinus angustifolia* 'Golden Desert' – kůra zlatá, listy jsou zelené, mění se asi v červenci na zlaté (Horáček, 2006b).

*Fraxinus angustifolia* 'Flame' – tvoří symetrickou okrouhlou korunu, lístky s úzkou čepelí, mění se z tmavě leskle zelených na vínové a později jsou až ohnivě zbarvené (Horáček, 2006b).

### 3. 1. 5. Další druhy rodu *Fraxinus*

*Fraxinus ornus* – Jasan zimnář, v České republice nepůvodní druh. Strom/keř 6–15 m vysoký, průměr kmene 20–30 cm. Letorosty v blízkosti pupenů jemně pýřité, listové jizvy půlměsícovité. Postavení pupenů vstřícné, barva je hnědá až šedě fialová, jsou plstnaté. Květy v bohatých koncových latách. Listy lichozpeřené, 2–4jařmé, 12–20 cm dlouhé; lístky eliptické, 3–8 cm dlouhé, 1,5–4 cm široké, mělce pilovité. Prostřední žilka na rubu hnědavě pýřitá (Leugnerová, 2007b)

Jde o světlomilný druh, který v mládí snese slabý zástin. Vydrží extrémní nedostatek vláhy, ale je náročný na živnost půdy, jeho optimum je na bazických podkladech. V České republice se používá k zalesňování krasových oblastí a suchých svahů, v sadovnictví a také jako okrasná dřevina (Musil a Möllerová 2005).

*Fraxinus pennsylvanica* – jasan pensylvánský, dvoudomý strom až 22 m vysoký. Letorosty většinou i v dospělosti pýřité s rezavými pupeny. Listy jsou 25–30 cm dlouhé, 3–4jařmé, lístky 6–15 cm dlouhé, ostře pilovité, oboustranně zelené a na rubu bývají pýřité. Na podzim se listy zbarvují do jasně žluté barvy. Květy jsou jednopohlavné, kvetou až po vyrašení listů (Gutzerová, 2015).

Světlomilný strom, snášející záplavy a vyskytující se na půdách slabě propustných údolních niv, na březích vod i bažinách (Musil a Möllerová 2005). Je pionýrskou dřevinou rychle osídlující břehy řek a narušovaná místa. Vysazován v parcích a zahradách pro okrasu. V Severní Americe je vysazován ve městech do stromořadí, protože dobře snáší městské prostředí a je odolný vůči nemocem (Gutzerová, 2015).

*Fraxinus americana* – jasan americký, dvoudomý strom dorůstající výšky až 35 metrů. Letorosty má lysé, pupeny rezavě hnědé. Jedná se o světlomilnou, mrazuodolnou, pionýrskou dřevinu, která v mládí snáší zástin. Nejlépe roste na vlhkých, propustných půdách a nebývá dominantní dřevinou. Dřevo je pevné a houževnaté. V České republice je tento druh relativně nejvzácnější (Musil a Möllerová 2005).

### 3. 2. Aerobiologie a její historie

Aerobiologie je věda zkoumající biologické objekty ve vzduchu. Počátky tohoto vědního oboru sahají až do 5. století př. n. l. zápisy Hippokrata, který tvrdil, že epidemické horečky u lidí jsou způsobeny tím, že vdechují částice ze vzduchu, které jsou svým obsahem lidské rase nepřátelské. Lucretius se zabýval pozorováním pohybu prachových částic ve slunečním paprsku v tmavé místnosti. Pohyb si vysvětloval bombardováním částiček neviditelnými atomy ve vzduchu. Micheli, botanik, řadou pokusů, kdy vkládal spory plísní na plátky ovoce, prokázal, že se plíseň z jednoho plátku šíří na další pomocí vzduchu. J. G. Koelrueter byl v roce 1766 pravděpodobně první, kdo poznal důležitost opylování větrem a hmyzem. C. P. Sprengel roku 1793 objevil, že rostliny, které postrádají okvěti, jsou často opylované větrem. T. A. Knight v roce 1799 referoval, že vítr přenáší pyl na velké vzdálenosti. V druhé polovině 19. století Louis Pasteur popsal svoji teorii o zárodkovém vzniku nemocí, Robert Koch identifikoval příčinu anthraxu a Maddox sestavil v roce 1870 aerokoniskop (Lacey a West 2006).

Philip Gregory je označován za otce moderní aerobiologie, měl velmi široký záběr, primárně se však zajímal o lékařskou mykologii a později ve spolupráci s O. J. Stedmanem, J. M. Hirstem a F. Lastem založili standardizovanou volumetrickou metodu měření obsahu částic ve vzduchu vztažené k  $m^3$  vzduchu. Jim Hirst v roce 1952 sestavil lapač spor, který fungoval na principu sání vzduchu na lepivé podložní sklíčko, které bylo posouvané mechanickým natahovacím strojkem (Lacey a West 2006).



Pro aerobiologické výzkumy je typické sledování velikosti částic obsažených ve vzduchu (nejčastěji pylu a spor). Dříve používané volně vystavené povrchové pasti zachytily velmi málo menších spór a účinnost ukládání částic byla extrémně variabilní v závislosti na rychlosti větru a také ovlivněna podle velikosti a orientace pasti. Zejména ve fytopatologii má toto sledování velký význam, můžeme sledovat vývoj hub, a tak můžeme plánovat obranná opatření (Hirst, 2009).

### 3. 3. Sledování a kvantifikace výskytu mikroorganismů ve vzduchu

Metody a přístroje pro detekci a koncentraci spor na jednotku objemu vzduchu jsou podobné těm, které slouží k zachycování polétavého prachu a pylu (Dhingra a Sinclair 1995).

#### 3. 3. 1. Typy lapačů

##### 3. 3. 1. 1. Pasivní lapače

Tyto lapače jsou nejjednodušší variantou sběru částic obsažených ve vzduchu. Pasivní odchyt je technika, která je často používaná, levná a snadno nastavitelná. Avšak nemůže být použita pro přímé výpočty koncentrace částic ve vzduchu.

Pasivní lapače mohou být také použity pro sběr částic v proudu vzduchu. Tenká skleněná tyč nebo trubka je potažena vazelínou. Skleněná tyč se umísťuje vertikálně tak, že částice dopadnou a přilnou k tyči bez ohledu na směr větru. Hodnoty dopadů částic jsou úměrné koncentraci částic a rychlosti větru (Lacey a West 2006).

##### 3. 3. 1. 2. Aktivní lapače

Cíleně nasávají vzduch, čili nedochází k samovolné sedimentaci, ale k cílenému vhánění vzduchu do přístroje, kde se spory zachycují. K tomu se nejčastěji používá podložních sklíček pro mikroskop, na které je nanášeno lepkové médium.

### 3. 3. 1. 2. 1. Podložní sklíčka a válcové tyče

Tato forma sběru poskytuje kvalitativní informace, ale je neúčinná pro kvantitativní práci a je selektivní pro velké spory. Úhel uložení sklíčka ve směru větru by měl být 45°. U vertikálně uložených podložních sklíček se jedná o nárazové pasti, ty jsou velmi citlivé na změny v rychlostech větru a neefektivní při nízkých rychlostech větru (Dhingra a Sinclair 1995).

Pro zefektivnění je využíváno 8 denních lapačů, které jsou otáčeny konstantní rychlostí pomocí hodinového strojku. Jedná se o tyč z pevného plexiskla 75 cm dlouhou, která je označena ve 2,5cm intervalech po celé délce. Tyč jezdí na 150cm vodorovném nosníku ve skříni z plexiskla, která má uprostřed 2,5cm otvor, prostřednictvím kterého je lapací tyč v kontaktu se vzduchem. Boky a vrchol tyče jsou potaženy vazelínou, konec tyče je připojen k hřídeli navijáku (Dhingra a Sinclair 1995).

### 3. 3. 1. 2. 2. Volumetrické lapače spor

Volumetrické lapače nám umožňují korelaci mezi koncentrací spor a meteorologickými daty. Existují 4 komerčně dostupné typy volumetrických lapačů:

Hirstův lapač spor – spory se přilepí na lepovou vrstvu podložního sklíčka, které se pohybuje kolem sacího otvoru rychlostí 2 mm/hod. a umožňuje lepení spor po 24 hodin. Otvor se otáčí po větru pomocí větrné lopatky (Dhingra a Sinclair 1995).

Burkardův 7denní objemový lapač spor – spory se přilepí na lepovou pásku, jež je ovinutá kolem válce a potřena vazelínou. Válcem otáčí 7denní strojek.

Kramer-Kolinsův 7denní lapač – lapač je principiálně podobný dvěma výše zmíněným. Použitá páska je celofánová a otáčí se rychlostí 60 mm/24 hod.

Padyho 24hodinový lapač – oddělené hodinové pásky s lepovou plochou umožňují stanovit hodinu zachycení spor (Dhingra a Sinclair 1995).

### 3. 3. 1. 2. 3. Štěrbínové lapače spor

Efektivní pro lapání spor venku, ale vhodný i pro lapání uvnitř. Lapač je lehký, kompaktní a přenosný. Funguje na 12V baterii nebo střídavý proud. Lapač byl vyvinut pro terénní studie, je vhodný pro měření produkce spor dřevokazných hub. Lapá spory po dobu 24 hod. (Dhingra a Sinclair 1995).

Vzduch je nasáván 2,5cm trubicí, která se zužuje do štěrbin. Pod vnitřním koncem štěrbin je uloženo podložní sklíčko. Sklíčko se pohybuje jednou za hodinu. Otvor je orientován do větru pomocí utěsněného kuličkového ložiska a větrníku s protizávažím (Dhingra a Sinclair 1995).

### 3. 3. 1. 2. 4. Nárazové lapače spor

Tyto lapače mohou nachytat velké množství mikroorganismů. Nevýhodou je, že doba zachycení spor a periodicita nelze určit. Lapač nasává vzduch vysokou rychlostí. Vzduch je zachycen ve dvou fázích. V první fázi je skleněná baňka z poloviny naplněná sběrnou kapalinou a do ní proudí vzduch pod úhlem 45°. Průchod pro vzduch je zadržován. V druhé fázi zátkou vyústí rameno, ve kterém je vakuum. Vrcholem zátky prochází sací trubice, která ústí do kapilárních trubiček, kde vzniká kritický tlak. Celá sestava pracuje při rychlosti sání 11 litrů za minutu. Spory se shromáždí ve sběrné kapalině na semi-selektivním médiu (Dhingra a Sinclair 1995).

### 3. 3. 1. 2. 5. Vířivé lapače spor

Primárně užíván pro sběr spor padlí a rzí z napadených jedinců a stanovení produkce spor. Použití pro detekci patogenů ze vzduchu je omezen (Dhingra a Sinclair 1995).

Vzduch víří po šroubovici v nádobě, která je v horní části širší a směrem dolů se zužuje. Proud se pohybuje směrem k úzkému konci cyklonu, kde se sníží rotační poloměr proudu, a tak odděluje menší a menší částice (Schiffner, 2002).

### 3. 3. 1. 2. 6. Silnoproudé lapače spor

Lapač vyvinut pro sběr spor padlí v živém stavu, jehož sběr jinými metodami není příliš efektivní. Vzduch je nasáván vysokou rychlostí, vzápětí udeří na sloupec bezvětří a proud vzduchu je vychýlen do průchodu, kde silný zdroj podtlaku způsobí srážku letících částic s nehybným vzduchem a částice se usadí na dně usazovací komory, kde jsou listy hostitelské rostliny umístěny ve vodorovné poloze nad vlhkým filtračním papírem (Dhingra a Sinclair 1995).

### 3. 3. 1. 2. 7. Muslinovy tkaninové lapače spor

Tato metoda je spolehlivá pro detekci a stanovení počtu typů spor, ale ne pro kvantitativní metody. Původně užívaný lapač pro lapání spor *Heterobasidion annosum*. Jde o 20 cm<sup>2</sup> muslinovy textilie několikrát přeložené, vložené do obálky, utěsněné a sterilizované při 100°C. Kousky látky jsou připojeny k drátěnému rámu kancelářskými sponkami. Celá sestava se dá do držáku tak, aby tkanina byla proti větru. Vystaví se po dobu až několika hodin (Dhingra a Sinclair 1995). Po expozici se tkanina vloží zpět do obálky a vezme do laboratoře, kde se vyhodnotí (Dhingra a Sinclair 1995).

## 3. 4. Vývoj a taxonomie

Rod *Chalara* obsahuje přes 100 druhů hub, přičemž většina z nich náleží do řádu voskovičkotvaré (Koukol a Havrdová 2014). *Chalara fraxinea*, označovaná jako původce nekrózy jasanů, byla prve identifikována roku 2001 v Polsku T. Kowalskim. V roce 2009, kdy už snad nikdo nepochyboval o roli houby *Chalara fraxinea* v odumírání jasanů v celé Evropě, se výzkum začal soustředit na biologii této houby. Velmi zajímavý poznatek přinesla studie v roce 2009 (Kowalski

a Holdenrieder 2009). Údaje ve zmíněné studii prokázaly, že *Hymenoscyphus albidus* je teleomorfa houby *Chalara fraxinea*. Rázem se stalo platným jménem, protože podle nomenklatorických pravidel mělo jméno teleomorfy přednost před názvem anamorfy. Tento objev zahrnoval jedno velké „ale“. Druh *Hymenoscyphus albidus* byl znám z Evropy již více než 100 let a považován za saprotrofní druh, nikdy nebyl spojován s chorobou jasanů (Koukol a Havrdová 2014).

Dalším významným a zlomovým objevem je výsledek výzkumu otištěný v článku z roku 2011 (Queloz *et al.* 2011). Valentin Queloz odhalil, že existují dva morfologicky velmi podobné druhy *Hymenoscyphus* sp. Díky testům bylo odhaleno, že houba, považovaná za teleomorfou houby *Ch. fraxinea*, objevená na řapících listů napadených jasanů, není *Hymenoscyphus albidus*, ale jedná se o druh *Hymenoscyphus pseudoalbidus*.

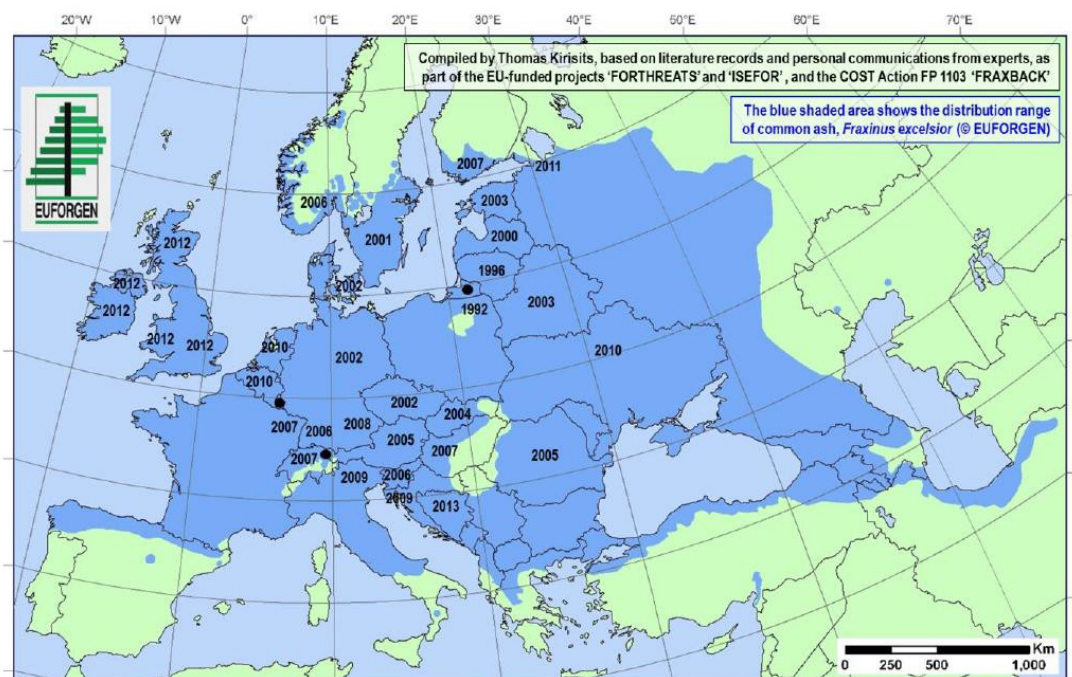
V roce 2012 se ukázalo, že je *Hymenoscyphus pseudoalbidus* identický se saprofytickým druhem *Lambertella albida*, který se běžně vyskytuje v Japonsku na *Fraxinus mandshurica* (Havrdová *et al.* 2013).

Je tedy prokázáno, že z Japonska došlo k přenosu tohoto druhu do Evropy, kde na jasanech začal fungovat jako parazit. Zatím nebylo potvrzeno, že by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* způsoboval onemocnění na *Fraxinus mandshurica* (Zhao *et al.* 2012).

V roce 2014 byl jakožto jediný platný název pro tuto patogenní houbu zvolen *Hymenoscyphus fraxineus* (Baral *et al.* 2014), a český název voskovička jasanová.

Při introdukci rostlin či patogenů do regionů mimo přirozený areál výskytu je úspěšnost infekce hostitelské rostliny závislá na genetické kompatibilitě mezi rostlinou a patogenem. Možné epidemické onemocnění souvisí s životním cyklem patogenu, změnách ve virulenci, odolnosti rostlin a přítomnosti vhodného prostředí (Gonthier a Nicolotti 2013).

### 3. 5. Šíření nekrózy jasanů



Obr. 3. Mapa šíření nekrózy jasanů v Evropě (Euforgen, 2015)

První případy hromadného hynutí a chřadnutí jasanů byly pozorovány již v padesátých a osmdesátých letech minulého století (Nárovec, 2011). Choroba se začala rychle šířit celou Evropou. V 90. letech se rozšířila do Litvy (Juodvalkis a Vasiliauskas 2002), v roce 1992 na severovýchod Polska (Przybyl, 2002). V roce 2000 je výskyt zaznamenán v Lotyšsku, v roce 2001 v jižním Švédsku (Thomsen *et al.* 2007), v roce 2002 v Estonsku (Juodvalkis a Vasiliauskas 2002). Choroba se šířila dál a nevyhnula se ani dalším státům. V roce 2002 byly zaznamenány známky odumírání jasanů v severním Německu (Heydeck *et al.* 2005), v roce 2003 v Dánsku (Thomsen *et al.* 2007). V roce 2007 detekována v České republice (Jankovský a Holdenrieder 2009). V roce 2004 zaznamenána na Slovensku, v roce 2005 v Maďarsku a Rumunsku (Szabo, 2009), v jižním Finsku a Norsku (Barklund, 2005) a také v Rakousku (Cech, 2006). Na Slovinsku v roce 2006 (Ogris *et al.* 2009), ve Švýcarsku v roce 2007, v Itálii v roce 2009 (Ogris *et al.* 2010) a v roce 2010 ve Francii (Husson *et al.* 2011). Dle Euforgen (2015) byla choroba prokázána v roce 2010 v Rumunsku, Belgii, Nizozemsku, v roce 2011 v západním Rusku, roce 2012 ve Velké Británii a Irsku a v roce 2013 v Bosně a Hercegovině.

Ve Velké Británii lze například zmínit celé epizody, označované jako „ash dieback“ či „ash decline“, které ohrožovaly *Fraxinus excelsior*. Vyznačovaly se progresivním zasycháním prýtů, větví i celých stromů, ale jejich příčina zůstávala neznámá. Hlavní podezření na původce stresů tehdy směřovalo k nepříznivým abiotickým, respektive antropogenním vlivům (Nárovec, 2011).

### 3. 6. Výskyt nekrózy jasanů v ČR

V České republice docházelo k různým projevům chřadnutí jasanů od konce 90. let, k výraznému rozvoji choroby došlo až po roce 2003 (Košťálová a Sázelová 2010). Symptomy chřadnutí jasanů byly zaznamenány v řadě oblastí České republiky: Beskydy, Jeseníky, Krkonoše, Šumava, okolí Prahy, východní Čechy, Českomoravská vrchovina, Dražanská vrchovina, Hostýnské vrchy, Chřiby, oblast LZ Židlochovice atd. Lze konstatovat vzrůstající plošný rozsah chřadnutí jasanů od roku 2004 (Jankovský *et al.* 2009).

První výskyt byl u nás laboratorně potvrzen v září roku 2007 na jasanu ztepilém (*Fraxinus excelsior* var. 'Pendula') v arboretu ve Křtinách. Následovaly další pozitivní nálezy z jiných lokalit, mimo jiné z Lomnice u Tišnova, z Hradčan u Tišnova a z oblasti ŠLP Křtiny. Infekce byla zjištěna dosud na jasanu ztepilém *F. excelsior* a jeho kultivarech, především převislé formě *F. excelsior* cv. 'Pendula' a jasanu úzkolistém *F. angustifolia* (Jankovský a Holdenrieder 2009).

### 3. 7. Symptomy infekce

První indentifikační znaky jsou zasychající letorosty a větve. Může být pozorován předčasný opad, zasychání listů, či hnědé až černé nekrózy na řapících listů a žilnatině. Nejvýznamějším znakem infekce jsou eliptické nekrózy kolem listových jizev a pupenů. Nekrózy se šíří v podélném i příčném směru a prolínají se do sebe. Vnitřní symptomy charakteristické pro infekci houbou *Chalara fraxinea* jsou především zbarvení napadené části dřevního válce do šeda až šedočerna a hnědočerná vrstva pod zelenou kůrou mladých větví. Napadené stromy reagují

intenzivní tvorbou vlků. Někteří jedinci přežívají a snaží se o regeneraci a další pak v důsledku onemocnění odumírají (Kirisits a Matlakova 2008).

U starších stromů odumírají jednoleté, méně často i starší výhony, infikované stromy však přežívají a regenerují. U dvouletých až tříletých jasanů bylo zaznamenáno jejich odumření v případě, kdy se nekróza vyskytla na bázi kmínků. U dvouletých a víceletých větví mohou nekrózy zavalovat. Byly pozorovány 2–3 leté zahojené nekrózy (Jankovský *et al.* 2009).

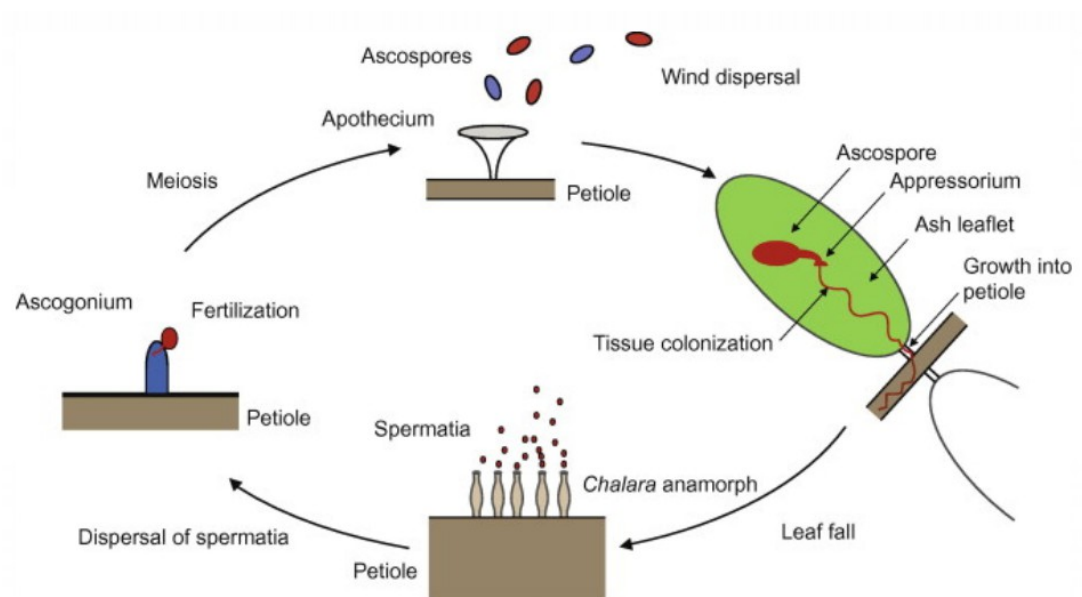


Obr. 4. Symptomy infekce *Hymenoscyphus fraxineus* (Kirisits a Matlakova 2008)

### 3. 8. Životní cyklus a šíření infekce

Na opadlém materiálu (řapících) jsou v letních měsících patrné mističkovité plodničky (apothecia) pohlavního stadia patogenu (Dvořák, 2013). Ta se objevují od června do září (října) s největším výskytem v létě (červenec až srpen) a produkují velké množství askospor, které jsou unášeny větrem, dopadají na jasanové listy, klíči, hyfy pronikají do pletiv a dochází k nekrotizaci pletiv. Následuje předčasný opad nekrotizovaných listů vedoucí ke značné defoliaci. Na řapících opadaných listů se následující sezonu vytvářejí apothecia a cyklus se opakuje (Koukol a Havrdová 2014).





Obr. 5. Schéma životního cyklu (Gross *et al.* 2012)

*Hymenoscyphus fraxineus* patří mezi druhy heterotalické, což znamená, že k pohlavnímu procesu je potřeba dvou mycelií s odlišným párovacím typem. Tyto párovací typy můžeme chápat jako různá pohlaví u jiných skupin organismů. U vřeckovýtusných hub se při pohlavním procesu oplodí askogon (samičí gametangium) pomocí hyfy (samčí gametangium) nebo spermacie (nepohyblivá gameta). Jako spermacie slouží obvykle konidie tvořené na anamorfe. U druhu *Hymenoscyphus fraxineus* jsou konidie produkované na anamorfe *Chalara fraxinea*. (Koukol a Havrdová 2014).

V laboratorních podmínkách při umělém křížení řapíků na misce bylo prokázáno, že oba párovací typy jsou v populacích přítomny se srovnatelnou četností. Podrobným studiem řapíků v opadu se dokonce ukázalo, že každý řapík kolonizovalo několik kmenů s odlišným párovacím typem. Podařilo se tak objasnit celý životní cyklus a důvody šíření *Hymenoscyphus fraxineus* (Gross *et al.* 2012).



Obr. 6. Apotécia vyrůstající z pseudosklerocií (Baral a Bemmann, 2014)

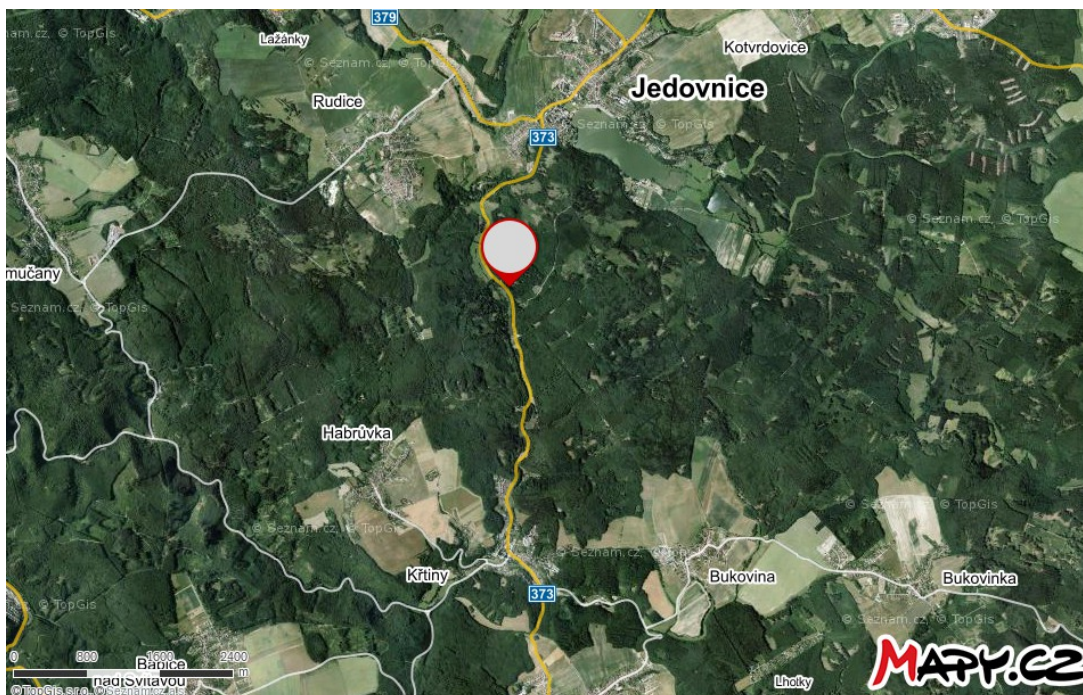
### 3. 9. Obrana

Vzhledem ke způsobu šíření infekce větrem je snaha o regulaci velmi náročná. Jedním ze způsobů částečné ochrany na místech s rošířením této nemoci je odstraňovat silně napadené jedince před opadem listů (Kirisits *et al.* 2012). Forestry Commission (2015) doporučuje v porostech odstraňování jedinců s korunou postiženou nekrózou jasanu z více jak 50 %, protože se jedná o jedince, kteří pozbyli dřevoprodukčního významu a zároveň představují zdroj infikovaného materiálu. Na územích, na nichž nebyla nemoc dosud pozorována, je doporučena pečlivá kontrola dováženého pěstebního a výsadbového materiálu (EPPO 2011). Ideální je obnovovat porosty přirozeně prostřednictvím fenologicky odolnějších jedinců, u kterých je předpoklad přenosu genetické predispozice odolnosti na další generaci (Forestry Commission 2015).

Zajímavé výsledky by mohly přinést výzkumy probíhající v Lužických horách (vzhledem ke členitosti území a pestrosti stanovišť oblast vhodná k tomuto typu studií) ukazující, že se průběh choroby a úroveň napadení porostů a výsadeb jasanu ztepilého značně liší jak během jednotlivých sezon, tak na různých stanovištích. Jako jeden z nejdůležitějších faktorů, který zřejmě výrazně ovlivňuje průběh choroby, je vlhkost prostředí. Na obecně sušších stanovištích nebo ve srážkově deficitních letních obdobích (kdy dochází k vývoji apotecí) je rozvoj nekrózy jasanu mnohem pomalejší, nebo alespoň opožděný a její dopad slabší (Koukol a Havrdová 2014).

## 4. Metodika práce

### 4. 1. Stanoviště



Obr. 7. Poloha umístěného lapače spor (www.mapy.cz)

Sledovaný smíšený porost se nachází v okolí a na vlastním pozemku Hackerovy školky, na území Školního lesního podniku „Masarykův les“ Křtiny.

Velká část jedinců na ploše jednoznačně vykazuje příznaky napadení houbou *Hymenoscyphus fraxineus*.

Poloha umístěného lapače spor souřadnicemi GPS: 49.3233397N, 16.7436261E, nadmořská výška: 469 m. n. m.



Obr. 8. Jedinec, u něhož byl umístěn lapač spor (Foto: Jana Hrnčířiková, 04/2015, Hackerova školka, ŠLP Křtiny)

#### 4. 1. 1. Geomorfologie území

Geomorfologicky území spadá do oblasti Drahanské vrchoviny. Reliéf území je členitý s dominantní polohou hluboce zaříznutých údolí řeky Svitavy a jejího levostranného přítoku Křtinského potoka. Geologická stavba je velmi pestrá. Území můžeme rozdělit do 3 hlavních geologických jednotek. Vyvřeliny brněnského masivu, vápence devonského až karbonského stáří a horniny moravského kulmu.

Z hlediska půdotvorného jsou významné i plošně méně rozšířené mladší pokryvné útvary, hlavně druhohorní, jurské a křídové sedimenty, v menší míře pak neogenní štěrky, štěrkopísky a čtvrtohorní spraše a sprašové hlíny.

Díky vysoké geologické a geomorfologické rozmanitosti vyniká území také vysokou pestrostí půdních typů. V oblasti převládají kambizemě, v místech s ovlivněním vodou pak pseudogleje až gleje a na horninách vápencového složení rendziny (Bajer et al. 2008).

#### 4. 1. 2. Klimatické podmínky

Sledované stanoviště se nachází v klimatické oblasti: Teplé T2 (QUITT *et al.* 1975), to znamená nad 50 letních dnů v roce (dnů kdy je průměrná denní teplota vyšší než 25 °C).

Průměrná roční teplota v jihomoravském kraji v roce 2015 byla 8,3 °C, roční teplota na území celé republiky za rok 2015 byla 9,4 °C (ČHMÚ, 2016). Průměrné srážky v kraji byly za rok 2015 430 mm, v celé ČR byly v roce 2015 532 mm. (ČHMÚ, 2016).

#### 4. 1. 3. Historické souvislosti

Na této lokalitě, jen několik set metrů dál, byla O. Holdenriederem v září roku 2007 ze vzorku odebraném z *Fraxinus excelsior* cv. „Pendula“ první ověřená identifikace nekózy jasanů v České republice (Jankovský *et al.* 2009). Při návštěvě areálu je očividné, že převážná většina jasanů rostoucí na této lokalitě je chorobou napadena. To potvrzují předchozí výzkumy (Jankovský a Holdenrieder 2009; Dvořák a Humplíková 2012; Dvořák *et al.* 2016).

#### 4. 2. Lapání spor

Spory monitorovaného patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* byly lapány od 25. 4. 2015 do 15. 11. 2015 volumetrickým lapačem Burkardova typu. Lapač byl umístěn 3 metry od kmene infikovaného jedince ve výšce 30 cm. Příklad nasával vzduch pomocí elektrického ventilátoru, jehož proud přilepil částice ze vzduchu na leповou pásku potřenou vazelínou. Pomocí hodinového strojku běžel lapač v sedmidenních intervalech, kdy bylo nutné vyměnit leповou pásku a znovu hodinový strojek natáhnout.



Obr. 9.



Obr. 10.

Obr. 9. Lapač Burkardova typu (Burkard Manufacturing, 2011)

Obr. 10. Automatický sedmidenní lapač spor od firmy Amet (Foto: Miloň Dvořák, 11/2011, ŠLP Křtiny)

#### 4. 3. Sběr klimatických dat

Meteorologická data byla zaznamenávána pomocí automatické klimatické stanice Signalizátor (Amet, Velké Bílovice), která každou hodinu zaznamenala teplotu a vlhkost vzduchu, rosný bod a ovlhčení listů. Ovlhčení listu bylo měřeno pomocí napětí mezi sadou elektrod, mezi nimiž byl proložen filtrační papír.

#### 4. 4. Práce v laboratoři

##### 4. 4. 1. Příprava vzorku

Po odebrání lepové pásky z lapače, byla páska bezpečně uschována do převozní krabičky tak, aby nedošlo ke kontaminaci poletujícími částicemi a následně v laboratoři rozstříhána dle jednotlivých dní po dvanácti hodinách. Každý vzorek se vložil do 2ml zkumavky. Takto připravené vzorky se uschovaly do mrazícího boxu.

##### 4. 4. 2. Extrakce DNA

Laboratorní postup je shodný s návodem výrobce (Příloha č. 1). Úprava laboratorního postupu vychází z publikace Dvořák *et al.* (2016). Oproti protokolu výrobce byly provedeny následující změny:

DNA byla extrahována ze všech vzorků spolu s prázdnou mikrozukavkou, která sloužila jako negativní kontrola extrakce. Do mikrozukavky k disrupci spor dle Hodspodsky *et al.* (2010), se vzorkem přidáme 0,4 g 0,1mm balotinových zrn a 250  $\mu$ l 0,1% roztoku Nonidet P40 (AppliChem, Darmstadt, Germany). Na 10 minut se dá do homogenizátoru Mixer Mill MM 400 (Retsch, Haan, Germany) na 30 Hz. Pro další zpracování DNeasy Plant Mini Kit byla inkubace po dobu prodlouženou na 60 minut. V posledním kroku se DNA z každého vzorku eluuje jen jednou 100  $\mu$ l elučního pufru předehřátého předem, inkubovaných po dobu 10 minut.



#### 4. 4. 5. Kvantifikace DNA

Real-time PCR umožňuje přímou kvantifikaci produktu v průběhu reakce. Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů. Principem real time PCR je rychlé a přesné zaznamenávání produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku v každém jednotlivém cyklu PCR. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace (Lysková, 2008).

Koncentrace DNA *Hymenoscyphus fraxineus* ve vzorcích byla vyjádřena jako počet kopií cílové sekvence v 1 µl extrahované DNA (dále jen počty kopií). Tyto počty kopií byly kvantifikovány za použití standardní křivky generované reakcí s různým množstvím plasmidu pCR™ 2.1-TOPO® TA vektoru (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) podle LightCycler® 480 Software (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko), (Dvořák *et al.* 2016).

V případě tohoto výzkumu byl využit termocykler Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), duálně značená sonda Cf-S a specifické primery Cf-F a Cf-R (Chandelier *et al.* 2010). Tato část zpracování proběhla dodavatelsky za pomoci Dr. Gabriely Rotkové z Masarykovy univerzity, Ústav experimentální biologie.

Tato metodika extrakce DNA, ve kterém je disrupce spor provedena pomocí balotinových zrn v kombinaci s lyzačními pufrů spolu s metodou qPCR je nejvíce citlivá technika pro detekci *Hymenoscyphus fraxineus* (Dvořák *et al.* 2016).

#### 4. 5. Statistická analýza

Veškerá získaná data byla primárně převedena do programu Microsoft Excel 2010. Spočítaly se denní průměry, minima a maxima všech naměřených hodnot. Byly vytvořeny tabulky s průměry hodnot za 2 – 25 dnů a posuny hodnot o 1 – 20 dnů, tzn. tak, aby všechny hodnoty teplot, vlhkosti a ovlhčení listů (průměry, minima, maxima), byly korelovatelné s četností spor s posunutým vlivem, jelikož vývoj spor je odvislý od dlouhodobějšího vývoje podmínek.

Tím pádem vyšla tabulka, která ukazovala, že při průměru např. teplot posledních 5 dnů s posunem 2 dny vychází korelace  $R_1$ , při průměru za posledních 10 dnů s posunem 3 dnů vychází korelace  $R_2$ , atd. Při korelacích dat byla hledána nejvyšší hodnota závislosti, která ukáže, které meteorologické veličiny jsou nejdůležitější pro výskyt spor v ovzduší a s jakým zpožděním se změna počasí projeví na množství spor. Tzn. že počet spor např. 20. května je nejvíce závislý na průměru minimálních denních teplot od 9. do 10. května.

Statistická analýza byly provedena pomocí programu STATISTICA verze 12 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Vzorok s negativními kontrolami byly z testů vyřazeny. Data nespĺňovala normální rozložení, testováno Kolmogorov-Smirnovův testem. Byla použita neparametrická obdoba Personova korelačního koeficientu Spearmanův korelační koeficient ( $p = 0,03$ ) pro sledování lineární závislosti mezi 2 proměnnými.

Všechny statistické testy pro celkové vyhodnocení byly prováděny na 5% hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). Tzn., že pokud u korelace vyšlo  $p < 0,05$ , pak jsou 2 proměnné v lineárním vztahu a intenzita je pak dána "r", které se pohybuje od -1 do 1.

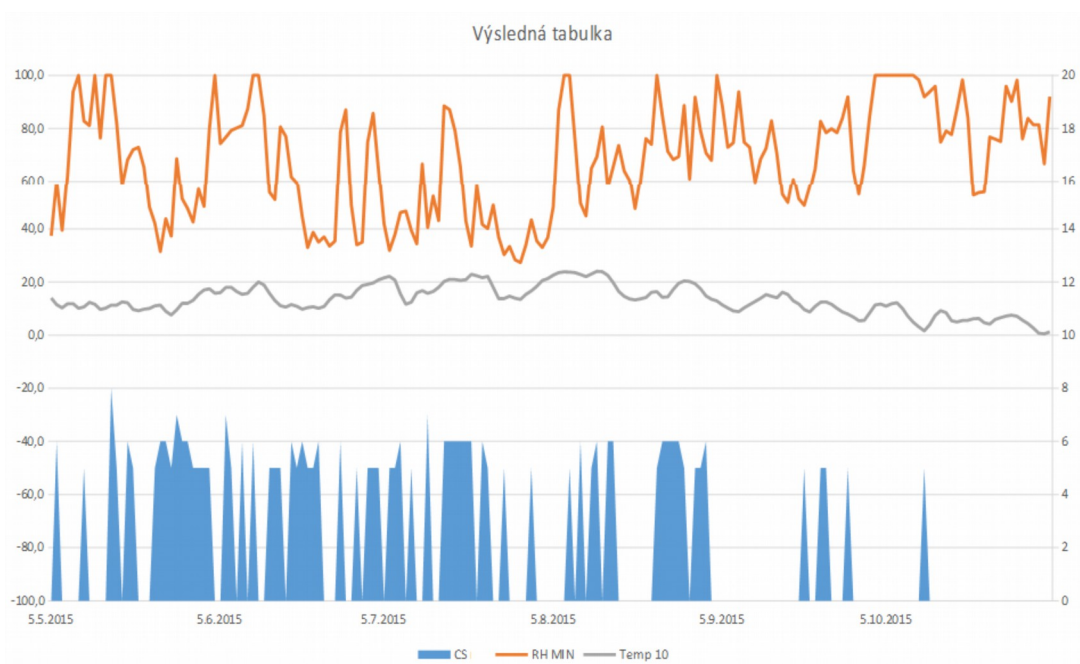
## 5. Výsledky

### 5. 1. Detekce *Hymenoscyphus fraxineus*

DNA spor sledovaného patogenu bylo prvně detekováno 26. 4. 2015, naposledy pak 23. 10. 2015. Pozitivních dnů bylo celkem 84 z 205. Nejvyšší četnost spor byla 13. 5. 2015, celkem  $3,75 \times 10^9$  kopií spor. Nejvíce pozitivních dnů, vzato za celé měsíce, bylo v červnu (20), nejméně v měsíci říjnu (5). Naměřená data jsou v příloze č. 2.

V průběhu lapání nedošlo k žádným technickým obtížím. Všechny negativní kontroly byly bez kontaminací.

Obr. 11. Přehled naměřených dat



Na obrázku 11 jsou viditelné počty kopií spor (CS), průběh průměrné denní teploty s posunem 10 dní (Temp 10) a ovlhčení listů (RH).

## 5. 2. Období sporulace

Proces výskytu spor byl v případě našeho výzkumu zachycen prvně 26. 4., v úsecích 27. 5. – 8. 5., 15. 5. – 17. 5., 27. 5. – 7. 8., 19. 8. – 27. 8., 4. 9. – 23. 9., byl vývoj víceméně kontinuální s krátkými přestávkami.

## 5. 3. Pauzy v období sporulace

V období 9. 5. – 14. 5., 18. 5. – 26. 5., 8. 8. – 18. 8., 28. 8. – 3. 9., 24. 9. – 15. 11., byl výskyt nízký, s velkými pauzami a až nulový.

## 5. 4. Sporulace podmíněná teplotou

Výskyt spor se ukázal být nejvíce závislý na průměrných denních teplotách vzduchu, bez připuštění vlivu posunu ( $r = 0,155$ ,  $p = 0,029$ ), s posunem viz kapitola 5. 5. Korelace s relativní vlhkostí ( $r = -0,026$ ,  $p = 0,097$ ) i ovlhčením listů ( $r = -0,070$ ,  $p = 0,065$ ) nebyly signifikantní.

## 5. 5. Zpoždění výskytu spor

Nejvyšší korelace vyšla při průměru teplot 2 po sobě jdoucích dnů s posunem 10 dnů ( $r = 0,315$ ). Tzn., že teploty naměřené v libovolných dvou po sobě jdoucích dnech ovlivní výskyt spor až za dalších deset dní od měření.

## 6. Diskuse

### 6. 1. Období sporulace

Patogen *H. fraxineus* se šíří askosporami unášenými vzduchem od poloviny června do srpna (Kowalski a Holdenrieder 2009; Queloz *et al.* 2011; Timmermann *et al.* 2011). V článku Dvořák *et al.* (2016) je jednoznačně zřetelné, že nejvyšší koncentrace spor jsou v letních měsících (červenec – srpen), dle našeho výzkumu je to již dříve, květen – červen a ke gradaci v letních měsících nedochází. Při sledování průběhu teplot, vzdušné vlhkosti i ovlhčení listu jsou vidět velké rozdíly, které mohly být důvodem velmi rozdílných výsledků.

Dvořák *et al.* (2016) se domnívají, že ze začátku jara můžou být zachyceny konidie, které jsou rozptylovány k oplození askogonu (samičího gametangia). Domnívají se, že nejvyšší vliv ovlhčení listu má 1 – 2 dny před zachycením inokula a vzdušná vlhkost s 13denním posunem. Dále soudí, že pro vývoj apotecíí je nutná dostatečně vysoká vzdušná vlhkost, a to po dobu 11 – 12 dní. Jakmile je apotecium zralé, ovlhčení listu může zvýšit uvolňování askospor, které se vyskytují se zpožděním 1 – 2 dnů.

Vysoký podíl vlhkosti jako důležitý faktor vychází i v publikaci Havrdová a Černý (2012). Provádělo se měření na 50 typově (hlavně vlhkostně) odlišných plochách a největší míra poškození odpovídala nejvlhčí ploše (břehový porost). Teplotní závislost ve výzkumu nebyla potvrzena.

Spory byly zachyceny od dubna až do listopadu, obdobně jako u Dvořák *et al.* (2016), to poukazuje na výskyt askospor ve vzduchu i bez viditelných čerstvých plodnic.

## 6. 2. Pauzy v období sporulace

Nepřetržitá produkce askospor není pravděpodobná, kvůli nedostatku výtrusorodé vrstvy apothecia (Dvořák *et al.* 2016). Mezery mezi produkcí spor jsou zřetelné i v našem případě. To mohlo být způsobeno nepříznivými teplotními podmínkami a pauzami v růstu apothecií. Obdobné pauzy jsou zřetelné ve výzkumu Chandelier *et al.* (2014) i ve výzkumu Dvořák *et al.* (2016).

## 6. 3. Sporulace podmíněná teplotou

Dvořák *et al.* (2016) tvrdí, že největší vliv na produkci spor má vlhkost a ovlhčení listů, naše výsledky naopak ukazují, že jediná prokazatelná závislost je mezi průměrnou teplotou a četností spor. Toto tvrzení potvrzuje i výzkum Chandelier *et al.* (2014), v jejichž 3letém výzkumu se odráží vliv vývoje teploty. Limitující faktor je v daném výzkumu teplota 12 °C.

## 6. 4. Zpoždění výskytu spor

Dvořák *et al.* (2016) uvádí, že vzdušná vlhkost a ovlhčení listu má stěžejní vliv na uvolnění askospor a podporují svými výsledky hypotézu, že největší vliv má ovlhčení listů 1 – 2 dny před zachycením vzdušného inokula. Jejich výsledky ukazují, že nejvyšší korelaci mezi ovlhčením listu a vzdušným inokulem je s 13denním zpožděním. Naše výsledky tento vliv nepotvrzují, naopak ukazují, že jediná prokazatelná závislost je mezi průměrnou teplotou a četností spor z průměru 2 po sobě jdoucích dnů s posunem 10 dnů.

## 7. Závěr

V rámci práce byla vyhodnocena meteorologická data a popsány závislosti mezi jednotlivými veličinami v daném místě a čase. K tomu bylo použito posunů dat, které umožnily nalezení nejvyššího korelačního koeficientu, který poukázal na rychlost vývoje. Výsledky ukázaly, že vývoj je závislý na dlouhodobějším vývoji počasí, jelikož apoteciím trvá než narostou a následně trvá než se spory uvolní. Díky sledování průběhu počasí je možno modelovat pravděpodobný výskyt inokula a zahájit včasnou obranu na základě meteorologických veličin.

Nejméně nákladným opatřením je pečlivá kontrola dováženého a výsadbového materiálu, která má však smysl na plochách, kde zatím nebyly zaznamenány symptomy napadení. Např. Kiristis *et al.* (2012) navrhují výběr fenotypově odolných jedinců. Dále uvádějí odstraňování napadených jedinců před opadem listů, aby nedošlo k opadu listů, které budou v následujícím roce zvyšovat infekční tlak. Forestry Commision (2015) navrhují kritérium pro odstranění jedince poškození koruny nekrózou jasanů více jak 50% a zároveň doporučují neodstraňovat staré jedince, ať v porostech nebo v městských výsadbách, projevující fenologickou odolnost vůči patogenu.

Plošně aplikovatelné jsou chemické prostředky, avšak to pouze u mladých výsadeb nebo ve školkách (Havrdová *et al.* 2013).

Jedním z efektivních opatření by mohlo být odstraňování opadaného listí. Na řapících těchto listů by tak nemohlo dojít k vytvoření apotecií a celý cyklus by mohl být značně zpomalen až znemožněn. To samozřejmě není možné v lesním prostředí, ale například u soliterně rostoucích jedinců ve městech a příměstských částech by to mohlo být běžnou praxí. Právě ve městech dotváří jasany svým majestátným vzhledem prostředí.

Další ze zatím neplošně aplikovaných metod jsou injektáže, které se zatím v republice dostávají do povědomí, ale již probíhají výzkumy a experimenty ověřující

možnosti technik mikro i makroinjektáží. Těmi se zabývají např. Bc. Lucie Rozsypálková, Ing. Petr Martinek, Ing. Jiří Rozsypálek. Zavedení účinné látky přímo do pletiv stromu se zdá být velmi účinnou metodou, která může podpořit rezistenci jedince.

Uvědomme si, že to jsou právě stromy, které přežívají generace a tiše nesou poselství minulosti ukryté ve svých letokruzích a připomínají nám i ve městech, v dnešní uspěchané době, moc přírody.



## 8. Summary

In this work were evaluated meteorological data and described dependence between variables in a given place and time. Data shifts were used to make finding the highest correlative coefficient possible. That refers to progress velocity. Results demonstrates, that progress depends on long-term weather evolution, because it takes some time to apothecia to grow and to release the spores. Thanks to observing weather evolution it is possible to simulate plausible occurrence of the inoculum and start well-timed defence pursuant to meteorologic values.

The least expensive measure is the careful inspection of imported planting material but that makes sense in areas with not reported symptoms of diseases only. For example, Kiristis et al. (2012) suggest to select phenotypically strong individuals. Further they mention the removal of infected individuals before falling leaves to avoid falling leaves, which will increase the infection pressure in the following year. Forestry Commission (2015) suggest more than 50 % damage to the crown caused by the necrosis of ash trees as a criterion for removing the individual, at the same time they recommend not to remove the old individuals, whether in the stands or in urban plantings, showing phenological resistance to the pathogen.

Applicable across the board are chemicals, but only in young plantations or tree nurseries (Havrdová et al. 2013).

One effective measure would be the removal of fallen leaves. This would result in not creating apothecia on the petioles of leaves and whole cycle could be significantly slowed or disabled. This is obviously not possible in a forest, but, for example to a solitary growing trees in urban and suburban areas, this could be a common procedure. Especially in cities, ash trees completes the environment by their majestic appearance.

Another method is grouting, not applied across the board so far. In Czech republic, grouting is only getting known for the present, but research and experiments testing possibilities of micro and macro grouting techniques are already proceeding. These techniques are explored by, for example, Bc. Lucie Rozsypálková, Ing. Petr Martinek, Ing. Jiří Rozsypálek. Grouting active substance directly into the tree seems to be very effective method, which can improve resistance of the individual.

## 9. Seznam použité literatury

BAJER, A., HYBLER, V., JELÍNEK, S., 2008. Geologická charakteristika území ŠLP Křtiny. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. [online]. Citování 29. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://ldf.mendelu.cz/ugp/wp-content/ugp-files/presentace/00-uvod/uvod.html>>.

BARAL, H.O., BEMMANN M., 2014, *Hymenoscyphus fraxineus* vs. *Hymenoscyphus albidus* – A comparative light microscopic study on the causal agent of European ash dieback and related foliicolous, stroma-forming species, *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, 5, 4.

BARAL, O., QUELOZ, V., HOSOYA, T., 2014. The one scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus* 5;79-80.

BARKLUND, P., 2005, Ash dieback takes over south and mid-Sweden. *SkogsEko* 3, 11-3 (in Swedish).

Burkard Manufacturing, 2011. 7 day recording volumetric spore trap [online]. Citováno 21. května 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.burkard.co.uk/7dayst.htm>>.

FORESTRY COMMISSION, 2015. Chalara dieback - Managing ash trees and woodland [online]. Citováno 10. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.forestry.gov.uk/forestry/INFD-92PJKX#top>>.

CECH, T. L., 2006. Echenscha den in Österreich. *Forstschutz Aktuell* 37, 18-20.

Územní teploty v roce 2015. Český hydrometeorologický ústav. [online]. 29. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty>>.

Územní srážky v roce 2015. Český hydrometeorologický ústav. [online]. 29. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-srazky>>.

DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. 2. vyd. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 434 s. ISBN 0-87371-638-8

DVOŘÁK, M., HUMPLÍKOVÁ, Z., 2013 Hymenoscyphus pseudoalbidus spore trapping in the Czech Republic 2012. In COST Action FP1103 FRAXBACK 4th MC Meeting & Workshop “Frontiers in ash dieback research”, 4-6th of September 2013.

DVOŘÁK, M., HUMPLÍKOVÁ, Z., HEJNÁ, M., HAVRDOVÁ, L., FEDUSIV, L. Současné poznatky o nekróze jasanů a výzkum biologie jejího původce za účelem vývoje metod obrany. Zahradnictví. 2013. sv. 2013, č. 9, s. 56--58. ISSN 1213-7596

DVOŘÁK, M., ROTKOVÁ, G., BOTELLA, L., 2016. Detection of Airborne Inoculum of *Hymenoscyphus fraxineus* and *H. albidus* during Seasonal Fluctuations Associated with Absence of Apothecia, Forest, 7 (1), 1.

FORESTRY COMMISSION, 2015. Chalara dieback - Managing ash trees and woodland [online]. Citováno 10. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.forestry.gov.uk/forestry/INFD-92PJKX#top>>.

GROSS, A., ZAFFARANO, P.L., DUO, A., GRÜNIG, C.R., Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Fungal Genet. Biol. 2012, 49, 977–986.

GUTZEROVÁ, N., 2015. *Fraxinus pennsylvanica* [online]. Citováno 28. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://botany.cz/cs/fraxinus-pennsylvanica/>>.

HAVRDOVÁ, L., ČERNÝ, K., 2012. Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu. *Acta Pruhoniana* 100, s. 137 – 145.

HEYDECK, P., BEMMANN, M., KONTZOG, H. G., 2005. Triebsterben an Gemeiner Esche (*Fraxinus excelsior*) im nordostdeutschen Tiefland. *Forst und Holz* 60; 505-6.

HIRST, J.M., 2009. Aerobiology in plant pathology, *Grana*, 30:1, 25-29.

HOSPODSKÝ, D., YAMAMOTO, N., PECCIA, J., 2010, Accuracy, precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 7004–7012.

HORÁČEK, P., 2006a, *Fraxinus excelsior*. [online]. Citováno 8. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://databaze.dendrologie.cz/>>.

HORÁČEK, P., 2006b, *Fraxinus angustifolia*. [online]. Citováno 8. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://databaze.dendrologie.cz/>>.

HUSSON, C., SCALA, B., PASCAL, C., PASCAL, O., FREY, N., 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France *Eur J. Plant Pathology* 130; 311-324 DOI 10.1007/s10658-011-9755-9.

CHANDELIER, A., ANDRÉ, F.; LAURENT, F., 2010. Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR. *For. Pathol.*, 40, 87–95.

CHANDELIER, A., HELSON, M.; DVORAK, M.; Gischer, F., 2014. Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays. *Plant Pathol.*, 63, 1296–1305.

JANKOVSKÝ, L., HOLDENRIEDER, O., 2009. *Chalara fraxinea* – Ash dieback in the Czech Republic. Plant Prot. Sci 45; 74-78.

JANKOVSKÝ, L., PALOVČÍKOVÁ, D., 2009. Nový příklad chřadnutí dřevin v ČR – nekróza jasanů [online]. Citováno 10. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://zahradaweb.cz/novy-priklad-chradnuti-drevin-v-cr-nekroza-jasanu/>>.

JANKOVSKÝ, L., ŠŤASTNÝ, P., PALOVČÍKOVÁ, D., 2009. Nekróza jasanů *Chalara fraxinea* v ČR. Lesnická práce 88 (1); 16-17. ISSN 0322-9254.

JUODVALKIS, A., VASILIAUSKAS, A., 2002. The extend and possible causes of dieback of ash stands in Lithuania. LZUU Mokslo Darbai, Biomedicinos Mokslai 56, 17-22 (in Lithuanian with English summary).

KIRISITS, T., MATLAKOVA, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E., 2008: Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Osterreich? Forstschutz Aktuell, Wien, (43): 29-34.

KIRISITS, T., KRITCH, P., KRUTLER, K., MATLAKOVA, M., HALMSCHLAGER, E., 2012. Ash dieback associated with *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in forest nurseries in Austria. Journal of Agricultural Extension and Rural Development 4(9); 230-235. ISSN 2141-2154.

KOUKOL, O., HAVRDOVÁ, L., 2014. Vřeckovýtrusá zkáza jasanů. Živa 1; 7–10.

KOŠŤÁLOVÁ, V., SÁZELOVÁ, D., 2010. Chřadnutí a odumírání jasanů. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, Praha. 8 s.

KOWALSKI, T., HOLDENRIEDER, O., 2008, Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa. [A new fungal disease of ash in Europe]. Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen. 3; 45-50.

LEUGNEROVÁ, G., *Fraxinus excelsior*, 4. 7. 2007a, [online] citováno 28. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://botany.cz/cs/fraxinus-excelsior/>>.

LEUGNEROVÁ, G., *Fraxinus ornus*, 5. 7. 2007b, [online] citováno 28. dubna 2016. Dostupné na World Wide Web: <<http://botany.cz/cs/fraxinus-ornus/>>.

LACEY, M., WEST, J. The air spora : a manual for catching and identifying airborne biological particles. Dordrecht: Springer, 2006. 156 s. ISBN 978-0-387-30252-2.

LYSKOVÁ, L., 2008. Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně: Lékařská fakulta. 47 s.

MUSIL, I., MÖLLEROVÁ J. Listnaté dřeviny, Přehled dřevin v rámci systému rostlin krytosemenných (Lesnická dendrologie 2). Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2005. 166 s. ISBN 80-213-1367-6.

NÁROVEC, V., TREJTNAROVÁ, J., JANČAŘÍK, V., 2008. Čeká jasany chřadnutí? [Are ash stands expected to decline?]. Lesu zdar 5; 4-6.

OGRIS, N., HAUPTMAN, T., JURC, D., 2009. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. New Dis. Rep. 19. February-August 2009. Dostupné na World Wide Web: [http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease\\_reports/ndr.php?id=019015](http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease_reports/ndr.php?id=019015)>.

OGRIS, N., HAUPTMAN, T., JURC, D., FLOREANCIG, V., NARSICH, F., MONTECCHIO, L., 2010. First report of *Chalara fraxinea* on common ash in Italy. Plant Dis 94, 133.

QUELEZ, V., Grunig C., Berndt R., Kowalsky T., Sieber T., Holdenrieder O., 2011: Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. For. Path. 41 (2011) 133–142

QUITT, E. (1975): Klimatické oblasti ČSR, 1:500 000. – Kartografické nakladatelství, Praha 1975, 570 mm × 760 mm.

PRZYBYŁ, K., 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. For. Pathol 32; 387-394.

SCHIFFTNER, K. C., Air pollution control equipment selection guide. 1.vyd. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. 229 s. ISBN 1-58716-069-2

DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. 2. vyd. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 434 s. ISBN 0-87371-638-8

SZABO, I., 2009. First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. Plant Pathology 58; 797.

THOMSEN, I. M., SKOVSGAARD, J. P., BARKLUND, P., VASAITIS, R., 2007. Fungal disease is the cause of ash dieback. Skoven 39; 234-6 (in Danish).

ÚRADNÍČEK, L., MADĚRA, P., TICHÁ, S., KOBLÍŽEK, J., 2009. Dřeviny České republiky, 2. přeprac. vydání. Lesnická práce, s. r. o., 367 s. ISBN 978-80-87154-62-5.



## 10. Přílohy

Příloha č. 1: Protokol výrobce

Quick-Start Protocol

Sample & Assay Technologies

DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the DNeasy Plant Handbook, which can be found at [www.qiagen.com/handbooks](http://www.qiagen.com/handbooks).

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact).

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1

concentrates.

- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser II, or a mortar and pestle.

2. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation. Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130  $\mu$ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.

4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.
7. Transfer 650 µl of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g. Discard the flowthrough.
9. Add another 500 µl Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100 µl Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g.
12. Repeat step 11.

For up-to-date licensing information and productspecific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, TissueRuptor® (QIAGEN Group).

1071299 04/2012 © 2011–1012 QIAGEN, all rights reserved.

## Příloha č.2 Tabulka výsledků

Datum	Četnost spor	Temp AVG	Temp MIN	Temp MAX	RH AVG	RH MIN	RH MAX	Volt AVG	Volt MIN	Volt MAX
25.4.2015	0	16,22	9,03	20,95	52,3	28,9	88,8	0,008	0,005	0,024
26.4.2015	31500	12,39	7,03	17,90	82,3	57,8	100,0	0,118	0,005	1,587
27.4.2015	44100	13,36	3,74	21,33	75,0	49,1	100,0	0,169	0,005	0,620
28.4.2015	0	9,96	3,31	21,71	86,1	46,1	100,0	1,030	0,005	2,485
29.4.2015	0	5,91	1,17	11,38	81,4	49,7	100,0	1,154	0,015	2,485
30.4.2015	0	7,18	-1,51	14,85	79,8	52,4	100,0	0,196	0,005	0,767
1.5.2015	68400	6,93	1,60	9,82	99,8	95,8	100,0	1,909	0,337	2,417
2.5.2015	0	7,90	1,60	11,38	93,8	74,2	100,0	1,448	0,054	2,407
3.5.2015	1060000	6,62	0,29	11,38	94,6	78,2	100,0	0,449	0,034	1,313
4.5.2015	12600000	12,79	8,63	17,90	96,7	85,7	100,0	1,624	0,063	2,417
5.5.2015	147000	14,97	9,42	20,19	95,5	81,3	100,0	1,335	0,054	2,417
6.5.2015	59100	13,02	9,03	15,23	100,0	100,0	100,0	2,241	1,177	2,437
7.5.2015	0	9,93	4,57	18,28	92,1	74,9	100,0	1,357	0,034	2,446
8.5.2015	135000	10,64	2,03	17,52	81,8	52,0	100,0	0,359	0,005	0,923
9.5.2015	0	12,99	8,23	17,52	91,9	74,5	100,0	0,728	0,015	2,417
10.5.2015	0	10,72	4,57	17,90	84,8	60,9	100,0	1,219	0,034	2,437
11.5.2015	0	9,53	2,03	19,81	75,8	39,7	100,0	0,134	0,005	0,474
12.5.2015	0	11,72	1,17	20,95	75,8	44,7	100,0	0,204	0,005	2,300
13.5.2015	0	12,98	9,82	17,90	86,4	67,6	100,0	1,140	0,024	2,456
14.5.2015	0	10,28	3,31	16,76	92,3	84,8	100,0	0,944	0,024	2,446
15.5.2015	3750000000	9,05	1,60	17,14	83,9	57,0	100,0	0,235	0,005	0,796
16.5.2015	0	11,27	1,60	21,33	74,5	37,4	100,0	0,160	0,005	0,503
17.5.2015	125000	11,34	5,81	15,62	78,7	58,3	93,8	0,034	0,005	0,308
18.5.2015	0	11,25	1,17	20,57	77,5	39,5	100,0	0,042	0,005	0,132
19.5.2015	0	13,82	9,03	21,71	88,4	62,2	100,0	0,376	0,015	2,397
20.5.2015	0	10,52	7,43	14,09	99,6	93,8	100,0	2,388	2,163	2,437
21.5.2015	0	8,86	7,43	10,21	100,0	100,0	100,0	2,406	2,388	2,417
22.5.2015	27100	9,54	5,81	13,32	95,3	82,8	100,0	1,545	0,063	2,388
23.5.2015	0	10,01	9,03	12,55	95,5	81,1	100,0	1,551	0,034	2,427
24.5.2015	0	10,08	9,03	11,38	100,0	100,0	100,0	2,380	2,349	2,397
25.5.2015	0	11,96	6,22	16,38	93,8	76,4	100,0	1,471	0,171	2,378
26.5.2015	0	10,66	7,83	12,55	100,0	100,0	100,0	1,559	0,894	2,144
27.5.2015	44900000	7,32	4,57	9,42	100,0	100,0	100,0	2,073	1,919	2,192
28.5.2015	63700	7,87	4,15	10,99	95,8	82,1	100,0	1,057	0,093	1,909
29.5.2015	0	11,17	2,03	19,42	87,0	58,4	100,0	0,237	0,024	0,669
30.5.2015	137000	12,78	7,83	19,81	95,9	68,2	100,0	1,264	0,024	2,397
31.5.2015	24700	11,19	5,40	17,14	93,9	72,0	100,0	2,263	2,026	2,437
1.6.2015	0	15,03	9,82	20,95	93,1	72,9	100,0	1,210	0,093	2,056

2.6.2015	0	15,73	9,42	22,86	89,2	65,4	100,0	0,415	0,024	1,060
3.6.2015	0	18,30	10,60	28,70	85,3	48,3	100,0	0,200	0,015	0,552
4.6.2015	34300	16,56	10,21	25,56	79,8	42,1	100,0	0,101	0,005	0,337
5.6.2015	158000	15,01	6,22	25,95	70,8	31,5	100,0	0,054	0,005	0,210
6.6.2015	124000	17,00	7,83	27,52	81,3	43,8	100,0	0,062	0,005	0,210
7.6.2015	49000	18,89	10,60	29,90	76,9	37,3	100,0	0,080	0,005	0,288
8.6.2015	3540000	17,12	13,32	20,57	78,5	68,6	90,1	0,018	0,015	0,034
9.6.2015	167000	15,70	11,38	22,48	77,1	51,4	98,6	0,027	0,005	0,151
10.6.2015	140000	15,03	9,03	23,24	79,0	47,7	100,0	0,030	0,005	0,093
11.6.2015	55400	16,45	8,63	26,34	78,9	42,6	100,0	0,039	0,005	0,112
12.6.2015	64300	19,74	13,32	27,52	79,0	55,1	100,0	0,031	0,005	0,073
13.6.2015	18900	20,32	12,93	28,70	80,5	48,5	100,0	0,341	0,005	2,427
14.6.2015	82400	17,42	12,93	23,63	95,1	80,1	100,0	1,926	0,171	2,466
15.6.2015	0	14,06	10,99	16,38	100,0	100,0	100,0	2,150	1,782	2,437
16.6.2015	0	12,04	7,83	17,52	90,6	74,3	100,0	1,537	0,190	2,446
17.6.2015	1210000	10,15	5,81	13,32	90,8	76,7	100,0	0,159	0,024	0,376
18.6.2015	42500	10,97	4,15	15,62	94,0	79,3	100,0	0,222	0,034	0,483
19.6.2015	0	12,04	8,63	13,70	94,4	80,2	100,0	0,423	0,034	1,157
20.6.2015	121000	9,74	5,81	12,55	97,7	81,1	100,0	1,397	0,034	2,427
21.6.2015	0	9,76	5,81	12,55	97,8	87,3	100,0	2,240	1,880	2,437
22.6.2015	185000	11,01	5,81	15,62	100,0	100,0	100,0	2,211	1,821	2,456
23.6.2015	0	10,37	7,43	12,16	100,0	100,0	100,0	2,392	2,358	2,427
24.6.2015	0	9,84	4,57	14,47	98,0	84,8	100,0	1,585	0,425	2,427
25.6.2015	87100	11,76	4,99	18,66	85,7	53,9	100,0	0,383	0,015	1,274
26.6.2015	34600	14,86	7,43	22,48	82,7	51,1	100,0	0,093	0,015	0,317
27.6.2015	75500	15,45	12,55	19,04	92,3	80,6	100,0	0,081	0,015	0,269
28.6.2015	0	14,68	10,21	19,04	91,2	77,0	100,0	0,975	0,015	2,437
29.6.2015	147000	13,22	7,43	18,28	91,0	61,7	100,0	0,165	0,015	0,474
30.6.2015	19400	15,39	7,43	22,48	85,2	59,4	100,0	0,135	0,015	0,405
1.7.2015	165000	18,32	11,38	27,91	76,9	44,7	100,0	0,066	0,005	0,210
2.7.2015	83300	19,02	11,38	29,10	66,9	33,0	100,0	0,029	0,005	0,093
3.7.2015	75500	19,21	10,99	28,70	69,7	38,7	100,0	0,019	0,005	0,063
4.7.2015	101000	20,07	11,38	29,50	69,5	35,0	100,0	0,028	0,005	0,103
5.7.2015	0	21,59	12,55	31,12	68,2	37,0	100,0	0,017	0,005	0,054
6.7.2015	0	21,52	13,70	31,52	73,6	33,5	98,8	0,016	0,005	0,044
7.7.2015	0	22,73	14,09	31,93	69,8	35,4	100,0	0,026	0,005	0,093
8.7.2015	133000	18,70	14,09	21,71	95,3	78,6	100,0	1,522	0,015	2,466
9.7.2015	0	12,37	7,83	18,66	94,4	87,0	100,0	1,043	0,034	2,427
10.7.2015	0	10,87	4,15	16,38	78,2	49,1	100,0	0,249	0,005	1,001
11.7.2015	30600	13,99	3,74	22,09	68,5	34,0	100,0	0,031	0,005	0,142
12.7.2015	0	17,81	7,83	26,73	68,5	35,0	100,0	0,024	0,005	0,093
13.7.2015	66400	15,69	13,70	18,28	91,9	74,9	100,0	1,652	0,015	2,456
14.7.2015	29300	15,80	12,55	19,04	96,5	85,7	100,0	1,303	0,034	2,446
15.7.2015	27500	17,09	13,32	20,95	84,5	64,0	100,0	0,171	0,015	0,562
16.7.2015	0	18,90	9,42	26,73	73,3	41,9	100,0	0,136	0,005	0,474
17.7.2015	53900	21,49	13,32	31,93	73,1	31,9	100,0	0,565	0,005	2,427
18.7.2015	51600	20,57	13,70	29,50	81,1	37,9	100,0	1,552	0,005	2,437

19.7.2015	140000	21,31	14,47	29,90	85,5	46,2	100,0	1,717	0,005	2,446
20.7.2015	0	19,91	15,62	25,17	77,5	46,7	100,0	1,028	0,005	2,456
21.7.2015	33000	21,85	12,93	30,71	72,1	39,4	100,0	0,147	0,005	0,649
22.7.2015	0	23,98	15,62	32,76	64,6	34,4	100,0	0,098	0,005	0,444
23.7.2015	0	20,73	17,90	24,79	83,8	66,6	99,0	0,355	0,015	2,271
24.7.2015	2280000	22,55	15,23	29,50	66,9	40,5	88,5	0,032	0,005	0,103
25.7.2015	0	21,66	14,85	25,56	77,0	52,4	100,0	0,422	0,005	2,446
26.7.2015	0	14,42	9,42	19,04	78,0	43,1	100,0	1,120	0,005	2,456
27.7.2015	220000	13,07	8,23	17,14	97,8	88,5	100,0	1,896	0,063	2,417
28.7.2015	177000	14,49	9,82	18,28	97,3	87,1	100,0	1,923	0,591	2,417
29.7.2015	145000	14,83	11,77	18,66	92,1	79,1	100,0	1,138	0,015	2,397
30.7.2015	663000	12,99	8,23	17,90	85,3	65,4	100,0	1,115	0,015	2,417
31.7.2015	310000	13,89	7,43	21,71	72,1	42,9	100,0	0,081	0,005	0,298
1.8.2015	221000	16,80	9,82	24,01	62,6	33,5	90,2	0,016	0,005	0,044
2.8.2015	0	16,53	13,32	21,71	79,6	56,5	91,8	0,022	0,005	0,044
3.8.2015	139000	20,25	12,55	27,52	70,8	41,7	96,0	0,028	0,005	0,083
4.8.2015	58800	20,84	12,93	29,10	72,6	40,1	100,0	0,065	0,005	0,220
5.8.2015	0	21,76	15,23	28,31	74,4	49,0	100,0	0,039	0,005	0,142
6.8.2015	0	23,44	16,00	32,34	65,9	36,9	96,1	0,024	0,005	0,093
7.8.2015	62400	23,61	16,00	32,76	64,6	30,3	98,9	0,019	0,005	0,063
8.8.2015	0	24,03	16,00	31,93	64,6	33,4	98,9	0,020	0,005	0,063
9.8.2015	0	23,47	15,62	31,93	60,7	28,4	96,1	0,014	0,005	0,044
10.8.2015	0	23,58	15,62	31,93	60,8	27,3	98,9	0,016	0,005	0,063
11.8.2015	0	22,06	16,00	31,12	77,2	34,0	100,0	0,724	0,005	2,437
12.8.2015	24900	22,05	16,76	29,50	80,3	43,4	100,0	1,023	0,005	2,446
13.8.2015	0	24,02	16,00	31,12	61,3	35,4	91,8	0,032	0,005	0,122
14.8.2015	0	24,03	16,76	31,52	60,0	33,0	88,5	0,009	0,005	0,024
15.8.2015	0	23,73	17,52	30,31	60,7	36,7	85,7	0,009	0,005	0,015
16.8.2015	0	21,29	17,14	26,73	73,4	48,3	96,1	0,116	0,005	0,942
17.8.2015	0	18,17	17,52	19,81	96,4	87,0	100,0	1,479	0,034	2,417
18.8.2015	0	14,82	13,32	17,52	100,0	100,0	100,0	2,096	2,026	2,192
19.8.2015	71500	14,42	13,32	15,62	100,0	100,0	100,0	2,086	2,026	2,134
20.8.2015	0	12,83	8,23	16,38	93,9	75,3	100,0	1,701	0,171	2,222
21.8.2015	102000	13,70	8,63	19,04	81,7	49,7	100,0	0,310	0,005	1,021
22.8.2015	0	13,62	7,43	19,42	77,6	44,9	100,0	0,068	0,005	0,278
23.8.2015	35600	14,68	9,42	19,04	84,0	65,0	100,0	0,041	0,005	0,132
24.8.2015	565000	17,55	13,70	21,33	82,7	69,3	98,7	0,032	0,015	0,112
25.8.2015	0	15,23	10,21	17,90	93,1	80,6	100,0	1,309	0,015	2,280
26.8.2015	194000	13,28	7,03	20,19	86,3	57,6	100,0	0,944	0,005	2,075
27.8.2015	556000	15,60	8,23	22,86	87,3	65,6	100,0	0,120	0,015	0,337
28.8.2015	0	18,89	13,32	24,40	93,0	73,6	100,0	0,310	0,015	0,806
29.8.2015	0	20,17	15,23	26,34	88,0	64,0	100,0	0,201	0,015	0,503
30.8.2015	0	20,66	15,23	27,12	83,3	60,3	100,0	0,106	0,015	0,366
31.8.2015	0	19,77	13,32	27,52	81,2	47,7	100,0	0,077	0,005	0,229
1.9.2015	0	18,97	12,93	25,95	83,6	59,8	100,0	0,046	0,005	0,122
2.9.2015	0	15,92	13,32	17,52	90,4	76,2	100,0	0,940	0,024	2,388
3.9.2015	0	13,59	8,63	17,14	93,9	74,0	100,0	2,202	1,196	2,427
4.9.2015	71100	13,46	10,21	15,23	100,0	100,0	100,0	2,363	2,319	2,407

5.9.2015	207000	12,31	9,82	15,62	95,3	84,8	100,0	2,211	1,880	2,339
6.9.2015	516000	10,42	8,63	12,16	87,7	71,4	100,0	0,802	0,015	1,860
7.9.2015	321000	10,02	6,62	12,55	88,4	68,3	100,0	0,576	0,015	2,212
8.9.2015	111000	8,26	4,57	12,93	92,4	69,4	100,0	1,640	0,073	2,349
9.9.2015	46300	9,45	7,03	12,16	98,1	88,7	100,0	1,921	0,259	2,417
10.9.2015	0	11,15	7,83	15,62	89,5	60,9	100,0	1,369	0,015	2,388
11.9.2015	71800	11,86	9,82	13,70	98,1	91,8	100,0	0,534	0,073	1,528
12.9.2015	35900	13,49	11,38	17,14	94,6	79,1	100,0	0,333	0,024	0,669
13.9.2015	214000	14,28	9,03	19,04	86,7	70,8	100,0	0,273	0,015	0,688
14.9.2015	0	16,26	12,93	19,04	80,3	68,0	100,0	0,339	0,015	2,427
15.9.2015	10300	13,01	8,63	16,38	100,0	100,0	100,0	2,426	2,417	2,437
16.9.2015	nedetek.	15,18	10,99	19,04	97,1	88,4	100,0	2,136	1,089	2,427
17.9.2015	10300	17,13	11,38	22,48	90,2	72,9	100,0	1,019	0,083	1,948
18.9.2015	10300	13,50	10,21	16,38	87,1	74,6	100,0	0,326	0,034	0,796
19.9.2015	0	12,35	8,23	16,00	98,8	93,8	100,0	2,439	2,407	2,456
20.9.2015	0	11,19	6,22	14,47	92,3	74,8	100,0	1,485	0,044	2,407
21.9.2015	1560000	8,11	2,46	13,70	92,0	72,9	100,0	0,507	0,015	1,255
22.9.2015	nedetek.	9,37	2,03	16,00	86,7	59,6	100,0	0,161	0,015	0,435
23.9.2015	218000	12,31	9,82	16,00	86,4	68,4	96,0	0,070	0,015	0,181
24.9.2015	0	12,51	9,82	16,76	86,9	72,5	96,0	0,060	0,015	0,122
25.9.2015	0	12,50	11,38	14,47	87,7	82,9	91,9	0,053	0,024	0,112
26.9.2015	0	10,74	6,62	13,32	87,5	70,4	100,0	0,256	0,015	1,626
27.9.2015	0	9,46	6,22	14,47	82,9	53,1	98,5	0,100	0,005	0,278
28.9.2015	0	8,05	3,31	14,47	81,2	50,0	100,0	0,141	0,005	0,474
29.9.2015	0	7,75	2,89	13,70	83,3	60,7	100,0	0,082	0,015	0,347
30.9.2015	0	5,90	1,17	10,60	79,6	51,4	100,0	0,059	0,005	0,220
1.10.2015	33500	5,02	-0,16	12,93	81,9	48,9	100,0	0,060	0,005	0,220
2.10.2015	0	6,05	0,29	14,85	84,6	56,0	100,0	0,063	0,005	0,171
3.10.2015	0	10,74	4,99	17,14	86,1	64,7	98,4	0,070	0,015	0,151
4.10.2015	69400	11,97	9,42	14,47	93,9	82,7	100,0	0,225	0,034	0,454
5.10.2015	76100	11,44	7,03	16,38	93,4	78,4	100,0	0,294	0,024	0,718
6.10.2015	0	10,39	4,57	16,00	93,7	79,9	100,0	0,230	0,024	0,474
7.10.2015	0	13,23	11,38	16,00	90,7	78,4	100,0	0,180	0,024	0,454
8.10.2015	0	11,14	8,63	12,93	95,2	83,9	100,0	1,219	0,054	1,968
9.10.2015	22900	9,02	5,40	10,99	97,1	91,9	100,0	2,325	1,313	2,456
10.10.2015	0	5,18	2,46	7,83	81,5	64,1	98,3	1,300	0,015	2,407
11.10.2015	0	4,49	2,89	6,22	60,9	53,2	69,5	0,014	0,005	0,015
12.10.2015	0	1,77	0,29	3,74	74,3	66,1	83,7	0,016	0,015	0,024
13.10.2015	0	1,47	-2,44	4,15	93,5	84,6	100,0	0,596	0,024	2,407
14.10.2015	0	6,40	4,57	7,43	100,0	100,0	100,0	2,424	2,397	2,456
15.10.2015	0	8,43	7,03	9,82	100,0	100,0	100,0	2,394	2,378	2,407
16.10.2015	0	10,03	9,03	10,60	100,0	100,0	100,0	2,403	2,388	2,417
17.10.2015	0	6,90	2,03	9,03	100,0	100,0	100,0	2,385	2,368	2,407
18.10.2015	0	3,92	-0,16	7,83	100,0	100,0	100,0	2,371	2,368	2,378
19.10.2015	0	6,05	4,99	7,03	100,0	100,0	100,0	2,394	2,368	2,427
20.10.2015	0	4,96	2,89	5,81	100,0	100,0	100,0	2,419	2,407	2,427
21.10.2015	0	6,23	4,57	7,83	100,0	100,0	100,0	2,410	2,388	2,427
22.10.2015	0	6,08	4,57	7,83	99,5	98,3	100,0	2,344	2,251	2,397

23.10.2015	51300	6,50	2,03	9,03	97,8	91,9	100,0	2,147	1,860	2,310
24.10.2015	0	2,86	-1,06	9,03	98,9	93,8	100,0	1,810	1,411	1,948
25.10.2015	0	5,46	0,29	9,82	98,8	95,9	100,0	1,626	1,206	1,880
26.10.2015	0	6,38	3,31	9,82	92,7	74,9	100,0	0,686	0,034	1,460
27.10.2015	0	6,81	3,74	9,82	92,2	79,1	98,4	0,273	0,034	0,435
28.10.2015	0	7,57	5,40	9,82	86,8	77,7	93,8	0,112	0,034	0,278
29.10.2015	0	7,50	6,62	7,83	92,5	87,5	98,4	0,229	0,103	0,581
30.10.2015	0	6,70	3,31	7,83	99,8	98,3	100,0	0,701	0,601	0,747
31.10.2015	0	4,58	0,29	10,21	96,9	84,0	100,0	0,618	0,396	0,874
1.11.2015	0	4,16	-0,61	9,42	83,0	52,8	100,0	0,337	0,015	0,786
2.11.2015	0	1,15	-1,97	8,63	86,0	53,7	98,2	0,263	0,015	0,542
3.11.2015	0	0,28	-4,33	9,03	84,8	54,0	98,3	0,217	0,015	0,767
4.11.2015	0	0,68	-2,90	7,83	90,8	76,8	100,0	0,284	0,034	0,610
5.11.2015	0	1,83	-1,97	9,82	91,7	76,0	100,0	0,477	0,044	1,177
6.11.2015	0	4,20	-1,51	12,55	92,2	75,1	100,0	0,389	0,024	0,591
7.11.2015	0	8,35	4,15	12,55	99,3	95,9	100,0	1,625	0,474	2,407
8.11.2015	0	8,63	2,89	13,70	97,9	90,2	100,0	2,398	2,368	2,417
9.11.2015	0	6,80	1,17	11,77	99,7	98,2	100,0	2,396	2,358	2,417
10.11.2015	0	11,44	9,82	14,09	90,1	76,1	100,0	1,559	0,220	2,417
11.11.2015	0	11,41	8,23	13,70	90,7	83,8	96,0	0,946	0,259	2,114
12.11.2015	0	6,53	2,89	9,03	93,3	81,4	100,0	0,875	0,073	1,636
13.11.2015	0	4,44	-0,61	9,03	92,2	81,4	100,0	0,706	0,093	1,235
14.11.2015	0	4,85	2,46	7,03	91,9	66,7	100,0	2,345	0,796	2,437
15.11.2015	0	5,82	3,74	9,03	98,5	92,0	100,0	2,418	2,378	2,437