



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

## ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a zemědělské biotechnologie

### Diplomová práce

Vertikální gradient výskytu spór *Hymenoscyphus  
fraxineus* na infikované lokalitě v Boršově nad Vltavou

Autor práce: Bc. Petr Štoidl

Vedoucí práce: Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.

Konzultant práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice

2021

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Petr ŠTOIDL  
Osobní číslo: Z19050  
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie  
Téma práce: Vertikální gradient výskytu spór *Hymenoscyphus fraxineus* na infikované lokalitě v Boršově nad Vltavou  
Zadávací katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

### Zásady pro vypracování

Kvantitativně popsat výskyt spór původce nekrózy jasanů v různých výškách nad zdrojem infekce.

Zvážit potenciál inokula této patogenní houby v šíření na větší vzdálenosti pomocí vzdušných proudů.

Zásady vypracování:

V literárním přehledu autor uvede základní fakta o patogenu *H. fraxineus* (taxonomické zařazení, historie šíření u nás i ve světě, životní cyklus, symptomy a hostitelské spektrum) a širěji rozvede způsob šíření tohoto patogenu včetně biotických a abiotických faktorů, které k němu přispívají.

Metodiku experimentu bude autor optimalizovat v úzké spolupráci s vedoucím práce (konzultantem). Během jedné sezóny bude autor po dobu výskytu apothecií *H. f.* v pravidelných intervalech vzorkovat ovzduší pomocí rotačních lapačů spór (ROTTRAP). Vzorkování budou prováděna současně v několika výškách na výškové budově (sila) v Boršově nad Vltavou. Autor bude bezpodmínečně dodržovat pravidla bezpečnosti práce. Kvantifikaci vzorků autor provede pomocí extrakce DNA a kvantitativní PCR.

Výsledky budou podány ve srozumitelné grafické formě a budou podepřeny statistickou analýzou dat.

Diskuze bude směřována ke srovnání s dosavadní literaturou týkající se šíření inokula původce nekrózy jasanů, případně obdobných fytopatogenních hub.

V závěru práce autor shrne poznatky svých výsledků a vyvodí z nich závěry mj. např. o dopadu šíření inokula na lokální ekosystém.

Rozsah pracovní zprávy: 40 – 50 stran

Rozsah grafických prací: 10 – 15 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

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.

DVOŘÁK, M.; ROTKOVÁ, G.; BOTELLA SÁNCHEZ, L.: Detection of airborne inoculum of *Hymenoscyphus fraxineus* and *H. albidus* during seasonal fluctuations associated with absence of apothecia. *Forests*. 2016. sv. 7, č. 1, ISSN 1999-4907.

CHANDELIER, A.; HELSON, M.; DVOŘÁK, M.; GISCHER, F.: Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays. *Plant Pathology*. 2014. sv. 63, č. 6, s. 1296–1305. ISSN 0032-0862.

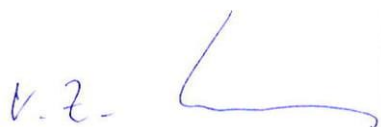
URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12218/abstract>

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.**  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: **24. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. dubna 2021**



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**   
**V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**  
studijní oddělení  
Studentská 1688, 37005 České Budějovice



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne .....

Podpis

## Abstrakt

*Hymenoscyphus fraxineus* je vřeckovýtrusná patogenní houba způsobující nekrózu jasanů po celé Evropě, šířící se převážně vzduchem za pomoci askospor. Cílem práce bylo kvantifikovat výskyt spor *H. fraxineus* v různých výškách nad zdrojem infekce. Z těchto výsledků následně zvážit potenciál inokula této patogenní houby v šíření na větší vzdálenosti pomocí vzdušných proudů. K detekci a kvantifikaci koncentrace DNA spor byla použita metoda qPCR. Na základě statistické analýzy získaných molekulárních dat byla prokázána závislost výskytu rozdílného množství spor *H. fraxineus* na výšce. Hlavním přínosem této práce je zmapování dosahu šíření patogenu *H. fraxineus* ve vzduchovém sloupci, což přímo souvisí i s doletem spor do větších vzdáleností.

**Klíčová slova:** Nekróza jasanů, Jasan ztepilý, *Fraxinus excelsior*, qPCR, lapač spór

## Abstract

*Hymenoscyphus fraxineus* is a pathogenic sac fungus causing ash tree necrosis throughout Europe, spreading predominantly through the air using ascospores. The aim of this thesis was to quantitatively describe the occurrence of spores of the causative agent of ash trees necrosis at different heights above the source of infection. The results were subsequently used to consider the inoculum potential of this pathogenic fungus for longer distance spreading using air currents. The qPCR method was used for the detection and quantification of DNA concentration. Based on a statistical analysis of the obtained molecular data a dependence of the occurrence of different amounts of *H. fraxineus* on height was proved. The main contribution of this thesis lies in charting the range of the *H. fraxineus* pathogen spread in the air column which is directly related to the range of spores to greater distances.

**Keywords:** ash dieback, European ash, *Fraxinus excelsior*, qPCR, spore trap

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěl poděkovat mému vedoucímu diplomové práce Ing. Miloňovi Dvořákovi, Ph.D. za rady, které mi poskytoval v terénu, v laboratoři i během psaní diplomové práce a za neutichající příval připomínek. Dále bych chtěl poděkovat doc. Ing. Michaelu Rostovi Ph.D. za statistické vyhodnocení. V neposlední řadě chci poděkovat Ing. Janu Harenčákovi za pomoc, cyklovýlety do Boršova nad Vltavou na odběr vzorků a za kritický názor, který se mi nebál říct.

# Obsah

Úvod.....	7
1 Teoretická část .....	9
1.1 Rod Jasan ( <i>Fraxinus</i> ).....	9
1.1.1 Jasan ztepilý ( <i>Fraxinus excelsior</i> ).....	9
1.1.2 Jasan úzkolistý ( <i>Fraxinus angustifolia</i> ) .....	11
1.2 <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	12
1.2.1 Popis, taxonomie .....	12
1.2.2 Výskyt <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> a historie šíření.....	13
1.2.3 <i>Hymenoscyphus albidus</i> a jeho role ve výzkumu chřadnutí jasanů .....	14
1.2.4 Životní cyklus a šíření infekce .....	15
1.2.5 Symptomy infekce .....	16
1.2.6 Obrana a ochrana proti <i>H. fraxineus</i> .....	18
1.3 Lapače spór s rotujícími rameny ROTTRAP .....	20
1.4 Molekulární metody použité k detekci <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> .....	22
1.4.1 Extrakce DNA.....	22
1.4.2 PCR .....	22
1.4.3 Real-time PCR .....	24
2 Hypotézy a cíle práce .....	29
2.1 Hypotézy .....	29
2.2 Cíle .....	29
3 Materiál a metodika.....	30
3.1 Terénní práce .....	30
3.1.1 Charakteristika území určeného pro monitoring.....	30
3.1.2 Odběr vzorků z lapače spór ROTTRAP 52.....	31
3.2 Laboratorní práce .....	33
3.2.1 Izolace DNA DNeasy® Plant Mini Kit .....	33

3.2.2	Příprava plazmidu .....	34
3.2.3	Klonování inzertu do plazmidu.....	36
3.2.4	Real-time PCR .....	40
4	Výsledky .....	43
5	Diskuse.....	47
	Závěr .....	50
	Seznam použité literatury.....	51
	Přílohy .....	60
	Seznam obrázků .....	67
	Seznam tabulek .....	68



---

## Úvod

Onemocnění plodin způsobená houbami mají vážný celosvětový ekonomický dopad. Ztráty plodin způsobené houbovými patogeny představují velkou hrozbu pro zemědělství i globální potravinovou bezpečnost a mohou způsobit obrovské a nenapravitelné změny v ekosystémech. Jednou z takových nemocí je Nekróza jasanů způsobená vrčkovýtrusou houbou *Hymenoscyphus fraxineus* (dále jen *H. fraxineus*). Kvůli tomuto patogenu asijského původu hrozí, že se dramaticky změní složení a fungování ekosystémů s podílem jasanů.

Jasan se do nedávna považoval za jednu z posledních dřevin, která neměla vážné problémy s patogeny. V uplynulých dvaceti letech ovšem došlo k rapidnímu odumírání jasanů, způsobené invazivní patogenní houbou *H. fraxineus*. Do té doby se zde vyskytoval pouze *Hymenoscyphus albidus* (dále jen *H. albidus*), která je blíže příbuzná s *H. fraxineus*, ale má výrazně odlišné biologické chování. *H. albidus* je vrčkovýtrusná houba rozšířená v Evropě chovající se jako saprofyt rozkládající padlé řapíky jasanu, která není považována za patogenní. V současné době je tato choroba jedním ze zásadních problémů evropského lesnictví.

*H. fraxineus* je smrtelnou invazivní patogenní houbou rozvíjející se pod kůrou a ve dřevě, kde ničí kambium a zabraňuje toku asimilátů a vody. Tento patogen je původem z východní Asie (Hosoya et al., 1993) a je hlavním původcem odumírání jasanů v Evropě (Kowalski a Holdenrieder, 2008). Napadá jak jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.), tak jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* L.) bez rozdílů stáří či výskytu stromů (volně rostoucí jedinci, lesy, města). Později žije jako saprofyt na opadaných řapících, z nichž se dále rozšiřuje.

Nekróza jasanů je poměrně nové onemocnění prvně popsané roku 2006 v Polsku T. Kowalskim způsobené houbou pojmenovanou *Chalara fraxinea* (dále jen *Ch. fraxinea*) (Kowalski, 2006), ačkoliv chřadnutí jasanů bylo popisováno již dříve. V několika následujících letech došlo k rozšíření po celé přirozené oblasti výskytu hostitele s výjimkou Španělska a jižní Itálie.

Vzhledem k závažnosti odumírání jasanů je *H. fraxineus* umístěn na seznamu výstrah EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) od roku 2007 (EPPO Global database, 2007).

---

Detekce patogenu spočívala v jeho izolaci na agaru se sladovým extraktem (Kowalski, 2006). Jednalo se o časové i pracně velice náročnou metodu, která nemusela vést ke správné detekci. Důvodem byl špatný růst na umělých mediích a fakt, že *H. fraxineus* je téměř morfologicky nerozeznatelná od *H. albidus*, což vedlo k přechodu na molekulární metody. Z tohoto důvodu byly navrženy metody pro detekci pomocí PCR přímo z rostlinných tkání (Bakys et al., 2009). I tato metoda měla své nedostatky, proto se začalo přecházet na qPCR, která dává možnost rychlé a přesné detekce patogenu (Atallah et al., 2007; Chandelier et al., 2010).

I když se v současné době civilizační vývoj neustále zrychluje a díky novým poznatkům a technologiím dochází ke stále většímu poznání, doposud neexistuje účinná metoda v boji s tímto onemocněním. Existují pouze určitá doporučení, kterými lze chorobu do jisté míry omezit. V současné době se několik vědeckých týmů snaží přijít na princip přenosu a možnosti přirozené rezistence jasanů. Jeden z takových týmů se nachází v Královské botanické zahradě, Kew, která je veřejnou institucí ve Velké Británii.

---

# 1 Teoretická část

## 1.1 Rod Jasan (*Fraxinus*)

Rod *Fraxinus* zahrnuje rostliny z řádu hluchavkotvaré (*Lamiales*) a čeledi olivovníkovité (*Oleaceae*). Jedná se o většinou opadavé stromy, jež mají vstřícné lichozpeřené listy. Bezobalné květy rostou v latovitých či hroznovitých květenstvích. Plodem je křídlatá nažka. Stromy patřící do tohoto rodu dorůstají výšky až 40 m. Rod *Fraxinus* je rozšířen především v mírném pásu severní polokoule s oblastmi zasahujícími do tropů a subtropů. Celkově obsahuje přibližně 48 druhů, přičemž v České republice rostou dva původní druhy, Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) a Jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia*) (Úradníček et al., 2009). Jedná se o šestou nejrozšířenější dřevinu v České republice.

Jasan má tvrdé, houževnaté, pružné a dobře opracovatelné dřevo sloužící k výrobě sportovního náčiní, hudebních nástrojů, násad a nábytku (Musil a Möllerová, 2005). Dále se využívá jako ochranný pás v lese či se vysazuje jako alejový strom (Úradníček et al., 2009). Dříve byly jasanů využívány v léčitelství díky zdroji éterických olejů, terpenů a tríslovin. Zmínku o jasanu lze nalézt i v mytologiích. Např. v severské mytologii zaujímá důležitou roli strom Yggdrasil (světový strom), znázorňovaný jako vždyzelený jasan, který prorůstá všemi devíti světy (Pautasso et al., 2013).

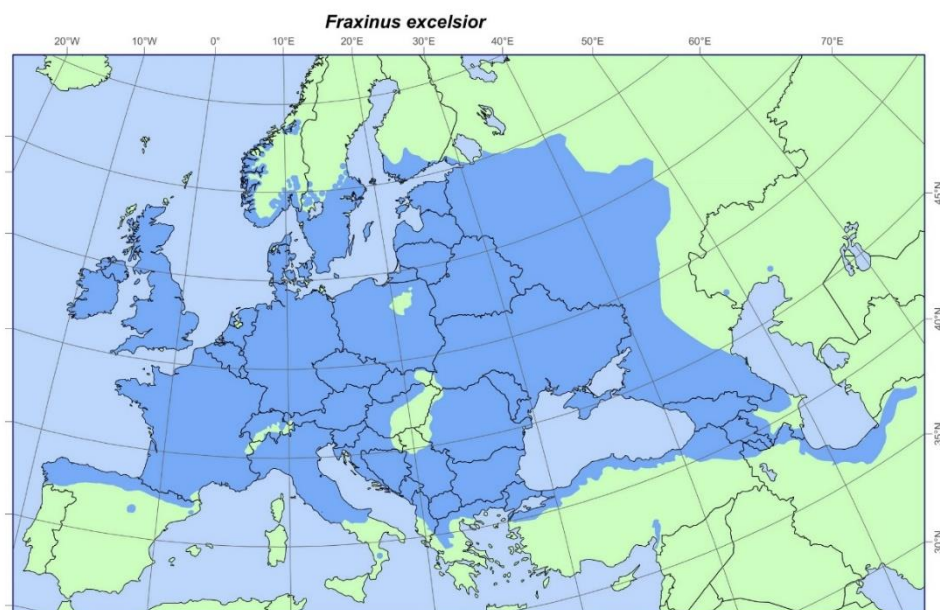
### 1.1.1 Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*)

Jedná se o velice statný strom dorůstající výšky okolo 30-40 metrů, průměru kmene přes 1,5 m a stáří i přes 250 let. Kmen má přímý s podlouhle vejcovitou řídkou korunou. Po obvodu koruny vyrůstají ze vstřícných černých pupenů 3-7 jařmé lichozpeřené listy dlouhé 20-25 cm (Musil a Möllerová, 2005). Jednotlivé lístky mají tvar vejčitý, dlouze zašpičatělý, a jsou přisedlé u řapíku. Během podzimu listy nemění barvu a opadávají zelené (Úradníček et al., 2009). Jasan kvete každoročně. Květenství mají malý hroznovitý tvar s mnohomanželnými květy a vyrůstají z postranních pupenů před samotným olistěním (Hrnčířiková, 2016).

Území rozšíření Jasanu ztepilého pokrývá velké území Evropy. Od severní části Íránu, severní hranice Turecka, Řecka, Itálie a Španělska až po jižní část Skandinávie.

---

Na východ rozšíření sahá až po Ural, Kavkaz až Kaspické moře a v západní Evropě obsazuje Francii a Velkou Británii (viz. Obr. 1).



Obrázek 1: Rozšíření Jasanu ztepilého v Evropě (EUFORGEN, 2016)

Jasan ztepilý se v ČR vyskytuje ve třech ekotypech: vápencový, lužní, horský. Rozdíly v těchto ekotypech jsou především v nárocích na vláhu, jelikož vápencový je přizpůsoben nedostatku vody, zatímco lužní a horských potřebují vláhu po celý rok. Lužní ekotyp jasanu se nachází v záplavových lužních oblastech. Horský ekotyp jasanu vyžaduje dobrou vláhu, často se vyskytuje na suťových prameništích stráních až okolo 1000 m. n. m. (Úradníček et al., 2009). Mezi nežádoucí podmínky, které jasanům neprospívají, patří: stagnující vody, rašelinné podklady, zasolené půdy i silné mrazy. Pro růst vyžadují dostatečnou živnost, proto jsou jasanové řazeny mezi tzv. náročné listnáče. Výskyt jasanů může být tedy i ukazatelem kvality půdy (Úradníček et al., 2009; Pautasso et al., 2013).

### **Význam jasanu ztepilého**

Jasan ztepilý či jiné druhy jasanů mají v Evropě význam ekologický i ekonomický. Bohužel nekróza jasanů v Evropě zasahuje jasanové porosty všech věkových stupňů. Řada odborníků má proto pesimistický pohled na vývoj epidemie. Uvažuje se i o kolapsu celé jasanové populace (McKinney et al., 2011). Nejvíce ohrožené jsou plochy s větším zastoupením jasanů (jasano-olšové luze či břehové porosty). Velký dopad má

---

tento patogen i ve volné krajině (stromořadí, remízky, aleje, linie v krajině či okrasné výsadby), kde jasan výrazně decimuje.

Jasan zastupuje významnou roli v ekologii ekosystému lesa hlavně v koloběhu živin. Tento výpadek by šel nahradit jinou dřevinou mající podobné vlastnosti. Bohužel dle výzkumů nebyla nalezena žádná dřevina mající stejné vlastnosti. Olše a osika byly označeny za dřeviny mající nejpodobnější vlastnosti (Lawrence et al., 2014).

### 1.1.2 Jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia*)

Jasan úzkolistý je teplomilný a světlomilný strom dosahující výšky 20-40 m s průměrem kmene do 1 m a korunou vejcovitého tvaru podobnou jasanu ztepilému. Stejně jako u jasanu ztepilého kvete před rašením listů v hroznech z postranních pupenů. Listy má vstřícné i přeslenité, lichozpeřené. Lístky jsou kopinaté, dlouhé 4-8 cm. Na rozdíl od jasanu ztepilého se na podzim před opadem listy barví do žluta až červeno-fialova.

Území rozšíření jasanu úzkolistého zahrnuje severní Řecko, Bulharsko, Chorvatsko, Černou Horu, Srbsko, Kosovo, Rumunsko, Maďarsko, Slovensko, jižní Moravu, Itálii, Francii, Španělsko, Maroko a pobřeží severní Afriky (viz. Obr. 2).

Optimálními podmínkami pro růst jsou vlhké půdy s vysokým obsahem živin (Hrnčíříková, 2016). Vyskytuje se především v nížinatých lužních lesích podél vodních toků. Zpracování dřeva probíhá společně s dřevem jasanu ztepilého.



Obrázek 2: Rozšíření Jasanu ztepilého v Evropě (Wikimedia Commons, 2019)

---

## 1.2 *Hymenoscyphus fraxineus*

### 1.2.1 Popis, taxonomie

Nemoc zvaná Nekróza jasanů je v Evropě se vyskytující smrtelná choroba způsobená patogenem *H. fraxineus*. *H. fraxineus* je teleomorfním stádiem houby *Ch. fraxinea* (po svém objevení bylo teleomorfní stádium několikrát přejmenováno). V češtině se patogen nazývá voskovička jasanová. Tento patogen náleží do říše: *Fungi* (Houby), oddělení: *Ascomycota* (Vřeckovýtrusné), třídy: *Leotiomycetes* (Voskovičkoplodé), řádu: *Helotiales* (Voskovičkotvaré), čeledi: *Helotiaceae*, rodu: *Hymenoscyphus*, druhu: *Hymenoscyphus fraxineus* (CABI, 2020). Rod *Hymenoscyphus* celkově obsahuje více jak 150 druhů, většinou se jedná o saprofyty (rozkládají mrtvou organickou hmotu). Evropská epidemie způsobena *H. fraxineus* je prvním příkladem parazitování na rostlinách tohoto rodu (Wang et al., 2006).

Patogen byl do Evropy zavlečen pravděpodobně z východní Asie a první záznamy o něm se objevují v devadesátých letech v Polsku. Posléze došlo k rozšíření patogenu po celém území jeho hostitele s výjimkou Španělska a jižní Itálie (Gross et al., 2014).

*H. fraxineus* vytváří na infikovaných řapících z předchozí vegetační sezóny početná apothecia bílé barvy o velikosti 1-3 mm. Apothecia se vytváří na černých pseudosklerociích pokrývající řapíky. V apotheciu se vytváří hyalinní jednobuněčné askospóry velké 13–21 × 3,5–5,0 μm. Anamorfa (*Ch. fraxinea*) tvoří hnědé fialidy (16–24 x 4–5 μm), v nichž jsou uloženy krátké válcovité, hyalinní konidie (Kowalski 2006; Longauer et al., 2018).

V původním prostředí se *H. fraxineus* chová jako saprofyt přežívající jako endofyt v jasanových listech. Jelikož s evropskými či severoamerickými jasanými neprošla houba společnou evolucí, dochází k infekci dřevnaté části větví, což má za následek vážné zdravotní problémy (Longauer et al., 2018).

---

## 1.2.2 Výskyt *Hymenoscyphus fraxineus* a historie šíření

První zmínky o odumírání jasanů v Evropě se datují do 80. let 20. století, které bylo nazýváno „dying of ash“. Z počátku bylo odumírání jasanů přisuzováno různým druhům patogenů či parazitickým houbám, kterým napomáhaly v šíření abiotické stresory (Hiemstra, 1995; Przybyl, 2002).

Dalším důležitým milníkem byly výzkumy prováděné T. Kowalskim, který přišel s výsledky poukazujícími na patogenní houbu *Ch. fraxinea* způsobující nekrózu jasanů. Již v průběhu 90. let 20. století bylo zaznamenáváno chřadnutí lesních porostů jasanů napříč Evropou s převahou v pobaltských zemích (Kowalski a Holdenrieder, 2008; Bakys et al., 2009). Vzhledem k rychlému šíření nemoci a vysoké intenzitě odumírání jasanů se předpokládala nepůvodnost patogenu (Husson et al., 2011). Problematikou chřadnutí jasanů se zabývá mnoho ústavů napříč zeměmi např. v ČR Ústav ochrany lesů a myslivosti Mendelovy univerzity v Brně či Ústav lesnických a půdních věd Univerzity přírodních zdrojů a biologických věd ve Vídni (BOKU, Universität für Bodenkultur Wien) v Rakousku.

Dle nejnovějších výzkumů je nekróza jasanu v Evropě, především jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior*), zapříčiněna vřeckovýtrusnou houbou *H. fraxineus*, jejíž anamorfní stádium je *Ch. fraxinea*. První záznamy o odumírání tímto patogenem byly zaznamenány roku 1992 v severovýchodní části Polska a jihozápadní části Litvy (Kowalski a Łukomaska, 2005). Následně došlo k rychlému rozšíření po Evropě (Timmermann et al., 2011). Až roku 2006 byla *Ch. fraxinea* popsána a označena za potenciálního původce odumírání jasanů v Evropě T. Kowalskim (Kowalski, 2006).

Choroba se Evropou šířila raketovou rychlostí. K potvrzování choroby v různých zemích docházelo v řádech let. Ve Švédsku 2001 (Barklund, 2005), Estonsku 2003 (Juodvalkis a Vasiliauskas, 2002), Dánsku 2003 (Thomsen et al., 2007). Dále Litvě (Lygis et al., 2005), Německu (Schumacher et al., 2007), Norsku (Talgø et al., 2008) a Finsku (Rytkönen et al., 2011). V České republice bylo větší odumírání jasanů pozorováno od roku 2004 (Jankovský a Holdenrieder, 2009). Následovaly země střední Evropy Slovensko, Rakousko (Halmschlager a Kirisits, 2008), Maďarsko (Kirisits et al., 2010), Rumunsko (Szabó, 2009), Slovinsko (Ogris et al., 2009), Itálie (EPPO Global Database, 2010a). V roce 2010 byla nemoc rozšířena ve 22 zemích Evropy (Timmermann et al., 2011).

---

Další výskyt byl potvrzen v roce 2011 ve Francii (Husson et al., 2011), Belgii (Chandelier et al., 2010; EPPO Global Database, 2011) v Rusku (Gross et al., 2014), na Ukrajině (Davydenko et al., 2013), a Nizozemsku (EPPO Global Database, 2010b). Roku 2014 bylo onemocnění zaznamenáno ve Velké Británii, Severním Irsku a Irské republice (Sansford, 2013; Short a Hawe, 2018). V Bosně a Hercegovině byl patogen potvrzen v roce 2013 (Treštić a Mujezinović, 2013) hned záhy v Srbsku (Keča et al., 2017) a Černé Hoře (Milenković et al., 2017). V současnosti je onemocnění potvrzené ve 30 státech Evropy (Longauer et al., 2018).

### **1.2.3 *Hymenoscyphus albidus* a jeho role ve výzkumu chřadnutí jasanů**

Již kolem roku 1995 bylo pozorováno první větší odumírání jasanu. Jako příčina odumírání byla T. Kowalskim určena houba pojmenovaná *Ch. fraxinea*. O pár let později byla opět T. Kowalskim a O. Holdenriederem vydaná publikace, kde bylo za pohlavní stádium *Ch. fraxinea* označena *H. albidus* (Kowalski a Holdenrieder, 2009). Problémem je že tato houba je známá již od roku 1850 pod názvem *Peziza albida* (*H. albidus*) jako saprofyt na jasanových listech. U této houby nikdy nedošlo k potvrzení patogenity. Queloz a kol. (2011) pomocí molekulárních sekvencí kultur z celé Evropy prokázali existenci dvou morfologicky podobných hub *H. albidus* a *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (dále jen *H. pseudoalbidus*). *H. albidus* byl rozšířen v oblastech bez plošného úhynu jasanů a byl určen jako nepatogenní (Queloz et al., 2011). Druhý objevený druh se vyznačoval identickými nepohlavními stádii jako *Ch. fraxinea*, a proto byl označen jako *H. pseudoalbidus*.

Díky následujícím studiím bylo za pomoci srovnání genotypů zjištěno, že tento druh pochází z Asie (Zhao et al., 2012). V Asii byl tento druh popsán pod názvem *Lambertella albida* (Zhao et al., 2012). Až v roce 2011 došlo na zasedání mezinárodního botanického kongresu (IBC) k úpravě pravidel pro pojmenování nových druhů a ustálení názvu *H. fraxineus* z *H. pseudoalbidus*. Na asijských druzích nebyly popsány žádné symptomy typické u evropských jasanů. Čínské a japonské druhy jasanů *F. mandshurica* a *F. chinensis* jsou vůči *H. fraxineus* doposud rezistentní, proto lze předpokládat Asii za původní oblast rozšíření (Zheng a Zhuang, 2014).



---

## 1.2.4 Životní cyklus a šíření infekce

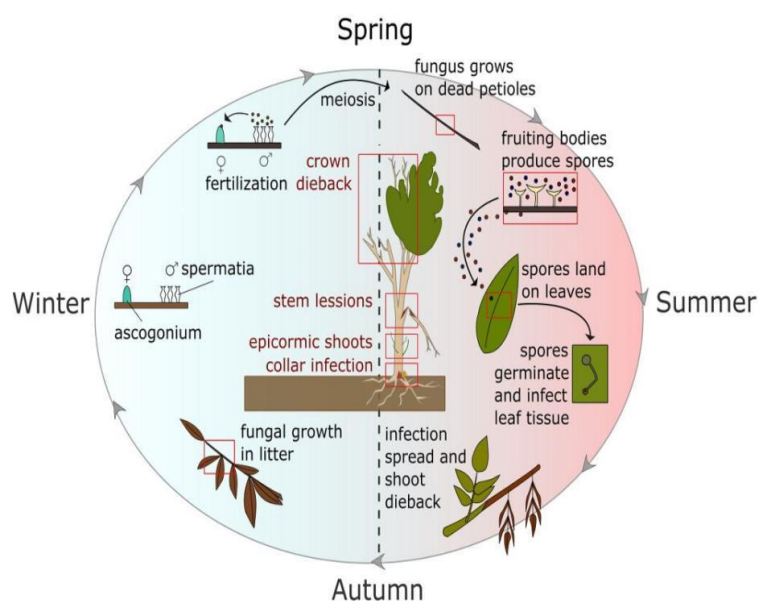
*H. fraxineus* náleží do skupiny heterotalické, což znamená, že k pohlavnímu rozmnožení je třeba dvou mycelií s odlišným párovacím typem. Lze je chápat jako různá pohlaví u jiných organismů, ovšem s tím rozdílem, že nebyl nalezen morfologický rozdíl mezi párovacími typy. U *ascomycot* se při pohlavním procesu oplodí askogon (samičí gametangium) pomocí hyfy (samčí gametangium) nebo spermácie (nepohyblivá gameta). Askogon není nijak morfologicky výrazný, jedná se o zvětšenou nebo spirálovitě stočenou hyfu. Samičí gametangium nelze rozeznat od obyčejné hyfy. Jako spermácie slouží obvykle konidie tvořené na anamorfě (Gross et al., 2012). U druhu *H. fraxineus* jsou konidie produkované na anamorfě *Ch. fraxinea* (Gross et al., 2012). U druhu *H. fraxineus* konidie produkované na anamorfě *Ch. fraxinea* fungují jako spermácie oplodňující askogon. Mají podstatně jinou úlohu, než je rozšiřování na nového hostitele. Může se zdát, že najít mycelium s opačným párovacím typem pro úspěšný pohlavní proces je jedním z limitujících faktorů. Ovšem při laboratorních pokusech byla prokázána přítomnost obou párovacích typů se srovnatelnou četností (Gross et al., 2012). K pohlavnímu procesu dochází na čerstvě spadáných řapících během podzimu. Za začátek infekce lze považovat období jara, kdy se začínají vytvářet drobné bílé plodničky na infikovaných loňských listech opadáných na zem. Při vhodných podmínkách dochází k tvorbě mističkovitých plodniček (apothecia) na opadáných řapících počátkem léta následujícího roku, které jsou producenty velkého množství askospór. Askospóry jsou unášeny větrem na velké vzdálenosti, dopadají na jasanové listy, klíče, dochází k proniknutí hyf do pletiva, následné nekrotizaci a předčasnému opadu listů (Koukol a Havrdová, 2014; Gross et al., 2014;). Patogen pravděpodobně může do hostitele proniknout i pupeny, lenticelami, poraněními v místech po sání hmyzu či jiných bezobratlých. Další rok se cyklus opět opakuje na řapících opadáných listů (Koukol a Havrdová, 2014).

Vlhkost vzduchu je mnohými autory popisována jako důležitý faktor ovlivňující uvolňování askospór a následně i klíčení (Brook, 1969; Dvořák et al., 2015). Vzdušná vlhkost dle Havrdové a Černého (2013) je v přímé vazbě s intenzitou napadení patogenu *H. fraxineus*. Z výsledků je patrná korelace mezi suchým létem s vyššími teplotami a rozšíření infekce. U stromů, které jsou vysazeny např. v parcích s průměrnou vlhkostí okolo 79%, byla koruna poškozena z 2,33%, zatímco u stromů rostoucích na březích řek, kde se průměrná vlhkost pohybuje okolo 84,6% došlo

k poškození koruny ze 17,02% (Havrdová a Černý, 2013). Dle (Dvořák et al., 2015) je vlhkost důležitým faktorem pro tvorbu apothecií, klíčení a následný infekční cyklus.

### Způsob šíření v hostiteli

Pokud se askospoře podaří přistát na jasanovém listu, dochází ke vzniku mycelia amorfního stádia *Ch. fraxinea*, která se pomocí průduchů dostává do mezofylu listů (Pautasso et al., 2013) (viz. Obr. 3). Dojde-li k průniku patogenu z listů do pletiv větví, dochází k růstu houby především ve směru ke kmeni (proximální směr). Askospóry se mohou do hostitelské rostliny dostat i skrze mechanické poškození či pupeny. Po proniknutí do dutého středu větve dochází k rychlému rozšíření ve směru transpiračního i asimilačního proudu. Časem dochází k prorůstání z duté střední části do dřevní části větve. Mycélium houby přežívá zimu v pletivech jasanu, odkud se poté dál šíří. Jakmile je infikováno kambium, dochází k jeho zničení a tvorbě podkorní nekrózy, což vede ke zničení celého kambiální zóny a odumření větve (Rozsypálek, 2012).



Obrázek 3: Schéma životního cyklu *H. fraxineus* (Teagasc, I.E., 2017)

### 1.2.5 Symptomy infekce

Pro onemocnění je charakteristická celá škála symptomů (viz. Obr. 4). První symptomy naznačující počátek infekce se projevují již během pozdního léta a jsou jimi například zasychající větve, letorosty, listy, které mohou předčasně opadávat,

---

popřípadě hnědé až černé nekrózy na řapících listů (Skovsgaard, et al., 2010). Již z dálky lze rozpoznat napadený strom dle habitu. Z důvodu rozšiřujícího se zasažení postupujícího od mladších výhonků ke starším dochází k prosychání koruny stromu po obvodu. Symptomatika choroby na listech však není zcela průkazná, jelikož podobné symptomy způsobuje taktéž padlí jasanové (*Erysiphe fraxini*) (Jankovský, et al. 2009). Při srovnání napadených a zdravých jedinců lze vyvodit pozdější rašení jedinců postižených *H. fraxineus* o zhruba týden. Na konci vegetační doby zdraví jedinci přirozeně shazují listy a přecházejí do dormance, zatímco nově vytvořené letorosty infikovaných jedinců nestíhají vytvořit dostatek mrazuvzdorných látek ve svých pletivech a během prvních podzimních mrazů velmi často namrzají a odumírají. To má za následek další oslabení napadených jasanů (Rozsypálek, 2012).

Důležitým a průkazným znakem pro určení patogenu je tvorba lézí či eliptických nekroz kolem listových pupenů a dále jizev, šířících se příčným i podélným směrem (viz. Obr. 4) (Schumacher et al., 2010). Mezi symptomy, které nejsou vidět na první pohled, ale až při bližším ohledání lze zařadit zbarvení napadeného dřevního válce majícího charakteristickou šedou až šedočernou vrstvu pod zelenou kůrou mladých větví. Hostitel na rozvoj patogenu reaguje tvorbou preventivních výhonů (vlků), které se vytvářejí pod odumřelými částmi větví. Vznikne tak typické shlukovité olistění. Někteří jedinci přežívají a regenerují. U starších částí stromu regenerace probíhá například formou zavalení nekrózy (Jankovský et al., 2009). U jedinců, kteří nezvládají regeneraci, dochází v pozdní fázi onemocnění k odumírání kosterních větví a k rozsáhlému poškození, které může vyústit v odumření stromu (Queloz et al., 2013; Kirisits et al., 2008). Výskyt *H. fraxineus* byl prokázán i v mrtvých kořenech živých jasanů, což vede k závěru, že houba dokáže infikovat i kořenové části, kde po napadení vznikají bazální nekrózy (Jankovský a Palovčíková, 2009).



Obrázek 4: Symptomy nekrózy jasanů: (a) Počátek infekce listů, na listech se objevují malé nekrotické léze; (b) Rozšiřování nekrotických lézí; (c) Izolace mycelia z části nekrotické žilky listu; (d) Prorůstání nekrotických lézí skrz řapíky – jizva po odpadlém listku; (e) Kmínek mladého jasanu s nekrotickými lézemi; (f) Kmínek staršího jasanu s nekrotickými lézemi; (g) Jarní vadnutí prýtu; (h) Zvadlý výhon v průběhu léta; (i) Uschlý výhon s vřeteny a řapíky; (j) Vnitřní nekróza xylému, začátek růstu nekrózy v kambiu; (k) Nekróza v centrální části obklopená zdravým xylémovým pletivem; (l) Dospělý odumírající jasan tvořící sekundární výhony (Gross et al., 2014; Longauer et al., 2018)

### 1.2.6 Obrana a ochrana proti *H. fraxineus*

Hlavním problémem v ochraně před *H. fraxineus* je způsob šíření infekce, která probíhá za pomoci větru na velké vzdálenosti (Pautasso et al., 2013). Jelikož dochází k rychlému šíření této choroby je ochrana a obrana velice obtížná až nemožná (Jankovský et al., 2009). V praxi se praktikuje a funguje jako částečná ochrana na místech s velkým rozšířením této nemoci odstranění silně napadených jedinců ještě před opadem listů či odstranění spadeného listí (Kirisits et al., 2012). Jasany, jež mají korunu poškozenou z více jak 50 % je lepší odstranit, jelikož jsou zdrojem velkého množství infikovaného materiálu a zároveň už nemají dřevoprodukční schopnost (Hrnčířiková, 2016). Dalším důležitým preventivním krokem je pečlivá kontrola dováženého pěstitelského či výsadbového materiálu dle organizace EPPO.

---

Možným řešením je pěstování nepůvodních druhů, avšak i u těch byla pozorovaná částečná napadení. Pozitivní výsledek by mohlo mít i pěstování v sušších oblastech, jelikož vlhkost ovlivňuje klíčení a vznik infekce (Havrdová a , 2013; Dvořák et al., 2015). Dalším řešením by mohla být obnova porostu pomocí fenologicky odolnějších jedinců (Mckinney et al., 2014). Nové výzkumy se snaží zaměřit na identifikaci genetické predispozice pro odolnost vůči patogenu *H.fraxineus*. Díky těmto zjištěním bylo zjištěno, že rezistence proti *H.fraxineus* je řízena více geny (Sidda et al., 2020). Toto zjištění otevírá nové možnosti v boji s tímto patogenem.

---

### 1.3 Lapače spór s rotujícími rameny ROTTRAP

Lapač ROTTRAP 52 (Miloň Dvořák, Boršov nad Vltavou, ČR) je složen ze dvou svislých mosazných tyček („ramínek“) čtvercového profilu o rozměrech 0,8 x 0,8 x 50 mm umístěných na koncích rotujícího ramene o délce 100 mm, které bylo osou přiděleno na elektromotoru, mající cca 2100 ot./min. Lapač může být poháněn pomocí autobaterie či přímo z elektro sítě. Takto konstruovaný lapač je schopen vzorkovat 52 l vzduchu za minutu. Částice jsou zachytávány na oboustrannou lepicí pásku Tesa (Tesa SE, Norderstedt, Německo) umístěnou a upravenou dle velikosti tyček na návětrné straně profilu rotujícího ramene. Lepicí páska se na tyčky aplikuje až před samotným odběrem, aby nedošlo k opotřebení lepicí strany.

Účinnost lapače je závislá na velikosti částic, jež jsou chytány. Čím menší částice, tím větší pravděpodobnost sklouznutí po vzduchovém polštáři, jenž je tlačěn před mosaznou tyčkou. Dále je doporučen odchyt částic maximálně po dobu 48 h, jelikož poté se u lapače snižuje účinnost chytání kvůli velkému množství částic, které se nachytají např. prach či pyl. Důležitým faktorem je taktéž stejná rychlost otáčení u všech použitých lapačů, aby mohlo dojít k přesnému porovnání dat.

Lapače se většinou montují otáčejícími se rameny dolů, aby nedocházelo k zatékání vody do zařízení. Pro zmírnění problému s přírodními podmínkami lze nainstalovat i plechovou stříšku. Při pohledu shora by ramena měla rotovat po směru hodinových ručiček. Jedná se o velice jednoduchou, levnou, lehkou a nenáročnou konstrukci, určenou pro snadnou práci v terénu, využívanou především při větším počtu lapačů např. pro zjišťování šíření inokula v prostoru (zjišťování přechodu počtu zkoumaných částí se zvyšující se výškou).



*Obrázek 5: Lapač spór s rotujícími rameny Rottrap 52 (foto: Dvořák, Boršov nad Vltavou, červen 2020)*

---

## 1.4 Molekulární metody použité k detekci *Hymenoscyphus fraxineus*

### 1.4.1 Extrakce DNA

Základním krokem pro veškeré analýzy DNA je její extrakce. Cílem izolace je získání vzorku DNA za pomoci chemických či fyzikálních metod ze zkoumaného biologického materiálu s náležitou čistotou bez příměsí ostatních kontaminantů a s dostačujícím množstvím. Aby se dala získat DNA ze vzorku je nutné narušení buňky, rozvolnění jejího obsahu, odstranění kontaminantu všech ostatních látek s výjimkou DNA. Vyizolovaná DNA se následně využívá pro PCR, klonování, qPCR.

### 1.4.2 PCR

PCR metoda slouží k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA v podmínkách *in vitro*. DNA pro tuto metodu může být izolovaná z různých zdrojů, jejíž amplifikací se získají miliony stejných kopií vybrané oblasti DNA.

Polymerázová řetězcová reakce je metoda, která umožňuje rychlé namnožení určitého úseku DNA, jejímž principem je replikace nukleových kyselin. K amplifikaci můžeme vybrat jakýkoliv úsek z libovolné DNA (rostlinné tkáň, živočišné tkáň, ale i komplementární DNA). Limitujícím faktorem je znalost okrajových sekvencí tohoto úseku (Ishmael a Stellato, 2008; Brown, 2007). PCR proběhne za předpokladu, že dvakrátke oligonukleotidy hybridizují s molekulou DNA, jsou přítomny 4 základní nukleotidy (thymin, guanin, adenin a cytosin), enzym DNA polymerázy (prodlužující amplifikovaný úsek) (Ishmael a Stellato, 2008), (voda a  $Mg^{2+}$  ionty sloužící ke zpevnění vazby DNA – polymeráza). Polymerázová řetězcová reakce je metoda rychlého namnožení určitého úseku.



Základní kroky PCR jsou následující (Obr. 6):

(1) Počáteční denaturace

- Rozrušení vodíkových můstků spojující k sobě vlákna DNA

(2) Denaturace

- dsDNA je denaturovaná na jednotlivá vlákna

(3) Annealing

- Při této teplotě dochází k nasedání krátkých oligonukleotidů neboli primerů na specifická místa ssDNA dle komplementarity bází.
- Teplota a doba nasedání primerů závisí na délce a složení jednotlivých primerů

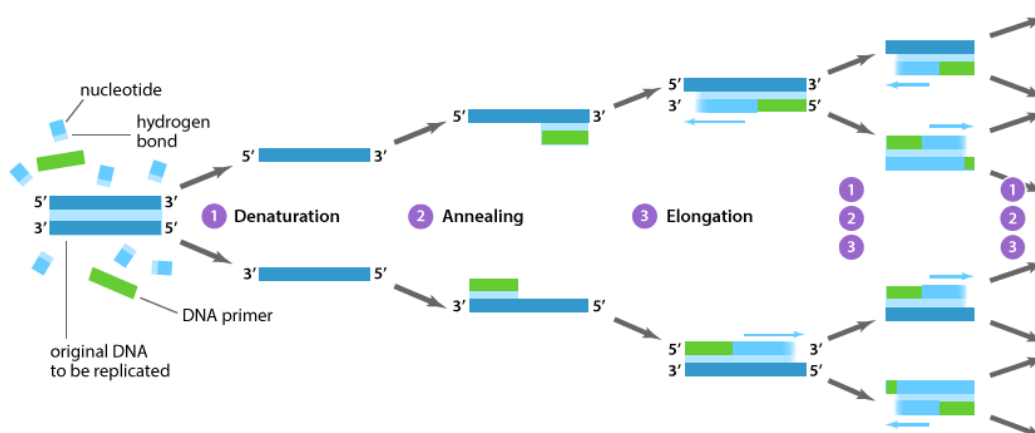
(4) Elongace

- Dochází k aktivaci enzymu *Taq* DNA polymerázy, které se připojuje k primerům, které jsou jejich startovací místa a od nichž dochází k syntéze nového vlákna komplementárního k templátovým molekulám DNA
- Syntéza probíhá ve směru 5' → 3'

(5) Závěrečná elongace

- Dochází ke komplementaci všech amplifikovaných úseků DNA

Kroky 2, 3 a 4 se cyklicky opakují 25 – 40x. Což má za následek geometrické navýšení ampliconů po každém cyklu (Ishmael a Stellato, 2008).



Obrázek 6: Průběh PCR reakce (Shafique, 2012)

---

### 1.4.3 Real-time PCR

Real-time PCR jinak také řečeno kvantitativní PCR (qPCR) je obměna konvenční PCR, která se liší od klasické PCR schopností proměřit kvantum amplifikované DNA po každém cyklu což je umožněno přidáním fluorescenčních reportérů, které se váží na DNA specificky nebo nespecificky a díky tomu vyzařují světelný signál, který je zachycen pomocí detektoru (Lysáková, 2015). Tato metoda byla objevena roku 1992 v USA (Higuchi et al., 1992). Jedná se o velice citlivou a vysoce specifickou díky použití specifického značení (Kubista et al., 2006).

#### Princip qPCR

V kvantitativní qPCR je množství syntetizované DNA zaznamenáváno průběžně. Ke kvantifikaci se používají fluorescenční barviva. Fluorescence je přímo úměrná množství DNA, která byla syntetizována, díky tomu jí lze kvantifikovat v každém cyklu. Reakční směs je podobná klasické PCR: templátová DNA, volné nukleotidy (adenin, cytosin, guanin a thymin),  $Mg^{2+}$  ionty, oligonukleotidové primery, termostabilní DNA-dependentní DNA polymeráza a oproti klasické PCR se navíc přidává reportér, který emituje fluorescenci.

Během prvních cyklů signál nemá intenzitu, až postupem času dochází k překonání rušení okolí díky zvýšení koncentrace amplifikované DNA, tím pádem i ke zvýšení síly fluorescence. Fluorescence posledního cyklu nám není schopná udat počáteční koncentraci DNA ve vzorku. K tomu slouží tzv. treshold (tzv. práh fluorescence). Algoritmus přístroje vypočte treshold, který nám udává přímkou kolmou na osu Y. Tato přímka nám říká statisticky nejvhodnější pozici pro odečet hodnoty  $C_T$  (*cycle of treshold*). Hodnota  $C_T$  vyjadřuje, kolik cyklů muselo proběhnout, aby vzorek dosáhl tresholdu (Pfaffl, 2001; Harenčák, 2018).

#### Detekční techniky

Rozlišujeme dvě detekční techniky: specifické a nespecifické, které se liší dle vazby fluorescenčního barviva na DNA. Jako fluorescenční reportér je používán fluorofor. Jedná se o heterocyklickou či polyaromatickou sloučeninu, jenž je schopna absorbovat energii světla určité vlnové délky, které je excitováno a díky tomu se dostat do energicky bohatšího stavu. Takto energicky nabitá sloučenina je velice nestabilní a

---

dochází k navrácení do původního stabilního stavu. To má za následek vyzáření přebytečné energie ve formě fotonu, který má nižší energii a vyšší vlnovou délku (Lysáková, 2015).

Nespecifická detekce využívá schopnost interkalačního barviva připoutat se na kteroukoliv dsDNA pomocí nekovalentní interakce. Jedná se o interakci, při které dochází k vazbě do malého žlábků DNA. Nevýhodou této metody je neschopnost rozpoznání, zda se váže na specifické produkty či nespecifické produkty (primery, dimery, ...). Prvním z interkalačních činidel byl ethidium bromid. Problémem tohoto činidla je slabá afinita i senzitivita. Z toho důvodu se dnes nejvíce využívá interkalační barvivo SYBR Green I, jehož afinita k dsDNA je cca 100x větší než afinita ethidium bromidu (Schneeberger et al., 1995). To je zapříčiněno tím, že po navázání na dsDNA se fluorescence zvýší 1000x při porovnání s nenavázaným barvivem (Kaltenboeck a Wang, 2005). SYBR Green I. patří do skupiny asymetrických cyaninových barviv skládající se ze dvou odlišných heterocyklických kruhu spojené metionovou vazbou (Lysáková 2015). Nevýhodou SYBR Green I. je snížení C<sub>q</sub> hodnoty u větších amplikonů a inhibice PCR závislá na jeho koncentraci (Nath et al., 2000; Vitzthum et al., 1999).

Specifická detekce se liší ve formě fluorescence, jelikož při této detekci dochází k vydání záření pouze za předpokladu amplifikaci cílové sekvence. Slouží k tomu oligonukleotidové sondy se sekvencí komplementární k templátové DNA. Na sondách je navázán zhášec (quencher) a reportér (fluorescenční prvek) (Kaltenboeck a Wang, 2005). Sondy se rozdělují na dva druhy hybridizační a hydrolyzační (viz.Obr.7).

Hybridizační sondy jsou založeny na Försterově rezonančním přenosu energie (angl. Förster resonance energy transfer, FRET). Jedná se o dvojici značených sond, kdy je jedna označena na 5'-konci akceptorovým fluoroforem a druhá donorovým fluoroforem na 3'-konci (Lysáková, 2015). Princip sond spočívá v těsné blízkosti (cca 1-5 nukleotidů od sebe) cílových sekvencí v průběhu hybridizace. Díky tomu může dojít k přesunu energie mezi donor-akceptorovým párem a k vyzáření fluorescence (Bernard et al., 1998; Mulhardt., 2006).

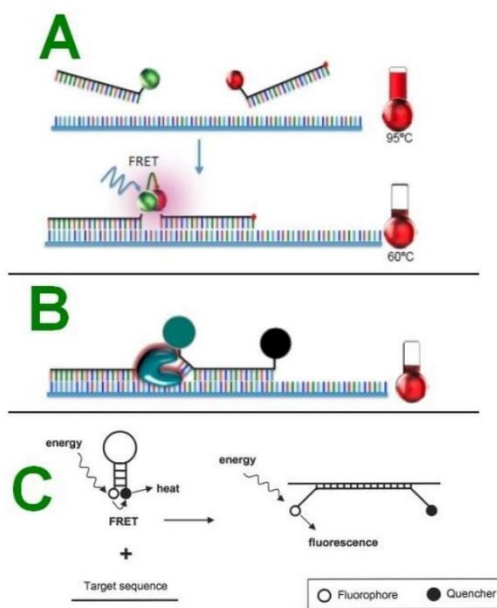
Hydrolyzační (TaqMan) sondy jsou oligonukleotidové sondy, které jsou delší a mají vyšší T<sub>m</sub> než primery a jenž mají na svém 3' konci umístěný zhášec (quencher) a na 5' konci je navázán reportér značený fluoroforem emitující fluorescenční světlo.

---

Principem TaqMan sond je rozklad na reportér, zhašeč a jednotlivé nukleotidy během toho co jsou hybridizované s ssDNA a probíhá elongace prostřednictvím 5' → 3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy. Jelikož se reportér nenachází v těsné blízkosti zhašeče, reportér emituje více fluorescence. Ta je měřena v každém cyklu a je proporcionálně závislá na množství uvolněných reportérů, tudíž na množství amplifikovaného produktu (Mulhardt, 2006; Livak et al., 1995).

K dalším systémům specifické detekce jsou oligonukleotidové molecular beacon sondy, které mají reportér a zhašeč navázané blízko u sebe. Rozdíl mezi molecular beacon sondami a TaqMan sondami je v jejich odlišné délce a tvaru. Fluorescenci neemitují do doby, než nezačínají hybridizovat do cílové sekvence (Tyagi a Kramer, 2012).

Nejpoužívanější fluorescenční reportéry jsou SYBR green I. (nespecifická detekce) a TaqMan sondy (specifická detekce).



Obrázek 7: Typy sond: A - Hybridizační sonda, B - TaqMan sonda, C - Molecular Beacons sonda (Lysáková, 2015)

---

## Grafické znázornění

Konečným výstupem je amplifikační křivka informující o závislosti fluorescence na počtu proběhlých cyklů, popř. amplifikované DNA. Před analýzou je zapotřebí zmírnit šum a odečíst fluorescenční pozadí, aby byly výsledky přesnější. Většina softwarů již bývá těmito funkcemi vybavena (Piazza a Ridker, 2015; Page a Stromberg, 2011).

Upravená amplifikační křivka se dá rozdělit na 3 hlavní fáze (Obr. 8):

### 1. Exponenciální fáze

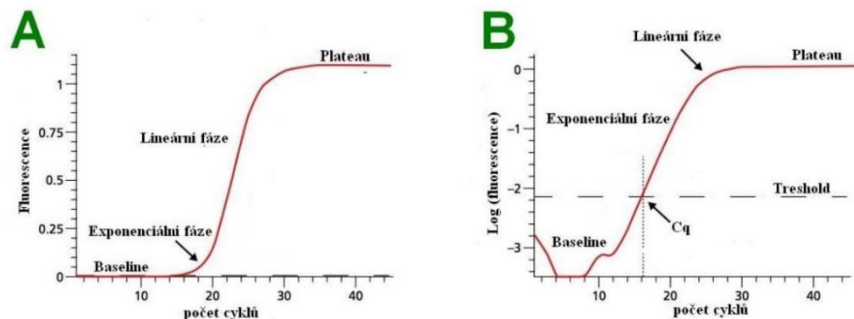
Teoretický přírůstek je  $2^n$  ( $n$  = počet cyklů). Kvantifikace se provádí v této fázi, jelikož právě tehdy je vztah mezi množstvím templátu a intenzitou fluorescence kvantitativní.

### 2. Lineární fáze

V této fázi dochází ke zpomalování přírůstku amplifikované DNA.

### 3. Fáze plateau

Dochází k výraznému zpomalení nárůstu produktu. V konečné fázi produkt skoro nepřibývá.

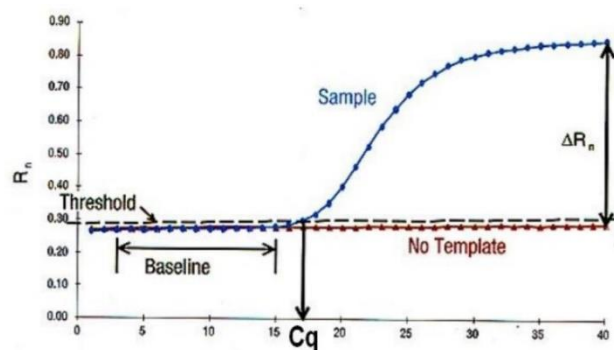


Obrázek 8: Amplifikační křivka v průběhu reakce (A - lineární zobrazení, B - logaritmičké zobrazení) (Lysáková, 2015)

Dále jsou v grafu důležité pojmy (Obr. 9)

- **Baseline** – počáteční fáze, kdy je signál velice slabý a špatně odlišitelný od pozadí
- **Threshold** – Hodnota  $\Delta R_n$ —automaticky stanovená programem nebo nastavená manuálně—používaná pro stanovení parametru  $C_T$  v qPCR. Nastavuje se vyšší než hodnota pozadí a dostatečně nízko, aby se nacházela v exponenciální fázi amplifikační křivky. Práh je přímka, jejíž průsečík s amplifikační křivkou definuje parametr  $C_T$ .

- **C<sub>q</sub> hodnota** – je číslo cyklu, během kterého amplifikační křivka protne treshold; tato hodnota se využívá pro kvantifikaci
- **R<sub>n</sub>** – normalizovaný reportér; poměr fluorescenční intenzity reportérového fluoroforu k pasivnímu fluoroforu
- **ΔR<sub>n</sub>** – normalizace hodnoty R<sub>n</sub> pomocí odečtu baseline



Obrázek 9: Amplifikační křivka v průběhu reakce (Lysáková, 2015)

## Vyhodnocení získaných dat

Hlavní využití, metody qPCR je možnost kvantifikace. Lze to provést dvěma způsoby: relativní či absolutní kvantifikací.

U absolutní kvantifikací získáme data o přesném množství původní templátové DNA díky dosazení získaných dat do kalibrační křivky, která je tvořena sérií ředění externího standartu o známé koncentraci. Absolutní genová kvantifikace se využívá v případech, kdy záleží na přesném množství RNA / DNA ve vzorku. Přesnost měření závisí zejména na použitém standardu. Jako standard se používá například rekombinovaná DNA (recDNA), genomická DNA, produkty RT-PCR, rekombinovaná RNA či komerčně dostupné syntetické oligonukleotidy (Bustin, 2000).

Druhou možností je výpočet relativní genové exprese. Jedná se o komparativní  $\Delta C_T$  kvantifikace, při které mezi sebou porovnáváme hodnoty genové exprese sledovaného a referenčního genu či mezi vzorkem a kontrolou (např. zdraví – nemocný). Výhoda tohoto vyhodnocení spočívá v poměrně jednoduchém provedení a možnost výsledná data uvést jako násobek genové exprese proti kalibračnímu vzorku (neošetřená kontrolní rostlina). Nevýhoda je nutnost získání účinnosti reakce, která je nutná pro výpočet (Pfaffl, 2001; Harenčák, 2018).

---

## **2 Hypotézy a cíle práce**

### **2.1 Hypotézy**

Se vzrůstající výškou klesá výskyt spór patogenu *H.fraxineus*.

spóry patogenu *H.fraxineus* mohou dosáhnout výšky přes 40m.

### **2.2 Cíle**

Cílem práce bylo kvantitativně popsat výskyt spór původce nekrózy jasanů v různých výškách nad zdrojem infekce

Dalším cílem práce bylo zvážit potenciál inokula této patogenní houby v šíření na větší vzdálenosti pomocí vzdušných proudů.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Terénní práce

#### 3.1.1 Charakteristika území určeného pro monitoring

Sledované území se nachází v lokalitě okolo sila v Boršově nad Vltavou. GPS sila: 48°55'29.649"N, 14°26'30.693"E, 413 m.n.m. Lokalita byla vybrána dle několika parametrů. Prvním významným parametrem je samotná budova sila, jenž poskytuje dostatečnou výšku pro připevnění několika lapačů v různých výškách. Druhým parametrem je celková lokalizace, poněvadž se zde nacházejí nakažené stromy jasanů v těsné blízkosti i ve vzdálenějších místech Boršova nad Vltavou (viz. Obr. 10).



Obrázek 10: Mapa znázorňující silo s umístěnými lapači ROTTRAP 52 a výskyt *H.fraxineus* (Petr Žuček, České Budějovice, 2021)



### 3.1.2 Odběr vzorků z lapače spór ROTTRAP 52

ROTTRAP 52 (Miloň Dvořák, Boršov nad Vltavou, ČR) je aktivní lapač spór s rotujícími rameny „rotorod“ na kterých se nacházejí dvě odchytové tyčky velikosti 5x0,8 mm. ROTTRAP 52 je schopen vzorkovat 52 l vzduchu za minutu. Napájen je elektrické sítě pomocí adaptéru 220 V/9 V.

Pro diagnostické účely se vzorky odebíraly z lapačů spór, jež byly nainstalovány na silu v Boršově nad Vltavou. Lapače byly umístěny v pěti výškách viz. (Tab. 1, Obr.11). Vzorky z lapačů byly odebírány po 48 hodinách v termínu od 19.7.2020 do 6.8. 2020 vždy mezi 10:00 – 11:00 SEČ do 1,5 ml mikrozkuumavek, které bylo třeba následně uložit do mrazáku (-20 °C). Celkově bylo odebráno 50 vzorků (Příloha.1).

Tabulka 1: Rozmístění lapačů spór na silu

Lapač	Patro	Výška (m)
Č.1.	0/12 (přízemí)	0,3 m
Č.2	3/12	13,84 m
Č.3	6/12	25,09 m
Č.4	9/12	36,57 m
Č.5	12/12	48,06 m



Obrázek 11: Umístění lapačů, obrázek vlevo lapače umístěné na silu; vpravo lokalita umístění lapače u země (foto: Dvořák, Boršov nad Vltavou, červen 2020)

---

Před samotnou výměnou pásek bylo potřeba vypnout všechny lapače, aby nedocházelo ke zkreslování dat. Použité pásky byly uloženy do 1,5ml mikrozkušavek. Nové pásky byly připraveny z oboustranné lepicí Tesa pásky.

Příprava lapače (viz. Obr. 12):

1. Očištění ramen lapače ethanolem
2. Připevnění Tesa pásky ve směru otáčení
3. Odstranění ochranné fólie
4. Seříznutí pásky na šířku ramínka (0,8 mm) za pomoci žiletky
5. Znovu připevnění lapače na silo



Obrázek 12: Příprava lapačů: A – připravení Tesa pásek ve směru, odstranění fólie; B – seříznutí pásky na tloušťku 0,8 mm; C – upevnění lapače na silo; D – umístění lapače u země, vedle meteorologické stanice SIGNALIZÁTOR (Amet, Velké Bílovice, ČR) měřící teplotu, vlhkost vzduchu a ovlhčení listů (foto: Dvořák, Boršov nad Vltavou, srpen 2020)

Důležitým faktorem pro tvorbu apothécií a askopor byla vzdušná vlhkost a teplo. Proto byla nainstalovaná meteorologická stanice SIGNALIZÁTOR (viz. Obr. 12D.), která veškeré tyto hodnoty zaznamenávala, aby posléze mohlo dojít k vyhodnocení vlivu počasí na tvorbu askospór.

---

## 3.2 Laboratorní práce

### 3.2.1 Izolace DNA DNeasy® Plant Mini Kit

K izolaci byl použit komerční kit DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Nizozemsko) jímž byly izolovány všechny vzorky.

DNA jednoho odběru byla vždy izolována ze dvou sběrných proužků (o rozměrech 50x0,8 mm). Před samotnou izolací se vzorek musel zhomogenizovat pomocí homogenizačních kuliček (1x wolframová a 20x skleněná kulička) ve 400 µl AP1 pufru a 4 µl RNase A. Disrupce probíhala v homogenizátoru Millmix 20 (Domel d.o.o., Železniki, Slovinsko) při 30 Hz/2x60 s.

Zhomogenizovaný vzorek se nechal inkubovat při 65 °C/ 10 minut z důvodu chemické disrupce buněčných stěn. Během inkubace bylo potřeba vzorek 2 - 3x obrátit. Následně se přidalo 130 µl P3 pufru a nechalo se inkubovat 5 minut na ledě a posléze centrifugovalo 5 minut při 14 000 ot./min. Získaný lyzát byl napipetován do QIAshredder kolon umístěných ve 2 ml zkumavkách. Takto přemístěný lyzát se centrifugoval 2 minuty při 14 000ot/min. Průtok byl přenesen do nové zkumavky, takovým způsobem, aby nebyl porušen pelet. K průtoku byl přidán 1,5násobek objemu AW1 pufru a promícháno pipetováním. 650 µl směsi se přepipetovalo do kolony DNeasy mini spin umístěné ve 2 ml sběrných zkumavkách. Poté se odstředovalo 1 minutu při 8000 ot. / min. Průtok byl zlikvidován a tento krok opakován i se zbývající směsí. Kolona byla vložena do nové 2ml odběrné zkumavky, zároveň se přidalo 500 µl AW2 pufru a centrifugovalo se 2 minuty při 14 000 ot. /min. Kolona byla vložena do nové 1,5 ml mikrozkušavky, přidalo se 100 µl AE pufru pro eluci, inkubovalo po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Následovala centrifugace po dobu 1 minuty při 8000 ot. / min.

Množství a čistota izolované DNA byla změřena spektrofotometricky na BioSpec-nano (Shimadzu corp., Japonsko) a následně uchována při teplotě - 20 °C.

---

### 3.2.2 Příprava plazmidu

Koncentrace DNA *H.fraxineus* se vyjadřovala jako počet kopií cílové sekvence v 1 µl templátové DNA pomocí absolutní kvantifikace. K získání těchto počtů byla použita standartní křivka na jejímž základě se vypočítává množství neznámé cílové sekvence. Pro vytvoření standartní křivky je zapotřebí vzorek o již známé a přesné koncentraci na jejímž základě se vytvoří ředící řada. Pro tento účel byly využity vektory plazmidu PCR™ 2.1-TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vložené do bakterie *Escherichia coli* (dále jen *E.coli*).

#### Izolace DNA z kultury

K izolaci DNA byla použita čistá kultura *H.fraxineus*. Pro klonování do plazmidu byl použit komerční kit DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Nizozemsko), jehož protokol byl popsán v předešlé kapitole 5.2.1. *Izolace DNA DNeasy® Plant Mini Kit*.

#### PCR

Po izolaci bylo zapotřebí úsek, jenž měl být vložen do plazmidu *E. coli*, aplikovat za pomoci PCR. Tento krok se provádí za použití polymerázy vytvářející „lepivé konce“ ampliconu z důvodu snadnějšího a přesnějšího zabudování inzertu do plazmidu. Amplifikace DNA probíhala v konvenčním termocykleru T3000 (Biometra, Göttingen, Německo).

Tabulka 2: Složení PCR reakce Green master mix

Reagencie (Green MM)	Objem (µl)
PCR H <sub>2</sub> O (Top-bio s.r.o., Vestec, ČR)	22
OneTaq® Hot Start Quick-Load® 2X Master Mix with Standart Buffer (New England Biolabs.inc, Ipswich, USA)	25
Primer CF F (10 µM)	1
Primer CF R (10 µM)	1
Extrahovaná DNA	1

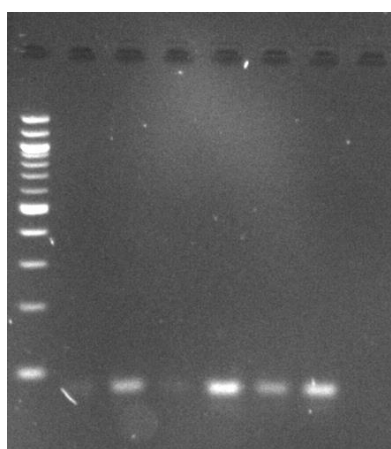
PCR reakce probíhala v objemu 50  $\mu$ l. PCR reagentie byly prvně rozmrazeny, promíchány a smíchány v řádném poměru (viz. Tab. 2). Průběh PCR reakce je viz. Tab. 3.

Tabulka 3: Průběh PCR reakce Green master mix

Krok	Teplota (°C)	Čas
1. Denaturace a aktivace	94	5 min
2. Denaturace	94	1 min
3. Annealing	60	1 min
4. Elongace	68	1 min
Cyklování kroku (2–4)		30x
5. Závěrečná elongace	68	5 min
6. Chlazení	4	$\infty$

### 3.2.2.1 Vizualizace fragmentů

Produkty PCR reakce se vizualizovaly na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru (Trizma base, kyselina boritá, 0,5 M EDTA) z důvodu výběru nejlepšího vzorku. DNA fragmenty byly obarveny za pomoci ethidium bromidu a společně se 100 bp DNA ladderem (velikostní marker) separovány v gelu při 120 V / 1 h. Gel se vyhodnocoval za pomoci UV transluminátoru s UV světlem o vlnové délce 312 nm (Shimadzu, Kjóto, Japonsko), snímacího kamerového systému a vyhodnocovacího softwaru (viz. Obr. 13).



Obrázek 13: Vizualizace amplifikonů z PCR reakce na 2 % agarózovém gelu v UV transluminátoru

---

### 3.2.3 Klonování inzertu do plazmidu

#### Přečištění PCR produktu

K přečištění byl použit protokol NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Taraka Bio, USA). Jedná se o přečištění za pomoci kolon, tudíž velice rychlá a na použití snadná metoda. Přečištění bylo provedeno za použití protokolu (příloha 3.). Pro přečištění byl veškerý produkt použit ke klonování.

#### Klonování TOPO TA Cloning®

Ke klonování byl použit protokol TOPO TA Cloning® a reagentie od společnosti Invitrogen Corporation (USA). Celý proces klonování se prováděl v digestoři, aby byla zajištěna sterilita a čistota produktu.

V prvním kroku byl inzert zabudován do TOPO® vektoru. Reagentie byly rozmrazeny, promíchány pipetováním a smíchány pipetováním, aby nedošlo k jejich znehodnocení, dle Tab. 4. Reakce byla posléze inkubována 5 minut při pokojové teplotě (cca 22–23 °C). Po uplynutí 5 minut byla reakce přesunuta na led.

Tabulka 4: Složení klonovací reakce

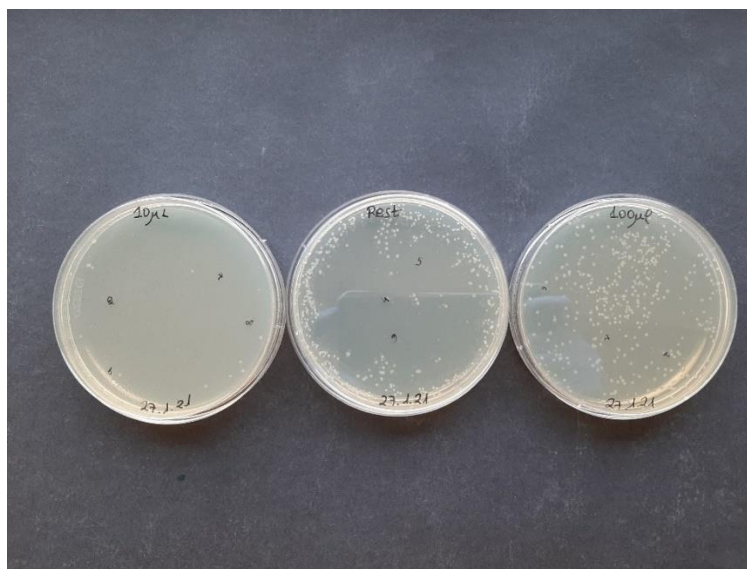
Reagentie	Objem (μl)
PCR produkt	4
Solný roztok	1
TOPO® vektor	1
Finální množství	6

Ke klonování byly použity buňky Mach1™-T1R *E. coli*. K buňkám *E. coli* byly přidány 2 μl klonovací reakce a celý mix byl jemně promíchán. Po promíchání byl mix umístěn do ledu a nechal se inkubovat 30 minut. Následně byl proveden tepelný šok ve 42 °C po dobu 30 s. Po tomto kroku bylo důležité, aby byly zkumavky okamžitě přeneseny na led. Přidalo se 250 μl S.O.C. média. Zkumavka s médiem byla třepána v třepáče 1 h / 25 rpm. V této hodině byly připraveny misky s LB agarom obsahující ampicilinem (InvivoGen, San Diego, USA). Byly připraveny 3 misky pro 3 různé množství. Na první misku bylo aplikováno 10 μl, na druhou 100 μl a na

---

poslední zbytek. S.O.C. médium s *E.Coli* bylo rovnoměrně rozetřeno po misce s LB agarem. Misky byly inkubovány v temnu otočené dnem vzhůru při 37 °C přes noc (cca 10 h).

Druhý den byly misky vloženy do lednice na teplotu 4 °C z důvodu zvýraznění modré a bílé barvy. K další práci byly použity pouze bílé kolonie, které obsahují zakomponovaný inzert (Obr. 14). Tyto kolonie se přemístily do zkumavek s LB liquid obsahující ampicilin, aby došlo k pomnožení bakterií. Zkumavky se umístily do třepačky, kde byly kultivovány 24 h / 37 °C / 25 rpm.



Obrázek 14: Petriho misky s LB agarem a separovanými koloniemi *E.coli*

V posledním kroku byly zkumavky centrifugovány za účelem oddělení média od buněk. Médium se zlikvidovalo, pelet byl resuspendován 250 µl resuspendačního roztoku a přemístěn do mikrozkušavek.

### **Přečištění plazmidu a kontrola kvality pomocí PCR**

Resuspendovaný vzorek byl přečištěn podle protokolu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) (příloha 4.). Kontrola provedeného klonování byla zajištěna pomocí PCR metody. Amplifikace DNA probíhala v konvenčním termocykleru T3000. Následně byly plazmidy uschovány v mrazícím boxu při teplotě – 20°C.

Tabulka 5: Složení PCR reakce Green master mix

Reagencie (Green MM)	Objem ( $\mu$ l)
PCR H <sub>2</sub> O (Top-bio s.r.o., ČR)	22
OneTaq <sup>®</sup> Hot Start Quick-Load <sup>®</sup> 2X Master Mix with Standart Buffer (New England Biolabs.inc)	25
Primer MI3 F	1
Primer MI3 R	1
Extrahovaná DNA	1

PCR probíhala v objemu 50  $\mu$ l. PCR reagencie byly prvně rozmrazeny, promíchány a smíchány v řádném poměru (viz. Tab. 5). Průběh PCR reakce je viz. Tab. 6.

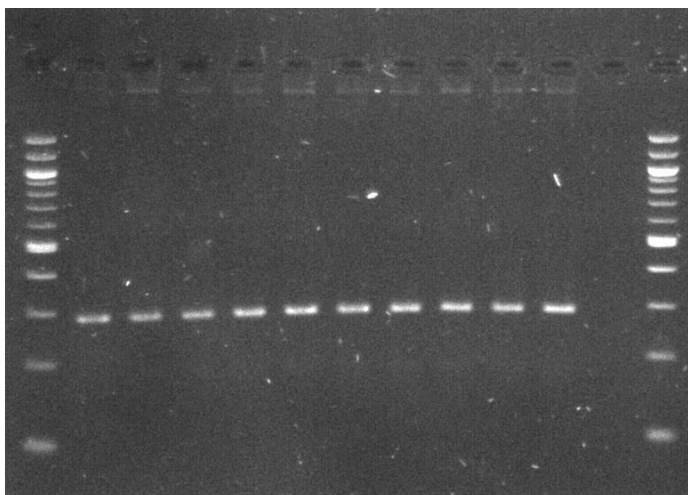
Tabulka 6: Průběh PCR reakce Green master mix

Krok	Teplota (°C)	Čas
1. Denaturace a aktivace	94	5 min
2. Denaturace	94	1 min
3. Annealing	55	1 min
4. Elongace	68	1 min
Cyklování kroku (2–4)		30x
5. Závěrečná elongace	68	5 min
6. Chlazení	4	$\infty$

### Vizualizace fragmentů

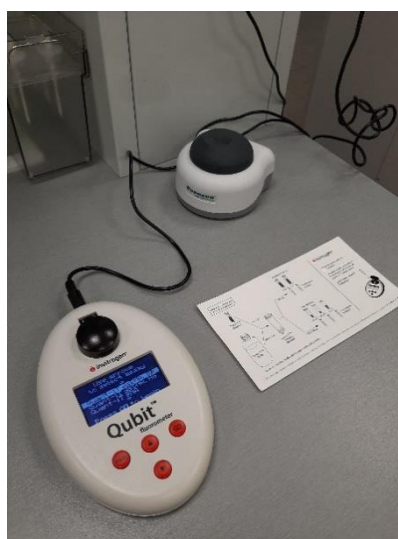
Produkty PCR reakce se vizualizovaly na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru (Trizma base, kyselina boritá, 0,5 M EDTA) z důvodu výběru nejlepšího vzorku. DNA fragmenty byly obarveny za pomoci ethidium bromidu a společně se 100 bp DNA ladderem (velikostní marker) separovány v gelu při 120 V / 1 h. Gel se vyhodnocoval za pomoci UV transluminátoru s UV světlem o vlnové délce 312 nm., snímacího kamerového systému a vyhodnocovacího softwaru.





Obrázek 15: Vizualizace amplifikonů z PCR reakce na 2 % agarózovém gelu v UV transluminátoru

Posléze byl vybrán nejlepší vzorek. U toho bylo za pomoci Qubit<sup>TM</sup> fluorometru (Invitrogen, Waltham, USA) (viz. Obr.16.) zjištěna koncentrace vyizolovaného plazmidu. Kalibrace přístroje Qubit<sup>TM</sup> fluorometru a příprava vzorku byla provedena dle protokol (příloha 5.).



Obrázek 16: Qubit<sup>TM</sup> fluorometru

---

### 3.2.4 Real-time PCR

Real-time PCR byla provedena na přístroji QuantStudio 6 Flex Real-time PCR Systém (Applied Biosystems – Life Technologies, Waltham, USA) (viz. Obr. 17). Data se analyzovala za pomoci programu QuantStudio Real-Time PCR Systém v1.3 (Applied Biosystems – Life Technologies) a zpracování bylo provedeno v tabulkovém editoru Microsoft Excel (Microsoft, USA).



Obrázek 17: Přístroj pro Real-Time qPCR analýzu – QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Reakce probíhala ve 30 cyklech se změnou teplot 2 °C / s délkou fází a teplotami uvedenými viz. Tab. 9. a s reagenциemi dle viz. Tab. 8. Primery a Taqman sonda byly použity podle (Chandelier et al., 2010) viz. Tab. 7. Primery jsou specifické pro *H.fraxineus* a ohraničují fragment DNA o velikosti 81 bp.

Tabulka 7: Sekvence primerů a Taqman sondy (Chandelier et al., 2010)

Typ	Zkratka	Sekvence
Forward primer	Cf-F	5'-CCCTTGTGTATATTATATTGTTGCTTTAGC-3'
Reverse primer	Cf-R	5'-GGGTCCTCTAGCAGGCACAGT-3'
Taqman sonda	Cf-S	6-FAM-5'-TCTGGGCGTCGGCCTCGG-3'-BHQ-1

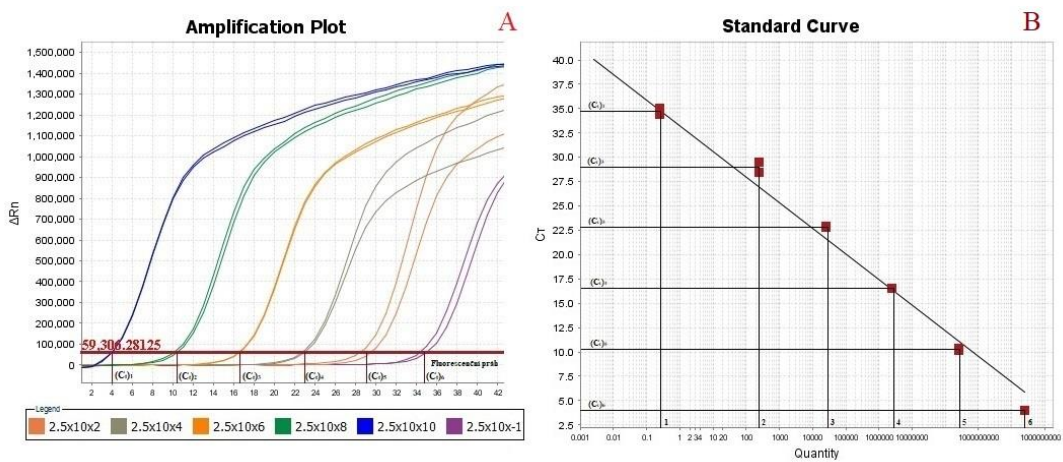
Tabulka 8: Složení Real-time PCR reakce

Reagencie	Objem ( $\mu\text{l}$ )
Master mix	5
PCR H <sub>2</sub> O (Top-bio s.r.o., Vestec, ČR)	1,9
Primer (20 $\mu\text{M}$ )	0,2
Primer (20 $\mu\text{M}$ )	0,2
TaqMan sonda	0,2
Extrahovaná DNA	3

Tabulka 9: Průběh Real-time PCR reakce

Krok	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas
1. Denaturace a aktivace	95	10 min
2. Denaturace	95	10 s
3. Annealing	60	30 s
4. Elongace	72	1 s
Cyklování kroku (2–4)		40x
5. Chlazení	4	$\infty$

Pro stanovení výchozího počtu molekul DNA v templátu se využívají standardy o známe koncentraci. Jako standart byl použit plazmid, do kterého byla vložena templátová DNA. Plazmid měl počáteční koncentraci  $2,5 \times 10^{10}$ , která byla naředěna pomocí desetinného ředění na koncentraci  $2,5 \times 10^{-2}$ , aby došlo k pokrytí celého spektra koncentrací v odběrech. Za pomoci takto vytvořené kalibrační křivky standardů byla po porovnání hodnot  $C_t$  softwarem termocykleru stanovena koncentrace DNA vzorků (viz. Obr.18).



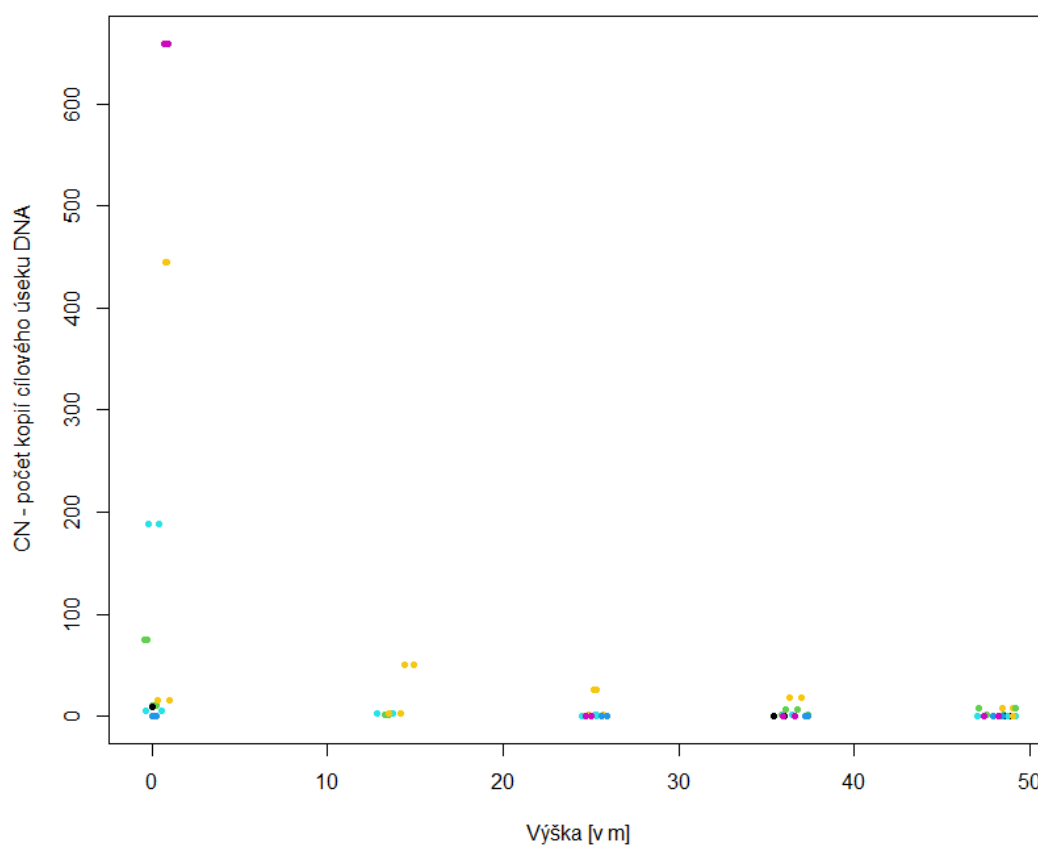
Obrázek 18: Absolutní kvantifikace A) Amplifikační křivka B) Kalibrační křivka standardů o známe koncentraci

---

## 4 Výsledky

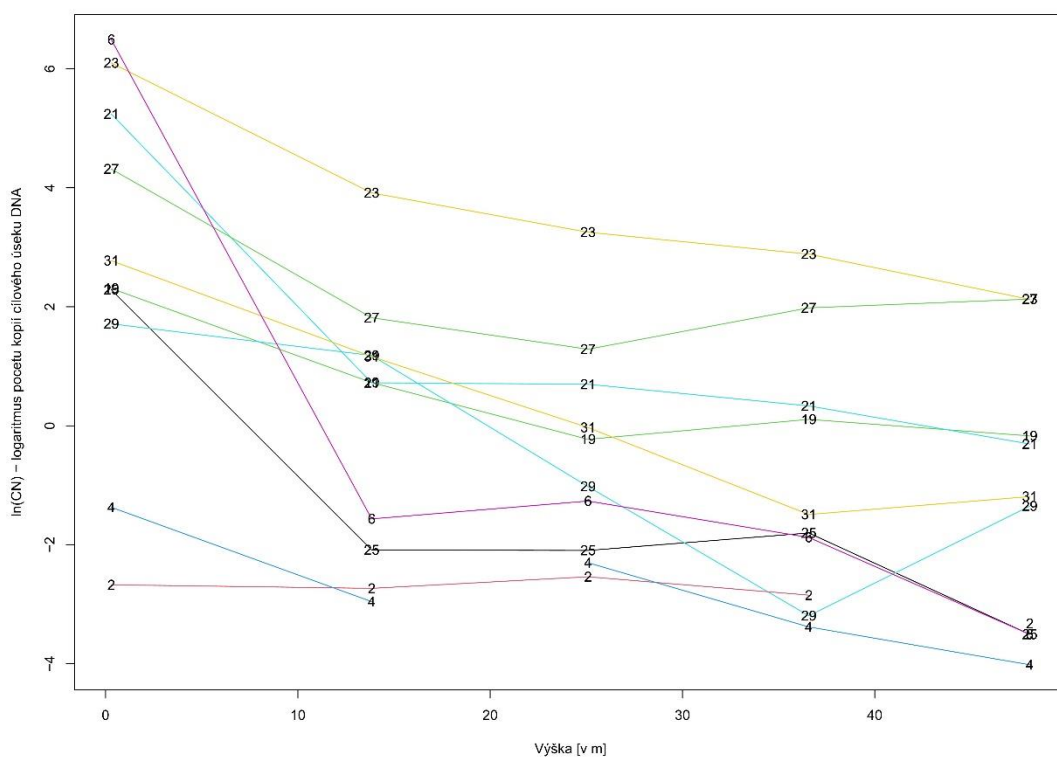
Zralé plodnice *H.fraxineus* na listových řapících byly pozorovány od začátku července. V rámci diplomové práce bylo provedeno 10 odběrových jednotek z lapačů spor, které byly umístěny v pěti různých výškách. Odběry byly prováděny od 19.7 2020 do 6.8. 2020 (viz. Příloha 1.).

Hodnoty zjištěné pomocí qPCR byly přeneseny do grafu (viz Obr.19). Z grafu (viz Obr.19) je patrné že koncentrace spor se exponenciálně snižuje se stoupající výškou.

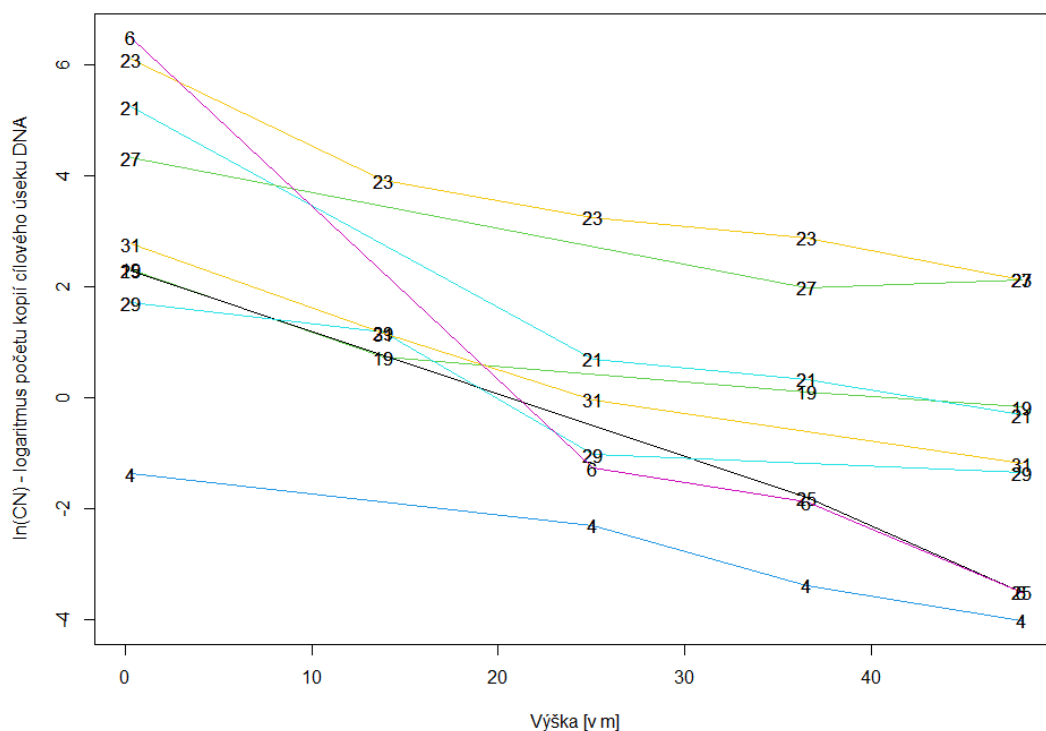


Obrázek 19: Graf naměřených hodnot

Z naměřených hodnot byl vytvořen semilogaritmický graf znázorňující vliv výšky na koncentraci DNA v průběhu jednotlivých odběrových dnů. Předpokladem bylo, že koncentrace by měla s výškou klesat. Jak je vidět na semilogaritmickém grafu (viz Obr.20) k poklesu hodnot s rostoucí výškou opravdu dochází. Ovšem jak je z grafu (viz Obr.20) taktéž patrné, v několika odběrech dochází k anomáliím (nárůst koncentrace ve vyšším patře či „konkávní hrb“). Tato nepřesnost je způsobená především aktivitou ventilátorů ve vyšších patrech síla. Především v době začátku žní byla aktivita mnohonásobně vyšší, což je nejpatrnější na odběrech z 2.8. a 4.8. Z tohoto důvodu byla data způsobující anomálie vypuštěna, aby se následně snížila chyba modelu.



Obrázek 20: Semilogaritmický graf z naměřených hodnot



Obrázek 21: Semilogaritmický graf z naměřených hodnot po vymazání dat způsobující anomálii

Po vypuštění dat způsobující nepřesnosti z grafu (viz. Obr.21) vyplývá, že naměřená data vykazují přibližně lineární průběh se záporným sklonem (tzn. Lineární pokles). Z tohoto grafu (viz. Obr.21) je zřejmé, že s výškou/vzdáleností od zdroje dochází k výraznému prudkému poklesu počtu kopií cílového úseku DNA. Původně navrhovaný exponenciální model založený na diferenciální rovnici vzhledem k povaze dat nezkonvergoval. Z toho důvodu byl využit jednodušší exponenciální model, který má tvar:

$$\widehat{CN} = \beta_0 \exp(-\beta_1 h)$$

Kdy  $\beta_0, \beta_1$  jsou odhadované regresivní koeficienty,  $h$  je výška v metrech,

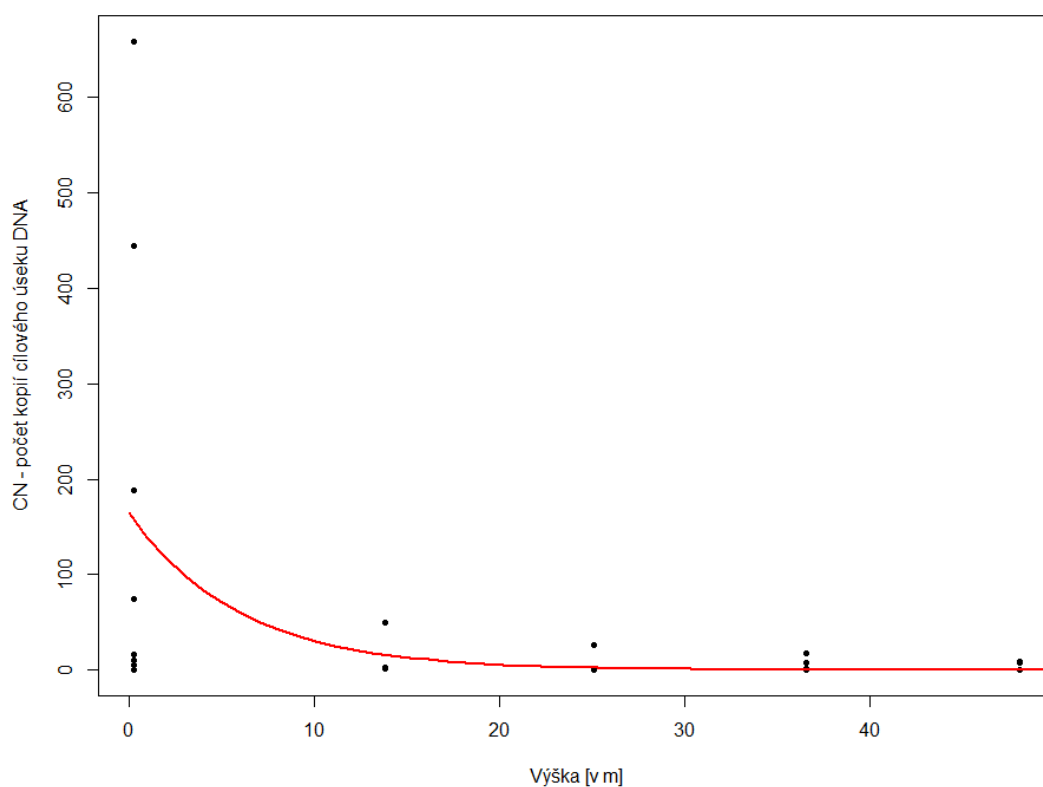
K výsledkům odhadu nelineárního regresivního modelu odhadnutého prostřednictvím Gaussovo-Newtonovo iteračního algoritmu byla využita procedura *nls*. Numerické řešení bylo získáno prostřednictvím R 4.0.3.

---

Odhadnutý Regresivní model je tedy možné zapsat ve tvaru:

$$\widehat{CN} = 164,6276 \exp(-0.1679 \cdot h)$$

Průběh odhadnutého exponenciálního nelineárního regresivního modelu je zachycen na níže uvedeném grafu (Viz. Obr. 22). Tento model odhaduje tzv. střední úroveň závislé proměnné při různých úrovních nezávislé (v tomto případě výška). Jedná se tedy o průměrnou úroveň CN v různých výškách.



Obrázek 22: Graf naměřených hodnot – doplněn o odhadnutý nelineární regresní model (červená křivka)



---

## 5 Diskuse

Ve své práci jsem se zaměřil na detekci spor ve vyšších vzdušných hladinách, než v jakých byly spory *H.fraxineus* doposud popisovány. Již dříve byly publikovány studie, které se zabývaly přenosem spor patogenů pomocí větru (Brown a Hovmøll, 2002). Přenosem askospor *H.fraxineus* se zabývá např. práce publikovaná Chandelierem a kolegy v roce 2014 (Chandelier et al., 2014). Hlavním předmětem výzkumu byl zde horizontální přenos spor do vzdálenosti cca 50 m. Odběry byly prováděny v rozmezí 0,5 m – 3 m nad zemí. Během tohoto výzkumu bylo potvrzeno, že množství *H.fraxineus* se vzrůstající výškou nad zemí klesá. Pro lepší pochopení infekce v korunách vysokých stromů bylo doporučeno měření koncentrací spor ve výškách nad 3 m (Chandelier et al., 2014).. K měření koncentrací spor v této práci byla použita stejná metodika jako aplikoval Chandelier s kolegy v roce 2014 (Chandelier et al., 2014). Pokud víme, toto je první případ, kdy se podařilo detekovat *H.fraxineus* ve výšce 50 m.

Ke sběru spor byly použity aktivní lapače ROTTRAP 52 s rotujícími raménky. Na rozdíl od spadových lapačů, lapače s rotujícími raménky jsou schopny vzorkovat větší objemy vzduchu za jednotku času a jsou necitlivé pro změny rychlosti větru (Aylor, 1993). Úspěšnost sběru spor u lapačů s rotujícími raménky závisí na velikosti spor (Edmonds,1972).

Detekce inokula proběhla ve všech odběrech z čehož lze usuzovat, že šlo o období, kdy patogen sporuloval, což souhlasí s údaji autorů Dvořák a kol. (Dvořák et al., 2015). Jak udává ve své studii Dvořák a kol. (Dvořák et al., 2015) patogen *H.fraxineus* se ve vzdušném inokulu nachází od začátku dubna do konce října. Největší koncentrace spor ve vzduchu je v České republice dosažena v průběhu srpna. Toto rozmezí je třeba brát s jistou rezervou, protože se každý rok může měnit s ohledem na počasí (Chandelier et al, 2014). Pro růst apothecií a uvolňování askospor je klíčová vlhkost prostředí (Brook, 1969; Villalta et al., 2002). Důležitou roli může také hrát ranní rosa, která chrání askospory před vysycháním (Hietala et al., 2013). Tyto predikce ve své práci potvrdil Dvořák a kol. (Dvořák et al., 2015), a proto bylo již před započítím a samozřejmě pak v průběhu celého experimentu počasí podrobně monitorováno (viz. Příloha 2.). Již na začátku července bylo objeveno větší množství

---

apothecií v místě plánovaného experimentu a díky následnému příznivému počasí byl pokus započat 19.7.2020.

Z analýzy výsledků bylo potvrzeno, že koncentrace askospor *H.fraxineus* se stoupající výškou klesá. Důležitým výsledkem je, že se askospory nachází i ve výšce 48,06 m. Díky tomuto zjištění lze předpokládat, že se askospory mohou šířit na podstatně větší vzdálenost, jelikož ve vyšších výškách je mohou zachytit vzdušné proudy a značně tak posunout hranici jejich doletu. Toto zjištění podporuje teorii přemítající o zavlečení choroby do Velké Británie z kontinentální Evropy za pomoci větru (Freer-Smith a Webber, 2017). Původně byl jako zdroj zavlečení patogenu *H.fraxineus* do Velké Británie označen dovoz sazenic z Nizozemska v letech 2011 (EPPO Global Database, 2012; Sansford, 2013), ovšem postupem času se zjistilo, že nemoc se ve Velké Británii objevila daleko dříve (Sansford, 2013; Clark a Webber, 2017; Wylder et al., 2018). Díky modelování, které bylo provedeno za účelem vyhodnocení možnosti přenosu askospor z kontinentální Evropy do Velké Británie se došlo k závěru, že mezi lety 2008-2011 existovalo nejméně 100 dní, během nichž byly environmentální podmínky (směr větru, vlhkost, srážky) nakloněny tomuto přenosu a mohli se tímto dostat do východní a jihovýchodní části Britských ostrovů (PostBOX, 2012). Teorii o přenosu askospor vzduchem podporuje i fakt, že většina původně infikovaných stromů se nacházela v jihovýchodní a východní části Britských ostrovů (Clark a Webber, 2017; Carroll, 2020). Co se ovšem týče přenosu životaschopných spor houbových patogenů na velké vzdálenosti (> 100 km) dle Browna a Hovmølla (Brown a Hovmøll, 2002) to možné je. Především tlustostěnné spory např. spory rzi, jsou těmto přenosům velice dobře přizpůsobeny (Brown a Ogle, 1997). Naopak askospory *H.fraxineus* jsou velice citlivé na vysychání, proto nemají velkou životaschopnost ve vzduchu (Gross et al., 2014). Z toho lze vyvodit, že riziko přenosu na větší vzdálenosti je mizivé.

Z výsledků lze vyvodit vztah mezi počasím a koncentrací askospor. Jelikož se několik dnů (15- 18.7.2020) před začátkem pokusu (19.7.2020) teplota pohybovala okolo 20°C a byly časté přeháňky. Díky zvýšené vlhkosti a teplotě okolo 20°C byly tedy ideální podmínky prostředí pro rozvoj apothecií *H.fraxineus*. Následujících několik teplých dnů (19- 23.7.2020) umožnilo apotheciím řádně dozrát. Zrání bylo podpořeno stále trvajícím vlhkostí z předchozích dnů způsobené deště. Během odběrů od 25.7.2020 až do 4.8.2020 docházelo ke snižování koncentrací lapených spor

---

z důvodu dlouho trvajícího sucha. Jak již bylo zmíněno dříve, uvolňování askospor z apothecií je závislé na vlhkosti. Ke zvýšení koncentrace došlo při posledním odběru 6.8.2020. Důvodem byly deštivé dny 3-4.8 2020 a slunný den 5.8.2020. Dle Dvořáka (Dvořák et al., 2015) přízemní vlhkost ovlivňuje uvolnění askospor se zpožděním 1-2 dny, což odpovídá i výsledkům této práce.

Výsledky taktéž poukazují na jistou nelineárnost v měření. Anomálie jsou vidět především mezi lapačem č. 2, lapačem č. 3 a lapačem č. 4. Tato nelineárnost je pravděpodobně způsobena ventilátory umístěnými pod posledním lapačem č. 5. Z těchto ventilátorů proudily prachové částice, které byly zachytávány lapači, a tudíž snižovaly schopnost zachytu spor. Problém se zahlcením lapačů kvůli pylu ve své práci řešila taktéž Botella et al. (2019). Příkladem takto znehodnoceného odběru jsou odběrové dny 2. 8. a 4. 8., kdy došlo ke kombinaci několika negativních faktorů. Prvním faktorem bylo dlouho trvající sucho, což mělo za následek snížené uvolňování askospor. A druhým faktorem byly začínající žně. Z toho důvodu bylo vytížení sila daleko větší a ventilátory vypouštěly daleko více nečistot. Z těchto důvodů byly některé naměřené hodnoty vyřazeny při statistické analýze stanovení průběhu odhadnutého exponenciálního nelineárního regresivního modelu.

Pro stanovení podrobnějšího modelu průběhu odhadnutého exponenciálního nelineárního regresivního modelu bohužel nemáme dostatečné množství dat z důvodu omezenosti přidělených finančních prostředků. Znásobením odběrů by se dal sestavit model, který by vypočítal množství inokula v určité výšce na základě toho, kolik je inokula u země. Neboť současný model nerespektuje fluktuaci množství inokula u země. Dalším důležitým faktorem je velikost zdroje. Poněvadž se nejedná o bodový zdroj, nelze aplikovat metodu spadu pevných částí užívanou u komínů. Dále by bylo zapotřebí měřit směr a sílu větru. V této práci byl faktor větru zanedbán. Avšak směr větru bývá v lokalitě převážně severozápadní a zdroje inokula jsou tím směrem všude.

---

## Závěr

V diplomové práci byla studována koncentrace spór patogenu *H.fraxineus* ve vzduchovém sloupci, které byly zachyceny pomocí lapačů umístěných na obilném silu v Boršově nad Vltavou. Analýza koncentrace spór probíhala pomocí absolutní kvantifikace DNA spór zachycených na lapačích metodou qPCR. Z výsledků plyne, že se vzrůstající výškou výskyt spór patogenu *H.fraxineus* ve vzduchovém sloupci klesá, což je v souladu s predikovanou hypotézou. Ze získaných dat byla dále zkonstruována funkce pro průběh odhadnutého exponenciálního nelineárního regresivního modelu. Za pomoci této funkce byl vypočítán přibližný počet kopií cílového úseku DNA (CN) v různých výškách, kde byly umístěny lapače spór. Dále byla popsána souvislost mezi dozráváním askospór a apothecií a měnícím se počasím.

Výsledky práce přispívají k detailnějšímu a hlubšímu pochopení přenosu askospór za pomoci větru. Z výsledků vyplývá, že spóry *H.fraxineus* jsou schopny dostat se do výšky okolo 50 m, a tudíž se mohou šířit vzdušnými proudy do velkých vzdáleností od místa svého původního výskytu.

---

## Seznam použité literatury

Atallah, Z. K. et al. (2007). Multiplex real-time quantitative pcr to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to verticillium wilt. *Phytopathology*, **97**(7): 865–872, ISSN 0031949X.

Aylord, D. E. (1993). Relative collection efficiency of Rotorod and Burkard spore samplers for airborne *Venturia inaequalis* ascospores. *Phytopathology*, **83**(10): 1116–1119. ISSN 0031949X.

Bakys, R., et al. (2009). Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, **58**(2): 284–292. ISSN 00320862.

BARKLUND, P. (2005). Ash dieback sweeping over South and Central Sweden. *SkogsEko*, **3**: 11–13.

Bernard, P. S., et al. (1998). Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Analytical Biochemistry*, **255**(1): 101–107, ISSN 00032697.

Botella, L., et al. (2019). Detection and quantification of the air inoculum of *Caliciopsis pinea* in a plantation of *Pinus radiata* in Italy. *IForest*, **12**(2): 193–198. ISSN 19717458.

Brook, P. J. (1969). Effects of Light, Temperature, and Moisture on Release of Ascospores by *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **12**(1): 214–227 ISSN 11758775.

Brown, J. F. a Ogle, H. J. (1997). *Plant pathogens and plant diseases*. Armidale, Australia: Published by Rockvale Publications for the Division of Botany, University of New England, ISBN 186389439X.

Brown, J. K. M. a Hovmøll, M. S. (2002). *Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease* ISSN 00368075.

Brown, T. A. (2007). *Klonování genů a analýza DNA*. 2. vyd, Olomouc: Univerzita Palackého, ISBN 978-80-244-1719-6.

---

Bustin, S. A. (2000). *Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. B.m.: Society for Endocrinology. ISSN 09525041.

CABI, (2020). *Hymenoscyphus fraxineus (ash dieback)*. Dostupné z: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108083#1F34AFD5-8915-4EFF-9EE2-2F2DC2CD9A74>

Carroll, D. (2020). *Ash dieback from Asia to Europe*. B.m. British society fo plant pathology.

Chandelier, et al. (2010). Detection of Chalara fraxinea in common ash (Fraxinus excelsior) using real time PCR. *Forest Pathology*, **40**(2): 87–95. ISSN 14374781.

Chandelier, A., et al. (2014). Detection and quantification of airborne inoculum of Hymenoscyphus pseudoalbidus using real-time PCR assays. *Plant Pathology*, **63**(6): 1296–1305. ISSN 13653059.

Clark, J. a Webber, J. (2017). The ash resource and the response to ash dieback in Great Britain. In: R. Vasaitis a Enderle, R., ed. *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.): Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, Swedish University of Agricultural Sciences, s. 228–237

Davydenko, K., et al. (2013). Fungi in foliage and shoots of Fraxinus excelsior in eastern Ukraine: A first report on Hymenoscyphus pseudoalbidus. *Forest Pathology*, **43**(6): 462–467. ISSN 14374781.

Dvořák, M., et al. (2015). Detection of Airborne Inoculum of Hymenoscyphus fraxineus and H. albidus during Seasonal Fluctuations Associated with Absence of Apothecia. *Forests*, **7**(12): 1. ISSN 1999-4907.

Edmonds, R.L. (1972). Collection efficiency of rotorod samplers for sampling fungus spores in the atmosphere. *Plant Disease Reporter*, **56**(8): 704–708.

EPPO GLOBAL DATABASE, (2007). *Ash dieback in Europe and possible implication of Chalara fraxinea: addition to the EPPO Alert List*, Dostupné z: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1225>

EPPO GLOBAL DATABASE, (2010a). *First record of Chalara fraxinea in Italy*, Dostupné z: <https://gd.eppo.int/reporting/article-329>

---

EPPO GLOBAL DATABASE, (2010b). *First report of Chalara fraxinea in the Netherlands*, Dostupné z: <https://gd.eppo.int/reporting/article-608>

EPPO GLOBAL DATABASE, (2011). *First report of Hymenoscyphus pseudoalbidus (anamorph Chalara fraxinea) in Belgium*, Dostupné z: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1769>

EPPO GLOBAL DATABASE, (2012). *First report of Chalara fraxinea in the United Kingdom*, Dostupné z: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1907>

EUFORGEN, 2016. *Fraxinus excelsior - European forest genetic resources programme*, Dostupné z: <http://www.euforgen.org/species/fraxinus-excelsior/>

Freer-Smith, P. H. a Webber, J. F. (2017). Tree pests and diseases: the threat to biodiversity and the delivery of ecosystem services. *Biodiversity and Conservation*, **26**(13): 3167–3181 ISSN 15729710.

Gross, A., et al. (2012). Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology*, **49**(12): 977–986. ISSN 10871845.

Gross, A., et al. (2014). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*, **15**(1): 5–21. ISSN 14646722.

Halmschlager, E. a Kirisits, T. (2008). First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology*, **57**(6): 1177. ISSN 00320862.

Harenčák, J. (2018). *Využití metody RT-PCR při studiu reakce rostlin řepky na stres chladem*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

Havrdová, L. a Černý, K. (2013). Význam vlhkosti vzduchu v epidemiologii nekrózy jasanu - předběžné výsledky, *Zprávy lesnického výzkumu*. **58**: 347–352.

Hiemstra, J.A. (1995). *Verticillium wilt of Fraxinus excelsior*.

Hietala, A. M., et al. (2013). The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. *Fungal Ecology*, **6**(4): 302–308. ISSN 17545048.

---

Higuchi, R., et al. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*, **10**(4): 413–417. ISSN 0733222X.

Hosoya, T., et al. (1993). Materials for the fungus flora of Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, **46**(34): 429–432.

Hrnčíříková, J. (2016). *Detekce výskytu Hymenoscyphus fraxineus pomocí lapačů spor a molekulárně biologických metod v Hackerově školce*. Mendelova univerzita v Brně.

Husson, C., et al. (2011). Chalara fraxinea is an invasive pathogen in France. *European Journal of Plant Pathology*, **130**(3): 311–324. ISSN 09291873.

Ishmael, F. T. a Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, **101**(4): 437–443. ISSN 15344436.

Jankovský, L. a Holdenrieder, O. (2009). *Chalara fraxinea-Ash Dieback in the Czech Republic*.

Jankovský, L. a Palovčíková, D. (2009). Nový příklad chřadnutí dřevin v ČR – nekróza jasanu. *Zahradnictví*,

Jankovský, L., et al. (2009). Nekróza jasanu Chalara fraxinea v ČR. *Lesnická práce*. **1/09**.

Juodvalkis, A. a Vasiliauskas, A. (2002). The extent and possible causes of dieback of ash stands in Lithuania. *LZUU Mokslo Darba*, **56**: 17–22.

Kaltenboeck, B. a Wang, Ch. (2005). *Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics*, ISBN 0120103400.

Keča, N., et al. (2017). *First Report of the Invasive Ash Dieback Pathogen Hymenoscyphus fraxineus on Fraxinus excelsior and F. angustifolia in Serbia*.

Kirisits, T., et al. (2010). Chalara fraxinea associated with dieback of narrow-leaved ash (Fraxinus angustifolia). *Plant Pathology*, **59**: 411

Kirisits, T., et al. (2012). Ash dieback associated with Hymenoscyphus pseudoalbidus in forest nurseries in Austria. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, **4**(9). ISSN 2141-2170.



---

Kirisits, T., et al. (2008). Verursacht *Chalara fraxinea* das Zurücksterben der Esche in Österreich? *FORSTSCHUTZ AKTUELL*, **43**: 29–34.

Koukol, O. a Havrdová, L. (2014). Vřeckovýtrusná zkáza jasanů. *Živa*, **1**: 7–10.

Kowalski, T. (2006). *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology*, **36**(4): 264–270. ISSN 14374781.

Kowalski, T. a Holdenrieder, O. (2009). The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology*, **39**(5): 304–308 ISSN 14374781.

Kowalski, T. a Łukomaska, A. (2005). Studies on *Fraxinus excelsior* L. dieback in Włoszczowa Forest Unitstas. *Acta Agrob.* **59**: 429–440.

Kowalski, T. a Holdenrieder, O. (2008). Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa | A new fungal disease of ash in Europe. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, **159**(3): 45–50. ISSN 0036-7818.

Kubista, M., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**(2–3): 95–125. ISSN 00982997.

Lawrence, C. (2014). *A summary of the impacts of ash dieback on UK biodiversity, including the potential for long-term monitoring and further research on management scenarios.*

Livak, K. J., et al. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, **4**(6): 357–362. ISSN 10889051.

Lizoň, P. (1992). The genus *Hymenoscyphus* (Heliales) in Slovakia, Czechoslovakia. *Mycotaxon*. **45**: 1–49.

Longauer, R., et al. (2018). Pěstební možnosti zmírnění fopadů chřadnutí jasanů způsobeného houbou *Hymenoscyphus fraxineus* (*Chalara fraxinea*).

Lygis, V., et al. (2005). Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, **20**(4): 337–346. ISSN 02827581.

- 
- Lysáková, P. (2015). *Real-time se zaměřením na studium genové exprese*. Masarykova univerzita.
- McKinney, L. V., et al. (2014). *The ash dieback crisis: Genetic variation in resistance can prove a long-term solution*, Blackwell Publishing Ltd. ISSN 13653059.
- McKinney, L. V., et al. (2011). Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): An emerging infectious disease. *Heredity*, **106**(5): 788–797. ISSN 0018067X.
- Milenković, I., et al. (2017). First report of *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* in Montenegro. *Forest Pathology*, 47(5), ISSN 14374781.
- Mulhardt, C. (2006). *Molecular Biology and Genomics*. 1. vyd. Academic Press. ISBN 978-0120885466.
- Musil, I. a Möllerová, J. (2005). *Listnaté dřeviny, Přehled dřevin v rámci systému rostlin krytosemenných*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Nath, K., et al. (2000). Effects of ethidium bromide and SYBR(®) Green I on different polymerase chain reaction systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **42**(1–2): 15–29. ISSN 0165022X.
- Ogris, N., et al. (2009). *Chalara fraxinea causing common ash dieback newly reported in Slovenia*. ISSN 00320862.
- Page, R. B. a Stromberg, A.J. (2011). Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments. *The Scientific World JOURNAL*, **11**: 1383–1393. ISSN 1537-744X.
- Pautasson, M., et al. (2013). *European ash (Fraxinus excelsior) dieback - A conservation biology challenge*, ISSN 00063207.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**(9), ISSN 13624962.
- Piazza, G. a Ridker, P. M. (2015). *Is venous thromboembolism a chronic inflammatory disease?*. American Association for Clinical Chemistry Inc. ISSN 15308561.

- 
- POSTBOX. (2012). *Transmission of Ash Dieback* Dostupné z:  
[https://www.parliament.uk/globalassets/documents/post/Ashdieback\\_POSTbox.pdf](https://www.parliament.uk/globalassets/documents/post/Ashdieback_POSTbox.pdf)
- Przybyl, K. (2002). Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology*, **32**(6): 387–394. ISSN 1437-4781.
- Queloz, V., et al. (2011). Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*, **41**(2): 133–142. ISSN 14374781.
- Queloz, V., et al. (2013). Nekróza jasanu *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Lesnická ochranná služba*. 4.
- Rozsypálek, J. (2012). *Nekróza jasanu Chalara fraxinea - fenologie, bionomie, charakteristika symptomu, rozšíření v oblasti Kroměřížska a Zlínska*. Mendelova univerzita v Brně.
- Rytkönen, A., et al. (2011). First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. *Forest Pathology*, **41**(3): 169–174. ISSN 14374781.
- Sansford, C. (2013). *Pest Risk Analysis for Hymenoscyphus pseudoalbidus (anamorph Chalara fraxinea) for the UK and the Republic of Ireland*
- Schneeberger, C., et al. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods and Applications*, **4**(4): 234–238. ISSN 10549803.
- Schumacher, J., et al. (2010). Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*, **40**(5): 419–429. ISSN 14374781.
- Schumacher, J., et al. (2007). First record of *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Germany - a new agent of ash decline. *undefined*.
- Shafique, S. (2012). *Polymerase Chain Reaction*. LAP Lambert Academic Publishing. ISBN 978-3-659-13479-1.
- Short, I. a Hawe, K. (2018). Ash dieback in Ireland – A review of European management options and case studies in remedial silviculture,

- 
- Sidda, J. D., et al. (2020). Diversity of secoiridoid glycosides in leaves of UK and Danish ash provide new insight for ash dieback management. *Scientific Reports*, **10**(1): 1–12 ISSN 20452322.
- Skovsgaard, J. P., et al. (2010). Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash ( *Fraxinus excelsior* L.). *Forest Pathology*, **40**(1): 7–18 ISSN 14374781.
- Szabó, I. (2009). *First report of Chalara fraxinea affecting common ash in Hungary*. ISSN 00320862.
- Talgø, V., et al. (2008). *Soppen som ein meiner fører til askeskotsjuka i store delar av Europa er no funnen i Østfold*. Bioforsk
- Teagasc, I.E. (2017). Lifecycle of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Agriculture and Food Development Authority*.
- Thomsen, I., et al. (2007). Fungal disease is the cause of ash dieback. *Skoven*. **39**: 234–326.
- Timmermann, V., et al. (2011). Ash dieback: Pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *EPPO Bulletin*, **41**(1): 14–20. ISSN 02508052.
- Treštić, T. a Mujezinović, O. (2013). *Ash dieback in Bosnia and Herzegovina*.
- Tyagi, S. a Kramer, F. R. (2012). Molecular beacons in diagnostics. *F1000 Medicine Reports*, **4**(1): 10. ISSN 17575931.
- Úradníček, L., et al. (2009). *Dřeviny České republiky*. 2. vyd. ISBN 978-80-87154-62-5.
- Villalta, O. N., et al. (2002). The use of weather and ascospore data for forecasting apple and pear scab in Victoria, Australia. *Australasian Plant Pathology*, **31**(3): 205–215. ISSN 08153191.
- Vitzthum, F., et al. (1999). A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Analytical Biochemistry*, **276**(1): 59–64. ISSN 00032697.

---

Wang, Z., et al. (2006). Evolution of helotialean fungi (Leotiomyces, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**: 295–312.

WIKIMEDIA COMMONS, 2019. *Fraxinus angustifolia range*. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fraxinus\\_angustifolia\\_range.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fraxinus_angustifolia_range.svg)

Wylder, B., et al. (2018). Evidence from mortality dating of *Fraxinus excelsior* indicates ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) was active in England in 2004–2005. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, **91**(4): 434–443, ISSN 0015-752X.

Zhao, Y., et al. (2012). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. **122**: 25–41. ISSN 2154-8889.

Zheng, H. D. a Zhuang, W. Y. (2014). *Hymenoscyphus albidoides* sp. nov. and *H. pseudoalbidus* from China. *Mycological Progress*, **13**(3): 625–638. ISSN 18618952.

## Přílohy

Den	Název vzorku	Název statistika	Patra	Výška	CN
19.07.2020	1197	19	Přízemí	0,3	10,059
19.07.2020	2197	19	3.	13,84	2,066
19.07.2020	3197	19	6.	25,09	0,796
19.07.2020	4197	19	9.	36,57	1,113
19.07.2020	5197	19	12.	48,06	0,843
21.07.2020	1217	21	Přízemí	0,3	188,682
21.07.2020	2217	21	3.	13,84	2,059
21.07.2020	3217	21	6.	25,09	2,009
21.07.2020	4217	21	9.	36,57	1,396
21.07.2020	5217	21	12.	48,06	0,736
23.07.2020	1237	23	Přízemí	0,3	444,826
23.07.2020	2237	23	3.	13,84	50,109
23.07.2020	3237	23	6.	25,09	25,847
23.07.2020	4237	23	9.	36,57	17,897
23.07.2020	5237	23	12.	48,06	8,367
25.07.2020	1257	25	Přízemí	0,3	9,831
25.07.2020	2257	25	3.	13,84	0,124
25.07.2020	3257	25	6.	25,09	0,123
25.07.2020	4257	25	9.	36,57	0,165
25.07.2020	5257	25	12.	48,06	0,03
27.07.2020	1277	27	Přízemí	0,3	74,887
27.07.2020	2277	27	3.	13,84	6,146
27.07.2020	3277	27	6.	25,09	3,619
27.07.2020	4277	27	9.	36,57	7,255
27.07.2020	5277	27	12.	48,06	8,409
29.07.2020	1297	29	Přízemí	0,3	5,547
29.07.2020	2297	29	3.	13,84	3,258
29.07.2020	3297	29	6.	25,09	0,36
29.07.2020	4297	29	9.	36,57	0,041
29.07.2020	5297	29	12.	48,06	0,259
31.07.2020	1317	31	Přízemí	0,3	16,027
31.07.2020	2317	31	3.	13,84	3,169
31.07.2020	3317	31	6.	25,09	0,97
31.07.2020	4317	31	9.	36,57	0,225
31.07.2020	5317	31	12.	48,06	0,304
02.08.2020	128	2	Přízemí	0,3	0,069
02.08.2020	228	2	3.	13,84	0,065
02.08.2020	328	2	6.	25,09	0,079
02.08.2020	428	2	9.	36,57	0,058
02.08.2020	528	2	12.	48,06	0,036
04.08.2020	148	4	Přízemí	0,3	0,254

Den	Název vzorku	Název statistika	Patra	Výška	CN
04.08.2020	248	4	3.	13,84	0,052
04.08.2020	348	4	6.	25,09	0,1
04.08.2020	448	4	9.	36,57	0,034
04.08.2020	548	4	12.	48,06	0,018
06.08.2020	168	6	Přízemí	0,3	659,063
06.08.2020	268	6	3.	13,84	0,209
06.08.2020	368	6	6.	25,09	0,282
06.08.2020	468	6	9.	36,57	0,153
06.08.2020	568	6	12.	48,06	0,03

*Příloha 1:* Odběry vzorků, název vzorku během qPCR, název vzorku ve statistickém vyhodnocení, pozice lapače (patro, výška), počet kopií DNA ve vzorku; Červeně jsou označeny vzorky, které byly z důvodu anomálie vyřazeny

Den	Teplota (°C)	Srážky (mm)
01.07.2020	31	0
02.07.2020	26	1,4
03.07.2020	24	0
04.07.2020	26	0
05.07.2020	28	0
06.07.2020	26	0
07.07.2020	21	0
08.07.2020	26	0,3
09.07.2020	28	0,3
10.07.2020	33	23,3
11.07.2020	18	11,5
12.07.2020	22	0,1
13.07.2020	23	0
14.07.2020	24	0
15.07.2020	25	1
16.07.2020	18	3,3
17.07.2020	20	1,4
18.07.2020	16	21,9
19.07.2020	25	0,1
20.07.2020	28	1,8
21.07.2020	25	0,8
22.07.2020	27	0,1
23.07.2020	27	0
24.07.2020	27	0,1
25.07.2020	27	0
26.07.2020	26	0
27.07.2020	28	0
28.07.2020	33	0
29.07.2020	28	0
30.07.2020	30	0
31.07.2020	30	0
01.08.2020	32	0
02.08.2020	26	0
03.08.2020	18	17,5
04.08.2020	15	17,6
05.08.2020	22	0
06.08.2020	27	0,1

*Příloha 2: Průběh počasí před a během odběrů; srážky i teplo jsou uvedeny jako denní průměry*



## 5 Protocols

### 5.1 PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as DNA concentration and removal of salts, enzymes, etc. from enzymatic reactions (SDS < 0.1 %).

#### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

#### 1 Adjust DNA binding condition

For very small sample volumes < 30 µL adjust the volume of the reaction mixture to 50–100 µL with water.



+ 2 vol NTI per  
1 vol sample

It is not necessary to remove mineral oil.

Mix 1 volume of sample with 2 volumes of Buffer NTI (e.g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NTI).

*Note:* For removal of small fragments like primer dimers dilutions of Buffer NTI can be used instead of 100% Buffer NTI. Please refer to section 2.3.

#### 2 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.



Load sample

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



11,000 x g  
30 s

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.

#### 3 Wash silica membrane

Add 700 µL Buffer NT3 to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



+ 700 µL NT3



11,000 x g  
30 s

Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and improve  $A_{260}/A_{230}$  values (see section 2.7 for detailed information).



+ 700 µL NT3



11,000 x g  
30 s

---

#### 4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



**11,000 x g**  
**1 min**

*Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.*

---

#### 5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



**+ 15–30 µL NE**  
**RT**  
**1 min**  
**11,000 x g**  
**1 min**

*Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.*

*Příloha 3: (2/2) Přečistění PCR produktů před klonováním*

---

**Protocol A. Plasmid DNA purification using centrifuges**

Step	Procedure
1	Resuspend the pelleted cells in <b>250 µL of the Resuspension Solution</b> . Transfer the cell suspension to a microcentrifuge tube. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain. <b>Note.</b> Ensure RNase A has been added to the Resuspension Solution (as described on p.3)
2	Add <b>250 µL of the Lysis Solution</b> and mix thoroughly by inverting the tube 4-6 times until the solution becomes viscous and slightly clear. <b>Note.</b> Do not vortex to avoid shearing of chromosomal DNA. Do not incubate for more than 5 min to avoid denaturation of supercoiled plasmid DNA.
3	Add <b>350 µL of the Neutralization Solution</b> and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4-6 times. <b>Note.</b> It is important to mix thoroughly and gently after the addition of the Neutralization Solution to avoid localized precipitation of bacterial cell debris. The neutralized bacterial lysate should become cloudy.
4	Centrifuge for 5 min to pellet cell debris and chromosomal DNA.
5	Transfer the supernatant to the supplied GeneJET spin column by decanting or pipetting. Avoid disturbing or transferring the white precipitate. <b>Note. Close the bag with GeneJET Spin Columns tightly after each use!</b>
6	Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube. <b>Note.</b> Do not add bleach to the flow-through, see p.8 for Safety Information.
7 for EndA+ strains only	<i>Optional:</i> use this preliminary washing step only if EndA+ strains which have high level of nuclease activity are used. Wash the GeneJET spin column by adding 500 µL of Wash Solution I (#R1611, diluted with isopropanol) and centrifuge for 30-60 sec. Discard the flow-through. <b>Note.</b> This step is essential to remove trace nuclease activity.
8	Add <b>500 µL of the Wash Solution</b> (diluted with ethanol prior to first use as described on p.3) to the GeneJET spin column. Centrifuge for 30-60 seconds and discard the flow-through. Place the column back into the same collection tube.
9	Repeat the wash procedure (step 8) using <b>500 µL of the Wash Solution</b> .
10	Discard the flow-through and centrifuge for an additional 1 min to remove residual Wash Solution. This step is essential to avoid residual ethanol in plasmid preps.
11	Transfer the GeneJET spin column into a fresh 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add <b>50 µL of the Elution Buffer</b> to the center of GeneJET spin column membrane to elute the plasmid DNA. Take care not to contact the membrane with the pipette tip. Incubate for 2 min at room temperature and centrifuge for 2 min. <b>Note.</b> An additional elution step (optional) with Elution Buffer or water will recover residual DNA from the membrane and increase the overall yield by 10-20%. For elution of plasmids or cosmids >20 kb, prewarm Elution Buffer to 70°C before applying to silica membrane.
12	Discard the column and store the purified plasmid DNA at -20°C.

*Příloha 4: Přečištění plasmidu po klonování pomocí GeneJET spin Columns*

- 
- 1.1 Set up the required number of 0.5-mL tubes for standards and samples. The Qubit<sup>®</sup> ssDNA Assay requires 2 standards.

**Note:** Use only thin-wall, clear, 0.5-mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit<sup>®</sup> assay tubes (Cat. no. Q32856) or Axygen<sup>®</sup> PCR-05-C tubes (part no. 10011-830).

- 1.2 Label the tube lids.

**Note:** Do not label the side of the tube as this could interfere with the sample read. Label the lid of each standard tube correctly. Calibration of the Qubit<sup>®</sup> Fluorometer requires the standards to be inserted into the instrument in the right order.

- 1.3 Prepare the Qubit<sup>®</sup> working solution by diluting the Qubit<sup>®</sup> ssDNA Reagent 1:200 in Qubit<sup>®</sup> ssDNA Buffer. Use a clean plastic tube each time you prepare Qubit<sup>®</sup> working solution. **Do not mix the working solution in a glass container.**

**Note:** The final volume in each tube must be 200  $\mu$ L. Each standard tube requires 190  $\mu$ L of Qubit<sup>®</sup> working solution, and each sample tube requires anywhere from 180–199  $\mu$ L. Prepare sufficient Qubit<sup>®</sup> working solution to accommodate all standards and samples.

For example, for 8 samples, prepare enough working solution for the samples and 2 standards: ~200  $\mu$ L per tube in 10 tubes yields 2 mL of working solution (10  $\mu$ L of Qubit<sup>®</sup> reagent plus 1990  $\mu$ L of Qubit<sup>®</sup> Buffer).

- 1.4 Add 190  $\mu$ L of Qubit<sup>®</sup> working solution to each of the tubes used for standards.

- 1.5 Add 10  $\mu$ L of each Qubit<sup>®</sup> standard to the appropriate tube, then mix by vortexing 2–3 seconds. Be careful not to create bubbles.

**Note:** Careful pipetting is critical to ensure that exactly 10  $\mu$ L of each Qubit<sup>®</sup> standard is added to 190  $\mu$ L of Qubit<sup>®</sup> working solution.

- 1.6 Add Qubit<sup>®</sup> working solution to individual assay tubes so that the final volume in each tube after adding sample is 200  $\mu$ L.

**Note:** Your sample can be anywhere from 1–20  $\mu$ L. Add a corresponding volume of Qubit<sup>®</sup> working solution to each assay tube: anywhere from 180–199  $\mu$ L.

- 1.7 Add each sample to the assay tubes containing the correct volume of Qubit<sup>®</sup> working solution, then mix by vortexing 2–3 seconds. The final volume in each tube should be 200  $\mu$ L.

- 1.8 Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes.

*Příloha 5: Kalibrace přístroje Qubit a příprava vzorků před měřením koncentrace*

---

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Rozšíření Jasanu ztepilého v Evropě.....	10
Obrázek 2: Rozšíření Jasanu ztepilého v Evropě.....	11
Obrázek 3: Schéma životního cyklu <i>H. fraxineus</i> .....	16
Obrázek 4: Symptomy nekrózy jasanů .....	18
Obrázek 5: Lapač spór s rotujícími rameny Rottrap 52 .....	21
Obrázek 6: Průběh PCR reakce.....	23
Obrázek 7: Typy sond .....	26
Obrázek 8: Amplifikační křivka v průběhu reakce .....	27
Obrázek 9: Aplifikační křivka v průběhu reakce .....	28
Obrázek 10: Mapa znázorňující silo s umístěnými lapači ROTTRAP .....	30
Obrázek 11: Umístění lapačů .....	31
Obrázek 12: Příprava lapačů .....	32
Obrázek 13: Vizualizace amplifikonů z PCR reakce.....	35
Obrázek 14: Petriho misky s LB agarem a separovanými koloniemi <i>E.coli</i> .....	37
Obrázek 15: Vizualizace amplifikonů z PCR reakce.....	39
Obrázek 16: Qubit <sup>TM</sup> fluorometru.....	39
Obrázek 17: Přístroj pro Real-Time qPCR analýzu.....	40
Obrázek 18: Absolutní kvantifikace .....	42
Obrázek 19: Graf naměřených hodnot .....	43
Obrázek 20: Semilogaritmický graf z naměřených hodnot.....	44
Obrázek 21: Semilogaritmický graf z naměřených hodnot po vymazání dat .....	45
Obrázek 22: Graf naměřených hodnot – doplněn o odhadnutý model .....	46

---

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozmístění lapačů spór na síle.....	31
Tabulka 2: Složení PCR reakce Green master mix.....	34
Tabulka 3: Průběh PCR reakce Green master mix.....	35
Tabulka 4: Složení klonovací reakce .....	36
Tabulka 5: Složení PCR reakce Green master mix.....	38
Tabulka 6: Průběh PCR reakce Green master mix.....	38
Tabulka 7: Sekvence primerů a Taqman sondy .....	40
Tabulka 8: Složení Real-time PCR reakce.....	41
Tabulka 9: Průběh Real-time PCR reakce .....	41