

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie



Česká
zemědělská
univerzita
v Praze

Vliv faktorů prostředí na kalamitní šíření vybraných
houbových patogenů na jehličnatých dřevinách

Disertační práce

Autor: Ing. Michal Samek

Školitel: doc. Ing. Vítězslava Pešková, Ph.D.

2022

Czech University of Life Sciences Prague

Faculty of Forestry and Wood Sciences

Department of Forest Protection and Entomology



Czech
University
of Life Sciences
Prague

Influence of environmental factors on calamity spreading
of selected fungal pathogens on coniferous trees

Doctoral Dissertation

Author: Ing. Michal Samek

Supervisor: doc. Ing. Vítězslava Pešková, Ph.D.

2022

"Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Vliv faktorů prostředí na kalamitní šíření vybraných houbových patogenů na jehličnatých dřevinách vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele.

Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby."

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. Ing. Vítězslavě Peškové, Ph.D. za odborné vedení disertační práce. Odbornému školiteli Ing. Romanu Modlingerovi, Ph.D., za odborné vedení terénních prací, konzultace k metodice a pomoc při statistickém zpracování rozsáhlých dat, Mgr. et Mgr. Ing. Danielu Baťovi za rady a digitalizaci terénních dat terénu a děkuji všem spoluautorům odborných publikací. Svým nejbližším pak děkuji za velkorysost, trpělivost a podporu.

Disertační práce byla podpořena dvěma projekty IGA FLD ČZU a projektem Grantové služby LČR.

Abstrakt

Stále častěji dochází vlivem disturbancí k nárůstu mortality lesních porostů střední Evropy. Disturbance představují velký problém pro hospodářské lesy především v kombinaci s probíhající změnou klimatu.

Disertační práce se zabývá šířením patogenů působících disturbance a faktory, které mohou ovlivňovat jejich životní cyklus ze tří různých úhlů pohledu. Prvním je hodnocení rozsahu napadení smrku ztepilého a pichlavého kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách, kde jsou sledovány faktory ovlivňující šíření na úrovni porostu. Druhým je fyziologický, kdy je zkoumáno, zda existuje rozdíl v obsahu trehalózy u napadených a nenapadených stromů kloubnatkou smrkovou na kyselých půdách s vyšším obsahem hliníku. Třetím pohledem je šlechtitelský, při kterém byl na mezinárodní výzkumné ploše Hůrky vyhodnocen zdravotní stav pěstovaných proveniencí douglasky tisolisté, který je v posledních letech ovlivněn sypavkami.

Houba *Gemmamyces piceae*, význačný invazní patogen posledního desetiletí v celé oblasti Krušných hor, se během výzkumu vyskytoval na smrku pichlavém i ztepilém. Významnými faktory podmiňující šíření byly věk a zakmenění. Nejvyšší míra napadení smrku ztepilého byla zjištěna ve středně starých porostech. Při plném (10) a nejrozvolněnějším (<6) zakmenění bylo zaznamenáno nižší napadení než v případě průměrného zakmenění (8). Intenzita napadení s ohledem na zakmenění se lišila i ve věkových kategoriích.

Trehalóza, která se vyskytuje v tělech většiny organismů představuje neredukující cukr ze skupiny disacharidů. Může být vnímána jako vhodný ukazatel zdravotního stavu a to proto, že u zdravých jedinců bývá hodnota jejího obsahu významně vyšší než v případě silně středně či silně napadených jedinců. Výsledky vyhodnocení trehalózy prokázaly významný rozdíl hodnoty mezi infikovanými a zdravými jedinci. Stromy napadené kloubnatkou měly slabě vyvinutou mykorhizu a obsah trehalózy byl u poškozených stromů výrazně nižší. Zjištěná nižší koncentrace houbových cukrů a ergosterolu spočívá v příznivých faktorech mykorhizy, která se projevuje vyšší zásobou vody a minerálních živin.

Na mezinárodní ploše Hůrky v oblasti Písecka, byl potvrzen výskyt patogenů z rodů *Rhabdocline* a *Nothophaeocryptopus* na douglasce tisolisté. Zjištěná defoliace poukazovala na zhoršený zdravotní stav, a navíc úzce korelovala s objemem kmene, který u nejvíce defoliováných jedinců jen výjimečně dosáhl 1 m³. Statistické výsledky vykazaly nepřímo úměrný vztah mezi defoliací a průměrným přírůstem. Vhodné provenience k pěstování na našem území pocházejí z oblasti Washingtonu a Britské Kolumbie.

Prezentované výsledky ukazují, že je vhodné při řešení biologie škodlivých činitelů pohlížet na problematiku z více různých pohledů. To i proto, že by nedostatečné srážky a sucho v součinnosti s dalšími patogeny či sekundárními škodlivými činiteli mohly představovat v budoucích letech velké riziko. V České republice je takovým příkladem ve významné kalamitě nebývalých rozměrů kambioxylofágní hmyz, zejména kůrovci (*Ips typographus* (L.), *Pityogenes chalcographus* (L.)), který věcně reprezentuje reálné problémy sucha v kombinaci se sekundárními činiteli.

Klíčová slova: invazní patogeny, kloubnatka smrková, sypavka, trehalóza, faktory šíření

Abstract

More often disturbances are leading to an increase in mortality in the forests of Central Europe. Disturbance is a major problem for forest ecosystems, especially in combination with ongoing climate change.

Dissertation thesis examines the spread of disturbance pathogens and the factors that may influence their life cycle from three different perspectives. The first is an assessment of the extent of the infestation of spruce bud blight (*Gemmamyces piceae*) in the Ore mountains, where factors influencing the spread at the stand level are investigated. The second is physiological, where is investigated whether there is a difference in trehalose content between infested and uninfested spruce trees by bud blight on acid soils with higher aluminium content. The third perspective is a breeding, where the health of cultivated provenances of Douglas-fir, which has been affected by needle casts in recent years, has been evaluated at the Hůrky international research plot.

The pathogen *Gemmamyces piceae*, a prominent invasive pathogen of the last decade throughout the Ore mountains, was present on both Norway spruce and Colorado Blue spruce during the survey. Age and stemming were important factors influencing the spread. The highest infestation rates of Norway spruce were found in medium-aged stands. At full (10) and at the loosest (<6) stemming, lower infestation was recorded than at average stemming (8). The intensity of infestation with respect to stemming also differed between age categories.

Trehalose can be seen as a good indicator of health status because healthy individuals tend to have significantly higher trehalose levels than moderately or severely infested individuals. The results of the trehalose assessment showed a significant difference in values between infected and healthy individuals. Trees infested with bud blight had poorly developed mycorrhiza and the trehalose content was significantly lower in the damaged trees. The observed lower concentration of fungal sugars and ergosterol is due to the favourable factors of mycorrhiza, which is reflected in a higher water and mineral nutrient supply.

The occurrence of pathogens of the genera *Rhabdocline* and *Nothophaeocryptopus* on Douglas fir was confirmed in the international research plot Hůrky in the Písek region. Evaluated defoliation indicated poor health and

was also closely correlated with stem volume, which rarely reached 1 m³ in the most defoliated specimens. Statistical results showed an inversely proportional relationship between defoliation and average increment. Suitable provenances for cultivation in Czechia originates from Washington and British Columbia.

The presented results showed how it is useful to look at the issue from several different perspectives when dealing with pest biology. This is also because inadequate rainfall and drought, in conjunction with other pathogens or secondary harmful agents, could pose a major risk in future years. In the Czechia, one biggest example is a major calamity of unprecedented proportions caused by cambiphagous insects, especially bark beetles (*Ips typographus* (L.), *Pityogenes chalcographus* (L.)), which factually represent the real problems of drought in combination with secondary harmful agents.

Key words: invasive pathogens, Picea bud blight, needle casts, trehalose, spread factors

Obsah

1.	Úvod	13
2.	Cíle práce	18
3.	Rozbor problematiky	18
3.1	Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého	24
3.2	Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové.....	31
3.3	Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě.....	32
4.	Metodika.....	38
4.1	Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého	38
4.2	Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové.....	42
4.3	Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě.....	44
5.	Výsledky	47
5.1	Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého	47
5.2	Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové.....	56
5.3	Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě.....	57
6.	Diskuze.....	61
6.1	Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého	61
6.2	Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové.....	65

6.3 Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě.....	66
7. Závěr	70
8. Seznam literatury a použitých zdrojů.....	73
9. Seznam příloh	100
Přílohy	101

Seznam obrázků

Obrázek 1 Areál přirozeného rozšíření smrku ztepilého (FARJON, 2017).....	25
Obrázek 2 Výskyt kloubnatky smrkové na našem území (ČERNÝ et al., 2016).....	30
Obrázek 3 „Vykloubené“ výhony smrku ztepilého způsobené kloubnatkou smrkovou. 31	
Obrázek 4 Mapa rozšíření douglasky tisolisté v Evropě v rozlišení 1x1 km (BRUS et al., 2011)	33
Obrázek 5 Skotská sypavka douglasky (PEŠKOVÁ, 2003).	36
Obrázek 6 Švýcarská sypavka douglasky (PEŠKOVÁ, 2003).	37
Obrázek 7 Rozmístění studijních výzkumných ploch v Krušných horách.	39
Obrázek 8 Podíl pupenů napadených kloubnatkou smrkovou na smrku pichlavém (2009-2015) a smrku ztepilém ve věkové skupině 31-60 let. Vodorovná čára uprostřed rámečku je medián, metličky představují 1,5násobek mezikvartilového rozpětí (SAMEK et al., 2022).	48
Obrázek 9 Podíl jednotlivých stromů smrku ztepilého napadených václavkou podle věkových tříd v letech 2016-2020. Vodorovná čára uprostřed rámečku je medián, metličky představují 1,5násobek mezikvartilového rozpětí (SAMEK et al., 2022)	49
Obrázek 10 Srovnání podílu napadených stromů podle věku v letech 2016-2020 (SAMEK et al., 2022).	50
Obrázek 11 Podíl napadených smrků ztepilých podle jednotlivých kategorií napadení ve věkové třídě 31-60 let v letech 2016-2020 (SAMEK et al., 2022).....	51
Obrázek 12 Podíl napadených smrků pichlavých podle jednotlivých kategorií napadení ve věkové třídě 31-60 let v letech 2009-2015 (SAMEK et al., 2022).....	51
Obrázek 13 Podíl napadených smrků ztepilých podle jednotlivých kategorií napadení ve věkové třídě 61-100 let v letech 2016-2020 (SAMEK et al., 2022).	52
Obrázek 14 Hodnoty predikované výsledným modelem a pozorované hodnoty (PEŠKOVÁ et al., 2020).	53

Obrázek 15 Závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na věku porostu. Modrá linie představuje vyhlazovací křivku modelu. Body jsou vyjadřují stupeň napadení hodnoceného porostu kloubnatkou v roce 2019, a barevné označení bodu reprezentuje pěti stupňový faktor Zakmenění, kde zakmenění pod hodnotu 6 bylo sloučeno do jedné třídy (PEŠKOVÁ et al., 2020).	53
Obrázek 16 Závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na věku porostu. Modrá linie představuje vyhlazovací křivku modelu. Body jsou vyjadřují stupeň napadení hodnoceného porostu kloubnatkou v roce 2019, a barevné označení bodu reprezentuje hod (PEŠKOVÁ et al., 2020).....	54
Obrázek 17 Krabicový graf závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na zakmenění (PEŠKOVÁ et al., 2020).	54
Obrázek 18 Závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou v roce 2019 na zakmenění, jakožto diskretní numerické veličiny. Modrá linie představuje vyhlazovací spline křivku. Body byly kolorovány podle tří věkových tříd "5-24", "25-75", "76-135 hodnoceného porostu (PEŠKOVÁ et al., 2020).....	55
Obrázek 19 Krabicový graf závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na zakmenění. Jednotlivé krabicové grafy reprezentují pěti stupňový faktor Zakmenění, kde zakmenění pod hodnotu 6 bylo sloučeno do jedné třídy. Krabicové grafy byly rozděleny do tří věkových tříd "5 - 24", "25 - 75", "76 - 135" a barevně odlišeny (PEŠKOVÁ et al., 2020).	55
Obrázek 20 Srovnání chromatogramů z lyofilizovaného materiálu zdravého (červeně) a nemocného (modře) stromu. Retenční doba trehalózy je přibližně 4,5 min (ŠULC et al., 2021)	57
Obrázek 21 Krabicový graf pro míru defoliace jednotlivých proveniencí. Fousky představují 1,5násobek mezikvartilové rozpětí. Písmeno nad proveniencí znamená pobřežní (C) nebo vnitřní (I) (SAMEK et al., 2019).	59
Obrázek 22 Vztah mezi defoliací a rozdílem objemu, resp. průměru, s využitím neparametrických proměnných v zobecněném aditivním modelu. Na ose y jsou rozdíly od průměrné defoliace = 37 % (SAMEK et al., 2019)	60
Obrázek 23 Rozhodovací strom faktorů ovlivňujících zdravotní stav douglasky tisolisté na studijní ploše. Na konci uzlů je uvedena průměrná defoliace (čísla). Zdravější stromy jsou vlevo (černá část rozhodovacího stromu), více poškozené stromy jsou vpravo (SAMEK et al., 2019).	61

Seznam tabulek

Tabulka 1 Způsoby šíření houbových patogenů (převzato z PROSPERO et CLEARY, 2017)	19
--	----

Tabulka 2 Seznam houbových patogenů s potvrzeným výskytem na douglasce (aktualizováno 2022).....	37
Tabulka 3 Klasifikační stupnice pro hodnocení napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou.....	40
Tabulka 4 Přehled monitorovaných ploch ve vztahu kloubnatky k trehalóze	42
Tabulka 5 Původ a základní parametry proveniencí douglasky tisolisté na mezinárodní ploše IUFRO Hůrky	45
Tabulka 6 ANOVA výsledného modelu lme (průměrné napadení porostu ~ Zakmenění+Rok+Věk+Věk : Zakmenění, random=~1 Šestice/Porost).....	53
Tabulka 7 Průměrné kvantitativní dendrometrické veličiny na ploše Hůrky ((SAMEK et al., 2019).	58
Tabulka 8 Výsledný zjednodušený gama model defoliace (SAMEK et al., 2019)	60

1. Úvod

Vzhledem k stále častějšímu výskytu disturbancí, které představují jeden ze základních ekosystémových procesů, dochází od roku 2000 k nárůstu zájmu o jejich management (LINDROTH et al., 2009; TURNER, 2010; SEIDL et al., 2014; SEIDL et RAMER, 2017). Značná ekologická valence umožňující růst dřevin v nejrůznějších vegetačních stupních, společenstvech a na různých stanovištích často způsobuje, že dopad patogenů se může lišit v závislosti na typu výsadeb, porostů a společenstev, a navíc může být také závislý na různých faktorech prostředí. I proto je z dlouhodobého hlediska důležité disponovat informacemi o invazibilitě škodlivých činitelů, jejich dopadu a o významu nejdůležitějších faktorů prostředí v jejich epidemiologii. Souběžně s tímto problémem v posledních několika desetiletích probíhá i výrazná kůrovcová gradace, čímž dochází k nárůstu mortality lesních porostů střední Evropy. Tato gradace představuje velký problém pro lesní dřeviny především v kombinaci s probíhající změnou klimatu. Je patrné, že se v budoucnu budou muset lesy vyrovnat s významnými změnami v přírodních podmínkách, které se negativně projeví na zdravotním stavu jednotlivých dřevin. Lze předpokládat, že reakce lesních ekosystémů nebude s ohledem na věkovou a druhovou skladbu jednotná (KOLSTRÖM et al., 2011; KINT et al., 2012).

V současnosti patří mezi nejvíce ohrožené druhy na našem území jehličnaté dřeviny, a to smrk ztepilý a borovice lesní. Určité riziko představuje i pěstování druhů nepůvodních jako je například douglaska tisolistá nebo smrk pichlavý (KŘIVÁNEK et al., 2006). Tyto introdukované dřeviny jsou součástí krajiny již postaletí. Zpočátku se jednalo především o druhy využívané v provenienčních výzkumech či v parkových varietách, kde plnily funkci estetickou, ale v posledním století začaly být využívány v lesnictví i jako alternativy za domácí dřeviny (KŘIVÁNEK et al., 2006). K jejich pěstování se přistupuje především proto, že je díky nim možné dosáhnout zvýšení produkční funkce lesů. Je otázkou, zda do určité míry nevede jejich využití i ke zvýšení stability porostů. Introdukované druhy sebou ale nesou i určitá rizika, například se mohou stát druhy invazními, které se posléze nekontrolovatelně šíří a vytlačují druhy původní včetně bylinné vegetace. Navíc často dochází s jejich introdukcí i k zavlečení invazních škodlivých organismů, které mohou v prostředí s nedostatečnou vyvinutou

odolností působit významné hospodářské škody (PANZAVOLTA et al., 2021). Invazní organismy jsou typické tím, že se na rozsáhlém území šíří na značné vzdálenosti od mateřské populace, a především jejich šíření ohrožuje biologickou rozmanitost či ekosystémové služby. Do této kategorie patří i invazní patogeny, které se často na našem území objeví právě na nepůvodních dřevinách, a následně ohrožují dřeviny autochtonní. Předložená práce i právě proto řeší šíření invazních patogenů vzbuzujících vážné obavy na introdukovaných a autochtonních dřevinách v lesním hospodářství.

Smrk ztepilý *Picea abies* (L.) Karst.) je jedna z nejrozšířenějších dřevin ve střední a severní Evropě (JÖNSSON et al., 2012), a především dřevina s největším procentuálním zastoupením na našem území (MZe 2021), kterou zasáhla masivní kůrovcová kalamita způsobená zejména zástupci podčeledi *Scolytinae* (HLÁSNY et al., 2021). V minulosti již došlo několikrát na našem území k výraznému poškození smrkových porostů, jednou z příčin byly například znečišťující látky v ovzduší, jako jsou ozon (O₃), oxidy dusíku (NO_x) a oxidy síry (SO_x), které významně přispěly ke zhoršení zdravotního stavu lesa (KANDLER et INES, 1995). V Evropě byl tento jev pozorován v mnoha zemích, například v sousedním Německu, Polsku, Rakousku nebo Švýcarsku (FUHRER, 1985), a ve střední Evropě vedl na mnoha místech k destabilizaci a rozpadu smrkových porostů (ULRICH, 1984; LOMSKÝ et al. 2002). Na území Česka došlo v minulosti k výraznému poškození lesů v oblasti Krušných hor, které souviselo s počátkem spalování uhlí (STOKLASA, 1923; NOŽIČKA, 1963). V 80. letech 20. století se po extrémním imisním zatížení ovzduší rozpadla většina smrkových a bukových porostů. Proto začaly být vysazovány náhradní dřeviny, u kterých se předpokládalo, že by měly být vůči působením imisí odolnější. Jednou z nejčastěji využívaných introdukovaných dřevin byl smrk pichlavý *Picea pungens* Engelm., který se až do počátku třetího tisíciletí jevil jako vhodná alternativa (SLODIČÁK et al., 2008).

Po výrazném odsíření elektráren koncem 20. století došlo od roku 2009 v lesních porostech Krušných hor k epidemickému šíření kloubnatky smrkové *Gemmamyces piceae* (Borthw.) Casagr. – houby s disjunktním holarktickým areálem poškozující pupeny zejména smrku pichlavého. Kloubnatka smrková, která napadené pupeny u infikovaných smrků deformuje, byla poprvé objevena

na smrku pichlavém v Abercairney, Perthshire (UK) v roce 1906 (BORTHWICK, 1909; SHOEMAKER, 1967). S ohledem na četnost nálezů byla střední Evropa včetně Česka po roce 1910 (KÖCK, 1918, TUBEUF, 1919) považována za hlavní ohnisko výskytu a šíření. Nicméně poté, až do začátku 21. století nebyla *G. piceae* nalézána. Posléze byl patogen znovu objeven v roce 2009 a jeho masivní šíření v porostech náhradních dřevin tvořených *P. pungens* v Krušných horách a Sudetských pohořích bylo v roce 2012 potvrzeno na ploše více než jednotky tisíc hektarů. Pro zmíněnou oblast představovalo velké riziko především to, že výskyt této houby byl již znám i na evropském smrku ztepilém *P. abies*, u kterého ale doposud nebyla zaznamenána zásadnější infekce či významné hospodářské škody. V roce 2015 však došlo k významnému rozšíření kloubnatky smrkové do všech věkových tříd smrku ztepilého. Právě proto bylo nutné zjistit současné rozšíření v PLO1¹ a determinovat faktory prostředí, které ovlivňují životní cyklus patogenu a podmiňují jeho další šíření.

Kvalitní a živá mykorhiza zvyšuje odolnost stromů vůči patogenům i těžkým kovům a zajišťuje jim konkurenční výhodu ve využívání lesních půd chudých na živiny (GRYNDLER et al., 2004; GÁPER et MIHÁL, 2008). Mykorhiza umožňuje stromům efektivněji využívat zdroje z prostředí, v němž žijí a získávat tak mnohem více živin a vody (GRYNDLER et al., 2004). V soužití hub s kořeny vyšších rostlin (mykorhiza) se setkáváme s trehalózou, která se vyskytuje asi u 80 % všech rostlin. Hlavním důvodem zjišťování obsahu trehalózy u mykorhizních kořenů je to, že dobře reprezentuje zdravotní stav stromu. Je možné předpokládat, že stromy s vyšším obsahem trehalózy mají lépe rozvinutou mykorhizu, protože ta představuje jeden z produktů metabolismu hub. Stanovení obsahu konkrétního produktu metabolismu hub by mělo s mírou rozvinutí mykorhizy korespondovat, a to i přes to, že je kvantifikace mykorhizy obecně poněkud obtížnější. Určitou roli hrají v této problematice i přírodní podmínky, resp. půdní, jelikož u kyselých půd s obsahem velkého množství hliníku bývá snížený výskyt mykorhizních hub, a následně snížená hodnota trehalózy, která by mohla mít za následek nižší odolnost vůči stresům. Trehalóza kromě osmotických vlastností plní funkci při regulaci metabolismu sacharidů, kdy reguluje využití sacharózy a zvyšuje fotosyntetickou kapacitu. Právě z těchto

¹ Přírodní lesní oblast 1 – Krušné hory

důvodů byl během fyziologických měření na výzkumných plochách v Krušných horách porovnán rozdíl v obsahu trehalózy u napadených a nenapadených stromů.

Je zřejmé, že se na zhoršeném zdravotním stavu smrku ztepilého podílí celá řada faktorů. Proto se stále častěji setkáváme s dřevinami, které by mohly být substitučně využívány. Významnou introdukovanou dřevinou, mnohdy z tohoto důvodu zmiňovanou v oblastech se zhoršeným zdravotním stavem mlazin (KUBEČEK et al., 2014), je douglaska tisolistá *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, která je pěstována ve střední Evropě z důvodu vysoké produkce a schopnosti stabilizovat lesní porosty především proti větrným polomům (ŠINDELÁŘ et BERAN, 2004; KUBEČEK et al., 2014). Různé výsadby této dřeviny s nedoloženým původem vznikaly v Evropě již v průběhu 19. století, přičemž první provenienční výzkum zaměřený na odolnost dřeviny, produkci a kvalitu byl proveden v Německu v roce 1910 (BASTIEN et al., 2013). Ve srovnání se smrkem ztepilým douglaska zásadně nezhoršuje půdní vlastnosti a má poměrně pozitivní vliv na tvorbu humusu, pH půdy, a navíc je při vhodných lesnických postupech schopna přirozené obnovy (ŠINDELÁŘ et BERAN, 2004, PODRÁZSKÝ et REMEŠ, 2008; PODRÁZSKÝ et KUBEČEK, 2014). Její využití je ale podmíněno vhodností jednotlivých proveniencí, což bylo doloženo řadou autorů v mnoha evropských zemích (ŁAKOMY et IWAŃCZUK, 2010; PETKOVA et al., 2014). Dalším významným hodnotícím aspektem pro využití douglasky je i posouzení možného nebezpečí napadení patogeny.

V roce 2010 při kontrole zdravotního stavu porostů v okolí mezinárodní výzkumné plochy IUFRO Hůrky na bývalém školním polesí Písek bylo zjištěno jejich silnější poškození způsobené sypavkami *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow a *Nothophaeocryptopus gaeumannii* (T. Rohde) Videira, C. Nakash., U. Braun & Crous, in Videira, Groenewald, Nakashima, Braun, Barreto, de Wit & Crous 2017 syn. *Nothophaeocryptopus gaeumannii* (Rohde) Petr. Na lokalitě Hůrky, s největší koncentrací douglasky tisolisté na našem území, došlo v kombinaci se suchem, především v letech 2010-2015, ke zhoršování jejího zdravotního stavu. Jelikož se nejedná o domácí dřevinu, ale o taxon pocházející ze Severní Ameriky, nebyl zatím v ČR ve větší míře hodnocen zdravotní stav jednotlivých proveniencí, spíše se jednalo o hodnocení produkce a kvality. Oba

zmíněné druhy vyskytující se na douglaskách byly nalezeny počátkem 20. století ve Skotsku, resp. ve Švýcarsku (GERNANDT et al., 1997; PEŠKOVÁ, 2003; KIMBERLEY et al., 2011) a jejich přítomnost byla potvrzena i na jiných místech našeho území (PEŠKOVÁ, 2003). Vzhledem k tomu, že nebyla v minulosti těmto patogenům přikládána téměř žádná důležitost, bylo nezbytné provést na mezinárodní ploše IUFRO Hůrky vyhodnocení míry infekce u jednotlivých proveniencí a zpřesnit biologii obou patogenů. Sypavky představují komplikaci při pěstování jehličnatých dřevin, o čemž svědčí i zvýšená pozornost při sledování a regulaci dvou druhů – *Dothistroma septosporum* (Dorogin) M. Morelet a *Lecanosticta acicola* (Thüm.) Syd.) v letech 2006-2014, které byly v roce 2019 přerazeny mezi regulované nekaranténní organismy a z území ČR je není nutné kromě školkařských provozů eradikovat. Jedná se o patogeny, které napadají a poškozují asimilační orgány, čímž dochází ke chlorotizaci, řídnutí a následné defoliaci korun.

Patogeny *Rhabdocline pseudotsugae*, *Nothophaeocryptopus gaeumannii* a *Gemmamyces piceae* představují velké riziko pro lesní ekosystémy, a to i s ohledem na fakt, že je bylo možné pozorovat v našich podmínkách již v minulém tisíciletí. Je tedy nezbytné shrnout jejich biologii včetně charakteristiky živných rostlin, rozšíření na našem území a faktory, které šíření ovlivňují a podmiňují. U obsahu trehalózy, který může dobře reprezentovat zdravotní stav dřevin, je velmi důležité stanovit správnou metodiku zpracování, vyhodnocení kořenů s následnou extrakcí, kvantifikací trehalózy a porovnat obsah trehalózy vkořenech zdravých a poškozených stromů kloubnatkou smrkovou. Tato práce si klade za cíl zmapovat rozšíření kloubnatky smrkové na smrku ztepilém v Krušných horách včetně vyhodnocení vlivu nejdůležitějších faktorů ovlivňující rozsah jejího šíření a zároveň zhodnotit zdravotní stav proveniencí douglasky tisolisté vhodné k pěstování na našem území i s ohledem na probíhající klimatickou změnu, a to i proto, že chybí ucelené výstupy na zmíněná témata.

2. Cíle práce

- Zmapovat rozšíření kloubnatky smrkové (*Gemmamyces piceae*) Borthw. Casagr. na smrku ztepilém a pichlavém v Krušných horách a vyhodnotit faktory prostředí, které mají vliv na šíření patogenu.
- Vyhodnotit zdravotní stav proveniencí douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii* Mirb./Franco) na provenienční ploše Hůrky, která se vzhledem k opakovaným významným obdobím sucha stává náchylnější k napadení houbovými patogeny.
- Zjistit, zda existuje rozdíl v obsahu trehalózy u napadených a nenapadených stromů na kyselých půdách s vyšším obsahem hliníku.

3. Rozbor problematiky

Řada patogenů vážně ohrožuje zdravotní stav dřevin (MORRICA et PANZAVOLTA, 2021; BALLA et al., 2022; OLSON et STENLID, 2022), proto představují významná rizika stejně, jako další biotičtí škůdci, například podkorní hmyz, chrousti, drobní hlodavci nebo zvěř. Jejich působením může docházet k odumření jehličnatých i listnatých dřevin napříč celým světem (KRAUSE et al., 1986; ORCUTT et NILSEN, 2000; THOMAS et al., 2002; OLIVA et al., 2016; PAAP et al., 2022).

Existuje mnoho možností, díky kterým k šíření patogenů dochází (Tabulka 1). Pro ochranu dřevin je důležité pochopit, i to jakým způsobem rozšiřování patogenu ovlivňuje vlastnosti organismu a dynamiku samotného procesu šíření. Jedná se o zcela zásadní informace pro preventivní a prediktivní opatření (PROSPERO et CLEARY, 2017). Samotné šíření často ovlivňuje celá řada faktorů, mezi které patří potenciál distribuce ve vztahu k reprodukčnímu potenciálu patogenu, přirozená schopnost rozšiřování a způsoby které usnadňují šíření mezi jednotlivými segmenty lesa (HENGEVELD, 1989; BEBBER, 2015). Distribuci patogenů je možné rozdělit do dvou hlavních kategorií, a to šíření přímou a nepřímou (pasivní) cestou. Přímou cestu představují infikovaná semena, sadební materiál a další vegetativní části rostlin. K nepřímému šíření dochází pomocí větru, vektorů, hmyzu, vody aj. (PROSPERO et CLEARY, 2017). Ačkoli

je možné pozorovat migrace i na velké vzdálenosti, pro úspěšné usídlení patogenu je pravděpodobně nejdůležitější šíření na krátké až střední vzdálenosti, které výrazně ovlivňuje dynamiku a přetrvání patogenu v invadované lokalitě (GHELARDINI et al., 2017).

Tabulka 1 Způsoby šíření houbových patogenů (převzato z PROSPERO et CLEARY, 2017)

Způsob šíření	Popis
Větre	Houby, které tvoří konidie nebo spory na povrchu hostitele, mohou být snadno unášeny větrem (rzi, sypavky, listové skvrnitosti) s rychlostí 0,05 až 2,5 cm/s jako inertní částice. Větší spory padají rychleji než menší. Může docházet k šíření až na vzdálenost kilometrů.
Vodou	Hlavně u patogenů vyskytujících se v blízkosti vodních toků či potoků ve formě unášených zoospor či kontaminovaného materiálu. Kromě prudších toků a řek bývá tento způsob méně efektivní na větší vzdálenosti. Existuje i možnost šíření rozstřikem či kontaminovanou zálivkou.
Autonomní šíření	Při tomto způsobu dochází k nepřetržitému a trvalému růstu hyf, které se mohou nezávisle pohybovat půdou od rostliny k rostlině (typicky václavka ve formě rhizomorf). Rozptýl růstu se může pohybovat od několika centimetrů do několika metrů za rok.
Vektory	U druhů, které se nemohou šířit z rostliny na rostlinu a k šíření potřebují zcela jiný nepřibuzný druh. Např. šíření odumírání jilmů v podobě kůrovců rodu <i>Scolytus</i> . Některé druhy poškozují vodivá pletiva, jimiž může patogen vstoupit do hostitele.
Antropogenně	Prostřednictvím člověka a jeho aktivit. Např. infikovaným sadebním materiálem, kontaminací rostlin či při nesprávném zacházení se zdravými rostlinami.

Řada patogenů ke svému šíření využívá více způsobů. V lesních ekosystémech se nejčastěji setkáváme s šířením větrem, kdy vítr unáší spory,

a to i na vzdálenosti tisíců kilometrů (HENGEVELD, 1989, KOLMER et al., 2009). Aby mohlo k šíření vůbec dojít, je nezbytné dostat infikované spory do vzduchu. K tomu dochází například vlivem rozdílných teplot vzduchu a infikovaných částí (např. letorostů a jehlic) nebo proudící studenou vlnou vzduchu (CLOSE et al., 1978). Na samotném šíření se poté významně podílejí teplota vzduchu, srážky a radiace (GREGORY, 1973). Zvláštní případ představují některé jednobytné i dvoubytné rzi (pět stádií výtrusů – bazidiospory, spermacie, aeciospory, urediospory, teliospory) a dvoubytné rzi schopné střídat hostitele. Přestože k šíření všech stádií spor dochází větrem, tak je možné mezi jednotlivými druhy spor pozorovat rozdíly. Bazidiospory vyžadují ke svému šíření a přežití vysokou vzdušnou vlhkost a konstantní teplotu (HELPER, 2014). Teliospory jsou největší, tudíž nepřiliš pohyblivé. Na velké vzdálenost se mohou šířit pouze při nižší vlhkosti a bez srážek, které šíření značně zpomalují (KOLMER et al., 2009; HELPER, 2014). Nejnebezpečnější typem spor jsou urediospory, které se při unášení větrem na hostitele dostávají ve formě mlhy s deštěm, který je pro úspěšné šíření nezbytný, a navíc mají schopnost se uchytit na další vektory, kterými jsou například vozidla, zavazadla či hmyz (KOLMER et al., 2009, HELPER, 2014).

K šíření vodou často dochází i ve formě opakované zálivky. Nejznámějším způsobem je ale unášení rostlinných částí a volných zoospor (HONG et MOORMAN, 2005). Tímto způsobem se šíří např. jeden z nejnebezpečnějších invazních organismů – rod *Phytophthora* (JUNG et al., 2018). Zálivka, zejména ve školkařských zařízeních, může být zdrojem infekce, zejména jedná-li se o recyklovanou vodu z rybníků, řek či přilehlých vodních zdrojů (HONG et MOORMAN, 2005). Detekovat a kvantifikovat patogen v zálivce je možné několika způsoby. Houby, hlístice a bakterie je možné v některých případech zachytit na filtry či sítkem (PETTIT et al., 2002). Patogeny, které je možné kultivovat, lze přímo inokulovat na médium, použít rezidua z filtru nebo je zředit a inokulovat na semi-selektivní médium (JEFFERS et MARTIN, 1986; OUDEMANS, 1999).

Další druh šíření – autonomní, probíhá ve chvíli, kdy je patogen schopen infikovat další jedince díky trvalému růstu hyf. Tuto skupinu na našem území reprezentuje zejména václavka, která v současné době představuje jednu z nejzásadnějších dřevokazných hub škodících v hospodářských lesích

(GUILLAUMIN et al., 1993; LEONTOVYČ et KUNCA, 2006; KUBIAK et al., 2017; COETZEE et al., 2018).

U šíření patogenů pomocí vektorů je základním předpokladem využití dalšího druhu, který patogen přenesou na dalšího hostitele. Příkladem jsou např. patogeny přenášené hlísticemi, savci, ale v lesních ekosystémech především v interakci s hmyzem, jehož některé druhy mají schopnost absorbovat inokulaci infekce a následně ji poraněním rostlinných pletiv rozšířit na další hostitele (PROSPERO et CLEARY, 2017).

Poslední kategorii představuje šíření způsobené antropogenními vlivy, tedy působením člověka, například ve formě přenosu pomocí infikovaných semen nebo jiného sadebního materiálu. Může ale dojít i k šíření při nevhodně provedené asanaci infikovaného dříví či kontaminací pracovních nástrojů (PROSPERO et CLEARY, 2017). Velmi známým případem je kombinovaný způsob zavlečení patogenu *Ophiostoma ulmi* z Evropy do USA, kdy došlo k přenosu infekce skrze vytěženou kulatinu jilmového dřeva a následně pomocí vektorů, které představovali kůrovci rodu *Scolytus* (BRASIER et KIRK, 2010). Paradoxně v Severní Americe došlo k potlačení *O. ulmi* domácími druhy z rodu *Ophiostoma*, a nejvýznamnější z nich *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier byl následně znovu zavlečen do Evropy, kde jeho působením došlo k nevratným rozvratům porostů, které od počátku tisíciletí stále trvají a značně tak omezují pěstování jilmů (STENLID et al., 2011; JÜRISOO et al., 2019).

Ze zmíněných způsobů šíření představuje ten antropogenní v současné době největší riziko pro lesní hospodářství (STENLID et al., 2011). Vlivem člověka často dochází k šíření nepůvodních a někdy i invazních druhů. Ty představují velmi důležitou kategorii, přičemž jejichž cesta ke zdomácnění je v současnosti rychlejší než dříve, a to především vlivem člověka. Určitý podíl na tom má i stále častější volba intenzivních způsobů hospodaření (např. pasečný způsob), která napadení hostitele významně usnadňuje. To platí i přesto, že invadující patogeny zpravidla překonávají celou řadu obtížných bariér – geografickou, fyto-sanitární, environmentální či přírodní. Ta bývá tou nejdůležitější, jelikož si v ní patogen hledá cílového, a především citlivého místního původního hostitele (BRIGHT, 1999; PFALLER et al., 2006; STENLID et OLIVA, 2016; GHELARDINI et al., 2017).

Invazní, a zejména zdomácnělé organismy, které se na dané území dostaly teprve s přispěním člověka se na něm mohou samovolně a nekontrolovatelně šířit. Z více než 90 taxonů z různých řádů a tříd, které do této skupiny náleží, má až 10 % z nich potenciál poškozovat populace svých hostitelů či celé ekosystémy (ČERNÝ et al., 2016b). Je velmi obtížné jejich vliv zásadně omezit či dokonce druh eradikovat (BRIGHT, 1999; PFALLER et al., 2006; WALKER et al., 2008), jejich prospěritě napomáhají i postupné změny lesních ekosystémů často související se změnou klimatu (BONAN, 2008; CANADELL et RAUPACH, 2008; LA PORTA et al., 2008; LINDNER et al., 2008; KOLSTRÖM et al., 2011; BRANG et al., 2014). Invazní patogeny představují velké riziko u jedinců oslabených abiotickými a dalšími biotickými činiteli (LA PORTA et al., 2008).

Mezi nejvýraznější zástupce patogenů posledních let patří v Evropě rod *Phytophthora* (BRASIER, 1996; HANSEN et DELATOUR, 1999; JUNG et al., 2000). Chřadnutí způsobené tímto patogenem se objevilo již v 90. letech 20. století, a to zejména v dubových porostech mediteránní části Evropy, kdy docházelo k odumírání dubu letního *Quercus robur* L. a dubu cesmínovitého *Quercus ilex* L. či v Severní Americe (GARBELOTTO et HAYDEN, 2012; GRÜNWALD et al., 2012), kde došlo k poškození autochtonních severoamerických druhů na kalifornském pobřeží v délce více než 300 km (RIZZO et al., 2002). Riziko ale tato skupina patogenů představuje i pro řadu dalších lesních a nelesních dřevin (KUNCA et LEONTOVYČ, 2005; JUNG et al., 2018; SCOTT et al., 2019). Mezi nejznámější zástupce patří *P. cambivora* (Petri) Buisman; *P. cinnamomi* Rands; *P. multivora* Scott & Jung; *P. plurivora* Jung et Burgess; *P. ramorum* Werres, de Cock & Man in 't Veld a *P. alni* species complex. Poslední zástupce – plíseň olšová (*P. alni*) způsobil na našem území od roku 2001 velké škody v cenných břehových porostech tvořených zástupci rodu olše (*Alnus* sp.) (ČERNÝ et al., 2008; ROMPORTL et al., 2016). Hlavním faktorem podílejícím se na tak masivním šíření patogenu byly záplavy a delší dobu stojící voda, která vytvořila optimální podmínky pro vývoj a šíření patogenu (STRNADOVÁ et al., 2010).

Kruciální patogen způsobující chřadnutí jasanů – voskovička jasanová *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya si na území Evropy prošla zajímavým vývojem. Její výskyt byl znám již před rokem 1850, tehdy ještě jako saprofyt *Peziza albida* Roberge (DESMAZIÈRES, 1850) na

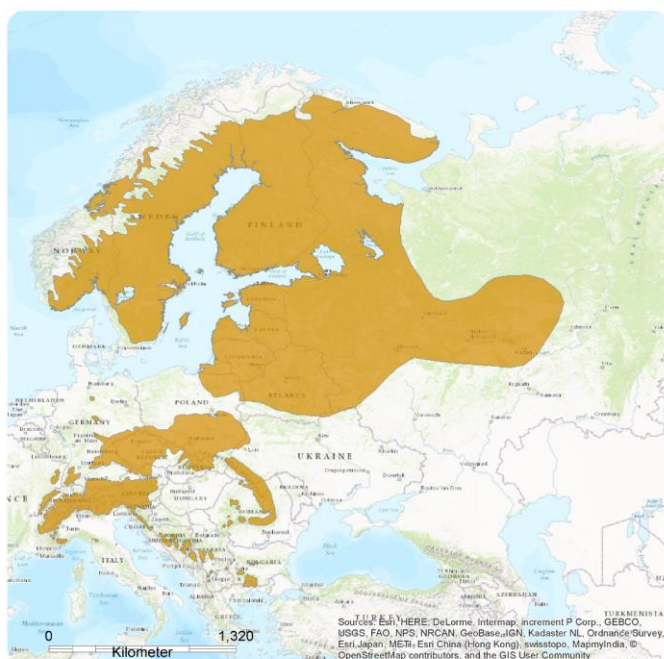
zčernalých a odumřelých částech jasanových listů. Patogenní forma, původně označovaná jako *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, kterou se zabývala v posledním desetiletí intenzivně celá řada autorů (MCKINNEY et al., 2014; BUROKIENE et al., 2015; HAVRDOVÁ et al., 2016; PAUTASSO, 2016; LONGAUEROVÁ et al., 2017; GROSDIDIER et al., 2018), byla do Evropy introdukována z Asie počátkem 90. let 20. století, kde byla dříve nazývána jako *Lambertella albida* (ZHAO et al., 2013). I přes obrovskou vlnu zájmu se stále vyskytují rizika spojená s patogenem, kterým nebyla věnována větší pozornost, jako je například spolupůsobení dalších abiotických a biotických faktorů, často nazývané chřadnutí způsobené komplexní skupinou příčin. Obrana vůči patogenu je velice obtížná, v přírodě však existují stromy geneticky odolnější vůči působení patogenu, kteří i přesto mohou být napadnuti invazním škůdcem *Agrilus planipennis* Fairmaire (LIEBHOLD, 2012), jenž se od roku 2013 šíří v evropské části Ruska a způsobuje výrazné chřadnutí jasanových porostů (STRAW et al., 2013; VALENTA et al., 2015).

Zřejmě největší problém při boji s invazními organismy představuje fakt, že často neexistují přirozené rezistentní schopnosti hostitelů vůči jejich působení. Navíc jsou domácí druhy patogenů v lesích často vytlačovány druhy invazními a agresivnějšími, které mohou způsobovat významné škody na lesních dřevinách. Příkladem je na bývalých zemědělských půdách kořenovník (*Heterobasidion* sp.), který reprezentuje v severní části planety pět zástupců, z nichž tři se přirozeně vyskytují v Evropě (*Heterobasidion annosum* sensu strictum (Fr.) Bref., *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen – nejčastěji na smrku, *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen). Jeden z těchto zástupců *H. annosum* bývá ve svém přirozeném areálu vytlačován invazním druhem *H. irregulare* (GARBELOTTO et al., 2022). Důvodem proč kořenovníky komplikují pěstování dřevin především na zemědělských půdách, je obvykle vyšší pH a často chybějící důležitá antagonistická mikrobiota (KORHONEN et STENLID, 1998). Význam kořenovníku pro lesní hospodářství podtrhují škody bezmála 800 milionů EUR (WOODWARD et al., 1998).

3.1 Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého

Důležitým prvkem lesního ekosystému je bezesporu vhodná dřevinná skladba s ohledem na mikroklimatické podmínky prostředí (ENNOS, 2015). Je vhodné se na rozmanitosti skladby podílet meziodově, a nikoliv pouze mezidruhově, kdy může dojít k infekci nejbližšího příbuzného druhu (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006). Při volbě dřevinné skladby je vhodné k hospodaření v lesích využívat vědecky podložená fakta a použít i další odborné znalosti (LINDNER et al., 2008). Je vhodné zvýšit druhovou bohatost dřevin, aby došlo k posílení přirozené rezistentní schopnosti lesů mírného pásma v Evropě, zvýšit porostní strukturu, rozmanitost, udržovat a zlepšovat genetickou variabilitu v rámci jednotlivých druhů stromů, zvyšovat odolnost jednotlivých stromů vůči biotickému, abiotickému stresu a nahrazovat rizikové porosty vhodnějšími dřevinami (zejména nepůvodní smrkové a borové monokultury v nížinách) (BRANG et al., 2014). Jedním z nejdůležitějších kroků ke zvýšení rezistence je míšení původních a nepůvodních druhů dřevin, jakožto i nepůvodních genetických kmenů, které se mohou lépe přizpůsobovat budoucím klimatickým podmínkám, ale pouze s dodržáním všech nezbytných fyto-sanitárních opatření zamezující zavlečení nepůvodních druhů škůdců (BOLTE et al., 2009). S ohledem na zhoršený zdravotní stav *Picea abies* a *Pinus sylvestris* se jeví jako vhodné ve větší míře zapojit do pěstování *Fagus sylvatica* L. a *Quercus robur* L., které se alespoň v současné době zdají s ohledem na klimatickou změnu odolnější a mohly by tak hrát významnou roli ve velké části střední Evropy (BURAS et MENZEL, 2019; SCHULDT et al., 2020). U zavádění nových druhů (douglaska, smrk pichlavý) je nezbytné počítat se zavlečením dalších invazních škůdců a patogenů (LOMBARDERO et al., 2008). Nevhodně zvolená skladba se ukázala například u distribuce kloubnatky, kdy se infekce rozšířila ze smrku pichlavého na smrk ztepilý. Vzniklá situace je modelovým příkladem nevhodné volby dřevin, která je o to důležitější v případě invazních škodlivých organismů, které mohou autochtonní hostitele vzhledem k neexistující přirozené odolnosti způsobit jejich odumření (MOSER et al., 2009; SIEROTA et al., 2019; DÍAZ-YÁÑEZ et al., 2020; JUNG et al., 2021).

Jednou z potenciálně ohrožených dřevin je smrk ztepilý, nejdůležitější hospodářská dřevina střední a severní Evropy, který bývá pěstován i mimo areál svého přirozeného rozšíření (Obrázek 1). Jedná se o druh nejpolymorfnější, u kterého se morfologická variabilita nejvíce projevuje na tvaru koruny u větvení a u jehlic (VIDACOVIĆ, 1991; MUSIL et HAMERNÍK, 2007). Naproti tomu smrk pichlavý, se přirozeně vyskytuje v montánní zóně západní části Severní Ameriky (MUSIL et HAMERNÍK, 2007; FARJON, 2010). Svým vzrůstem dosahuje nižší výšky (21-27 m) než smrk ztepilý a menší výčetní tloušťky (0,6 m). Nejlépe přirůstá za dostatečné vlhkosti, ale umí snášet i sucho, a to lépe než ostatní smrky (VIDACOVIĆ, 1991; MUSIL et HAMERNÍK, 2007; FARJON, 2010).



Obrázek 1 Areál přirozeného rozšíření smrku ztepilého (FARJON, 2017)

Chřadnutí smrku ztepilého i s ohledem na probíhající klimatickou změnu nejčastěji způsobuje sucho. Tento abiotický škodlivý činitel má významnou roli i v probíhající současné kůrovcové kalamitě (KOHLER et al., 2010; PRETZSCH et al., 2014; NETHERER et al., 2021). Sucho se typicky projevuje celou řadou symptomů jako jsou diskolorace či předčasná senescence nejen listnatých dřevin, a navíc se v mikroklimatu ekosystému projevuje redukcí vzdušné vlhkosti a srážek (YUAN et al., 2019), což má za následek sníženou transpirační schopnost jedince (RUEHR et al., 2016; SCHULDT et al., 2020). To vše se primárně podílí na zhoršeném zdravotním stavu lesů. Kromě toho dochází k výraznému

oslabení napadených jedinců, které se v tu chvíli stávají náchylnější vůči biotickým faktorům (SCHULDT et al., 2020). Je prokázáno, že smrk je z našich dřevin vůči poškození suchem nejcitlivější, a to například v porovnání s douglaskou tisolistou, která je schopná se lépe vyrovnávat s dlouhodobým stresováním suchem (VITALI et al. 2017). Další z abiotických faktorů, které představují riziko při pěstování smrku i dalších dřevin je vítr a mráz. Jedná se o faktory, při jejichž působení může docházet k velkým disturbancím, a především oslabení jedinců, které se obdobně jako v případě sucha stávají náchylnější vůči sekundárním biotickým škůdcům (RUBA et al., 2013; PAVLOV, 2015). Vítr, který bývá považován za nejdůležitější klimatickou disturbanci v lesích Evropy představoval problém zejména v druhé polovině 20. století, kdy se podílel na více než 50 % ztrát v lesním hospodářství (SCHELHAAS et al., 2003; JARZYNA, 2021). Velké riziko přináší vítr v kombinaci s podkorním hmyzem. Hmyz sice v tomto případě představuje sekundární škodlivý činitel, může však velmi efektivně napadnout čerstvé polomy, vývraty, a tím ohrožit i okolní stojící zdravé stromy (ERIKSSON et al., 2007; GRODZKI et GĄSIENICA FRONEK, 2019; SOUKHOVOLSKY et al., 2022). Nebezpečí hrozí i u stojících souší, které mohou působením větru spadnout a může tak dojít k narušení porostního okraje a tím ke vzniku dalších škod větrem. Mráz představuje riziko zejména v případě pozdních jarních mrazů, které způsobují poškození tkání a vodivých pletiv rostlin, čímž dochází k redukci růstu a ovlivnění jejich konkurenceschopnosti (JARZYNA, 2021; ÖZÇELİK et al., 2022; STRÍBRSKÁ et al., 2022). Mráz nejvíce ohrožuje výsadby a semenáčky, protože nejčastěji dochází k pozdním mrazům blízko země, čímž může docházet k problémům s přirozenou či umělou obnovou lesa (JARZYNA, 2021). Při v současnosti pozorovaném chřadnutí dřevin hraje zřejmě významnou roli fenotyp, a tedy i fenotypová maladaptace. Všechny zmíněné faktory jsou klíčové při omezování schopnosti stromů využívat veškerý svůj potenciál fenotypové plasticity a plastických reakcí. Navíc toho stále víme jen málo o fyziologických mechanismech, které stojí za fenotypovou odolností stromů (STENLID a OLIVA, 2016). Největším problémem je nejasnost v interakci patogenu a infikovaného stromu včetně následného odumření, a to především proto, že se jedná o složitý komplex procesů. Patogeny mohou způsobit velkou škálu interakcí s hostitelem, které mohou mít významné fyziologické důsledky. Často je mylně chápáno, jak dochází vlivem patogenu k usmrcení jedince, a to

hlavně kvůli chybné interakci s jinými abiotickými faktory, které vedou k odumření stromů.

K výše uváděným rizikům dochází působením celé řady faktorů. Vítr a rozdíly ve větrném proudění na okraji porostů mohou například vést k častějšímu šíření patogenů z okrajů dovnitř porostu, než tomu bývá naopak, a to především proto, že v těchto místech bývá rychlost větru větší (CROCKATT, 2012). Mezi nejdůležitější, které zároveň podmiňují i šíření patogenů, patří klimatické změny a způsoby hospodaření. Důsledkem velké změny klimatických podmínek dochází ke snížení množství srážek a zvýšení teploty (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006; KÖHL et al., 2010; DE FRENNE et al., 2021). Ty vedou k redukci až ztrátě schopnosti jedinců uvnitř populace se v místních podmínkách vůči napadení adaptovat a dochází tak k permanentnímu stresu a následnému poškození porostů (ENNOS, 2015). I když se současná klimatická změna týká především sucha, tak mohou problém představovat i bleskové záplavy, kdy může dojít k výraznému přemokření půdy a vzniku vhodných podmínek pro usazení invadovaného patogenu (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006). Lesnické hospodaření, a zejména to intenzivní, často vede ke změnám v ekologické bilanci a vzniku disbalancí, které mají za následek vytvoření ideálních podmínek k aklimatizaci patogenu a vzniku významných disturbancí (CASTELLO et al., 1995). Kromě toho dochází i ke zvýšení půdní vlhkosti a zvýšení teploty důsledkem snížení podílu vegetace, což negativně ovlivňuje evapotranspiraci (CASTELLO et al., 1995; KUBOTA et al., 2021).

K prvnímu výraznému poškození lesních porostů ve studované oblasti PLO1 došlo se začátky spalování uhlí (HASELHOF et LINDAU, 1903). Vzhledem k extrémní imisní kalamitě, která se vyskytla v 80. letech 20. století byly v místech, kde nebylo možné tyto dřeviny znovu obnovit, založeny porosty náhradních dřevin (SLODIČÁK et al., 2008). V těchto porostech byl použit smrk pichlavý zejména kvůli potenciálně vyšší imisní odolnosti. Výběr této dřeviny, která zaujímala plochu více než 8000 ha působil až do začátku 21. století velmi vhodně (SLODIČÁK et al., 2008). Jednotlivé stromy v tomto období již dosahovaly dimenzí uspokojujících dřevařský průmysl a postupně začaly vznikat plány pro ekonomické využití této dřeviny. Tomu nahrával i zlepšující se zdravotní stav lesních porostů a snížení vlivu přímých atmosférických depozic škodlivých látek

z ovzduší. Stále však přetrvávala vysoká zátěž půdního prostředí projevující se značnou acidifikací a zdánlivě vitální lesní porosty tak zůstávaly i nadále značně labilní (ŠRÁMEK et al. 2015).

Svojí roli představuje stále častější fragmentace krajiny, která má za následek vznik izolovaných částí lesa. To se dotýká i samotného lesa, kdy vznikají segmenty s odlišnými vlastnostmi uvnitř a na okraji porostu (CROCKATT, 2012; ÖZÇELİK et al., 2022; STŘÍBRSKÁ et al., 2022). Okraje často bývají exponované a náchylné vůči působení vnějšího prostředí, díky čemuž dochází k tvorbě odlišných mikroklimatických podmínek, které mohou být spjaty s rozvojem biotických a vyšší intenzitou působení abiotických činitelů (CAMARGO et KAPOŠ, 1995; HEITHECKER ET HALPERN, 2007; CROCKATT, 2012). K tomu napomáhá i to, že v těchto místech, která často působí jako přirozený filtr pro patogeny šířící se na delší vzdálenosti, dochází k tvorbě jiných větrných podmínek ovlivňujících teplotu, vlhkost, srážky, směr větru a samotné šíření spor patogenů (CROCKATT, 2012). Navíc se tzv. „filtrací“ na okraji může zvýšit pravděpodobnost usazení spor patogenů (CROCKATT, 2012). Rovněž acidifikace a depozice dusíku bývá v okraji porostu až o 50 % vyšší než v jeho středu (DE SCHRIJVER et al., 2007) je známo, že obě látky ovlivňují výskyt hub (HÖGBERG et al., 2006; KJØLLER et al., 2012). Například eutrofizace působená dusíkem má za následek úbytek mykorhizních hub v rámci celé Evropy (ARNOLDS, 1991; HU et CHEN, 2020) či výraznou změnu jejich životního cyklu například snížením počtu mykorhizních špiček či produkce mycelia (KJØLLER et al., 2012).. Depozice dusíku může roli hub v některých případech i zastoupit. Jedná se především o dekompozici dřevní hmoty anebo listového opadu (BERG and LASKOWSKI, 2005; BEBBER et al., 2011),

Přesto, že patogeny mohou způsobit výrazné poškození lesa, většinou jim nebyla věnována dostatečná pozornost, a to platí i s ohledem na patogen jako prvek ekosystému. V tomto pojetí totiž může představovat velmi důležitý člen, který má za cíl přirozeně redukovat přestárlé monotónní porosty anebo upravovat nevhodně zvolenou dřevinnou skladbu a plnit tak funkci „přirozeného“ správce lesa (CASTELLO et al., 1995). Důkazem může být situace z roku 2009, kdy v Krušných horách byla na smrku pichlavém, po téměř sto letech v Česku opět zjištěna houba *Gemmamyces piceae* (SOUKUP et PEŠKOVÁ 2009). Zpočátku neznatelný a lokální výskyt, začal nabírat od roku 2009 epidemický charakter,

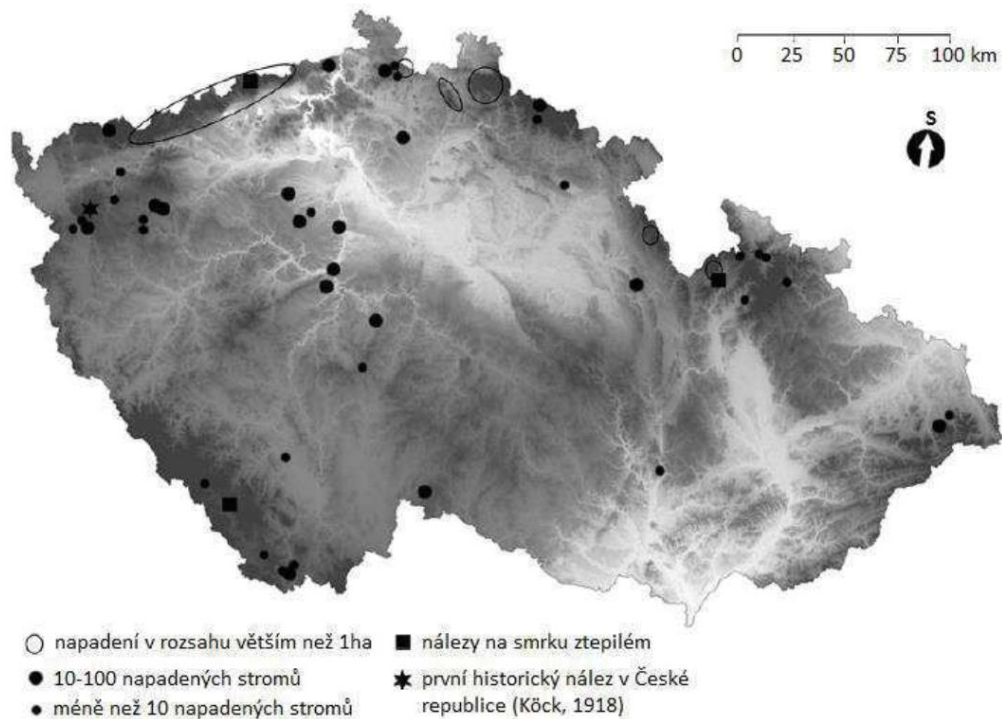
a především v severovýchodní části Krušných hor dosáhl během krátké doby kalamitních rozměrů (POSPÍŠIL et POSPÍŠIL, 2011; PEŠKOVÁ et SOUKUP, 2013; ČERNÝ et al., 2016a; ZÝKA et al., 2018). V roce 2015 došlo k nárůstu napadení smrku ztepilého, které se rozšířilo i v mladších věkových třídách a problém se tak přestal týkat pouze starších a jednotlivých stromů.

Houba *Gemmamyces piceae*, synonymum *Cucurbitaria piceae* Borthw., *Cucurbitodthis piceae* (Borthw.) Petr., byla poprvé nalezena na napadených pupenech smrku pichlavého *Picea pungens* var. *glauca* v Abercairney, Perthshire (UK) v roce 1906 (Borthwick, 1909; Shoemaker, 1967; TUBEUF, 1919). V současném taxonomickém pojetí je řazena do oddělení Ascomycota, řádu Pleosporales, čeledi Melanommatacea (JAKLITSCH et VOGLMAYR, 2017). Anamorfní stadium, které popsal v roce 1925 Naumov, je označováno jako *Megaloseptoria mirabilis* (NAUMOV 1925; ČERNÝ et al., 2016a).

Patogen primárně poškozuje severoamerické smrky *P. pungens* Engelm. a *Picea engelmannii* Parry ex Engelm., které patří mezi citlivé (ALFORD, 2000). Na Aljašce byl její výskyt potvrzen na *Picea glauca* Moench, *Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb. a *Picea sitchensis* Bong. (WINTON, 2020). V Česku byl patogen potvrzen na druhu *P. glauca*, ale také nově na jihoevropském *Picea omorika* (Pančić) Purk. (PEŠKOVÁ et al., 2016b). Systematickým sledováním kalamitního šíření patogenu na smrku pichlavém v Česku se zabývali PEŠKOVÁ et SOUKUP (2013), ČERNÝ et al. (2016a) a ŠEFL et al. (2020). Potvrzený výskyt na evropském smrku ztepilém *P. abies*, který byl dosud popisován jako nepříliš významný nebyl v Evropě ani v Česku podrobněji sledován. Jediným významným záznamem bylo napadení 13 ploch v severní Anglii a jihozápadním Skotsku, kde bylo zjištěno poškození starších jedinců *P. abies* (REDFERN et al., 1997).

Výskyt patogenu byl potvrzen v celé řadě dalších evropských zemí – v Rakousku, Dánsku, Anglii, Finsku, Německu, Irsku, Itálii, Rusku, Skotsku, Slovinsku, Švédsku, Švýcarsku a Walesu (BORTHWICK, 1909, KOCK, 1918, NAUMOV 1925 in ČERNÝ et al., 2016a; THIRINGER, 1964, SHOEMAKER, 1967, SCHNEIDER et DAEBELER, 1968; TOMICZEK et al., 2011; OGRIS et JURC 2013). Kromě Evropy byl patogen nalezen v Severní Americe na Aljašce (Winton, 2020)

V Česku byl její výskyt poprvé zjištěn na *P. pungens* na Kladské v Slavkovském lese v roce 1917. Od té doby pak byla houba opakovaně nalézána v různých částech ČR (Obrázek 2) (TUBEUF, 1919).



Obrázek 2 Výskyt kloubovatky smrkové na našem území (ČERNÝ et al., 2016).

Typickým znakem napadení je výskyt stromatu na pupenech, s četnými drobnými hnědými až černě zbarvenými kulovitými plodnicemi, často pokrývajícími i celý pupen (SOUKUP et PEŠKOVÁ, 2009). Výhony bývají zduřelé, silně zkrácené a často ohnuté a ty které pod vlivem infekce neodumřely, mají často netypické postavení a vyrůstají do nejrůznějších směrů (Obrázek 3). Pokud dojde k odumření terminálního pupenu, přebírají jeho funkci boční pupeny, které vytváří typický vzhled infikované koruny (SOUKUP et PEŠKOVÁ, 2009; PEŠKOVÁ et al., 2016a, 2016b).



Obrázek 3 „Vykloubené“ výhony smrku ztepilého způsobené kloubnatkou smrkovou

K infekci hostitelské dřeviny dochází během vegetačního období. Následující rok v době rašení se nejprve vytvářejí pyknidy, ve kterých se tvoří konidie. Následně dochází k tvorbě perithecií, kde se vyvíjí od dubna do srpna askospory o velikosti 30-42 x 12-19 μm . Vrchol produkce askospor je mírně opožděn za vrcholem výskytu konidií. S oběma typy plodnic se můžeme na pupenech setkávat v průběhu vegetační sezóny. Přítomnost pupenů s plodnicemi kloubnatky smrkové život napadeného jedince bezprostředně neohrožuje a nižší výskyt infikovaných pupenů strom v růstu nijak významněji neomezuje. Překročili však počet napadených a odumřelých pupenů 3/4 celkového počtu může strom odumřít.

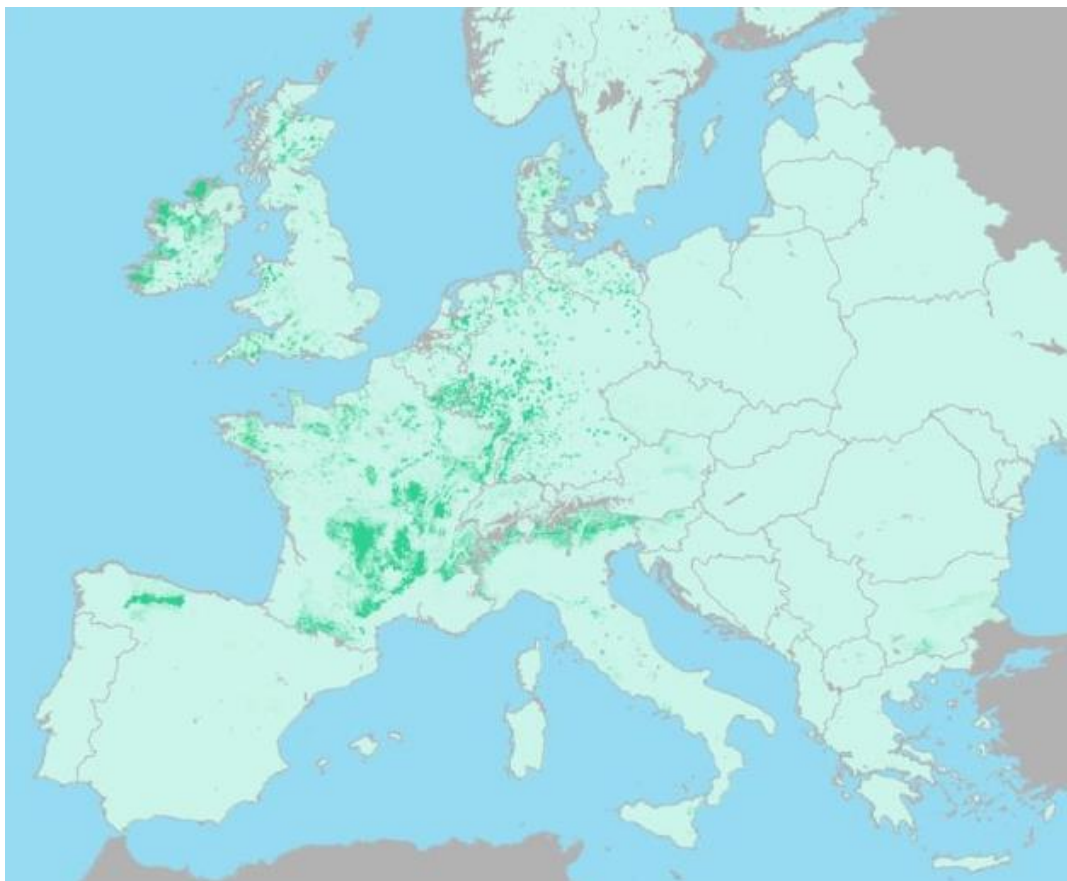
3.2 Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové

Mykorrhiza představuje funkční a morfologické propojení kořenů vyšších rostlin a symbiotických hub. Strom ze spojení profituje mimo jiné lepším zásobením vodou a minerálními látkami, zejména dusíkem a fosforem, houba pak získává organické látky (GRYNDLER et al., 2004). Jedním z nejdůležitějších disacharidů, které je houba schopna tvořit je trehalóza. Tento neredukující disacharid (α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 1) - α -D-glukopyranosid) je považován za látku, která pomáhá rostlinám přežít v nevhodných podmínkách prostředí, nicméně její biotické interakce jsou stále málo známé (FERNANDEZ et al., 2010). V těle houby má výhodu v tom, že se umí dobře transportovat na dálku vláknou podhoubí. Její obsah se v mykorrhizních kořenech mění s ročním obdobím, nejvyšší je na podzim a v zimě. Mykorrhiza obecně vede k vyšší vitalitě a odolnosti stromů, a proto je důležité stanovit obsah trehalózy v kořenech jakožto ukazatele kvality

mykorhiz (NIEDERER et al., 1989; GRYNLER et al., 2009). Již v minulosti byly sacharidy v ektomykorhizních kořenech smrku analyzovány jako trimethylsilylderiváty pomocí GC-FID nebo HPAEC-PAD (HAMPP et al., 1995). Nevýhodou těchto technik je vysoká polarita trehalózy, nedostatečná citlivost, případně koelující látky (např. sacharóza). V minulosti bylo známo mnoho rozdílů mezi dříve publikovanými hodnotami, za které pravděpodobně mohlo použití různých analytických technik. Významný rozdíl v již publikovaných výsledcích představuje i odlišný přístup při odběru vzorků ektomykorhizních kořenů a analýze trehalózy pomocí LC-MS/MS.

3.3 Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě

Douglaska tisolistá se v celosvětovém měřítku rozlišuje na dvě hlavní variety – *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii* a *Pseudotsuga menziesii* (Beissn.) Franco var. *glauca*. Mezi nejzásadnější rozdíly mezi varietami patří trend růstu (var. *menziesii* roste rychleji, má větší produkci) odolnost vůči sypavkám ve prospěch var. *menziesii*. Naproti tomu má var. *menziesii* větší citlivost na zimní vytrapirování či je náročnější na půdní vlhkost (ŠIKA, 1981). Varieta „*menziesii*“ často nazývaná pobřežní či zelená má jehlice zelené, var. *glauca* též sivá má jehlice šedě sivé a vyskytuje se v horských a vnitrozemských oblastech (LAVENDER et HERMANN, 2014). Hlavní rozdíly jsou ale především ve fyziologických vlastnostech, mezi které patří rychlost růstu, rytmus růstu, odolnost vůči biotickým škůdcům či klimatickým extrémům a růstový nebo věkový potenciál (LAVENDER et HERMANN, 2014; SLODIČÁK et al., 2014). Areál přirozeného výskytu (Obrázek 4) obou variet se prolíná a je velmi rozsáhlý. I s ohledem na velké množství přechodů mezi oběma varietami je často jejich původ obtížné definovat (MUSIL et HAMERNÍK, 2007; SLODIČÁK et al., 2014; LAVENDER et HERMANN, 2014). Jedná se velmi odolný rod, o čemž svědčí její výskyt v klimatu přímořském, tak i například v klimaticky drsnějších podmínkách v oblastech Kaskádového pohoří (MUSIL et HAMERNÍK, 2007; SLODIČÁK et al., 2014).



Obrázek 4 Mapa rozšíření douglasky tisolisté v Evropě v rozlišení 1x1 km (BRUS et al., 2011)

Pseudotsuga glauca, často považována pouze za varietu *P. menziesii*, je dřevinou menší a pomaleji rostoucí než varieta *menziesii*, s využitím především jako okrasná dřevina v parcích (například kultivary „Fletcheri“ nebo „Pendula“), v lesích se s ní setkáváme minimálně (MUSIL et HAMERNÍK, 2007). Je tolerantnější vůči většímu zastínění a suchu.

U nás jsou nejkvalitnější porosty v oblastech Lesů města Písek, Opočenska a Dobříšska (SLODIČÁK et al., 2014). U těchto výsadeb je největším problémem neznalost původu osiva, značně omezující určení vhodných proveniencí k pěstování. V Česku nebývá domácí osivo využíváno, a to zejména z důvodu nízké kvality semen, které navíc bývají často napadena krásenkou douglaskovou – *Megastigmus spermotrophus* (BERAN, 2014). Jelikož se jedná o introdukovanou dřevinu, osivo se do ČR dováží dle platné legislativy (vyhláška č. 456/2021 Sb.). I z důvodu neznalosti původu osiva kvalitních historických porostů začaly být prováděny provenienční výzkumy, jejichž cílem je nalézt vhodné provenience k pěstování v našich podmínkách (SLODIČÁK et al., 2014). Jejich výstupem

by měla být informace o kvalitě osiva z různých částí Severní Ameriky a ze stanovištně odlišných podmínek (EDWARDS, 1956). V ČR byly před založením výzkumu organizace IUFRO založeny 2 série ploch. Třetí série, zakládána v letech 1966–1971, pod záštitou organizace IUFRO (mezinárodní provenienční pokus) umožnila získat nejen osivo s přesně známým původem, ale též teoretickou možnost porovnat výsledky i s ostatními státy. Z osiva z 25 proveniencí byly v roce 1971 založeny tři výzkumné plochy – Hůrky (25 proveniencí); Jizbice (16 proveniencí) a Jíloviště-Cukrák složená z 8 proveniencí (BERAN, 2014).

I přes snahu najít vhodné osivo z nejlepších proveniencí, která může vést ke zdárnému využívání douglasky v našem hospodářství, provází její pěstování celá řada úskalí. Mezi nejzávažnější problémy patří biotičtí a abiotičtí škodliví činitelé. Mezi nejznámější činitele patří požár, jehož působením ale často dochází k podpoře přirozené obnovy (MUSIL et HAMERNÍK, 2007; LAVENDER et HERMANN, 2014), mráz který svým působením poškozuje douglaskové porosty nejčastěji a náchylnější a méně odolná je vůči jeho působení varieta „*menziesii*“ (SAKAI et WEISER, 1973; LAVENDER et HERMANN, 2014) a sucho, které může komplikovat přirozenou obnovu a snižovat přírůst (BORER, 1982 ex LAVENDER et HERMANN, 2014; WHITE, 1987 ex LAVENDER et HERMANN, 2014). Ke snížení procenta mortality vlivem sucha je nezbytné zajistit prorůstání kořenů alespoň do hloubky 30 cm (LAVENDER et HERMANN, 2014). Zejména v oblastech střední Evropy se setkáváme s tzv. jarním vytranspirováním. K tomuto jevu dochází v situaci, kdy půda zůstává stále zmrzlá, ale jehlice působením slunce odpařují vodu. Nedostatek vody, který by obvykle řešily přísunem vody z půdy, není díky zmrzlé půdě možný.

Jedním z klíčových faktorů odolnosti douglasky proti biotickým škůdcům je volba správné provenience, která zajistí vyšší odolnost vůči jejich působení. V současné době na našem území největší riziko kromě kůrovců představují houby, zejména sypavky – *Rhabdocline pseudotsugae* a *Nothophaeocryptopus gaeumannii* (PEŠKOVÁ, 2003; MUSIL et HAMERNÍK, 2007). Sypavky nepředstavují hlavní faktor při mortalitě douglasky, obecně způsobují snížení její rezistentní schopnosti, která není schopna bránit se sekundárním činitelům, mezi které patří např. další biotičtí škůdci včetně dřevokazných hub (PEŠKOVÁ, 2003). K jejich

šíření dochází při vzniku vhodných podmínek, zejména při optimální (nižší) teplotě, větru a vyšší vzdušné vlhkosti (HOOD, 1982; HANSEN et al., 2000; HOOD et KIMBERLEY, 2005; ŁAKOMY et IWAŃCZUK, 2010; KIMBERLEY et al., 2011). Zřejmě nejefektivnějším způsobem obrany kromě lesopěstebních opatření je výběr geneticky odolných jedinců a porostů, resp. proveniencí odolnějších vůči poškození (HOOD et KIMBERLEY, 2005). Ve školkařských provozech a při výsadbách je možné využít ošetření fungicidními přípravky (PEŠKOVÁ et ČÍŽKOVÁ, 2015).

Skotská sypavka douglasky – *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow

První nález skotské sypavky byl zaznamenán v roce 1917 v Severní Americe. V následujících letech byla objevena ve Skotsku, Anglii a dalších státech v Evropě. Koncem 30. let 20. století byla zjištěna i v západních Čechách (PEŠKOVÁ, 2003). V současné době je výskyt potvrzen ve více než 16 evropských zemích (MORGENSTERN et al., 2016, ROQUES et al., 2019). Sypavku může způsobovat až pět zástupců rodu *Rhabdocline* (CATAL et al., 2010). V Evropě je znám výskyt pouze *Rhabdocline pseudotsugae*, který má jako hostitele douglasky a způsobuje zasychání a následný opad jehlic (GERNANDT et al., 1997). (MORGENSTERN et al., 2016, ROQUES et al., 2019). Nejnáchylnější bývají k poškození především douglasky ve věku 2–30 let (BUTIN, 1995; PEŠKOVÁ et ČÍŽKOVÁ, 2015). Působením abiotických vlivů, a především spolupůsobením vysoké vzdušné vlhkosti, či při mrazovém vysychání se může zvyšovat možnost infekce (PEŠKOVÁ et ČÍŽKOVÁ, 2015).

Jedná se o vřeckatou houbu patřící do řádu Helotiales a čeledi Hemiphacidiaceae. Životní cyklus (Obrázek 5), který začíná na přelomu května a června, kdy dozrávají žlutooranžové až hnědé plodnice z loňského roku (MORGENSTERN et al., 2016), trvá zpravidla v našich podmínkách jeden rok. Při zralosti plodnic dochází k nadzvedávání pokožky jehlic, čímž se uvolňují výtrusy, které se následně šíří a infikují letošní jehlice douglasek. Po dozrání plodnic (ke konci léta či na podzim) napadené jehlice z loňského roku odumírají a opadávají. Zpravidla tak opadává celý ročník napadených jehlic (BUTIN, 1995; PEŠKOVÁ, 2003).



Iniciální stádium

Hnědofialové mramorování - počátek tvorby plodnic

Plodnice

Obrázek 5 Skotská sypavka douglasky (PEŠKOVÁ, 2003).

Prvotní žluté tečkování na nových jehlicích, se postupně zbarvuje do hnědofialova (PEŠKOVÁ, 2003; MORGENSTERN et al., 2013) a v následujícím roce na jaře dochází k vytváření červenohnědého mramorování. Pokud dojde k silné infekci během několika let za sebou, dochází ke snížení přírůstu hostitelské dřeviny a tvorbě krátkých výhonů, což může mít za následek i odumření jedince (PEŠKOVÁ, 2003; MORGENSTERN et al., 2013). Askospory bývají zprvu jednobuněčné a bezbarvé, poté přecházejí ve dvoubuněčné, světle hnědé barvy o velikosti 18 - 20 x 6,5 - 7,5 μm (BUTIN, 1995). Současně známá morfologie a životní cyklus patogenu je založen na makroskopickém a mikroskopickém pozorování plodnic. V současnosti je však možné doložení a potvrzení výskytu patogenu prostřednictvím DNA testu, testovaném v projektu TreeLAMP (MORGENSTERN et al., 2013; 2016; 2020).

Švýcarská sypavka douglasky – *Nothophaeocryptopus gaeumannii* (Rohde) Petr

Švýcarská sypavka douglasky způsobující zasychání a opadávání jehlic, řadí se mezi houby vřecovýtrusné, třídy Dothideomycetes a řádu Dothideales (PEŠKOVÁ et ČÍŽKOVÁ, 2015), může být v iniciálním stádiu se skotskou sypavkou zaměněna. S patogenem pocházejícím ze Severní Ameriky je možné se setkat v řadě evropských zemí (ŁAKOMY et IWAŃCZUK, 2010; PETKOVA et al., 2014; MORGENSTERN et al., 2016) či na Novém Zélandu (HOOD et KIMBERLEY, 2005; KIMBERLEY et al., 2011). V ČR je první nález uváděn z června 2002 na Rožmitálsku (PEŠKOVÁ, 2003). Sypavka, která bývá nejvíce patrná v 10 až 30letých výsadbách může při vysokém infekčním tlaku kromě mladých výsadeb napadnout všechny věkové třídy (HANSEN et al., 2000). Pokud dojde

k silné, opakované infekci, může v mladých výsadbách, infikovaný jedinec zcela odumřít.

Vřeckatá houba patří do řádu Mycosphaerellales a čeledi Mycosphaerellaceae. K nákaze dochází na přelomu května a června a následující rok se začne objevovat žlutozelené mramorování (nemusí se objevit), a během léta může přecházet až do červenohnědé barvy (Obrázek 6). Výtrusy i askospory (9–10 x 3,5 - 6 µm velké) jsou dvoubuněčné a k vytváření plodnic dochází na 1 a 2 letém jehličí. Zpočátku bezbarvné askospory se zbarvují dohněda (BUTIN, 1995; HANSEN et al., 2000; PEŠKOVÁ, 2003). K šíření patogenu dochází kromě šíření vzduchem (ve formě spor) i přenosem školkařského materiálu, který představuje zdroj šíření houby zejména na dlouhé vzdálenosti (MORGENSTERN et al., 2013).



Zlutozelené mramorování

Následuje zasychání jehlic od špiček

Obrázek 6 Švýcarská sypavka douglasky (PEŠKOVÁ, 2003).

Kromě sypavek představují výrazná omezení při pěstování i další patogeny (Tabulka 2).

Tabulka 2 Seznam patogenů s potvrzeným výskytem na douglasce (aktualizováno 2022)

Název houby	Obl. nálezu	Zdroj
<i>Rhabdocline pseudotsugae</i> Syd.	Sev. Amerika, Evropa (i ČR), Nový Zéland	GERNANDT et al. 1997
<i>Rhabdocline parkeri</i> Sherwood, J.K. Stone & G.C. Carroll	USA, Kanada	GERNANDT et al. 1997
<i>Rhabdocline weirii</i> A.K. Parker & J. Reid	USA, Kanada	GERNANDT et al. 1997
<i>Phellinus weirii</i> (Murrill) Gilb.	USA	HOLAH et al. 1997
<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	Dánsko	KOCH et THOMSEN 2003
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat.	Dánsko, ČR	KOCH et THOMSEN 2003

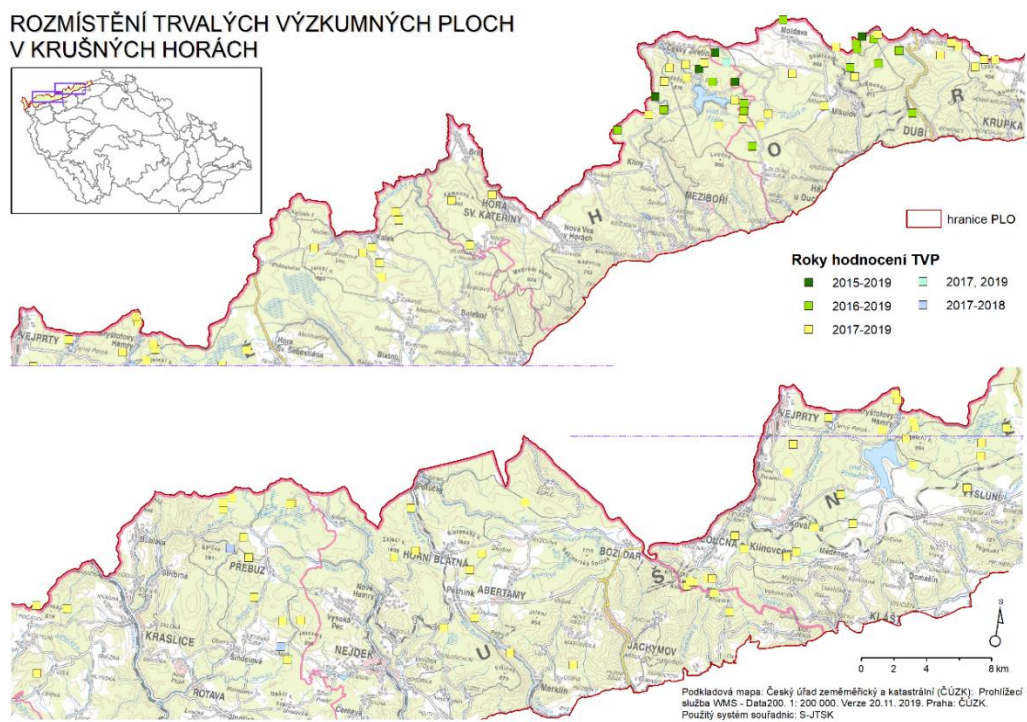
<i>Nothophaeocryptopus gaeumannii</i> (T. Rohde) Petr.	Sev. Amerika, Evropa (i ČR), Nový Zéland	TEMEL et al. 2004
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.	Německo	DEFLORIO et al. 2008
<i>Kretzschmaria deusta</i> (Hoffm.) P.M.D. Martin	Německo	DEFLORIO et al. 2008
<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	Německo	DEFLORIO et al. 2008
<i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer) Donk	Německo	DEFLORIO et al. 2008
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	Německo	DEFLORIO et al. 2008
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	Německo, USA	DEFLORIO et al. 2008
<i>Pholiota sp.</i>	USA	KISER et al. 2011
<i>Gymnopilus hybridus</i> (Gillet) Maire	USA	KISER et al. 2011
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	USA	KISER et al. 2011
<i>Armillaria sp.</i>	USA, Slovinsko, ČR	OGRIS et JURC 2013
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	Slovinsko	OGRIS et JURC 2013
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds.) P. Kumm.	Slovinsko	OGRIS et JURC 2013
<i>Phacidium coniferarum</i> (G.G. Hahn) DiCosmo, Nag Raj & W.B. Kendr.	Slovinsko	OGRIS et JURC 2013
<i>Dothistroma septosporum</i> (Dorogin) M. Morelet	Lotyšsko	DRENKHAN et al. 2016
<i>Dothistroma pini</i> Hulbary	neuveđen	DRENKHAN et al. 2016
<i>Pythium sp.</i>	USA	PAUDEL et al. 2016
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & B. Sutton	USA, Chorvatsko	ZGRABLIČ et al. 2016
<i>Leptographium wagneri</i> (W.B. Kendr.) M.J. Wingf.	USA	HESSBURG et HANSEN 2000
<i>Phytophthora ramorum</i> Werres, De Cock & Man in 't Veld	USA	LEBOLDUS et al. 2018
<i>Ophiostoma pseudotsugae</i> (Rumbold) Arx	USA	CRUICKSHANK et al., 2020
<i>Phellinidium sulphurascens</i> (Pilát) Y.C. Dai	USA	CRUISCKSHANK et al., 2020
<i>Phytophthora pluvialis</i> Reeser, W. Sutton & E.M. Hansen	Nový Zéland	GÓMEZ-GALLEGO et al., 2017

4. Metodika

4.1 Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého

Chřadnutí porostů způsobené kloubnatkou smrkovou bylo v PLO1 – Krušné hory sledováno od roku 2009 do 2020. V roce 2009 byly založeny výzkumné plochy v porostech smrku pichlavého. Jednalo se o stejnověké homogenní porosty, na kterých bylo vybráno 25 jedinců, pro opakované hodnocení. Vzhledem k intenzivnímu šíření kloubnatky na smrku ztepilém začaly být v roce 2016 na základě dat z lesního hospodářského plánu a s ohledem na mozaiku

stanovišť, věku a LVS² zakládány výzkumné plochy v homogenních porostech smrku ztepilého (Příloha 1). Všechny faktory byly zvoleny tak, aby bylo možné provést porovnání jejich vlivu na výskyt a rozvoj patogenu, aby podle nich bylo možné stanovit přesný trend vývoje napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou. Celkem bylo založeno 103 trvalých ploch (Obrázek 7); Na plochách bylo vyznačeno 50 životaschopných jedinců smrku ztepilého, u kterých bylo hodnoceno napadení kloubnatkou smrkovou a sledována dynamika vývoje napadení. Trvalé plochy, byly hodnoceny v letech 2017-2020.



Obrázek 7 Rozmístění studijních výzkumných ploch v Krušných horách.

Intenzita stupně napadení byla kvantifikována semikvantitativně (0-4) podle intenzity napadení pupenů (Tabulka 3). Byla zaznamenáno postavení hodnocených stromů v porostu (okraj/porostní nitro) a měřeny dendrometrické parametry (tloušťka, výška) na TVP³.

² Lesní vegetační stupeň

³ Trvalá výzkumná plocha

Tabulka 3 Klasifikační stupnice pro hodnocení napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou

Kategorie	Popis poškození
0	Bez napadených pupenů.
1	Napadeny jednotlivé pupeny nebo max. jednotlivé větve.
2	Napadení více větví, max. do 1/3 koruny.
3	Napadení více jak 1/3 koruny do max. 2/3 koruny.
4	Strom napaden z více než 2/3. Počínající defoliace (proředění korun vlivem opakovaného víceletého napadení pupenů kloubnatkou smrkovou).

Bylo provedeno srovnání napadení porostů smrku ztepilého a pichlavého, které bylo možné provést pouze ve věkové třídě 31-60 let, protože byl smrk pichlavý vysazován v Krušných horách od 70. let 20. století. V oblasti vodního díla Fláje na území obce Český Jiřetín byly vybrány výzkumné plochy, protože se jednalo o epicentrum disturbance s nejlépe zpracovanou datovou řadou během celého hodnocení.

Za účelem porovnání napadení SM⁴ a SMP⁵ byly vytvořeny dvě proměnné vyjadřující napadení kloubnatkou:

1. podíl poškozených pupenů – průměrná míra napadených korun stromů vypočtená ze všech jedinců na ploše v procentech, a vyjadřuje tak intenzitu poškození jednotlivých stromů
2. podíl napadených stromů – podíl napadených jedinců ze všech jedinců na hodnocené ploše, a vypovídá tak o prostorovém rozsahu napadení ve studovaném porostu

Pro statistické vyhodnocení celkového napadení smrku ztepilého a vlivu vybraných faktorů prostředí byla sledována závislá proměnná, kterou představovalo procento napadených jedinců v porostu (součet jedinců z kategorií 1-4 pro daný porost dělený počtem hodnocených jedinců v porostu). Rok hodnocení byl stanoven jako kategoriální závislá proměnná a věk jako diskrétní závislá proměnná. Data z let 2017 až 2019 byla použita k tvorbě modelu, pomocí kterého bylo predikováno napadení kloubnatkou smrkovou

⁴ smrk ztepilý

⁵ smrk pichlavý

ve všech porostech smrku ztepilého v PLO 1⁶, v rámci podmínek prostředí vyskytujících se na síti výzkumných ploch. Z celkového počtu 103 výzkumných ploch bylo do modelu zahrnuto 87 tvořících kompletní šestici (vždy dva porosty ze tří věkových skupin. Závislou proměnnou modelu bylo zvoleno průměrné napadení porostu.

Mezi nezávislé (vysvětlující) proměnné byly zařazeny:

1. zakmenění – získáno výpočtem reálné kruhové základny s použitím AVB šetřené plochy a převodem na 1 ha s následným podělením kruhovou základnou tabulkovou (SUROVÝ in verb.) bylo zjištěno skutečné zakmenění porostu. Pro účely porovnání vlivu zakmenění v modelu byly vybrány pouze porosty nad 31 let. Pro porosty mladší než 31 let byla použita hodnota zakmenění z LHP.
2. rok hodnocení [2017, 2018, 2019].
3. Věk – aktuální věk porostu podle LHP, prolongovaný k roku 2019.

Základní předpoklady pro statistickou analýzu regresního typu byly stanoveny podle ZUUR et al. (2010). Závislou proměnnou nebylo možné zobrazit normálním rozdělením, jako nevhodnější se ukázalo Gamma rozdělení. Navíc byl porušen předpoklad nezávislosti z hlediska hodnocení stejného porostu ve všech letech. Tato okolnost byla do statistického modelu zahrnuta použitím porostu jako vnořeného faktoru. Vzhledem k tomu, že systém ploch byl navržen v split-plot designu k vyhodnocení dat byl použit zobecněný model lineárních smíšených efektů v glmmTMB packu podle postupů popsanych BROOKS et al (2017). Šestice byla zadána jako nested, a zohledněno bylo rovněž opakované hodnocení stejné plochy (PEKÁR et BRABEC, 2009). Rozhodujícím kritériem pro získání modelů s pouze významnými parametry bylo Akaikeho informační kritérium a kvalita proložení reziduí proti predikovaným hodnotám. Nejlepší z vytvořených modelů byl: lme (průměrné napadení porostu ~ Zakmenění+Rok+Věk+Věk:Zakmenění, random=~1|Šestice/Porost). Pro možnost predikce byl model rozšířen o náhodný intercept každé šestice, reprezentující různou úroveň napadení kloubnatkou v dané oblasti. Všechny statistické analýzy byly provedeny v prostředí R 4.0.2. (2020).

⁶ Přírodní lesní oblast 1 – Krušné hory

Na základě výsledků samotného modelu, který těsně popsal zdrojová data, byla provedena predikce do všech porostních skupin smrku ztepilého. Před aplikací vypočteného modelu na celou oblast PLO 1 bylo nutné nejprve zařadit jednotlivé porosty se zastoupením smrku ztepilého k šesticím použitým k vytvoření modelu. Nad oblastí Krušných hor byla tvořena síť Thiessenových polygonů, rozčleňujících prostor dle vzdálenosti k nejbližšímu zájmovému bodu. Jednotlivé porosty pak byly přiřazeny dle příslušnosti do polygonů této sítě. Intercepty každé šestice a koeficienty modelu pro zakmenění, věk a jejich kombinaci byly projektovány do roku 2017, 2018 a 2019.

4.2 Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové

Pro stanovení hodnoty obsahu trehalózy v kořenech bylo vybráno 6 porostů s největší intenzitou napadení ze založených TVP pro monitoring kloubnatky na lesní správě Litvínov (Tabulka 4).

Tabulka 4 Přehled monitorovaných ploch ve vztahu kloubnatky k trehalóze a počty jedinců v kategoriích podle stupně napadení

porost	revír	řada	stanoviště	věk	zakmenění	LVS	kat. 0	kat. 1	kat. 2	kat. 3	kat. 4
320C5	Vřesoviště	S	živné	46	8	7	6	8	18	5	3
125C6	Klíny	K	kyselé	53	7	6	14	16	15	4	1
110B5b	Český Jiřetín	K	kyselé	48	9	7	7	8	18	8	1
502A5	Moldava	G	podmáčené	45	9	6	10	5	17	11	3
107B5a	Český Jiřetín	S	živné	43	9	7	4	8	13	15	4
504F6	Moldava	G	podmáčené	51	7	7	10	8	20	8	3

Na těchto TVP byly provedeny odběry vzorků kořenů a jejich zpracování, a to následujícím způsobem:

1. Jemné kořeny o velikosti < 2 mm byly odebírány půdním vrtákem (průměr 6 cm, hloubka odebíracího prostoru 15 cm).

2. Odebrané kořeny byly rychle omyty vodou a vloženy v plastovém sáčku do tekutého dusíku.
3. V laboratoři byly vzorky vyjmuty z kapalného dusíku a uloženy do mrazničky při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do další analýzy.
4. Během tří týdnů byly vzorky podrobeny lyofilizaci (po dobu 196 h; Lyovac GT 2, Steris, Německo).

Samotná extrakce měla následující postup:

1. 5-7 g lyofilizovaných kořenů bylo rozemleto v laboratorním mlýnku (IKA, A11 basic, Německo).
2. Do plastové mikrocentrifugační zkumavky o objemu 2 ml (Eppendorf, Německo) bylo naváženo 25 mg kořenového prášku a přidáno 1,5 ml směsi methanol/voda (80/20 v/v).
3. Zkumavka byla několik sekund silně protřepávána, aby se vzorek navlhl, a umístěna do temperované třepačky (TS-100, Biosan, Lotyšsko) na 30 minut při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 1 000 otáčkách za minutu.
4. Vzorky byly poté odstředěny (Eppendorf, Minispin plus) při 12 500 otáčkách za minutu po dobu 10 min a kapalná fáze byla přefiltrována přes nylonový injekční filtr ($0,25\text{ }\mu\text{m}$) do 2ml vijalky.

Po extrakci byla použita LC-MS/MS analýza pro kterou byl vyvinut optimalizovaný extrakční postup pro stanovení trehalózy s následnou LC-MS/MS detekcí s využitím iontové vazby Cs^+ , založený na Rogatského testu vyvinutém pro lidskou plazmu (ROGATSKY et al., 2005). Data byla shromážděna pomocí softwaru Chromeleon 6.8 a Analyst 1.4.

Optimalizace a validace metody byla provedena na kořenech smrku se zcela odstraněnou trehalózou prostřednictvím trehalázy. Byla vytvořena pětibodová matrice odpovídající lineární kalibrační křivka s použitím dihydrátu trehalózy o koncentracích 5, 10, 20, 30 a 40 $\mu\text{g/ml}$. Linearita byla R^2 (čtverec korelačního koeficientu) = 0,9989, rezidua < 4 %. Mez detekce (jako $3 \times S/N$) = 1,3 $\mu\text{g/ml}$, což odpovídá 78 ng/mg matrice vzorku; mez kvantifikace (jako $10 \times S/N$) = 4,35 $\mu\text{g/ml}$, což odpovídá 261 ng/mg matrice vzorku. Průměrná výtěžnost na hladině

hrotu 15 µg/g byla 96 %. Preciznost v rámci dne (4 %) a denní preciznost (8 %) jsou vyjádřeny jako relativní směrodatná odchylka od průměrné naměřené hodnoty. Během validace metody byly optimalizovány následující parametry: i) směs extrakčních rozpouštědel, ii) teplota extrakce a iii) doba extrakce. Výsledky těchto testů jsou uvedeny v podpůrných informacích. Všechny validační analýzy byly provedeny ve třech opakováních.

Při opakovaném sběru vzorků ze tří edafických kategorií a celkem šesti porostů bylo hodnoceno celkem 180 vzorků.

Všechna získaná data byla následně statisticky vyhodnocena a údaje jsou uvedeny v µg trehalosy/g DW se směrodatnou odchylkou; (viz Příloha 8). Soubory dat byly testovány na homogenitu (Leveneho test) a normalitu (Shapiro-Wilkův test). Po splnění statistických předpokladů byla použita jednocestná ANOVA. Rozdíly byly testovány na hladině $p = 0,05$. Pro podrobnou analýzu byl použit Tukeyho HSD test. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistica 13.3 (TIBCO Software, USA).

4.3 Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě

Hlavním důvodem studia na mezinárodní ploše IUFRO Hůrky je velmi rozdílná náchylnost jednotlivých proveniencí douglasky k sypavkám *R. pseudotsugae* a *P. gaeumannii*. Provenienční plocha Hůrky složená z 25 proveniencí se nachází na velmi mírném svahu s převážně severovýchodní expozicí ve výšce 445 m n. m. Místní průměrné roční teploty vzduchu dosahují 7,3-7,5 °C a průměrný roční úhrn srážek je 550-575 mm.

Testované provenience ze semenářských oblastí Britské Kolumbie, Washingtonu a Oregonu (Tabulka 5). Provenience 1028, 1078, 1081, 1102 a 1104 představují standardní provenience přítomné na všech výzkumných plochách mezinárodního experimentu. Výzkumná plochopokus je ve tvaru pravidelného obdélníku o rozloze 1 ha a rozdělena na 100 částí (25 proveniencí ve 4 opakováních), každá o rozměrech 10 × 10 m.

Tabulka 5 Původ a základní parametry proveniencí douglasky tisolisté na mezinárodní ploše IUFRO Hůrky

Stát (USA), provincie (Kanada)	Provenience		Oblast provenience	Nadmořská výška [m n.m.]	Severní šířka	Západní délka
British Columbia	1004	Stuie	Maritime	230	52° 22'	126° 00'
	1010	Barrière	Cariboo Trans.	612	51° 12'	120° 10'
	1012	Klina Klini	Maritime	3	51° 07'	125° 36'
	1013	Revelstoke	Nelson	600	51° 00'	118° 12'
	1021	D'Arcy	Submaritime	275	50° 33'	122° 30'
	1025	Nimkish	Maritime	90	50° 19'	126° 53'
	1028 x	Merritt	Zone Not Def.	870	50° 04'	120° 51'
	1030	Squamish	Maritime	15	49° 47'	123° 09'
	1033	Forbidden	Maritime	610	49° 40'	125° 09'
	1036	Alberni	Maritime	140	49° 19'	124° 51'
1043	San Juan	Maritime	215	48° 35'	124° 05'	
Washington	1049	Bacon Point	7 – Skagit	500	48° 36'	121° 23'
	1050	Marblemount	7 – Skagit	120	48° 35'	121° 24'
	1058	Lake Crescent	1 – Hoh	305	48° 04'	124° 00'
	1061	Louella	1 – Hoh	457	48° 00'	123° 05'
	1067	Skykomish	5 – Kitsap	305	47° 42'	121° 20'
	1069	North Bend	8 – Snoqualmie	150	47° 28'	121° 45'
	1075	Enumclaw	5 – Kitsap	240	47° 16'	121° 56'
	1078 x	Cle Elum	8 – Snoqualmie	640	47° 13'	121° 07'
	1081 x	Alder Lake	9 – Toutle	430	46° 48'	122° 17'
1089	Cathlamet	3 – Twin Harbors	200	46° 18'	123° 16'	
Oregon	1100	Grand Ronde	6	200	45° 06'	123° 36'
	1102 x	Upper Soda	12	1000	44° 23'	122° 12'
	1103	Coquille	2	100	43° 12'	124° 10'
	1104 x	Brookings	1	300	42° 07'	124° 12'
x standardní provenience IUFRO/standardy IUFRO						

Během terénního šetření byly zhodnoceny dendrometrické veličiny (výška, tloušťka) a defoliace všech stromů v provenienčním pokusu podle metodiky ICP (EICHHORN et al., 2010). Defoliace použita jako ukazatel zdravotního stavu byla

hodnocena semikvantitativně podle procenta poškození: nepoškozený strom (0 %), mírně poškozený (1-25 %), poškozený (26-50 %), silně poškozený (51-75 %), odumírající (76-99 %) a mrtvý (100 %).

K porovnání zdravotního stavu proveniencí byl použit statistický regresní model (PEKÁR et BRABEC, 2009). Proměnnou závislou byla míra defoliace stromů, vysvětlující kategoriální proměnnou provenience a vysvětlujícími kvantitativními proměnnými objem kmene, rozdíl průměrů mezi měřeními v letech 2011 a 2016 a počet stromů. Protože data závislé proměnné neodpovídala Gaussovu normálnímu rozdělení, byl jako alternativa použit zobecněný lineární model. Aproximace pomocí Poissonova rozdělení nebyla dostatečně spolehlivá, přestože defoliace měla specifický a relativně malý počet hodnot. Vzhledem ke kladným hodnotám defoliace a histogramu zkosenému doprava bylo pro aproximaci použito gama rozdělení (gama GLM).

Do analýzy byly zahrnuty pouze stromy tříd 1, 2 a 3 (KONŠEL, 1931), tvořící souvislý zápoj v obou hodnoceních (2011, 2016). Jedinci a provenience s rozdílem průměrů přesahujícím 1,5× mezikvartilové rozpětí, u nichž byl výrazný nárůst průměru pravděpodobně způsoben mezerami v okolních korunách byly vyloučeny. Celá provenience 1104 Brookings, stejně jako 4. opakování v proveniencích 1081 Alder Lake a 1103 Coquille, byly vyřazeny z důvodu vysoké mortality. Dále byly na základě předchozího hodnocení vyřazena provenience 1028 Merrit kvůli nízkému počtu jedinců a vysokému podílu mortality.

Do původního modelu byly zahrnuty všechny dvojité interakce mezi faktory. Zjednodušení bylo provedeno podle CRAWLEY (2013) a PEKÁR a BRABEC (2009). Významnost faktorů modelu byla určena analýzou rozptylu s použitím konzervativního F-testu na obvyklých hladinách významnosti: $\alpha < 0,05$, $\alpha < 0,01$ a $\alpha < 0,001$. Výsledný model byl vybrán na základě minimalizace Akaikeho informačního kritéria podle principu Occamovy břitvy (CRAWLEY 2013). U statisticky významné kategoriální proměnné (provenience) byly úrovně faktorů porovnávány také pomocí kontrastů "treatment" [PEKÁR et BRABEC, 2009; CRAWLEY, 2013], pro které byla jako srovnávací stanovena provenience 1102 Upper Soda.

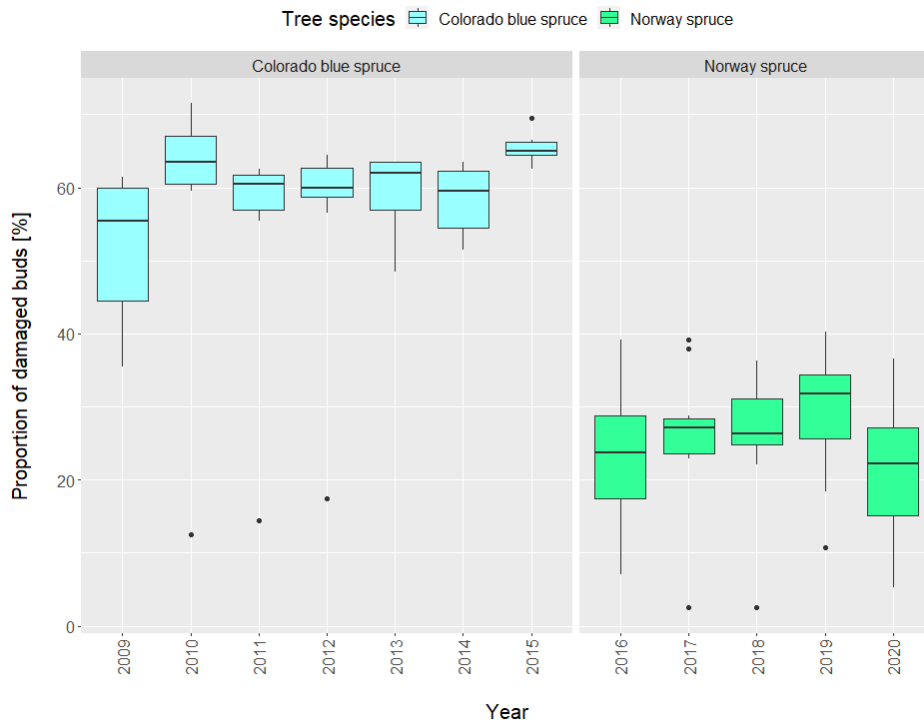
Za účelem vyhodnocení vlivu faktorů a rozřídění proveniencí podle zdravotního stavu byla použita metoda rozhodovacího stromu. Byly převzaty všechny významné faktory z předchozí regresní analýzy (bez interakcí), přičemž rozhodovací strom byl vytvořen pomocí balíčku s názvem "rpart" podle Burgera (BURGER, 2018). Výsledný rozhodovací strom byl ořezán s ohledem na parametr složitosti stromu. Všechny analýzy byly provedeny v prostředí R 3.3.2 (R core team, 2016).

5. Výsledky

5.1 Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého

V rámci hodnocení napadení smrku pichlavého kloubnatkou smrkovou bylo v průměru v letech 2009–2015 napadeno 60 % pupenů smrku pichlavého. V roce 2009 došlo k rychlému rozvoji patogenu, bylo v průměru napadeno 55 % pupenů smrku pichlavého, v roce 2010 to bylo již 63 % pupenů a poté se poškození pohybovalo kolem 60 % napadených pupenů. V roce 2015 došlo k dalšímu nárůstu napadení na 65 % (Obrázek 8).

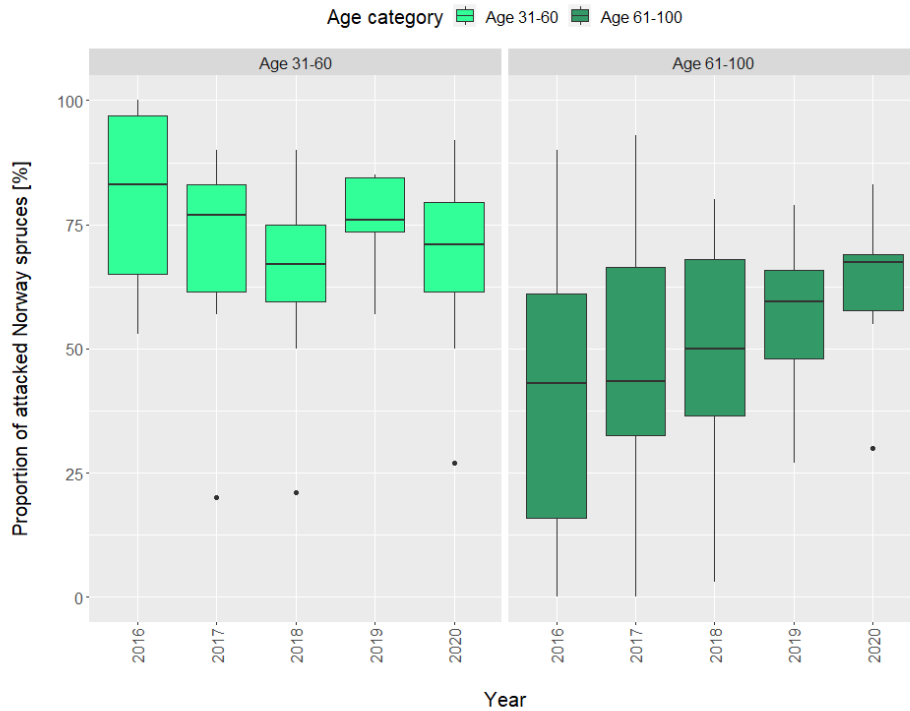
V porostech smrku ztepilého bylo v letech 2009 až 2014 v Krušných horách nalezeno pouze několik stromů s jednotlivě napadenými pupeny. V roce 2015 došlo k výraznému nárůstu poškození smrku ztepilého a na mnoha místech byly napadeny celé porostní skupiny různého věku. Během hlavní fáze rozvoje patogenu v letech 2016-2020 se intenzita poškození pupenů smrku ztepilého pohybovala průměrně kolem 25 %. Na výzkumných plochách bylo v roce 2016 napadeno v průměru 23 % pupenů, intenzita se zvyšovala a v roce 2019 dosáhla 31 %, v roce 2020 pak poklesla na 22 % (Obrázek 8). V roce 2021 nebylo na výzkumných plochách zjištěno žádné nové napadení pupenů.



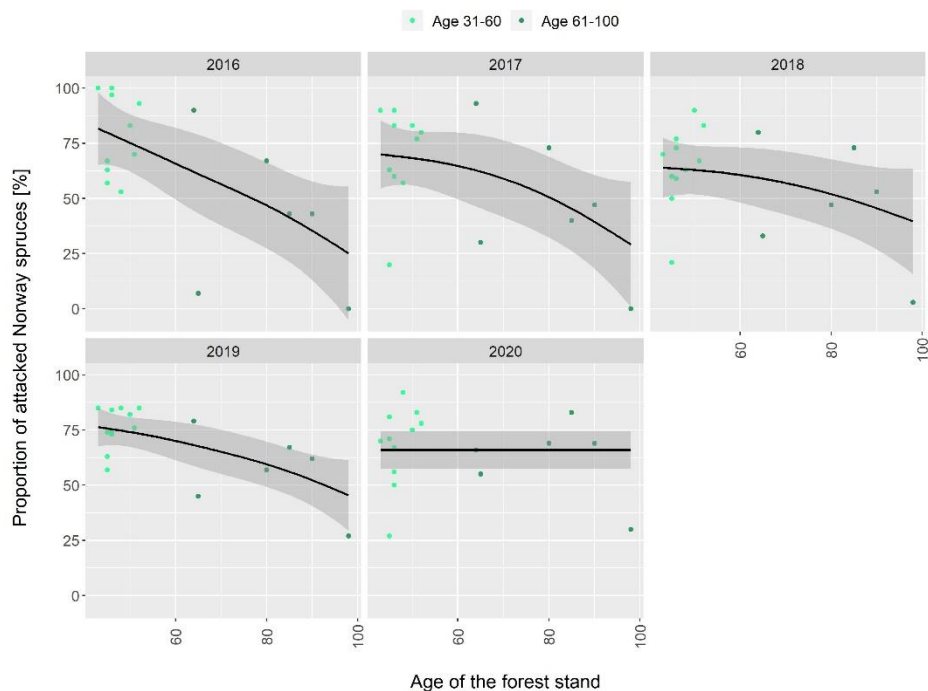
Obrázek 8 Podíl pupenů napadených kloubnatkou smrkovou na smrku pichlavém (2009-2015) a smrku ztepilém ve věkové skupině 31-60 let. Vodorovná čára uprostřed rámečku je medián, metličky představují 1,5násobek mezikvartilového rozpětí (SAMEK et al., 2022).

Kromě intenzity napadení se u obou dřevin lišilo i prostorové rozšíření patogenu. U smrku pichlavého bylo rozšíření souvislé, přičemž všechny stromy byly napadeny stejně jako v okolních porostech. Napadení se vyskytovalo ve srovnatelném rozsahu ve starších i mladších porostech. Nejmladší napadený porost byl 11 let starý. U smrku ztepilého se napadení v mladších porostech vyskytovalo méně často. V oblasti PLO1 se též vyskytovala řada porostů smrku ztepilého starších 60 let s výraznou infekcí. Napadení se u smrku ztepilého významně lišilo v závislosti na věku porostu (GLMM: $n = 85$; $df = 12$; $p < 0,01$). V počáteční (akutní) fázi šíření patogenu v roce 2016 bylo na výzkumných plochách napadeno v průměru 80 % mladých jedinců, zatímco ve starších porostech bylo napadeno pouze 42 % jedinců (Obrázek 9). U středně starých jedinců docházelo ve sledovaném období k postupnému poklesu počtu napadených jedinců a v posledních dvou letech byl zaznamenán prudký nárůst starších jedinců. V roce 2020 činil podíl napadení středně starých stromů 68 % a u starých 62 %. Na počátku sledování v roce 2016 podíl napadených jedinců s věkem klesal, ale tento trend se v průběhu času měnil, a to jak v důsledku

poklesu napadení v mladších porostech, tak nárůstu napadení ve starších porostech. V roce 2020 se napadení ustálilo, ale srovnání s rokem 2016 nebylo statisticky významné (GLMM: $n = 85$; $df = 12$; $p = 0,06$; Obrázek 10).



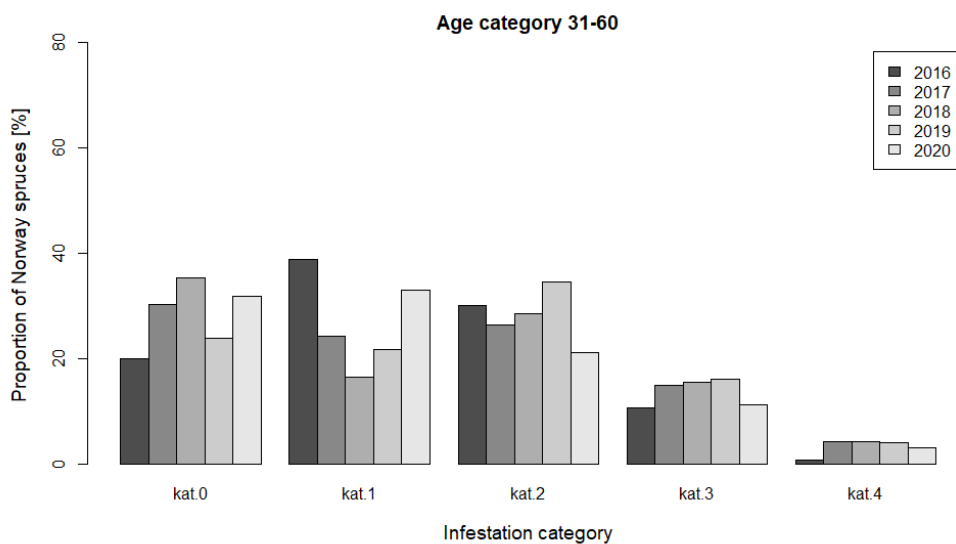
Obrázek 9 Podíl jednotlivých stromů smrku ztepilého napadených václavkou podle věkových tříd v letech 2016-2020. Vodorovná čára uprostřed rámečku je medián, metličky představují 1,5násobek mezikvartilového rozpětí (SAMEK et al., 2022)



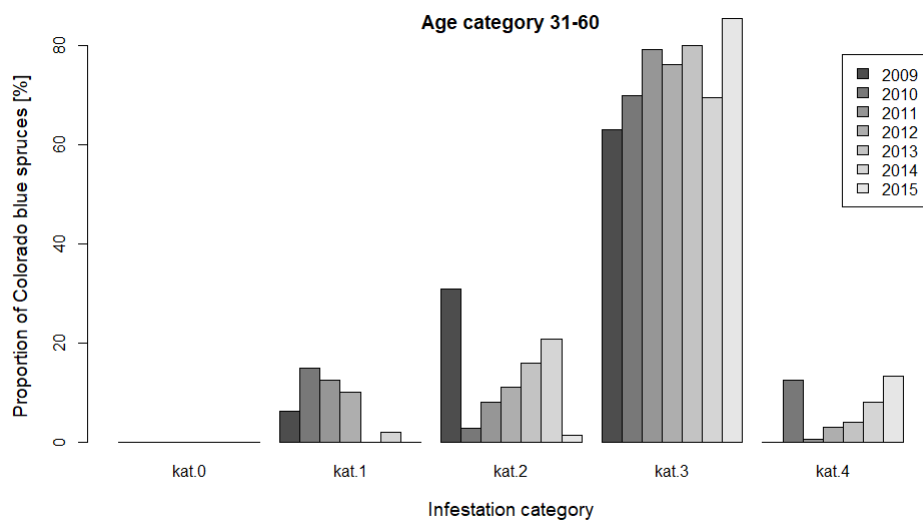
Obrázek 10 Srovnání podílu napadených stromů podle věku v letech 2016-2020 (SAMEK et al., 2022).

Intenzita napadení v jednotlivých kategoriích se u mladších a starších porostů lišila. Podíl silně napadených stromů (kategorie 3 a 4), byl ve středně starých porostech více než dvojnásobný (Obrázek 11 a 13). Pozorován byl trvalý pokles počtu nenapadených stromů a postupný nárůst napadení kategorií 1, 2 a 3 u nejstarších jedinců (Obrázek 13).

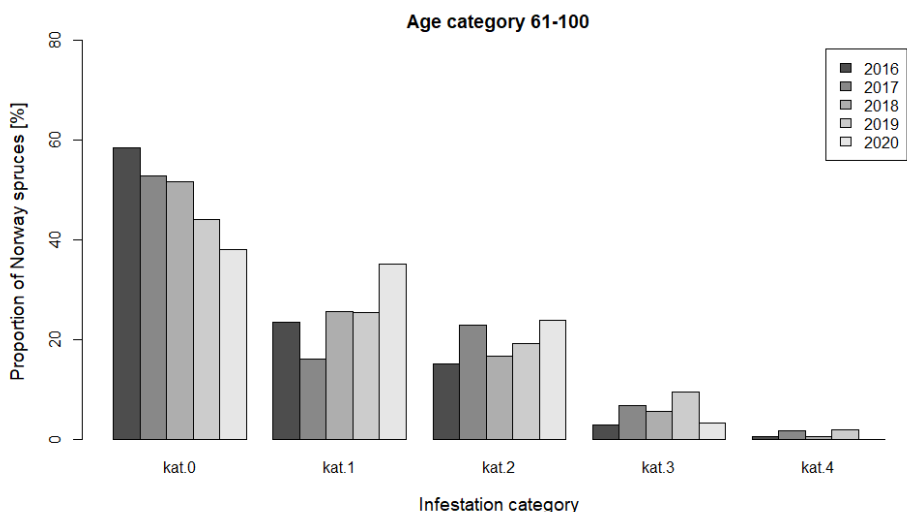
Zcela odlišný vývoj byl u středně starých smrku pichlavých. Ten lze charakterizovat kontinuálním napadením (Obrázek 12). Nejvíce napadených jedinců se nacházelo v kategorii 3 (v průměru 75 % jedinců, Obrázek 12; u smrku ztepilého bylo v kategorii 3 v průměru pouze 11 % jedinců, Obrázek 11). Nejméně poškozené stromy v kategorii 1 se posouvaly do kategorie 2 a během šetření nebyl nalezen zdravý jedinec (Obrázek 12).



Obrázek 11 Podíl napadených smrků ztepilých podle jednotlivých kategorií napadení ve věkové třídě 31-60 let v letech 2016-2020 (SAMEK et al., 2022).



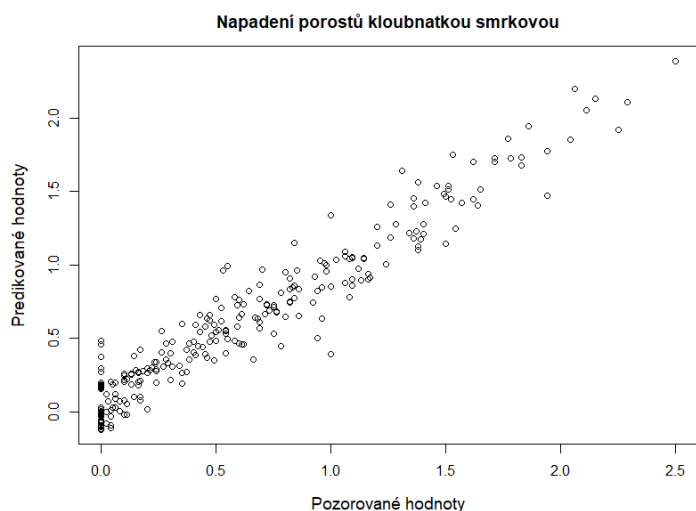
Obrázek 12 Podíl napadených smrků pichlavých podle jednotlivých kategorií napadení ve věkové třídě 31-60 let v letech 2009-2015 (SAMEK et al., 2022).



Obrázek 13 Podíl napadených smrků ztepilých podle jednotlivých kategorií napadení ve věkové třídě 61-100 let v letech 2016-2020 (SAMEK et al., 2022).

Predikční model napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou 2017 - 2019

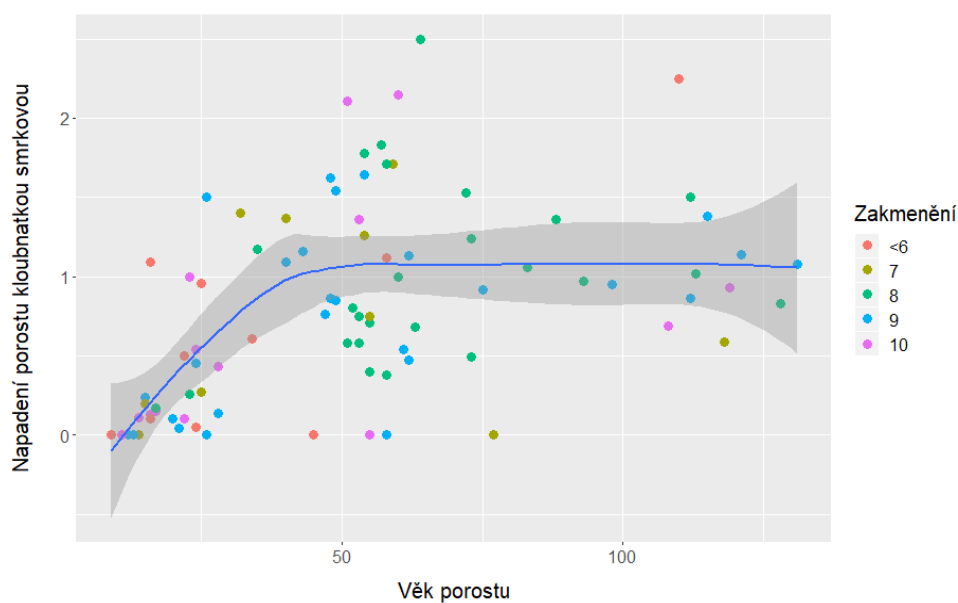
Predikované hodnoty lineárního modelu se smíšenými efekty měly poměrně dobrou shodu s pozorovanými hodnotami (Obrázek 14). Faktory významné pro stupeň napadení kloubnatkou smrkovou jsou zobrazeny v ANOVA tabulce (Tabulka 6). Tyto faktory jsou zároveň důležité i z lesnického hlediska. Napadení nejmladších porostů do 20 let je velice nízké, vyskytují se pouze jednotlivě napadené pupeny na stromech. Kolem 55 let věku napadení kulminuje a od cca 76 let se napadení kloubnatkou udržuje na stejné úrovni (Obrázek 15 a 16). Na základě těchto zjištění, byly původní věkové skupiny modifikovány: 1) do 24 let; 2) 25 – 75 let; 3) 76 až 135 let. U zakmenění je interpretace poněkud složitější. Při plném (10) a nejrozvolněnějším (<6) bylo zaznamenáno nižší napadení než v případě průměrného zakmenění (8) viz Obrázek 17. Z Obrázků 17 a 18 je zřetelné největší poškození při zakmenění 8. Statisticky významná interakce zakmenění a věku nám ukazuje na odlišný trend v napadení mezi těmito faktory. Z výsledků ve věkové skupině "25-75" let bylo nejnižší napadení kloubnatkou při zakmenění <6 a nejvyšší při zakmenění <10. Ve věkové skupině "76-135" bylo naopak nejvyšší napadení v řidších porostech (zakmenění <6) a napadení v plném zakmenění (10) patřilo k nejnižším (Obrázek 19).



Obrázek 14 Hodnoty predikované výsledným modelem a pozorované hodnoty (PEŠKOVÁ et al., 2020).

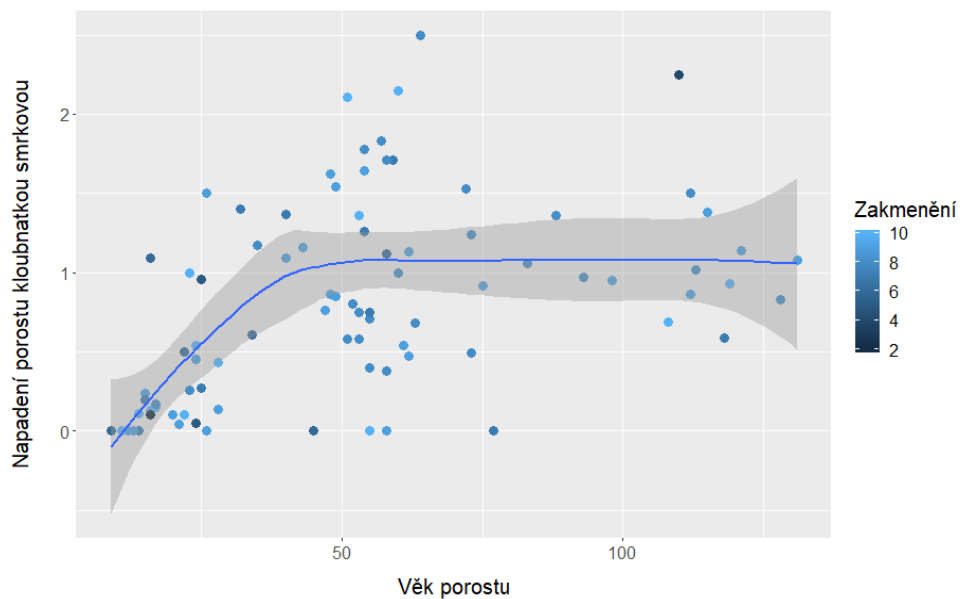
Tabulka 6 ANOVA výsledného modelu lme (průměrné napadení porostu ~ Zakmenění+Rok+Věk+Věk : Zakmenění, random=~1|Šestice/Porost) (PEŠKOVÁ et al., 2020).

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	170	89,06674	<,0001
Zakmeneni	4	170	3,50986	0,0088
Rok	2	170	44,6611	<,0001
Vek	1	170	20,50206	<,0001
Zakmeneni:Vek	4	170	5,4211	0,0004

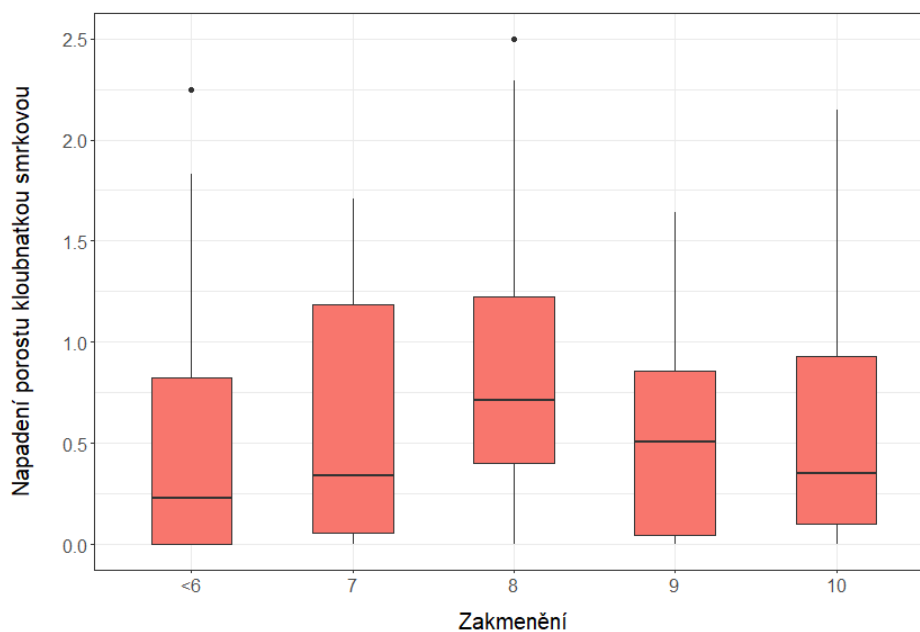


Obrázek 15 Závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na věku porostu. Modrá linie představuje vyhlazovací křivku modelu. Body jsou vyjadřují stупeň

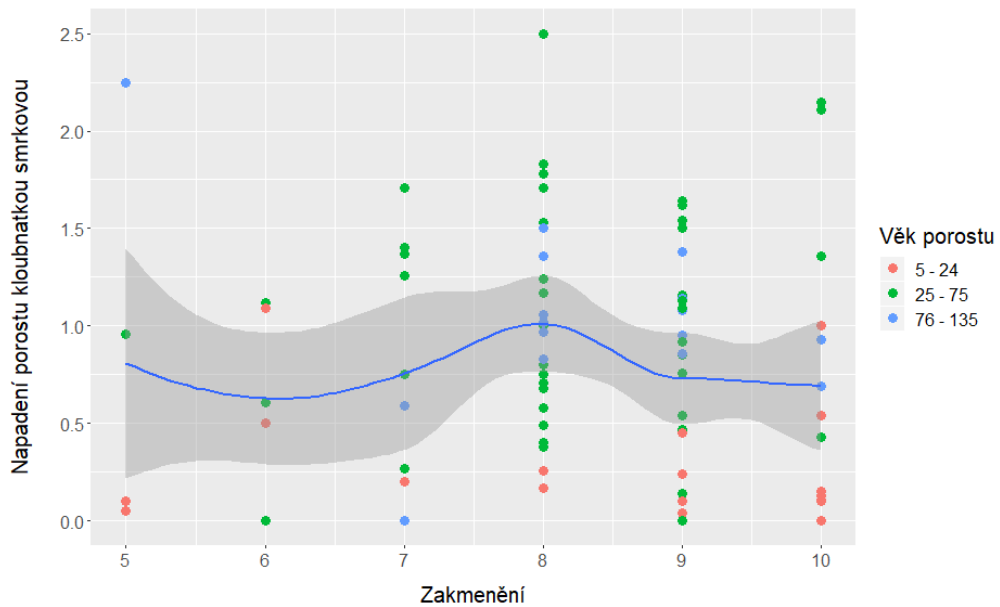
napadení hodnoceného porostu kloubnatkou v roce 2019, a barevné označení bodu reprezentuje pěti stupňový faktor Zakmenění, kde zakmenění pod hodnotu 6 bylo sloučeno do jedné třídy (PEŠKOVÁ et al., 2020).



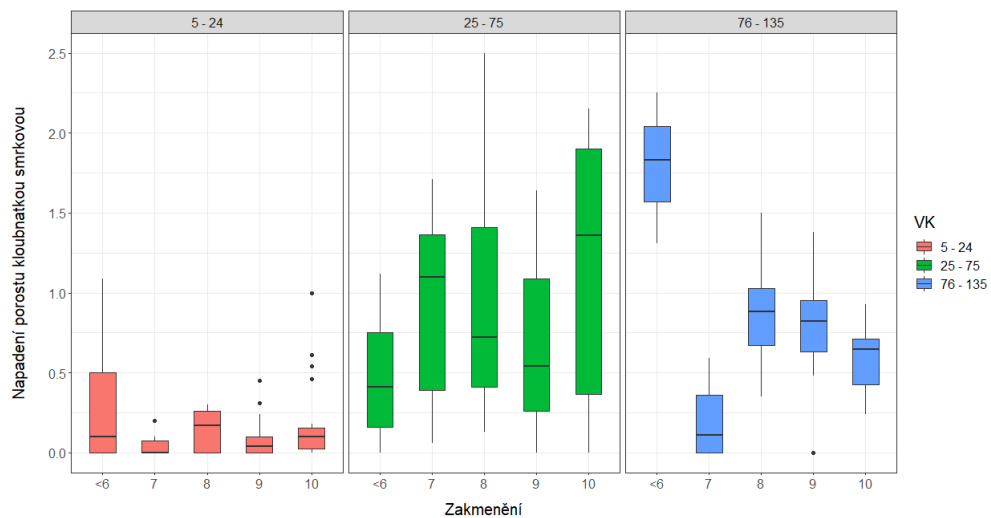
Obrázek 16 Závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na věku porostu. Modrá linie představuje vyhlazovací křivku modelu. Body jsou vyjadřující stupeň napadení hodnoceného porostu kloubnatkou smrkovou v roce 2019, a barevné označení bodu reprezentuje hod (PEŠKOVÁ et al., 2020).



Obrázek 17 Krabicový graf závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na zakmenění (PEŠKOVÁ et al., 2020).



Obrázek 18 Závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou v roce 2019 na zakmenění, jakožto diskrétní numerické veličiny. Modrá linie představuje vyhlazovací spline křivku. Body byly kolorovány podle tří věkových tříd "5-24", "25-75", "76-135" hodnoceného porostu (PEŠKOVÁ et al., 2020).



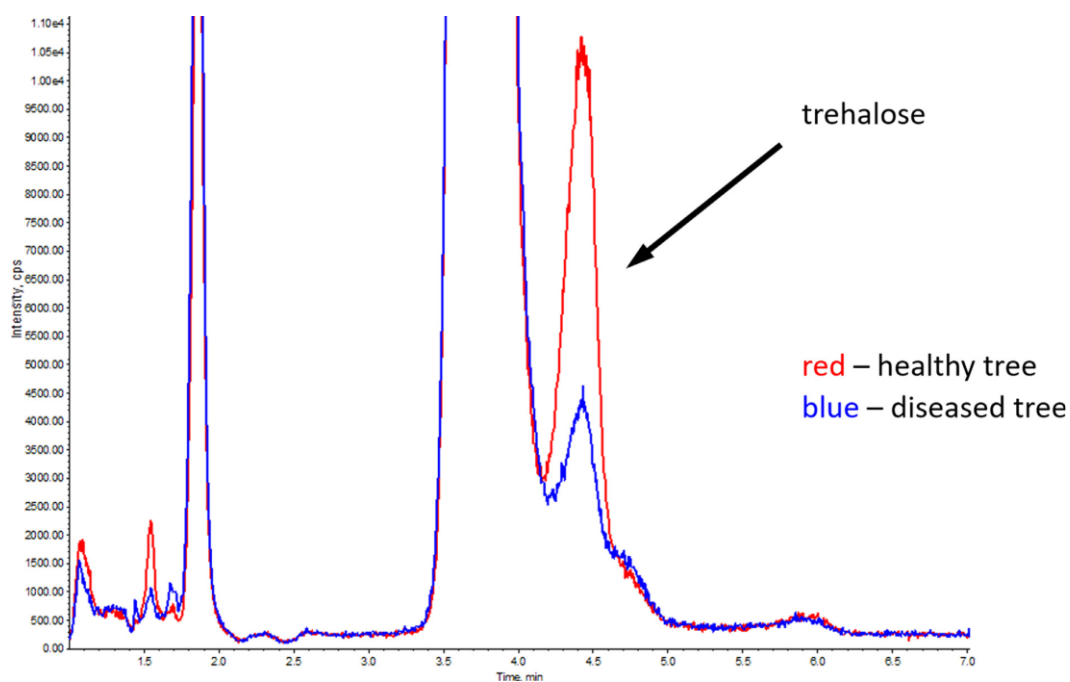
Obrázek 19 Krabicový graf závislost napadení porostu smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou na zakmenění. Jednotlivé krabicové grafy reprezentují pětistupňový faktor Zakmenění, kde zakmenění pod hodnotu 6 bylo sloučeno do jedné třídy. Krabicové grafy byly rozděleny do tří věkových tříd "5 - 24", "25 - 75", "76 - 135" a barevně odlišeny (PEŠKOVÁ et al., 2020).

Výše charakterizovaná data byla použita k tvorbě predikčního modelu napadení (Příloha 2, 3 a 4), ohraničené rozsahem měření veličin vstupujících do modelu, tj. LVS 6., 7. a 8. Mapy predikce výskytu kloubnatky smrkové jsou

v měřítku 1 : 220 000. Přínos mapy spočívá ve stanovení nejvýznamnějších faktorů ovlivňující výskyt a intenzitu napadení porostů smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou. Z map je zřejmé, že porosty smrku ztepilého nejsou v oblasti PLO 1 napadeny stejnoměrně, a ve sledovaném období byl zaznamenán trend postupného zhoršování napadení porostů.

5.2 Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové

Byl odebrán stejný počet sond ze zdravých a infikovaných jedinců na 6 výzkumných plochách. V závislosti na charakteru vzorku byla účinnost extrakce 90-99 %. Optimální teplota extrakce byla podle předchozích pozorování a výzkumů mezi 50 a 60 °C v závislosti na matrici (podpůrná informace, tabulka S3). Pro optimální dobu extrakce byla stanovena doba 30 min, i když malá část vzorků byla plně extrahována již po 15 min. Získané výsledky vyhodnocení množství trehalózy zobrazují významný rozdíl hodnoty mezi infikovanými a zdravými jedinci ($p = 0,01$). Průměrná hodnota trehalózy ve zdravých kořenech smrku byla 739 ± 96 μg trehalózy/g DW (průměr \pm SD) ve srovnání s 624 ± 88 μg trehalózy/g DW u infikovaných kořenů (Obrázek 20). Z výsledků je zřejmé, že jedinci více napadené kloubnatkou smrkovou vykazovaly nižší obsah trehalózy ve vzorcích kořenů než stromy zdravé. Ve 180 odebraných vzorcích byl zjištěn rozdíl v obsahu trehalózy v kořenech mezi poškozenými a nepoškozenými stromy ve prospěch zdravých stromů, ale rozdíl nebyl statisticky významný.



Obrázek 20 Srovnání chromatogramů z lyofilizovaného materiálu zdravého (červeně) a nemocného (modře) stromu. Retenční doba trehalózy je přibližně 4,5 min (ŠULC et al., 2021)

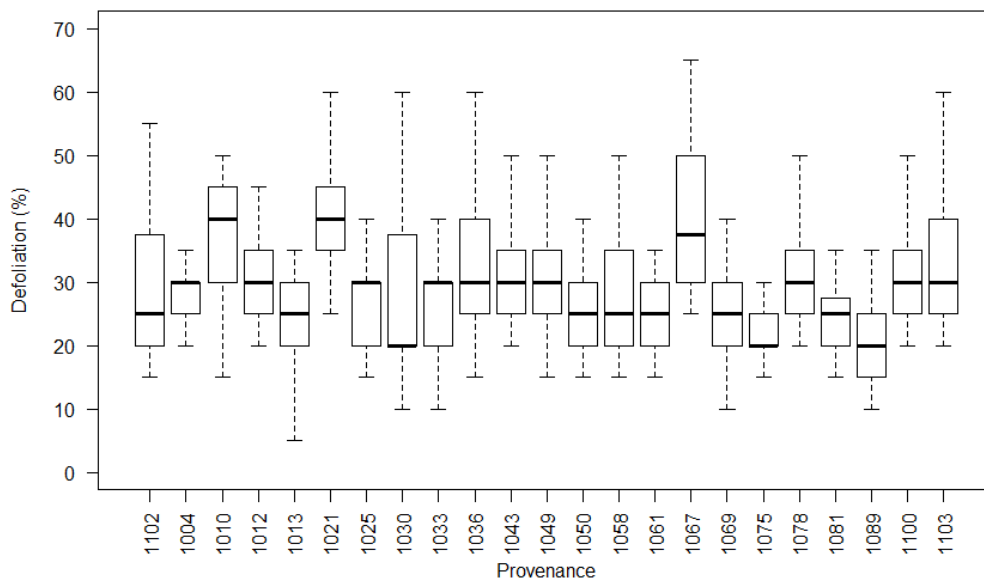
5.3 Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě

U celkem 704 hodnocených stromů byla zjištěna průměrná defoliace stromů 37 % (Obrázek 21). Největší defoliace byla pozorována u proveniencí 1028 Merritt (90 %), 1010 Barrière (61 %) a 1067 Skykomish (53 %). Naopak nejnižší byla zjištěna u proveniencí 1069 North Bend (23 %) a 1089 Cathlamet (24 %). Celkem 71 odumřelých stromů vykazovalo 100 % defoliaci. Nejméně jedinců bylo zaznamenáno (Tabulka 7) u proveniencí 1028 Merritt (15) a 1081 Alder Lake (18), nejvíce u proveniencie 1067 Skykomish (45).

Průměrná výška douglasky na výzkumné ploše byla 30,1 m (Tabulka 7). Největší výšky byly zjištěny u proveniencí 1075 Enumclaw (33,5 m), 1069 North Bend (32,7 m) a 1103 Coquille (32,4 m). Průměrné výšky pěti dalších proveniencí rovněž přesáhly 32 m. Nejnižší průměrná výška byly zjištěny u proveniencí 1028 Merritt (18,3 m), 1067 Skykomish (25,2 m) a 1078 Cle Elum (25,9 m). Nejvyšší strom (40,4 m) byl zjištěn v provenienci 1075, zatímco nejnižší (16,2 m) v provenienci 1067.

Tabulka 7 Průměrné kvantitativní dendrometrické veličiny na ploše Hůrky ((SAMEK et al., 2019).

Stát (USA), provincie (Canada)	Provenience		Počet jedinců	Výška [m]	Výčetní tloušťka [cm]	Objem s kůrou [m ³]	Defoliace [%]	Počet jedinců se 100% defoliací
	ID	Název						
British Columbia	1004	Stuie	27	32	31.9	1.16	34	2
	1010	Barrière	32	26	25.1	0.64	61	10
	1012	Klina Klini	27	31.3	31.4	1.12	31	1
	1013	Revelstoke	40	31.4	32.6	1.22	28	1
	1021	D'Arcy	24	28.7	29.8	0.95	48	3
	1025	Nimkish	30	30.6	29.2	0.99	32	2
	1028x	Merritt	15	18.3	15.9	0.21	90	14
	1030	Squamish	36	32.2	30.5	1.2	36	3
	1033	Forbidden	38	30.5	29.5	1.01	36	5
	1036	Alberni	27	32.3	34	1.36	34	1
Washington	1043	San Juan	32	29.9	29.6	1.02	38	3
	1049	Bacon Point	31	30.6	30.9	1.1	33	1
	1050	Marblemount	31	32.2	32.1	1.18	30	1
	1058	Lake Crescent	31	32.1	32.7	1.26	28	0
	1061	Louella	21	30.6	33.5	1.35	37	3
	1067	Skykomish	45	25.2	22.4	0.48	53	7
	1069	North Bend	29	32.7	35.3	1.42	23	0
	1075	Enumclaw	30	33.5	37.7	1.72	27	1
	1078x	Cle Elum	28	25.9	25.7	0.70	46	5
	1081x	Alder Lake	18	31.5	32.8	1.29	31	0
Oregon	1089	Cathlamet	31	31.9	33.5	1.27	24	0
	1100	Grand Ronde	26	30.8	33.0	1.21	34	3
	1102x	Upper Soda	31	28.8	30.4	1.07	39	4
	1103	Coquille	19	32.4	31.8	1.22	37	1
	1104x	Brookings	5	29.5	31.5	1.01	26	0
Σ/Průměr			704	30.1	30.5	1.09	37	71



Obrázek 21 Krabicový graf pro míru defoliace jednotlivých proveniencí. Fousky představují 1,5násobek mezikvartilové rozpětí. Písmeno nad proveniencí znamená pobřežní (C) nebo vnitřní (I) (SAMEK et al., 2019).

Průměrná výčetní tloušťka všech hodnocených jedinců byla 30,5 cm (Tabulka 7). Nejmenší výčetní tloušťka byly zaznamenána u proveniencí 1078 Cle Elum (11,8 cm) a 1025 Nimkish (13,7 cm), zatímco největší výčetní tloušťka byla zjištěna u proveniencí 1102 Upper Soda (55,9 cm), 1013 Revelstoke (53,9 cm), 1103 Coquille (53,3 cm) a 1075 Enumclaw (52,6 cm). Nejvyšší průměrné hodnoty výčetní tloušťky byly zjištěny u proveniencí 1075 (37,7 cm) a 1069 North Bend (35,3 cm), naopak nejmenší u proveniencí 1067 (22,4 cm) a 1028 (15,9 cm).

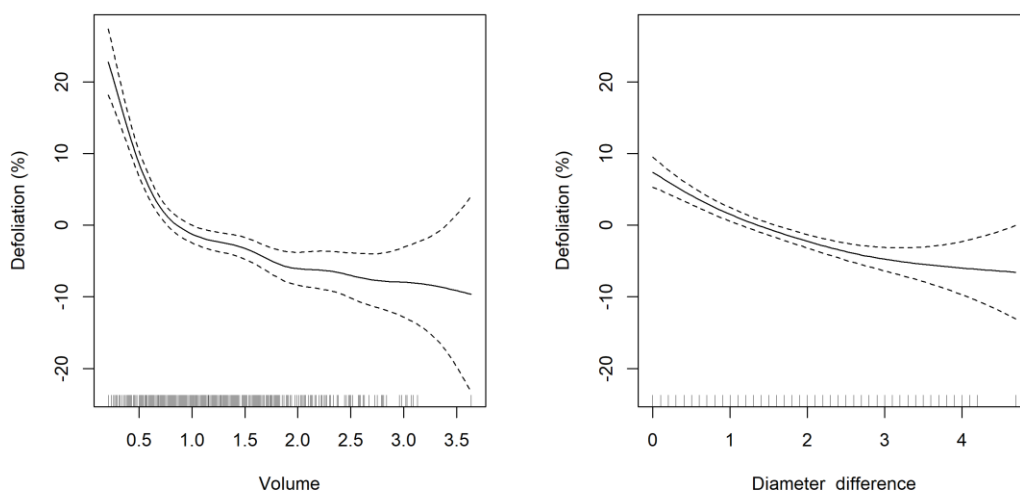
Objem porostu s hroubí všech hodnocených douglasek činil 765,84 m³. Průměrný objem jedince byl 1,09 m³. Největšího průměrného objemu dosáhla provenience 1075 Enumclaw (1,72 m³), zatímco provenience 1028 Merritt (0,21 m³) a 1067 Skykomish (0,48 m³) měly objem nejmenší.

Pomocí gama GLM byly faktory objem stromu, provenience a rozdíl průměrů výčetních tloušťek mezi roky 2011 a 2016 určeny jako významné pro míru defoliace a interakce objemu včetně provenience (gamma GLM R² = 0,65; Tabulka 8) byly rovněž významné. Defoliace koruny byla významně ovlivněna objemem hodnoceného stromu. Defoliace se snižovala s rostoucím objemem Obrázek 22. Nejvíce defoliováných stromů mělo objem <1 m³. Vztah mezi defoliací a rozdílem průměrů byl rovněž nepřímo úměrný (Obrázek 22), přičemž

stromy s <30 % defoliací měly také nejvýraznější přírůst mezi hodnoceními. Rozdíly v míře defoliace mezi proveniencemi jsou dobře patrné z Obrázku 21. Mezi nejvíce defoliované provenience patřily 1010 Barrière, 1021 D'Arcy a 1067 Skykomish.

Tabulka 8 Výsledný zjednodušený gama model defoliace (SAMEK et al., 2019)

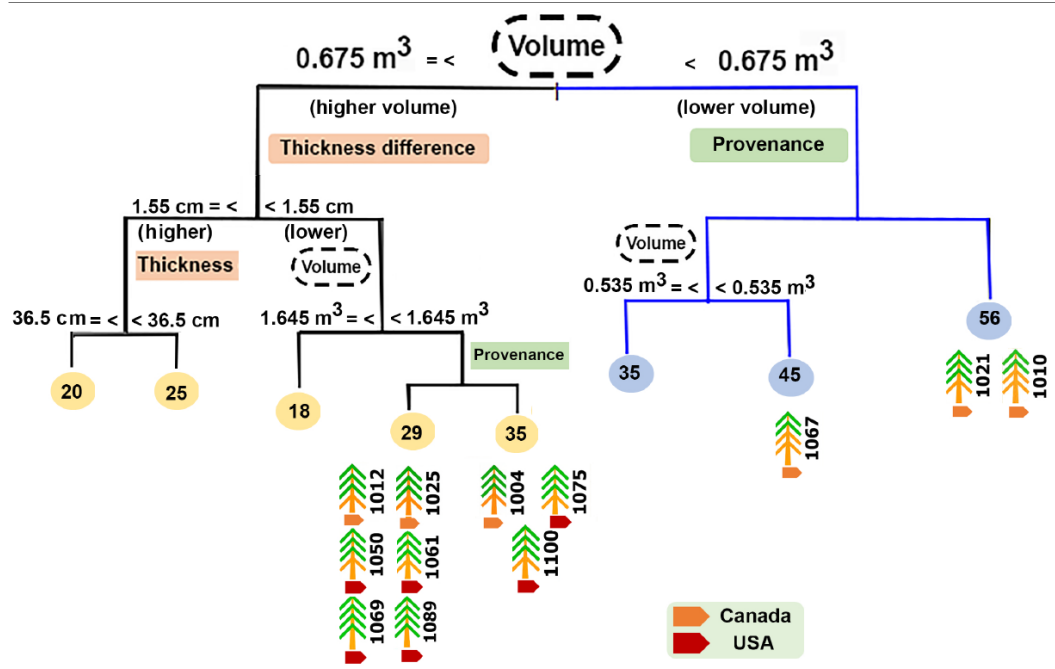
	Df	Deviance	Resid . Df	Resid. Deviance	F	Pr(>F)	
NULL	558	86.412					
volume	1	42.627	557	43.785	728.487	2.20E-16	** *
provenance	22	4.908	535	38.878	3.8122	2.23E-08	** *
diameter difference	1	3.933	534	34.945	67.2096	1.98E-15	** *
volume:provenance	22	2.903	512	32.042	2.2552	0.001	** *
volume : diameter difference	1	1.337	511	30.705	22.8495	2.29E-06	** *



Obrázek 22 Vztah mezi defoliací a rozdílem objemu, resp. průměru, s využitím neparametrických proměnných v zobecněném aditivním modelu. Na ose y jsou rozdíly od průměrné defoliace = 37 % (SAMEK et al., 2019)

Provenience byly rozděleny do několika skupin pomocí rozhodovacího stromu (Obrázek 23) a byla posouzena míra vlivu jednotlivých faktorů na zdravotní stav. Největší vliv na objem stromu měla hodnota defoliace. Nejnižší defoliaci měly stromy s objemem nad 1,645 m³. Provenience s nejlepším přírůstkem a nejnižší defoliací pochází z Britské Kolumbie - 1012 Klina Klini, 1025 Nimkish

a z Washingtonu - 1050 Marblemount, 1061 Louella, 1069 North Bend a 1089 Cathlamet. Naopak provenience s objemem menším než 0,675 m³ vykazovaly vyšší míru defoliace a vyšší náchylnost k působení sypavek. Nejhorší zdravotní stav měly provenience 1010 Barriere a 1021 D'Arcy. Více defoliovaná byla také provenience 1067 Skykomish.



Obrázek 23 Rozhodovací strom faktorů ovlivňujících zdravotní stav douglasky tisolisté na studijní ploše. Na konci uzlů je uvedena průměrná defoliace (čísla). Zdravější stromy jsou vlevo (černá část rozhodovacího stromu), více poškozené stromy jsou vpravo (SAMEK et al., 2019).

6. Diskuze

6.1 Kloubnatka smrková a její rozšíření v porostech smrku ztepilého a pichlavého

Odsíření elektráren, které bylo zaznamenáno v posledních třiceti letech (HADAŠ, 2002; ŠRÁMEK et al., 2015; CHMI 2020), může do jisté míry souviset se současným rozsáhlým rozšířením kloubnatky v Krušných horách. Síra působila jako fungistatikum potlačující rozvoj patogenu v těchto oblastech. Při snížení jejího obsahu v polutantech došlo k masivní fruktifikaci a šíření kloubnatky na smrku pichlavém (ČERNÝ et al., 2016a). Zhoršený zdravotní stav smrku ztepilého a následné odumírání náhradních porostů smrku pichlavého započalo ve druhé polovině 20. století. Náhradní porosty byly zakládány z důvodu

značného poškození původních smrkových kultur znečištěním ovzduší, především depozicemi SO_x a NO_x a vysokými koncentracemi fluorovodíkových kyselin. Oxid siřičitý svým přímým vlivem na asimilační aparát dřevin a nepřímým působením na chemismus půdy následně způsobil odumírání porostů na ploše přibližně 40 000 ha (ŠRÁMEK et al., 2015). I přesto že přímé emise nemají dnes prakticky žádný vliv na zdravotní stav lesních dřevin, tak zvýšená depozice NO_x a amonných iontů NH₄⁺ nadále přispívá k okyselování půdy. Vážný problém v těchto kyselých půdách je rovněž nízký obsah živin. Například obsah draslíku je téměř ve všech částech Krušných hor nižší než 3500 mg.kg⁻¹ (FIALA et al., 2017), což je pro pěstování dřevin v horských oblastech komplikací. Zřejmý negativní vliv výše uvedených antropogenních faktorů vedoucí k úbytku biomasy (BACIAK et al., 2015) je navíc v posledních letech podpořen nárůstem koncentrace přízemního ozonu O₃.

Přetrvávajícím problémem je bezesporu dlouhodobá acidifikace půd způsobená znečištěním ovzduší. Slabá úživnost půdy (FIALA et al., 2017) snižuje obranyschopnost dřevin, což vede k usnadnění úspěšného napadení patogeny (PAOLETTI et al., 2010). Mladší stromy jsou obecně náchylnější ke znečištění ovzduší než dospělé stromy, protože získávají méně živin potřebných pro růst a vytvoření obranných mechanismů (KOZLOWSKI, 1976). Kromě toho mají individuální stromy v podrostu obecně nižší stomatální vodivost, což má za následek menší průnik škodlivých látek do tkání, a přispívá tak k menšímu napadení mladších a zastíněných rostlin (TUFFEN et GROGAN, 2019). Nicméně i starší porosty mohou být poškozeny znečištěním ovzduší, a to zejména proto, že koruny stromů mohou působit jako filtr, který snižuje množství znečišťujících látek dopadajících na zem (BYTNEROWICZ, 1996).

Jako podmiňující faktory, podporující potenciální riziko vzniku a šíření infekce mohou působit vysoká vzdušná vlhkost, snížená vitalita, nedostatečná výživa nebo zamokření, vyšší věk či hustý zápoj (POSPÍŠIL et POSPÍŠIL, 2011). U smrku pichlavého houba kloubnatka smrková poškozovala spíše nižší a hustší koruny (ČERNÝ et al., 2016a), u smrku ztepilého naopak horní částí koruny (PEŠKOVÁ et SOUKUP, 2016). V obou částech koruny navíc docházelo často k poškození pupenů mrazem, které často znesnadňovalo hodnocení. V Severní Americe bylo zaznamenáno napadení severoamerických smrků houbou

Dichomera gemmicola A. Funk & B. Sutton, jejíž symptomy mohou být v první fázi vývoje zaměněny s houbou *G. piceae*. Tento patogen byl pozorován již před 50 lety v oblastech východní Kanady (FUNK et SUTTON, 1972; WINTON, 2020). Při mikroskopickém posouzení jsou obě houby snadno rozlišitelné (SHERWOOD et al., 2015). Během terénních prací, ale k záměně s tímto patogenem dojít nemohlo, jelikož nebyl do současné doby výskyt *Dichomera gemmicola* v rámci celé Evropy pozorován. Naproti tomu distribuce kloubnatky smrkové byla potvrzena v několika evropských zemích – České republice (ŠEFL, 2013; ČERNÝ et al., 2016a; PEŠKOVÁ et al., 2016a, 2016b), Irsku (FEIGE et al., 2004), Itálii (KOZLOWSKI et al., 1990), Aljašce (PERALTA et al., 2020) a Velké Británii (BORTHWICK, 1909). V severních částech Evropy nebyl dosud výskyt potvrzen. Jedním z důvodů mohou být nízké zimní teploty, které mohou navzdory psychrofilní povaze kloubnatky smrkové omezovat rozvoj patogenu (PETERSSON, 2018).

Přestože nejvyšší intenzita napadení byla zjištěna ve středně starých porostech s věkem 31-60 let, trend postupujícího napadení byl nejvýraznější u starších jedinců nad 60 let, a to zejména v důsledku nárůstu poškozených jedinců v kategoriích 1 a 2. Tento rozdíl byl nejintenzivnější v letech 2019 a 2020. Jedná se o poněkud odlišný trend oproti jednomu z největších fytopatologických rizik současnosti *Hymenoscyphus fraxineus* (T.Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya, který lze pozorovat častěji u mladších jasanů (TIMMERMANN et al., 2017). K infekci mladších jasanů dochází častěji především v důsledku šíření patogenu z opadaných listů a řapíků, které jsou na zemi. Intenzita šíření spor v těchto místech je totiž 5 - 100krát větší než ve výšce pouhých 3 m nad zemí (CHANDELIER et al., 2014). Starší stromy bývají vůči poškození odolnější, to ale nemusí být při opakované infekci pravidlem. Kloubnatka smrková se šíří především v koruně stromu, kde může hrát roli i počet pupenů, který je u mladších jedinců obvykle nižší díky hustší koruně. Starší jedinci mohou být zpočátku lépe schopni odolávat infekci patogenem díky svým vyvinutějším obranným mechanismům. Pokud se ale infekce se spolupůsobením dalších faktorů opakuje, může dojít ke zhoršení celkového zdravotního stavu stromů (FIALA et al., 2017).

Z výsledků práce je zřejmá nižší míra napadení při plném zakmenění (10), kterou má za následek i vyšší zastoupení mladších porostů s tímto zakmeněním, které často bývají přehoustlé. Bylo možné pozorovat i statisticky významnou interakci mezi intenzitou napadení a věkem u nízkého, průměrného a plného zakmenění. Hustota porostu a zakmenění ovlivňují lokální mikroklimatické podmínky, které mají důležitý vliv na fyziologii a odolnost jednotlivých stromů. Vysoké teploty uvnitř porostu v kombinaci se suchem zapříčiněným rozvolněním zápoje způsobují oslabení jedinců či tvorbu příhodných podmínek pro rozvoj podkorního hmyzu nebo podporují riziko vzniku lesních požárů (JACTEL et al., 2009). To je o to výraznější u starých porostů, kde bylo zjištěno největší napadení u nízkého zakmenění, kde je potřeba počítat s větším ohrožením stability a zdravotního stavu porostu v případě napadení (KOLEJKA et al., 2010). Hustota, resp. zakmenění by ale do budoucna mohlo představovat poněkud odlišnou roli. Jeho stanovení je již obtížné a vzhledem ke stále častějšímu využívání smíšené druhové skladby by se to mohlo stát téměř nemožným úkolem (PRETZSCH et al., 2020).

I když je, s ohledem na trend týkající se změn průměrné roční teploty a počtu dnů s denní teplotou nad 5 °C v zimních měsících, zřejmý vliv teploty a sucha na napadení patogeny (SOUKUP et al., 2009), nebude tento jev nejdůležitějším faktorem pro napadení porostu. Na výzkumných plochách se vedle sebe vyskytovaly jedinci s velmi rozdílnou mírou napadení, kteří byly ovlivněni klimatickými a půdními charakteristikami stejně. Z fyziologických měření je zřejmé, že *G. piceae* negativně ovlivňuje vodní režim smrku a snižuje účinnost využití vody (WUEinst) ve výhonech (TOMÁŠKOVÁ, 2018). To může zvyšovat stres suchem a potlačovat odolnost vůči dalšímu napadení patogeny. V minulosti již ve smrkových porostech na našem území k podobnému katastrofálnímu dopadu patogenu došlo, a to v Orlických horách. Na přelomu tisíciletí došlo k neočekávanému výskytu houby *Ascochyta abietina* (Lagerb.) Schläpfer-Bernh., která byla známa především z borových porostů v Rakousku, Švédsku a Polsku (HANSSON, 1998a; SIEROTA et al., 2019). Vývoj a postup infekce byl obdobně náhlý a způsobil poškození pupenů jak na sazenicích smrku pichlavého, tak i smrku ztepilého. Svou roli zde dozajista sehrály roky s vyšší sněhovou pokrývkou, které vytvořily optimální podmínky pro rozvoj patogenu a vedly

k masivní fruktifikaci a následnému výraznému rozšíření (HANSSON, 1998a). I když negativní vliv provenience u smrku nebyl zatím jednoznačně potvrzen, tak ho již bylo možné pozorovat (PULKKINEN, 1993). Je tedy zřejmé, že volba proveniencí z nižších nadmořských výšek mohla být s ohledem na častější stresování v horských oblastech abiotickými faktory poněkud nevhodná. To potvrzují i data z výzkumů *Pinus sylvestris* a *Pinus contorta* (HANSSON, 1998b; SKOVSGAARD et al., 2010), u kterých byl vliv provenience jednoznačně potvrzen.

6.2 Vyhodnocení trehalózy a jejího zastoupení u smrku ztepilého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové

Klíčovými faktory pro přesnou kvantifikaci trehalózy ve vzorcích mykorhizních kořenů jsou rychlý odběr materiálu, okamžité zchlazení vzorku v kapalném dusíku, skladování při -80 °C a lyofilizace. Z kombinací extrakčních rozpouštědel s různým poměrem ethanolu nebo methanolu ve vodě bylo nejlepší výtěžnosti extrakce dosaženo s 80% roztokem methanolu a vody (v/v). Oproti tomu metodika založená na ethanolových směsích, která se převážně používá v jiných pracích, získala v experimentu asi o 10 % méně trehalózy. Předchozí studie vždy používaly horké směsi ethanolu k zastavení aktivity trehalózy. Zastavení aktivity trehalózy v tomto výzkumu bylo dosaženo vložím vzorků kořenů do kapalného dusíku ihned po vykopání ektomykorhizních kořenů a následnou lyofylizací. Použití nižšího množství vzorku kořenů než 25 mg neposkytlo u některých vzorků reprodukovatelné výsledky pro trehalózu (SD < 32 %, n = 5) a vyšší množství je nevhodné kvůli velkému obsahu sacharózy, která pak interferuje s trehalózou. Při LC-MS analýze trehalózy je hlavním problémem nalezení vhodných podmínek pro samotnou separaci od ostatních sacharidů.

Stromy napadené kloubnatkou měly slabě vyvinutou mykorhizu a obsah trehalózy byl u těchto stromů výrazně nižší. Zjištěná nižší koncentrace houbových cukrů a ergosterolu spočívá v příznivých faktorech mykorhizy, která se projevuje vyšší zásobou vody a minerálních živin. Mycelium mykorhizních hub umí též chránit hostitelskou dřevinu před patogeny tím, že vylučuje fungistatické sloučeniny a aktivuje ochranný mechanismus v půdě (KOZLOWSKI, et al., 1990). Při vůbec první zmínce o vztahu mezi trehalózou a vitalitou kořenů bylo navrženo hodnotit morfologické parametry kořenů na základě míry syntézy trehalózy

(NIEDERER et al., 1989). Její podíl na obranně dřevin, který byl zjištěn například u borovice lesní po napadení václavkou smrkovou (ISIDOROV et al., 2008), kdy byla prokázána akumulace reaktivních forem kyslíku (FERNANDEZ et al., 2010).

6.3 Vliv sypavek na výběr vhodných proveniencí douglasky tisolisté ve střední Evropě

Mezinárodní provenienční plocha Hůrky byla již dříve několikrát hodnocena (BERAN, 1995; KŠÍR et al., 2015). Nikdy se nejednalo o vyhodnocení zdravotního stavu proveniencí. Během šetření na mezinárodní ploše IUFRO v Nizozemsku bylo zjištěno, že žádná provenience nesplňuje kritéria vysoké produkce a zároveň vysoké odolnosti vůči biotickým a abiotickým činitelům (EILMANN et al., 2013). Z výsledků je ale zřejmé, že je vhodné dávat přednost severním proveniencím na méně suchých lokalitách, zatímco na sušších lokalitách jižním proveniencím. Na Hůrkách je situace podobná a na výběr je alespoň několik produkčních proveniencí s nižší mírou napadení sypavkami. Při porovnání statistické metody pomocí kontrastů se významně lišily provenience 1021 a 1030. Provenience 1021 měla objem kmene zhruba na úrovni průměrné hodnoty provenienčního výzkumu. Zjištěný objem by měl odpovídat průměrné míře defoliace, ale zjištěná míra defoliace se ve skutečnosti výrazně lišila. Podobný trend vykazuje i provenience 1030; z hlediska objemu patří k nejlépe rostoucím, což by mělo odpovídat i nízké míře defoliace, ta je však spíše průměrná.

Při porovnání výsledků měření mezi lety 2011 (KŠÍR et al., 2015) a 2016 došlo k poklesu jedinců na výzkumné ploše z 721 na 704. V roce 2016 bylo vitálních 633 jedinců a 71 jedinců bylo odumřelých nebo odumírajících. Vzhledem k tomu, že KŠÍR et al., (2015) nehodnotili defoliaci, tak nebylo možné porovnat její změnu. Přesto lze současný zdravotní stav stromů napříč proveniencemi považovat za mírně zhoršený, a to hlavně z důvodu zvýšeného výskytu sypavek. Sucho se projevilo poprvé až v zimě 2015/16 po předchozích letech (2013-2014) s extrémním vláhovým deficitem, a proto je možné konstatovat, že sucho nepředstavovalo hlavní příčinu zhoršeného stavu jednotlivých proveniencí na Hůrkách.

Mezi roky 2011 (KŠÍR et al., 2015) a 2016 existuje zjevná proporcionální závislost mezi nárůstem objemu kmene a průměru kmene. V roce 2011 byla nejmenší objemová produkce zjištěna u proveniencí 1028 Merritt, 1067 Skykomish, 1078 Cle Elum a 1010 Barrière. Zjištěné výsledky tomu analogicky odpovídají. Žádná uvedená provenience se na výzkumné ploše neosvědčily. Naopak provenience 1075 Enumclaw, 1069 North Bend a 1089 Cathlamet, které se osvědčily již v předchozím hodnocení, lze doporučit především díky jejich nadprůměrné produkci, u které se zpravidla očekává vyšší odolnost vůči patogenům a obecně příznivému růstu. I přesto je na provenienční ploše řada dalších proveniencí s nadprůměrnou produkční schopností (např. 1036 Alberni), které vykazují horší zdravotní stav. Navíc lze v příštích letech očekávat další zhoršení zdravotního stavu vzhledem k jejich původu v pobřežních oblastech Britské Kolumbie a Washingtonu (tj. vyšší náchylnost k suchu a podzimním mrazům).

Míra odolnosti některých proveniencí vůči sypavkám se projevila rozdílnou a neočekávanou (vyšší a nižší) mírou defoliace vzhledem ke zjištěnému objemu kmene. Je tedy zřejmé, že strom s menším objemem bývá náchylnější vůči působení sypavek. Vitalita, jakožto vhodný ukazatel odolnosti jedince nebyla ve výzkumu přímo hodnocena, ale bylo ji možné posoudit na základě schopnosti stromu přirůstat v porovnávaném období. Odolnost stromu proti sypavkám je ve skutečnosti více podmíněna dobrým zdravotním stavem než konkrétním původem. Například u růstových proveniencí jako 1004, 1075 a 1100 byla míra defoliace relativně vyšší, než se očekávalo, díky čemuž je možné předpokládat jejich vyšší susceptibilitu k sypavkám. Provenience 1069, 1075 a 1089 naopak patří podobně jako v roce 2011 mezi vůbec ty nejhodnější (KŠÍR et al., 2015). U nejhůře hodnocených proveniencí 1010, 1021 a 1067 platí doporučení se jejich pěstování vyhýbat KŠÍR et al., (2015).

Čtyři provenience (1025, 1050, 1069 a 1100) na Hůrkách byly zastoupeny i mezi 18 proveniencemi hodnocenými v Nizozemsku (EILMANN et al., 2013). Vzájemná možnost porovnat výsledky naší práce s výzkumy v Nizozemí je i s ohledem na nesrovnatelné přírodní podmínky rozporuplná. Provenience 1025, poněkud podprůměrná na provenienční ploše Hůrky, patřila v Nizozemsku k nejproduktivnějším, a to i přes to že její nevýhodou je nižší odolnost vůči suchu,

jehož efekt byl v Nizozemsku hodnocen. Vyšší citlivost k suchým obdobím vykazovala také provenience 1069 North Bend, která patřila k nejlepším na mezinárodní ploše Hůrky.

Výsledky hodnocení mladších porostů ve věku do 30 let z Bulharska (PETKOVA, 2011; PETKOVA et al., 2014; Popov, 2014) potvrzují trend, že pobřežní provenience z Oregonu a Washingtonu rostou v typických podmínkách střední Evropy a zejména v Bulharsku lépe než ty vnitrozemské. S ohledem na výsledky výzkumu v Bulharsku je zřejmé, že sypavky představují ve výzkumných pokusech limitující faktor pěstování. Prvotně byly zjištěny na ploše ve věku 17 let (GEORGIEVA, 2009), kdy se vyskytovaly především u vnitrozemských proveniencí, ale při opakovaném hodnocení ve věku 24 let se vyskytovaly napříč všemi proveniencemi v celém pokusu (PETKOVA et al., 2014). Přesto bylo hlavní ohnisko napadení u vnitrozemských proveniencí. Nejhůře hodnocené provenience byly Keremeos (Washington), Whitefish (Montana), Bates (Oregon) a Canyon City (východní Oregon), všechny se sníženou vitalitou a typickými symptomy sypavkového onemocnění (PETKOVA et al., 2014). Mezi nejlépe rostoucí a odolnější vůči sypavkám (PETKOVA et al., 2014, Milenkova et al., 2018) patřili provenience Newhalem a Darrington ze Skagitských semenářských oblastí v západní části Kaskádového pohoří. Pocházejí z nadmořské výšky mezi 500 a 1167 m a z oblastí s podobným klimatem středoevropským podmínkám. Podobných výsledků však dosáhla i pobřežní provenience Brookings z Oregonu, jejíž využití není v českém lesnictví legálně možné. Výsledky výzkumů z mnoha částí Evropy totiž vedla k vymezení určitých preferovaných geografických oblastí pro dovoz osiva do kterých Oregon nespadá (ŠINDELÁŘ et BERAN, 2004; LAVENDER et HERMANN, 2014).

Na polském území byl výskyt sypavek potvrzen na 3 z 11 výzkumných ploch (ŁAKOMY et IWAŃCZUK, 2010). V silně napadených porostech přesáhla defoliace 45 % u téměř 90 % stromů. Vyšší infekční tlak byl zjištěn především u starších jedinců (35 let). To platí i pro Hůrky, kde byla prokázána vysoká míra napadení i ve věku téměř 50 let. Obecně je ale známý fakt, že nejčastější věk infekce je zpravidla 10-30let (BUTIN, 1995; HANSEN et al., 2000; MAGUIRE et al., 2002). Výsledky z Polska či Nového Zélandu rovněž nepřímo potvrzují, že sypavky způsobené *P. gaeumannii* představují nejnebezpečnější rizikový faktor pro mladé

výsadby douglasek (HOOD et KIMBERLEY, 2005; HANSEN et al., 2000, MAGUIRE et al., 2002; KIMBERLEY et al., 2011). Je zřejmé, že ne všechny mrtvé jedince posledních let lze přičítat pouze vlivu sypavek, dalšími faktory zhoršujícími zdravotní stav douglasek byly stres způsobený suchem a jiné patogeny.

V oblastech Nového Zélandu bylo hodnoceno sedm proveniencí na sedmi lokalitách. Probíhající infekce sypavkami (s plodnicemi na více než 80 % jehlic) byla zjištěna na čtyřech lokalitách. Mezi proveniencemi nebyly zjištěny téměř žádné rozdíly v míře infekce, ale pouze rozdíly v intenzitě infekce na jehlicích minulého ročníku (HOOD et KIMBERLEY, 2005, KIMBERLEY et al., 2011). Navíc je prokázáno, že v jejich místních podmínkách se jednalo o nejvýznamnější primární škodlivý činitel douglasky. Současně byl potvrzen značný význam klimatických faktorů pro šíření sypavek a pozitivní korelaci mezi sypavkami a redukcí růstu. Za dobu s největším poklesem přírůstkem douglasky (tj. v době maximálního infekčního tlaku) určili období 8-15 let od počátku infekce.

V současné době není známa žádná provenience, která by byla zcela odolná vůči sypavkám (HOOD et al., 1990; BASTIEN et al., 2013), navíc je velice obtížné najít primární příčinu jejich šíření. Jednou z nich může být změna klimatu, která vede k oslabení hostitele a následnému rozvoji infekce, jako například v pobřežní oblasti Oregonu, kde se oba patogeny katastroficky podepsali na zdravotním stavu více než 120 000 ha porostů (HANSEN et al., 2000). Příčinou takto masivního šíření byl zřejmě nevhodně zvolený původ proveniencí z vyšších nadmořských výšek a porostů s nižší přirozenou odolností vůči patogenu (pravděpodobně částečně z vnitrozemí). Kromě významného vlivu sypavek je potřeba počítat i s rizikem fyziologického sucha a nízké dostupnosti vláhy, což představuje již v současné době hlavní hrozbu pro lesní ekosystémy. Tyto jevy nejsou na první pohled patrné, ale může docházet k výraznému snížení přírůstu, který je s ohledem na hospodářské využití dřevin nežádoucí (LAVENDER et HERMANN, 2014). Očekává se, že vlivem změny klimatu ve střední Evropě pravděpodobně dojde ke zvýšení průměrné teploty spolu s kolísáním a snížením ročních srážek (REYER et al., 2010; VITALI et al., 2017). I proto by mohly mít vnitrozemské provenience vyšší uplatnitelnost i přes své nižší produkční schopnosti a nižší odolnost proti sypavkám (BASTIEN et al., 2013). Je nezbytné při výběru zohlednit relativně vysokou odolnost a zároveň vynikající produkční

schopnosti. Z výzkumné plochy Hůrky lze v tomto ohledu vyzdvihnout zejména provenience 1069 North Bend a 1089 Cathlamet. Jako vhodné se jeví i pozitivně hodnocené proveniencí 1061, 1069, 1075 a 1089 z předchozího šetření (KŠÍR et al., 2015).

Dřívější výzkumy potvrzují nevhodnost introdukce *P. m. var. glauca* do středoevropských podmínek kvůli její nižší produkční schopnosti a vysoké náchylnosti k sypavkám (SCHMID et al., 2014). Zatímco pobřežní provenience byly ve většině výzkumných pokusů IUFRO hodnoceny pozitivně, výsledky z České republiky jsou poněkud méně optimistické. Důvodem je nepříznivý vliv zdejších jarních mrazů a fyziologického sucha u mladých douglasek (MALMQVIST et al., 2018). Kromě výběru vhodné provenience je nutné v porostech využít opatření lesopěstebního charakteru, a to odstranění nejvíce postižených jedinců. Tím se zlepší mikroklimatické podmínky, díky kterým budou zdravý jedinci ještě více prosperovat.

7. Závěr

Změna klimatu v Evropě již má významný vliv na interakce mezi rostlinou a patogenem. To představuje jednu z největších výzev pro ekologickou a funkční stabilitu lesů v Evropě v příštích letech. S ohledem na významné disturbance v posledním desetiletí je častým tématem náhrada smrku ztepilého introdukovanými dřevinami. U potencionálně vhodné dřeviny douglasky tisolisté se z důvodu zvětšujícího se areálu rozšíření a zároveň zmenšení vzdálenosti mezi dříve rozptýlenými porosty zvyšuje riziko, které představují sypavky pro středoevropské douglaskové porosty.

Mezinárodní plocha Hůrky, kde byl proveden provenienční výzkum této dřeviny je přímým důkazem. Během hodnocení byl potvrzen výskyt patogenů z rodu *Rhabdocline* a *Nothophaeocryptopus*. Zjištěná defoliace poukazuje na zhoršený zdravotní stav, a navíc úzce koreluje s objemem kmene, který u nejvíce defoliováných jedinců jen výjimečně dosáhl 1 m³. Zřejmý je nepřímo úměrný vztah mezi defoliací a průměrným přírůstem. Z hodnocených proveniencí je vhodné i z důvodu téměř nulového napadení patogenem využívat ty z oblastí Washingtonu - 1061 Louella, 1069 North Bend, 1075 Enumclaw a 1089 Cathlamet. Navíc při porovnání s předchozím hodnocením z roku 2011 vykazují

všechny provenience dobrý zdravotní stav. Jejich pěstování je možné doporučit v místech s podobnými klimatickými a půdními podmínkami jako ve zkoumané oblasti. Naopak za nevhodné lze považovat provenience 1010 Barrière, 1021 D'Arcy a 1067 Skykomish a standard IUFRO 1078, které vykazují nejen nižší přírůst, ale také horší zdravotní stav. Oproti hodnocení z roku 2011 by k těmto proveniencím měla být zařazena i 1036 Albèrni, jejíž současný zdravotní stav je výrazně horší.

U další z introdukovaných dřevin, smrku pichlavého, došlo k výrazné redukci plochy vlivem invazního patogenu kloubnatky smrkové. V letech 2009-2015 nebyl při hodnocení v Krušných horách u smrku pichlavého zaznamenán ani jeden zcela zdravý jedinec. Naopak u smrku ztepilého došlo k masivnímu šíření až po roce 2015. Přestože nejvyšší míra napadení smrku ztepilého byla zjištěna ve středně starých porostech (31-60 let), trend postupujícího nárůstu napadení byl nejvýraznější u starých jedinců (61 a více let). Jeho projev byl patrný zvýšením počtu poškozených jedinců v kategoriích 1 a 2, a to především v letech 2019 a 2020. Stanovení zakmenění je složitější, ale i přesto mělo při míře napadení svou roli. Při plném (10) a nejrozvolněnějším (<6) bylo zaznamenáno nižší napadení než v případě průměrného zakmenění (8). Intenzita napadení u zakmenění se navíc lišila i ve věkových kategoriích, kdy u mladých porostů bylo napadení nejvyšší u průměrného zakmenění, u středně starých u nejvyššího zakmenění a u starých u nejnižšího. Určitou obavu představovalo i rozšíření patogenu v letech 2018 a 2019 na smrku ztepilém v oblasti Jizerských hor a Krkonoš. Ze všech výsledků a zjištění je patrné, že hlavním důvodem chřadnutí a šíření patogenu byl nejspíše komplexní soubor příčin a faktorů, včetně nevhodných půdních podmínek (nízké pH a pro horské ekosystémy typický nízký obsah živin, např. draslíku).

Kvalitní a dostatečně rozvinutá mykorhiza zvyšuje odolnost stromů vůči působení patogenů i těžkých kovů a zajišťuje jim konkurenční výhodu ve využívání lesních půd chudých na živiny. Na základě výsledků předložené práce představuje trehalóza, kterou jsou mykorhizní houby schopné tvořit, vhodný ukazatel zdravotního stavu stromů a to proto, že u zdravých jedinců byla zjištěná hodnota významně vyšší než v případě silně infikovaných jedinců v kategorii napadení 3 a 4. Klíčovými faktory pro přesnou kvantifikaci ve vzorcích

ektomykorhizních kořenů je rychlý a dostatečný odběr materiálu, okamžité zchlazení vzorku v kapalném dusíku, vhodné skladování a lyofilizace.

I s ohledem na obtížnou predikci klimatických výkyvů a vývoj půdních podmínek v lesních oblastech v delším časovém horizontu je nezbytné volit pečlivě dřevinnou skladbu. Introdukované dřeviny je potřeba i nadále zkoumat a řešit jejich citlivost vůči klimatickým výkyvům. Důležité je přihlížet k velké citlivosti dřevin vůči nedostatečnému množství srážek v případě smrku pichlavého či ztepilého nebo některých proveniencí douglasky. Předvídání dalšího šíření či napadení lesních ekosystémů patogeny ve vztahu ke klimatickým faktorům je velice obtížné, jelikož tato problematika nebyla dostatečně popsána ani kvantifikována. Je ale zřejmé, že pokud dojde k vytvoření ideálních podmínek pro rozvoj a fruktifikaci patogenů, mohlo by dojít k rozpadu i dalších porostů, jako v případě smrku pichlavého pod infekčním tlakem kloubnatky smrkové v Krušných horách. Je proto vhodné i nadále pokračovat v monitoringu zkoumaných patogenů v zájmových oblastech.

Nedostatečné srážky a zejména sucho vedoucí k jarním a letním přísuškům by do budoucna mohlo představovat velké riziko v součinnosti s dřevokaznými houbami (GÁPER et al., 2014) a kořenovými hnilobami zejména rodem *Armillaria*, který v kombinaci s rody *Stereum* a *Heterobasidion*, již dnes představuje velké riziko při pěstování dřevin v podhorských oblastech např. na bývalých zemědělských půdách. Připočteme-li k tomu fakt, že vedle nich je v České republice ve významné kalamitě nebývalých rozměrů i kambioxylofágní hmyz, zejména kůrovci (*Ips typographus* (L.), *Pityogenes chalcographus* (L.)), který přesně reprezentuje možné problémy se sekundárními činiteli, tak nezbyvá než doufat, že v blízké budoucnosti nebudeme obdobné problémy řešit i u dřevin, kterou jsou pěstovány na vhodných stanovištích.

8. Seznam literatury a použitých zdrojů

ALFORD, D. V. ed., 2000. Pest and Disease Management Handbook. Oxford, UK: Blackwell. ISBN: 978-0-470-68019-3

ARNOLDS, E. E. F., 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 35(2-3), 209-244. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(91\)90052-Y](https://doi.org/10.1016/0167-8809(91)90052-Y)

BACIAK, M., WARMIŃSKI, K., BĘŚ, A., 2015. The effect of selected gaseous air pollutants on woody plants. *Leśne Prace Badawcze*, 76, 4, 401–409, <https://doi.org/10.1515/frp-2015-0039>

BALLA, A., SILINI, A., CHERIF-SILINI, H., CHENARI BOUKET, A., MOSER, W. K., NOWAKOWSKA, J. A., BELBAHRI, L., 2021. The threat of pests and pathogens and the potential for biological control in forest ecosystems. *Forests*, 12(11), 1579. <https://doi.org/10.3390/f12111579>

BASTIEN, J.-C., SANCHEZ, L., MICHAUD, D., 2013. Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). In: *Forest Tree Breeding in Europe*. Springer Netherlands. 325-369. ISBN: 978-94-007-6146-9

BEBBER, D. P., WATKINSON, S. C., BODDY, L., DARRAH, P. R., 2011. Simulated nitrogen deposition affects wood decomposition by cord-forming fungi. *Oecologia*, 167(4), 1177-1184. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2057-2>

BEBBER, D. P., 2015. Range-expanding pests and pathogens in a warming world. *Annu. Rev. Phytopathol*, 53(1), 335-356. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120207>

BERAN, F., 1995. Dosavadní výsledky provenienčního výzkumu douglasky tisolisté v ČR. *Zprávy lesnického výzkumu*, 40.3-4: s. 7-13.

BERAN, F., 2014. Douglaska tisolistá v ČR – Biologie, genetika, provenienční výzkum. In *Pěstební postupy při zavádění douglasky do porostních směsí v podmínkách ČR*. Lesnická práce, 22-47. ISBN 978-80-7458-065-9

BERG, B., LASKOWSKI, R., 2006. Litter decomposition: guide to carbon and nutrient turnover. Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(05\)38001-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(05)38001-9)

BOLTE, A., AMMER, C., LÖF, M., MADSEN, P., NABUURS, G. J., SCHALL, P., ... ROCK, J., 2009. Adaptive forest management in central Europe: climate change impacts, strategies and integrative concept. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 24(6), 473-482. <https://doi.org/10.1080/02827580903418224>

BONAN, G. B., 2008. Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *science*, 320(5882), 1444-1449. <https://doi.org/10.1126/science.1155121>

BORTHWICK, A.W., 1909. A new disease of *Picea*. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh, 4, 259–261.

BRANG, P., SPATHELF, P., LARSEN, J. B., BAUHUS, J., BONCČINA, A., CHAUVIN, C., SVOBODA, M.. 2014. Suitability of close-to-nature silviculture for adapting temperate European forests to climate change. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 87(4), 492-503. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpu018>

BRASIER, C.M., 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annales des sciences forestières*, 53, 347-358, <https://doi.org/10.1051/forest:19960217>

BRASIER, C.M., KIRK, S.A., 2010. Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. *Plant Pathol.* 59, 186-199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02157.x>

BRIGHT, C., 1999. Invasive species: pathogens of globalization. *Foreign Policy*, 50-64. <https://doi.org/10.2307/1149643>

BROOKS, M. E., KRISTENSEN K., BENTHEM, K., MAGNUSSON, A., BERG, C.W., NIELSEN, A., SKAUG, H.J., MÄCHLER, M., BOLKER, B.M., 2017. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal*, 378-400, doi:10.32614/RJ-2017-066

BRYNER SF, PROSPERO S, RIGLING D., 2014. Dynamics of *Cryphonectria hypovirus* infection in chestnut blight cankers. *Phytopathology* 104, 918–1025. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-13-0069-R>

BURAS, A., MENZEL, A., 2019. Projecting tree species composition changes of European forests for 2061–2090 under RCP 4.5 and RCP 8.5 scenarios. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1986. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01986>

BURGER, S.V., 2018. *Introduction to Machine Learning with R – rigorous mathematical modelling*. O'Reilly, USA, 226 s. ISBN 978-1491976449.

BUROKIENE D, PROSPERO S, JUNG E et al., 2015. Genetic population structure of the invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its expanding range. *Biological Invasions* 17, 2743–56. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0911-6>

BUTIN, H., 1995. *Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity trees*. Oxford University Press, New York, Tokyo, 252 s. ISBN 9780198549321

BYTNEROWICZ, A., 1996. Physiological aspects of air pollution stress in forests. *Phyton Horn, Austria*, 36. 15–22, ISSN: 0079-2047

CAMARGO, J. L., KAPOV, V., 1995. Complex edge effects on soil moisture and microclimate in central Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology*, 11(2), 205-221. DOI: <https://doi.org/10.1017/S026646740000866X>

CANADELL, J. G., RAUPACH, M. R., 2008. Managing forests for climate change mitigation. *science*, 320(5882), 1456-1457. <https://doi.org/10.1126/science.1155458>

CASTELLO, J. D., LEOPOLD, D. J., & SMALLIDGE, P. J., 1995. Pathogens, patterns, and processes in forest ecosystems. *Bioscience*, 45(1), 16-24. <https://doi.org/10.2307/1312531>

CATAL, M., ADAMS, G. C., FULBRIGHT, D. W., 2010. Evaluation of Resistance to Rhabdocone Needlecast in Douglas Fir Variety Shuswap, with Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 100.4: 337-344. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-4-0337>

CLOSE, R.C., MOAR, N.T., TOMLINSON, A.I. et al., 1978. Aerial dispersal of biological material from Australia to New Zealand. *Int J Biometeorol* 22, 1–19. <https://doi.org/10.1007/BF01553136>

COETZEE, M. P., WINGFIELD, B. D., & WINGFIELD, M. J., 2018. Armillaria root-rot pathogens: species boundaries and global distribution. *Pathogens*, 7(4), 83. <https://doi.org/10.3390/pathogens7040083>

CRAWLEY, M., 2013. *The R Book*, 2st. ed. John Wiley & Sons. New York, USA, 1051 p. ISBN 978-0-470-97392-9.

CROCKATT, M. E., 2012. Are there edge effects on forest fungi and if so do they matter?. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.002>

CRUICKSHANK, M. G., STURROCK, R. N., PELLOW, K. W., LEAL, I., 2020. Resistance and tolerance of Douglas-fir seedlings to inoculation with the fungal root pathogen *Coniferiporia sulphurascens*. *Forest Pathology*, 50(6), e12651. <https://doi.org/10.1111/efp.12651>

ČERNÝ, K., GREGOROVÁ, B., STRNADOVÁ, V., HOLUB, V., TOMSOVSKY, M., & CERVENKA, M., 2008. *Phytophthora alni* causing decline of black and grey alders in the Czech Republic. *Plant Pathology*, 57(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01718.x>

ČERNÝ, K., PEŠKOVÁ, V., SOUKUP, F., HAVRDOVÁ, L., STRNADOVÁ, V., ZAHRADNÍK, D., HRABĚTOVÁ, M., 2016a. *Gemmamyces* bud blight of *Picea pungens*: a sudden disease outbreak in Central Europe. *Plant Pathology*, British Society for Plant Pathology, 12. <https://doi.org/10.1111/ppa.12513>

ČERNÝ K., HEJNÁ M., KOLÁŘOVÁ Z., MRÁZKOVÁ M., ROMPORTL D. 2016b. An overview of selected alien invasive fungal pathogens of woody plants in the Czech Republic, 7. https://www.vukoz.cz/dokumenty/056/invazni_druhy-kveten_16.pdf

DE FRENNE, P., LENOIR, J., LUOTO, M., SCHEFFERS, B. R., ZELLWEGER, F., AALTO, J., HYLANDER, K., 2021. Forest microclimates and climate change: Importance, drivers and future research agenda. *Global Change Biology*, 27(11), 2279-2297. <https://doi.org/10.1111/gcb.15569>

DE SCHRIJVER, A., DEVLAEINCK, R., MERTENS, J., WUYTS, K., HERMY, M., VERHEYEN, K., 2007. On the importance of incorporating forest edge deposition

for evaluating exceedance of critical pollutant loads. *Applied Vegetation Science*, 10(2), 293-298. <https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2007.tb00529.x>

DEFLORIO, G., JOHNSON, C., FINK, S., SCHWARZE, F. W. M. R., 2008. Decay development in living sapwood of coniferous and deciduous trees inoculated with six wood decay fungi. *Forest Ecology and Management*, 255(7), 2373-2383. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.12.040>

DESMAZIÈRES J. B. H. J., 1850. *Plantes Cryptogames du Nord de La France*. 1st edn. Fasc. 41. Lille: Desmazières.

DESPREZ-LOUSTAU, M. L., MARÇAIS, B., NAGELEISEN, L. M., PIOUS, D., VANNINI, A., 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of forest science*, 63(6), 597-612. <https://doi.org/10.1051/forest:2006040>

DÍAZ-YÁÑEZ, O., MOLA-YUDEGO, B., TIMMERMANN, V., TOLLEFSRUD, M. M., HIETALA, A. M., & OLIVA, J., 2020. The invasive forest pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* boosts mortality and triggers niche replacement of European ash (*Fraxinus excelsior*). *Scientific reports*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61990-4>

DRENKHAN, R., TOMEŠOVÁ-HAATAJA, V., FRASER, S., BRADSHAW, R. E., VAHALÍK, P., MULLETT, M. S., ... BARNES, I., 2016. Global geographic distribution and host range of *Dothistroma* species: a comprehensive review. *Forest Pathology*, 46(5), 408-442. <https://doi.org/10.1111/efp.12290>

EDWARDS, M. V., 1956. The design, layout and control of provenance experiments. *Silvae Genetica*, 5, 169-181. https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae_Genetica/1956/Vol._5_Heft_5-6/05_5-6_169.pdf

EICHHORN J, ROSKAMS P, FERRETTI M, MUES V, SZEPESI A, DURRANT D., 2010. Visual assessment of crown condition and damaging agents. Manual Part IV. In: "Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests". UNECE-ICP Forests Programme Co-ordinating Centre, Hamburg, Germany, 49.

EILMANN, B., DE VRIES, S. M. G., DEN OUDEN, J., MOHREN, G. M. J., SAUREN, P., SASS-KLAASSEN, U., 2013. Origin matters! Difference in drought tolerance and

productivity of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)) provenances. *Forest Ecology and Management*, 302: s. 133-143. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.03.031>

ENNOS, R. A., 2015. Resilience of forests to pathogens: an evolutionary ecology perspective. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 88(1), 41-52. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpu048>

ERIKSSON, M., NEUVONEN, S., ROININEN, H., 2007. Retention of wind-felled trees and the risk of consequential tree mortality by the European spruce bark beetle *Ips typographus* in Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 22(6), 516-523. <https://doi.org/10.1080/02827580701800466>

FARJON, A., 2010. *A Handbook of the World's Conifers*. Koninklijke Brill, Leiden. ISBN: 978-90-04-17718-5

FARJON, A., 2017. *Picea abies*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T42318A71233492. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T42318A71233492.en>. Downloaded on 27 September 2021.

FEIGE, G. B., ALE-AGHA, N., JENSEN, M., CHRISTIAANS, B., KRICKE, R., 2004. New, rare or remarkable microfungi in the Italian Alps (Carnic Alps)--part I--ascomycotina. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 69, 4, 457–465,

FERNANDEZ, O., BÉTHENCOURT, L., QUERO, A., SANGWAN, R. S., CLÉMENT, C., 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in plant science*, 15(7), 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.004>

FIALA, P., REININGER, D., SAMEK, T., 2017. Chemismus půdního prostředí a jehlic smrku ztepilého (*Picea abies*/L./Karst.) ve vápněných a kontrolních porostech Krušných hor. *Zprávy lesnického výzkumu*, 62, 1, 23-32,

FUHRER, J., 1985. Formation of secondary air pollutants and their occurrence in Europe. *Experientia*, 41, 286–301, <https://doi.org/10.1007/BF02004489>

FUNK, A., SUTTON, B. C., 1972. A disease of conifer buds in western Canada associated with *Dichomera gemmicola* n. sp. *Canadian Journal of Botany*, 50, 7, 1513–1518, <https://doi.org/10.1139/b72-187>

GÁPER, J., MIHÁL, I. 2008. Ectomycorrhizal potential and rot in man-made spruce forests. Journal of Faculty of Ecology and Environmental Sciences Technical University in Zvolen.

GÁPER, J., SLIACKA, I., HVOLKOVÁ, L. 2014. Diversity and ecology of polypores in urban vegetation of northern, central and southern Slovakia. Folia Oecologica, 41(1), 17.

GARBELOTTO, M., HAYDEN, K. J., 2012. Sudden oak death: interactions of the exotic oomycete *Phytophthora ramorum* with naïve North American hosts. Eukaryotic Cell, 11(11), 1313-1323. <https://doi.org/10.1128/EC.00195-12>

GARBELOTTO, M., LIONE, G., MARTINIUC, A.V., GONTHIER, P., 2022. The alien invasive forest pathogen *Heterobasidion irregulare* is replacing the native *Heterobasidion annosum*. Biol Invasions. <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02775-w>

GEORGIEVA, M., 2009. Diseases on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) and their influence on the species introduction in Bulgaria. PhD Thesis. Ph. D. Thesis.] Sofia, Forest Research Institute–BAS: 134 s..(in Bulgarian).

GERNANDT, D. S., CAMACHO, F. H., STONE, J. K., 1997. *Meria laricis*, an Anamorph of *Rhabdocline*. Mycologia, Vol. 89, No. 5: 735-746. <https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026840>

GHELARDINI, L., LUCHI, N., PECORI, F., PEPORI, A. L., DANTI, R., DELLA ROCCA, G., SANTINI, A., 2017. Ecology of invasive forest pathogens. Biological Invasions, 19(11), 3183-3200. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1487-0>

GÓMEZ-GALLEGO, M., BADER, M. K. F., SCOTT, P. M., LEUZINGER, S., WILLIAMS, N. M., 2017. *Phytophthora pluvialis* studies on Douglas-fir require Swiss needle cast suppression. Plant Disease, 101(7), 1259-1262. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1738-RE>

GREGORY, P. H., 1973: The Microbiology of the Atmosphere, 2nd Ed. Leonard Hill London. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7291>

GRODZKI, W., GAŚSIENICA FRONEK, W., 2019. The European spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) in wind-damaged stands of the eastern part of the Tatra

National Park—the population dynamics pattern remains constant. <https://doi.org/10.2478/ffp-2019-0017>

GROSDIDIER, M., IOOS, R., MARCAIS, B., 2018. Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France? *Forest Pathology*, Volume 48 (4), 124–126. <https://doi.org/10.1111/efp.12426>

GRÜNWARD, N. J., GARBELOTTO, M., GOSS, E. M., HEUNGENS, K., PROSPERO, S., 2012. Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends in microbiology*, 20(3), 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.12.006>

GRYNDLER, M., BALÁŽ, M., HRŠELOVÁ, H., JANSÁ, J., VOSÁTKA, M. 2004. Mykorhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin.

GRYNDLER, M., HRŠELOVÁ, H., CAJTHAML, T., HAVRÁNKOVÁ, M., ŘEZÁČOVÁ, V., GRYNDLEROVÁ, H., LARSEN, J. 2009. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza*, 19(4), 255-266.

GUILLAUMIN, J. J., MOHAMMED, C., ANSEMI, N., COURTECUISSÉ, R., GREGORY, S. C., HOLDENRIEDER, O., VAN DAM, B., 1993. Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe. *European Journal of Forest Pathology*, 23(6-7), 321-341. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1993.tb00814.x>

HADAŠ, P., 2002. Stav imisí a depozicí v přírodní lesní oblasti Krušných hor. *Lesnická práce*, 81, 11,

HAMPP, R., SCHAEFFER, C., WALLENDÁ, T., STÜLTEN, C., JOHANN, P., EINIG, W., 1995. Changes in carbon partitioning or allocation due to ectomycorrhiza formation: biochemical evidence. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 548-556. <https://doi.org/10.1139/b95-295>

HANSEN, E., DELATOUR, C., 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Ann. For. Sci.* 56, 539-547, <https://doi.org/10.1051/forest:19990702>

HANSEN, E. M., STONE, J. K., CAPITANO, B. R., ROSSO, P., SUTTON, W., WINTON, L., 2000. Incidence and Impact of Swiss Needle Cast in Forest Plantations of

Douglas-fir in Coastal Oregon. *Plant Disease*, 84.7: s. 773-778.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.7.773>

HANSSON, P., 1998a. *Gremmeniella abietina* in northern Sweden: Silvicultural aspects of disease development in the introduced *Pinus contorta* and in *Pinus sylvestris*. Management of *Pinus sylvestris* Stands Infected by *Gremmeniella abietina*, Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, 40, ISSN: 1401-6230

HANSSON, P., 1998b. Susceptibility of different provenances of *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* and *Picea abies* to *Gremmeniella abietina*. *European Journal of Forest Pathology*, 28, 1, 21–32, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1998.tb01162.x>

HASELHOFF, E., LINDAU, G., 1903. Die Beschädigung der Vegetation durch Rauch. Leipzig, 412, <https://doi.org/10.5962/bhl.title.54099>

HAVRDOVÁ, L., NOVOTNÁ, K., ZAHRADNÍK, D., BURIÁNEK, V., PEŠKOVÁ, V., ŠRŮTKA, P., ČERNÝ, K., 2016. Differences in susceptibility to ash dieback in Czech provenances of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, Volume 46 (4), 281–288.
<https://doi.org/10.1111/efp.12265>

HEITHECKER, T. D., HALPERN, C. B., 2007. Edge-related gradients in microclimate in forest aggregates following structural retention harvests in western Washington. *Forest Ecology and Management*, 248(3), 163-173.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.05.003>

HELPER, S., 2014. Rust fungi and global change. *New Phytologist*, 201(3), 770-780. <https://doi.org/10.1111/nph.12570>

HENGEVELD, R., 1989. *Dynamics of Biological Invasions*, Chapman & Hall: London, UK.

HESSBURG, P. F., HANSEN, E. M., 2000. Infection of Douglas-fir by *Leptographium wageneri*. *Canadian Journal of Botany*, 78(10), 1254-1261.
<https://doi.org/10.1139/b00-097>

HLÁSNY, T., ZIMOVÁ, S., MERGANIČOVÁ, K., ŠTĚPÁNEK, P., MODLINGER, R., TURČÁNI, M., 2021. Devastating outbreak of bark beetles in the Czech Republic:

Drivers, impacts, and management implications. *Forest Ecology and Management*, 490, 119075. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119075>

HÖGBERG, M. N., HÖGBERG, P., MYROLD, D. D., 2007. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three?. *Oecologia*, 150(4), 590-601. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0562-5>

HOLAH, C. J., WILSON, V. M., HANSEN, M. E., 1997. Impacts of a native root-rotting pathogen on successional development of old-growth Douglas fir forests. *Oecologia*, 111: s. 429-433. <https://doi.org/10.1007/s004420050255>

HONG, C. X., MOORMAN, G. W., 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(3), 189-208. <https://doi.org/10.1080/07352680591005838>

HOOD, I. A., 1982. *Phaeocryptopus gaeumannii* on *Pseudotsuga menziesii* in southern British Columbia. *NZJ For. Sci*, 12, 415–24.

HOOD, I.A., SANDBERG, C.J., BARR, C.W., HOLLOWAY, W.A., BRADBURY, P.M., 1990. Changes in needle retention associated with the spread and establishment of *Phaeocryptopus gaeumannii* in planted Douglas-fir. *Eur. J. For. Path.*, 20: s. 418–429. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1990.tb01157.x>

HOOD, I. A., KIMBERLEY, M. O., 2005. Douglas fir provenance susceptibility to Swiss needle cast in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 34.1: 57-62. <https://doi.org/10.1071/AP04080>

HU, Y., CHEN, B., 2020. Arbuscular mycorrhiza induced putrescine degradation into γ -aminobutyric acid, malic acid accumulation, and improvement of nitrogen assimilation in roots of water-stressed maize plants. *Mycorrhiza*, 30(2), 329-339. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00952-0>

CHANDELIER, A., HELSON, M., DVORAK, M., GISCHER, F., 2014. Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays. *Plant pathology*, 63, 6, 1296–1305, <https://doi.org/10.1111/ppa.12218>

ISIDOROV, V. A., LECH, P., ŻÓŁCIAK, A., RUSAK, M., & SZCZEPANIAK, L., 2008. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of metabolites from the

needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. *Trees*, 22(4), 531-542. <https://doi.org/10.1007/s00468-008-0213-z>

JACTEL, H., NICOLL, B. C., BRANCO, M., GONZALEZ-OLABARRIA, J. R., GRODZKI, W., LÄNGSTRÖM, B., VODDE, F., 2009. The influences of forest stand management on biotic and abiotic risks of damage. *Annals of Forest Science*, 66(7), 701-701. <https://doi.org/10.1051/forest/2009054>

JAKLITSCH, W. M., VOGLMAYR, H., 2017. Three former taxa of *Cucurbitaria* and considerations on *Petrakia* in the *Melanommataceae*. *Sydowia*, 69, 81. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia69-2017-0081>

JARZYNA, K., 2021. Climatic hazards for native tree species in Poland with special regards to silver fir (*Abies alba* Mill.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Climatology*, 144(1), 581-591. <https://doi.org/10.1007/s00704-021-03550-y>

JEFFERS, S. N., MARTIN, S. B., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant disease*, 70(11), 1038-1043. ISSN: 0191-2917

JÖNSSON, A.M., SCHROEDER, L.M., LAGERGREN, F., ANDERBRANT, O., SMITH, B., 2012. Guess the impact of *Ips typographus*-An ecosystem modelling approach for simulating spruce bark beetle outbreaks. *Agricultural and Forest Meteorology* 166–167, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.07.012>

JUNG, T., BLASCHKE, H., OBWALD, W., 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathol.* 49, 706-718, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1996.tb00846.x>

JUNG, T., PÉREZ-SIERRA, A., DURÁN, A., HORTA JUNG, M., BALCI, Y., SCANU, B., 2018. Canker and decline diseases caused by soil – and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia*, 40, 182–220, <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.08>

JUNG, T., HORTA JUNG, M., WEBBER, J. F., KAGEYAMA, K., HIENO, A., MASUYA, H., ... BRASIER, C. M., 2021. The destructive tree pathogen *Phytophthora ramorum*

originates from the laurosilva forests of East Asia. *Journal of Fungi*, 7(3), 226. <https://doi.org/10.3390/jof7030226>

JÜRISOO, L., ADAMSON, K., PADARI, A., & DRENKHAN, R., 2019. Health of elms and Dutch elm disease in Estonia. *European Journal of Plant Pathology*, 154(3), 823-841. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01707-0>

KANDLER, O., INNES, J.L., 1995. Air pollution and forest decline in Central Europe. *Environmental pollution*, 90, 171–180, [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00006-D](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00006-D)

KIMBERLEY, M. O., HOOD, I. A., KNOWLES, R. L., 2011. Impact of Swiss needle-cast on growth of Douglas-fir. *Phytopathology*, 101.5: s. 583-593. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-10-0129>

KINT, V., AERTSEN, W., CAMPIOLI, M., VANSTEENKISTE, D., DELCLOO, A., MUYS, B., 2012. Radial growth change of temperate tree species in response to altered regional climate and air quality in the period 1901–2008. *Climatic Change*, 115, 343–363. <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-012-0465-x>.

KISER, J., MORRELL, J. J., FILIP, G., 2011. Fungal colonization of coastal Douglas-fir following mechanical commercial thinning damage. *Forest Pathology*, 41(4), 317-324. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00675.x>

KJØLLER, R., NILSSON, L. O., HANSEN, K., SCHMIDT, I. K., VESTERDAL, L., & GUNDERSEN, P., 2012. Dramatic changes in ectomycorrhizal community composition, root tip abundance and mycelial production along a stand-scale nitrogen deposition gradient. *New phytologist*, 194(1), 278-286. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04041.x>

KOCH, J., THOMSEN, I. M., 2003. *Serpula himantioides*, *Heterobasidion annosum* and *Calocera viscosa* as butt rot fungi in a Danish Douglas-fir stand. *Forest Pathology*, 33: s. 1-6. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2003.00302.x>

KOLSTRÖM, M., LINDNER, M., VILÉN, T., MAROSCHEK, M., SEIDL, R., LEXER, M.J., NETHERER, S., KREMER, A., DELZON, S., BARBATI, A., MARCHETTI, M., CORONA, P., 2011. Reviewing the Science and Implementation of Climate Change Adaptation Measures in European Forestry. *Forests* 2, 961–982. <https://doi.org/10.3390/f2040961>

KÖHL, M., HILDEBRANDT, R., OLSCHOFKSY, K., KÖHLER, R., RÖTZER, T., METTE, ... T., KENTER, B., 2010. Combating the effects of climatic change on forests by mitigation strategies. *Carbon balance and management*, 5(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1750-0680-5-8>

KONŠEL, J., 1931. *Stručný nástin tvorby a pěstění lesů v biologickém ponětí*, 1st ed., Matice lesnická: Písek, Czechoslovakia, 552.

KÖCK, G., 1918. Ein für Österreich neuer Schädling auf *Picea pungens*. *Österreichische Gartenzeitung*, 13, 147–48.

KOHLER, M., SOHN, J., NÄGELE, G., BAUHUS, J., 2010. Can drought tolerance of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) be increased through thinning?. *European Journal of Forest Research*, 129(6), 1109-1118. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0397-9>

KOLEJKA, J., KLIMÁNEK, M., MIKITA, T., SVOBODA, J., 2010. Polomy na Šumavě způsobené orkánem Kyrill a spoluúčast reliéfu na poškození lesa. *Geomorphologica Slovaca et Bohemica*, 2, 16-28. ISSN 1337-6799

KOLMER, J. A., ORDONEZ, M. E., & GROTH, J. V., 2009. The rust fungi. *eLS*, 8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021264>

KORHONEN, K., STENLID, J., 1998. Biology of *Heterobasidion annosum*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hütermann, A. (eds.). *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. CAB International, Wallingford, UK, 43–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.0366b.x>

KOZŁOWSKI, T. T., KRAMER, P. J., PALLARDY, S. G., 1990. *The physiological ecology of woody plants*. Academic press, 678, ISBN: 978-0-12-424160-2

KRAUSE, G. H. M., ARNDT, U., BRANDT, C. J., BUCHER, J., KENK, G., & MATZNER, E., 1986. Forest decline in Europe, Development and possible causes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 31(3), 647-668. <https://doi.org/10.1007/BF00284218>

KŘIVÁNEK, M., PYŠEK, P., JAROŠÍK, V., 2006. Planting history and propagule pressure as predictors of invasion by woody species in a temperate region. *Conservation Biology*, 20(5), 1487-1498. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00477.x>

KŠÍR, J., BERAN, F., PODRÁZSKÝ, V., NOVOTNÝ, P., DOSTÁL, J., KUBEČEK, J., 2015. Výsledky hodnocení mezinárodní provenienční plochy s douglaskou tisolistou (*Pseudotsuga menziesii* /Mirb./ Franco) na lokalitě Hůrky v jižních Čechách ve věku 44 let. Zprávy lesnického výzkumu, 60 (2), 104-114. <https://doi.org/10.17221/9/2019-JFS>

KUBEČEK, J., ŠTEFANČÍK, I., PODRÁZSKÝ, V., LONGAUER, R., 2014. Výsledky výzkumu douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii* /Mirb./ Franco) v České republice a na Slovensku – přehled. Lesnícky časopis-Forestry Journal, 60 (2): 120–129.

KUBIAK, K., ŻÓŁCIAK, A., DAMSZEL, M., LECH, P., & SIEROTA, Z., 2017. Armillaria pathogenesis under climate changes. Forests, 8(4), 100. <https://doi.org/10.3390/f8040100>

KUBOTA, T., KAGAWA, A., ABE, T., & HOSODA, I., 2021. Effects of clear-cutting, meteorological, and physiological factors on evapotranspiration in the Kamabuchi experimental watershed in northern Japan. Hydrological Processes, 35(4), e14111. <https://doi.org/10.1002/hyp.14111>

KUNCA, A., LEONTOVYČ, R. 2005. Occurrence of Phytophthora spp. on forest trees in Slovakia. Phytophthora in nurseries and forest stands, Skierniewice, Poland, 2004, 41-45.

ŁAKOMY, P., IWAŃCZUK, M., 2010. Phaeocryptopus gaeumannii in douglas-fir stands in smolarz forest district. Phytopathologia, 58: 43-52.

LA PORTA, N., CAPRETTI, N., THOMSEN, I.M., KASANEN, R., HIETALA, A.M., VON WEISSENBERG, K., 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. Canadian Journal of Plant Pathology, Volume 30 (2), 177–195. <https://doi.org/10.1080/07060661.2008.10540534>.

LAVENDER, D.P., HERMANN, R.K., 2014. Douglas-fir. The genus *Pseudotsuga*. Corvallis, Oregon, Oregon State University, College of Forestry, Forest Research Laboratory, 352. ISBN 978-0-615-97995-3

LEBOLDUS, J. M., SONDRÉLI, K. L., SUTTON, W., REESER, P., NAVARRO, S., KANASKIE, A., & GRÜNWARD, N. J., 2018. First report of *Phytophthora ramorum*

lineage EU1 infecting Douglas fir and grand fir in Oregon. *Plant Disease*, 102(2), 455-455. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0681-PDN>

LEONTOVYČ, R., KUNCA, A. 2006. The role of fungal pathogens in the premature decay of Norway spruce stands in Slovakia. In *Current problems of forest protection in spruce stands under conversion. Papers from a scientific workshop held at Ustroń-Jaszowiec, Poland, 13-14 October, 2003* (79-84). Instytut Badawczy Leśnictwa (Forest Research Institute).

LIEBHOLD A.M., 2012. Forest pest management in a changing world. *International Journal of Pest Management* 58, 289–95. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.678405>

LINDNER, M., GARCIA-GONZALO, J., KOLSTRÖM, M., GREEN, T., REGUERA, R., MAROSCHEK, M., SEIDL, R., LEXER, M.J., NETHERER, S., SCHOPF, A., 2008. Impact of Climate Change of European Forests and Options for Adaptation. Report to the European Commission Directorate-General for Agriculture and Rural Development. 173 pp. K dispozíci na: <https://hal.inrae.fr/hal-02821804/document>.

LINDROTH, A., LAGERGREN, F., GRELE, A., KLEMEDTSSON, L., LANGVALL, O., WESLIEN, P., TUULIK, J., 2009. Storms can cause Europe-wide reduction in forest carbon sink. *Global Change Biology* 15, 346–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01719.x>

LOMBARDERO, M. J., VÁZQUEZ-MEJUTO, P., AYRES, M. P., 2008. Role of plant enemies in the forestry of indigenous vs. nonindigenous pines. *Ecological Applications*, 18(5), 1171-1181. <https://doi.org/10.1890/07-1048.1>

LOMSKÝ, B., MATERNA, J., PFANZ, H., 2002. SO₂ – Pollution and Forests Decline in the Ore Mountains. 1st ed. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti : Jíloviště-Strnady? Czechia, 342, ISBN 80-86461-24-6

LONGAUEROVÁ, V., KUNCA, A., LONGAUER, R., MALOVÁ, M., LEONTOVYČ, R. 2017. The ash and ash dieback in Slovakia. *Dieback of European ash*, 209-219.

MAGUIRE, D. A., KANASKIE, A., VOELKER, W., JOHNSON, R., JOHNSON, G., 2002. Growth of young Douglas-fir plantations across a gradient in Swiss needle cast

severity. *Western Journal of Applied Forestry*, 17.2: s. 86-95. <https://doi.org/10.1093/wjaf/17.2.86>

MALMQVIST, C., WALLERTZ, K., & JOHANSSON, U., 2018. Survival, early growth and impact of damage by late-spring frost and winter desiccation on Douglas-fir seedlings in southern Sweden. *New forests*, 49(6), 723-736. <https://doi.org/10.1007/s11056-018-9635-7>

MORGENSTERN, K., DÖRING, M., KRABEL, D., 2013. Rhabdocline needle cast—investigations on various Douglas fir tissue types. *European journal of plant pathology*, 137.3: 495-504. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0261-0>

MORGENSTERN, K., POLSTER, J-U., KRABEL, D., 2016. Genetic variation between and within two populations of *Rhabdocline pseudotsugae* in Germany. *Canadian Journal of Forest Research*, 46.5: 716-724. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2015-0430>

MORGENSTERN, K., POLSTER, J. U., REICHE, B., SCHÜTZEL, P., HUTTER, I., KRABEL, D., 2020. Role of phytopathogenic fungi in forest plant breeding—Development of DNA-based quick tests for quality assurance in forest plant production. In *Environmental Sciences Proceedings* (Vol. 3, No. 1, 96). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/IECF2020-07898>

MORICCA, S., PANZAVOLTA, T., 2021. Recent Advances in the Monitoring, Assessment and Management of Forest Pathogens and Pests. *Forests*, 12(12), 1623. <https://doi.org/10.3390/f12121623>

MOSER, W. K., BARNARD, E. L., BILLINGS, R. F., CROCKER, S. J., DIX, M. E., GRAY, A. N., ... MCWILLIAMS, W. H., 2009. Impacts of nonnative invasive species on US forests and recommendations for policy and management. *Journal of Forestry*, 107(6), 320-327. <https://doi.org/10.1093/jof/107.6.320>

MCKINNEY L, NIELSEN L, COLLINGE D, THOMSEN I, HANSEN J, KJÆR E, 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long term solution. *Plant Pathology* 63, 485– 99. <https://doi.org/10.1111/ppa.12196>

MUSIL, I., HAMERNÍK, J., 2007. Jehličnaté dřeviny. Přehled nahosemenných i výtrusných dřevin. Lesnická dendrologie 1., Academia Praha, 352. ISBN 978-80-200-1567-9

Ministerstvo Zemědělství (MZe). 2021. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020. Ministerstvo zemědělství, 128. ISBN: 978-80-7434-625-5

NAUMOV, N. A., 1925. Mikologicheskie zametki. O neskol'kikh novykh ili maloizvestnykh vidakh. Bolezni Rast, 14, 137-149.

NETHERER, S., KANDASAMY, D., JIROSOVÁ, A., KALINOVÁ, B., SCHEBECK, M., SCHLYTER, F., 2021. Interactions among Norway spruce, the bark beetle *Ips typographus* and its fungal symbionts in times of drought. Journal of pest science, 94(3), 591-614. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01341-y>

NIEDERER, M., PANKOW, W., WIEMKEN, A., 1989. Trehalose synthesis in mycorrhiza of Norway spruce: an indicator of vitality. European Journal of Forest Pathology, 19(1), 14-20. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1989.tb00765.0078>

NOŽIČKA, J., 1963. Kouřové škody v našich lesích a boj proti nim do roku 1918. Práce VÚL ČSSR, 26, 237–258.

OGRIS, N., JURC, D., 2013. Tree diseases determined by the reporting, prognostic and diagnostic service for forests in Slovenia 1982–2012. Acta Silvae et Ligni, 102, 31–42, <https://doi.org/10.20315/ASetL.102.3>

OLIVA, J., STENLID, J., GRÖNKVIST-WICHMANN, L., WAHLSTRÖM, K., JONSSON, M., DROBYSHEV, I., STENSTRÖM, E., 2016. Pathogen-induced defoliation of *Pinus sylvestris* leads to tree decline and death from secondary biotic factors. Forest Ecology and Management, 379, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.08.011>

OLSON, Å., STENLID, J., 2022. Population dynamics of forest tree pathogens. In Forest Microbiology, 131-143. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85042-1.00041-0>

ORCUTT, D. M., NILSEN, E. T., 2000. Physiology of plants under stress: Soil and biotic factors (Vol. 2). John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-17008-2

OUDEMANS, P. V., 1999. Phytophthora species associated with cranberry root rot and surface irrigation water in New Jersey. *Plant Disease*, 83(3), 251-258. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.251>

ÖZÇELİK, M. S., TOMÁŠKOVÁ, I., SUROVÝ, P., & MODLINGER, R. 2022. Effect of Forest Edge Cutting on Transpiration Rate in *Picea abies* (L.) H. Karst. *Forests*, 13(8), 1238.

PAAP, T., WINGFIELD, M. J., BURGESS, T. I., WILSON, J. R., RICHARDSON, D. M., SANTINI, A., 2022. Invasion frameworks: a forest pathogen perspective. *Current Forestry Reports*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s40725-021-00157-4>

PANZAVOLTA, T., BRACALINI, M., BENIGNO, A., MORICCA, S., 2021. Alien invasive pathogens and pests harming trees, forests, and plantations: Pathways, global consequences and management. *Forests*, 12(10), 1364. <https://doi.org/10.3390/f12101364>

PAOLETTI, E., SCHAUB, M., MATYSSEK, R., WIESER, G., AUGUSTAITIS, A., BASTRUP-BIRK, A. M., BYTNEROWICZ, A., GÜNTHARDT-GOERG, M.S., MÜLLER-STARCK, G., SERENGIL, Y., 2010. Advances of air pollution science: from forest decline to multiple-stress effects on forest eco-system services. *Environmental Pollution*, 158, 6, 1986–1989, doi:10.1016/j.envpol.2009.11.023

PAUDEL, B. R., CARPENTER-BOGGS, L., HIGGINS, S., 2016. Influence of brassicaceous soil amendments on potentially beneficial and pathogenic soil microorganisms and seedling growth in Douglas-fir nurseries. *Applied Soil Ecology*, 105, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.007>

PAUTASSO M, 2016. Scientometrics of forest health and tree diseases: an overview. *Forests* 7, 17. <https://doi.org/10.3390/f7010017>

PAVLOV, I. N., 2015. Biotic and abiotic factors as causes of coniferous forests dieback in Siberia and Far East. *Contemporary problems of ecology*, 8(4), 440-456. <https://doi.org/10.1134/S1995425515040125>

PEKÁR, S., BRABEC, M., 2009. *Moderní analýza biologických dat 1*, 1st ed. Scientia, Praha, Czech Republic, 225. ISBN 978-80-86960-44-9.

PERALTA, S. M. G., ADAMS, G. C., WINTON, L., CERNY, K., EVERHART, S. E., 2020. An outbreak of bud blight disease of spruce (*Picea* spp.) in Alaska: an epidemiological study of *Gemmamyces piceae*. *Plant Health* 2020 Dostupné z: <https://apsnet.confex.com/apsnet/2020/meetingapp.cgi/Paper/16863>

PEŠKOVÁ, V., 2003. *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow. Skotská sypavka douglasky. *Lesnická práce*, 82 (11): příloha [4 s.]

PEŠKOVÁ, V., ČÍŽKOVÁ, D., 2015. *Lesnická fytopatologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze. 109.

PEŠKOVÁ, V., SOUKUP, F., 2013. Škody působené václavkou v smrkových porostech severní Moravy a Slezska. *Lesnická práce*, 92.6: 368-369.

PEŠKOVÁ, V., SOUKUP, F., 2016. Houbové choroby v lesích Česka v roce 2015 In: KNÍŽEK, M. (Ed.): *Škodliví Činitelé v lesích Česka 2015/2016*. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí. Průhonice, 14. 4. 2016. 20-22. ISBN 978-80-7417-107-9

PEŠKOVÁ, V., SOUKUP, F., KNÍŽEK, M., 2016a. Biotičtí škodliví činitelé na borovici a sucho. *Lesnická Práce*, 4: příloha [8 s.].

PEŠKOVÁ, V., MODLINGER, R., SOUKUP, F., RUČKOVÁ, J., 2016b. Nárůst napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou v Krušných horách. *Lesnická práce*, 95 (2), 46–47.

PEŠKOVÁ, V., MODLINGER, R., TOMÁŠKOVÁ, I., SAMEK, M., BAT' A, D., LORENC, F., DUŠEK, D., KACÁLEK, D. 2020. Vliv faktorů prostředí na napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou a návrh praktických postupů omezujících její šíření. In *Závěrečná Zpráva, Grantová Služba Lesy České Republiky, s.p.; Výzkumný Ústav Silva Taroucy Pro Krajinu a Okrasné Zahradnictví, v.v.i.: Jíloviště, Czech Republic*, 94.

PETTERSSON, J. M., 2018. Diseases on Christmas Trees in Southern Sweden and Western North Carolina with Emphasis on *Phytophthora* Root Rot and *Neonectria* Canker. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 78, ISBN: 978-91-7760-170-8

PETKOVA, K., 2011. Investigation of Douglas-fir provenance test in North-Western Bulgaria at age 20. *For Ideas*, 17.2: 42.

PETKOVA, K., GEORGIEVA, M., UZUNOV, M., 2014. Investigation of Douglas-fir provenance test in North-Western Bulgaria at the age of 24 years. *Journal of Forest Science*, 60.7: 288-296. <https://doi.org/10.17221/12/2014-JFS>

PETTIT, T. R., WAKEHAM, A. J., WAINWRIGHT, M. F., WHITE, J. G., 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology*, 51(6), 720-727. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00759.x>

PFALLER, M. A., PAPPAS, P. G., WINGARD, J. R., 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clinical Infectious Diseases*, 43(Supplement_1), S3-S14. <https://doi.org/10.1086/504490>

PODRÁZSKÝ, V., REMEŠ, J., 2008. Půdotvorná role významných introdukovaných jehličnanů – douglasky tisolisté, jedle obrovské a borovice vejmutovky. *Zpravy Lesn. Vyzk*, 53, 29–36, ISSN 0322-9688. Dostupné z: http://www.vulhm.cz/sites/File/vydavatelska_cinnost/zpravy_lesnickeho_vyzkum_u/zlv_2008_01.pdf#page=30 (accessed on 12 07 2021).

PODRÁZSKÝ, V., KUBEČEK, J., 2014. Může douglaska tisolistá nahradit chřadnoucí smrk? *Lesn. Prace*, 93, 14–19, DOI. Dostupné z: http://lmda.silvarium.cz/search/i.jsp?pid=uuid:17f63f3c-1e0e-47a3-90ed-6c99df079585#periodical-periodicalvolume-periodicalitem-page_uuid:6cdddc09-c5e1-11e4-9f52-001b63bd97ba (accessed on 20 07 2021).

POSPÍŠIL, F., POSPÍŠIL, J., 2011. Poškození smrku pichlavého kloubnatkou v Krušných horách. In. KNÍŽEK, M. (Ed.) *Škodliví činitelé v lesích Česka 2010/2011*. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí Průhonice, 12. 4. 2011. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 78. ISBN 978-80-86461-12-0

PRETZSCH, H., DEL RÍO, M., 2020. Density regulation of mixed and mono-specific forest stands as a continuum: a new concept based on species-specific coefficients for density equivalence and density modification. *Forestry: An*

International Journal of Forest Research, 93(1), 1-15.
<https://doi.org/10.1093/forestry/cpz069>

PRETZSCH, H., RÖTZER, T., MATYSSEK, R., GRAMS, T. E. E., HÄBERLE, K. H., PRITSCH, K., MUNCH, J. C., 2014. Mixed Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst) and European beech (*Fagus sylvatica* [L.]) stands under drought: from reaction pattern to mechanism. *Trees*, 28(5), 1305-1321. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1035-9>

PROSPERO, S., CLEARY, M., 2017. Effects of host variability on the spread of invasive forest diseases. *Forests*, 8(3), 80. <https://doi.org/10.3390/f8030080>

PULKKINEN, P., 1993. Frost hardiness development and lignification of young Norway spruce seedlings of southern and northern Finnish origin. *Silva Fenn*, 27, 47–54, <https://doi.org/10.14214/sf.a15658>

REDFERN, D., BOSWELL, R., PROUDFOOT, J., 1997. Forest condition 1996. Research information note 291. Forestry Commission. [[http://www.forestry.gov.uk/pdf/RIN291.pdf/\\$file/RIN291.pdf](http://www.forestry.gov.uk/pdf/RIN291.pdf/$file/RIN291.pdf)]. Přístupné 3 srpna 2021.

REYER, C., LASCH, P., MOHREN, G. M., & STERCK, F. J., 2010. Inter-specific competition in mixed forests of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and common beech (*Fagus sylvatica*) under climate change—a model-based analysis. *Annals of Forest Science*, 67(8), 805. <https://doi.org/10.1051/forest/2010041>

RIZZO, D. M., GARBELOTTO, M., DAVIDSON, J. M., SLAUGHTER, G. W., KOIKE, S. T., 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant disease*, 86(3), 205-214. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.3.205>

ROGATSKY, E., JAYATILLAKE, H., GOSWAMI, G., TOMUTA, V., STEIN, D., 2005. Sensitive LC MS quantitative analysis of carbohydrates by Cs⁺ attachment. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(11), 1805-1811. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.07.017>

ROMPORTL, D., CHUMANOVÁ, E., HAVRDOVÁ, L., PEŠKOVÁ, V., ČERNÝ, K., 2016. Potential risk of occurrence of *Phytophthora alni* in forests of the Czech Republic.

ROQUES, A., AUGER-ROZENBERG, M. A., CAPRETTI, P., SAUVARD, D., LA PORTA, N., SANTINI, A., 2019. Pests and diseases in the native and European range of Douglas-fir. 3.5.

RUBA, J., MIEZITE, O., BALTMANIS, R., LUGUZA, S., 2013. Abiotic risks of managing young forest stands of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Research for rural development*, 27-33.

RUEHR, N. K., GAST, A., WEBER, C., DAUB, B., ARNETH, A., 2016. Water availability as dominant control of heat stress responses in two contrasting tree species. *Tree Physiology*, 36(2), 164-178.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpv102>

SAKAI, A., WEISER, C.J., 1973. Freezing resistance of trees in North America with reference to tree regions. *Ecology*, 54(1): 118-126.
<https://doi.org/10.2307/1934380>

SAMEK, M., NOVOTNÝ, P., MODLINGER, R., FULÍN, M., BERAN, F., ROY, A., PEŠKOVÁ, V. 2019. Impact of *Rhabdocline pseudotsugae* and *Phaeocryptopus gaeumannii* on the selection of suitable provenances of Douglas fir in Central Europe. *Forests*, 10(3), 204. <https://doi.org/10.3390/f10030204>

SAMEK, M., MODLINGER, R., BAT'A, D., LORENC, F., VACHOVÁ, J., TOMÁŠKOVÁ, I., PEŠKOVÁ, V. 2022. *Gemmamyces piceae* Bud Blight Damage in Norway Spruce (*Picea abies*) and Colorado Blue Spruce (*Picea pungens*) Forest Stands. *Forests*, 13(2), 164. <https://doi.org/10.3390/f13020164>

SCOTT, P., BADER, M.K.-F., BURGESS, T., HARDY, G., WILLIAMS, N., 2019. Global biogeography and invasion risk of the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Environ Sci Policy*, 101, 175-182, <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2019.08.020>

SEIDL, R., RAMMER, W., 2017. Climate change amplifies the interactions between wind and bark beetle disturbances in forest landscapes. *Landscape Ecological*, 32, 1485–1498. <https://doi.org/10.1007/s10980-016-0396-4>.

SEIDL, R., RAMMER, W., BLENNOW, K., 2014. Simulating wind disturbance impacts on forest landscapes: tree-level heterogeneity matters. *Environmental Modelling & Software*, 51, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2013.09.018>.

SHOEMAKER, R. A., 1967. *Cucurbitaria piceae* and associated Sphaeropsidales parasitic on spruce buds. *Canadian Journal of Botany*, 45, 1243–48. <https://doi.org/10.1139/b67-131>

SHELHAAS, M. J., NABUURS, G. J., SCHUCK, A., 2003. Natural disturbances in the European forests in the 19th and 20th centuries. *Global Change Biology*, 9(11), 1620-1633. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00684.x>

SCHMID, M., PAUTASSO, M., HOLDENRIEDER, O., 2014. Ecological consequences of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cultivation in Europe. *European Journal of Forest Research*, 133(1), 13-29. <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0745-7>

SCHNEIDER, R., DAEBELER, F., 1968. Eine für Deutschland neue Knospenkrankheit an *Picea pungens* var. *glauca* (Erreger: *Cucurbitaria piceae* Borthwick). *Journal of Phytopathology*, 63(4), 388-392. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1968.tb02403.x>

SCHULDT, B., BURAS, A., AREND, M., VITASSE, Y., BEIERKUHNLEIN, C., DAMM, A., ... KAHMEN, A., 2020. A first assessment of the impact of the extreme 2018 summer drought on Central European forests. *Basic and Applied Ecology*, 45, 86-103. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2020.04.003>

SIEROTA, Z., GRODZKI, W., SZCZEPKOWSKI, A., 2019. Abiotic and biotic disturbances affecting forest health in Poland over the past 30 years: Impacts of climate and forest management. *Forests*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.3390/f10010075>

SHERWOOD, P., VILLARI, C., CAPRETTI, P., BONELLO, P., 2015. Mechanism of induced susceptibility to *Diplodia* tip blight in drought-stressed Austrian pine. *Tree Physiology*, 35, 5, 549–562, <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv026>

SKOVGAARD, J. P., THOMSEN, I. M., SKOVGAARD, I. M., MARTINUSSEN, T., 2010. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Forest Pathology*, 40, 1, 7–18, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2009.00599.x>

SLODIČÁK, M., BALCAR, V., NOVÁK, J., ŠRÁMEK, V. a kolektiv., 2008. Lesnické hospodaření v Krušných horách. 3. vyd. Hradec Králové : Lesy české republiky, s.p., 477. ISBN 978-80-86945-04-0.

SLODIČÁK, M., BERAN, F., NOVÁK, J., KACÁLEK, D., 2014. Douglaska tisolistá a její místo v lesním hospodářství ČR. In Pěstební postupy při zavádění douglasky do porostních směsí v podmínkách ČR. Lesnická práce, 8-19.

SOUKHOVOLSKY, V., KOVALEV, A., TARASOVA, O., MODLINGER, R., KŘENOVÁ, Z., MEZEI, P., ... JAKUŠ, R., 2022. Wind Damage and Temperature Effect on Tree Mortality Caused by *Ips typographus* L.: Phase Transition Model. *Forests*, 13(2), 180. <https://doi.org/10.3390/f13020180>

SOUKUP, F., PEŠKOVÁ, V., 2009. *Gemmamyces piceae* (Borthw.) Casagr. Kloubnatka smrková. Lesní ochranná služba, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Praha, 4.

ŠIKA, A., 1981. Present results of the international provenance experiment of IUFRO with Douglas-ir in the CR. *Comm. Inst. For. Čech.*, 12: 83-101.

ŠINDELÁŘ, J., BERAN, F., 2004. K některým aktuálním problémům pěstování douglasky tisolisté (orientační studie). *Jíloviště-Strnady, VÚLHM: Lesnický průvodce*, 3, 34.

STENLID, J., OLIVA, J., BOBERG, J. B., HOPKINS, A. J., 2011. Emerging diseases in European forest ecosystems and responses in society. *Forests*, 2(2), 486-504. <https://doi.org/10.3390/f2020486>

STENLID, J., OLIVA, J., 2016. Phenotypic interactions between tree hosts and invasive forest pathogens in the light of globalization and climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 20150455. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0455>

STOKLASA, J., 1923. Beschädigung der Vegetation durch Rauchgase und Fabrksexhalationen. *Urban und Schwanzenberg*, Berlin, 487.

STRAW NA, WILLIAMS DT, KULINICH O, GNINENKO YI, 2013. Distribution, impact and rate of spread of emerald ash borer *Agilus planipennis* (Coleoptera:

Buprestidae) in the Moscow region of Russia. *Forestry* 86, 515– 22. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpt031>

STRÍBRSKÁ, B., HRADECKÝ, J., ČEPL, J., TOMÁŠKOVÁ, I., JAKUŠ, R., MODLINGER, R., ... JIROŠOVÁ, A. 2022. Forest margins provide favourable microclimatic niches to swarming bark beetles, but Norway spruce trees were not attacked by *Ips typographus* shortly after edge creation in a field experiment. *Forest Ecology and Management*, 506, 119950.

STRNADOVÁ, V., ČERNÝ, K., HOLUB, V., GREGOROVÁ, B., 2010. The effects of flooding and *Phytophthora alni* infection on black alder. *Journal of Forest Science*, 56(1), 41-46. <https://doi.org/10.17221/67/2009-JFS>

ŠEFL, J., 2013. Kloubnatka smrková (*Gemmamyces piceae*) ve vybraných porostech v oblasti Flájské přehrady v letech 2010–2012. *Studia Oecologica*, 1, 59–71, ISSN 1802-212X

ŠEFL, J., MOTTLOVÁ, V., SCHOŘÁLKOVÁ, I., 2020. Bud blight (*Gemmamyces piceae*) in the eastern part of the Krušné hory Mountains. *Journal of Forest Science*, 66, 309–317. <https://doi.org/10.17221/11/2020-JFS>

ŠRÁMEK, V., NOVOTNÝ, R., FADRHOŇSOVÁ, V., 2015. Decay of Norway spruce stands and quality of forest soils in the region of northern Moravia and Silesia. *Zprávy lesnického výzkumu*, 60(2), 147-153.

TEMEL, F., JOHNSON, G. R., STONE, J. K., 2004. The relationship between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *Forest Pathology*, 34.6: s. 383-394. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00379.x>

THIRINGER, J. O., 1964. Eine für Schweden neue Knospenkrankheit auf Koniferen. *Göteborgs Botaniska Trädgård*.

THOMAS, F. M., BLANK, R., HARTMANN, G., 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *Forest Pathology*, 32(4-5), 277-307. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00291.x>

TIMMERMANN, V., NAGY, N. E., HIETALA, A. M., BØRJA, I., SOLHEIM, H., 2017. Progression of ash dieback in Norway related to tree age, disease history and regional aspects. *Baltic Forestry*, 23, 1, 150-158,

TOMÁŠKOVÁ, I., 2018. Water use efficiency of Norway spruce with bud blight disease. *Acta Hortic*, 1222, 133-136, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1222.18>

TOMICZEK, C., CECH, T. L., FÜRST, A., HOYER-TOMICZEK, U., KREHAN, H., PERNY, B., & STEYRER, G., 2011. Forest protection situation 2010 in Austria. *Forstschutz aktuell*, (52), 3-9.

TUBEUF, C., 1919. *Schilderungen und Bilder aus nordamerikanischen Wäldern*.

TUFFEN, M.G., GROGAN, H.M., 2019. Current, emerging and potential pest threats to Sitka spruce plantations and the role of pest risk analysis in preventing new pest introductions to Ireland. *Forestry*, 92, 26-41, <https://doi.org/10.1093/forestry/cpy036>

TURNER, M.G., 2010. Disturbance and landscape dynamics in a changing world. *Ecology* 91, 2833–2849. <https://doi.org/10.1890/10-0097.1>

ULRICH, B., 1984. Effects of air pollution on forest ecosystems and waters. The principles demonstrated at a case study in central Europe. *Atmospheric Environment*, 18, 621–628, [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(84\)90182-3](https://doi.org/10.1016/0004-6981(84)90182-3)

VALENTA V, MOSER D, KUTTNER M, PETERSEIL J, ESSL F, 2015. A high-resolution map of Emerald Ash Borer invasion risk for southern central Europe. *Forests* 6, 3075– 86. <https://doi.org/10.3390/f6093075>

VIDACOVIĆ, M., 1991. *Conifers, Morphology and Variation*. Grafički Zavod Hrvatske, Zagreb. <https://doi.org/10.1093/treephys/12.4.319a>

VITALI, V., BÜNTGEN, U., BAUHUS, J., 2017. Silver fir and Douglas fir are more tolerant to extreme droughts than Norway spruce in south-western Germany. *Glob Chang Biol* 23:5108–5119. <https://doi.org/10.1111/gcb.13774>

WALKER, S. F., BOSCH, J., JAMES, T. Y., LITVINTSEVA, A. P., VALLS, J. A. O., PIÑA, S., ... FISHER, M. C., 2008. Invasive pathogens threaten species recovery

programs. *Current Biology*, 18(18), R853-R854.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.033>

WINTON, L., 2020. Spruce bud blights. Region 10 - Forest & Grassland Health. US Forest Service. [online]. Dostupné z: <https://www.fs.usda.gov/detailfull/r10/forest-grasslandhealth/?cid=FSEPRD535386>

WOODWARD, S., STENLID, J., KARJALAINEN, R., HUTTERMANN, A. (Ed.), 1998. *Heterobasidion annosum: biology, ecology, impact and control*. CAB International: Oxon. ISBN 0 85199 275 7. 589.

YUAN, W., ZHENG, Y., PIAO, S., CIAIS, P., LOMBARDOZZI, D., WANG, Y., ... YANG, S., 2019. Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Science advances*, 5(8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1396>

ZGRABLIĆ, Ž., MARJANOVIĆ, H., DIMINIĆ, D., 2016. Can we predict *Sphaeropsis sapinea* outbreak by monitoring fungal diversity in Austrian pine plantations?. *Šumarski list*, 140(1-2), 7-15. <https://doi.org/10.31298/sl.140.1-2.1>

ZHAO, Y. J., HOSOYA, T., BARAL, H. O., HOSAKA, K., KAKISHIMA, M., 2013. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon*, 122(1), 25-41. <https://doi.org/10.5248/122.25>

ZUUR, A.F., IENO, E.N., ELPHICK, C.H.S., 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1, 3–14, <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x>

ZÝKA, V., ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., ZAHRADNÍK, D., HRABĚTOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L., ROMPORTL, D., 2018. Predikce poškození porostů smrku pichlavého kloubnatkou smrkovou v Krušných horách. 1. vyd. Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i. 47, ISBN: 978-80-87674-29-1

R Core Team., 2016 *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. available from WWW: <https://www.R-project.org/>

9. Seznam příloh

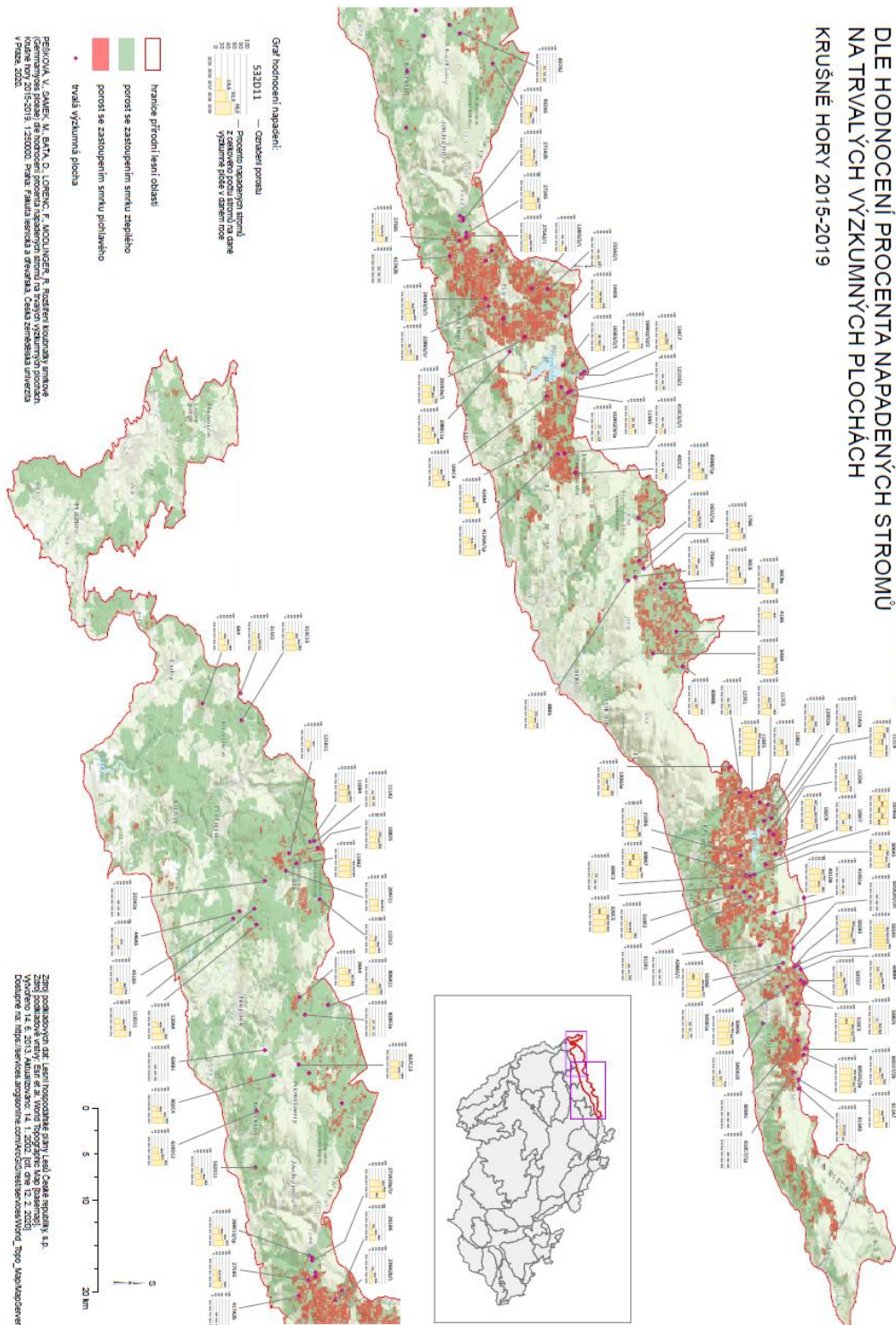
Příloha 1 Fotografie založených ploch – nahoře věková skupina 1-30, uprostřed věková skupina 31-60, dole věková skupina 61-140	101
Příloha 2 Rozšíření kloubnatky smrkové (<i>Gemmamyces piceae</i>) dle hodnocení procenta napadených stromů na trvalých výzkumných plochách	102
Příloha 3 Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (<i>Picea abies</i>) kloubnatkou smrkovou (<i>Gemmamyces piceae</i>) v Krušných horách pro rok 2017.	103
Příloha 4 Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (<i>Picea abies</i>) kloubnatkou smrkovou (<i>Gemmamyces piceae</i>) v Krušných horách pro rok 2018.	104
Příloha 5 Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (<i>Picea abies</i>) kloubnatkou smrkovou (<i>Gemmamyces piceae</i>) v Krušných horách pro rok 2019.	105
Příloha 6 Grafický abstrakt zobrazující citlivost jednotlivých proveniencí vůči sypavkám (SAMEK et al., 2018).....	106
Příloha 7 Grafický abstrakt zobrazující výsledky hodnocení napadení smrků kloubnatkou smrkovou v Krušných horách (SAMEK et al., 2022).	107
Příloha 8 Grafický abstrakt zobrazující výsledky měření hodnoty trehalózy (ŠULC et al., 2021).	107
Příloha 9 <i>Gemmamyces piceae</i> Bud Blight Damage in Norway Spruce (<i>Picea abies</i>) and Colorado Blue Spruce (<i>Picea pungens</i>) Forest Stands	122
Příloha 10 Impact of <i>Rhabdocline pseudotsugae</i> and <i>Phaeocryptopus gaeumannii</i> on the Selection of Suitable Provenances of Douglas Fir in Central Europe	139
Příloha 11 Trehalose determination in Norway spruce (<i>Picea abies</i>) roots. Analytics matters	145
Příloha 12 Development of a novel dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of ergosterol in roots and various fungi samples	152
Příloha 13 Pathogens threatening Czech Republic forest ecosystems – a review	170

Přílohy



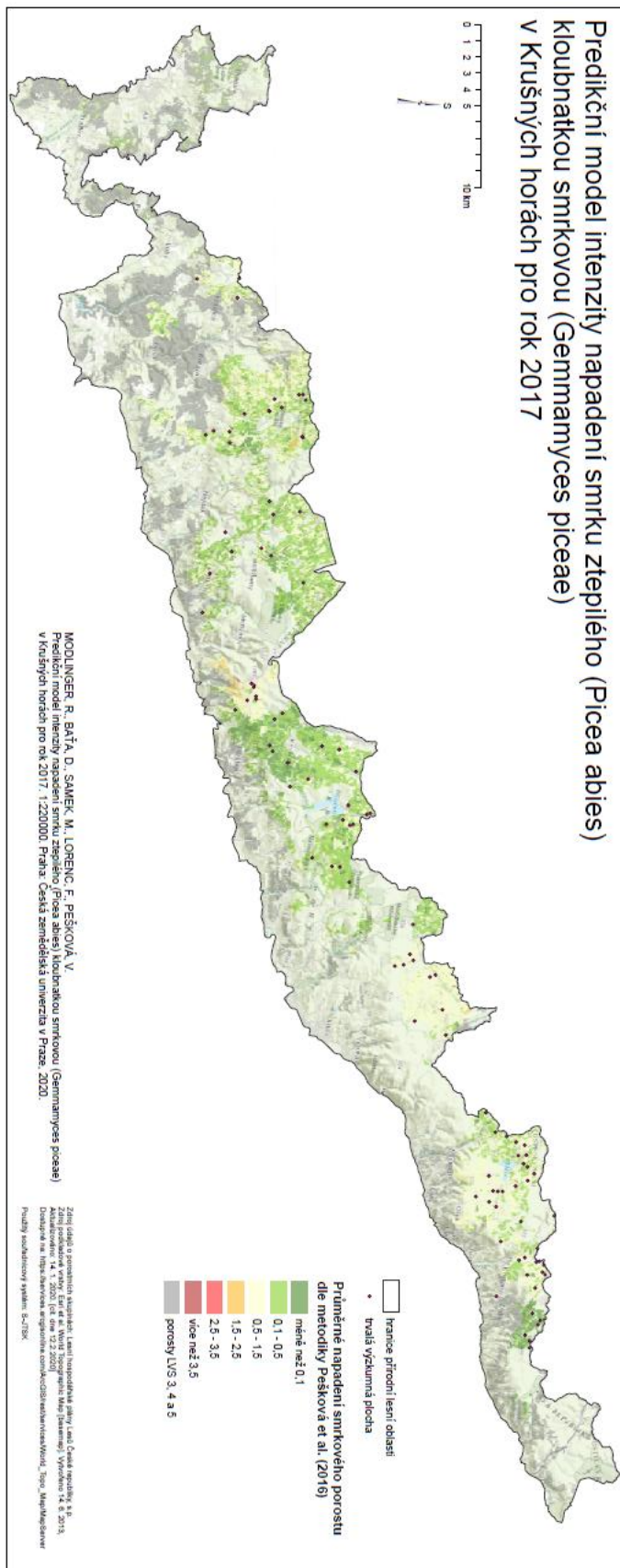
Příloha 1 Fotografie založených ploch – nahoře věková skupina 1-30, uprostřed věková skupina 31-60, dole věková skupina 61-140

**ROZŠÍŘENÍ KLOUBNATKY SMRKOVÉ (*GEMMAMYCES PICEAE*)
DLE HODNOCENÍ PROCENTA NAPADENÝCH STROMŮ
NA TRVALÝCH VÝZKUMNÝCH PLOCHÁCH
KRUŠNÉ HORY 2015-2019**

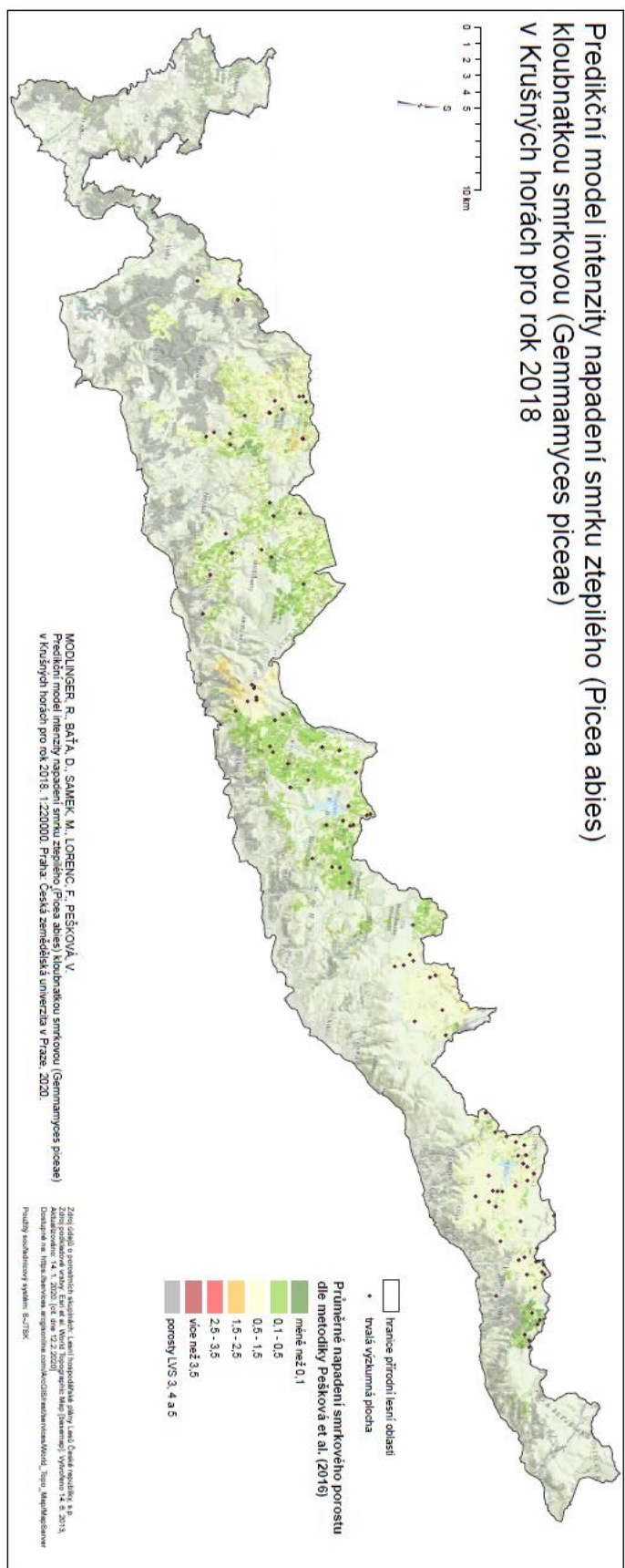


Příloha 2 Rozšíření kroužnatky smrkové (*Gemmamyces piceae*) dle hodnocení procenta napadených stromů na trvalých výzkumných plochách (Pešková et al., 2020).

Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (*Picea abies*) kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách pro rok 2017

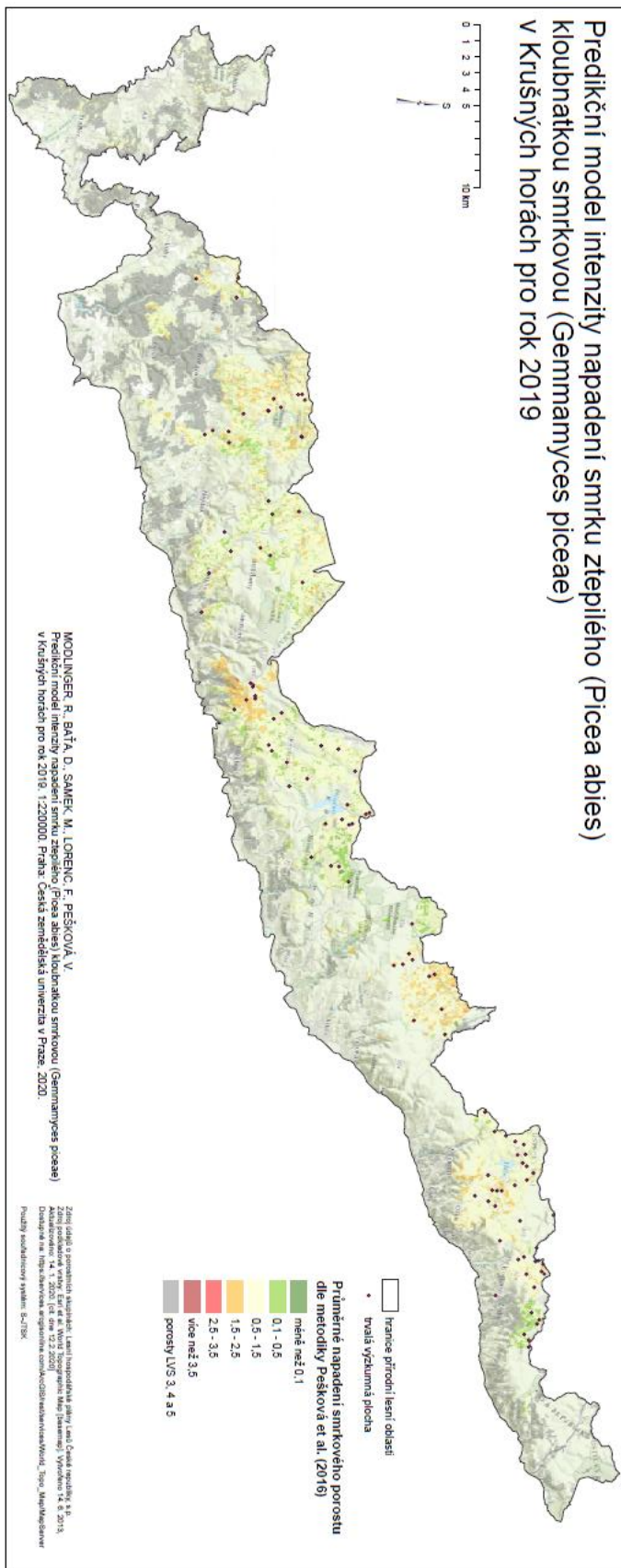


Příloha 3 Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (*Picea abies*) kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách pro rok 2017 (PEŠKOVÁ et al., 2020).

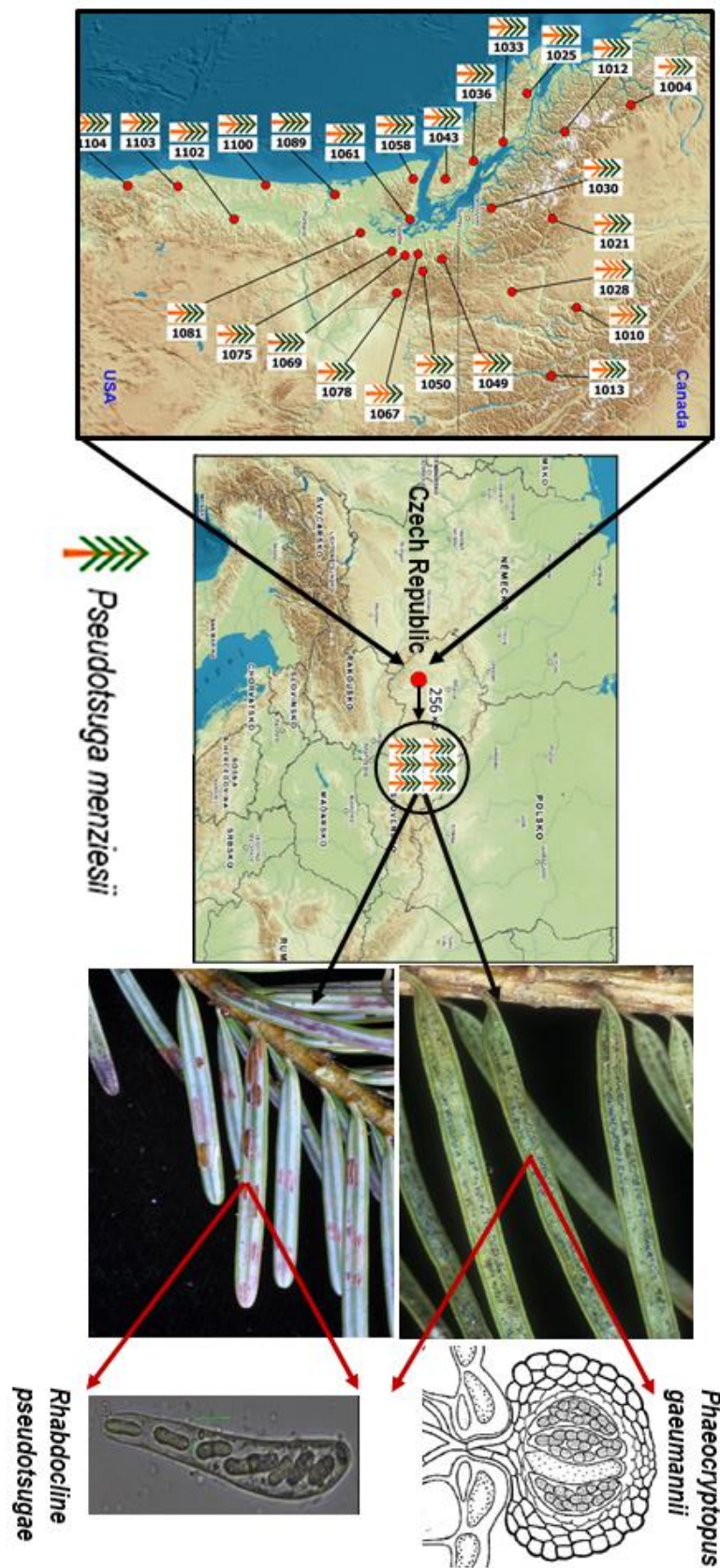


Příloha 4 Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (*Picea abies*) kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách pro rok 2018 (PEŠKOVÁ et al., 2020).

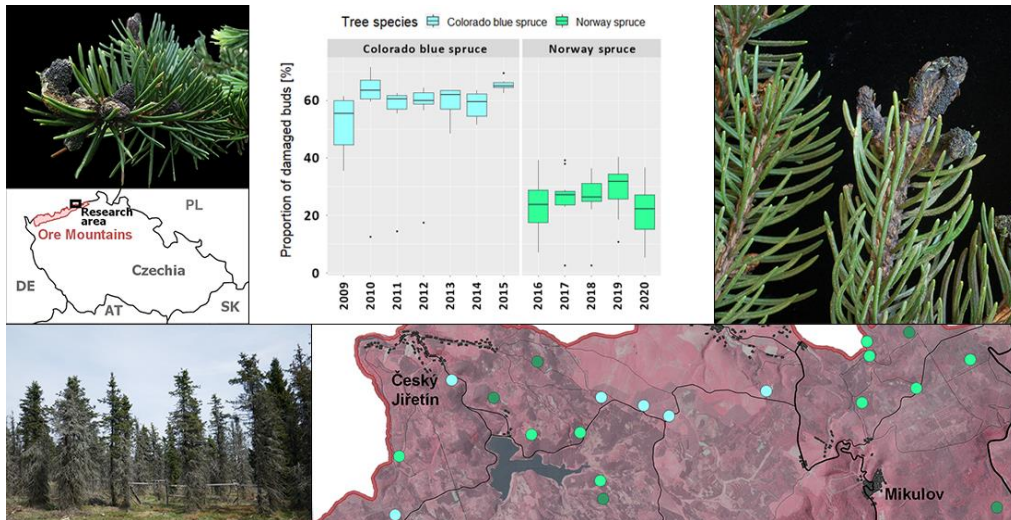
Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (*Picea abies*) kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách pro rok 2019



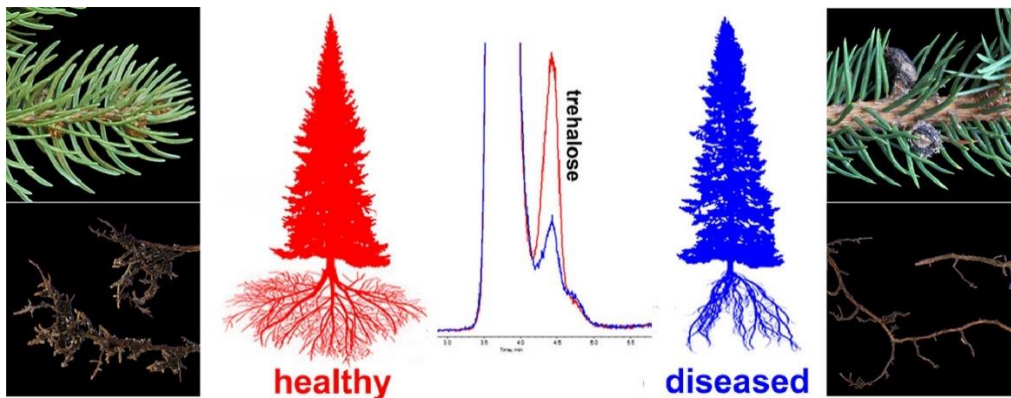
Příloha 5 Predikční model intenzity napadení smrku ztepilého (*Picea abies*) kloubnatkou smrkovou (*Gemmamyces piceae*) v Krušných horách pro rok 2019 (PEŠKOVÁ et al., 2020).



Příloha 6 Grafický abstrakt zobrazující citlivost jednotlivých proveniencí vůči sypavkám (SAMEK et al., 2018).



Příloha 7 Grafický abstrakt zobrazující výsledky hodnocení napadení smrků kloubnatkou smrkovou v Krušných horách (SAMEK et al., 2022).



Příloha 8 Grafický abstrakt zobrazující výsledky měření hodnoty trehalózy (ŠULC et al., 2021).

Health stage	Tree number	Trehalose (mean) [µg/g DW]	SD [µg/g DW]
Healthy	1	853.3	± 8.50
	2	738.1	± 4.62
	3	812.4	± 5.72
	4	688.7	± 3.10
	5	762.5	± 8.49
	6	741.9	± 6.03
	7	703.0	± 4.12
	8	587.6	± 6.49
	9	617.5	± 11.1
	10	885.8	± 5.98
Diseased	11	526.4	± 5.99
	12	596.2	± 4.71
	13	788.2	± 7.65
	14	621.7	± 10.4

15	733.4	±	3.61
16	579.8	±	9.57
17	543.1	±	8.32
18	661.8	±	7.05
19	632.8	±	6.83
20	559.3	±	3.82

Article

Gemmatomyces piceae Bud Blight Damage in Norway Spruce (*Picea abies*) and Colorado Blue Spruce (*Picea pungens*) Forest Stands

Michal Samek¹, Roman Modlinger^{1,*}, Daniel Bařa¹, Frantiřek Lorenc², Jana Vachova¹, Ivana Tomařkova¹ and Vitezslava Peřkova¹

¹ Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 6-Suchbol, CZ-165 21 Prague, Czech Republic; samek@fd.czu.cz (M.S.); barta@fd.czu.cz (D.B.); ruckova@fd.czu.cz (J.V.); tomaskova@fd.czu.cz (I.T.); peskovav@fd.czu.cz (V.P.)

² Forestry and Game Management Research Institute, Strnady 136, CZ-252 02 Jiloviřte, Czech Republic; lorenc@vvlhm.cz

* Correspondence: modlinger@fd.czu.cz; Tel: +420-606-688-883



Citation: Samek, M.; Modlinger, R.; Bařa, D.; Lorenc, F.; Vachova, J.; Tomařkova, I.; Peřkova, V. *Gemmatomyces piceae* Bud Blight Damage in Norway Spruce (*Picea abies*) and Colorado Blue Spruce (*Picea pungens*) Forest Stands. *Forests* 2022, 13, 164. <https://doi.org/10.3390/f13020164>

Academic Editor: Artur Alves

Received: 12 December 2021

Accepted: 17 January 2022

Published: 22 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright  2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Since 2008, spruce bud blight (*Gemmatomyces piceae* (Borthw.) Casagr.) has been spreading epidemically in forest stands of the Czech Republic's Ore Mountains. This fungus, with a disjunct Holarctic range, injures buds, especially of Colorado blue spruce (*Picea pungens* Engelm.). Damaged buds do not sprout, and, in case of a stronger attack, the tree does not recover its assimilation apparatus and may die. Within the past few years, there has been a huge spread of this fungus throughout the mountain range. This paper summarizes the biology of *G. piceae*, its host plants, and presents the first findings from the massive outbreak of *G. piceae*. In 2015, an increase in damage was detected on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). The course of the *G. piceae* epidemic had been monitored in 25 permanent research plots over the course of 11 years. In the case of Colorado blue spruce, stands aged 10–60 years were attacked, with 60% of buds damaged on average. The intensity of damage to Norway spruce buds was around 25%. Norway spruce infestation varied significantly depending upon the age of the stand (GLMM: $p < 0.01$). In the age class of 31–60 years, on average 80% of individuals were infested. In older stands, only 42% of trees were infested, and no infestation was found in individuals younger than 15 years. In Colorado blue spruce, the distribution of the pathogen was continuous, whereby all individuals in the research plots were affected, and, with the exception of a few trees, the infestation was lethal or resulted in a significant reduction of the assimilation apparatus. The development of damage on Colorado blue spruce can be characterized as continuous growth.

Keywords: forest pest; damage; forest health; disease; forest pathology; fungi; invasive species

1. Introduction

Air pollutants such as ozone (O₃), nitrogen oxides (NO_x), and sulfur dioxides (SO_x) contribute significantly to deteriorating forest health [1]. In Europe, this phenomenon has been observed in many countries, such as in Germany, Poland, Austria, or Switzerland [2], and, in Central Europe, it led to the destabilization and collapse of forest stands in many places [3,4]. In the Ore Mountains region, problems with the health of forest stands were recorded as early as the end of the 16th century [5], and in the case of air pollution from the beginning of the 20th century [6]. The first notable damage to forest stands is related to the beginning of coal burning [7]. In the 1980s, after an extreme air pollution load, most of the spruce and beech forests collapsed. In areas where it was not possible to restore these trees, stands of substitute tree species were established [8]. These were species with potentially higher air pollution resistance, and among conifers, mainly Colorado blue spruce. Until the beginning of the 21st century, the selection of this tree species seemed to be

very appropriate. Forest stands of Colorado blue spruce in the Ore Mountains covered an area of more than 8000 ha [9]. Individual trees were already reaching dimensions suitable for the timber industry, and plans for economic exploitation of this tree species gradually began to emerge. Improving the health of forest stands was also facilitated by reducing the air pollution. However, significant soil acidification as a consequence of atmospheric pollution persisted, making vital forest stands highly unstable [10]. Even after 30 years, the fungal and microbial communities living in the soil failed to recover [11]. Nevertheless, even the reduced ectomycorrhizal fungal diversity is still beneficial to the host tree [12]. Next to the increased water and mineral uptake by mycorrhizae fungus, the advantage of the mycorrhizal presence are the fungal sugar products of the metabolism. According to our previous research, the content of trehalose is significantly higher in healthy trees compared to the trees with bud blight disease [13].

After a long period without a record of its occurrence in the Czech Republic, *G. piceae* was detected during 2008 on Colorado blue spruce in the Ore Mountains [14]. Initially rather inconspicuous and localized, the damage started to take on an epidemic character in 2009, and especially in the northeastern part of the Ore Mountains region, reaching disastrous proportions within a short period of time [15,16].

The fungus *G. piceae*, synonym *Cucurbitaria piceae* Borthw., *Cucurbitodithis piceae* (Borthw.) Petr. was first found on infected buds of Colorado blue spruce (*P. pungens* var. *glauca*) at Abercrombie, Perthshire (U.K.) in 1906 [17,18]. Under current taxonomic nomenclature, it is classified in the division Ascomycota, order Pleosporales, family Melanommataceae [19]. The anamorphic stage described by Naumov in 1925 is referred to as *Megaloseptoria mirabilis* Naumov [20].

Infection of the host plant occurs during the vegetation season. The following year, at the time of budding, first pycnidia form, and conidia then form within them. Conidia occur within the fruiting bodies until September, with strong production during July and August [21]. This is followed by the formation of perithecia, where ascospores develop and form from April to August, with strong production in the summer months (July and August). The peak of ascospore production is slightly delayed after the peak occurrence of conidia. Both types of fruiting bodies can be encountered on buds during the vegetation season. The infestation of an individual causes buds swelling and spiral twisting. When the infection is severe, and the terminal bud dies, a more pronounced growth of lateral shoots is typical. In spring, infected buds are covered with a hard, black crust (basal stroma of the fungus), from which numerous small brown- to black-coloured spherical fruiting bodies grow, or the fruiting bodies grow directly between the scales of the bud, and, in case of a stronger infestation, they cover the entire bud [22]. The presence of buds with bud-blight fruiting bodies does not immediately threaten the infested tree. If the percentage of infested (and dead) buds is relatively low, the tree's growth is not significantly restricted. If the number of infected and dead buds exceeds three-quarters of the total number for several years in a row, however, the tree stops budding, does not renew its assimilation apparatus, and may die.

The pathogen has been confirmed in a number of European countries, such as, Austria, Denmark, England, Finland, Germany, Ireland, Italy, Russia, Scotland, Slovenia, Sweden, Switzerland and Wales [17,18,23–32]. In the Czech Republic, *G. piceae* was first detected on Colorado blue spruce in 1917, but damage showing the same symptoms was observed as early as 1909 [23]. From 1910 onwards, the fungus was repeatedly found in many parts of Bohemia [32]. With regard to the frequency of the pathogen's findings after 1910 [23,33], Central Europe was considered to be the epicenter of its spread. Thereafter, though, the fungus was not detected in the Czech Republic until the 21st century.

The infection was described as not very significant. The most severe damage was recorded in northern England and southwest Scotland, where damage to older individuals of Norway spruce was found in 13 plots [34]. In addition to Europe, the pathogen has been found in North America, in Alaska [35].

The spruce bud blight primarily damages North American spruces Colorado blue spruce and Engelmann Spruce (*Picea engelmannii* Parry ex Engelm.), which are usually regarded as susceptible [36]. In Alaska, its occurrence has been confirmed on White spruce (*Picea glauca* Moench), Black spruce (*Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns and Poggenb.), and Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong.) [35]. This applies also to the Czech Republic, where the pathogen has been confirmed on *P. glauca*, but recently also on the south European *Picea omorika* (Pančić) Purk. [37]. Systematic monitoring of the wide spread of the pathogen on Colorado blue spruce in the Czech Republic was carried out by Pešková et Soukup [38], Pešková et Modlinger [37], Černý et al. [20] and Šefl et al. [39].

Due to the considerable extent of damage to the Colorado blue spruce stands in the Ore Mountains, resulting from *G. piceae* infestation, the stands could be regarded as highly destabilized, and it was necessary to proceed with stand reconstruction. Moreover, an increase in the number of pathogen detections on Norway spruce in 2015 began to raise concerns about further development of these stands, as the infectious capabilities of the fungus was strong [40].

The main objective of this research was to compare the development of bud-blight infestation on the two host tree species, Colorado blue spruce and Norway spruce, in terms of the intensity of damage to individual trees and spatial extent of the infestation in the monitored stand. The results presented here are based upon 11 years of research in the Ore Mountains region, which is currently the epicenter of the bud blight's occurrence. Findings from the current widespread outbreak act as an essential information source for areas that have been potentially newly affected by this pathogen, such as Alaska or other European countries. Secondary objectives were to summarize current knowledge about the distribution of *G. piceae* in the world, list the host tree species known to date, and describe the biology of the pathogen and factors influencing the spread of the fungus in stands.

2. Materials and Methods

The decline of replacement tree stands in the Ore Mountain region was monitored between 2009 and 2020. In 2009, research plots with Colorado blue spruce were established. These were homogeneous stands of the same age, where 25 individuals were selected and repeatedly evaluated. Due to the intensive spread of spruce bud blight on Norway spruce, research plots were established in 2016 also in homogeneous stands of this tree species. In each plot, 30 individuals were monitored. To compare Colorado blue spruce and Norway spruce, only research plots from the location around the Fláje waterworks were selected (Figure 1), as this was the epicenter of the disastrous occurrence and data on the intensity of infestation were found to be most complete there.

To monitor the intensity of spruce bud blight infestation, we followed the methodology of Černý et al. [20] using a scale from 0 to 4, where 0 = trees without damage, 1 = trees with low damage (up to 25% of buds affected), 2 = moderate damage (25% ≤ x < 50% of buds affected), 3 = high damage (50% ≤ x < 75%), and 4 = extreme damage (≥75% of buds affected). Trees in the last category were dying or dead. The values of disease severity in particular trees were averaged for each plot. The resulting values were linearly approximated as percentages based upon marginal values for each category (0%, 25%, 50%, 75%, and 100%).

For further processing, two variables were created to express the infestation by spruce bud blight, namely, the proportion of damaged buds and proportion of attacked trees. Proportion of damaged buds is the average rate of attacked tree canopies calculated from all individuals within a plot as a percentage, and thus it expresses the intensity of damage to individual trees. The proportion of attacked trees is the proportion of attacked individuals among all individuals in the evaluated plot, and thus it is an indication as to the spatial extent of infestation in the studied stand. A direct comparison between Colorado blue spruce and Norway spruce could be made only in the age class of 31–60 years, as Colorado blue spruce has only been planted in the Ore Mountains since the 1970s [9].

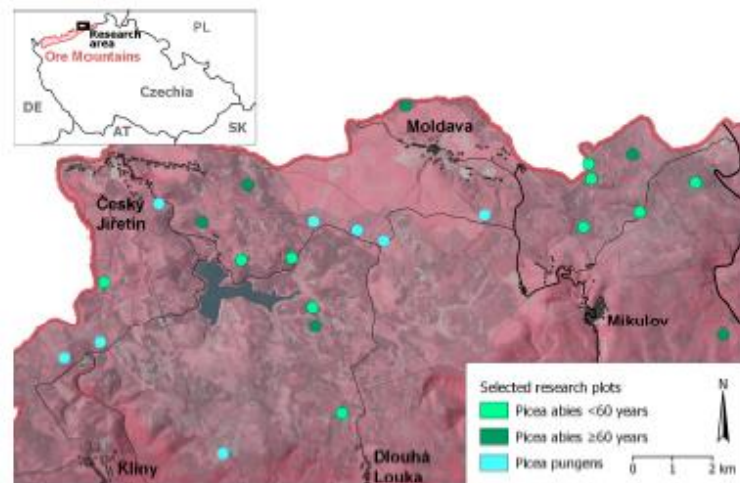


Figure 1. Location of research plots in the Czechia and the Ore Mountains. The colours of the point represent different tree species or age classes of forest stands.

For the statistical evaluation, we created a dependent variable which is the percentage of infested individuals in the stand (sum of individuals from categories 1–4 for a given stand divided by the number of evaluated individuals in the stand). The year of evaluation was set as a categorical dependent variable and age was set as a discrete dependent variable. Basic assumptions for the regression-type statistical analysis were made following Zuur et al. [41]. The dependent variable was not well approximated by a normal distribution, and the Gamma distribution function was shown to be the most appropriate. Moreover, the assumption of independence was violated from the viewpoint of evaluating the same stand in all years. This circumstance was incorporated into the statistic model by using stand as a nested factor. A generalized linear mixed effects model in the glmmTMB package was used to evaluate the data under the procedures described by Brooks et al. [42]. All statistical analyses were performed in the R 4.0.2. environment [43].

3. Results

The pathogen developed very rapidly on Colorado blue spruce. In 2009, an average of 55% of the buds were infected, by 2010 this percentage reached 63%, and thereafter the damage fluctuated at around 60% of infected buds. In 2015, there was a further increase in infestation to 65% (Figure 2). Infestation at this level is already a very serious problem for the tree, and the chances for successful regeneration of the assimilation apparatus are restricted. The relatively strong bud damage in 2009 indicates that the pathogen must have been already present in stands in the previous period. Nevertheless, the year 2009 can be regarded as a period within which the pathogen developed rapidly. There were considerable differences in the intensity of infestation between individual research plots in 2009 (see the variance in the box plot in Figure 2). Later, damage intensity became uniform across all plots. On average, 60% of buds were infested on Colorado blue spruce during the monitoring period.

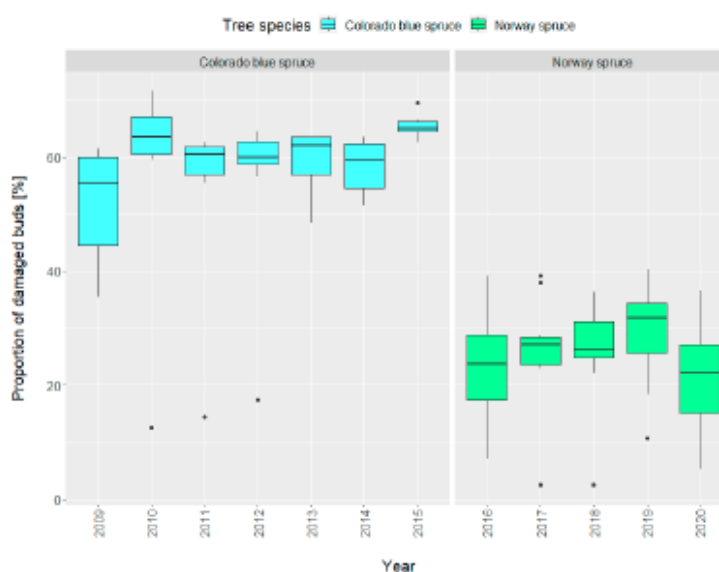


Figure 2. Proportion of buds infested by spruce bud blight in Colorado blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) (2009–2015) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) in the age group 31–60 years. Horizontal line in middle of a box is the median, whiskers represent 1.5 times the interquartile range.

Only a few trees with individually infected buds were found in the stands of Norway spruce from 2009 to 2014 in the Ore Mountains region, even though the source of infection—infected buds of Colorado blue spruce—were in direct contact with them. In 2015, there was a significant increase in the damage to Norway spruce, and in many places entire stand groups of different ages were infested. In the research plots, an average 23% of buds were infested in 2016, the intensity was increasing and reached 31% by 2019, then declined to 22% in 2020 (Figure 2). In 2021, no new bud infestation could be found in the research plots, and a newly developed infection could be detected only in a few stand groups outside the research plots. During the main phase of pathogen development between 2016 and 2020, the intensity of bud damage in Norway spruce was around 25%.

In addition to the intensity of infestation of the tree canopy, the impact of spruce bud blight on Colorado blue spruce and Norway spruce also differed as to the extent of spatial infestation of the stands. In Colorado blue spruce, the distribution was continuous. All individual trees in the research plots were affected, as were those in the surrounding stands. Uninfected trees occurred only individually. Infestation was present to the comparable extent in both older and younger stands. The youngest stand infested by spruce bud blight was 11 years old. In the case of Norway spruce, the fungus was found in individuals younger than 15 years in only one stand, and the infestation of individual trees under 30 years of age was less frequent than in the case of Colorado blue spruce. In contrast to the Colorado blue spruce, there were also a number of Norway spruce stands in the Ore Mountains older than 60 years. The infestation of Norway spruce by spruce bud blight differed significantly depending upon stand age (GLMM: $n = 85$; $df = 12$; $p < 0.01$). In the initial (acute) phase of the pathogen's spread in 2016, an average of 80% of individuals in the 31–60 year age class were infested in the research plots, while only 42% of individuals were infested in older stands (Figure 3). The proportion of infested individuals changed during the period under study. There was a gradual decrease in the number of infested individuals in the age class of 31–60 years, and a sharp increase was recorded in the age class of 61–100 years in the final two years of the research period. In 2020, the proportion of

infested individuals in the 31–60 year age class was 68% and in the 61–100 year age class it was 62%. The relationship between the proportion of infested individuals and age of the stand varied during the monitored period. At the beginning of the survey in 2016, the proportion of infested individuals decreased with age, but this trend changed over time, due to both a drop in infestations in younger stands and an increase in infestations in older stands. In 2020, this trend more or less disappeared, but the comparison with 2016 was not statistically significant (GLMM: $n = 85$; $df = 12$; $p = 0.06$; Figure 4).

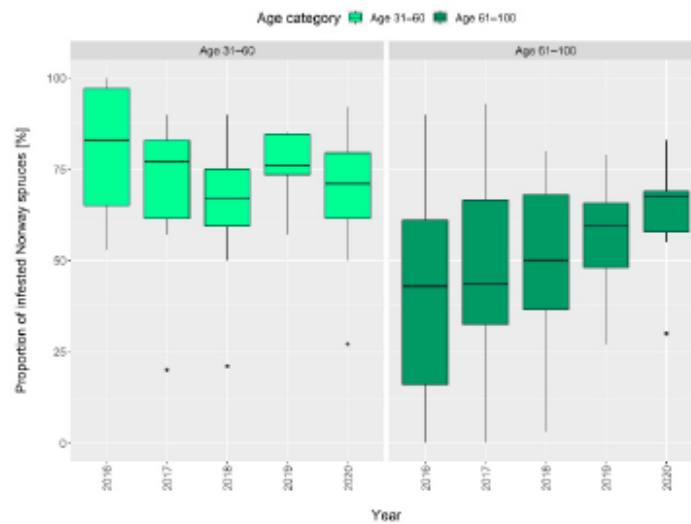


Figure 3. Proportion of individual Norway spruce trees infested by spruce bud blight by age classes in years 2016–2020. Horizontal line in middle of a box is the median, whiskers represent 1.5 times the interquartile range.

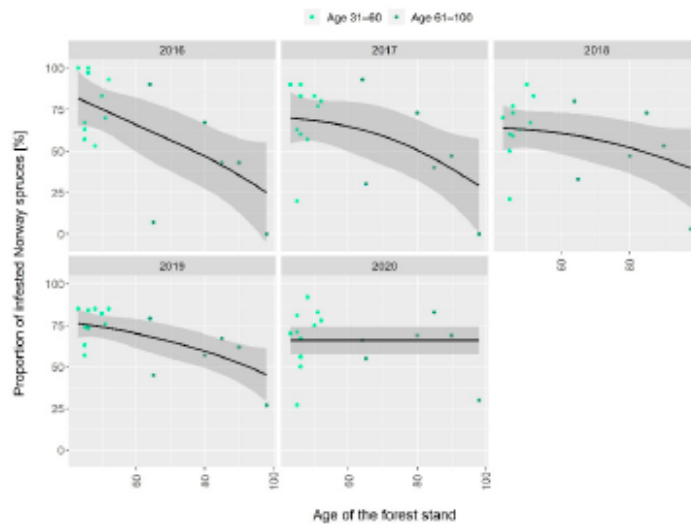


Figure 4. Comparison of the proportion of infested trees by age in years 2016–2020.

In terms of infestation severity in individual categories, there is a clear difference between younger and older stands of Norway spruce as to the proportions of heavily infested trees (categories 3 and 4), which was more than double in stands aged 31–60 years (Figures 5 and 6). The steady decline in the number of uninfested trees and gradual increase in infestation categories 1, 2, and 3 in the 61–100 year age class (Figure 7) is remarkable. By contrast, in the 31–60 years age class, there was a gradual regeneration of stands during 2016–2018, as represented by an increase in the number of uninfested trees, then a sudden deterioration of the situation in 2019, followed by another regeneration phase from 2020 onwards (Figure 5).

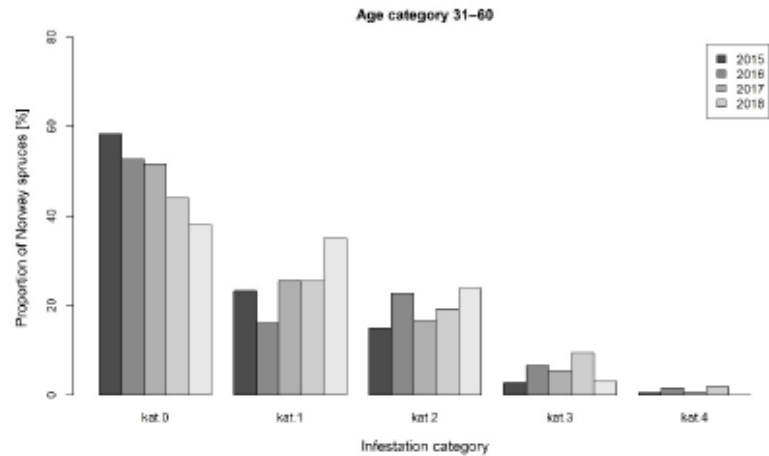


Figure 5. Proportions of infested Norway spruce trees by individual infestation categories in age class 31–60 years during 2016–2020.

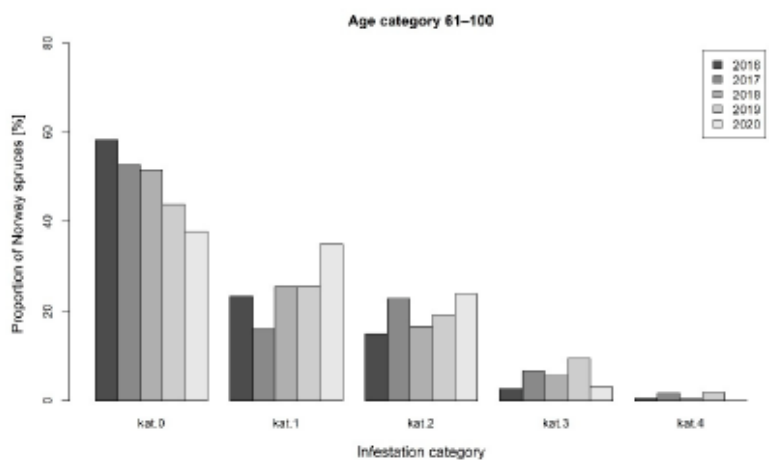


Figure 6. Proportion of infested Norway spruce trees by individual infestation categories in age class 61–100 years during 2016–2020.

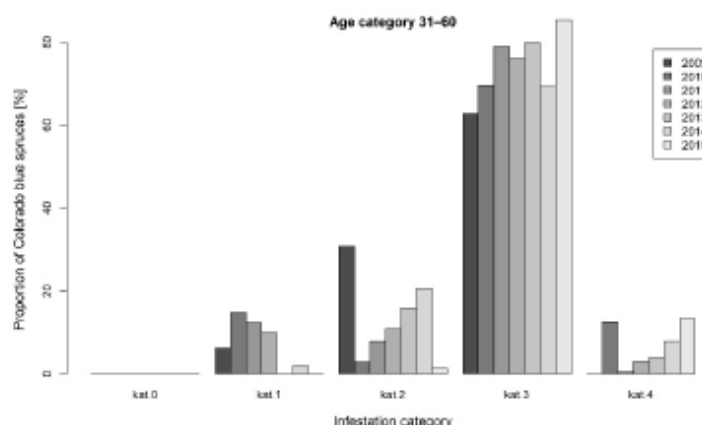


Figure 7. Proportions of infested Colorado blue spruce trees by individual infestation categories in age class 31–60 years during 2009–2015.

A completely different development of the pathogen can be observed in Colorado blue spruce in the age class of 31–60 years. This can be characterized as a continuous growth in infestation (Figure 6). The effect on Colorado blue was more pronounced by the pathogen, with an infestation category 3 (75% of individuals on average, Figure 6; for Norway spruce only 11% of individuals on average were in category 3, Figure 5). No uninfested trees were present in the Colorado blue spruce plots. The least damaged trees in category 1 were shifting to category 2, indicating a gradual deterioration of health (Figure 6).

Among the abiotic factors, damage to sprouting shoots with a subsequent infestation by the fungus *Botrytis cinerea* Pers., was observed in Colorado blue spruce. A frequent phenomenon wherein no damage to the buds occurred was dehydration (rusting of annual and, to a lesser extent, possibly older needles) during the dormant season and in very early spring, especially in sunny locations. Locally, ground-level ozone damage was investigated. None of the abiotic damage was of concern, and it was not very significant from the phytopathological point of view.

Among other fungal pathogens, *Lophodermium piceae* (Fuckel) Höhn. was observed on Colorado blue spruce and *Sirococcus conigenus* (Pers.) P.F. Cannon and Minter on shoots and needles. When they occurred heavily and repeatedly, both pathogens proved to be significant pests, and especially for young stands at sites with stable high air humidity. The genus *Armillaria* was frequently observed at the epicenter of occurrence on drying and dead individuals of both Colorado blue spruce and Norway spruce of various ages. Other fungi identified were of the genera *Rhizosphaera* and *Cytospora*, and some wood-destroying fungi (*Stereum sanguinolentum* (Alb. and Schwein.) Fr.) were found rather individually with no major significance for Colorado blue spruce or Norway spruce.

4. Discussion

The current dieback of Colorado blue spruce substitute stands, and deteriorated health of Norway spruce have their origins in the second half of the 20th century. Replacement stands were set up because of the significant damage to the original spruce cultures by air pollution, mainly by SO_x and NO_x deposition and high concentrations of hydrogen fluoride. Sulfur dioxide, due to its direct effect on the assimilation apparatus of trees and indirect effect on soil chemistry, subsequently caused vegetation to die in an area of approximately 40,000 ha [10]. Between 1990 and 2000, SO_x emissions in the region of North Bohemia decreased by 87% and direct emissions have had practically no effect on the health status of vegetation today [10]. Nevertheless, the increased deposition of NO_x and NH_4^+ ammonium ions continue in contributing to soil acidification. In these

acidic soils, low nutrient content is also a significant problem. Potassium content, for instance, is less than $3500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in almost all parts of the Ore Mountains [44], which is a complication for growing trees in mountainous areas. The desulfurization of power plants that has been recorded in recent years [10,45,46] may be related to the current widespread spruce bud blight in the Ore Mountains. Sulfur actually acted as a fungistatic, thereby inhibiting development of the pathogen in these areas. When its content in pollutants was reduced, large scale fructification and spread of spruce bud blight occurred on Colorado blue spruce [20].

The negative impact of the aforementioned anthropogenic factors, resulting in biomass reduction, is evident [47]; furthermore, there has also been an increase in ozone (O_3) in recent years. Nevertheless, the persisting problem is the long-lasting soil acidification caused by air pollution. The poor soil fertility [44] reduces the defensive abilities of woody plants, resulting in the pathogen's successful attack [48]. Younger trees are generally more susceptible to air pollution than are mature trees, as they are able to obtain fewer nutrients needed for growth and securing of defense mechanisms [49]. Nevertheless, older stands can also be damaged by air pollution, especially because the canopy can act as a filter that reduces the amount of pollutants reaching the ground [50]. In addition, individuals in the understory generally have lower stomatal conductance, which results in less penetration by harmful substances into the tissue, thus contributing to less infestation of younger and shaded plants [51].

During the monitored period from 2009 to 2015, not a single completely healthy individual was observed in the stands of replacement trees composed of Colorado blue spruce. The infestation quickly reached disastrous proportions even before its peak in 2012. In 2013 and 2014, the observed infestation diminished slightly, but in 2015 the health of Colorado blue spruce deteriorated significantly. The infestation began to spread noticeably also on Norway spruce, even though, until 2015, and despite the significant impact of air pollution and decay of replacement stands of Colorado blue spruce, a major presence of spruce bud blight was not detected [22]. The situation abroad is similar, with only the following countries having confirmed the occurrence to date: the Czech Republic [20,40,52], Ireland [29], Italy [30], Alaska [53], and Great Britain [17]. No occurrence has yet been confirmed in Northern Europe. Pettersson [54] attributes this to low winter temperatures, which, despite the psychrophilic nature of the spruce bud blight, may limit the development of the pathogen.

The significantly poorer health of Colorado blue spruce caused by the pathogen can be attributed to two factors namely the choice of a tree species was not entirely appropriate for Czech Republic conditions because of different ecological valence and the planting of Colorado blue spruce led to the destruction of the original ecosystems during reforestation and led to the removal of the original stands destroyed by pollutants [55]. The initially higher resistance to air pollution became completely irrelevant after desulfurization of power plants in 2000, especially as the fungistatic function of sulfur was eliminated and spruce bud blight spread as a result. Trees that replaced the original Norway spruces were unable to acclimate to Czech Republic conditions and, due to the presence of sulfur, did not develop the necessary resistance to the pathogen [56].

Although the highest level of infestation was found in stands aged 31–60 years, the trend of progressive infestation was most pronounced in the age category older than 60 years, mainly due to the increase in damaged individuals in categories 1 and 2. This difference was clearly visible in 2019 and 2020. To consider another example, in case of the pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz and Hosoya, more frequent infestations of younger ash trees were also observed [57]. Older trees tend to be more resistant to damage, but if the frequency of infection is higher in several successive years, then skeletal branches may start to drop off, which results in dying back. Younger ash trees are usually infected more frequently, mainly due to the spread of the pathogen from fallen leaves and petioles that are on the ground. In fact, intensity of spore dispersal on the ground is 5–100 times greater than at just 3 m above the ground [58]. Spruce bud blight

spreads primarily in the tree crown, where the number of buds may also play a role, and this is usually lower in younger individuals due to the denser canopy. Older individuals may initially be better able to resist pathogen infection due to their more developed defense mechanisms. If they are, however, exposed to infectious pressure repeatedly and unsuitable soil conditions for growth of woody plants persist over the long term [35], then the overall condition of trees may be worsened.

During the evaluation, other harmful factors of both an abiotic and biotic nature could also be observed, and to some extent these affected the overall health of the stands. In some years, frost damage to buds occurred frequently. In North America, spruce trees have been reported to be infested by the fungus *Dichomera gemmicola* A. Funk and B. Sutton, the bud blight from which may be confused with that of *G. piceae* at its first stage of development. The pathogen was previously observed 50 years ago in areas of eastern Canada [59]. Upon initial investigation, it may be confused on the basis of morphological traits and very similar symptoms, such as twisting of young shoots [35], but upon microscopic examination the fungi are easily distinguishable [60].

In recent decades, there has been an increasing trend in the average annual temperature and the number of days with a daily temperature of above 5 °C during winter months. Over the past 30 years, annual rainfall has been below the usual levels. This combination suggests an increase in drought stress during both winter and summer months, while the drought effect on the level of pathogen infestation has also been proven [61]. Thus, in the case of spruce bud blight, changes in climatic conditions may influence the intensity of infestation but are unlikely to be the most important factor at stand level. In the research plots, individuals with very different infestation rates were found almost side by side, and these individuals were equivalently influenced by climate and soil characteristics. From the physiological measurements, it is clear that the *G. piceae* negatively influences the water regime of the spruce and reduces the water-use efficiency (WUE_{int}) in the shoots [62]. This can boost the drought stress and suppress the resistance to further pathogen attack.

A similar and severe spread of pathogens has occurred in the past in the spruce stands of the Eagle Mountains in the Czech Republic [59], namely as a result of the fungus *Ascochyx abietina* (Lagerb.) Schläpfl.-Bermh., which is also known to have affected pine stands in Austria, Sweden, and Poland [63–66]. The pathogen appeared with similar dramatic suddenness and caused bud damage to both Colorado blue spruce and Norway spruce saplings. Years with deeper snow cover also played a role, creating optimal conditions for the pathogen to develop, thereby resulting in massive fructification, which caused its significant spread [63]. Weather conditions were also an important factor in its development, with the summer months having lower than average air temperatures and higher-than-average relative humidity. This established favorable conditions for the development of the pathogen and weakened trees' resistance. A similar phenomenon was recently observed in the Ore Mountains, where, after the colder year of 2017, a massive spread occurred in 2018. Provenance also influence the spruce's resistance. It is evident that lower altitude provenances tend to become more stressed by abiotic factors in mountain areas, making it easier for the pathogen to infect individuals. This is particularly true for *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* [65,67]. In the case of spruce, on the other hand, this has not yet been confirmed, although the negative effect of provenance suitability could also be observed [68]. To date, scientific verification as to the relationship between infestation intensity and the influence of spruce genotypes has not yet been carried out.

5. Conclusions

The main cause for the significant spread of bud-blight disease in the Ore Mountains since 2015 remains poorly understood. A complex set of causes is being considered, including unsuitable soil conditions (low pH and, typical of mountain ecosystems, low nutrient content, such as of potassium) [44]. In addition, one needs to consider the impossibility to predict climate fluctuations and, in the longer term, the development of soil conditions in mountainous areas, of which the influence has not yet been sufficiently described and quan-

tified in the context of pathogen infestation. Therefore, predicting further developments is complicated.

The influence of the surrounding strongly infected Colorado blue spruce trees also remains uncertain. If ideal conditions for the development of the fungus arise, then the breakdown of Norway spruce stands may occur, making spruce bud blight a key and conditional factor for spruce cultivation in the Ore Mountains. This hypothesis is based upon findings of the expanding range of the pathogen's infestation in Norway spruce. In 2018 and 2019, the occurrence of spruce bud blight on Norway spruce was confirmed in the area of the Jizera Mountains and Giant Mountains [69].

A combination of anthropogenic and biotic damaging factors could lead to the irreversible destruction of vegetation in mountain areas in the future. Moreover, trees weakened by air pollution or pathogen infection may become easy targets, especially for secondary harmful agents. Root rot could become a significant problem in the future, and especially *Armillaria* spp. [70], which, in combination with genera *Stereum* spp. and *Heterobasidion* spp., already pose major risks when growing woody plants on former agricultural lands, even in foothill areas. Following these threats, the cambiohagous insects, especially bark beetles (*Ips typographus* (L.), *Pityogenes chalcographus* (L.)) are in a state of permanent outbreak in the Czech Republic [71].

Author Contributions: Conceptualization, R.M., M.S., V.P.; methodology, V.P., R.M.; validation, M.S., V.P., R.M.; formal analysis, R.M.; investigation, M.S., V.P., R.M., J.V., D.B., I.T., F.L.; data curation, M.S., V.P., R.M., D.B., I.T., F.L., J.V.; writing—original draft preparation, M.S., V.P., R.M., I.T., F.L., D.B., J.V.; visualization, R.M., D.B., M.S., V.P.; supervision, R.M., V.P.; project administration, V.P., R.M.; funding acquisition, V.P., R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by GS LČR 68 under project “Picea abies attacked by Gemmomyces spruce bud blight—case study in the Ore Mountains”; by NAZV under the project “Objectivization of the method for detection of the occurrence and dynamics of forest damaging agents by modern remote sensing tools as a decision support mean for the state forest administrative” (grant number QK1920458), as provided by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. Infrastructural support and salary for R.M. and I.T. was also obtained from “EXTEMIT-K,” No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000433 financed by OP RDE. Infrastructural support and salary for V.P. was also obtained from “EVA 4.0”, No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000803 financed by OP RDE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to policy of the institute.

Acknowledgments: The authors would like to thank Aleš Kilb (forest manager district Litvínov, State Forest Enterprise Lesy ČR), who initialized damage research on the Colorado blue spruce in 2009; František Soukup, who assisted in establishing the first permanent plots in the Fláje area, and Daniel Týšer who helped with the graphical abstract. The authors would like to thank Gale A. Kirking at English Editorial Services, s. r. o. for linguistic improvements.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kandler, O.; Innes, J.L. Air pollution and forest decline in Central Europe. *Environ. Pollut.* **1995**, *90*, 171–180. [[CrossRef](#)]
2. Fuhrer, J. Formation of secondary air pollutants and their occurrence in Europe. *Experientia* **1985**, *41*, 286–301. [[CrossRef](#)]
3. Ulrich, B. Effects of air pollution on forest ecosystems and waters. The principles demonstrated at a case study in central Europe. *Atmos. Environ.* **1984**, *18*, 621–628. [[CrossRef](#)]
4. Lomský, B.; Materna, J.; Pfarz, H. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti: Jiloviště-Strnady? In *SO₂—Pollution and Forests Decline in the Ore Mountains*, 1st ed.; Forestry and Game Management Research Institute: Jiloviště, Czech Republic, 2002; 342p, ISBN 80-86461-24-6.
5. Nožička, J. Kouřové škody v našich lesích a boj proti nim do roku 1918. *Práce VÚL. ČsR* **1963**, *26*, 237–258.
6. Stoklasa, J. Beschädigung der Vegetation durch Rauchgase und Fabriksexhalationen. *Urban Und. Schwanzenberg Berl.* **1923**, 487.
7. Haselhoff, E.; Lindau, G. Die Beschädigung der Vegetation durch Rauch. *Leipzig* **1903**, 412. [[CrossRef](#)]

8. Slodičák, M. Pěstování porostů náhradních dřevin. In: Problematika zachování porostů náhradních dřevin v imisní oblasti Krušných hor. *Sborník Ref. Z. Čelostátní Konf. Most* **1999**, 33–40.
9. Slodičák, M.; Balcar, V.; Novák, J.; Lomský, B.; Šrámek, V.; Navrátil, P.; Kacálek, D.; Mauer, O.; Kula, E.; Podrázský, V.; et al. Lesnické hospodaření v Krušných horách. In *LČR, VÚLHM: Hradec Králové, Strnady, Edice Grantové služby LČR Czech Republic; Česká zemědělská univerzita v Praze: Kamýčká, Czech Republic*, 2008; p. 480. ISBN 978-80-86945-04-0.
10. Šrámek, V.; Balcar, V.; Buriának, V.; Havránek, E.; Jurásek, A.; Liška, J.; Novák, M.; Slodičák, M. *Aktualizace Studie. Lesnické Hospodaření v Krušných Horách*, 1st ed.; Jiloviště, Výzkumný Ústav Lesního Hospodářství a Myslivosti, v.v.i.: Strnady, Czech Republic, 2015; p. 195.
11. Vacek, S.; Hünová, I.; Vacek, Z.; Hejmanová, P.; Podrázský, V.; Král, J.; Moser, W.K. Effects of air pollution and climatic factors on Norway spruce forests in the Orlické hory Mts. (Czech Republic), 1979–2014. *Eur. J. For. Res.* **2015**, *134*, 1127–1142. [[CrossRef](#)]
12. Gehring, C.A.; Mueller, R.C.; Haskins, K.E.; Rubow, T.K.; Whitham, T.G. Convergence in mycorrhizal fungal communities due to drought, plant competition, parasitism and susceptibility to herbivory: Consequences for fungi and host plants. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 306. [[CrossRef](#)]
13. Šulc, M.; Tomášková, I.; Krejzková, A.; Samek, M.; Diuzheva, A.; Hradecký, J.; Pešková, V. Trehalose determination in Norway spruce (*Picea abies*) roots. *Analytics matters. MethodsX* **2021**, *8*, 101280. [[CrossRef](#)]
14. Pešková, V.; Soukup, F. Prosychnání a odumírání dřevin. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2008 a jejich očekávaný stav v roce 2009. In *Zprávy Ochrany Lesa. Supplementum*; Knížek, M., Ed.; Jiloviště, Výzkumný Ústav Lesního Hospodářství a Myslivosti, v.v.i.: Strnady, Czech Republic, 2009; pp. 43–44. ISBN 978-80-7417-011-9.
15. Pospíšil, F.; Pospíšil, J. Poškození smrku pichlavého kloubnatkou v Krušných horách. *Zprav. Ochr. Lesa* **2011**, *15*, 76–79.
16. Zýka, V.; Černý, K.; Strnadová, V.; Zahradník, D.; Hrabětová, M.; Havrdová, L.; Romportl, D. *Průběh Poškození Smrku Pichlavého Kloubnatkou Smrkovou v Krušných Horách*, 1st ed.; Výzkumný Ústav Silva Taroucy Pro Krajinu a Okrasné Zahradnictví, v.v.i.: Průhonice, Czech Republic, 2018; p. 47. ISBN 978-80-87674-29-1.
17. Borthwick, A.W. A new disease of *Picea*. In *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh*; Nabu Press: Edinburgh, UK, 1909; pp. 259–261. ISBN 978-1247782461.
18. Shoemaker, R.A. *Cucurbitaria piceae* and associated *Sphaeropsidales* parasitic on spruce buds. *Can. J. Bot.* **1967**, *45*, 1243–1248. [[CrossRef](#)]
19. Jaklitsch, W.M.; Voglmayr, H. Three former taxa of *Cucurbitaria* and considerations on *Petrakia* in the Melanommataceae. *Sydowia* **2017**, *69*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pešková, V.; Soukup, F. Současná situace v porostech smrku pichlavého v Krušných horách. *Lesn. Práce* **2013**, *10*, 46–47.
21. Černý, K.; Pešková, V.; Soukup, F.; Havrdová, L.; Strnadová, V.; Zahradník, D.; Hrabětová, M. Gemmamyces bud blight of *Picea pungens*: A sudden disease outbreak in Central Europe. *Plant Pathol.* **2016**, *65*, 1267–1278. [[CrossRef](#)]
22. Pešková, V.; Modlinger, R.; Tomášková, I.; Samek, M.; Bařa, D.; Lorenc, F.; Dušek, D.; Kacálek, D. Vliv faktorů prostředí na napadení smrku ztepilého kloubnatkou smrkovou a návrh praktických postupů omezujících její šíření. In *Závěrečná Zpráva, Grantová Služba Lesy České Republiky, s.p.; Výzkumný Ústav Silva Taroucy Pro Krajinu a Okrasné Zahradnictví, v.v.i.: Jiloviště, Czech Republic*, 2020; p. 94.
23. Köck, G. Ein für Österreich neuer Schädling auf *Picea pungens*. *Osterr. Gart.* **1918**, *13*, 147–148.
24. Ferdinandsen, C.; Jørgensen, C.A. Skovtræernes Sygdomme. Copenhagen. *Den. Gyldeandl.* **1938**, 570.
25. Muller, E. Eine neue Krankheit der Stechfichte. *Schweiz. Beitr. Zur Dendrol.* **1950**, *2*, 69–72.
26. Thiringer, J.O. Eine für Schweden neue Knospenkrankheit auf Koniferen. *Göteborg. Bot. Tradg.* **1964**, *27*, 1–6.
27. Schneider, R.; Daebeler, F. Eine für Deutschland neue Knospenkrankheit an *Picea pungens* var. *glauca* (Ereger: *Cucurbitaria piceae* Borthwick). *Phytopathol. Z.* **1968**, *63*, 388–392. [[CrossRef](#)]
28. Muskett, A.; Malone, J. Catalogue of Irish Fungi—IV. Ascomycotina. *Proc. R. Ir. Academy. Sect. B Biol. Geol. Chem. Sci.* **1983**, *83B*, 151–213.
29. Tuffen, M.G.; Grogan, H.M. Current, emerging and potential pest threats to Sitka spruce plantations and the role of pest risk analysis in preventing new pest introductions to Ireland. *Forestry* **2019**, *92*, 26–41. [[CrossRef](#)]
30. Fejge, G.B.; Ale-Agha, N.; Jensen, M.; Christiaans, B.; Kricke, R. New, rare or remarkable microfungi in the Italian Alps (Carnic Alps)—part I—ascomycotina. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2004**, *69*, 457–465. [[PubMed](#)]
31. Tomiczek, C.; Cech, T.L.; Fürst, A.; Hoyer-Tomiczek, U.; Krehan, H.; Pemy, B.; Steyer, G. Waldschutzsituation 2010 in Österreich. *Forstsch. Aktuell* **2011**, 523.
32. Ogris, N.; Jurec, D. Tree diseases determined by the reporting, prognostic and diagnostic service for forests in Slovenia 1982–2012. *Acta Silvae Ligni* **2013**, *102*, 31–42. [[CrossRef](#)]
33. Tubeuf, C. Schilderungen und Bilder aus nordamerikanischen Wäldern. *Naturwissenschaftliche Zeitschrift für Forst- und Landwirtschaft. Z. Für Pflanzenkrankh. (Pflanzenpathol.) Und Pflanzenschutz* **1919**, *17*, 1–44.
34. Redfern, D.; Boswell, R.; Proudfoot, J. Forest condition 1996. Research information note 291. *For. Comm.* **1997**, 6.
35. Winton, L.; Spruce bud blights. Spruce Bud Blights. Region 10—Forest & Grassland Health. US Forest Service. 2020. Available online: <https://www.fs.usda.gov/detailfull/r10/forest-grasslandhealth/?cid=FSEPRD535386> (accessed on 10 July 2020).
36. Alford, D.V. (Ed.) *Pest and Disease Management Handbook*; British Crop Protection Enterprises: Oxford, UK, 2000; p. 624. [[CrossRef](#)]
37. Pešková, V.; Modlinger, R. Stav napadení smrku pichlavého a ztepilého kloubnatkou smrkovou. *Lesn. Práce* **2015**, *3*, 48–49.
38. Soukup, F.; Pešková, V. *Gemmamyces piceae* (Borthw.) Casagr. kloubnatka smrková. *Lesn. Práce* **2009**, *88*, 1–4.


39. Šeňl, J.; Mottlová, V.; Schořálková, I. Bud blight (*Gemmamyces piceae*) in the eastern part of the Krušné hory Mountains. *J. For. Sci.* **2020**, *66*, 309–317. [CrossRef]
40. Pešková, V.; Modlinger, R.; Soukup, F.; Ručková, J. Nárůst napadení smrků ztepilého kloubnatkou smrkovou v Krušných horách. *Lesn. Práce* **2016**, *95*, 46–47.
41. Zuur, A.F.; Ieno, E.N.; Elphick, C.S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* **2010**, *1*, 3–14. [CrossRef]
42. Brooks, M.E.; Kristensen, K.; Benthem, K.; Magnusson, A.; Berg, C.W.; Nielsen, A.; Skaug, H.J.; Mächler, M.; Bolker, B.M. glmmTMB Balances Speed and Flexibility among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *R J.* **2017**, *9*, 378–400. [CrossRef]
43. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. 2020. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 12 September 2021).
44. Fiala, P.; Reiningger, D.; Samek, T. Chemismus půdního prostředí a jehlic smrků ztepilého (*Picea abies*/L./Karst.) ve vápněných a kontrolních porostech Krušných hor. *Zprávy Lesn. Výzkumu* **2017**, *62*, 23–32.
45. Hadaš, P. Stav imisí a depozicí v přírodní lesní oblasti Krušných hor. *Lesn. Práce* **2002**, *81*, 11.
46. Czech Hydrometeorological Institute. *Air Pollution in the Czech Republic in 2019*; CHMI: Prague, Czech Republic, 2020; p. 204. ISBN 978-80-7653-013-3.
47. Baciak, M.; Warmiński, K.; Bęś, A. The effect of selected gaseous air pollutants on woody plants. *Leśne Pr. Badaw.* **2015**, *76*, 401–409. [CrossRef]
48. Paoletti, E.; Schaub, M.; Matyssek, R.; Wieser, G.; Augustaitis, A.; Bastrup-Birk, A.M.; Bytnerowicz, A.; Günthardt-Goerg, M.S.; Müller-Starck, G.; Serengil, Y. Advances of air pollution science: From forest decline to multiple-stress effects on forest ecosystem services. *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 1986–1989. [CrossRef]
49. Kozłowski, T.T. Susceptibility of young tree seedlings to environmental stress—Amer. *Nurseryman* **1976**, *144*, 55–59.
50. Bytnerowicz, A. Physiological aspects of air pollution stress in forests. *Phyton* **1996**, *36*, 15–22.
51. Šeňl, J. Kloubnatka smrková (*Gemmamyces piceae*) ve vybraných porostech v oblasti Flájské přehrady v letech 2010–2012. *Studia Oecologica* **2013**, *1*, 59–71.
52. Kozłowski, T.T.; Kramer, P.J.; Pallardy, S.G. *The Physiological Ecology of Woody Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1990; p. 678. ISBN 978-0-12-424160-2.
53. Peralta, S.M.G.; Adams, G.C.; Winton, L.; Cerny, K.; Everhart, S.E. An outbreak of bud blight disease of spruce (*Picea* spp.) in Alaska: An epidemiological study of *Gemmamyces piceae*. *Plant Health*. 2020. Available online: <https://apsnet.confex.com/apsnet/2020/meetingapp.cgi/Paper/16863> (accessed on 17 September 2021).
54. Pettersson, J.M. Diseases on Christmas Trees in Southern Sweden and Western North Carolina with Emphasis on *Phytophthora* Root Rot and *Neonectria* Canker. Ph.D. Thesis, Southern Swedish Forest Research Centre, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2018; p. 78. ISBN 978-91-7760-170-8.
55. Fanta, J. Rehabilitating degraded forests in Central Europe into self-sustaining forest ecosystems. *Ecol. Eng.* **1997**, *8*, 289–297. [CrossRef]
56. Klopčič, M.; Poljanec, A.; Gartner, A.; Boncina, A. Factors related to natural disturbances in mountain Norway spruce (*Picea abies*) forests in the Julian Alps. *Ecoscience* **2009**, *16*, 48–57. [CrossRef]
57. Timmermann, V.; Nagy, N.E.; Hietala, A.M.; Borja, I.; Solheim, H. Progression of ash dieback in Norway related to tree age, disease history and regional aspects. *Balt. For.* **2017**, *23*, 150–158.
58. Chandelier, A.; Helson, M.; Dvorak, M.; Gischer, F. Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudotsugae* using real-time PCR assays. *Plant Pathol.* **2014**, *63*, 1296–1305. [CrossRef]
59. Funk, A.; Sutton, B.C. A disease of conifer buds in western Canada associated with *Dichomera gemmicola* n. sp. *Can. J. Bot.* **1972**, *50*, 1513–1518. [CrossRef]
60. Sherwood, P.; Villari, C.; Capretti, P.; Bonello, P. Mechanism of induced susceptibility to *Diplodia* tip blight in drought-stressed Austrian pine. *Tree Physiol.* **2015**, *35*, 549–562. [CrossRef]
61. Soukup, F.; Pešková, V. Napadení poškozených smrků v Orlických horách houbou *Ascochyta abietina*. *Lesn. Práce* **2000**, *79*, 472–473.
62. Tomášková, I. Water use efficiency of Norway spruce with bud blight disease. *Acta Hort.* **2018**, *1222*, 133–136. [CrossRef]
63. Hansson, P. *Gremmeniella abietina* in Northern Sweden: Silvicultural Aspects of Disease Development in the Introduced *Pinus contorta* and in *Pinus sylvestris*. Management of *Pinus sylvestris* Stands Infected by *Gremmeniella abietina*. Ph.D. Thesis, Southern Swedish Forest Research Centre, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1998; p. 40.
64. Sierota, Z.; Grodzki, W.; Szczepkowski, A. Abiotic and biotic disturbances affecting forest health in Poland over the past 30 years: Impacts of climate and forest management. *Forests* **2019**, *10*, 75. [CrossRef]
65. Hansson, P. Susceptibility of different provenances of *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta* and *Picea abies* to *Gremmeniella abietina*. *Eur. J. For. Pathol.* **1998**, *28*, 21–32. [CrossRef]
66. Serrn, J. Tree mortality caused by *Gremmeniella abietina* in a subalpine afforestation in the central Alps and its relationship with duration of snow cover. *Eur. J. For. Pathol.* **1999**, *29*, 65–74. [CrossRef]
67. Stefansson, E.; Sinko, M. Experiments with provenances of Scots Pine, with special regard to high ground in N. Sweden. *Studia For. Suec.* **1967**, *47*, 108.

68. Pulkkinen, P. Frost hardiness development and lignification of young Norway spruce seedlings of southern and northern Finnish origin. *Silva Fenn.* **1993**, *27*, 47–54. [[CrossRef](#)]
69. Pešková, V.; Samek, M.; Modlinger, R.; Vele, A. Původní patogen smrku pichlavého se stává nebezpečím pro naše horské smrčiny. *Krkonoše Jižerské Hory* **2019**, *8*, 22–23.
70. Skovsgaard, J.P.; Thomsen, I.M.; Skovgaard, I.M.; Martinussen, T. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *For. Pathol.* **2010**, *40*, 7–18. [[CrossRef](#)]
71. Hlásný, T.; Zimová, S.; Merganičová, K.; Štěpánek, P.; Modlinger, R.; Turčáni, M. Devastating outbreak of bark beetles in the Czech Republic: Drivers, impacts, and management implications. *For. Ecol. Manag.* **2021**, *490*, 13. [[CrossRef](#)]

Příloha 9 *Gemmamyces piceae* Bud Blight Damage in Norway Spruce (*Picea abies*) and Colorado Blue Spruce (*Picea pungens*) Forest Stands

Article

Impact of *Rhabdocline pseudotsugae* and *Phaeocryptopus gaumannii* on the Selection of Suitable Provenances of Douglas Fir in Central Europe

Michal Samek ^{1,*}, Petr Novotný ², Roman Modlinger ¹, Martin Fulín ², František Beran ², Amit Roy ¹  and Vítězslava Pešková ¹

¹ Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, CZ-165 00 Prague, Czech Republic; modlinger@fd.czu.cz (R.M.); roy@fd.czu.cz (A.R.); peskovav@fd.czu.cz (V.P.)

² Department of Forest Tree Species Biology and Breeding, Forestry and Game Management Research Institute, Strnady 136, 252 02, Jiloviště, Czech Republic; pnovotny@vulhm.cz (P.N.); fulin@vulhm.cz (M.F.); beran@vulhm.cz (F.B.)

* Correspondence: samekm@fd.czu.cz; Tel: +420-725-185-390

Received: 31 January 2019; Accepted: 22 February 2019; Published: 26 February 2019



Abstract: Two diseases, Rhabdocline needle cast caused by *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow, and Swiss needle cast caused by *Phaeocryptopus gaumannii* (Rohde) Petr., recently became a severe threat to Central European Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) stands. Both pathogens infect assimilative organs causing needle chloritization and drop off. Pervasive infection by these pathogens has been recorded at the Hlírky provenance trial (Písek, South Bohemia, Czech Republic), established in 1971 as part of a series of experiments by International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). The intensity and duration of needle cast sporulation were monitored using a Burkard spore trap, and the health status of 24 Douglas fir provenances from the original area of distribution (British Columbia, Washington, Oregon) was evaluated under this trial. While comparing provenances, the following characteristics were surveyed: trunk volume, defoliation rate, and the difference in tree diameter between measurements in 2011 and 2016. A statistical evaluation was performed using the regression model and a decision tree. The highest sporulation rates on needles for both needle casts were observed from April to July. The Washington provenances 1069 North Bend, 1075 Enumclaw, and 1089 Cathlamet can be recommended for plantation, considering the provenances' satisfactory productivity and low extent of damage from needle casts, while the provenances such as 1104 Brookings, 1028 Merritt (due to high mortality) and 1010 Barrière, 1021 D'Arcy, and 1067 Skykomish (due to high defoliation) are not suitable for plantation under Central European conditions.

Keywords: *Pseudotsuga menziesii*; IUFRO provenance trial; climate change; Central Europe; invasive species; Rhabdocline needle cast; Swiss needle cast; health status

1. Introduction

During an examination of stands health in the neighborhood of the Hlírky research trial (Czech Republic) in 2012, infections of Douglas fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco caused by pathogens *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow and *Phaeocryptopus gaumannii* (Rohde) Petr. were recorded for the first time. The occurrences of both needle casts were directly observed during the research trial itself. However, in 2011, when the trial had been evaluated by Kšir et al. [1], the needle cast problem was deemed insignificant. A repeated examination of the tree health status in 2015 confirmed the

regular occurrence of both needle casts in the surrounding stands, and an increased infection rate was also reasserted in the provenance trial, with apparent differences in the defoliation of individual provenances detected.

Douglas fir has been introduced to Central Europe by forest managers for its high production of commercially valuable products and also for its ability to stabilize forest stands, mainly against windthrow [2,3]. Various plantations of this species with undocumented origin were created in Europe during the 19th century, while first provenance-based research, oriented to survival rate, production, and quality, was performed in Germany in 1910 [4]. It is also considered as an alternative to the domestic Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in areas where the quality of the litter has deteriorated [3]. In comparison to Norway spruce, Douglas fir has a smaller effect on soil nutrients and has a positive effect on humus production, soil pH, and can regenerate naturally under suitable silvicultural treatments [2,5,6].

Although Douglas fir has successfully regenerated naturally in a number of European locations, e.g., References [7–11], artificial renewal of partially adapted first-generation Douglas fir stands has had mixed success. The most significant limitation, however, is the low quality of seeds from European sources [12,13]. In contrast to seeds from North America, European seeds exhibit low germination rates [2,14] and low resistance to the Douglas fir seed chalcid *Megastigmus spermotrophus* Wachtl, 1893 [2,15]. Hence, stand renewal can often fail even after using the seed orchards, and European forest managers have no other practical alternatives than relying on imports from the US and Canada [12]. Ultimately, the use of seeds from local sources with pre-adaptation to the site conditions of Central Europe is most the desirable option [16].

The natural range of the Douglas fir is large, and that is reflected in its substantial intra-species variability. Two varieties are currently distinguished [17] as *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii* (from here on *P. m.* var. *menziesii*) and *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *glauca* (from here on *P. m.* var. *glauca*). While *P. m.* var. *menziesii* grows closer to the Pacific coast at altitudes ranging from sea level to 1950 m a.s.l., *P. m.* var. *glauca* inhabits the more continental climate of mountainous and inland areas at altitudes of 250 m a.s.l. in the north to 3350 m a.s.l. in the south [18]. The main differences between the varieties are in the coloration of their needles, maximum age and size, growth rate and cycle, and resistance to climatic extremes and biological pests [19]. *P. m.* var. *menziesii* has the fastest growth and higher productivity and is usually more resistant to needle casts. However, it is more sensitive to winter transpiration and requires higher soil moisture to grow [20]. Alternatively, *P. m.* var. *glauca* grows more slowly and rarely reaches to 40 m height. It is frost-resistant and capable of enduring more massive shading and drought (arid conditions). However, due to its lower productivity, it is less used in Central European forestry [12,19].

In the domestic range of Douglas fir, fire is the decisive disturbance factor shaping the structure of local forests [21]. The selection pressures of abiotic factors such as frost and drought have contributed to the creation of a number of Douglas fir populations [22]. Among biotic pests, *Dendroctonus pseudotsugae* Hopkins, 1905 and *Orgyia pseudotsugata* have been shown to have a long-term impact on Douglas fir growth. Swiss needle cast (SNC) caused by *P. gaeumannii* emerged as a major disease during the 1980s and 1990s [23].

As for areas of non-natural occurrences in Europe, damage by late frost [24], winter transpiration [14] and late-spring frost [25] prevailed in the early phases of introduction (initial years). The resistance of certain provenances to frost can also be influenced by the early budding, which is a critical adaptive characteristic co-determining the length of the vegetation period and susceptibility to frost damage [25]. Campbell and Sorensen [26] have demonstrated that susceptibility to frost damage may increase due to the delay of budding by one week. The budding period is influenced primarily by elevation, geographic position, and distance from the ocean [22,26]. Usually, coastal provenances bud later (mid-May) than inland provenances (mid-April). Boyce [27] proposed such differences in the timing of budding as one of the reasons underlying the Douglas fir resistance to *P. gaeumannii* because a massive infection most often occurs before budding. Lavender and Hermann [19] considered the

influence of early budding (i.e., earlier entry into dormancy) as a possible explanation for greater drought resistance in populations from higher elevations.

Needle casts are an especially serious biotic constraint on Central European forests. For the last few decades, the most significant damage has been Rhabdocline needle cast (RNC) caused by *R. pseudotsugae*, while SNC has emerged more recently, e.g., References [28–36]. Both fungi cause changes in needle color and subsequent loss [29]. Although forests of all developmental phases are affected, 10- to 30-year-old stands are most susceptible [37].

R. pseudotsugae was first described by Weir [38] in North America. The highest spread occurred there in the mid-20th century [37]. The first damaging effect of RNC in Europe was recorded in Scotland back in 1922 [39], although there are reasonable grounds to presume that *R. pseudotsugae* existed there even before 1914 [40]. In subsequent years, it spread across England, Denmark, and the Netherlands to other states. Its first occurrence in the Czech Republic was recorded in the late 1930s [41]. Its presence has now been confirmed in 14 European countries [42].

R. pseudotsugae has a 1-year development cycle. First signs of attack are pale green flecks, which is changing to orange shade in late autumn and violet-brownish in winter. Fruiting bodies are formed on the underside of needles during April and ripen from May to July. Spores are spread by wind and infect leaf buds upon opening [43], often leading to the complete loss of new leaves in a given year. Infection can further spread to older needles [39,44].

SNC caused by *P. gaeumannii* was first documented in 1925 on 20-year-old Douglas firs in Switzerland and Germany [45]. In the United States, this disease, found predominantly on Christmas tree plantations, was not considered a severe phytopathological problem until the early 1950s [46]. From 2003, it began spreading into forest stands in western Oregon and Washington [47,48]. *P. gaeumannii* started to cause problems in New Zealand from the mid-1950s [31] becoming a limiting health factor for stands of various age classes [32].

The occurrence of the fungus has also been confirmed, for example, in Poland [33] and Bulgaria, where together with *R. pseudotsugae* it endangers the growing provenances [49]. It was not mentioned in the Czech Republic until 2002 [50]. Initial symptoms of SNC attack are very similar to RNC. Black fruit bodies began to break out through the stomata. In the second and third year, additional fruit bodies appeared on the green parts of the needles. After 3 years, the needles are shed [43]. Usually, fruiting bodies are more abundant on needles aged 3 years or older and are absent on younger foliage [27,51], but in the late 20th century, we have observed abundant fruiting bodies on current-year needles [37].

Previous provenance research identified areas in the natural region from where high-quality stands have originated with high production and growth rate in European conditions. But the increasingly visible climatic changes induce stress on the tree stands, and thus the requirement of a new wave of selection in European stands is unavoidable, and a mere production-oriented selection is no longer sufficient. Managers of Douglas fir in Europe require fast-growing and disease-resistant provenances. Although a higher resistance to needle cast has already been confirmed in *P. m. var. menziesii* [4,52], it exhibits poorer resistance to reduced soil moisture and humidity due to climate changes. Hence, it is crucial to identify factors associated with Douglas fir stands with both higher resistance to biotic and abiotic stresses with reasonable growth. The recorded infection of Douglas fir with pathogens *R. pseudotsugae* and *P. gaeumannii* at the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) provenance trial at Hůrky in 2015 (Figure 1, Table 1) was thus used immediately to conduct a targeted study about the tree health status of all verified provenances and to determine the rates of their susceptibility to the two needle casts. Together with an evaluation of production criteria, it is now possible to perform a superior initial selection of provenances suitable for growing under the conditions of expected climate changes in Central Europe.

Table 1. Characteristics of evaluated provenances at the Hírky area.

State (USA), Province (Canada)	Provenance	Provenance Area	Elevation (m a.s.l.)	North Latitude	West Longitude	
British Columbia	1004	Stuie	Maritime	230	52°22'	126°00'
	1010	Barrière	Cariboo Trans	612	51°12'	120°10'
	1012	Klina Klini	Maritime	3	51°07'	125°36'
	1013	Revelstoke	Nelson	600	51°00'	118°12'
	1021	D'Arcy	Submaritime	275	50°33'	122°30'
	1025	Nimkish	Maritime	90	50°19'	126°53'
	1028 ×	Merritt	Zone Not Defined	870	50°04'	120°51'
	1030	Squamish	Maritime	15	49°47'	123°09'
	1033	Forbidden	Maritime	610	49°40'	125°09'
	1036	Alberni	Maritime	140	49°19'	124°51'
	1043	San Juan	Maritime	215	48°35'	124°05'
Washington	1049	Bacon Point	7-Skagit	500	48°36'	121°23'
	1050	Marblemount	7-Skagit	120	48°35'	121°24'
	1058	Lake Crescent	1-Hoh	305	48°04'	124°00'
	1061	Louella	1-Hoh	457	48°00'	123°05'
	1067	Skykomish	5-Kitsap	305	47°42'	121°20'
	1069	North Bend	8-Snoqualmie	150	47°28'	121°45'
	1075	Enumclaw	5-Kitsap	240	47°16'	121°56'
	1078 ×	Cle Elum	8-Snoqualmie	640	47°13'	121°07'
	1081 ×	Alder Lake	9-Toutle	430	46°48'	122°17'
1089	Cathlamet	3-Twin Harbors	200	46°18'	123°16'	
Oregon	1100	Grand Ronde	6	200	45°06'	123°36'
	1102 ×	Upper Soda	12	1000	44°23'	122°12'
	1103	Coquille	2	100	43°12'	124°10'
	1104 ×	Brookings	1	300	42°07'	124°12'

× standard International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) provenance/ IUFRO standards.



Figure 1. Map of provenances examined at the Hírky trial in their natural range of occurrence in western North America; source: Google Earth Pro.

2. Materials and Methods

During 1966–1970, seeds from 182 autochthonous Douglas fir stands in the US and Canada were collected as part of an international experiment conducted by IUFRO. Samples were divided among 45 institutions from 30 countries [19]. Participating on behalf of the Czech Republic, the Forestry and Game Management Research Institute received seeds of 25 provenances, including five benchmark standards. In 1971, three experimental trials were found within the present-day Czech Republic. Evaluation of the susceptibility to the needle casts within provenances was possible at Hírky due to active infection of Douglas firs by *R. pseudotsugae* and *P. gaeumannii* in the provenance trial as well as nearby forests.

The Hírky provenance trial is situated on a very gentle slope with a predominantly north-east exposure at 445 m a.s.l. (oak-beech forest altitudinal zone). Local mean annual temperatures reach 7.3–7.5 °C and mean annual precipitation is 550–575 mm. The soil type is oligotrophic brown earth. The absolute height yield class of Douglas fir at standing volume with bark per hectare $467 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ is 36 [1].

Verified provenances (Table 1, Figure 1) originate from British Columbia (11), Washington (10), and Oregon (4). Provenances 1028, 1078, 1081, 1102, and 1104 constitute comparison benchmarks present in most trials of the international experiment [1]. The area of research trial is a regular rectangle of 1 ha divided into 100 parts (25 provenances in four repetitions), $10 \times 10 \text{ m}$ each. A total of 3700 nursery-raised 3-year-old saplings (2-year-old saplings for benchmarks) were planted in the spring

of 1971 at a spacing of 2×1.1 m in odd rows and 2×2 m in even rows. Since its planting in 1971, the number of individuals in the trial has gradually declined due to the fall in winter transpiration (1973), natural mortality, thinning (1987, 1996, 2006) aimed at releasing high-quality individuals and removing untrained and dry trees. The less number of trees at the planting age is due to the fast growth of Douglas fir, which overtakes all autochthonous trees.

In 2016, heights and breast-height diameters were measured to compare gains from the previous measurement in 2011 [1]. The height was measured at breast height and by a VERTEX III ultra-sound height-meter (accuracy of 0.1 m). Diameter breast height was measured by millimeter caliper in two perpendicular measurements (0.1 cm) respectively. Based on volume equations for Douglas fir [53], the volume of large wood with bark was calculated. Defoliation of all trees in the provenance trial was also assessed by consensus agreement of visual observations by three evaluators.

A Burkard automated spore trap (AMET, Velké Bilovice, Czech Republic) with datalogger Minikin THi for continual measuring temperature and air humidity were installed from 15 April to 31 of August 2015 in a location with strong infection pressure to determine the time and intensity of needle cast sporulation. An Olympus BX41 microscope with an Olympus WH10X/22 objective was used for sample processing. In addition, 10 Douglas fir tree samples were felled nearby the trial in monthly intervals, and branch samples from the upper and lower crown sections were collected from these to confirm the presence of needle cast. The presence of needle cast spores was determined in the laboratory under an Olympus 110AL 1.5X W061 binocular microscope ($4\times$ magnification). Determination of ascospores and conidia was carried out according to Butin [43].

Each tree's social standing within the stand was determined according to Konšel [54] using the grades 1–dominant, 2–co-dominant, 3–intermediary, 4–overtopped (viable), and 5–dying/dead. Defoliation rate was determined as an indicator of health status within five percentage point increments according to the grading system used for SANASILVA inventory [55]: undamaged tree (0%), slightly damaged (1%–25%), damaged (26%–50%), severely damaged (51%–75%), dying (76%–99%), and dead (100%). The occurrence of other fungal pathogens was also evaluated.

A statistical regression model was used to compare the provenances' health states [56]. In this case, the dependent variable was tree defoliation rate; the explanatory categorical variable was provenance, and the quantitative explanatory variables were trunk volume, diameter difference between measurements in 2011 and 2016, and the number of trees. As the data of the dependent variable did not follow a Gaussian normal distribution, a generalized linear model was applied as an alternative. Approximation using the Poisson distribution was not sufficiently reliable, even though defoliation had a specific and relatively small number of values. Given the positive values for defoliation and a histogram skewed to the right, a gamma distribution was used for approximation (gamma GLM).

Only trees belonging to classes 1, 2, and 3 [54] and forming the canopy level in both evaluations (2011, 2016) were included in the analysis. Cases with diameter difference exceeding $1.5\times$ inter-quartile span (46 individuals) were excluded because the marked increase in diameter was probably caused by gaps that formed in the surrounding canopy (usually due to death or harvesting of nearby trees). The entire 1104 Brookings provenance, as well as the 4th repetitions in provenances 1081 Alder Lake and 1103 Coquille, were removed due to high mortality.

All double interactions between factors were included in the initial model. Simplification was done according to Crawley [57] and Pekár, Brabec [56]. The significance of model factors was determined by analysis of variance using a conservative *F*-test at the usual levels of significance: $\alpha < 0.05$, $\alpha < 0.01$, and $\alpha < 0.001$. The resulting model (1) was selected by minimizing the Akaike information criterion according to the Occam's razor principle [57]. For the statistically significant categorical variable (provenance), factor levels were also compared using "treatment" contrasts [56,57], for which the provenance 1102 Upper Soda originating from the southern inland part of the Douglas fir range and with presumed higher resistance to a drier and warmer climate was selected for comparison. An advantage of this provenance also lies in the fact that it is one of IUFRO's benchmarks, thereby

allowing for potential future comparison with other trials of the international provenance experiment. Its average values for production and defoliation were also comparable. Provenances 1028 Merritt and 1104 Brookings were excluded from our analysis based on the previous evaluation, which was one of the worst due to the low number of individuals and high mortality ratio.

For evaluation of factors influence and sorting the provenances according to health status, the decision tree method was implemented. All significant factors from the previous regression analysis were adopted (without interactions), and the decision tree was created using the package called 'rpart' according to Burger [58]. The final decision tree was pruned and looked at the tree's complexity parameter. All analyses were performed in the R 3.3.2 environment [59].

3. Results

The results of evaluating *R. pseudotsugae* and *P. gaeumannii* sporulation by Burkard spore trap on the locality Hürky in 2015 (Table 2) confirmed the most significant occurrence of *R. pseudotsugae* spores in June (40 pcs). Their presence on adhesive tapes of the spore trap and on collected sample branches was minimal by July (3 pcs). The occurrence of *P. gaeumannii* based on the numbers of spores captured on adhesive tapes and in samples was much more frequent (spores were registered on all sample collection dates with the exception of April). The highest number of spores (201 pcs) were collected in July. The first finding was recorded in late May, and the strongest infection pressure occurred at the end of June and in early July (i.e., sporulation occurred later than in *R. pseudotsugae*). Sporulation of *P. gaeumannii* occurred at lower temperatures in comparison with *R. pseudotsugae*.

Table 2. Timing and intensity (number of spores) of needle cast sporulation obtained from the Burkard automated spore trap on Hürky trial in 2015.

	April	May	June	July	August	Total
<i>Rhabdocline pseudotsugae</i>	0	14	41	4	0	59
<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i>	0	1	38	201	0	240

The presence of ascospores and conidia of *P. gaeumannii* and *R. pseudotsugae* was reaffirmed in 2016 on ten trees that were cut purposefully at the close neighborhood to the trial. The conidia of *R. pseudotsugae* were found only in a single May term, the ascospores were confirmed in April, May, and June. The *P. gaeumannii* conidia were not detected but ascospores were recorded on all samples, mainly in April, May, and July.

Average defoliation of trees on the provenance trial reached 37% (Figure 2). The greatest defoliation was observed in provenances 1028 Merritt (90%), 1010 Barrière (61%), and 1067 Skykomish (53%). In contrast, the best evaluations were seen in provenances 1069 North Bend (23%) and 1089 Cathlamet (24%). A total of 71 trees showed 100% defoliation indicating they all were dead.

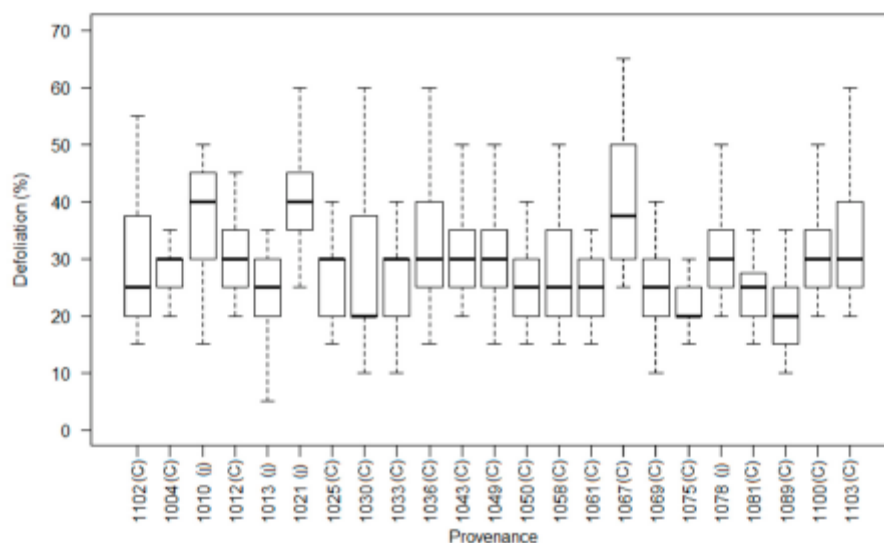


Figure 2. Box plot for defoliation rates of individual provenances. Whiskers represent 1.5 times the inter-quartile range. The letter above the provenance means coastal (C) or interior (I).

In the frame of comparison measurement in the provenance trial in 2016, 704 trees were measured in total. The lowest numbers of individuals were recorded (Table 3) in the provenances 1028 Merritt (15) and 1081 Alder Lake (18), whereas the most were observed at 1067 Skykomish provenance (45).

The average height of Douglas firs during the research trial was 30.1 m (Table 3). The most substantial heights were reached by the provenances 1075 Enumclaw (33.5 m), 1069 North Bend (32.7 m), and 1103 Coquille (32.4 m). The average heights of five other provenances also exceeded 32 m. The lowest average heights were documented in provenances including 1028 Merritt (18.3 m), 1067 Skykomish (25.2 m), and 1078 Cle Elum (25.9 m). The tallest tree (40.4 m) was observed at provenance 1075, while the shortest (16.2 m) one was present at provenance 1067.

The average diameter of all trees in the trial was 30.5 cm (Table 3). The absolutely lowest diameters were recorded at provenances 1078 Cle Elum (11.8 cm) and 1025 Nimkish (13.7 cm), whereas the thickest individuals were documented at provenances 1102 Upper Soda (55.9 cm), 1013 Revelstoke (53.9 cm), 1103 Coquille (53.3 cm), and 1075 Enumclaw (52.6 cm). The highest average values were found at provenances 1075 (37.7 cm) and 1069 North Bend (35.3 cm), while the least was at 1067 (22.4 cm) and 1028 (15.9 cm) provenance.

Standing volume with the bark of all Douglas firs evaluated within the trial was 765.84 m³. Average volume per tree was 1.09 m³. The most massive average volume was achieved by provenance 1075 Enumclaw (1.72 m³), while provenances 1028 Merritt (0.21 m³) and 1067 Skykomish (0.48 m³) had the smallest volumes.

Using a gamma GLM, the factors including tree volume, provenance, and diameter difference between 2011 and 2016, were determined as significant for defoliation rate, and the interaction of volume and provenance (gamma GLM $R^2 = 0.65$; Table 4) was also significant. Crown defoliation was significantly influenced by the volume of the evaluated trees. Defoliation showed a decrease with increasing volume (Figure 3; $r = -0.62$). The most defoliated trees had volumes around <1 m³. The relationship between defoliation and diameter difference was also inversely proportional (Figure 3; $r = -0.65$). Trees showing <30% defoliation have the most substantial diameter increase. The differences in defoliation rates among provenances are apparently clear in Figure 2. Undoubtedly, most defoliated provenances were 1010 Barrière, 1021 D'Arcy, and 1067 Skykomish.

Table 3. Mean quantitative characteristics determined.

State (USA), Province (Canada)	Provenance	Coastal (C)/Inland (I)	Number of Trees	Height (m)	Breast-Height Diameter (cm)	Standing Volume of One Tree with Bark (m ³)	Defoliation (%)	Number of Trees with 100% Defoliation
British Columbia	1004	Strife	27	32	31.9	1.16	34	2
	1010	Barrlie	32	26	26.1	0.64	61	10
	1012	Klma Klud	27	31.3	31.4	1.12	31	1
	1013	Revelstoke	40	31.4	32.6	1.22	29	1
	1021	D'Acy	24	28.7	29.8	0.95	48	3
	1025	Nimksh	30	30.6	29.2	0.99	32	2
	1028 x	Merritt	15	18.3	15.9	0.21	90	14
	1030	Squamish	36	32.2	30.5	1.2	36	3
	1033	Ferndale	38	30.5	29.5	1.01	36	5
	1036	Alberta	27	32.3	34	1.36	34	1
Washington	1043	San Juan	32	29.9	29.6	1.02	34	3
	1049	Bacon Point	31	30.6	30.9	1.1	33	1
	1050	Martinson	31	32.2	32.1	1.19	30	1
	1058	Lake Crescent	31	32.1	32.7	1.26	29	0
	1061	Lonella	21	30.6	33.5	1.35	37	3
	1067	Skykomah	45	28.2	22.4	0.48	53	7
	1069	North Bend	29	32.7	30.3	1.42	23	0
	1075	Brumelaw	30	33.5	27.7	1.72	27	1
	1078 x	Ole Elman	28	25.9	26.7	0.70	46	5
	1081 x	Alber Lake	18	31.5	32.8	1.29	31	0
Oregon	1089	Cathlamet	31	31.9	33.5	1.27	34	0
	1100	Grand Ronde	26	30.8	33.0	1.21	34	3
	1102 x	Uppser Soda	31	28.8	30.4	1.07	39	4
	1103	Copville	19	32.4	31.8	1.22	37	1
Σ/Average	1104 x	Brookings	5	29.5	31.5	1.01	26	0
			704	30.1	30.5	1.09	37	71

x standard IUFRO provenance/IUFRO standards.

Table 4. Resulting simplified gamma model of defoliation.

	Df	Deviance	Residual Df	Resid. Deviance	F	Pr (>F)	
NULL	558	86.412					
volume	1	42.627	557	43.785	728.487	2.20×10^{-16}	***
provenance	22	4.908	535	38.878	3.8122	2.23×10^{-8}	***
diameter difference	1	3.933	534	34.945	67.2096	1.98×10^{-15}	***
volume:provenance	22	2.903	512	32.042	2.2552	0.001	***
volume: diameter difference	1	1.337	511	30.705	22.8495	2.29×10^{-6}	***

Df—degrees of freedom; ***—statistically highly significant ($P \leq 0.001$).

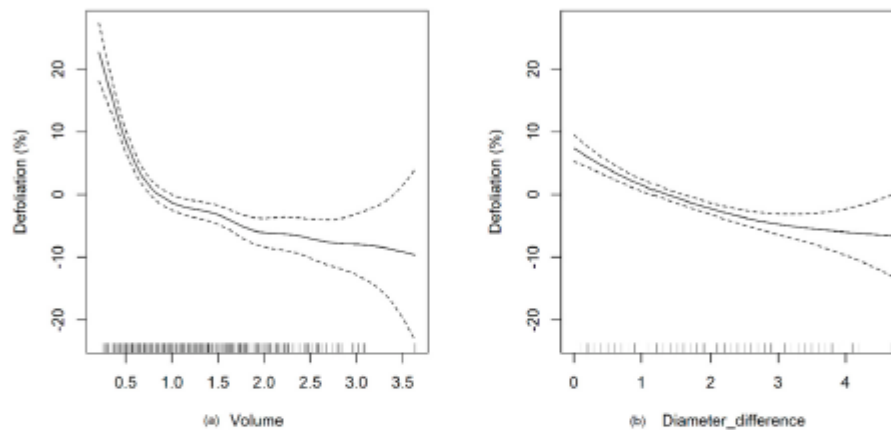


Figure 3. Relationship between defoliation and volume (a) resp. diameter difference (b), using non-parametric smoothers in generalized additive model. On the y-axis are the differences from the average defoliation = 37%.

The provenance was divided into several groups using the decision tree Figure 4, and the extent of impact on the health status caused by individual factors was assessed. Tree volume was substantially affected by the defoliation rate. Trees with a volume of over 1645 m³ had the lowest defoliation. A second important factor for well-growing trees was thickness difference that implies little influence to the needle casts. So well-growing and thick trees were observed to have low defoliation. If the growth wasn't so good, the provenance might have a higher influence of needle cast. The provenance with the best growth increase and the lowest defoliation originates from British Columbia—1012 Klina Klinj, 1025 Nimkish and Washington—1050 Marblemount, 1061 Louella, 1069 North Bend, and 1089 Cathlamet. On the other hand, provenance with a volume of less than 0.675 m³ showed a higher level of defoliation and higher susceptibility to needle casts. The worst health status was documented for provenance 1010 Barrière and 1021 D'Arcy, which were strongly defoliated in spite of their excellent volume. So we can categorize them as sensitive to needle casts. If the volume of the trees is low, the defoliation is even higher. The more defoliated provenance was 1067 Skykomish, which also belonged to the worst growing provenances.

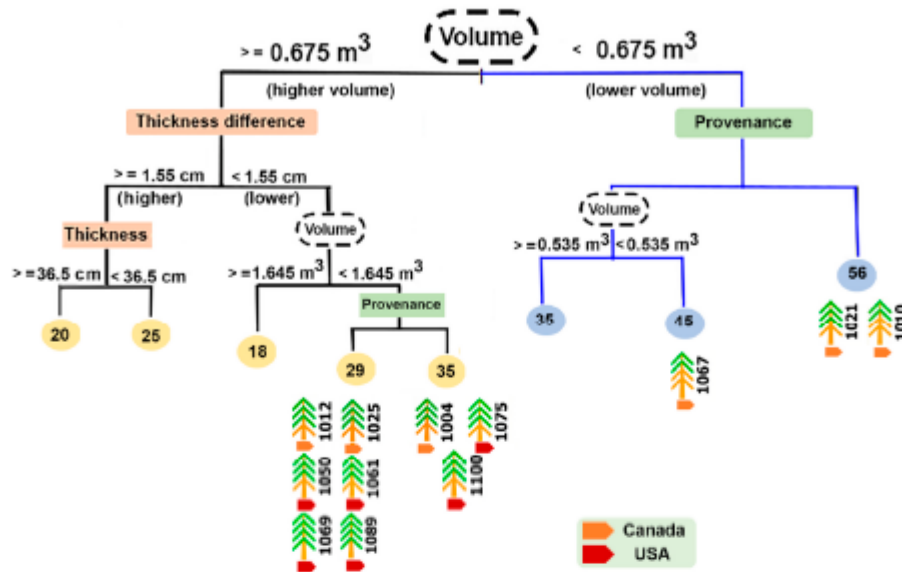


Figure 4. The decision tree based on the factors that influence the Central European Douglas fir stands health status. At the end of the nodes, the mean defoliation is mentioned. A higher number represents a more damaged tree. Healthier trees are on the left (black part of the decision tree) whereas more damaged trees are on the right side (blue part of the decision tree). Factor importance for splitting the arms decreases with the floor. Values dividing the nodes are stated for each arm. Selected typical provenances are stated with marking of country origin (Canada/USA).

4. Discussion

The Hürky international provenance trial has previously been evaluated several times, e.g., [1,60]. However, a more in-depth observation of the health status of the provenances was never the subject of monitoring. In Czech territory, the most substantial losses at the IUFRO provenance trials occurred shortly after planting, during 1972/73 and 1975/76, due to winter transpiration. However, the losses were not so high among most provenances specifically at the Hürky trial. The coastal provenances from Oregon and Washington were among the most damaged ones whereas those from the inland areas (e.g., from British Columbia) were damaged the least and demonstrated relatively good growth [20].

It is known that the formation and spreading of spores of *R. pseudotsugae* and *P. gaemannii* are substantially influenced by temperature, wind, and air humidity [31–33,36,37,51]. Periods of spreading *R. pseudotsugae* spores at the Hürky trial started at the end of April with the culmination in May to June, which is consistent with published data [43,61,62]. In the case of *P. gaemannii*, the spores occur in May and June [43]. At the Hürky trial, however, the highest occurrence of this needle cast was recorded only in late June and early July, which corresponds more closely to the findings in Poland [33].

In addition to the substantial influence of needle cast, there are other risks such as physiological drought and low moisture availability that is regarded as the main threat to Douglas fir stands in the coming decades. Growth can also be decreased due to drought damage, which was not apparent at first sight [19]. A partial solution may be to use inland provenances from drier areas of the North-Western US [19] that are less productive but more resistant to drought. However, the disadvantage for their planting in Europe is their greater susceptibility to needle cast, and especially to RNC.

In an evaluation of an international IUFRO trial in the Netherlands, Eilmann et al. [63] concluded that no provenance simultaneously fulfills the criteria of high production and high resistance to drought. They recommended giving preference to northern provenances at less dry locations and southern provenances at drier locations. At the Hürky trial, the result is comparable, and at least

several production provenances with lower infection rate are available to choose from. In comparisons using contrasts, the provenances 1021 and 1030 were significantly different. Provenance 1021 had a volume close to the average for the trial. Such volume would correspond to the mean defoliation rate, but the defoliation rate determined actually varied significantly. A similar trend was demonstrated in provenance 1030, which produced high volume under average defoliation.

While comparing the results from measurements between 2011 [1] and 2016, there was a decrease in the number of trees in the research trial from 721 to 704. In 2016, 633 individuals were critical, and 71 were dying or dead. Kšir et al. [1] did not evaluate defoliation, and therefore it was not possible to compare the changes over the last five years. However, the current health status across the provenances can be considered slightly worse due to the co-influence of needle cast. Years with an extreme moisture deficit and drought stress only occurred recently and had an impact for the first time in the winter of 2015/16. Its impact then continued to the winter of 2016/17, too. The effect of drought on Douglas fir health status was therefore primarily eliminated for the analysis.

There is an apparent proportional relationship between volume and diameter increase between 2011 [1] and 2016 (Figure 4). In 2011, the smallest volume production had been documented in provenances 1028 Merritt, 1067 Skykomish, 1078 Cle Elum, and 1010 Barrière. The new results presented here are analogous. All mentioned provenances did not prove successful in the research trial. In contrast, provenances 1075 Enumclaw, 1069 North Bend, and 1089 Cathlamet, which had proven themselves healthy in the previous evaluation, can be recommended primarily due to their above-average production, favorable diameter growth, and minimal infection by pathogens. There are a number of other provenances in the trial with above-average production (e.g., 1036 Alberni) while showing poorer health status. Moreover, further deterioration of their health status can be expected in the coming years due to their origin in the coastal areas of British Columbia and Washington (i.e., higher susceptibility to drought and autumn frosts).

Crown defoliation was negatively correlated with volume (-0.6) and thickness difference (-0.6). In addition, the vitality (growth potential) of the individual trees can also characterize the resistance of the tree, which is a useful phenomenon in relation to the resistance to against needle casts. Vitality was not directly measured in the current research, but it could be derived from growth rates. Thus, it is clear that the resistance of a tree to needle casts is more relying on the functional health status of it than a specific provenance that it belongs to. Nevertheless, some provenances showed better growth and more resistance to pathogens. These include provenances including 1069, 1075, and 1089, which were found to be appropriate in previous measurements [1]. Alternatively, the highest defoliation, the lowest volume, and the worst vitality were documented in provenances 1010, 1021 and 1067, which were previously not recommended by Kšir et al. [1] for further cultivation. However, in some rare cases, the extent of tolerance of some provenance against needle casts was demonstrated by variable and unexpected (higher and lower) defoliation rate relative to the volume found. For example, provenances like 1004, 1075 and 1100 showed the highest growth and a relatively higher defoliation rate than expected, and their higher susceptibility to needle casts can be assumed.

Many researchers examined the growth status of the different provenances in their published studies [20,31,32,49,60,63,64] but no one is considering the problems related to needle casts. Hence, we can only compare some aspects of our investigated trial with pre-existing studies. Four provenances (1025, 1050, 1069, and 1100) identical to those on the Hürky research trial are also represented in the range of 18 provenances evaluated in the Netherlands [63]. The results are, however, apparently contradictory due to different natural conditions. The 1025 provenance, somewhat below-average considering growth at the Hürky trial, was among the most productive one in the Netherlands in spite of its higher sensitivity to drought condition. In contrast, higher sensitivity to dry spells was also shown by provenance 1069 North Bend, which was among the best of the positively verified units at Hürky.

At research trials in Bulgaria, the needle casts caused by *R. pseudotsugae*, and *P. gaeumannii* appear to be the limiting factor for selecting the Douglas fir stands for planting. They were first found in

a Douglas fir trial at 17 years of age [64] when they occurred primarily in inland provenances. The results of evaluating the health status in the trial at 24 years of age [49,65,66] indicate that the coastal provenances from Oregon and Washington demonstrate faster growth than inland provenances (almost a third of the trees have died, and 10% had defoliation >60%) in the local conditions. Among the worst-rated provenances were, with no exceptions, from the interior such as Keremeos (Washington), Whitefish (Montana), Bates (Oregon), and Canyon City (East Oregon) that showed symptoms typical of needle cast together with decreased vitality [49]. The best-growing and more resistant to both needle casts [49,67], which is traditionally recommended for importing of Douglas fir reproductive material into Central Europe from above-mentioned source areas are the provenances namely Newhalem and Darrington from the Skagit seed zones in the western part of the Cascades. They are originated from an altitude between 500 and 1,167 m, which is similar to Central European conditions. Similar results were obtained from the coastal provenance Brookings from Oregon. Unfortunately, the use of them has been legally banned in Czech forestry at present.

We have additional data from Poland, where SNC was found on 3 out of 11 monitored trials [33]. In highly infested stands, defoliation exceeded above 45% in 90% of the trees. A higher infection pressure was determined in older (35 years) Douglas firs than in younger (17 years) trees. This does not correspond to the oft-stated most normal infection age of 10–30 years [37,43,68]. It is, however, partially confirmed by the results from the Hírky trial, where high infection pressure in certain provenances was demonstrated in trees with almost 50 years of age. Still, the Polish research did not consider that the needle cast, caused by *P. gaemannii*, is the most dangerous risk factor for young Douglas fir plantations [31,37,68]. Similar to the findings in the Hírky research trial, Łakomy and Iwańczuk [33] have also recorded dying and dead trees. It is clear, however, that not all losses from recent years can be attributed solely to the influence of needle casts, as stress caused by drought and other pathogens contributed significantly to it.

The spread of pathogen *P. gaemannii* has also been examined in New Zealand [31,32]. Seven provenances were evaluated at seven locations. Active infection (with fruiting bodies on more than 80% of needles) was determined at four locations. There were almost no observed differences in infection rates among provenances. However, the differences were prominent in infection intensity on the last year's needles. Kimberley et al. [32] demonstrated indirectly that, in their local conditions, *P. gaemannii* is the most significant primary pathogen of Douglas fir. Simultaneously, they confirmed the importance of climatic factors for the spread of needle cast and a positive correlation between temperature and growth reduction. They determined the period of 8–15 years from infection start as the time showing the highest decrease in Douglas fir's growth gain (i.e., during the time of maximum infection pressure).

It is difficult to determine the underlying causes of the increasing magnitude of damage in recent years, primarily due to *P. gaemannii* [32]. One explanation to consider is climate change that leads to weakening and subsequent increase in infection. Hansen et al. [37], who reported the infection in stands spanning of more than 120,000 ha in the coastal area of Oregon, confirmed this. The cause was apparently the origin of provenances from the higher altitudes and stands with lower natural resistance to the pathogen (probably partially from inland). A comparison of the above-mentioned study with the Hírky trial is impossible because no data on tree defoliation was available. The difference in both pathogenic fungi attack among provenances was not evaluated, and so it is not possible to mention, which one is causing more damage and which provenances are more susceptible.

It is expected that the changing climatic conditions in Central Europe will probably result in an increased average temperature along with fluctuating and lower annual precipitation [69,70]. Hence, certain provenances from the inland areas may have higher potential applicability despite their lower productive capabilities and lower resistance to needle cast [4,36]. While there are no provenances known for the complete resistance to needle cast [4,52], provenance's with relatively high resistance and production capability are required. From the range at the Hírky research trial, especially the provenances 1069 North Bend and 1089 Cathlamet can be considered can be considered viable, in this

respect. Conversely, provenances 1028 and 1078, which are among the poorest performing for growth and the most defoliated, appear unfavorable. Moreover, the positive evaluation of provenances 1061, 1069, 1075, and 1089 from the previous investigation supports the present claim [1].

Interestingly, earlier findings supported our claims as to the unsuitability of introducing *P. m. var. glauca* into Central European conditions due to its low production capability and high susceptibility to needle cast [10]. The inland provenances like 1010, 1021 are more susceptible than coastal ones. Whereas the coastal provenances were evaluated positively in most IUFRO research trials, the results from the Czech Republic are somewhat less optimistic. This is due to the adverse effects of the local spring frosts and physiological drought on young Douglas firs [25]. Findings from many parts of Europe [2,19] have aided in the selection of certain preferred geographic areas for importing seeds (mainly western Washington and northwestern Oregon). In addition [49] to selecting a suitable provenance, both needle casts can be partially reduced in stands by removing the most afflicted trees. This improves the microclimatic conditions to favor the remaining, healthy trees.

5. Conclusions

In a provenance trial with Douglas fir, we confirmed the occurrence of pathogens from the genera *Rhabdochloa* and *Phaeocryptopus*. The highest sporulation intensity was recorded in June for *R. pseudotsugae* and June /July for *P. gaeumannii*. The determined defoliation indicates a somewhat poor health status of the Hůrky provenance trial. Defoliation has a significant association with trunk volume in which the most defoliated individuals only rarely reached 1 m³. An inversely proportional relationship between defoliation and diameter gain was also observed. Among the compared provenances, it is essential to highlight the Washington provenances 1061 Louella, 1069 North Bend, 1075 Enumclaw, and 1089 Cathlamet. All of these have maintained satisfactory gains since the previous measurement in 2011 and were almost not affected at all by pathogens. Therefore, these appear most suitable for stands with similar climatic, soil, and topographic conditions. In contrast, the provenances 1010 Barrière, 1021 D'Arcy, and 1067 Skykomish, in addition to IUFRO standard 1078, can be considered unsuitable, demonstrating not only lower growth but also poorer health status. These results correspond well with the evaluation from 2011, with the exception of provenance 1036 Alberni, the current health status of which is considerably poorer and therefore should be placed among provenances that no longer should be planted.

As climate change becomes increasingly problematic in Europe, interest in replacing spruce with Douglas-fir is growing. However, as the area of Douglas-fir forest in Europe grows, the connectivity between stands also increases, along with the risk for pathogen attack. The risk posed by the RNC and SNC to Central European Douglas stands is likely to increase in upcoming years.

Author Contributions: Conceptualization, M.S., R.M., V.P.; Methodology, R.M., V.P., P.N., F.B.; Validation, M.S., V.P., R.M., M.F.; Formal Analyses, R.M.; Investigation, M.S., V.P., R.M., P.N., M.F.; Resources, M.S.; Data Curation, M.S., R.M., V.P.; Writing—Review & Editing, M.S., P.N., V.P., R.M., A.R.; Visualization, M.S., R.M., V.P., M.F., A.R.; Supervision, V.P., P.N., R.M.; Project Administration, V.P., R.M.; Funding Acquisition, V.P., R.M., F.B., P.N.

Funding: The article was created in relation to implementing research projects supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. QJ1520299 and No. MZE-RO0118. The study was also supported by the Internal Grant Agency of Faculty of Forestry and Wood Sciences Czech University of Life Sciences in Prague—project GA FLD CZU B10/17. AR, RM is supported financially by EXTEMIT-K, No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000433 financed by OP RDE during the preparation of the manuscript. VP is supported financially by Operational Programme Research, Development, and Education (OP RDE)-project “EVA4.0” (reference number CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000803).

Acknowledgments: Schurman Jonathan Scott is duly acknowledged for his valuable comments on the revised version of the manuscript. We used Grammarly (www.grammarly.com/ premium version) for English language editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kšár, J.; Beran, F.; Podrázský, V.; Novotný, P.; Dostál, J.; Kubeček, J. Výsledky hodnocení mezinárodní provenienční plochy s douglaskou tisolistou (*Pseudotsuga menziesii* /Mirb./Franco) na lokalitě Hůrky v jižních Čechách ve věku 44 let. *Zpravy Les. Vyzk.* **2015**, *60*, 104–114.
2. Šindelář, J.; Beran, F. K některým aktuálním problémům pěstování douglasky tisolisté (orientační studie). *Lesn. Průvodce* **2004**, *3*, 1–34.
3. Kubeček, J.; Štefančík, L.; Podrázský, V.; Longauer, R. Výsledky výzkumu douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii* /Mirb./Franco) v České republice a na Slovensku—Přehled. *Les. Cas. For. J.* **2014**, *60*, 120–129. [[CrossRef](#)]
4. Bastien, J.-C.; Sanchez, L.; Michaud, D. Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). In *Forest Tree Breeding in Europe*, 1st ed.; Pâque, L., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2013; pp. 325–369, ISBN 978-94-007-6146-9.
5. Podrázský, V.; Remeš, J. Pídotvorná role významných introdukovaných jehličnanů—Douglasky tisolisté, jedle obrovské a borovice vejmutovky. *Zpravy Les. Vyzk.* **2008**, *53*, 29–36.
6. Podrázský, V.; Kubeček, J. Může douglaska tisolistá nahradit chřadnoucí smrk? *Lesn. Prace* **2014**, *93*, 14–19.
7. Broncano, M.J.; Vila, M.; Boada, M. Evidence of *Pseudotsuga menziesii* naturalization in montane Mediterranean forests. *For. Ecol. Manag.* **2005**, *211*, 257–263. [[CrossRef](#)]
8. Bušina, F. Natural regeneration of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) in forest stands of Training Forest District Hůrky, Higher Forestry School and Secondary Forestry School in Písek. *J. For. Sci.* **2007**, *53*, 20–34. [[CrossRef](#)]
9. Hart, V.; Hartová, M.; Tauchman, P. Analysis of herbicide effects on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) natural regeneration. *J. For. Sci.* **2010**, *56*, 209–217. [[CrossRef](#)]
10. Schmid, M.; Pautasso, M.; Holdenrieder, O. Ecological consequences of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cultivation in Europe. *Eur. J. For. Res.* **2014**, *133*, 13–29. [[CrossRef](#)]
11. Eberhard, B.; Hasenaauer, H. Modeling Regeneration of Douglas fir forests in Central Europe. *Austrian J. For. Sci.* **2018**, *135*, 33–51.
12. Cafourek, J. Dovož osiva douglasky tisolisté do ČR. *Lesn. Prace* **2014**, *93*, 432–434.
13. Martiník, A.; Houšková, K.; Palátová, E.; Cafourek, J.; Mauer, O. *Předosevní Příprava a Doba Výsevu Douglasky Tisolisté (Pseudotsuga menziesii (Mirb./Franco))*, 1st ed.; Mendelova univerzita v Brně: Brno, Czech Republic, 2014; 16p, ISBN 978-80-7509-161-1.
14. Šika, A. Reprodukční materiál douglasky tisolisté v ČR z domácích zdrojů. *Prace VULHM* **1985**, *67*, 41–62.
15. Jarry, M.; Candau, J.N.; Roques, A.; Ycart, B. Impact of emigrating seed chalcid, *Megastigmus spermatorophus* Wachtl (Hymenoptera: Torymidae), on seed production in a Douglas-fir seed orchard in France and modelling of orchard invasion. *Can. Entomol.* **1997**, *129*, 7–19. [[CrossRef](#)]
16. Wolf, H. First results related to flushing and response to drought stress of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) progenies descending from Germany in comparison to provenances descending from North-America. *Forstarchiv* **2012**, *83*, 75–84.
17. Farjon, A. *A Handbook of the World's Conifers*, 1st ed.; Brill: Leiden, The Netherlands; Boston, MA, USA, 2010; Volume II, pp. 529–1111, ISBN 978-90-04-17718-5.
18. Farjon, A.; Filet, D. *An Atlas of the World's Conifers: An Analysis of Their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status*, 1st ed.; Brill: Leiden, The Netherlands; Boston, MA, USA, 2013; 512p, ISBN 978-90-04-21180-3.
19. Lavender, D.P.; Hermann, R.K. *Douglas-Fir. The Genus Pseudotsuga*, 1st ed.; Oregon State University, College of Forestry, Forest Research Laboratory: Corvallis, OR, USA, 2014; 352p, ISBN 978-0-615-97995-3.
20. Šika, A. Present results of the international provenance experiment of IUFRO with Douglas fir in the CSR. *Commun. Inst. For. Czech.* **1981**, *12*, 83–101.
21. Jenkins, M.J.; Hebertson, E.; Page, W.; Jorgensen, C.A. Bark beetles, fuels, fires and implications for forest management in the Intermountain West. *For. Ecol. Manag.* **2008**, *254*, 16–34. [[CrossRef](#)]
22. Bansal, S.; Harrington, C.A.; St. Clair, J.B. Tolerance to multiple climate stressors: A case study of Douglas-fir drought and cold hardiness. *Ecol. Evol.* **2016**, *6*, 2074–2083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ritóková, G.; Shaw, D.C.; Filip, G.; Kanaskie, A.; Browning, J.; Norlander, D. Swiss Needle Cast in Western Oregon Douglas-Fir Plantations: 20-Year Monitoring Results. *Forests* **2016**, *7*, 155. [[CrossRef](#)]

24. Sakai, A.; Weise, C.J. Freezing resistance of trees in North America with reference to tree regions. *Ecology* **1973**, *54*, 118–126. [CrossRef]
25. Malmqvist, C.; Wallertz, K.; Johansson, U. Survival, early growth and impact of damage by late-spring frost and winter desiccation on Douglas-fir seedlings in southern Sweden. *New For.* **2018**, 1–14. Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-018-9635-7> (accessed on 20 January 2019). [CrossRef] [PubMed]
26. Campbell, R.K.; Sorensen, F.C. Cold-acclimation in seedling Douglas fir related to phenology and provenance. *Ecology* **1973**, *54*, 1148–1151. [CrossRef]
27. Boyce, J.S. A needle-cast of Douglas fir associated with *Adelopus gutmanni*. *Phytopathology* **1940**, *30*, 649–659.
28. Hansen, E.M. Forest pathogens of N.W. North America and their potential for damage in Britain. *For. Rec. UK For. Comm.* **1985**, *129*, 1–14.
29. Gemandt, D.S.; Camacho, F.H.; Stone, J.K. *Meria laricis*, an anamorph of *Rhabdocline*. *Mycologia* **1997**, *89*, 735–746. [CrossRef]
30. Holah, C.J.; Wilson, V.M.; Hansen, M.E. Impacts of a native root-rotting pathogen on successional development of old-growth Douglas fir forests. *Oecologia* **1997**, *111*, 429–433. [CrossRef] [PubMed]
31. Hood, I.A.; Kimberley, M.O. Douglas fir provenance susceptibility to Swiss needle cast in New Zealand. *Australas. Plant Pathol.* **2005**, *34*, 57–62. [CrossRef]
32. Kimberley, M.O.; Hood, I.A.; Knowles, R.L. Impact of Swiss needle-cast on growth of Douglas-fir. *Phytopathology* **2011**, *101*, 583–593. [CrossRef] [PubMed]
33. Łakomy, P.; Iwańczuk, M. *Phaeocryptopus gaeumannii* in Douglas-fir stands in Smolarz forest district. *Phytopathologia* **2010**, *58*, 43–52.
34. Ogris, N.; Jurc, D. Tree diseases determined by the reporting, prognostic and diagnostic service for forests in Slovenia 1982–2012. *Acta Silvae Ligni* **2013**, *102*, 31–42. [CrossRef]
35. Diminić, D.; Gršković, M.; Mozer, A. Fungal diseases of coniferous trees in plantations in North Adriatic area of Croatia. *Glas. Sum. Poluse* **2016**, *5*, 355–364.
36. Spiecker, H.; Lindner, M.; Schuler, J. (Eds.) *Douglas-Fir—An Option for Europe*; EFI What Science Can Tell Us 9; European Forest Institute: Joensuu, Finland, 2019; 121p, ISBN 978-952-5980-66-0.
37. Hansen, E.M.; Stone, J.K.; Capitano, B.R.; Rosso, P.; Sutton, W.; Winton, L. Incidence and Impact of Swiss Needle Cast in Forest Plantations of Douglas-fir in Coastal Oregon. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 773–778. [CrossRef]
38. Weir, J.R. A needle blight of the Douglas fir. *J. Agric. Res.* **1917**, *10*, 99–105.
39. Wilson, M.; Wilson, M.J.F. *Rhabdocline pseudotsugae* Syd.: A new disease of the Douglas fir in Scotland. *Trans. R. Scot. Arbor. Soc.* **1926**, *40*, 37–40.
40. Brown, A.B. Observation on leaf fall in the Douglas fir when infected with *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow. *Ann. Appl. Biol.* **1930**, *17*, 745–754. [CrossRef]
41. Kalandra, A. První výskyt sypavky duglasky—Přísobené houbou *Rhabdocline pseudotsugae* Syd.—V odstoupeném Sudetském území Čech. *Ochrana Rostlin* **1939**, *15*, 36–40.
42. Morgenstern, K.; Polster, J.-U.; Krabel, D. Genetic variation between and within two populations of *Rhabdocline pseudotsugae* in Germany. *Can. J. For. Res.* **2016**, *46*, 716–724. [CrossRef]
43. Buřín, H. *Tree Diseases and Disorders. Causes, Biology and Control in Forest and Amenity Trees*, 1st ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA; Tokyo, Japan, 1995; 252p, ISBN 0198549326.
44. Van Vloten, H. *Rhabdocline Pseudotsugae* Sydow: Oorzaak Eener Ziekte van Douglasspar. Ph.D. Thesis, Mededeling/Instituut voor Phytopathologie, Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen, The Netherlands, 1932.
45. Gäumann, E. Über eine neue Krankheit der Douglasien. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **1930**, *40*, 305–313.
46. Michaels, E.; Chastagnez, G.A. Distribution, severity, and impact of Swiss needle cast in Douglas-fir Christmas trees in western Washington and Oregon. *Plant Dis.* **1984**, *68*, 939–942. [CrossRef]
47. Temel, F.; Johnson, G.R.; Stone, J.K. The relationship between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *For. Pathol.* **2004**, *34*, 383–394. [CrossRef]
48. Stone, J.K.; Capitano, B.R.; Kerrigan, J.L. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir needles. *Mycologia* **2008**, *100*, 431–444. [CrossRef] [PubMed]
49. Petkova, K.; Georgieva, M.; Uzunov, M. Investigation of Douglas-fir provenance test in North-Western Bulgaria at the age of 24 years. *J. For. Sci.* **2014**, *60*, 288–296. [CrossRef]

50. Pešková, V. *Rhabdocline pseudotsugae* Sydow. Skotská sypavka douglasky. *Lesn. Prace* **2003**, *82*. Available online: http://lmda.silvarium.cz/search/i.jsp?pid=uuid:17f63f3c-1e0e-47a3-90ed-6c99df079585#periodical-periodicalvolume-periodicalitem-supplement-page_uuid:d76be9a1-c570-11e4-8912-001b63bd97ba (accessed on 10 March 2018).
51. Hood, I.A. *Menziesii* in southern British Columbia. *NZJ For. Sci.* **1982**, *12*, 415–424.
52. Hood, I.A.; Sandberg, C.J.; Barr, C.W.; Holloway, W.A.; Bradbury, P.M. Changes in needle retention associated with the spread an establishment of *Phaeocryptopus gaeumannii* in planted Douglas-fir. *Eur. J. For. Pathol.* **1990**, *20*, 418–429. [CrossRef]
53. Bergel, D. Die Herleitung neuer Massentafeln für die Douglasie in Nordwestdeutschland. *Allg. Forst Jagdzeitung* **1971**, *142*, 247–256.
54. Koňšel, J. *Stručný Nástin Tvorby a Pěstění Lesů v Biologickém Poměří*, 1st ed.; Mašice lesnická: Písek, Czechoslovakia, 1931; 552p.
55. Bosshard, W. Sanasilva-Kronenbilder; Couronnes d'arbres; Le chiome degli alberi. In *Eidgenössische Anstalt für das Forstliche Versuchswesen; Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft Birmensdorf, Switzerland*, 1986.
56. Pekár, S.; Brabec, M. *Moderní Analýza Biologických Dat 1*, 1st ed.; Scientia: Praha, Czech Republic, 2009; 225p, ISBN 978-80-86960-44-9.
57. Crawley, M. *The R Book*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 2013; 1051p, ISBN 978-0-470-97392-9.
58. Burger, S.V. *Introduction to Machine Learning with R—Rigorous Mathematical Modelling*; O'Reilly: Sebastopol, CA, USA, 2018; 226p, ISBN 978-1491976449.
59. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2016; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 28 December 2018).
60. Beran, F. Dosavadní výsledky provenienčního výzkumu douglasky tisolisté v ČR. *Zpravy Les. Vyzk.* **1995**, *40*, 7–13.
61. Catal, M.; Adams, G.C.; Fulbright, D.W. Evaluation of Resistance to Rhabdocline Needlecast in Douglas Fir Variety Shuswap, with Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* **2010**, *100*, 337–344. [CrossRef] [PubMed]
62. Morgenstern, K.; Döring, M.; Krabel, D. Rhabdocline needle cast—Investigations on various Douglas fir tissue types. *Eur. J. Plant Pathol.* **2013**, *137*, 495–504. [CrossRef]
63. Eilmann, B.; de Vries, S.M.G.; den Ouden, J.; Mohren, G.M.J.; Sauren, P.; Sass-Klaassen, U. Origin matters! Difference in drought tolerance and productivity of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) provenances. *For. Ecol. Manag.* **2013**, *302*, 133–143. [CrossRef]
64. Georgieva, M. Diseases on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) and Their Influence on the Species Introduction in Bulgaria. Ph.D. Thesis, Forest Research Institute-BAS, Sofia, Bulgaria, 2009. (In Bulgarian)
65. Petkova, K. Investigation of Douglas-fir provenance test in North-Western Bulgaria at age 20. *For. Ideas* **2011**, *17*, 1–42.
66. Popov, E.B. Results of 20 years old Douglas-fir provenance experiment established on the northern slopes of Rila Mountain in Bulgaria. *J. For. Sci.* **2014**, *60*, 394–399. [CrossRef]
67. Milenkova, A.; Konner, M.; Fusi, B.; Petkova, K. Identification of varieties and genetic diversity of Douglas fir stands in the region of Osogovo, Southwest Bulgaria. *For. Ideas* **2018**, *24*, 37–50.
68. Maguire, D.A.; Kanaskie, A.; Voelker, W.; Johnson, R.; Johnson, G. Growth of young Douglas-fir plantations across a gradient in Swiss needle cast severity. *West. J. Appl. For.* **2002**, *17*, 86–95. [CrossRef]
69. Reyer, C.; Lasch, P.; Mohren, G.M.J.; Sterck, F. Inter-specific competition in mixed forests of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and common beech (*Fagus sylvatica*) under climate change—A model-based analysis. *Ann. For. Sci.* **2010**, *67*, 805. [CrossRef]
70. Vitali, V.; Buntgen, U.; Bauhus, J. Seasonality matters—The effects of past and projected seasonal climate change on the growth of native and exotic conifer species in Central Europe. *Dendrochronologia* **2018**, *48*, 1–9. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Příloha 10 Impact of *Rhabdocline pseudotsugae* and *Phaeocryptopus gaeumannii* on the Selection of Suitable Provenances of Douglas Fir in Central Europe



Protocol Article

Trehalose determination in Norway spruce (*Picea abies*) roots. Analytics matters



Miloslav Šulc^{a,c,*}, Ivana Tomášková^b, Anna Krejzková^b, Michal Samek^b, Alina Diuzheva^b, Jaromír Hradecký^b, Vítězslava Pešková^b

^aFood Research Institute, Radiova 1285/7, CZ-10200 Prague 15 - Hostivar, Czechia

^bFaculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129 Suchdol, CZ - 165 21 Praha 6, Czechia

^cFaculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129- Suchdol, CZ - 165 21 Praha 6, Czechia

ABSTRACT

We present concise results of method validation for trehalose quantitation by LC-MS/MS in spruce ectomycorrhizal roots in order to describe spruce health status, mainly in connection to contamination by a pathogenic fungus, *Gemmatomyces piceae*. The procedure is based on Rogatsky et al. (2005) developed for human plasma. We found out that the best extraction yield was achieved with 80% methanol/water (v/v) solution and optimal extraction temperature was set between 50-60°C. In contrast to previous papers, we minimized the activity of trehalase enzyme by putting root samples into liquid N₂ immediately after root excavation, followed by freeze-drying in order to stop trehalase activity. Higher content of trehalose was recorded in healthy trees, confirming the idea that ectomycorrhiza plays a significant role in plant-pathogen interactions.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

ARTICLE INFO

Method name:

Keywords: Trehalose, Spruce roots, Liquid chromatography - Mass spectrometry, Mycorrhiza

Article history: Received 19 August 2020; Accepted 13 February 2021; Available online 18 February 2021

* Corresponding author at: Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Kamýcká 129, CZ - 165 21 Praha 6 - Suchdol, Czech Republic.

E-mail addresses: miloslav.sulc@vupp.cz (M. Sulc), tomaskova@fd.czu.cz (I. Tomášková).

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101280>

2215-0161/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Specifications table

Subject Area	Environmental Science
More specific subject area	Plant physiology
Method name:	
Protocol name	NA
Reagents/tools	Reagents liquid nitrogen methanol (HPLC grade) caesium acetate (LC-MS grade) acetonitrile (HPLC grade) trehalose dihydrate (analytical standard) ethanol (denatured with benzene, GR)
Experimental design	Equipment Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, USA) with a triple quadrupole mass spectrometer (Q Trap 3200; ABSciex, USA). HILIC (amino) column Analytical method validation was performed using spiked pooled blank samples of healthy Norway spruce (<i>Picea abies</i>) roots. Root samples from Norway spruce were taken in the Ore Mountains (Krušné hory) near Červený Hrádek (GPS 50°31'07.9"N 13°27'03.0"E) in the Czech Republic. Samples were taken from both healthy (n = 10) trees and trees affected by the pathogenic fungi <i>Gemmomyces piceae</i> causing bud blight disease (n = 10). Tree age was between 50 and 80 years.
Trial registration	NA
Ethics	
Value of the Protocol	- Optimization of the field sampling procedure. - Trehalose quantitation in ectomycorrhizal spruce roots.

Description of protocol: Method details

Background

The non-reducing disaccharide trehalose (α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranoside) has been considered to help plants survive in inconvenient environmental conditions; nevertheless, its biotic interactions are still little understood [1]. We focused on Norway spruce (*Picea abies*) affected by the deadly pathogen *Gemmomyces piceae* and trehalose content in the roots as the biomarker of mycorrhizal quality, resulting in higher tree vitality and resistance [3].

In the past, carbohydrates in spruce ectomycorrhizal roots were analyzed as trimethylsilyl derivatives by GC-FID or by HPAEC-PAD [2]. The disadvantages of these techniques are high polarity of trehalose, insufficient sensitivity, or co-eluting substances (e.g., sucrose). Many discrepancies between previously published values were probably caused by the use of different analytical techniques. Moreover, the different approach in ectomycorrhizal root sampling and trehalose analysis by LC-MS/MS revealed the source of different published results.

Our research goals were i) to establish a proper methodology for field root handling followed by extraction and quantitation of trehalose, and ii) to compare trehalose content in the roots damaged by a fungal pathogen (*Gemmomyces piceae*) and healthy ones.

Final procedure:

Root sampling

1. Fine roots < 2 mm were collected from a soil sample taken with a soil auger (6 cm i.d., stuck 15 cm deep).
2. Excavated roots were extracted from soil samples using tweezers, quickly washed with water and submerged in a plastic bag into liquid nitrogen.

3. In the laboratory, samples were removed from liquid nitrogen and stored in a freezer at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.
4. Within three weeks, the samples underwent freeze-drying (for 196 h; Lyovac GT 2, Steris, Germany).

Sample extraction

1. 5–7 g of freeze-dried roots were ground in a laboratory mill (IKA, A11 basic, Germany).
2. 25 mg of the root powder was weighed into a 2-mL plastic microcentrifuge tube (Eppendorf, Germany) and 1.5 mL methanol/water mix (80/20 v/v) added.
3. The tube was shaken vigorously for a couple of seconds to wet the sample and placed in a thermoshaker (TS-100, Biosan, Latvia) for 30 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1,000 rpm.
4. The samples were then centrifuged (Eppendorf, Minispin plus) at 12,500 rpm for 10 min and the liquid phase filtered through a nylon syringe filter ($0.25\text{ }\mu\text{m}$) into a 2-mL HPLC vial.

LC-MS/MS analysis

We developed an optimized extraction procedure for determination of trehalose followed by LC-MS/MS detection using Cs^+ ion attachment, based on Rogatsky's assay developed for human plasma [4]. Trehalose analysis was carried out using an Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, USA) equipped with a binary pump, coupled with a triple quadrupole mass detector (Q Trap 3200; ABSciex, USA). The analytes were separated by isocratic elution (with a column flush step) on a Luna NH_2 column ($150 \times 2\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$, 100 Å; Phenomenex, USA). The operating conditions were as follows: flow rate $350\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$; column temperature $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; injection volume $1\text{ }\mu\text{L}$. The binary mobile phase consisted of (A) 0.1 mM caesium acetate in water and (B) acetonitrile. Isocratic conditions of 20% A and 80% B were kept for 10 min, increased to 50% A and 50% B at 11 min and remained constant for 1.5 min, then returned to original conditions of 20% A and 80% B and remained there until minute 15. The autosampler was kept at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trehalose (as m/z $[\text{M}+\text{Cs}]$, e.i. precursor m/z 565, product m/z 133) was detected and quantified using ESI source operated in positive mode with the following parameters: Q1 mass 475.1 Da; Q3 mass 133.0 Da; curtain gas 30 psi; collision gas: medium; ion spray voltage: 5500 V; source gas temperature 600°C ; GS1 60 psi and GS2 60 psi. Data were gathered using Chromeleon 6.8 and Analyst 1.4 software.

Method validation parameters

Method optimization and validation was performed on spiked blank spruce roots (spike level $15\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$). Before spiking, complete removal of trehalose from tested samples was achieved using naturally present trehalase. Due to co-elution with saccharose in real samples, quantification of trehalose was based on peak height. A five-point matrix matched linear calibration curve was made using trehalose dihydrate of 5, 10, 20, 30, and $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$. Linearity was R^2 (square of the correlation coefficient) = 0.9989, residuals <4%. Limit of detection (as $3 \times S/N$) = $1.3\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ which corresponds to $78\text{ ng}/\text{mg}$ of sample matrix; limit of quantitation (as $10 \times S/N$) = $4.35\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$, which corresponds to $261\text{ ng}/\text{mg}$ of sample matrix. Average recovery on spike level $15\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ was 96%. Within-day precision (4%) and day-to-day precision (8%) are expressed as relative standard deviation from average measured value. During method validation the following parameters were optimized: i) extraction solvent mixture, ii) extraction temperature, and iii) extraction time. The results of these test are presented in Supporting Information. All validation analyses were performed in triplicate.

Statistical analysis

The data are presented in μg trehalose/g DW with standard deviation; see Supporting Information (Table S1). Datasets were tested for homogeneity (Levene test) and normality (Shapiro-Wilk test). After fulfilling the statistical presumptions, one-way ANOVA was used. Differences were tested at the level of $p = 0.05$. Tukey HSD test was used for detailed analysis. Statistical analysis was performed using Statistica 13.3 (TIBCO Software, USA).

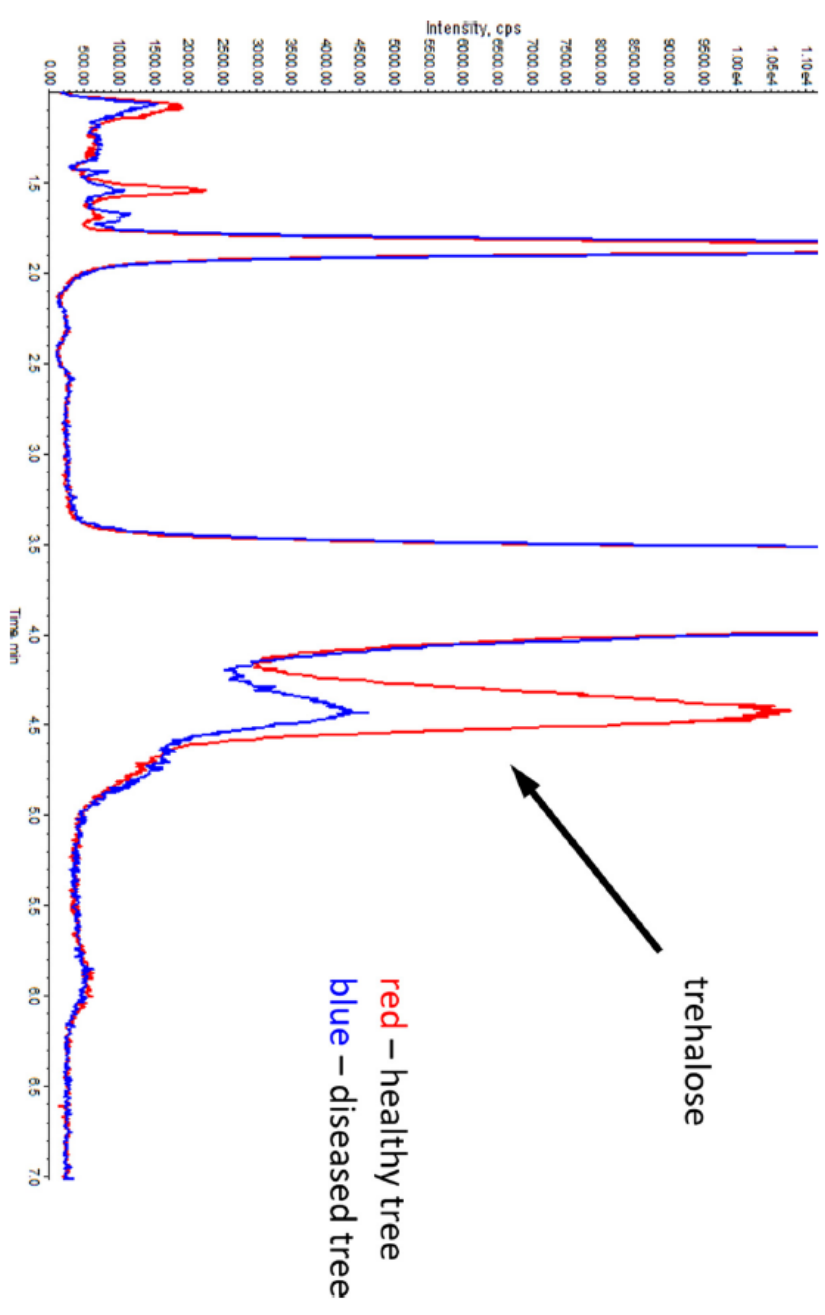


Fig. 1. Chromatogram comparison from a freeze-dried material of a healthy (red) and diseased (blue) tree. Retention time of trehalose is about 4.5 min.

Results from the testing dataset

From our results, it is evident that diseased trees do differ significantly from healthy ones ($p = 0.01$). The mean value of trehalose in healthy spruce roots was $739 \pm 96 \mu\text{g trehalose/g DW}$ (mean \pm SD) as compared to $624 \pm 88 \mu\text{g trehalose/g DW}$ in the damaged group (Fig. 1).

Conclusion

The key factors for accurate trehalose quantitation in ectomycorrhizal roots samples are swift material collection, immediate sample cooling in liquid N_2 , storage at -80°C , and freeze-drying. From the combinations of extracting solvents with varying proportions of either ethanol or methanol in water, the best extraction yield was achieved with 80% methanol/water (v/v) solution (Supporting Information Table S2). In contrast to this, the methodology based on ethanolic mixtures predominantly used in other papers recovered about 10% less trehalose in our experiments. Depending on the nature of the sample, the extraction efficacy was 90–99%. The optimum extraction temperature lay between 50 and 60°C , depending on the matrix (Supporting Information Table S3). Previous studies always used hot ethanol mixes to stop trehalase activity. We minimized the activity of trehalase by putting root samples into liquid N_2 immediately after ectomycorrhizal root excavation and by subsequent freeze-drying. The optimum extraction time was found to be 30 min, even though a small proportion of samples was already fully extracted after 15 min (Supporting Information Table S4). Using lower amounts of sample than 25 mg did not provide reproducible results for trehalose in some samples ($\text{SD} < 32\%$, $n = 5$) and higher amounts are inconvenient due to the large saccharose content, which then interferes with the trehalose peak.

In trehalose LC-MS analysis the main difficulty is finding out the appropriate conditions for separation of trehalose from other carbohydrates. In our work, the mobile phase was modified to achieve good separation. But the novelty of our approach was to develop and optimize extraction procedure for quantitation of trehalose in root samples. To the best of our knowledge, there is no publication where an optimal extraction procedure is described in detail for analysis of spruce ectomycorrhizal roots. Because of the complex matrix of plant materials, the optimization of extraction is quite important.

The validated method was used on set of samples where half of the sampled trees were affected by *Gemmatomyces piceae*. The results showed that these trees had a lower content of trehalose in root samples than trees without this pathogen.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research was Supported by grant "EXTEMIT - K", No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000433 financed by OP RDE and by grant "EVA4.0", No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000803 financed by OP RDE. Further, it was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, institutional support MZE-RO0318.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found at doi:10.1016/j.mex.2020.101207.

References

- [1] O. Fernandez, L. Béthencourt, A. Quero, R.S. Sangwan, C. Clément, Trehalose and plant stress responses: friend or foe? Trends in Plant Sci. 15 (2010) 409–417.

- [2] R. Hampp, C. Schaeffer, T. Wallenda, C. Stülten, P. Johann, W. Einig, Changes in carbon partitioning or allocation due to ectomycorrhiza formation: biochemical evidence, *Can. J. Bot.* 73 (1995) 548–556.
- [3] M. Niederer, W. Pankow, A. Wiemken, Trehalose synthesis in mycorrhiza of Norway spruce: an indicator of vitality, *Eur. J. For. Pathol.* 19 (1989) 14–20.
- [4] E. Rogatsky, H. Jayatilake, G. Goswami, V. Tomuta, D. Stein, Sensitive LC MS quantitative analysis of carbohydrates by Cs⁺ attachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (2005) 1805–1811.



Development of a novel dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of ergosterol in roots and various fungi samples

Alina Kalyniukova^{a,*}, Ivana Tomášková^a, Vítězslava Pešková^a, Filip Pastierovič^a, Michal Samek^a, József Balogh^{b,c}

^a Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, CZ – 165 21 Praha 6 – Suchbát, Czech Republic

^b Department of Chemistry, University of Nyíregyháza, Sóstói út,31/B, H-4400 Nyíregyháza, Hungary

^c Department of Analytical Chemistry, Ushkhorod National University, Pidhums 66, 88000 Ushkhorod, Ukraine

ARTICLE INFO

Keywords:
Ergosterol
Dispersive liquid-liquid microextraction
Green chemistry
Fungi
Mycorrhizae
Liquid chromatography

ABSTRACT

In this work, a novel dispersive liquid-liquid microextraction procedure was developed for the determination of ergosterol using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. The effect of several parameters, such as the selection of extraction and dispersive solvents and their volumes, extraction time, salt concentration and, pH, were studied. Under optimized experimental conditions, the calibration plot was found to be linear in the range of 0.02–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a correlation coefficient of 0.9995. The limits of detection and limit of quantification were found to be 0.006 and 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The enrichment factor was 85. The average recoveries, measured at two concentration levels, were in the range of 95–101%, with RSD less than 14%. The developed method was applied for the determination of ergosterol as a biomarker of mycorrhizae presence in Norway spruce roots and various fungi samples.

1. Introduction

Ergosterol is the major product of sterol biosynthesis in fungi and plays an essential role in their aerobic growth. Ergosterol as a biomarker for fungal biomass or mycorrhiza has proved to be a good indicator of fungal activity [1]. Traditionally, mycorrhiza is considered to be a factor boosting a tree's resistance to drought and heavy metals [2–5], but a positive influence has also been recorded for protection against pathogens [6]. Our research was conducted in order to elucidate the positive relationship between mycorrhizal fungus in Norway spruce roots, the saccharide products of their metabolism and the healthy status of the tree. The experiment was focused on Norway spruce infected by *Gemmatyces piceae* (Borthw.) Casagr. which causes bud blight disease [7]. As oligosaccharides play an essential role in plant metabolism, osmoprotection and signaling [8], our study was focused on oligosaccharides in relation to tree resistance to the pathogen [9]. Ergosterol estimation

was the first step in a multilayer investigation as a biomarker of the presence of fungi in root samples.

Common methodological approaches for ergosterol extraction include high organic solvent consumption that, upon the analysis of a large number of samples, leads to serious environmental pollution. Extraction solvents in conventional extraction methods are ethanol and a mixture of chloroform and methanol [10,11]. In the microwave extraction method, methanol [12], ethanol [13], n-hexane and dichloromethane [14] were used as extractants. The main drawbacks of these methods are the high consumption of extraction solvents (5–50 mL) and protracted time of analysis. However, among environmentally friendly procedures, matrix solid-phase dispersion extraction [15] and ultrasound-assisted extraction [16] were applied for ergosterol analysis. In those assays, ethanol and a mixture of chloroform:methanol were used as an extraction solvent in a volume up to 5 mL. Ergosterol has been determined in wild and edible mushrooms and caterpillar fungus by

Abbreviations: AN, acceptor number; DAD, diode array detector; DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction; DN, donor number; DS, dispersive solvent; ES, extraction solvent; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry method; HPLC, high-performance liquid chromatography; LC-APCI-MS-MS, liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric method; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; LPME, liquid-phase microextraction; LR, linear range; PDA, photodiode array detector; R, recovery; RSD, relative standard deviation; SD, standard deviation; UAE, ultrasound assisted extraction; UV, ultraviolet detector.

* Corresponding author at: Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, CZ – 165 21 Praha 6 – Suchbát, Czech Republic.

E-mail address: druzheva@fd.czu.cz (A. Kalyniukova).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107095>

Received 24 August 2021; Received in revised form 22 November 2021; Accepted 13 December 2021

Available online 15 December 2021

0026-265X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

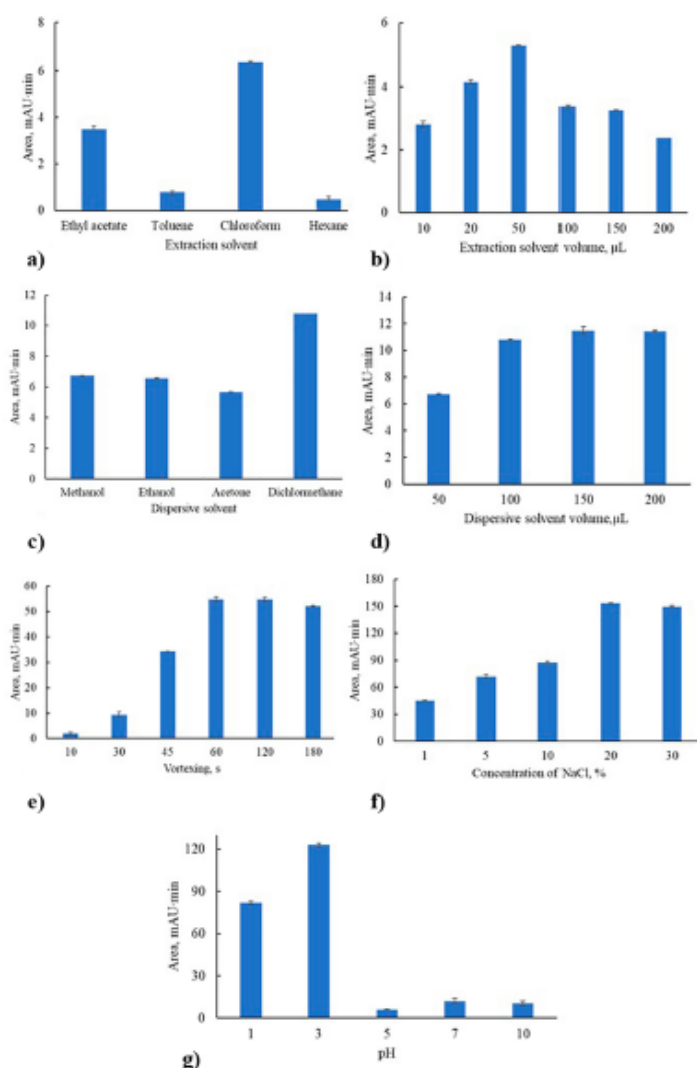


Fig. 1. Optimization of DLLME procedure (a) Selection of extraction solvent (sample volume – 5 mL, volume of extraction solvent – 50 μL , volume of DS – 0 μL , pH 7, concentration of NaCl – 0%, vortexing – 30 s); b) Selection of extraction solvent volume (sample volume – 5 mL, ES – chloroform, volume of ES – 50 μL , pH 7, concentration of NaCl – 0%, vortexing – 30 s); c) Selection of dispersive solvent (sample volume – 5 mL, ES – chloroform, volume of ES – 50 μL , volume of DS – 50 μL ; pH 7, concentration of NaCl – 0%, vortexing – 30 s); d) Selection of dispersive solvent volume (sample volume – 5 mL, ES – chloroform, DS – dichloromethane, volume of ES – 50 μL , volume of DS – 100 μL , pH 7, concentration of NaCl – 0%, vortexing – 30 s); e) Effect of vortexing (sample volume – 5 mL, ES – chloroform, DS – dichloromethane, volume of ES – 50 μL , volume of DS – 100 μL , pH 7, concentration of NaCl – 0%); f) Effect of concentration of NaCl (sample volume – 5 mL, ES – chloroform, DS – dichloromethane, volume of ES – 50 μL , volume of DS – 100 μL , pH 7, vortexing – 60 s); g) Effect of pH (sample volume – 5 mL, ES – chloroform, DS – dichloromethane, volume of ES – 50 μL , volume of DS – 100 μL , concentration of NaCl – 0, vortexing – 60 s).

high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector [10,16], in wild truffles with an HPLC-diode array detector (DAD) [16], in prairie natural wetland by the liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric method (LC-APCI-MS) [17] and in grains by the gas chromatography-mass spectrometry method (GC-MS) [18,19].

According to the principles of green chemistry, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a powerful microextraction technique. In DLLME, an extraction solvent and a disperser solvent are rapidly injected into the sample solution to extract a target analyte. Afterwards, a cloudy solution is formed due to the dispersion of the extraction solvent into fine microdroplets. As a result, the surface area between the extraction solvent and the aqueous sample increases, thus improving the extraction efficiency due to the better transfer of analytes

to the organic phase [20].

Analysis of plant materials is a challenging task, because of the complexity of the matrices [21]. In recent years, studies have been reported more often on the development of liquid-phase microextraction procedures (LPME) for the analysis of plant materials. Moreover, LPME allows the consumption of organic solvents to be minimized, provides a high enrichment factor and easy operation, and is compatible with various detection techniques [22]. The application of DLLME was demonstrated on the extraction of phenolic compounds in roots [23] and leaves samples [24,25], but no microextraction procedure has yet been developed for the extraction of ergosterol.

The objective of this study was to develop a "green" DLLME, in combination with high-performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-PDA), for the determination of

ergosterol that is suitable not only for extraction of ergosterol from Norway spruce roots, but for various fungi samples.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standard: ergosterol ($\geq 96\%$) obtained from Acros organics (China). Solvents: methanol and acetonitrile (HPLC-grade), acetone ($\geq 99.9\%$), ethanol 96% ($\geq 99\%$), dichloromethane ($\geq 99\%$), hexane ($\geq 99\%$), chloroform ($\geq 99.2\%$), hydrochloric acid 32 % ($\geq 99.9\%$) and sodium hydroxide ($\geq 99\%$) were purchased from VWR Chemicals (Prague, Czech Republic).

2.2. HPLC analysis

HPLC analysis was performed using the UltiMate 3000 UHPLC Thermo Fisher (USA) system combined with a photodiode array detector. The separation was achieved using a Hypersil GOLD C18 column (150 mm \times 2.1, mm i. d., 5 μ m) (Thermo Fisher, USA). The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and methanol (B) (v/v, 90/10), and isocratic elution was applied. The column was thermostated at 25 °C. The flow rate of the mobile phase was set at 0.3 mL min⁻¹, and the injection volume was 5 μ L. For ergosterol, the monitoring wavelength was 282 nm and the retention time 5.5 min (± 0.2 min). A Thermo Scientific Chromleon Chromatography Data System was used for data acquisition and processing.

2.3. Sample collection

In total, 84 samples were taken from 6 forest stands of Norway spruce covering the most common sites in the Ore Mts.: acid, rich or gleyed soils in highlands or at mountain elevations. In every forest stand 7 samples from damaged and 7 samples from healthy trees were taken. Samples were taken by means of a root auger with an inner diameter of 6 cm to a depth of 15 cm. Mycorrhizae were assessed following the method detailed by Peřková & Soukup (2006) [26]. Roots were cleaned of the soil and immediately were put into nitrogen. The samples were stored at -80 °C in a freezer and before the analysis, they were freeze dried.

A disk of pedunculate oak with noticeable rot was placed into a humid chamber. After six weeks of cultivation, white mycelium grew on the samples. According to typical features (mycelial thickness and compactness, presence of clamp connections) microscopic examination revealed that it was the mycelium of a wood-destroying fungus.

Fusarium (CLF 1865) and *Phomopsis* (CCF 3854) samples from the Collection of Fungal Cultures, Prague, Czech Republic were used for chemical analyses.

2.4. Statistical method

For statistically significant differences between the groups, factorial ANOVA and the LSD test were used. The Shapiro-Wilk test was used for testing the normal distribution data and the Levene and Brown Forsythe test for homogeneity of the distribution. Data were evaluated on the level $\alpha = 0.05$ using Statistica software.

2.5. Sample pretreatment

A sample weighting 25–100 mg was placed into an Eppendorf tube, and 1 mL of methanol was added. The test tubes were placed into a thermo-shaker (Biosan TS-100, Latvia) for 30 min at room temperature. Afterwards, the samples were centrifugated at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to the new Eppendorf tube and used in the further DLLME procedure.

2.6. DLLME procedure

A 5 μ L aliquot of a standard of ergosterol or 200 μ L of the sample was placed into a 15 mL test tube and make up with the water up to 5 mL. Then, 50 μ L of organic solvent and 100 μ L of dispersive solvent were rapidly injected into the test tube using an automated pipette, and a cloudy solution was formed resulting from the dispersion of the fine droplets. The solution was then vortex for 30 s. For complete phase separation, the solution was kept at rest for 2 min. The upper phase was discarded using a pastier pipette. Then 50 μ L of the lower layer was collected and transferred into a new Eppendorf tube and evaporated under a nitrogen stream. The residue was dissolved in 20 μ L of methanol prior to HPLC-PDA analysis.

3. Results and discussion

3.1. Selection of extraction solvent and its volume

The extraction solvent (ES) plays a key role in DLLME. Four extraction solvents – hexane, toluene, chloroform and, ethyl acetate were tested. The extraction ability of ergosterol changes in the following sequences of solvents: chloroform > ethyl acetate > toluene > hexane, which is in good accordance with their Gutmann acceptor numbers (AN) (kcal mol⁻¹) 23.1 > 9.3 > 3.3 > 0. Therefore, chloroform showed the highest extraction efficiency (Fig. 1a). To examine the effect of the extraction solvent volume, different volumes (10–200 μ L) of chloroform were tested. It was observed (Fig. 1b) that by increasing the volume of extraction solvent up to 50 μ L, the peak area of ergosterol increased, but after 50 μ L it slightly decreased. Thus, 50 μ L was selected as the optimal extraction solvent.

3.2. Selection of dispersive solvent and its volume

As a dispersive solvent (DS), methanol, ethanol, dichloromethane and acetone, as organic solvent candidates, were investigated. The results revealed that the most effective method was adding dichloromethane (AN – 20.4 and Gutman donor number (DN) – 1.0) to chloroform (AN 23.1 and DN 4.0) (Fig. 1c). If to compare the Gutman donor numbers of the selected solvents, dichloromethane has the lowest number, while ethanol, methanol and, acetone have higher DN of 32.0, 30.0 and 17.0, respectively. Therefore, the application of dispersive solvents with higher DN was found to be less effective than a DS with a lower number for the extraction of ergosterol. Thus, dichloromethane was selected for further analysis. To assess the effect of the DS volume on the extraction efficiency, different volumes of DS in the range of 50–200 μ L were checked. As can be seen from Fig. 1d, the extraction efficiency of ergosterol is enhanced up to 100 μ L. At volumes higher than 100 μ L, the analytical response remained constant. Therefore, 100 μ L of dichloromethane was selected for further analysis.

3.3. Effect of extraction time

The effect of extraction time was studied, with the time-varying from 10 to 180 sec of vortex mixing (Fig. 1e). The vortex mixing provided a large contact surface area between the ergosterol and the ES:DS mixer, created by vortex agitation, which led to an increase in the response, reaching its maxima at 60 s. So, 60 s of vortexing was selected as the optimal extraction time.

3.4. Effect of ionic strength

To study the effect of ionic strength on the extraction efficiency, the aqueous phase was changed to a 1%, 5%, 10%, 20% and 30% solution of NaCl. As shown in Fig. 1g, by increasing the NaCl concentration from 0 to 20%, the analytical signal increased and remained constant up to 30%. Thus, the extraction efficiency of ergosterol from aqueous solution

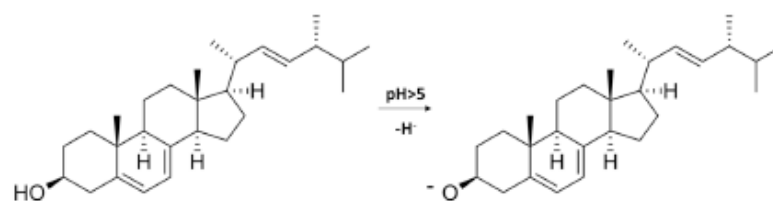


Fig. 2. Extraction of ergosterol forms at the pH > 5.

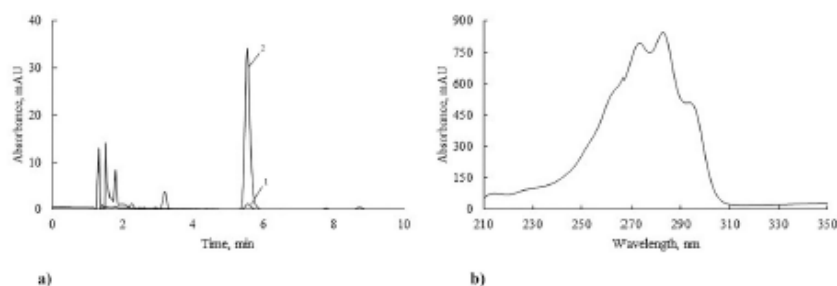


Fig. 3. a) The chromatograms of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ergosterol obtained by 1 - conventional extraction (Extraction condition: extraction solvent – 1 mL of methanol); 2 – DLLME (Extraction conditions: extraction solvent – 50 μL of chloroform; dispersive solvent – 100 μL of dichloromethane; extraction medium – 5 mL of 20% NaCl, pH 3; vortexing 60 s.); b) UV-spectra of ergosterol.

to organic solvent was improved by the salting-out effect, decreasing the hydration of ergosterol (R-OH) and improving the extraction ability of ergosterol. Therefore, a 20% solution of NaCl was chosen as the optimum salt concentration for further experiments.

3.5. Effect of pH

The influence of pH on the ionization form of the analyte could affect its extractability; therefore, the pH in the range of 1–10 was investigated. The pH was adjusted using 0.1 M hydrochloric acid or sodium hydroxide solution using 50 + Violab pH meter. The results (Fig. 1h) showed that the highest analytical response was obtained at pH 3. At a pH > 5, the R-OH form of ergosterol forms R-O⁻ (Fig. 2), which has ionic character and is weakly extracted to organic solvents. Thus, a pH of 3 was selected for further experiments.

Summarizing, the optimal conditions for DLLME were the following: extraction solvent – 50 μL of chloroform; dispersive solvent – 100 μL of dichloromethane; extraction medium – 5 mL of 20% NaCl, pH 3; extraction time – vortexing 60 s.

3.6. Analytical figures of merit

The standard of ergosterol at appropriate concentration was prepared for the construction of the calibration curve for a non-extraction procedure by plotting the peak area vs. the concentration of the analyte. Good linearity was obtained in the concentration range from 1.31 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with the following equation $A = 0.2695 \cdot C - 0.0505$, where, A – peak area (mAU·min), C – concentration of ergosterol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) and the correlation coefficient is 0.9990. For DLLME, the linear range was 0.02–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with equation $A = 22.87 \cdot C - 0.6405$, where A – peak area (mAU·min), C – concentration of ergosterol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) and the correlation coefficient is 0.9995. The chromatograms of ergosterol and the UV spectra of ergosterol are presented in Fig. 3. The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), calculated as 3σ and 10σ the standard deviation of the minimal detected concentration (0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the non-extraction method and 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for DLLME)

Table 1

Results of intra-day and inter-day precision test of ergosterol by DLLME (n = 5).

Spiked concentration, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inter-day			Intra-day		
	Found \pm SD	RSD, %	R, %	Found \pm SD	RSD, %	R, %
0.45	0.42 ± 0.06	14.9	95	0.43 ± 0.03	6.9	96%
1.00	1.01 ± 0.14	14.2	101	0.99 ± 0.05	5.1	99%

divided by the slope, were found to be 0.39 and 1.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the non-extraction method and 0.006 and 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for DLLME, respectively. The enrichment factor was estimated as the ratio of the slope of the calibration plots for DLLME and the non-extraction procedure and found to be 85. The pre-concentration factor, calculated as the ratio of the volume of aqueous phase (5 mL) and the final volume subjected to detection (20 μL), was found to be 250. The precision of the method was evaluated by inter- and intra-day measurements at two concentration levels: 0.45 and 1.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The intra-day precision was determined by analyzing samples five times (each analysis was performed 5 times) in one day, and the inter-day precision was determined by analyzing the samples once a day on five consecutive days. The intra-day and inter-day RSDs were less than 15%, which showed good reproducibility of the developed method (Table 1).

3.7. Application of DLLME in real samples analysis

To study the applicability of the developed method, different samples were investigated, including Norway spruce roots, *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., and mycelium of wood-destroying fungus. The samples matrix is complex and additional sample pre-treatment was required. The procedure of sample pre-treatment was previously optimized using the root samples. For this purpose, parameters such as extraction solvent, solid:liquid ratio, extraction time and temperature were optimized.

Table 2
Amount of ergosterol in fungi samples, n = 3.

Sample	Added concentration, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Found concentration, $\mu\text{g g}^{-1}$	R, %	RSD, %
<i>Fusarium</i> sp.	0	$3.4 \pm 0.2^*$	96	5.0
	10.0	$13.0 \pm 0.1^*$		0.3
Mycelium of a wood-destroying fungus	0	251.0 ± 2.6	111	10.0
	0.6	584.3 ± 0.4		0.1
<i>Trametes hirsuta</i>	0	38.6 ± 0.1	98	0.2
	0.6	136.7 ± 0.2		0.1
<i>Phomopsis</i> sp.	0	$2.2 \pm 0.1^*$	100	0.4
	0.2	$4.2 \pm 0.1^*$		0.7
Norway spruce roots	0	266.0 ± 1.3	101	0.5
	2.0	320.0 ± 3.0		1.0

* $\mu\text{g mL}^{-1}$.

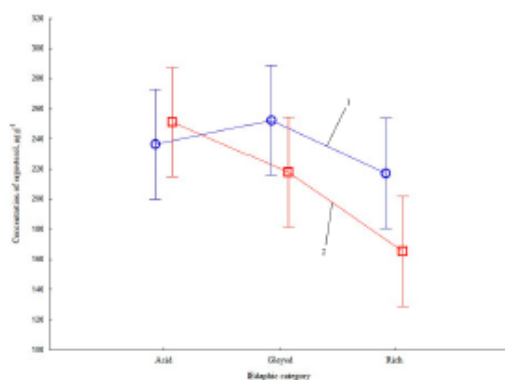


Fig. 4. Ergosterol concentration in Norway spruce roots in different type of soil and level of damage of roots (1 – non-damaged, 2 – damaged trees).

Methanol, ethanol, methanol:dichloromethane (70:30) were tested as extraction solvents. The highest extraction yield was obtained with methanol, and it was selected for further experiment (*Supplementary materials Fig S1. a*). For the selection of the optimal solid:liquid ratio, sample of 25, 50, 100, and 150 mg were tested, no big difference in ergosterol recovery was found, therefore, 25–100 mg of the sample was decided to be suitable for analysis. Extraction time and temperature were tested using a thermoshaker. The extraction time was varied from 5 to 45 min (*Supplementary materials Fig S1. b*) and the extraction temperature from 25 to 60 °C (*Supplementary materials Fig S1. c*). The highest recovery was obtained after 30 min of shaking and remained constant afterwards. The temperature did not influence the extraction recovery of ergosterol; therefore, further analysis was carried out at room temperature.

At optimal conditions, the DLLME procedure was carried for the

determination of the concentration of ergosterol using a standard addition method. The chromatograms of the samples are presented in the *Supplementary materials Fig. S2*. All samples were spiked with ergosterol at different concentration levels. *Table 2* reveals the obtained mean value \pm standard deviation (SD) and recoveries of ergosterol. As can be seen, RSDs are less than 10% while the recoveries are more than 96%. As a result, DLLME could be a good alternative assay for the determination of ergosterol.

Based on the purpose of this article, Norway spruce roots were analyzed in the term of ergosterol estimation as a biomarker of the fungi. The results are in the *Supplementary materials Table S1*. The value of the concentration of ergosterol extracted from the roots of the tree depending on the type of the soil (acid, gleyed, and rich) and the degree of root damage (non-damage tree and very damage tree) was compared. The phytopathological survey revealed the non-branched root system in trees affected by necrotrophic fungi compared to a healthy one. Ergosterol concentration was significantly lower in the damaged roots at rich edaphic category sites compared to healthy trees from rich and gleyed edaphic categories (*Fig. 4, Table 3*). When the comparison was made for all edaphic categories together only insignificant lower values for damaged trees were found.

3.8. Comparison with other extraction methods

The developed microextraction procedure was compared terms of the matrix, solvent consumption, LR, LOD or LOQ with previously developed procedures for the extraction of ergosterol in *Table 4*. The reported solvent extractions required a high amount of extraction solvents from 1 to 30 mL, wherein for DLLME, only 150 μL is required. The applicability of the DLLME is wider because it is possible to use it for various samples in comparison with other methods, where only one kind of the sample was suitable for analysis. In addition, DLLME-HPLC-PDA provided a good sensitivity in comparison with other works [10,15–17,20].

4. Conclusion

DLLME with HPLC-PDA detection was developed for the determination of ergosterol in a fungal biomass in Norway spruce root samples and various fungi matrices. The developed method belongs to “green” chemistry methods, what require a low amount of solvent and, are characterized by good sensitivity and reproductivity. The proposed assay could be a good alternative to already existing methods.

CRedit authorship contribution statement

Alina Kalyniukova: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Ivana Tomášková: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Vítězslava Pešková: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Filip Pastierovič: Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. Michal Samek: Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. József Balogh: Formal analysis, Investigation, Writing –

Table 3

LSD test for comparison of ergosterol content in spruce roots (displayed numbers represent p values). Error: Between MS = 4686.2. df = 78.000.

Level of damage/type of soil		0 acid	0 gleyed	0 rich	4 acid	4 gleyed	4 rich
0	acid		0.544345	0.456055	0.572735	0.472778	0.007233
0	gleyed	0.544345		0.178374	0.966207	0.187266	0.001181
0	rich	0.456055	0.178374		0.192192	0.978033	0.047960
4	acid	0.572735	0.966207	0.192192		0.201593	0.001350
4	gleyed	0.472778	0.187266	0.978033	0.201593		0.045046
4	rich	0.007233	0.001181	0.047960	0.001350	0.045046	

Table 4
Comparison of developed DLLME with other extraction methods.

Sample	Extraction method	Amount of solvent	Detection	LR ¹	LOD ² /LOQ ³	Ref.
Wild mushrooms (<i>A. caesarea</i> , <i>B. edulis</i> , <i>C. cibarius</i> , <i>F. hepatica</i> , <i>L. deliciosus</i> , <i>M. procerum</i> and <i>M. esculenta</i>)	Soxhlet extraction	5 mL of n-hexane	HPLC-UV ⁴	31.25 to 2000 µg mL ⁻¹	0.3498/1.060 µg mL ⁻¹	[10]
Wild truffles (<i>T. melanosporum</i> and <i>T. aestivum</i>)	UAE ⁵	4 mL of chloroform/methanol (2:1)	HPLC-DAD ⁶	0.1–1.0 mg mL ⁻¹	0.023/0.076 mg mL ⁻¹	[16]
Edible fungi	Matrix solid-phase dispersion extraction	5.0 mL 70% ethanol	LC-UV	4.21–25.27 µg mL ⁻¹	0.04/0.13 µg mL ⁻¹	[15]
<i>Cordyceps sinensis</i>	Solvent extraction	1 mL methanol/dichloromethane (75:25)	HPLC-UV	5–300 µg mL ⁻¹	0.01/0.03 µg mL ⁻¹	[27]
Prairie natural wetland	UAE	10 mL pentane	LC-APCI-MS-MS ⁷	0.10–1.00 µg mL ⁻¹	0.50 ng mL ⁻¹	[17]
Norway spruce roots, <i>Fusarium</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., mycelium of a wood destroying fungus, <i>Trametes hirsuta</i>	DLLME	50 µL chloroform 100 µL dichloromethane	HPLC-PDA	0.02–10 µg mL ⁻¹	0.006/0.02 µg mL ⁻¹	This work

¹ LR – linear range, ² LOD – limit of detection, ³ LOQ – limit of quantification, ⁴ UV – ultraviolet detector, ⁵ UAE – ultrasound assisted extraction, ⁶ DAD – diode-array detector, ⁷ LC-APCI-MS-MS – liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric method.

original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was supported by grant “Advanced research supporting the forestry and wood-processing sectors adaptation to global change and the 4th industrial revolution”, No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000003 financed by OP RDE⁺ and the Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Forestry and Wood Sciences (Excellent teams 2021).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107095>.

References

- A.K. Besi, J. Lajtha, I. Kozma, I. Fekete, Application of a stir bar sorptive extraction sample preparation method with HPLC for soil fungal biomass determination in soils from a detrital manipulation study, *J. Microbiol. Methods* 136 (2017) 1–5, <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2017.02.009>.
- T. Ledto, J.J. Zwiazek, Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review, *Mycorrhiza* 21 (2011) 71–90, <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0348-9>.
- E.A. Lilleskov, P.M. Wargo, K.A. Vogt, D.J. Vogt, Mycorrhizal fungal community relationship to root nitrogen concentration over a regional atmospheric nitrogen deposition gradient in the northeastern USA, *Can. J. For. Res.* 38 (2008) 1260–1266, <https://doi.org/10.1139/X07-211>.
- E.A. Lilleskov, T.W. Kuyper, M.L. Bidartondo, E.A. Hobbie, Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: a review, *Environ. Pollut.* 246 (2019) 148–162, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.074>.
- J.W.G. Cairney, A.A. Meberg, Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities, *Environ. Pollut.* 106 (1999) 169–182, [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00081-0).
- T. Corcobado, M. Vinas, G. Mareno, A. Solla, Ectomycorrhizal symbiosis in declining and non-declining *Quercus ilex* trees infected with or free of *Phytophthora cinnamomi*, *For. Ecol. Manag.* 324 (2014) 72–80, <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.03.040>.
- K. Čerň, V. Pešková, F. Soukup, L. Havrdová, V. Strnadová, D. Zahradník, M. Hrabětová, Gemmanycetes bud blight of *Picea pungens*: a sudden disease outbreak in Central Europe, *Plant Pathol.* 65 (2016) 1267–1278, <https://doi.org/10.1111/ppa.12513>.
- U. Nehls, F. Gohringer, S. Wittulsky, S. Dietz, Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review, *Plant Biol.* 12 (2010) 292–301, <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00912.x>.
- M. Samek, R. Modlinger, D. Bača, F. Lorenz, J. Vachová, I. Tomášková, V. Pešková, First record of the bud blight Gemmanycetes piceae on the Norway spruce *Picea abies* in the Ore mountains and subsequent development of the forest stand damage, *Forests* (2021) (in prep.).
- J.C.M. Barreira, M.R.P.P. Oliveira, L.C.F.R. Ferreira, Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms, *Food Anal. Methods* 7 (2014) 217–223, <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9621-9>.
- S.Y. Newell, T.L. Aruffi, R.D. Fallon, Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography, *Appl. Environ. Microbiol.* (1988) 1876–1879, <https://doi.org/10.1128/AEM.54.7.1876-1879.1988>.
- K. Stuper-Szablewska, T. Rogozinski, J. Perkowski, Contamination of pine and birch wood dust with microscopic fungi and determination of its sterol contents, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 68 (2017) 127–134, <https://doi.org/10.1515/ahh-2017-68-2924>.
- S.A. Heleno, M.A. Prieto, L. Barros, A. Rodrigues, M.F. Barreiro, L.C.F.R. Ferreira, Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology, *Food Bioproc. Process.* 100 (2016) 25–35, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.006>.
- G.A. Bataglion, E. Meurer, A.C. de Albergaria-Barbosa, M.C. Bicego, R.R. Weber, M. N. Eberlin, Determination of geochemically important sterols and triterpenols in sediments using ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), *Anal. Chem.* 4 (2015) 7771–7778, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01517>.
- Z.M. Qian, Z. Wu, C.H. Li, G. Tan, H. Hu, W. Li, A green liquid chromatography method for rapid determination of ergosterol in edible fungi based on matrix solid-phase dispersion extraction and a core-shell column, *Anal. Methods* 12 (2020) 3337–3343, <https://doi.org/10.1039/d0ay00714e>.
- A. Villares, A. Garcia-Lafuente, E. Guillamón, A. Ramos, Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles, *J. Food Compos. Anal.* 26 (2012) 177–182, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.12.003>.
- J.V. Headley, K.M. Peru, B. Verma, R.D. Roberts, Mass spectrometric determination of ergosterol in a prairie natural, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 149–156, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00326-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00326-6).
- Z. Hossain, T. Goto, A rapid determination of ergosterol in grains using gas chromatography-mass spectrometry method without derivatization, *Food Anal. Methods* 8 (2015) 1021–1026, <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9983-7>.
- C. Lamper, J. Těrn, T. Bartík, R. Komoróczy, A. Mesterházy, F. Sági, Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of the ergosterol content, *Cereal. Res. Commun.* 28 (2000) 337–344, <https://doi.org/10.1007/BF03543613>.
- M. Rutkowska, J. Plotka-Wasylika, M. Sajid, V. Andrich, Liquid-phase microextraction: a review of reviews, *Microchem. J.* 149 (2019), 103989, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103989>.
- A. Mocan, M. Babota, A. Pop, I. Fizeşan, A. Diuzheva, M. Locatelli, S. Carradori, C. Campestru, L. Menghini, C. R. Sisa, M. Soković, G. Zengin, R. Păltinean, S. Badarau, D. C. Vodnar, G. Crişan, Chemical Constituents and Biologic Activities of Sage Species: A Comparison between *Salvia officinalis* L., *S. glutinosa* L. and *S. transylvanica* (Schur ex Griseb. & Schenk) Schur. *Antioxidants* (Basel), 9 (2020), 480, 10.3390/antiox9060480.
- A. Diuzheva, M. Locatelli, A. Tartaglia, M. Goga, V. Ferrone, G. Carlucci, V. Andrich, Application of liquid-phase microextraction to the analysis of plant and herbal samples, *Phytochem. Anal.* 31 (2020) 687–699, <https://doi.org/10.1002/pca.2939>.
- A. Diuzheva, S. Carradori, V. Andrich, M. Locatelli, E. de Luca, M. Tiecco, R. Germani, I. Menghini, A. Nocentini, P. Grutteri, C. Campestru, Use of innovative (micro)extraction techniques to characterize harpagophytum procumbens root and its commercial food supplements, *Phytochem. Anal.* 29 (2017) 233–241, <https://doi.org/10.1002/pca.2737>.
- A. Mocan, A. Diuzheva, S. Carradori, V. Andrich, X. Massafa, C. Moldovan, C. Sisa, J.F. Petzer, A. Petzer, S. Zara, G.D. Marconi, G. Zengin, G. Crişan, M. Locatelli, Development of novel techniques to extract phenolic compounds from Romanian cultivars of *Prunus domestica* L. and their biological properties, *Food Chem. Toxicol.* 119 (2018) 189–196, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.045>.

- [25] A. Mocan, A. Duzheva, S. Bădăleu, C. Moldovan, V. Andrich, S. Carradori, C. Campestre, A. Tartaglia, M. De Simone, D. Vodnar, M. Tiecco, R. Germani, G. Crisan, M. Locatelli, Liquid phase and microwave-assisted extractions for multicomponent phenolic pattern determination of five romanian Galium species coupled with bioassays, *Molecules* 24 (2019) 1226, <https://doi.org/10.3390/molecules24071226>.
- [26] V. Pešková, F. Soukup, Level of mycorrhizal infection: the standard method. *Journal of For. Sci.* 47 (a.1.2) (2001), 151153.
- [27] J.F. Yuan, J.H. Wang, X. Liu, H.C. Kuang, S.H. Zhao, Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC, *Food Chem.* 105 (2007) 1755–1759, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.070>.

Příloha 12 Development of a novel dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of ergosterol in roots and various fungi samples

REVIEW PAPER

Pathogens threatening Czech Republic forest ecosystems – a review

František Lorenc^{(1)✉}, Michal Samek^(1, 2)

⁽¹⁾ Forestry and Game Management Research Institute, Strnady 136, CZ – 252 02 Jíloviště-Strnady, Czech Republic

⁽²⁾ Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Kamýcká 129, CZ – 165 00 Praha 6 – Suchbátka, Czech Republic

ABSTRACT


In recent years, European forests have been endangered by rising temperatures and more frequent weather extremes. In the Czech Republic, the warm and dry period between 2015 and 2019 led to the weakening of many trees and activation of harmful biotic agents, including fungal and other pathogens. These factors led to the death and decline of many trees and forest stands. The most important pathogens of forest trees in the Czech Republic are *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink; *A. gallica* Marxm. & Romagn.; *A. cepistipes* Velen.; *A. mellea* (Vahl) P. Kumm; *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.; *H. parviporum* Niemelä & Korhonen; *H. abietinum* Niemelä & Korhonen; *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier; *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya; *Cryptostroma corticale* (Ellis & Everh.) P.H. Greg. & S. Waller; *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz; *Cucurbitaria piceae* Borthw.; *Phytophthora alni* species complex; *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt.; *P. cambivora* (Petri) Buisman; *P. cinnamomi* Rands.; *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess and *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld. Other important forest tree pathogens with potential for spreading in the Czech Republic in the coming years are *Neonectria coccinea* (Pers.) Rossman & Samuels; *Inonotus* spp.; *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton; *Cenangium ferruginosum* Fr. and *Lecanosticta acicola* (Thüm.) Syd. The effects of most of the above-mentioned pathogens are expected to be similar or greater in the future. Moreover, the introduction of new invasive pathogens cannot be neglected. Measures against dangerous fungal and fungal-like infections should include long-lasting management decisions. It is crucial to strengthen the overall resilience of forest stands by increasing their species, age and spatial diversities; planting site-suitable tree species and focusing on timely interventions against pathogens and the prevention of their spread, all in relation to the integrated pest management plans.

KEY WORDS

climate change, Czechia, drought, forest protection, invasive pathogens

✉ Tel. +420 724 352 558, e-mail: lorenc@vulhm.cz

Received: 29 June 2021; Revised: 19 January 2022; Accepted: 20 January 2022; Available online: 22 March 2022

 Open access

©2021 The Author(s). <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Introduction

Fungal pathogens cause significant damage to forest ecosystems worldwide (Stenlid and Oliva, 2016). These pathogens can cause massive economic loss, such as damage caused by *Heterobasidion* root rot, which exceeds 800 million euros in Europe annually (Brunette and Cauria, 2016). Global climate change also has a significant effect on the development of pathogens. It can be a limitation factor in the life cycle of pathogens, and in some cases, worsen their spread. Owing to global climate change, European forests face changes in average climatic factors and increasingly extreme weather fluctuations, such as prolonged drought, storms, floods (Lindner *et al.*, 2008, 2010) and extreme heat (Lorenz *et al.*, 2019). In the Czech Republic, the mean annual temperature during 2015-2019 was approximately 1.3°C higher than the mean annual temperature during 1980-2010. Moreover, the annual total precipitation was 78% in 2015 and 76% in 2018, compared to annual total precipitation during 1980-2010 (ČHMÚ, 2020). These changes lead to an increase in drought frequency as a stress factor, causing a reduction in the assimilation apparatus, which reduces the carbon content in woody plants. This subsequently weakens their resistance to biotic pests (Oliva *et al.*, 2014), including fungal and fungal-like pathogens (Desprez-Loustau *et al.*, 2006). These weather conditions have negatively affected the health of forest stands (Novotný, 2020) and led to the activation of several harmful biotic factors. Overgrowth of bark beetles, combined with the neglect of timely search and sanitation of infested trees, has led to a widespread decay of many stands (Lubojacký and Knížek, 2020). In addition, the damage caused by fungal and other pathogens through primary or secondary participation has increased (Lorenc, 2020b). Moreover, invasive pathogens have massively spread due to the increasing frequency of global trade and transportation. The most important being the timber, wood products, wood packaging and 'plants for planting' pathways (Potter and Unquart, 2017). The most significant invasive pathogens that have uncontrollably spread in the Czech Republic in recent years are *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya; *Cryptostroma corticale* (Ellis & Everh.) P.H. Greg. & S. Waller; *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz; *Cucurbitaria piceae* Borthw. and *Phytophthora* spp. These, along with other important pathogens and their life cycles, are described in detail below. Some other potential pathogens are also briefly mentioned.

This review aims to summarize the present and possible future pathogens, which can be a significant threat for trees in Czech forests. Presented data about the volume of harvested wood and damaged area from the Czech Republic (MZE, 2015-2021) are based on the data received from forest managers (Knížek and Liška, 2021) and recalculated to represent the whole Czech Republic (MZE, 2021).

Basidiomycete fungal pathogens

The most significant long-term pathogen in Czech forests is honey fungus *Armillaria* spp. The Czech Republic comprises five *Armillaria* species: 1) *A. ostoyae* (Romagn.) Herink, which threatens mainly spruce plantations but can also occur on other conifers and broadleaves; 2) *A. gallica* Marxm. & Romagn., which threatens mainly oak stands but can also occur on other broadleaves and conifers (Jankovský, 2003; Dálya and Sedlák, 2020); 3) *A. cepistipes* Velen., which is predominantly a saprotroph (less often parasite) which occurs on broadleaves and rarely on conifers, mainly in hilly and lower montane beech forests; 4) *A. mellea* (Vahl) P. Kumm., which occurs on broadleaves, including fruit trees and 5) *A. borealis* Marxm. & Korhonen, which is predominantly a saprotroph (rarely a parasite) of both broadleaves and conifers, with no major

economic importance (Jankovský, 2003). *Armillaria* spp. causes severe damage mainly in Silesia and northern and central Moravia. The most endangered plants are monoculture plantations (Dálya and Sedlák, 2020), especially non-native spruce stands (Černý, 1988) on compacted soils, with a lack of nutrients and soil pH values <5 (Lindner *et al.*, 2008). Volumes of harvested spruce wood from salvage cuttings due to *Armillaria* sp. infestation in the Czech Republic were (in m³): 304K in 2020, 210K in 2019, 250K in 2018, 450K in 2017, 731K in 2016 and 423K in 2015 (MZE, 2016-2021). The areas most affected in the long-term are Silesia, North Moravia and South Moravia (MZE, 2016-2021). Research on *Picea abies* (L.) H. Karst. in the Czech part of Silesia in 2015 showed that, among the trees with confirmed honey fungus infections, 56% were infected by *A. ostoyae*, 32% were infected by *A. cepistipes* and 1% were infected by *A. gallica* (Holuša *et al.*, 2018). The symptoms of infestation of woody plants by *Armillaria* spp. include resinous outflow, white rot of wood (mainly in the roots and lower part of the trunk), bottle-thick bases of trunks, light grey-green or yellow-green colouring and subsequent fall-off of needles, the presence of fruiting bodies near infested trees and the presence of brown or black cord-like rhizomorphs on and around the roots (Soukup, 2005). The effect of *Armillaria* spp. increases with higher temperatures and lower precipitation during the growing season (Lindner *et al.*, 2008). Therefore, under the current and future predicted climate conditions, continuing significant damage to woody plants by honey fungus can be expected. Spruce stands have lower pH compared to beech and beech-spruce mixed stands (Cremer and Prietzel, 2017). Therefore, in monocultural spruce plantations, an effective measure can be the planting other tree species (*e.g.*, *Fagus sylvatica*) that increase soil pH, which is less favourable to *Armillaria* species (Holuša *et al.*, 2018). Forest managers should be prepared to convert spruce stands to near-natural forests instead of monoculture plantations (Holuša *et al.*, 2018), as this can significantly reduce the rate of infestation by *Armillaria* spp. as well as other wood-decay fungi (Morrison *et al.*, 2014; Dálya and Sedlák, 2020). Stump removal and root raking are other measures that reduce mortality and can be used in the effort against *Armillaria* spp. (Morrison *et al.*, 2014). Pre-commercial thinning seems to be unnecessary in areas where spruce plantations are highly stressed (Holuša *et al.*, 2018). The most frequent biocontrol agents are based on the fungus *Trichoderma* spp., which may efficiently employ diverse antagonistic mechanisms against fungal plant pathogens (Percival *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2019; Rees *et al.*, 2021).

The second most crucial fungal pathogen causing root rot in the Czech Republic is *Heterobasidion annosum* sensu stricto, which includes three Eurasian species: *H. annosum* (Fr.) Bref.; *H. parviporum* Niemelä & Korhonen and *H. abietinum* Niemelä & Korhonen (Niemelä and Korhonen, 1998). In the Czech Republic, the *H. annosum* species is most common and occurs on many conifers and broadleaves. *H. parviporum* occurs mainly on *Picea* spp. (Sedlák and Tomšovský, 2011) and other conifers, but less on broadleaves (CABI, 2021a). *H. abietinum* occurs only on conifers (Sedlák and Tomšovský, 2011). These pathogens cause the most serious damage in stands on forested former agricultural land. In *P. abies* stands on former pastures and meadows, the primary infection caused through *H. parviporum* spores is dominant, but secondary infection increases with stand age. *H. parviporum* can form large (over 100 m²) territorial clones, causing extensive tree dieback and mortality (Klavina *et al.*, 2021). Symptoms caused by *Heterobasidion* spp. vary depending on the pathogen species involved, the tree species infected, the age and previous use of the forest stand, the soil type, the local climate, and possibly atmospheric pollution. Even so, it is possible to consider the general main symptoms of infestation by *Heterobasidion* spp. to be root rot, subsequent rot of the rhizome of the trunk, and resinous outflow. When disintegration of sapwood starts, the crown begins to thin. Infected trees occur in clusters in the stand and are

highly sensitive to windthrow. Fruiting bodies of *Heterobasidion* spp. grow on roots, stumps, and dead trunks (Soukup, 2011). Climate change towards a milder winter with prolonged periods at temperatures above 5°C can increase the sporulation and infection of *Heterobasidion* spp. (La Porta *et al.*, 2008). Drought can predispose conifers to *Heterobasidion* attack through the reduction of the endogenous defence mechanisms of trees (Lindberg and Johansson, 1992). Therefore, continuing serious damage of conifers by *Heterobasidion* root rot can be expected in the Czech Republic and beyond, because the fungus may remain active in dead stumps and in the root systems for decades. Stumps after thinning can be infected by the pathogen through spores (Pratt and Greig, 1988). Stump removal with the careful removal of all roots is the only effective control strategy against *Heterobasidion* root and butt rots on heavily infested sites (Cleary *et al.*, 2013; Garbelotto and Gonthier, 2013). However, it is an expensive and time-consuming control method that requires the use of machines, making it unsuitable for most forest stands. Potential solutions are chemical and biological control agents (especially biological preparations based on *Phlebia gigantea* [Fr.] Donk.), which were proved to be effective and are recommended for use (Holdenrieder *et al.*, 1998; Klavina *et al.*, 2021). A long-term alternative is to change the tree species composition to a mixture forest, with the use of planting near-natural forests (Worrall *et al.*, 2010).

Ascomycete fungal pathogens

The Dutch elm disease affecting elms (*Ulmus* spp.), caused by the fungus *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf., was first recorded in the Czech Republic's present territory (the former Czechoslovakia) in 1932 (Polák, 1932). It spread in the following years, especially in floodplain forests in the lowlands (Kalandra and Pfeffer, 1935). A new and more aggressive species, *O. novo-ulmi* (Brasier, 1991), spread widely in the 1970s (Jančařík, 1976), causing the massive death and disappearance of elms from many areas. The occurrence of *O. novo-ulmi* on elms in the Czech Republic was confirmed by Dvořák *et al.* (2007) using molecular biology methods; the presence of both subspecies *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* Brasier (indigenous in the areas of Ukraine and Moldavia) and *O. novo-ulmi* subsp. *americana* Brasier & S.A. Kirk (indigenous in North America) and its hybrids was recorded. No strain belonged to *O. ulmi* (Dvořák *et al.*, 2007). The spores of both pathogens are mainly spread by subcortical insects, especially *Scolytus* spp. (Příhoda, 1959; Jürisoo *et al.*, 2021). The pathogen's hyphae block the conductive tissues of the host (Příhoda, 1959). The host subsequently defends itself against the penetration of the pathogen and its toxins by forming clumps of accompanying parenchymal cells, which leads to further blockage of the conductive tissues (Jančařík, 1999). During the acute course of the disease, the leaves wither, curl and dry but do not fall off, and the tree dies during one growing season. In some cases, the branches of the infested trees dry from one side of the crown to the centre over many years. The process of dying can take many years, without any symptom (Příhoda, 1959). In recent years, there has been no noticeable increase in the Dutch elm disease in the Czech Republic. Nevertheless, it remains a significant threat. Rising temperatures can favour bark beetles which are vectors of *O. novo-ulmi* (Santini and Faccoli, 2014). However, it is unclear how ongoing climate change will affect elms (Martín *et al.*, 2019) as well as interactions among the fungal pathogen, its insect vectors, and the host trees (Santini and Faccoli, 2014). The most effective measure against this disease is integrated pest management, which lowers the fungal inoculum levels and vector densities. Prompt sanitation is the best single method of containing the disease. Biological protection can also be used via biocontrol products based on *Verticillium albo-atrum* (Postma and Goosen-van de Geijn, 2016). Chemical control, especially fungicides injected pre-

ventively or curatively, play an important role when other methods cannot be implemented (Stipes, 2000). Using non-native, resistant genotypes or material bred with higher field resistance could be used to re-establish European elms (Solla *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2021).

Ash dieback is one of the most concerning and fastest-spreading fungal diseases of woody plants in Europe, including the Czech Republic. The causative agent of ash dieback, the fungus *Hymenoscyphus fraxineus* (anamorph *Chalara fraxinea* Kowalski), was first recorded in the Czech Republic in 2007 (Jankovský and Holdenrieder, 2009), but it has possibly occurred there before. The disease spread from the northeast to the southwest of the country and affected mainly young trees. Nowadays, it occurs in practically the whole of the Czech Republic on both young and old trees (Havrdová and Černý, 2012). In the Czech Republic, *H. fraxineus* attacks the native ash species, *Fraxinus excelsior* L., more often than native *F. angustifolia* Vahl (Havrdová *et al.*, 2016b). Non-native *F. ornus* L. is less susceptible to *H. fraxineus* infection than both native Czech ash species (Queloz *et al.*, 2011). The pathogen is the most serious in plantations with a higher proportion of ash trees – especially in ash-alder alluvial forests, hardwood alluvial forests, riparian stands (Havrdová and Černý, 2012) and urban plantings. Typical symptoms of ash dieback are leaf spots, premature leaf drop, drying of shoots and branches, excessive formation of preventive shoots, secondary crown development (including growth on the trunk), colouring of wood, and necrosis of surface tissues at the base of the trunks and roots (Černý *et al.*, 2016a). Recorded occurrence of ash decline (dominantly due to *H. fraxineus*, less due to other fungal pathogens *e.g.*, *Armillaria* spp. and *Ganoderma applanatum* [Pers.] Pat.) in forests of the Czech Republic were (in ha): 3.5K in 2020, 6K in 2019, 5K in 2018, 4K in 2017 and 4K in 2016 (MZE, 2017–2021). The damage caused by ash dieback increases with tree density, proportion of ash in stands, nutrient and water availability and temperature (Havrdová *et al.*, 2016a). Juvenile trees are more exposed to competition with other vegetation and thus more predisposed to die-off if they are infected by ash dieback (Cech, 2008). In contrast, spore density of *H. fraxineus* decreases with increasing height of the stand (Timmermann *et al.*, 2017) and damage by ash dieback decreases with distance to other ash stands and increasing slope (Havrdová *et al.*, 2016a). Infected trees appear to be more susceptible to other pathogens, especially *Armillaria* spp. (Timmermann *et al.*, 2017). The most significant potential damage areas are warm and wet areas in the Silesia and Western Carpathians (Havrdová *et al.*, 2016a). Due to the rapid spread of *H. fraxineus*, the cultivation of ash trees remains problematic and the establishment of new ash stands is often abandoned. The survival of *H. fraxineus* at temperatures above 35°C is limited; thus, as warming progresses, this pathogen can recede in the warmer regions of Europe (Grosdidier *et al.*, 2018). In the Czech Republic, where such temperatures are still rare (ČHMÚ, 2020), it can be assumed that ash dieback will continue to be a crucial limiting factor to ash growth in the coming years. Thinning for supporting vital ash trees can improve the health status of the stand. All trees with a dead terminal or seriously damaged top part of the crown, with necrosis of the base and a seriously damaged trunk, should be removed. Planting mixed stands rather than monocultures is also recommended. At high humidity sites favourable for *H. fraxineus*, the proportion of ash trees should be low, allowing their replacement by another tree species in the case of ash dieback (Černý *et al.*, 2016a). The use of fungicides is acceptable only for the control of individual valuable trees in the countryside, as well as in urban areas (Rozsypálek *et al.*, 2017) and forest nurseries (Černý *et al.*, 2016a). Models predicting environmental suitability can be useful for making long-term strategic decisions (*e.g.*, identifying areas where future ash regeneration and cultivation may be unsuccessful) (Chumanová *et al.*, 2019).

A possible threat to maples (*Acer* spp.) is the sooty bark disease caused by the fungus *Cryptostroma corticale*. This disease was first recorded in Great Britain in 1945 on *A. pseudoplatanus* L. (Gregory and Waller, 1951), but *C. corticale* was first recorded in North America as a saprotroph on the barks of *A. pseudoplatanus* and *A. saccharum* Marsh. (Ellis and Everhart, 1889). The disease most commonly affects *A. pseudoplatanus* and rarely *A. platanoides* L. (Kelnarová *et al.*, 2016). In the Czech Republic, this disease was first recorded in 2005 on a maple in urban greenery in Prague (Koukol *et al.*, 2014). Subsequently, *C. corticale* was confirmed in the city parks of Prague and the floodplain of the Vltava River (Koukol *et al.*, 2014). Another survey conducted in Prague recorded *C. corticale* in 25% of the 112 surveyed localities, with more frequent occurrence in localities on steep slopes, with higher altitude, with more substantial nitrogen oxide pollution and with a denser network of roads and paths (Kelnarová *et al.*, 2017). The first occurrence of *C. corticale* in Czech forests was documented by Černý *et al.* (2015). However, *C. corticale* probably occurred in the Czech forests earlier and escaped attention due to its largely hidden way of life, occurring in the host tissues without any visible manifestation of the disease (Kelnarová *et al.*, 2016). Recently, infestation by *C. corticale* (accompanied by the ascomycetous fungus, *Prostheccium pyriforme* Jaklitsch & Voglmayr) has been confirmed on *A. pseudoplatanus* in several stands of the Czech forest in North Bohemia (Lorenc, 2020a). In recent years, *C. corticale* has spread in Europe (including the Czech Republic) in response to higher temperatures and repeated periods of drought (Longa *et al.*, 2016). The first symptoms of sooty bark disease include wilting and branch dieback. Later, a greenish-brown stain can be observed in the cross-sections of the trunk. Where the pathogen reaches the bark, subcortical stromata are produced. Ultimately, dark spore masses are visible under peeled, necrotized bark and the dead host remains covered with dark stroma (Gregory and Waller, 1951). Inhalation of large amounts of *C. corticale* spores can cause a hypersensitivity pneumonitis called 'maple bark disease' in humans. Persons who have intensive contact with infested trees or wood (*e.g.*, woodman, foresters, sawyers, or paper mill workers) are particularly at risk (Braun *et al.*, 2021). Optimal growth temperature was determined at 25°C (Ogris *et al.*, 2021). *C. corticale* is a mostly weak and opportunistic pathogen, but increases in severity under hot and dry conditions (Ogris *et al.*, 2021). In the event of widespread planting of maples and an increase in summer droughts and temperature, a significant spread of this pathogen in the Czech Republic can be expected. Removing necrotized branches and infested individuals from the stand and ensuring higher air humidity when processing or storing necrotized wood are desirable to prevent the release of spores (Kelnarová, 2015). To avoid contact with *C. corticale* spores, persons working on infested trees or wood should wear personal protective equipment (Braun *et al.*, 2021). It is suitable to replace the removed trees with other species. When planting sycamore maples in new localities, it is necessary to focus on the habitat requirements of the tree species (Kelnarová, 2015). No effective fungicides nor biopreparates against *C. corticale* are available.

Maples are also threatened by the fungus *Eutypella parasitica*, which causes *Eutypella* canker and brown rot of maple heartwood. The pathogen is native to North America and it was first recorded in Europe in 2005 on *Acer pseudoplatanus* in Slovenia (Jurc *et al.*, 2006). In the Czech Republic, it was first recorded in 2015 in Silesia (Černý *et al.*, 2017). Subsequently, it was recorded in natural stands of various ravine and alluvial forests, other natural or commercial forests, riparian stands and open landscapes in the Czech and Polish parts of Silesia. The proportion of infested maples here was found to be 1-50%. The most common host species were *A. pseudoplatanus*, and rarely *A. platanoides* and *A. campestre* L. (Černý *et al.*, 2017). Symptoms of *Eutypella* canker are distinctive oval bark lesions on the trunk. The bark remains in place, except at the oldest part

in the centre. This canker is mainly located on the lower portions of the trunks. White to light cream-coloured mycelial fans of *E. parasitica* are present in the bark, mainly along the advancing edge of the lesions. Fruiting bodies (perithecia) of the pathogen are present on the older parts of the canker (Jurc *et al.*, 2006). Spores of the pathogen are dispersed by wind (EPPO, 2008) and show dissemination for a short distance (Johnson and Kuntz, 1979). A potential problem could be the trade of plants, which can lead to the spread of the disease (EPPO, 2008). *E. parasitica* damages the most valuable sycamore timber and represents a clear risk for maple cultivation (Černý *et al.*, 2017). Extensive areas covering the natural distribution of maples in Europe, including the Czech Republic, are at considerable risk from *E. parasitica* infection (Ogris *et al.*, 2006). Discharge of spores is heavily affected by rain, high humidity, and high temperatures (minimum 4°C, optimum 24-28°C, maximum 36°C), which is important for spore germination and pathogen development (Johnson and Kuntz, 1979). Therefore, areas with a warm and humid microclimate and overgrown stands are particularly threatened (Chumanová *et al.*, 2019). Branches affected by *Eutypella* canker can be pruned, but there is hardly any treatment possible for trunk cankers. In an urban environment, adequate watering and fertilization may help trees to resist infection (EPPO, 2008). No effective fungicides nor biopreparates against *E. parasitica* are available.

Stands of a substitute tree, *Picea pungens* Engelm., especially in the Ore Mountains, are seriously damaged by the *Gemmamyces* bud blight caused by *Cucurbitaria piceae*. The pathogen was first discovered in Scotland in 1906 (Borthwick, 1909). The main host trees of this pathogen are *Picea* spp. and rarely *Abies* spp. (Borthwick, 1909). In the Czech Republic, *C. piceae* was first identified in *P. pungens* in the Slavkovský les Mountains (Western Bohemia) in 1917, but a disease with symptoms corresponding to *Gemmamyces* bud blight had already been observed there in 1909 (Köck, 1918). The widespread death of *P. pungens* due to *Gemmamyces* bud blight began in the Ore Mountains in 2009 (Soukup and Pešková, 2009). Subsequently, *C. piceae* has been commonly observed on *P. pungens* in the Ore Mountains and Jizera Mountains, but lesser plantations of the trees affected by the pathogen are distributed from mountains to lowlands over the whole Czech Republic (Zýka *et al.*, 2018). The pathogen occurs on *P. abies*, in the Ore Mountains, Lusatian Mountains, Šumava Mountains and Kralický Sněžník, but it probably also occurs in other regions (Zýka *et al.*, 2018). The occurrence of *C. piceae* on *P. abies* is low, and infected trees are usually not seriously affected (Soukup and Pešková, 2009). However, a significant increase in the number of trees with a higher proportion of infested buds has been observed in the Ore Mountains since 2014 (Modlinger and Pešková, 2017). The infection occurs during the growing season. The dominant infectious agent is probably conidium, which spreads in humid weather (Černý *et al.*, 2016b). The main symptoms of infestation on *Picea* spp. and *Abies* spp. are twisted shoots and swollen buds, where black stroma with small spherical fruiting bodies appear (Soukup and Pešková, 2009). *C. piceae* is a psychrophile, as indicated by the following cardinal temperatures: 0°C (minimum), 13-18°C (optimum), and 25°C (maximum) (Černý *et al.*, 2016b). Higher damage of *P. pungens* by *Gemmamyces* bud blight has been recorded on sites with higher total precipitation and on moist soils with low nutrients. The opposite effect is observed in higher air temperature and southern exposure (Zýka *et al.*, 2018). However, *C. piceae* has recently moved to warmer, less climatically suitable areas (Černý *et al.*, 2016b). Therefore, it is difficult to predict the occurrence of this pathogen in the Czech Republic in the coming years. In the severely affected Czech *P. pungens* stands, only thinning, gradual suppression of *P. pungens* and change of species composition can be considered. In ornamental plantings with a low disease incidence, the removal of affected twigs, branches and highly affected individuals can be recommended.

For more severe damage, fungicide should be sprayed before or during bud opening, and again during the spore transmission phase. Preventing the introduction of this pathogen to North America, the homeland of the most susceptible *Picea* species (*P. pungens* and *P. engelmannii* Parry ex Engelm) through the inspection or regulation of susceptible plants, is also recommended (Černý *et al.*, 2016b).

Fungal-like pathogens

One of the most serious threats to woody plants are organisms of the genus *Phytophthora*. It is now classified in Oomycetes, in the *Straminipila* lineage within the *Straminipila-Alveolata-Rhizaria* (SAR) eukaryotic supergroup (McCarthy and Fitzpatrick, 2017). *Phytophthora* species can survive under adverse environmental conditions with the use of resting structures (mainly sexual oospores), vegetative chlamydospores and hyphal aggregations (Jung *et al.*, 2018). Soilborne *Phytophthora* species (e.g., *P. alni* species complex; *P. cambivora* (Petri) Buisman; *P. cinnamomi* Rands. and *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess) infect fine roots, the bark of suberized roots, and the collar region with mobile zoospores under wet soil conditions. Airborne *Phytophthora* species (e.g., *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld) infect leaves, shoots, fruits and bark of branches and stems with sporangia, that are produced under humid conditions on infected plant tissues and dispersed by rain and wind splash (Jung *et al.*, 2018). Typical symptoms of plants affected by *Phytophthora* spp. are crown thinning, chlorosis and dieback caused by extensive fine root losses and/or collar rot (Jung *et al.*, 2015). In a large-scale study conducted in 732 European nurseries plus 2525 areas in which trees and shrubs were planted, 49 *Phytophthora* taxa were recorded in 91.5% of the nurseries and 66% of the other tested areas (Jung *et al.*, 2015). In the Czech Republic, *Phytophthora* diseases on woody plants and *Phytophthora* diversity were overlooked until 2000 (Černý *et al.*, 2011). The most dangerous invasive *Phytophthora* species for forest trees recorded in the Czech Republic are potentially *P. alni* species complex (Černý *et al.*, 2003), *P. cactorum* (Erwin and Ribeiro, 1996), *P. cambivora* (Černý *et al.*, 2008), *P. cinnamomi* (Černý *et al.*, 2011), *P. plurivora* (Mrázková *et al.*, 2010) and *P. ramorum* (Černý *et al.*, 2011). Between 2006 and 2010, 16 *Phytophthora* species in the Czech Republic were detected on more than 20 investigated woody plants – most frequently *P. alni* species complex, *P. plurivora* and *P. cactorum* (Černý *et al.*, 2011). The most serious invasive *Phytophthora* pathogen on woody plants that has not yet been recorded in the Czech Republic is *P. kernociae* Brasier, Beales & S.A. Kirk (ÚKZÚZ, 2014-2021). The impact of future changes in temperature and precipitation patterns on the spread and activity of *Phytophthora* remains unknown (Hung *et al.*, 2018). However, due to the interaction between *Phytophthora*-caused fine root losses and droughts, as well as the multicyclic spread of *Phytophthora* zoospores and sporangia under persisting humid conditions, rising temperatures and increased summer droughts, alternating with periods of unseasonal heavy rain, will most likely intensify the root and collar rot incidences (Jung *et al.*, 2018). The control and management of *Phytophthora* pathogens and diseases should mainly focus on the prevention of their introduction and slowing down their spread once they are introduced (Jung *et al.*, 2018). Products based on propamocarb, metalaxyl, fosetyl-Al or dimethomorph can be used against oomycetes, including *Phytophthora* species. Propamocarb and metalaxyl-based products are suitable for soil applications. Potassium phosphonate (phosphite) showed a positive effect on reducing infection pressure, but a major drawback is the need to repeat treatments due to its short shelf life (Hardy *et al.*, 2001; Tynan *et al.*, 2001; Daniel *et al.*, 2005). Phosphite-Al-based fungicide can also reduce *Phytophthora* development and thus mitigate the impact on forest stands (González *et al.*, 2017). Although the success rate of phosphonate use is inversely proportional to the stage of infestation (Gentile *et al.*, 2009), the

efficacy of fosetyl-Al injection against *P. cinnamomi* has been demonstrated (González *et al.*, 2017).

The *P. alni* species complex, which causes *Phytophthora* disease of alders, has spread in Europe since the 1980s and later to the Czech Republic. The pathogen mainly attacks the root neck of trees and causes the mass dying of alders (*Alnus* spp.) (Černý and Strnadová, 2010). The *P. alni* species complex was first identified in 1995 (Brasier *et al.*, 1995) where it was recorded only on alders (Hansen, 2012). The pathogen currently occurs in most European countries (Jung and Blaschke, 2004). In the Czech Republic, it was first isolated from damaged *A. glutinosa* (L.) Gaertn. In western Bohemia (Černý *et al.*, 2003), it occurs on the native alder species, *A. glutinosa* and *A. incana* (L.) Moench. Its occurrence is expected in the whole territory, but mostly in Southern Bohemia (Černý *et al.*, 2010). Within the *P. alni* species complex, there are three known species: *P. × alni*, *P. × multiformis* and *P. uniformis* (Brasier *et al.*, 2004; Husson *et al.*, 2015). Of these, *P. × alni* is the most aggressive and constitutes approximately 88% of the population of the complex (Štěpánková *et al.*, 2013). The main causes of the massive spread of infestation are the transfer of planting material from nurseries (Jung *et al.*, 2007) and spontaneous spread through water-courses (Jung and Blaschke, 2004). The *P. alni* disease of alders has been observed to increase with the mean summer temperature of the river water (Thoirain *et al.*, 2007). *P. × alni* is a thermophile with optimal growth temperature ranges above 22°C (Brasier *et al.*, 1995). On the other hand, high summer temperatures may favour antagonistic microflora populations (Garrett *et al.*, 2011), resulting in unfavourable conditions for *P. × alni* (Aguayo *et al.*, 2014). Low winter air temperatures promote tree recovery because of poor pathogen survival (Aguayo *et al.*, 2014). Extreme drought can accelerate the *Phytophthora* disease process, due to reduced vitality of the host tree (Jung and Burgess, 2009). Depending on the European area, climate change can either enhance or decrease the severity of alder decline (Aguayo *et al.*, 2014). Measures against the *Phytophthora* disease include performing controls and keeping records of the occurrence of the disease, avoiding discharge of the pathogen to water sources and healthy vegetation, and using healthy and controlled material when planting alders. In nurseries, it is possible to change the planted species, change cultivation practices, change the source of irrigation water and use fungicides. In stands, the removal of infested alder trees, replacing alder trees with different plants (even temporarily) and felling downstream in winter, from healthy to damaged stands, is recommended. The infected material should be discarded and working tools and machines should be cleaned (Černý and Strnadová, 2011).

P. cadorum is a well-known pathogen of many plants with both a soil- and an airborne lifecycle (Jung *et al.*, 2018). In the Czech Republic, the pathogen was first recorded on *Fagus sylvatica* L., *A. hippocastanum* L. and *Populus alba* L. as the causal agent of bleeding cankers (Černý *et al.*, 2009). The main host tree of the pathogen in the Czech Republic is *F. sylvatica*, and rarely *Quercus* spp., *Tilia* spp., *Acer* spp., *Larix* spp., *Pseudotsuga* spp., *Abies* spp. or *Picea* spp. (ÚKZÚZ, 2014-2021).

P. cambivora is a soilborne pathogen (Jung *et al.*, 2018) of both conifers and broadleaves (CABI, 2021b), long-established in many European countries (Santini *et al.*, 2013). In the Czech Republic, the pathogen was first recorded on *Castanea sativa* Mill. as the causal agent of ink disease (Černý *et al.*, 2008). The main host trees of the pathogen in the Czech Republic are *Fagus* spp., *Quercus* spp. and *Castanea* spp. (ÚKZÚZ, 2014-2021).

The most feared *Phytophthora* species worldwide is *P. cinnamomi*. It is a soilborne pathogen (Jung *et al.*, 2018) which has a wide range of plant hosts, mainly woody plants. In southwestern Australia, tens of thousands of hectares of *Eucalyptus* forest have been destroyed by the pathogen (Podger, 1972). Within the European trees, *P. cinnamomi* mainly affects *Quercus* spp.

(Bergot *et al.*, 2004). In the Czech Republic, the pathogen was first recorded on *Rhododendron* spp. and *Vaccinium corymbosum* L. (Černý *et al.*, 2011). In case of longer drought periods (Lindner *et al.*, 2008) and higher winter temperatures, expansion of *P. cinnamomi* can be expected (Bergot *et al.*, 2004).

P. plurivora is a soilborne species (Jung *et al.*, 2018) whose isolates were previously routinely identified as *P. citricola* (Jung and Burgess, 2009). The pathogen is native in Europe and has probably spread globally through the nursery trade of diseased plant material (Schoebel *et al.*, 2014). In the Czech Republic, Mrázková *et al.* (2013) isolated *P. plurivora* from 20 hosts, predominantly from *Rhododendron* spp., *Acer* spp., *Quercus* spp., *Fraxinus* spp. and *Tilia* spp. The *P. plurivora* isolates from forest trees were more aggressive towards such trees than isolates from ericaceous ornamental plants. This pathogen is found in a broad range of elevations and environments, including forest and riparian stands, and has potentially become naturalized (Mrázková *et al.*, 2013).

P. ramorum is an airborne species (Jung *et al.*, 2018) with a wide range of both broadleaf and conifer hosts (EPPO, 2021). The pathogen is also a causative agent of Sudden Oak Death (Goheen *et al.*, 2002) and Sudden Larch Death (Brasier and Webber, 2010). In the Czech Republic, *P. ramorum* was first recorded on *Rhododendron* spp. in 2009 (Černý *et al.*, 2011) and subsequently, records of the pathogen came mainly from imports of *Rhododendron* spp. Eradication of the pathogen has been successful and since then, no *P. ramorum* has been recorded in the Czech Republic (ÚKZÚZ, 2014-2021).

Conclusions

The above-mentioned pathogens are just a few potential threats that are well known. Some other important pathogens that can be problematic are *Neonectria coccinea* (Pers.) Rossman & Samuels, *Inonotus* complex, *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton 1980, *Cenangium ferruginosum* Fr. and *Lecanosticta acicola* (Thüm.) Syd. Some of these have caused serious problems (*e.g.*, a combination of drought and pathogens on *Pinus* spp.) and others can present future issues with *Fagus* spp. and *Quercus* spp.

Climate change is likely to have a deep impact on plant – pathogen interactions and represents one of the biggest challenges for the ecological and functional stability of forests in the coming years. Several fungal diseases on trees may become more devastating because abiotic stresses predispose trees to pathogens (La Porta *et al.*, 2008), *e.g.*, *Heterobasidion* spp. (Lindberg and Johansson, 1992) and *Sphaeropsis sapinea* (Vornam *et al.*, 2019). Increasing temperature and moisture positively affect sporulation and dispersal of certain pathogens (La Porta *et al.*, 2008), *e.g.*, *Hymenoscyphus fraxineus* (Havrdová *et al.*, 2016a; Grosdidier *et al.*, 2018). Migration of pathogens triggered by climatic change may increase disease incidence or geographical ranges. New threats may appear either because of a change in tree species composition or because of invasive species (La Porta *et al.*, 2008). Invasive pathogens, *e.g.*, *H. fraxineus* and several *Phytophthora* species, have the potential to radically reshape native woods and forests, (Potter and Unquart, 2017).

It is necessary to make long-lasting management decisions, even if uncertainty about climate change impacts is still large. Forest management requires expert knowledge and enhanced efforts to provide science-based decision support (Lindner *et al.*, 2014). To strengthen the adaptive capacity of temperate forests in Europe, it is recommended to increase tree species richness, increase structural diversity, maintain and improve genetic variation within tree species, increase the resistance of individual trees to biotic and abiotic stress, replace high-risk stands

(especially non-native spruce and pine monocultures in lowlands) and keep the average growing stocks low (Brang *et al.*, 2014). Forest adaptation can include intermixing of native and non-native tree species as well as non-local genetic strains, which can adapt better to future climate conditions (Bolte *et al.*, 2009). *Picea abies* and *Pinus sylvestris* L. will likely become unprofitable and, consequently, their abundance in Central European lowland forests during the anticipated climate change will significantly decrease. *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* L. may endure in large parts of Central Europe. Potential alternative tree species, such as *Quercus ilex* L., *Pinus nigra* J.F. Arnold, *P. halepensis* Mill., *P. pinaster* Aiton and *Castanea sativa* can be considered a meaningful replacement of locally declining tree species (Buras and Menzel, 2019). However, the introduction of new species has a risk of uncontrolled spread (Lombardero *et al.*, 2008).

The phenotype, and hence phenotypic maladaptation, evidently plays a significant role in a tree disease. Biotic factors are key in limiting the capacity of trees to use all their potential phenotypic plasticity and plastic responses. We still know little about the physiological mechanisms behind phenotypic tree resistance (Stenlid and Oliva, 2016). The biggest problem is that we do not know how pathogens kill trees, because it is a complex process. Pathogens can establish a large array of interactions with the host with differing physiological consequences. Our understanding of how pathogens kill trees is often misled due to an interaction with other abiotic factors that lead to the killing of trees.

The most cost-effective measurement against both native and invasive species is to prevent their establishment. Regional and international regulatory programs that can restrict the predictable pathways of pathogens can be useful tools (Hansen, 2008). Specifically, it is important to manage imported plant material, control the seeds and planting material in forestry, ensure timely application of suitable chemical preparations or bio-preparations in forest nurseries (preventively and in case of pathogen attack), apply adequate watering, plant individual tree species in suitable habitats, ensure timely removal of infested plants or their parts and plant interventions, creating less suitable conditions for the pathogens.

Authors' contribution

FL., M.S. – manuscript preparation; FL., M.S. – manuscript corrections.

Conflicts of interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Scribendi Inc. for quick English proofreading.

Funding source

This review was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, institutional support MZE-RO0118.

References

- Aguayo, J., Elegbede, F., Husson, C., Saintonge, F.X., Marçais, B., 2014. Modeling climate impact on an emerging disease, the *Phytophthora alni* induced alder decline. *Global Change Biology*, Volume 20 (10), pp. 3209-3221. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00824.x>.
- Bergot, M., Cloppet, E., Pérarnaud, V., Déqué, M., Benoit, M., Desprez-Loustau, M.L., 2004. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology*, Volume 10 (9), pp. 1539-1552. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00824.x>.

- Bolte, A., Ammer, C., Lof, M., Madsen, P., Nabuurs, G.J., Schall, P., Spathelf, P., Rock, J. 2009. Adaptive forest management in central Europe: Climate change impacts, strategies and integrative concept. *Scandinavian Journal of Forest Research*, Volume 24 (6), pp. 473-482. DOI: <https://doi.org/10.1080/02827580903418224>.
- Borthwick, A.W., 1909. A new disease of *Picea*. Notes From the Royal Botanic Garden, Edinburgh, 4, pp. 259-261.
- Brang, P., Spathelf, P., Bo Larsen, J., Bauhus, J., Bonečena, A., Chauvin, C. *et al.*, 2014. Suitability of close-to-nature silviculture for adapting temperate European forests to climate change. *Forestry*, Volume 87 (4), pp. 492-503. DOI: <https://doi.org/10.1093/forestry/cpu018>.
- Brasier, C.M., 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia*, Volume 115 (3), 151-161. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00462219>.
- Brasier, C.M., Kirk, S.A., Delean, J., Cooke, D.E. L., Jung, T., Man In'T Veldt, W.A., 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogen spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research*, Volume 1 (8), pp. 1172-1184. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756204001005>.
- Brasier, C.M., Rose, J., Gibbs, J.N., 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology*, Volume 44, pp. 999-1007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02658.x>
- Brasier, C.M., Webber, J., 2010. Sudden larch death. *Nature*, Volume 466, pp. 824-825. DOI: <https://doi.org/10.1038/466824a>.
- Braun, M., Klingelhöfer, D., Groneberg, D.A., 2021. Sooty bark disease of maples: the risk for hypersensitivity pneumonitis by fungal spores not only for woodman. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, Volume 16 (1), pp. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12995-021-00292-5>.
- Brunette, M., Cauria, S., 2016. An economic comparison of risk handling measures against *Hyllobius abietis* and *Heterobasidion annosum* in the Landes de Gascogne Forest. *Annals of Forest Science*, Volume 73 (3), pp. 777-787. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13595-016-0568-z>.
- Buras, A., Merz, A., 2019. Projecting Tree Species Composition Changes of European Forests for 2061-2090 Under RCP 4.5 and RCP 8.5 Scenarios. *Frontiers in Plant Science*, Volume 9 (1986), pp. 1-13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01986>.
- CABI, 2021a. *Heterobasidion parvsporium*. Invasive Species Compendium. CAB International. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/27048>.
- CABI, 2021b. *Phytophthora cambivora* (root rot of forest trees). Invasive Species Compendium. CAB International. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40956>.
- Cech, T.L., 2008. Eschenkrankheit in Niederösterreich – neue Untersuchungsergebnisse. *Forschungs Aktuell*, Volume 43, pp. 24-28. Available from: https://bfw.ac.at/400/pdf/fsaktuell_43_9.pdf.
- Chen, L., Böka, B., Kedves, O., Nagy, V. D., Szűcs, A., Champramary, S., Roszik, R., Patocska, Z., Münsterkötter, M., Huynh, T., Indie, B., Vágvolgyi, C., Sipos, G., Kredics, L., 2019. Towards the biological control of devastating forest pathogens from the genus *Armillaria*. *Forests*, Volume 10 (11), p. 1013. DOI: <https://doi.org/10.3390/f10111013>.
- Chumanová, E., Romportl, D., Havrdová, L., Zahradník, D., Pešková, V., Černý, K., 2019. Predicting ash dieback severity and environmental suitability for the disease in forest stands. *Scandinavian Journal of Forest Research*, Volume 34 (4), pp. 254-266. DOI: <https://doi.org/10.1080/02827581.2019.1584638>.
- Cleary, M.R., Arhipova, N., Morrison, D.J., Thomsen, I.M., Sturrock, R.N., Vasaitis, R., Gaitnieks, T., Stenlid, J., 2013. Stump removal to control root disease in Canada and Scandinavia: a synthesis of results from long-term trials. *Forest Ecology and Management*, Volume 290, pp.5-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.05.040>.
- Cremer, M., Prietzel, J., 2017: Soil acidity and exchangeable base cation stocks under pure and mixed stands of European beech, Douglas fir and Norway spruce. *Plant and Soil*, Volume 415 (1-2), pp. 393-405. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3177-1>.
- Černý, A., 1988. Parazitické dřevokazné houby. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 104 pp.
- Černý, K., Gregorová, B., Holub, V., Strnadová, V., 2003. First finds of 'alder-*Phytophthora*' in the Czech Republic. *Czech Mycology*, Volume 55 (3-4), pp. 291-296. DOI: <https://doi.org/10.33585/cmy.55314>.
- Černý, K., Gregorová, B., Strnadová, V., Tomšovský, M., Holub, V., Gabrielová, S., 2008. *Phytophthora cambivora* causing ink disease of sweet chestnut recorded in the Czech Republic. *Czech Mycology*, Volume 60 (2), pp. 267-276. DOI: <https://doi.org/10.33585/cmy.60210>.
- Černý, K., Havrdová, L., Zlatník, V., Hrabětová, M., 2016a. Pěstování jasanu v prostředí s výskytem *Hymenoscyphus fraxineus*. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. a Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem. 52 pp. Available from: https://www.vukoz.cz/dokumenty/056/Metodiky/Pestovani_jasanu_s_Hymenoscyphus_fraxineus.pdf [accessed: 2.06.221].
- Černý, K., Hrabětová, M., Svobodová, I., Mrázková, M., Kowalski, T., 2017. *Eurypella parasitica* naturalised in Bohemian and Polish Silesia. *Forest Pathology*, Volume 47 (4), p. e12347. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12347>.
- Černý, K., Mrázková, M., Hrabětová, M., Strnadová, V., Romportl, D., Havrdová, L., Haňáčková, Z., Novotná, K., Štochlová, P., Loskotová, T., Pešková, V., 2015. Invaze houbových patogenů – riziko pro lesní hospodaření v ČR? In: Invazní škodlivé organismy v lesích ČR. Sborník příspěvků. Česká Lesnická Společnost, Praha, pp. 31-45.

- Černý, K., Pešková, V., Soukup, F., Havrdová, L., Strnadová, V., Zahradník, D., Hrabětová, M., 2016b. *Gemmarmyces* bud blight of *Picea pungens*: a sudden disease outbreak in Central Europe. *Plant Pathology*, Volume 65 (8), pp. 1267-1278. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12513>.
- Černý, K., Strnadová, V., 2010. *Phytophthora* Alder Decline: Disease Symptoms, Causal Agent and Its Distribution in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, Volume 46 (1), pp. 12-18. DOI: <https://doi.org/10.17221/43/2009-PPS>.
- Černý, K., Strnadová, V., 2011. Onemocnění olší způsobené druhem *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk. Management napadených porostů. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., 33 pp. Available from: https://www.vukoz.cz/dokumenty/056/Metodiky/Cerny-et-Strnadova-2011_Onemocneni-olsi-zpusobene-druhem-Phytophthora-alni_Management-napadenych-porostu.pdf [accessed: 5.05.2021].
- Černý, K., Strnadová, V., Gregorová, B., Holub, V., Tomšovský, M., Mrázková, M., Gabrielová, S., 2009. *Phytophthora cactorum* causing bleeding canker of common beech, horse chestnut, and white poplar in the Czech Republic. *Plant Pathology*, Volume 58 (2), p. 394. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01970.x>
- Černý, K., Tomšovský, M., Mrázková, M., Strnadová, V., 2011. The present state of knowledge on *Phytophthora* spp. diversity in forest and ornamental woody plants in the Czech Republic. *New Zealand Journal of Forestry Science*, Volume 41, pp. 75-82. Available from: https://www.scionresearch.com/_data/assets/pdf_file/0005/58730/NZJFS-41S2011S75-S82_CERNY.pdf [accessed: 1.06.2021].
- ČHMÚ, 2020. Portál ČHMÚ. Český hydrometeorologický ústav. Available from: <http://portal.chmi.cz/> [accessed: 1.06.2021].
- Dálya, L.B., Sedlák, P., 2020. Prevalence of major wood-decay Agaricomycetes in artificial, managed near-natural and undisturbed forests of South Moravia, Czechia. *Forest Pathology*, Volume 50 (5), p. e12636. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12636>.
- Daniel, R., Wilson, B.A., Cahill, D.M., 2005. Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*, Volume 34 (4), pp. 541-548. DOI: <https://doi.org/10.1071/AP05074>.
- Desperez-Loustau, M.L., Marçais, B., Nageleisen, L.M., Pioua, D., Vannini, A., 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*, Volume 63 (6), pp. 597-612. DOI: <https://doi.org/10.1051/forest:2006040>.
- Dvořák, M., Tomšovský, M., Jankovský, L., Novotný, D., 2007. Contribution to identify the causal agents of Dutch elm disease in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, Volume 43, pp. 142-145. DOI: <https://doi.org/10.17221/2243-PPS>.
- Ellis, J.B., Everhart, B.M., 1889. New species of hyphomycetous fungi. *The Journal of Mycology*, Volume 5 (2), pp. 68-72. DOI: <https://doi.org/10.2307/3752309>.
- EPPO, 2008. Mini Data Sheet on *Eurypella parasitica*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2 pp. Available from: https://gd.eppo.int/download/doc/1002_minids_ETPLPA.pdf.
- EPPO, 2021. EPPO Global Database. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Available from: <https://gd.eppo.int/>.
- Erwin, D.C., Ribeiro, O.K., 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press. 562 pp.
- Garbelotto, M., Gonthier, P., 2013. Biology, epidemiology, and control of *Heterobasidium* species worldwide. *Annual review of phytopathology*, Volume 51, pp. 39-59. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102225>.
- Garrett, K.A., Forbes, G.A., Savary, S., Skelsey, P., Sparks, A.H., Valdivia, C., van Bruggen, A.H.C., Wilcoquet, L., Djurle, A., Duveiller, E., Ekersten, H., Pande, S., Vera Cruz, C., Yuen, J., 2011. Complexity in climate-change impacts: an analytical framework for effects mediated by plant disease. *Plant Pathology*, Volume 60 (1), pp. 15-30. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02409.x>.
- Gentile, S., Valentino, D., Tamiotti, G., 2009. Control of ink disease by trunk injection of potassium phosphite. *Journal of Plant Pathology*, Volume 91 (3), pp. 565-571. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v91i3.547>.
- Goheen, E.M., Hanse E.M., Kanaskie, McWilliams, M.G., Osterbauer, N., Sutton, W., 2002. Sudden Oak Death, caused by *Phytophthora ramorum*, in Oregon. *Plant Disease*, Volume 86 (4), p. 441. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.4.441C>.
- González, M., Caetano, P., Sánchez, M.E., 2017. Testing systemic fungicides for control of *Phytophthora* oak root disease. *Forest Pathology*, Volume 47 (4), p. e12343. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12343>.
- Gregory, P.H., Waller, S., 1951. *Cryptostroma corticale* and sooty bark disease of sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Transactions of the British Mycological Society*, Volume 34 (4), pp. 579-597. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(51\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(51)80043-3).
- Grosdidier, M., Ioos, R., Marçais, B., 2018. Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France? *Forest Pathology*, Volume 48 (4), pp. e124-26. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12426>.
- Hansen, E.M., 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Environment Research*, Volume 13, pp. 33-41. Available from: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/235236/ber13-A033.pdf?sequence=1>.

- Hansen, E.M., 2012. *Phytophthora alni*. *Forest Phytophthoras*, Volume 2 (1). DOI: <https://doi.org/10.5399/osu/fp.2.1.303>.
- Hardy, G.E.S., Barrett, S., Shearer, B.L., 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, Volume 30, pp. 133-139. DOI: <https://doi.org/10.1071/AP01012>.
- Havrdová, L., Černý, K., 2012. Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu. *Acta Pruhonická*, Volume 100, pp. 137-145. Available from: https://www.vukoz.cz/acta/dokumenty/Acta_100/acta-100_komplet-cz.pdf.
- Havrdová, L., Zahradník, D., Černý, K., Chumanová, E., Romportl, D., Pešková, V., 2016a. Mapa potenciálního poškození lesních porostů ČR nektrózou jasanu. Specializovaná mapa s odborným obsahem. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. 28 pp. Available from: https://www.vukoz.cz/dokumenty/056/Methodiky/Mapa_nekroza_jasanu.pdf.
- Havrdová, L., Novotná, K., Zahradník, D., Buriánek, V., Pešková, V., Šrůtka, P., Černý, K., 2016b. Differences in susceptibility to ash dieback in Czech provenances of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, Volume 46 (4), pp. 281-288. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12265>.
- Holdenrieder, O., Langenegger, K., Sieber, T.N., 1998. Occurrence of *Heterobasidium annosum* intersterility groups in Switzerland. In: Delatour, C., Guillaumin, J.J., Lung-Escarmant, B., Marçais, B., eds. Root and Butt Rots of Forest Trees. 9th International Conference on Root and Butt Rots, 1.-7. September 1997. Carcans-Maubuisson, France: INRA Editions, Les Colloques, 89, 437 pp.
- Holuša, J., Lubojacký, J., Čurn, V., Tonka, T., Lukášová, K., Horák, J., 2018. Combined effects of drought stress and *Armillaria* infection on tree mortality in Norway spruce plantations. *Forest Ecology and Management*, Volume 428, pp. 434-445. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.031>.
- Husson, C., Aguayo, J., Revellin, C., Frey, P., Ioos, R., Marçais, B., 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genetics and Biology*, Volume 77, pp. 12-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.013>.
- Jančařík, V., 1976. Vliv grafiozy na zastoupení jilmů v ČR. In: O grafioze brestov. Zborník prednášok ze seminára, Nové Zámky – Palárikovo: Osveta, pp. 20-44.
- Jančařík, V., 1999. Grafioza jilmů. *Lesnická práce*, Volume 78 (10), Attachmet I-IV.
- Jankovský, L., 2003. Distribution and ecology of *Armillaria* species in some habitats of southern Moravia, Czech Republic. *Czech Mycology*, Volume 55, pp. 3-4. DOI: <https://doi.org/10.33585/cmy.55303>.
- Jankovský, L., Holdenrieder, O., 2009. *Chalara fraxinea* – ash dieback in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, Volume 45, pp. 74-78. DOI: <https://doi.org/10.17221/45/2008-PPS>.
- Johnson, D.W., Kuntz, J.E., 1979. Eutypella canker of maple: ascospore discharge and dissemination. *Phytopathology*, Volume 69 (2), pp. 130-135. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-130>.
- Jung, T., Blaschke, M., 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology*, Volume 53, pp. 197-208. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.00957.x>.
- Jung, T., Burgess, T.I., 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, Volume 22, pp. 95-110. DOI: <https://doi.org/10.3767/003158509X442612>.
- Jung, T., Downing, M., Blaschke, M., Vernon, T., 2007. *Phytophthora* root and collar rot of Alders caused by the invasive *Phytophthora alni*: actual distribution, pathways, and modeled potential distribution in Bavaria. In: Evans, H., Oszako, T., eds. Alien Invasive Species and International Trade. Warsaw: Forest Research Institute, pp. 10-18. Available from: <https://www.iufro.org/download/file/1984/75/70312-jedlnia06.pdf?page=10> [3.06.2021].
- Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguín Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S.O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corebado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Dogmuş-Lehtijärvi, H.T., Franceschini, A., Ginetti, B., Green, S., Glavendekić, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca, N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla Vázquez, P.J., Marçais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., Nagy, Z.Á., Neehwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane, A., Paplomatas, E.J., Pintos Varela, C., Prospero, S., Rial Martínez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytönen, A., Sánchez, M.E., Sanz Ros, A.V., Seanu, B., Schlerzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgo, V., Tomic, Z., Tsopeles, P., Vannini, A., Vetraino, A.M., Wenneker, M., Woodward, S., Pérez-Sierra, A., Deprez-Loustau M.-L., 2015. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology*, Volume 46(2), pp. 134-163. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12239>.
- Jung, T., Pérez-Sierra, A., Durán, A., Horta Jung, M., Balci, Y., Seanu, B., 2018. Canker and decline diseases caused by soil- and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia*, Volume 40, pp. 182-220. DOI: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.08>.
- Jurec, D., Ogris, N., Slippers, B., Stenlid, J., 2006. First report of *Eutypella canker* of *Acer pseudoplatanus* in Europe. *Plant Pathology*, Volume 55 (4), pp. 577. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01426.x>.

- Jürisoo, L., Süda, I., Agan, A., Drenkhan, R., 2021. Vectors of Dutch elm disease in Northern Europe. *Insects*, Volume 12 (5), pp. 393. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects12050393>.
- Kalandra, A., Pfeffer, A., 1935. Příspěvek ke studiu graphiosy na jilmech. *Lesnická práce*, Volume 14, pp. 1-14.
- Kelnarová, I., 2015. Rozšíření a význam latentního patogenu *Cryptostroma corticale* na *Acer pseudoplatanus* v Praze. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky. 61 pp. Available from: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/62063> [accessed: 8.06.2021].
- Kelnarová, I., Černý, K., Zahradník, D., Koukol, O., 2017. Widespread latent infection of *Cryptostroma corticale* in asymptomatic *Acer pseudoplatanus* as a risk for urban plantations. *Forest Pathology*, Volume 47(4), p. e12344. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12344>.
- Kelnarová, I., Koukol, O., Černý, K., 2016. Sazná nemoc kůry – hrozba pro naše kleny? *Živa*, Volume 1, pp. 14-17. Available from: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/sazna-nemoc-kury-hrozba-pro-nase-kleny.pdf>
- Klavina, D., Bruna, L., Zaluma, A., Burnevica, N., Polmanis, K., Gaitnieks, T., Piri, T., 2021. Infection and Spread of Root Rot Caused by *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* Stands after Thinning: Case Studies on Former Pasture and Meadow Lands. *Forests*, Volume 12 (1), pp. 70. DOI: <https://doi.org/10.3390/f12010070>.
- Knížek, M., Liška, J., eds., 2021. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2020 a jejich očekávaný stav v roce 2021. Zpravodaj ochrany lesa. Supplementum 2021. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. 76 pp. Available from: https://www.vulhm.cz/files/uploads/2021/06/ZOL_Suppl_2021.pdf.
- Köck, G., 1918. Ein für Österreich neuer Schädling auf *Picea pungens*. *Österreichische Gartensetung*, Volume 13, pp. 147-148.
- Koukol, O., Kelnarová, I., Černý, K., 2014. Recent observations of sooty bark disease of sycamore maple in Prague (Czech Republic) and the phylogenetic placement of *Cryptostroma corticale*. *Forest Pathology*, Volume 45 (1), pp. 21-27. DOI: <https://doi.org/10.1111/cfp.12129>.
- La Porta, N., Capretti, N., Thomsen, I.M., Kasanen, R., Hietala, A.M., Von Weissenberg, K., 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Volume 30 (2), pp. 177-195. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2008.10540534>.
- Lindberg, M., Johansson, M., 1992. Resistance of *Picea abies* seedlings to infection by *Heterobasidion annosum* in relation to drought stress. *European Journal of Forest Pathology*, Volume 22 (2), pp. 115-124. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1992.tb01438.x>.
- Lindner, M., Garcia-Gonzalo, J., Kolström, M., Green, T., Reguera, R., Maroschek, M., Seidl, R., Lexer, M.J., Netherer, S., Schopf, A., 2008. Impact of Climate Change of European Forests and Options for Adaptation. Report to the European Commission Directorate-General for Agriculture and Rural Development. 173 pp. Available from: <https://hal.inrae.fr/hal-02821804/document>.
- Lindner, M., Maroschek, M., Netherer, S., Kremer, A., Barbati, A., Garcia-Gonzalo, J., Seidl, R., Delzon, S., Corona, P., Kolström, M., Lexer, M.J., Marchetti, M., 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*, Volume 259 (4), pp. 698-709. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.023>.
- Lindner, M., Fitzgerald, J.B., Zimmermann, N.E., Reyser, C., Delzon, S., van der Maaten, R., Schelhaas, M.-J., Lasch, P., Eggers, J., van der Maaten-Theunissen, M., Suckow, F., Psomas, A., Poulter, B., Hanewinkel, M., 2014. Climate change and European forests: What do we know, what are the uncertainties, and what are the implications for forest management? *Journal of Environmental Management*, Volume 146, pp. 69-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.030>.
- Lombardero, M.J., Vázquez-Mejuto, P., Ayres, M.P., 2008. Role of plant enemies in the forestry of indigenous vs. nonindigenous pines. *Ecological Applications*, Volume 18, pp. 1171-1181. DOI: <https://doi.org/10.1890/07-1048.1>.
- Longa, C.M.O., Vai, N., Maresi, G., 2016. *Cryptostroma corticale* in the northern Apennines (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, Volume 55 (1), pp. 136-138. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-17164.
- Lorene, F., 2020a. Sazná nemoc kůry – nová hrozba javorů. *Lesnická práce*, Volume 99 (9), pp. 38-39.
- Lorene, F., 2020b. Houbové a ostatní choroby. In: Knížek, M., Liška, J., eds. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2019 a jejich očekávaný stav v roce 2020. Zpravodaj ochrany lesa. Supplementum 2020. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., pp. 51-55. Available from: https://www.vulhm.cz/files/uploads/2020/06/ZOL_Suppl_2020.pdf.
- Lorenz, R., Stalhandske, Z., Fischer, E.M., 2019. Detection of a Climate Change Signal in Extreme Heat, Heat Stress, and Cold in Europe From Observations. *Geophysical Research Letters*, Volume 46 (14), pp. 8363-8374. DOI: <https://doi.org/10.1029/2019GL082062>.
- Lubojačský, J., Knížek, M., 2020. Podkorní hmyz. In: Knížek, M., Liška, J., eds. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2019 a jejich očekávaný stav v roce 2020. Zpravodaj ochrany lesa. Supplementum 2020. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., pp. 51-55. Available from: https://www.vulhm.cz/files/uploads/2020/06/ZOL_Suppl_2020.pdf.
- Martín, J.A., Sobrino-Plata, J., Rodríguez-Calcerrada, J., Collada, C., Gil, L., 2019. Breeding and scientific advances in the fight against Dutch elm disease: Will they allow the use of elms in forest restoration? *New Forests*, Volume 50 (2), pp. 183-215. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-018-9640-x>.

- Martín, J.A., Domínguez, J., Solla, A., Brasier, C.M., Webber, J.F., Santini, A., 2021. Complexities underlying the breeding and deployment of Dutch elm disease resistant elms. *New Forests*, Volume 1-36. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09865-y>.
- McCarthy, C.G.P., Fitzpatrick, D.A., 2017. Phylogenomic reconstruction of the oomycete phylogeny derived from 37 genomes. *mSphere*, Volume 2 (2), pp. e00095-e00017. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00095-17>.
- Modlinger, R., Pešková, V., 2017. Aktuální výskyt vybraných biotických škodlivých činitelů v porostech náhradních dřevin Krušných hor. In: Knížek, M., ed. Škodliví činitelé v lesích Česka 2016/2017 – Praktická ochrana lesa v současných podmínkách. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí, 19. 4. 2017, Průhonice. Zpravodaj ochrany lesa, pp. 60-61. Available from: https://www.vulhm.cz/files/uploads/2019/03/ZOL_20-2017.pdf.
- Morrison, D.J., Cruickshank, M.G., Lalumière, A., 2014. Control of laminated and *Armillaria* root diseases by stump removal and tree species mixtures: Amount and cause of mortality and impact on yield after 40 years. *Forest Ecology and Management*, Volume 319, pp. 75-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.02.007>.
- Mrázková, M., Černý, K., Tomšovský, M., Holub, V., Strnadová, V., Zlatohlávek, A., Gabrielová, S., 2010. First Report of Root Rot of Pedunculate Oak and Other Forest Tree Species Caused by *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic. *Plant Disease*, Volume 94 (2), p. 272. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0272B>.
- Mrázková, M., Černý, K., Tomšovský, M., Strnadová, V., Gregorová, B., Holub, V., Pánek, M., Havrdová, L., Hejtná, M., 2013. Occurrence of *Phytophthora multivora* and *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, Volume 49 (4), pp. 155-164. DOI: <https://doi.org/10.17221/74/2012-PPS>.
- MZE, 2016. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2015. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha, 130 pp. Available from: <https://cagri.cz/public/web/mze/lesy/lesnictvi/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho/zprava-o-stavu-lesa-2015.html>.
- MZE, 2017. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2016. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha, 128 pp. Available from: <https://cagri.cz/public/web/mze/lesy/lesnictvi/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho-2016.html>.
- MZE, 2018. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2017. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha, 114 pp. Available from: <https://cagri.cz/public/web/mze/lesy/lesnictvi/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho-3.html>.
- MZE, 2019. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2018. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha, 110 pp. Available from: <https://cagri.cz/public/web/mze/lesy/lesnictvi/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho-4.html>.
- MZE, 2020. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2019. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha, 124 pp. Available from: <https://cagri.cz/public/web/mze/lesy/lesnictvi/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho-2019.html>.
- MZE, 2021. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha, 124 pp. Available from: <https://cagri.cz/public/web/mze/lesy/lesnictvi/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho/zprava-o-stavu-lesa-a-lesniho-2020.html>.
- Niemelä, T., Korhonen, K., 1998. Taxonomy of the genus *Heterobasidion*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Huttermann, A., eds. *Heterobasidion annosum*. Wallingford: CAB International, pp. 27-33.
- Novotný, R., 2020. Abiotické vlivy a antropogenní činitelé. In: Knížek, M., Liška, J., eds.: Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2019 a jejich očekávaný stav v roce 2020. Zpravodaj ochrany lesa. Supplementum 2020. Strnady. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., pp. 12-20. Available from: https://www.vulhm.cz/files/uploads/2020/06/ZOL_Suppl_2020.pdf.
- Ogris, N., Jure, D., Jure, M., 2006. Spread risk of *Eurypella* canker of maple in Europe. *EPPO Bulletin*, Volume 36 (3), pp. 475-485. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.01047.x>.
- Ogris, N., Brglez, A., Piškur, B., 2021. Drought Stress Can Induce the Pathogenicity of *Cryptosporium corticale*, the Causal Agent of Sooty Bark Disease of Sycamore Maple. *Forests*, Volume 12 (3), pp. 377. DOI: <https://doi.org/10.3390/f12030377>.
- Oliva, J., Stenlid, J., Martínez-Vilalta, J., 2014. The effect of fungal pathogens on the water and carbon economy of trees: implications for drought-induced mortality. *New Phytologist*, Volume 203, pp. 1028-1035. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.12857>.
- Percival, G.C., Smiley, E.T., Fox, R.T., 2011. Root collar excavation with *Trichoderma* inoculations as a potential management strategy for honey fungus (*Armillaria mellea* A). *Arborticultural Journal*, Volume 33 (4), 267-280. DOI: <https://doi.org/10.1080/03071375.2011.9747617>.
- Podger, 1972. *Phytophthora cinnamomi*, A Cause of Lethal Disease in Indigenous Plant Communities in Western Australia. *Phytopathology*, Volume 62, pp. 972-981. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-62-972>.
- Polák, O., 1932. Ohrožení našich jilmů houbou *Graphium ulmi*. Referát o přednášce prof. Pekla. *Československý Les*, Volume 12, pp. 87-89.
- Postma, J., Goossen-van de Geijn, H., 2016. Twenty-four years of Dutch Trig® application to control Dutch elm disease. *Biocontrol*, Volume 61 (3), pp. 305-312. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9731-6>.

- Potter, C., Urquhart, J., 2017. Tree disease and pest epidemics in the Anthropocene: A review of the drivers, impacts and policy responses in the UK. *Forest Policy and Economics*, Volume 79, pp. 61-68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2016.06.024>.
- Pratt, J.E., Greig, J.W., 1988. *Heterobasidion annosum*: Development of Butt Rot following Thinning in two young First Rotation Stands of Norway Spruce. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, Volume 61 (4), pp. 339-347. DOI: <https://doi.org/10.1093/forestry/61.4.339>.
- Přihoda, A., 1959. *Lesnická fytopatologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 363 pp.
- Queloz, V., Grünig, C.R., Berndt, R., Kowalski, T., Sieber, T.N., Holdenrieder, O., 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*, Volume 41 (2), pp. 133-142. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x>.
- Rees, H.J., Bashir, N., Drakulic, J., Cromey, M.G., Bailey, A.M., Foster, G.D., 2021. Identification of native endophytic *Trichoderma* spp. for investigation of in vitro antagonism towards *Armillaria mellea* using synthetic and plant-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 131 (1), pp. 392-403. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14938>.
- Rozsypálek, J., Dvořák, M., Longauer, R., Botella, L., Prouza, M., Palovčíková, D., Jankovský, L., 2017. Ash and ash dieback in the Czech Republic. In: Vasaitis, R., Enderle, R., eds. Dieback of European ash (*Fraxinus* spp.): Consequences and guidelines for sustainable management. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. pp. 79-88.
- Santini, A., Ghelardini, L., De Pace, C., Desprez-Loustau, M.L., Capretti, P., Chandelier, A., Cech, T., Chira, D., Diamandis, S., Gaitniekis, T., Hantula, J., Holdenrieder, O., Jankovský, L., Jung, T., Jure, D., Kirisits, T., Kuneš, A., Lygis, V., Malecka, M., Marçais, B., Schmitz, S., Schumacher, J., Solheim, H., Solla, A., Szabo, I., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A.M., Webber, J., Woodward, S., Stenlid, J., 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytologist*, Volume 197 (1), pp. 238-250. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04364.x>.
- Santini, A., Facciolli, M., 2015. Dutch elm disease and elm bark beetles: a century of association. *Forest Biogeosciences and Forestry*, Volume 8 (2), pp. 126-164. DOI: <https://doi.org/10.3832/for1231-008>.
- Schoebel, C.N., Stewart, J., Gruenwald, N.J., Rigling, D., Prospero, S., 2014. Population History and Pathways of Spread of the Plant Pathogen *Phytophthora plurivora*. *Plos One*, Volume 9 (1), p. e85368. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106209>.
- Sedláč, P., Tomšovský, M., 2011. Species distribution and host spectrum of *Heterobasidion annosum* s.l. in the Czech Republic. In: Capretti, P., Comparini, C., Garbelotto, M., La Porta, N., Santini, A., eds. XIII Conference 'Root and Butt Rot of Forest Trees' IUFRO Working Party 7.02.01., 4.-10. September. 2011, Firenze – Auditorium di S. Apollonia S. Martino di Castrozza (TN) – Palazzo Sass Maor, Italy: Firenze University Press. pp. 74-75.
- Solla, A., Bohnens, J., Collin, E., Diamandis, S., Franke, A., Gil, L., Burón, M., Santini, A., Mittempergher, L., Pinon, J., Broeck, A.V., 2005. Screening European elms for resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Science*, Volume 51 (2), pp. 134-141. DOI: <https://doi.org/10.1093/forestscience/51.2.134>.
- Soukup, F., 2005. *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink václavka smrková. *Lesnická práce*, 84 (10), Attachment I-IV. Available from: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2005/2005_armillaria.pdf.
- Soukup, F., 2011. *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. l. kořenovník vrstevnatý. *Lesnická práce*, Volume 90 (8), Attachment I-IV. Available from: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2011/2011_korenovnik_vrstevnaty.pdf.
- Soukup, F., Pešková, V., 2009. *Gemmanomyces piceae* (Borthw.) Casagr. Kloubnatka smrková. *Lesnická práce*, Volume 88 (12), Attachment I-IV. Available from: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2009/2009_kloubnatka.pdf.
- Stenlid, J., Oliva, J., 2016. Phenotypic interactions between tree hosts and invasive forest pathogens in the light of globalization and climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, Volume 371, p. 20150455. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0455>.
- Stipes, R.J., 2000. The Management of Dutch Elm Diseases. In: Dunn C.P., ed. *The Elms. Breeding, Conservation and Disease Management*. Springer US, pp. 157-172. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4507-1>.
- Štěpánková, P., Černý, K., Strnadová, V., Hanáček, P., Tomšovský, M., 2013. Identification of *Phytophthora alni* Subspecies in Riparian Stands in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, Volume 49, pp. 3-10. DOI: <https://doi.org/10.17221/41/2013-PPS>.
- Thoirain, B., Husson, C., Marçais, B., 2007. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of alder in north-eastern France. *Phytopathology*, Volume 97, pp. 99-105. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0099>.
- Timmermann, V., Nagy, N.E., Hietala, A.M., Břrja, I., Solheim, H., 2017. Progression of ash dieback in Norway related to tree age, disease history and regional aspects. *Baltic Forestry*, Volume 23 (1), pp. 150-158. Available from: https://www.balticforestry.mi.lt/bf/PDF_Articles/2017-23%5B1%5D/Baltic%20Forestry%202017.1_150-158.pdf.
- Tynan, K.M., Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Dell, B., Colquhoun, I.J., McComb, J.A., Hardy, G.S.J., 2001. The long-term ability of phosphite to control *Phytophthora cinnamomi* in two native plant communities of Western Australia. *Australian Journal of Botany*, Volume 49 (6), pp. 761-770. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT00062>.
- ÚKZÚZ, 2014-2021. Rostlinolékařský portal [online]. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Available from: http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rpldomuluvod http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/.

- Vornam, B., Leinemann, L., Peter, F.S., Wolff, A., Leha, A., Salinas, G., Schumacher, J., Gailing, O., 2019. Response of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings subjected to artificial infection with the fungus *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Molecular Biology Reporter*, Volume 37, pp. 214-233. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01149-2>.
- Worrall, J.J., Harrington, T.C., Blodgett, J.T., Conklin, D.A., Fairweather, M.L., 2010. *Haerobasidion annosum* and *H. parviporum* in the Southern Rocky Mountains and Adjoining States. *Plant Disease*, Volume 94 (1), pp. 115-118. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0115>.
- Zýka, V., Černý, K., Strnadová, V., Zahradník, D., Hrabětová, M., Havrdová, L., Romportl, D., 2018. Predikce poškození porostů smrku pichlavého kloubnatkou smrkovou v Krušných horách. Specializovaná mapa s odborným obsahem. Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. 48 pp. Available from: https://www.cazv.cz/wp-content/uploads/2019/05/13_PREDIKACE_POSKOZENI_SMRKU_KLOUBNATKOU_SMRKOVOU.pdf