

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta lesnická a dřevařská**

**Katedra ochrany lesa a entomologie**



**Fakulta lesnická  
a dřevařská**

**Vliv faktorů prostředí na šíření patogenů rodu  
*Phytophthora* v olšových porostech na vybraných  
plochách**

**Diplomová práce**

**Autor: Bc. Johana Šindelářová**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Vítězslava Pešková, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Johana Šindelářová

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

**Vliv faktorů prostředí na šíření patogenů rodu *Phytophthora* v olšových porostech na vybraných plochách**

Název anglicky

**Influence of environmental factors on distribution of *Phytophthora* pathogens in alder riparian stands from selected plots**

### Cíle práce

Cílem diplomové práce je zhodnocení zdravotního stavu olšových porostů na vybraných tocích povodí Vltavy, vyhodnocení faktorů prostředí, izolace a identifikace jednotlivých druhů rodu *Phytophthora*.

### Metodika

Diplomová práce se bude zabývat rozšířením patogenních organismů rodu *Phytophthora* a jejich vlivem na zdravotní stav vybraných olšových porostů v rámci povodí Vltavy. Zejména *Phytophthora* xalni způsobuje v posledních letech významné škody v porostech olší. Pro identifikaci patogenu je nutné provést izolaci z napadených pletiv a determinovat druh patogenu metodami molekulární biologie.

Výzkumné práce budou probíhat na plochách založených v břehových porostech povodí Vltavy. Během vegetační sezony bude provedeno zhodnocení jednotlivých parametrů včetně zdravotního stavu olší a úrovně defoliace. Na vybraných plochách budou odebírány vzorky půdy a vzorky napadeného pletiva, které budou následně zpracovány v laboratoři za účelem získání čistého izolátu patogenu rodu *Phytophthora*. Identifikace druhu pomocí metody PCR a dále sekvenování proběhne ve spolupráci s externím pracovištěm.

Zjištěné výsledky budou statisticky zpracovány a bude provedeno vyhodnocení napadení olší plísni olšovou v závislosti na faktorech prostředí.

### Harmonogram

Duben – září 2020 – založení nových pokusných ploch, odběry a izolace vzorků, sběr dat v terénu

Říjen – prosinec 2020 – izolace a determinace patogenu v laboratoři, zpracování získaných dat

Leden 2021 – předložení literární rešerše a zpracovaných dat ke kontrole

Březen 2021 – předložení výsledků a diskuze diplomové práce

**Doporučený rozsah práce**

50-60

**Klíčová slova**

olše lepkavá, Phytophthora xalni, Phytophthora spp., břehové porosty, izolace patogenu

**Doporučené zdroje informací**

- Bjelke U., Boberg J., Oliva J., Tattersdill K., McKie B. G., Diez J., et al. 2016. Dieback of riparian alder caused by the Phytophthora alni complex: projected consequences for stream ecosystems. *Freshwater Biology*, 61(5): 565–579.
- Černý K., Strnadová V. 2010. Phytophthora Alder Decline: Disease Symptoms, Causal Agent and its Distribution in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 46(1): 12–18.
- Černý K., Strnadová V. 2012. Winter survival of Phytophthora alni in aerial tissues of black alder. *Journal of Forest Science*, 58(7): 328–336.
- Jung T., Blaschke M. 2004. Phytophthora root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology*, 53: 197–208.
- Jung T., Orlikowski L., Henricot B., Abad-Campos P., Aday A. G., Aguin Casal O. et al. 2016. Widespread Phytophthora infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of Phytophthora diseases. *Forest Pathology*, 46(2): 134–163.
- Oßwald W., Fleischmann F., Rigling D., Coelho A. C., Cravador A., Diez J., et al. 2014. Strategies of attack and defence in woody plant- Phytophthora interactions. *Forest Pathology*, 44(3): 169–190.
- Romportl D., Chumanová E., Havrdová L., Pešková V., Černý K. 2016. Potential risk of occurrence of Phytophthora alni in forests of the Czech Republic. *Journal of Maps*, 12: 5 s.

**Předběžný termín obhajoby**

2020/21 LS – FLD

**Vedoucí práce**

doc. Ing. Vítězslava Pešková, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ochrany lesa a entomologie

**Konzultant**

Ing. Markéta Macháčová

Elektronicky schváleno dne 25. 5. 2020

**prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 18. 10. 2020

**prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.**

Děkan

V Praze dne 04. 03. 2023

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv faktorů prostředí na šíření patogenů rodu *Phytophthora* v olšových porostech na vybraných plochách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5. dubna 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Vítězslavě Peškové, Ph.D. za její vedení, velmi cenné rady, připomínky, pomoc a veškerý čas a také konzultantce Ing. Markétě Macháčové za ochotu, pomoc, skvělý přístup při konzultacích, a hlavně za čas strávený při výjezdech do terénu a pokusech v laboratořích, při kterých mi byla velkou inspirací. Velké díky patří Phytophthora Research Centre za konzultace při zpracování izolátů a pomoc s identifikací jednotlivých druhů rodu *Phytophthora*. Dále bych chtěla poděkovat Fakultě lesnické a dřevařské ČZU v Praze za možnost studovat obor, který jsem si zvolila a zejména děkuji skvělým vyučujícím.

V neposlední řadě děkuji svým blízkým a rodině za nejen psychickou podporu. Zvláště velké díky patří mamince a tatínkovi, kteří při mně vždy stáli. Na závěr bych ráda poděkovala Zdendovi a mému synovi za trpělivost. Právě oni byli a jsou pro mě tou největší motivací a pohonem v životě i během studia.

# Vliv faktorů prostředí na šíření patogenů rodu *Phytophthora* v olšových porostech na vybraných plochách

## Abstrakt

V období let 2019 až 2021 byl proveden monitoring zdravotního stavu olšových porostů ve Středních Čechách na 20 lokalitách v povodí Vltavy. Byly hodnoceny parametry – stupeň napadení patogenem *Phytophthora alni* podle typických příznaků na kmenech stromů a dále úroveň defoliace jako hlavní ukazatel zdravotního stavu. Znamky napadení vykazovalo 15 z 20 porostů. V těchto porostech byly odebrány vzorky podkorních pletiv a půdy k izolaci patogenů rodu *Phytophthora*. Po každou hodnocenou lokalitu byly zjištěny následující parametry: šíře vodního toku, vzdálenost kmene od vodního toku, průměr kmene, výška stromu, nadmořská výška, podíl a pokryvnost olší.

Výsledky prokázaly výskyt *Phytophthora xalni* na 9 lokalitách a jednu pozitivní izolaci *Phytophthora uniformis* ze vzorků odebraných z podkorních pletiv. Z půdních vzorků na 4 lokalitách byly izolovány další druhy: *Phytophthora plurivora*, *Phytophthora lacustris* a *Phytophthora gallica*. Z ostatních oomycetů byly získány další půdní patogeny rodu *Pythium* a *Phytophythium*, které se rovněž mohou podílet na odumírání olšových porostů.

V rámci tříletého hodnocení olšových porostů bylo zjištěno zhoršení zdravotního stavu (stupeň napadení, úroveň defoliace). Mezi nejvýznamnější faktory prostředí, které měly vliv na napadení porostů, byly vzdálenost stromu od vodního toku, průměr kmene (= věk stromu), podíl a pokryvnost olší. Dále byl pozorován trend ve výskytu *Phytophthora alni* v souvislosti s nadmořskou výškou a šířkou vodního toku, ale vliv těchto faktorů nebyl statisticky průkazný.

**Klíčová slova:** *Phytophthora alni*, *Alnus glutinosa*, faktory prostředí, zdravotní stav, izolace patogenu

# Influence of environmental factors on distribution of *Phytophthora* pathogens in alder riparian stands in selected plots

## Abstract

From 2019 to 2021, the health status of alder stands in Central Bohemian Region was monitored at 20 sites in the Vltava River basin. The following parameters were assessed - the degree of *Phytophthora alni* infestation according to typical symptoms on tree trunks and the level of defoliation as the main indicator of health status. 15 out of 20 stands showed signs of infestation. Underbark tissues and soil samples were taken to isolate *Phytophthora* pathogens in these stands. The following parameters were determined for each site: width of the watercourse, the distance of the tree from the watercourse, stem diameter, tree height, altitude, the proportion of alders and foliage coverage of alders at the site.

The results showed the presence of *Phytophthora xalni* at 9 sites and one positive isolation of *Phytophthora uniformis* from samples taken from the underbark tissues. Other species were isolated from soil samples at 4 sites: *Phytophthora plurivora*, *Phytophthora lacustris* and *Phytophthora gallica*. Other oomycetes of the genus *Pythium* and *Phytopythium*, which may also be involved in alder dieback, were recovered from the soil samples.

A three-year assessment of alder stands revealed a deterioration in health status (degree of infestation, level of defoliation). The most important environmental factors that influenced the infestation were the distance of the tree from the watercourse, the diameter of the trunk (= age of the tree), and the proportion and foliage coverage of alder trees. There was also a trend in the occurrence of *Phytophthora alni* in relation to altitude and watercourse width, but the influence of these factors was not statistically significant.

**Keywords:** *Phytophthora alni*, *Alnus glutinosa*, environmental factors, health status, pathogen isolation

# Obsah

<b>1. Úvod a cíl práce</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Literární rešerše</b> .....	<b>12</b>
2.1 Základní charakteristika rodu <i>Phytophthora</i> .....	12
2.2 <i>Phytophthora alni</i> Brasier & S. A. Kirk .....	13
2.2.1 Životní cyklus a morfologie patogenu .....	14
2.2.2 Vstupní mechanismy a reakce hostitelské dřeviny .....	15
2.2.3 Symptomy napadení .....	16
2.2.4 Výskyt patogenu v Evropě.....	18
2.2.5 Výskyt patogenu v Česku .....	19
2.3 Další druhy rodu <i>Phytophthora</i> .....	20
2.4 Hostitelské dřeviny .....	22
2.4.1 Olše a její fyziologie.....	22
2.4.2 <i>Alnus glutinosa</i> .....	23
2.4.3 <i>Alnus incana</i> .....	24
2.5 Vliv faktorů prostředí na šíření patogenu.....	24
2.6 Laboratorní metody .....	28
2.6.1 Izolace patogenů rodu <i>Phytophthora</i> .....	28
2.6.1.1 Izolace z kůry .....	28
2.6.1.2 Izolace z půdy.....	28
2.6.2 Kultivace patogenů rodu <i>Phytophthora</i> .....	29
2.6.3 Genetická analýza získaných izolátů .....	31
<b>3. Metodika</b> .....	<b>32</b>
3.1 Výzkumná oblast.....	32
3.2 Monitoring terénu .....	34
3.3 Odběr vzorků z pletiv kmenu olší .....	35
3.3.1 Izolace a kultivace patogenu.....	35
3.4 Odběr vzorků z půdy pro izolaci patogenu .....	37
3.4.1 Izolace a kultivace patogenu.....	37
3.5 Identifikace druhů rodu <i>Phytophthora</i> .....	38
3.6 Statistické zpracování dat.....	40
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>41</b>
4.1 Terénní průzkum .....	41
4.2 Izolace a determinace patogenů rodu <i>Phytophthora</i> .....	42
4.3 Vývoj zdravotního stavu porostů v letech 2019-2021 .....	44
4.4 Vliv faktorů prostředí na stupeň napadení .....	47



5. Diskuze .....	52
6. Závěr .....	56
7. Seznam použitých zdrojů .....	57
8. Přílohy .....	69

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Mycelium <i>Phytophthora xalni</i> a typicky ornamentované oogonium (foto: J. Šindelářová a M. Macháčová).....	15
Obrázek 2: Příznaky napadení olší patogenem <i>Phytophthora xalni</i> – zleva doprava: rezavé až černé exudáty vytékající na povrch borky při rozsáhlém napadení kmene; propadlá nekrotická léze typického jazykovité tvaru; sekundární napadení odumírající olše lepkavé dřevokaznou houbou <i>Inonotus radiatus</i> (foto: J. Šindelářová).....	16
Obrázek 3: Příznaky napadení olší patogenem <i>Phytophthora xalni</i> v korunách stromů (Libomyšl, květen 2020) (foto: J. Šindelářová).....	17
Obrázek 4: Mapa rozšíření patogenu v roce 2016. Převzato z BJELKE et al. (2016) a upraveno autorem.....	19
Obrázek 5: Mapa s lokalitami výzkumných ploch v rámci povodí Vltavy.....	32
Obrázek 6: Mycelium <i>Phytophthora xalni</i> vyrůstající ze vzorků napadeného pletiva na selektivním agarovém médiu po 5 dnech kultivace (foto: J. Šindelářová)....	36
Obrázek 7: Mladé listy sloužící k zachycení plovoucích zoospor půdních oomycet, tzv. leaf-baiting metoda (foto: J. Šindelářová).....	37
Obrázek 8: Mycelium <i>Phytophthora plurivora</i> vyrůstající z listových nekróz na selektivním médiu (foto: J. Šindelářová).....	38
Obrázek 9: Výzkumné plochy s pozitivní izolací <i>Phytophthora xalni</i> (označeno hvězdičkou).....	42
Obrázek 10: Kultura <i>Phytophthora xalni</i> (nalevo) a <i>Phytophthora plurivora</i> (napravo) po 7 dnech kultivace na V8 agarovém médiu ve tmě (foto: M. Macháčová).....	43

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled chemikálií používaných při přípravě selektivních médií pro izolaci patogenů rodu <i>Phytophthora</i> (upraveno podle DRENTH, SENDALL et al. 2001).....	30
Tabulka 2: Rozdělení jednotlivých ploch podle gradientu nadmořské výšky.....	32
Tabulka 3: Přehled základních charakteristik výzkumných ploch (detailní popisy každé plochy jsou uvedeny v kap. 8 Přílohy).....	33
Tabulka 4: Kategorie vzdálenosti kmene olše lepkavé od vodního toku.....	34
Tabulka 5: Hodnocení symptomů napadení plísní olšovou na stupnici [0–4].....	34
Tabulka 6: Použitá agarová média při izolaci <i>Phytophthora xalni</i> .....	36
Tabulka 7: Výpočet reakční PCR směsi (upraveno dle návodu).....	39
Tabulka 8: Výsledky izolace ze vzorků kůry a půdy na výzkumných plochách.....	43
Tabulka 9: Výsledky párového t-testu při porovnání průměrného stupně napadení a průměrné defoliace mezi jednotlivými roky.....	45

## Seznam grafů

Graf 1: Zastoupení stromů s příznaky napadení <i>Phytophthora alni</i> na jednotlivých lokalitách podle nadmořské výšky (v r. 2021).....	41
Graf 2: Měsíční úhrn srážek [mm] za rok 2019, 2020, 2021 v Praze a Středočeském kraji (zdroj: ČHMÚ).....	45
Graf 3: Měsíční úhrn srážek [mm] za rok 2019, 2020, 2021 v Plzeňském kraji (zdroj: ČHMÚ).....	46
Graf 4: Vývoj teplot [°C] za rok 2019, 2020, 2021 v Praze a Středočeském kraji (zdroj: ČHMÚ).....	46
Graf 5: Vývoj teplot [°C] za rok 2019, 2020, 2021 v Plzeňském kraji (zdroj: ČHMÚ).....	47
Graf 6: Zastoupení napadených jedinců olše lepkavé a porovnání v letech 2019, 2020, 2021 (box-and-whisker diagram).....	47
Graf 7: Podíl jedinců s jednotlivými stupni napadení [0-4] podle kategorie vzdálenosti od vodního toku a porovnání v letech 2019, 2020, 2021 (kategorie vzdálenosti – viz kap. 3.9, Tab. 4).....	48
Graf 8: Podíl jedinců s jednotlivými stupni napadení [0-4] v pěti gradientech nadmořské výšky a porovnání v letech 2019, 2020, 2021.....	49

## 1. Úvod a cíl práce

Olše (*Alnus* spp.) - olše lepkavá *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. a olše šedá *Alnus incana* (L.) Moench nejsou považovány v lesním hospodářství za hlavní dřeviny. Podle Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2021 činí jejich současný podíl v lesních porostech pouze 1,7 %, přesto jsou olše v řadě lesních typů dřevinou nepostradatelnou. Významná je jejich ekologie a schopnost růstu na lokalitách s nadbytkem vody, kde jiné dřeviny trpí stresem, také jejich funkce meliorační, kdy díky schopnosti symbiotických bakterií rodu *Frankia* a na dusík bohatému opadu přispívají k vyhovujícímu cyklu dusíku a k urychlení dekompozičních procesů. Olše lepkavá i olše šedá mají nezastupitelný, enormní význam při zpevňování břehů a ve spontánní rekolonizaci břehů po disturbancích. Olše jsou velmi hojnou dřevinou podél toků, kde jejich hustá síť kořenových systému nabízí úkryt pro bezobratlé i ryby.

V posledních 22 letech jsou poškozovány břehové porosty patogenem *Phytophthora alni* Brasier et S. A. Kirk (plíseň olšová). Jedná se o letální fytoftorovou hnilobu kořenů a kořenových krčků, která poškozují strukturu a funkce porostů olší. Tato choroba je považována za jeden z nejvýznamnějších introdukovaných patogenů dřevin, která dokáže měnit charakter, strukturu a fungování ekosystémů v rozsáhlých areálech. V současné době je druh *Phytophthora alni* široce rozšířen po celém území ČR a postupně se stává trvalou složkou ekosystémů s přítomností olše. V rámci ČR byl jeho výskyt v lesích identifikován na cca 50 % plochy lesních porostů s olší a ve správě Povodí Vltavy byl patogen zjištěn v břehových porostech vodních toků o délce 6 000 km. Pravděpodobně pokrývá 80 % celkové kilometráže vodních toků Vltavy a expanduje směrem na východ. V případě zanedbání rozvoje choroby, kterou tento organismus způsobuje, a jeho následné rozšíření může vést ke značným škodám v oblasti vodohospodářství, lesnictví a v ochraně přírody. Situace může být komplikovaná s probíhající klimatickou změnou, tzn. že vyšší teploty mohou ovlivňovat šíření patogenu a tím i výši škod způsobených na lesních porostech.

Předložená diplomová práce se zabývá rozšířením patogenních organismů rodu *Phytophthora* a jejich vlivem na zdravotní stav vybraných olšových porostů v rámci povodí Vltavy. Pro identifikaci patogenů bylo nutné provést izolaci z napadených pletiv hostitele a determinovat druh patogenu metodami molekulární biologie. Cílem práce bylo rovněž ověřit hypotézu, zdali existuje průkazná závislost mezi vlivy prostředí (nadmořská výška, šířka vodního toku, vzdálenost od vodního toku a další) a výskytem napadení.

## 2. Literární rešerše

### 2.1 Základní charakteristika rodu *Phytophthora*

Zástupci rodu *Phytophthora* patří do taxonu eukaryotických organismů, superskupiny SAR, skupiny Stramenopiles, třídy Peronosporomycetes (též oomycety) (ADL et al. 2012).

Rod *Phytophthora* byl poprvé popsán v roce 1876 Antonem de Barym (typový druh *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – plíseň bramborová). V průběhu následujících desetiletí byly popisovány další druhy, tj. *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröter, *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman a do roku 1996 bylo známo 58 druhů (ERWIN, RIBEIRO 1996). Zástupci tohoto rodu jsou považovány za nejvýznamnější primární rostlinné patogeny způsobující nemalé ekonomické škody jak v Evropě, tak i po celém světě. Tyto organismy jsou zodpovědné za hnilobu kořenů, hnilobu krčků rostlin, rakoviny nebo odumírání celých porostů (ERWIN, RIBEIRO 1996; TSAO 1990). Druhy rodu *Phytophthora* patří mezi nebezpečné invazní organismy, které jsou běžně zavlečeny s živými rostlinami napříč kontinenty a státy. Ve svých nových areálech se nekontrolovaně šíří a pronikají do přírodních lesních společenstev a ekosystémů. Z druhů rodu *Phytophthora*, které způsobují značné ekonomické, environmentální i jiné (např. snížení produkce, zvýšení eroze) škody, lze zmínit např. druhy *Phytophthora alni* (Evropa), *Phytophthora cinnamomi* (Austrálie, jižní Evropa), *Phytophthora ramorum* (Severní Amerika, Irsko a Britské ostrovy), *Phytophthora lateralis* (Severní Amerika), *Phytophthora austrocedrae* (Jižní Amerika) a další (ČERNÝ et al. 2020; JUNG et al. 2000a).

Významnou vlastností oomycetů je jejich vazba na vodní prostředí, kde jejich nepohlavní rozmnožování, které je zásadní pro šíření choroby, probíhá. Z mycelia vyrůstají sporangiofory, které nesou zoosporangia obsahující dvoubičíkaté pohyblivé zoospory. V pletivech hostitelů a ve vnějším prostředí tyto organismy vytváří také pohlavní orgány – samičí oogonia a samčí antheridia. Pohlavním procesem (gametangiogamie) pak vzniká oospora, která dokáže v nepříznivých podmínkách přežít řadu let (ČERNÝ et al. 2020; NOVÁK, SKALICKÝ 2017).

Zástupci tohoto rodu jsou morfologicky podobné houbám, ale ve srovnání s pravými houbami jsou druhy *Phytophthora* jedinečné tím, že hlavní část životního cyklu jsou primárně diploidní, zatímco pravé houby jsou haploidní. Na rozdíl od hub je jejich buněčná stěna tvořena celulózou a glukánem, nikoliv chitinem (JELÍNEK, ZICHÁČEK 2021).

## 2.2 *Phytophthora alni* Brasier & S. A. Kirk

*Phytophthora alni* Brasier et S.A. Kirk (plíseň olšová) je celosvětově nejvýznamnějším patogen olší (*Alnus* spp.). Šíří se primárně vodou, napadá kořenové systémy olší, které následně odumírají a tím dochází k poškození stabilizačních a ekologických funkcí břehových porostů (BJELKE et al. 2016). V anglické literatuře se onemocnění způsobené tímto patogenem označuje jako „Phytophthora disease of alder“ (BRASIER et al. 2004). V české literatuře je možné se setkat s více označeními, z nichž nejčastěji se uvádí „plíseň olšová“, dále fytoftorová hniloba kořenů a krčků olší“, „fytoftorové onemocnění olší“ nebo „krvácivá rakovina olší“ (ČERNÝ et al. 2013a).

Po objevu a první izolaci druhu *Phytophthora alni* se ukázalo, že se jedná o okruh heteroploidních mezidruhových hybridů neznámých druhů příbuzných *Phytophthora cambivora* a *Phytophthora fragariae* a pravděpodobně pochází z lesních školek (BRASIER et al. 1995, 1999). Po následném popisu druhu *Phytophthora alni* byla jeho variabilita v rámci druhu dočasně vyřešena na úrovni jednotlivých poddruhů: *Phytophthora alni* subsp. *alni* (Brasier & S. A. Kirk) (*PAA* – standardní forma), *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (Brasier & S. A. Kirk) (*PAU* – švédská varianta) a *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (Brasier & S. A. Kirk) (*PAM* – německá, nizozemská, anglická varianta) (BRASIER et al. 2004). Nehybridní druh *PAU* byl do Evropy introdukován ze Severní Ameriky (AGUAYO et al. 2013) a *PAM*, jehož původ a předci jsou stále neznámí, vznikl nejspíše retikulací nebo autopolyloidizací (AGUAYO et al. 2016; IOOS et al. 2006) a v Čechách nebyl doposud izolován.

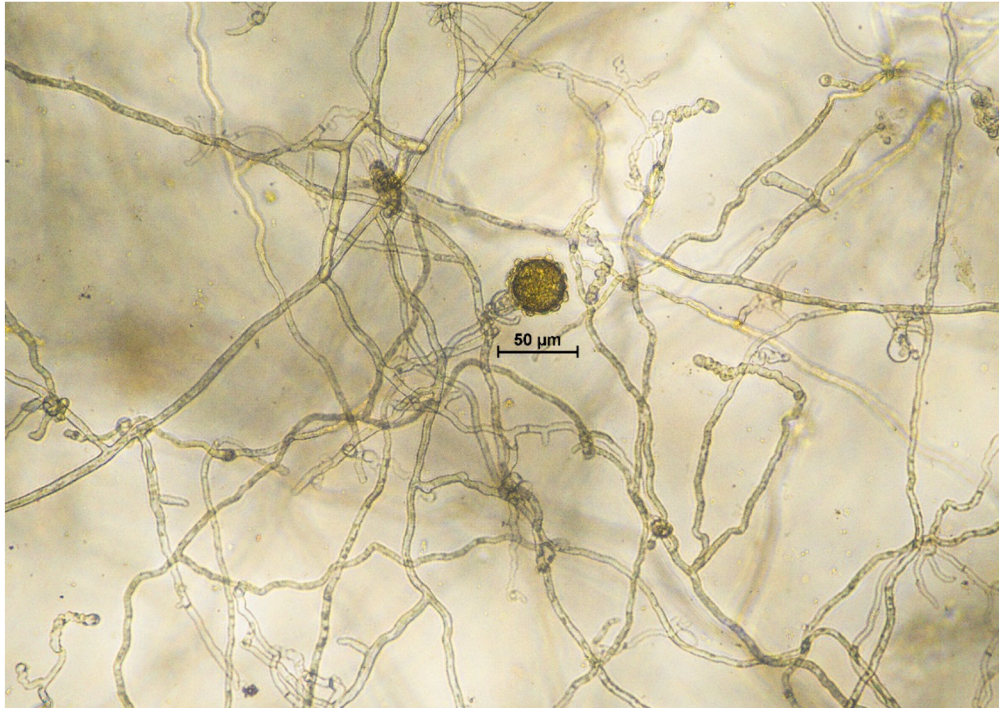
Na základě výzkumů a studií jaderné a mitochondriální DNA se zjistilo, že triploidní druh *PAA* vznikl vícenásobnou (více než 13x) hybridizací mezi poddruhy *PAU* a *PAM* nebo jejich předky (AGUAYO et al. 2016; BAKONYI et al. 2007; IOOS et al. 2006). Výsledkem těchto studií je reklasifikace poddruhů *PAA*, *PAU*, *PAM* a jejich povýšení na druhovou úroveň: *Phytophthora xalni*, *Phytophthora uniformis* a *Phytophthora xmultiformis* (HUSSON et al. 2015), které jsou součástí komplexu *Phytophthora alni*. Studie ukazují, že tyto druhy mají odlišné vlastnosti, např. odolnost vůči mrazu a mohou se lišit mírou patogenity k olším (ČERNÝ, STRNADOVÁ 2012; BRASIER, KIRK 2001). Druh *Phytophthora xalni* je nejvíce nebezpečný a velmi agresivní a rovněž v Evropě široce rozšířený (BRASIER et al. 2004).

ŠTEPÁNKOVÁ et al. (2013) provedli průzkum v České republice (s výjimkou severovýchodní části země), a jejich výsledky ukázaly značnou prevalenci poddruhu *Phytophthora xalni*, který v ČR tvoří cca 88 % populace druhu. Zbylé izoláty (11,86 %) byly určeny jako *Phytophthora uniformis* a výskyt *Phytophthora xmultiformis* zde nebyl zaznamenán. Výskyt *Phytophthora xalni* se soustřeďoval na břehy širokých řek v nížinách, také na břehy rybníků, na lokality v nižších nadmořských výškách a převážně na jasanové olšiny. Zatímco rozšíření *Phytophthora uniformis* bylo omezeno spíše na malé vodní toky položené v různých nadmořských výškách a rovněž jasanové olšiny. Tento výskyt a šíření poddruhů koresponduje s významnější agresivitou *Phytophthora xalni* (DE MERLIER et al. 2005; BRASIER, KIRK 2001), také s efektivnější produkcí

sporangii tohoto poddruhu (CHANDELIER et al. 2006) a s vyšší mírou přežití zoospor ve vodním prostředí (KONG et al. 2012).

### 2.2.1 Životní cyklus a morfologie patogenu

Plíseň olšová je vázána na vodní prostředí, kde probíhá její nepohlavní způsob rozmnožování. Podél toků je hlavním zdrojem infekce kořenů a kořenových krčků vodní inokulum. Zoosporangia většinou vznikají při teplotě vody cca 15 °C. Ve vodě se pohybují volně plovoucí dvouubičíkaté zoospory, které se pohybují buď pasivně po proudu toku, či aktivně při chemotaktickém vyhledávání svého hostitele. Zoospory jsou chemotakticky přitahovány různými aminokyselinami (glutamát, aspartát, asparagin a glutamin) k jemnému kořenovému vlášení olší (CAHILL, HARDHAM 1994; DEACON, DONALDSON 1993). Ukázalo se, že zoospory se hromadí na specifických místech, buď kde hostitel uvolňuje nejvíce živin nebo kde je strom méně odolný vůči patogenu – např. tam kde dochází k růstu kořene a v místech poranění (ZENTMYER 1961). Zoospory uvolňované ze sporangii se přichycují především v oblasti kořenových krčků většinou přes kořenové špičky nebo i lenticely (JUNG, BLASCHKE 2004; GIBBS et al. 2003) a na místa s narušenou borkou a tam se encystují (HARDHAM 2001). Zárodek, který se vyvine z cysty, se zvětší a vytvoří tzv. průnikovou hyfu (OH, HANSEN 2007), jež zpočátku roste intercelulárně podél buněčných stěn. Poté dochází ke kolonizaci hyfovými vlákny patogena až nekrotizaci vodivých pletiv (xylém, floém) rostliny, na nichž se průběžně začnou utvářet gametangia (pohlavní orgány), které většinou nevyklíčí. Až poté se ve vodním prostředí začnou na myceliu tvořit sporangiofory se sporangii nesoucí pohyblivé zoospory (ČERNÝ et al. 2013a). V případě poškození pletiva se u některých zástupců rodu *Phytophthora* zde může objevit i stádium klidových spor, tj. chlamydospor nebo oospor (PARKE et al. 2007; JUNG et al. 1996; MIRCETICH, ZENTMYER 1966). Druh *Phytophthora plurivora* přežívá nepříznivé podmínky ve formě oospor, naopak *Phytophthora cactorum* dokáže přežít jak ve formě oospor, tak i chlamydospor (MATHERON, MIRCETICH 1985). U druhu *Phytophthora alni* většina pohlavních orgánů nedozrává a oospory pravděpodobně vůbec neklíčí (Obr. 1). Chlamydospor, které vznikají nepohlavně, patogen nejspíše nevytváří (ČERNÝ et al. 2013a).



Obr. 1: Mycelium *P. alni* a typicky ornamentované oogonium (foto: J. Šindelářová a M. Macháčová)

Kromě tohoto nejběžnějšího způsobu šíření parazita, existují i další způsoby šíření – výsadbou olší z infikovaných školek, zálivkou kontaminovanou vodou ve školkách, drenážemi, půdní vodou, při záplavách, spolu s výsadbou ryb ze sádek s kontaminovanou vodou, při stavebních a těžebních pracích v infikovaných porostech, kontaminovanou technikou, infikovaným vytěženým materiálem, ale také např. příčinou pohybu skotu v řekách (REDONDO et al. 2015; ČERNÝ et al. 2010).

Za hlavní období aktivity patogenu je považováno období od konce jara až do půlky podzimu. Optimální podmínky pro růst jsou teploty okolo 23–25 °C, nicméně patogen dokáže přežít teploty okolo -5 až -7,5 °C. Při nízkých teplotách se *Phytophthora alni* rozmnožuje a šíří jen velmi omezeně (ČERNÝ et al. 2013b).

### 2.2.2 Vstupní mechanismy a reakce hostitelské dřeviny

*Phytophthora alni* proniká do pletiv svých hostitelů několika způsoby. Prvním je přímé napadení jemného kořenového vlášení vystaveného infekci patogenem. Studie ukázaly, že tyto zdroje infekce nejsou v přírodních podmínkách příliš významné. Zásadní je začátek infekce kořenů a kořenových krčků, odkud se patogen šíří přes vodivá pletiva směrem ke kmeni stromu (LONSDALE 2003). Dalším způsobem je přímé infikování hostitelských druhů prostřednictvím lenticel, adventivních kořenů či ran, kde patogen napadne a následně zničí kůru a floém (OBWALD et al. 2014). Při studiích bylo zjištěno, že olše rostoucí u potoků jsou během dočasných záplav napadeny hlavně přes lenticely

a adventivní kořeny, zatímco infekce u sazenic pěstovaných ve školkách na nezavlažovaných lokalitách začíná v kořenech (JUNG, BLASCHKE 2004).

Po tom, co patogen napadne svého hostitele, směřuje kolonizace pletiv od kořenu do kmene, kde infikuje kambium, poté floém a xylém (GIESBRECHT et al. 2011; DAVIDSON et al. 1994; TIPPETT et al. 1983). Zprvu hyfová vlákna parazita prorůstají podél buněčných stěn hostitelských buněk. Pomocí extracelulárních enzymů může dojít i k degradaci těchto stěn. Během reakce na tuto infekci, buňky často mění svůj tvar, zmenšují se (POGODA, WERRES 2004) a dochází k ucpání plazmodezmat (GIESBRECHT et al. 2011). To vede k zabarvení pletiva, kolapsu buněk, usazení kalózy, škrobu a vytvoří se dočasně nový periderm, který chrání sousední pletivo před sekundární infekcí (OH, HANSEN 2007; POGODA, WERRES 2004). Díky rychlému uzavírání stomat se snižuje absorpce vody a v důsledku toho dochází k poklesu fotosyntézy.

### 2.2.3 Symptomy napadení

První fáze napadení v porostu probíhá skrytě na kořenech olší, obvykle bez typických symptomů na nadzemních částech stromu. Patogen infikuje svého hostitele prostřednictvím kořenů a také může přímo napadat bázi kmenu (LONSDALE 2003), na kterém jsou s postupujícím zvětšujícím se rozsahem poškození viditelné rudohnědě zbarvené nekrózy (REDONDO et al. 2015; ČERNÝ et al. 2010). Nekrózy mají typický jazykový či klínovitý vzhled a jsou schopné se rychle prodlužovat (i několik desítek cm ročně). V místě nekrosů jsou pozorovány krvácivé exudáty, které vytékají na povrch kůry (Obr. 2). Tyto výtoky mají charakteristické rezavé až černavé zbarvení. Nejlépe viditelné jsou od konce léta do prosince, ale bývají postupně smyty deštěm nebo při povodních a zůstávají jen matné černé skvrny. V závislosti na faktorech prostředí a intenzitě rozvoje infekce se exudáty nemusí objevit vůbec (BJELKE et al. 2016).



Obr. 2: Příznaky napadení olší patogenem *P. xalni* – zleva doprava: rezavé až černé exudáty vytékající na povrch borky při rozsáhlém napadení kmene; propadlá nekrotická léze typického jazykovité tvaru; sekundární napadení odumírající olše lepkavé dřevokaznou houbou *Inonotus radiatus* (foto: J. Šindelářová)



Pokud patogen v pletivech odumře, dochází kolem nekrotických kalusů k tvorbě kalusu, k zavalení rány, často k tvorbě adventivních kořenů, i k částečné regeneraci olše a k vytvoření sekundární koruny se shlukovitým olistěním. Stromy, jež onemocnění prodělaly, mají trvale zmenšenou listovou plochu a jsou obvykle náchylné např. k infekci patogenem *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst. (BJELKE et al. 2016; ČERNÝ et al. 2010) (Obr. 2).

První projevy nemoci v koruně jsou patrné až po déle trvající infekci. Dochází k omezení přísunu minerálních látek, a i vody směrem do koruny stromu. Objevují se změny v olistění napadených stromů a porost začíná ohniskově prosychat (ve středu porostu jsou stromy odumřelé a směrem ven se stupeň nákazy snižuje) (ČERNÝ et al. 2010) – (Obr. 3). U dospělých jedinců se viditelné symptomy mohou projevovat až po několika letech od infekce (JUNG et al. 2000a; ERWIN, RIBEIRO 1996; JUNG et al. 1996; TSAO 1990; RIBEIRO 1978). V důsledku napadení se rozvíjí nespecifické příznaky v koruně stromu, které vypadají jako když strom trpí suchem nebo nedostatkem živin. Dochází ke změně barvy (žloutnutí), zmenšení listů a tím dochází ke ztrátě olistění, vadnutí, odumírání větví, řídnutí a prosvětlení koruny v celém objemu. Strom začne nadměrně plodit, a nakonec dochází k jeho úplnému odumření (JUNG 2009; JUNG et al. 2000a; ERWIN, RIBEIRO 1996; JUNG et al. 1996). Mladé stromy odumírají během několika měsíců, zatímco dospělé olše odumírají i několik let (JUNG, BLASCHKE 2004; STREITO et al. 2002; GIBBS et al. 1999).



Obr. 3: Příznaky napadení olší patogenem *P. xalni* v korunách stromů (Libomyšl, květen 2020) (foto: J. Šindelářová)

#### 2.2.4 Výskyt patogenu v Evropě

Fytoftorové onemocnění olší se poprvé objevilo v západní Evropě na jihu Velké Británie v roce 1993 (GIBBS 1995). Byly pozorovány charakteristické příznaky choroby: odumírání koruny a viditelné léze na spodní části kůry kmene. Na dalších lokalitách v Británii byla poprvé izolována *Phytophthora alni* z lézí na bázi kmene. Patogen byl následně izolován z několika dalších evropských zemí.

Poté, co byl patogen poprvé objeven ve Velké Británii v 90. letech 20. století se následně objevil i v severozápadním Německu (HARTMANN 1995), Francii (STREITO et al. 2002) a Rakousku (CECH 1997). Další zprávy o výskytu patogenu byly zaznamenány v řadě dalších států západní, střední Evropy (Belgie, Nizozemsko, Česko, Polsko a Maďarsko) a rovněž jižní (severní Itálie) a severní Evropy (Švédsko). Nyní se organismus vyskytuje například ve Španělsku a Portugalsku (KANOUN-BOULÉ et al. 2016; PINTOS et al. 2010).

Ve Francii se *Alnus* spp. vysazuje podél potoků, často v kombinaci s jinými dřevinami a dominuje ve vlhkých lesních ekosystémech. Na základě požadavku Evropské unie v 90. letech minulého století, několik institucí začalo pátrat po *Phytophthora alni*, která byla poprvé nalezena v roce 1996 na východě a jihozápadě Francie. V Německu byla *Phytophthora alni* zpozorována na severozápadě a severovýchodě v rezervaci Spreewald v Braniborsku (SCHUMACHER et al. 2006). V Bavorsku bylo napadení olší zjištěno na cca 45 % plochy porostů olší (JUNG, BLASCHKE 2004). Rovněž v Maďarsku byl patogen izolován z půdy i z nekrotických pletiv olší v roce 1999 (BAKONYI et al. 2006; SZABÓ et al. 2000)

V rámci evropského areálu rozšíření byla *Phytophthora xalni* potvrzena v Irsku, Velké Británii, Švédsku, Německu, Nizozemsku, Belgii, Francii, Španělsku, Polsku, České republice, Rakousku a Maďarsku (PINTOS VARELA et al. 2010; SOLLA et al. 2010; TRZEWIK, ORLIKOWSKA 2010; ČERNÝ et al. 2008; DE MERLIER et al. 2005; IOOS et al. 2005; BRASIER et al. 2004; NAGY et al. 2003; SZABÓ et al. 2000). Oblast výskytu *Phytophthora xalni* překrývá oblast rozšíření *Phytophthora xmultiformis* na západě (UK a severozápad Evropy). Druh *Phytophthora uniformis* je znám z Evropy a jako jediný z komplexu i ze Severní Ameriky z Aljašky a Oregonu (AGUAYO et al. 2013; ADAMS et al. 2010). Je distribuován téměř v celé Evropě, i přestože je její výskyt v poslední letech méně častý např. v porovnání s *Phytophthora xalni*, tak zabírá nejrozsáhlejší oblast výskytu (Švédsko, Litva, Německo, Nizozemsko, Belgie, Francie, Španělsko, Česká republika, Rakousko, Itálie, Maďarsko a Slovinsko (PINTOS VARELA et al. 2012; MUNDA et al. 2006; DE MERLIER et al. 2005; IOOS et al. 2005; BRASIER et al. 2004; NAGY et al. 2003; SANTINI et al. 2001; SZABÓ et al. 2000). Rozšíření poddruhu *Phytophthora xmultiformis* je velmi omezené a lokální – Spojené království, Nizozemsko, Belgie, Francie a Německo (DE MERLIER et al. 2005; IOOS et al. 2005; BRASIER et al. 2004).



Obr. 4: Mapa rozšíření patogenu v roce 2016. Převzato z BJELKE et al. (2016) a upraveno autorem

### 2.2.5 Výskyt patogenu v Česku

*Phytophthora alni* byla v České republice poprvé izolována v roce 2001 v povodí Ohře – v severozápadních Čechách poblíž Karlových Varů (ČERNÝ et al. 2003). Je pravděpodobné, že se na území vyskytovala už dříve, protože výskyt symptomů této choroby byl zaznamenán také v povodí Lužnice, Berounky, Ploučnice, Jizery a jinde. Lze říci, že invaze choroby je nejvíce zatížena na povodí Vltavy a Ohře (ČERNÝ et al. 2010). Jsou zmínky o chřadnutí olší zřejmě způsobené *Phytophthora alni* už v 80. a 90. letech minulého století (JANČAŘÍK 1993). Patogen se postupně rozšířil na většině území ČR (hlavně v západní části) v tisících kilometrech břehových porostů a postupně expandoval na východ (ČERNÝ et al. 2008).

V letech 2012–2016 ČERNÝ et al. (2017a, 2017b) zkoumali rozšíření choroby v břehových porostech v povodí Vltavy. Celková délka zkoumaných vodních toků byla okolo 9607 km. Výskyt patogenu byl evidován na cca 40,54 % místech okolo vodních toků. Délka patogenem napadených úseků vodních toků činila 5916 km (tj. přes 61 % celkové délky). Velké škody byly zřetelné na lokalitách s pomalejším prouděním vody a na olších, které rostly v těsné blízkosti toku.

Je pravděpodobné, že největší škody jsou v pánevních a plochých oblastech s hustou sítí vodních toků, a naopak nejmenší škody jsou v oblastech suchých, teplých a také v oblastech horských s členitým reliéfem (ČERNÝ et al. 2016a, 2016b). Organismus představuje riziko pro přírodní i kulturní porosty olší, ohrožuje především stabilitu říčních a lužních ekosystémů. Napadeny bývají porosty velkých řek i malých toků, porosty vodních nádrží a rybníků a další. *Phytophthora alni* se občasně vyskytuje i v zaplavovaných nivách, výtopách, bažinách, slatinách, ale i v lesních porostech, lesních školkách, větrolamech, parcích, ve výsadbách na zemědělské půdě a jinde.

### **2.3 Další druhy rodu *Phytophthora***

Antropogenní zavlékání do lesních porostů a společenstev či jiné efektivní spontánní šíření patogenů rodu *Phytophthora* představuje dlouhodobě jedno z nejvýznamnějších rizik, které tyto patogeny představují. Druhy, které se na naše území rozšířily před delší dobou a zdomácněly v něm (*Phytophthora plurivora*, *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora gonapodyides* aj.) mohou omezit nebo zkomplikovat pěstování svých hostitelů a tím způsobit velké ekonomické i environmentální škody (ČERNÝ et al. 2020).

#### ***Phytophthora plurivora* T. Jung & T. I. Burgess,**

#### ***Phytophthora multivora* P. Scott & T. Jung**

*Phytophthora plurivora* a *Phytophthora multivora* byly poprvé izolovány v roce 1927 na pomerančovnicích z východní Asie na Taiwanu (SAWADA 1927). Patogen *Phytophthora multivora* se považuje za australského endemita (SCOTT et al. 2009), zatímco *Phytophthora plurivora* je velmi kosmopolitní a v ČR se vyskytuje ve velmi široké škále společenstev a ekosystémů od plně umělých až po širokou škálu biotopů od lužních lesů, kde se běžně vyskytuje, až po květnaté bučiny a další biotopy, kam v současnosti proniká. Je to jeden z nejvýznamnějších nejběžnějších nepůvodních patogenů lesních dřevin. Ve 20. století se rozšířil do Evropy, kde se podílí na chřadnutí a odumírání dubových porostů (JUNG et al. 2000b; HANSEN, DELATOUR 1999). Mimo Evropu byl tento druh izolován zejména z plantáží a školek v Severní Americe (BRAZEE et al. 2016; JUNG, BURGESS 2009). Způsobuje hnilobu kořenů a krčků, ale i nekrózu podkorních pletiv, usychání výhonů a větví, skvrnitosti listů, vadnutí, které může vést k odumírání hostitelů a celých porostů. Škála hostitelských dřevin je široká, infikuje např. rododendrony a další okrasné dřeviny, včetně našich nejvýznamnějších

lesní dřevin (*Abies*, *Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Pinus*, *Quercus*, *Tilia*, ...) (JUNG, BURGESS 2009). Druh *Phytophthora plurivora* je dobře přizpůsoben mírnému klimatu a preferuje prostředí s dostatkem až nadbytkem vody. Optimální teplota růstu patogenu je 20 °C, minimální 2–4 °C a maximální přes 30 °C (ČERNÝ et al. 2020).

V České republice proběhl výzkum, jehož cílem bylo porovnat rozšíření, patogenitu, rozsah pronikání do přirozených ekosystémů a potenciální nebezpečí pro výsadby a porosty dřevin těchto dvou patogenů (*Phytophthora multivora* a *Phytophthora plurivora*). Výsledky ukázaly, že se oba druhy vyskytují v celé řadě systémů, jak umělých, tak přirozených porostů, ale odlišují se frekvencí výskytu i svými areály – cca 90 % izolátů náleželo druhu *Phytophthora plurivora*, který se šíří víceméně plošně po celém území ČR v různých nadmořských výškách, zatímco *Phytophthora multivora* byl izolován pouze z nižších poloh středních Čech a jižní Moravy. Druh první (*Phytophthora plurivora*) byl introdukován na území ČR pravděpodobně dříve než druh druhý (*Phytophthora multivora*), jehož počátek zavlečení je doby nedávné a patogen se teprve začíná šířit a nejdříve obsazuje nižší, člověkem zatížené a pozměněné oblasti. Během výzkumu byly provedeny testy patogenity, kde se ukázalo, že *Phytophthora plurivora* je více agresivní než *Phytophthora multivora* a napadá hlavně buk lesní, ale i javor klen, dub letní a jasan ztepilý (MRÁZKOVÁ et al. 2010). Také infikuje ořešáky rostoucí na polosuchých půdách v západním Maďarsku (KOVÁCS et al. 2013).

### ***Phytophthora lacustris* Brasier, Cacciola, Nechw., T. Jung & Bakonyi** ***Phytophthora gonapodyides* (H. E. Petersen) Buisman**

Dalšími běžnými a kosmopolitními patogeny napadající nejen olšové porosty jsou *Phytophthora lacustris* a *Phytophthora gonapodyides* (SZABÓ et al. 2013). Kromě olšových porostů napadají široké hostitelské spektrum – např. *Phytophthora gonapodyides* je známá z cca 70 hostitelů (ČERNÝ et al. 2020). Druh *Phytophthora lacustris* infikuje kořenové systémy *Alnus glutinosa*, *Prunus persica*; kůru *Alnus glutinosa* a výhony *Alnus glutinosa* a *Salix alba* (NECHWATAL et al. 2013). V porovnání s *Phytophthora alni* se tyto patogeny nepovažují za druhy agresivní a nejsou zodpovědné za devastaci porostů, ale mohou způsobovat jejich chřadnutí, především hniloby kořenů a kořenových krčků (SÁRÁNDI – KOVÁCS et al. 2015; MARCAIS, HUSSON 2014; SZABÓ et al. 2013).

Druh *Phytophthora gonapodyides* byl poprvé izolován v Dánsku, kde jej Peterson (1909) nejprve pojmenoval jako *Pythiomorpha gonapodyides*. V roce 1927 Buisman revidoval taxonomii a převedl tento druh do rodu *Phytophthora*. Později se prokázalo, že rod *Pythiomorpha* je neplatný (ERWIN, RIBEIRO 1996).

Morfologie většiny izolátů *Phytophthora lacustris* je podobná *Phytophthora gonapodyides*. V důsledku toho byl první izolát druhu *Phytophthora lacustris* přiřazen k druhu *Phytophthora gonapodyides*. Až v roce 2013 byl *Phytophthora lacustris* formálně zařazen mezi samostatné druhy (NECHWATAL et al. 2013).

Oba výše zmíněné druhy (*Phytophthora lacustris*, *Phytophthora gonapodyides*) se vyznačují relativně vysokou maximální teplotou růstu. Druh *Phytophthora gonapodyides* roste maximálně při 30–35 °C a druh *Phytophthora lacustris* při 36–37 °C. Optimální teploty růstu se pohybují u *Phytophthora gonapodyides* okolo cca 25 °C a u *Phytophthora lacustris* 28–33 °C (NOWAK et al. 2015; NECHWATAL et al. 2013).

## 2.4 Hostitelské dřeviny

### 2.4.1 Olše a její fyziologie

*Phytophthora alni* je druhem oligofágním vázaným pouze na olše (*Alnus* spp.) a v rámci celého světa je jejich nejvýznamnějším patogenem (JUNG, BLASCHKE 2004). V České republice byl zjištěn pouze na *Alnus glutinosa* a *Alnus incana* (ČERNÝ et al. 2010), ale celosvětově jsou jeho hostitelem i další druhy, jak evropské (*A. glutinosa*, *A. incana*, *A. cordata*, *Duschekia alnobetula*), tak severoamerické (*A. rubra*, *A. incana tenuifolia*) (SIMS et al. 2015; ADAMS et al. 2010; IOOS et al. 2006; BRASIER et al. 2004). Je pravděpodobné, že tento druh může způsobovat poškození i dalších druhů olší. V českém lesním hospodářství představuje *Phytophthora alni* potenciální hrozbu hlavně tam, kde dominuje olše, tj. zejména v lužní a glejové řadě (např. 3L, 5L, 6L, 1G) (ČERNÝ et al. 2013a).

Olše (*Alnus* spp.) jsou dobře adaptované pro růst v podmáčených a vlhkých stanovištích a jsou významnou složkou břehových porostů. Zejména jsou schopny udržet zástin a chladnější teploty pro ostatní břehovou vegetaci. V důsledku toho, že jsou odolné vůči podmáčeným a vlhkým stanovištím, může být potenciálně složité je nahradit jinými druhy (CLAESSENS 2003; MALANSON 1993). Především olše patří k organismům, které jsou schopny vázat vzdušný dusík prostřednictvím symbiotických rhizobakterií (*Frankia alni*) žijící v asociaci s postranními kořeny těchto rostlin, kde vytváří hlízky o velikosti až 10 cm (Příloha 22 - Obr. I). Díky asimilaci dusíku je olše schopna produkovat opad bohatší na dusík, a to jej činí atraktivním pro detrivory (IVERSEN 1974).

Olše hrají nezastupitelnou roli v břehových porostech vodních toků, kde jsou schopny nejen zpevňovat koryto, ale také vytvářet příznivé prostředí a úkryt pro řadu vodních organismů (pro bezobratlé a ryby) (BRAUNS et al. 2007; FLORY, MILNER 1999).

## 2.4.2 *Alnus glutinosa*

*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (olše lepkavá) je listnatý strom pocházející z Evropy. Je to dřevina krátkověká. Jedinci se běžně dožívají 60 let. Zcela výjimečně se může dožít 160 let. Dorůstá do výšky mezi 10–25 m (výjimečně 35–40 m) (ELLENBERG 2009; SCHUTT et al. 2002).

Olše lepkavá roste na většině území Evropy, od Skandinávie po Středomoří a části severní Afriky (MCVEAN 1953). Běžně roste do 1000 m n.m., avšak v horách střední Evropy se občas vyskytuje podél vodních toků až do nadmořské výšky 1800 m (PIETZARKA et al. 2000). Předpokládá se, že v důsledku globálního oteplování v budoucích desetiletích se může její přirozený areál rozšířit dále na sever do Skandinávie a Ruska.

Dřevina je přizpůsobena širokému rozpětí teplot a je relativně mrazuvzdorná (MCVEAN 1953). Druh roste nejlépe na hlubokých nevápenných minerálně bohatých humózních hlinitých půdách, ale může růst i na chudých, podmáčených a těžkých půdách. Je výrazně vlhkomilná dřevina, snáší vysokou půdní vlhkost a vysokou hladinu spodní vody, ale je velmi citlivá vůči záplavám (MCVEAN 1956). Déletrvající zaplavení inhibuje vegetativní růst kořenů, redukuje jejich větvení a tvorbu mykorhiz. Dále dochází k inhibici fotosyntézy, transport uhlovodíků je zpomalen nebo zastaven a v důsledku redukce biomasy kořenů dochází k poklesu absorpce živin (KOZLOWSKI 1997). Následkem odumření kořenového systému se mohou objevit typické symptomy chřadnutí – chlorotizace, zmenšení listů a jejich předčasný opad, zvýšená plodnost (avšak zmenšení plodů), řidnutí olistění a posléze odumírání výhonů a větví hlavně v horních částech korun. Vlivem zvýšené tvorby parenchymatických pletiv v xylému a floému může dojít k tloušťnutí kmene (KOZLOWSKI 1997), ke zvýšené tvorbě adventivních kořenů a ke zduření lenticel (STRNADOVÁ et al. 2006). Také dochází ke změně půdní struktury – pokles obsahu kyslíku v půdním prostředí, zvýšená koncentrace oxidu uhličitého a uvolňování nemalého množství toxických látek do půdy (např. aldehydy, ketony, merkaptany a další) (KOZLOWSKI 1997). Zaplavení má za následek odumírání symbiotických bakterií rodu *Frankia* (STRUKOVÁ et al. 1996). V důsledku tohoto oslabení je pak hostitel vystaven stresu, a to může predisponovat k napadení olše různými patogeny, včetně patogenů z rodu *Phytophthora* (VYHLÍDKOVÁ et al. 2005; GREGOROVÁ, ČERNÝ 2003).

Olše lepkavá je pionýrská dřevina náročná na světlo a je vhodná k zabezpečování a zpevnování svahů břehů. Na našem území se nejhojněji vyskytuje v lužních lesích prvního vegetačního stupně, kde tvoří čisté porosty nebo roste ve směsi s jasanem (*Fraxinus* spp.), břízou (*Betula* spp.), vrbou (*Salix* spp.) nebo dubem (*Quercus* spp.). Pro účely lesnických rekultivací je řazena do kategorie velmi vhodných dřevin, nenáročných na substrát, tolerantních k imisím a s excelentním růstem (KUPKA, DIMITROVSKÝ 2011; DIMITROVSKÝ 2000).

### 2.4.3 *Alnus incana*

Olše šedá, *Alnus incana* (L.) Moench se vyskytuje v severní, střední a jihovýchodní Evropě a roste především v horských oblastech. V Čechách je hojná v horách a podhorských oblastech v 6. a 7. lesním vegetačním stupni, kde tvoří čisté porosty kolem potoků a řek. Tento keř či strom roste do výšky 20 m na březích potoků, dočasných vodních tocích podél cesty, vlhkých místech na úpatích pahorkatin, travnatých slatinách, vykácených a vypálených plochých a opuštěných loukách a výjimečně se dožívá 100 let. Podél vodních toků sestupuje i do nižších poloh, kde roste ve směsi s olší lepkavou, ale je zde většinou uměle vysázena. V Krkonoších je její výškové maximum 1000 m n. m. (KOVANDA 1990). Stejně jako *Alnus glutinosa* je nenáročná dřevina, ale lépe snáší kolísání hladiny podzemní vody i zaplavování (ÚRADNÍČEK et al. 2009; MEZERA 1958). Dobře zvládá mrazy, ale na světlo je náročnější – v zástínu se jí nedaří. Stejně jako olše lepkavá, tak i olše šedá je považována za pionýrskou dřevinu, která obohacuje půdu dusíkem a svým opadem je schopna vylepšit chudé půdy, kde příznivě působí na jejich strukturu a tvorbu humusu. Rovněž stabilizuje svahy a říční břehy na např. šterkových náplavech, zpevňuje horské sutě, sesuvné svahy a strže, a je vhodná k zalesňování extrémních stanovišť (ÚRADNÍČEK et al. 2001).

## 2.5 *Vliv faktorů prostředí na šíření patogenu*

### Teplota

V současné době je zřejmé, že změna klimatu bude mít velký dopad na interakci mezi dřevinou a patogenem (JEGER, PAUTASSO 2008). Původci chorob tak pravděpodobně budou mít ničivější účinky v důsledku působení vnějších faktorů:

- abiotické stresy (sucho, záplavy) předurčují stromy k napadení různými patogeny
- teplota a vlhkost ovlivňují sporulaci a šíření patogenů a změny klimatu pravděpodobně upřednostňují šíření určitých druhů patogenů
- přesun patogenů způsobená vlivem klimatu může rozšířit jejich areál výskytu, např. pokud se patogeny setkají s novými hostiteli anebo potenciálními přenašeči
- mohou se objevit nové hrozby kvůli změně druhové skladby dřevin nebo kvůli invazním druhům (LA PORTA et al. 2008)

Patogen *Phytophthora alni* způsobuje výrazně vyšší škody v teplejších obdobích. Optimum jeho růstu bylo zjištěno při teplotách 23–25 °C (BRASIER et al. 2004), ale největší škody způsobuje při 25 °C (HAQUE et al. 2015). Obtížně přežívá nízké teploty hlavně pod tenkou borkou. V prostředí při -10 °C jeho životaschopnost výrazně klesá a odumírá během 2–3 dnů, což může ovlivnit jeho přežívání v porostech (AGUAYO et al. 2014; ČERNÝ, STRNADOVÁ 2012) a distribuci (REDONDO et al. 2015).

V současné době průměrná zimní teplota přesahuje 0 °C (IPCC 2007). Následkem zvyšujících se teplot během zimy, evropské invazní druhy rodu *Phytophthora* (včetně *Phytophthora alni*) úspěšně přežívají tyto nepříznivé podmínky (BERGOT



et al. 2004; COAKLEY, SCHERM 1996). Během zim s průměrnou teplotou -2 °C patogen přežívá v napadených pletivech pouze v minimálních frekvencích. Dá se očekávat, že oteplování klimatu velmi pravděpodobně bude dopomáhat k rozvoji choroby (ČERNÝ et al. 2015a, 2015c; ČERNÝ, STRNADOVÁ 2012).

Patogen *Phytophthora alni* je překvapivě relativně tolerantní vůči chladu a je schopen dlouhodobě bez problémů přežít teploty -2,5 °C (ČERNÝ et al. 2012). Předpokladem je, že hlavní rezervoárem infekce po zimách se standardním průběhem klimatu jsou pletiva v nezamrzlých vrstvách půdy a vody (ČERNÝ, STRNADOVÁ 2012). Rovněž sporulace tohoto patogenu je s teplotou pozitivně korelována – při teplotě 8 °C a nižší je sporulace víceméně omezená a nejintenzivnější je při dosud nejvyšší testované teplotě 15 °C (CHANDELIER et al. 2006).

Co se týče odolnosti vůči mrazu, bylo zjištěno, že *Phytophthora xalni* je méně tolerantní k mrazu než např. druh *Phytophthora uniformis*, který je izolován z chladných oblastí (Švédsko, Aljaška). REDONDO et al. (2015) ve Švédsku provedli výzkum zaměřený na vliv teploty na šíření těchto tří druhů *Phytophthora xalni*, *Phytophthora uniformis* a *Phytophthora xmultiformis*. Výsledky ukázaly, že patogen *Phytophthora xalni* je omezen na oblasti s příznivými mírnějšími zimními podmínkami, zatímco *Phytophthora uniformis* byl pozorován i na lokalitách s nízkými zimními teplotami. To může pravděpodobně souviset s tím, že *Phytophthora uniformis* má více životaschopné oospory, které jsou schopny úspěšně přežít zimu (DELČÁN, BRASIER 2001). Rovněž extrémní podmínky jako jsou velmi vysoké teploty během léta omezily výskyt patogenu (AGUAYO et al. 2014). Zároveň se dá očekávat trend, že v důsledku oteplování klimatu se v budoucnu bude teplotnějším druhům více dařit (REDONDO et al. 2015).

## **Voda**

Velmi významný faktor je voda, protože se v ní patogen rozmnožuje a šíří. Choroba se vyskytuje zejména na lokalitách s lepší dostupností vody a na lokalitách zaplavovaných. Obecně lze říci, že se choroba více vyskytuje na lokalitách s dlouhou periodou zadržení vody (slepá ramena, mokřadní olšiny, nadjezí, výtopy a podhrází rybníků a nádrží) (JUNG, BLASCHKE 2004). Okolo 80 % všech napadených olšových porostů v ČR se nalézají v bezprostřední blízkosti vodního toku a výše škod způsobených *Phytophthora alni* průkazně závisí na hustotě říční sítě.

V srpnu roku 2002, postihly západní Česko povodně, které zaplavily stovky kilometrů olšových porostů. Tyto letní povodně přispěly k náhlému a rychlému šíření fytoftorového onemocnění olší v povodí Vltavy (STRNADOVÁ et al. 2010). Kolísání hladiny podzemní vody a dlouhodobé podmáčení mohou být primárními příčinami poškození několika druhů dřevin (KOZLOWSKI 1997). Záplavy mění strukturu půdy, a to vede k zastavení růstu a rozpadu kořenového systému (KOZLOWSKI 1997) a tím i k zakrnutí růstu, odumírání větví a v některých případech i k odumření celého stromu (MCVEAN 1956). Během povodní se zoospory patogenu šíří z infikované kůry a napadají

další stromy (STREITO et al. 2002). Nejvyšší riziko infekce způsobují záplavy během vegetačního období (SCHUMACHER et al. 2006). Je prokázáno, že zaplavení indukuje pokles rezistence hostitele a tím urychluje rozvoj infekce (STRNADOVÁ et al. 2010).

Výskyt choroby je také častější na lokalitách s pomalejším prouděním vody v nižších polohách. Podél horských potoků s rychlejším prouděním je výskyt patogenu nižší (THOIRAIN et al. 2007). V České republice byly největší škody zjištěny na širších vodních tocích, a naopak škody na drobných tocích (cca do 2 m šířky) byly zpravidla menší (ROMPORTL et al. 2016). S rozšířením patogenu koreluje i výskyt jílovitých půd na březích (THOIRAIN et al. 2007), což zřejmě souvisí se sedimentační aktivitou, a tedy s průtočnou rychlostí, sklonem a šíří toku. Vysoká míra poškození na dolních tocích může souviset i s vyšší aktivitou patogenu při vyšších teplotách a vyšší koncentrací inokula v důsledku jeho splavování z výše položených lokalit povodí. Významné je také větší poškození porostu v úsecích s pomalejším prouděním vody, což pravděpodobně souvisí s vyšší úspěšností kolonizace zoosporami patogenu. Podle výzkumů, incidence onemocnění roste s klesající vzdáleností stromu od vodního toku, se zvyšující se šířkou toku, vyšší teplotou vody, obsahem jílu na březích a pomalejším průtokem vody (THOIRAIN et al. 2007).

### **Nadmořská výška**

Patogen *Phytophthora alni* se v České republice vyskytuje od planárního do montánního stupně. Největší škody jsou v olšových břehových porostech identifikovány mezi 250 a 450 m n. m. V Čechách byl zjištěn maximální výškový údaj výskytu patogenu – cca 820 m n. m. na nejdelším přítoku Otavy, tj. na Vodňanské Blanici. Mezi oblastí s nejvyšší výší predikovaných potenciálních škod lze zařadit jihočeské pánevní oblasti, Jindřichohradeckou kotlinu, Stropnickou pahorkatinu a širší okolí toků, jež je odvodňují a jejich přítoků, údolní oblasti Hornosázavské pahorkatiny a také členitější oblasti západních a středních Čech (oblasti větších toků – Mže, Úslava, Úhlava, Radbuza). Nejnižší míru poškození je možné předpokládat na lokalitách s vyšší nadmořskou výškou, chladné polohy (Šumava, Novohradské hory, Český les, nejvyšší polohy Brd, Plzeňská pahorkatina, Křivoklátsko, Český kras) a rovněž v suchých oblastech (Pražská plošina, Plzeňská kotlina, vyšší polohy Tepelské vrchoviny, Benešovská pahorkatina, Českomoravská vysočina). Lze předpokládat, že potenciální dlouhodobé škody způsobené patogenem budou největší v pánevních typech krajiny, plošších částech pahorkatin a vrchovin s větší četností drobných toků a s vyšším procentuálním podílem olší v břehových porostech. To by znamenalo, že nejnižší škody budou omezeny na oblasti Pražské tabule a na některé vyšší či členité části vrchovin a hlavně pohoří. To je zapříčiněné širokou ekologickou valencí patogenu *Phytophthora alni* kopírující niku svých hlavních hostitelů, ztíženou prostupností krajiny pro patogen a odlišnou invazibilitou odlišných krajinných typů (ČERNÝ et al. 2016c).

V rámci komplexu druhů *Phytophthora alni* lze obecně říci, že druh *Phytophthora xalni* je běžný na dolních širších tocích v nižších nadmořských výškách a jeho areál je

souvislý. Druh *Phytophthora uniformis* proniknul na území ČR již dříve, a proto je jeho rozšíření ostrůvkovité a jeho výskyt hlavně na drobných tocích ve středních a vyšších polohách. Populace tohoto druhu se pravděpodobně zmenšuje následkem kompetice druhu předchozího (ŠTĚPÁNKOVÁ et al. 2013).

Do dalších let lze očekávat, že se patogen *Phytophthora alni* bude nadále šířit v krajině povodí Vltavy, bude pronikat do méně dostupných částí ČR – tj. vyšší a více heterogenní oblasti a následkem vyššího zastoupení olší v břehových porostech tam zapříčiní vyšší škody (ČERNÝ et al. 2016c, 2016d).

Pozitivní vliv na distribuci patogenu mají faktory lesních vegetačních stupňů (LVS). Rozsah poškození olší je vyšší v 1. a v 2. LVS a od 5. LVS výše, nejnižší ve 3. a 4. LVS (ČERNÝ et al. 2016d).

### **Další faktory**

Patogen se může šířit ve všech biotopech, kde roste jeho hostitel. V ČR byl patogen izolován z břehových porostů, z lesních výsadeb, z parků, z lesních školek a z okolí v blízkosti lesní skládek (BJELKE et al. 2016; JUNG, BLASCHKE 2004).

Výskyt *Phytophthora alni* v lesní porostech České republiky je průkazně pozitivně závislý na přítomnosti, šířce, délce a významnosti vodního toku, na výměře porostu, na věku porostu, podílu olší a zásobě. Vyšší míra napadení na významných vodních tocích (VVT) může pravděpodobně souviset s délkou toku, plochou jeho povodí a prouděním toku a také s tím, že se VVT nalézají zpravidla ve více osídlených oblastech s vyšší mírou antropogenní zátěže. Ve srovnání s drobnými vodními toky (DVT) jsou VVT poněkud více ve středu zájmu, a proto může být poškození porostu odhaleno dříve a opatření (kácení či odstranění dřevin) se mohou provádět ve vyšší a časnější frekvenci (ČERNÝ et al. 2016a).

Významná je i pozice výsadby, tzn. pozice krčků vůči hladině vody (SCHUMACHER et al. 2006). Nezaplavované porosty vysazené výše na březích, byly podstatně méně napadeny. Drtivá většina infikovaných olší v břehových porostech byla zjištěna do vzdálenosti 1 m od břehu (GIBBS et al. 1999) a v ČR v těsné blízkosti od vodního toku do cca 4 (-10) m (ČERNÝ et al. 2016c).

Velká hrozba nastává, pokud se *Phytophthora alni* zavleče do lesních školek. Bohužel tam se patogen vyskytuje nejčastěji, protože školky používají k závlaze povrchovou vodu (SCHUMACHER et al. 2006). Ze školek se může patogen introdukovat i na velmi vzdálená místa prostřednictvím obchodování se školkařským materiálem. V Bavorsku byly promořené školky, které překupovaly sazenice od velkých komerčních školek a používaly závlahu pocházející z řeky, která byla kontaminovaná *Phytophthora alni*. Je překvapivé, že na první pohled nebyly shledány žádné symptomy napadení na těchto olších, ale projevíly se až po nějaké době po vysazení na trvalá stanoviště. Naopak ve školkách, kde ze semen vypěstovaly své vlastní sazenice, patogen *Phytophthora alni* nebyl pozorován (JUNG, BLASCHKE 2004). Šíření spolu

se školkařským materiálem je prokázáno i u nás – ve školkách v ČR se vyskytoval druh *Phytophthora xalni* i *Phytophthora uniformis* (ČERNÝ et al. 2015b). Byly zde testovány lesní školky a i rybníky. Zjistilo se, že dvě ze třinácti pozorovaných školek jsou promořené patogenem a také třicet dva rybníků, které se jeví jako zdroj nákazy (ČERNÝ et al. 2015b).

## **2.6 Laboratorní metody**

### **2.6.1 Izolace patogenů rodu *Phytophthora***

Prvním krokem při monitoringu patogenu je jeho spolehlivé prokázání – izolace z poškozených pletiv (ČERNÝ et al. 2010). Většina druhů rodu *Phytophthora* se považuje za primární patogeny infikující živá nebo čerstvě napadená pletiva svého hostitele. Pokud jsou odebrána pletiva čerstvá či nedávno infikovaná, izolace z pletiv je relativně jednoduchá a úspěšná metoda v porovnání s druhou metodou, kde je izolace patogenu ze vzorků půdy víceméně obtížná. Aby bylo možné patogen *Phytophthora* úspěšně izolovat ze vzorků půdy, je důležité odebírat vzorky ze správného místa opakovaně a vhodně s nimi zacházet a optimálně skladovat (DRENTH, SENDALL 2001).

#### **2.6.1.1 Izolace z kůry**

První viditelné exudáty se objevují obvykle koncem jara, ale na začátku vegetační doby může hostitel potlačit aktivitu patogenu díky jeho obranným mechanismům, a proto je vhodné s odběrem vzorků počkat na dobu, kdy je patogen nejvíce aktivní, tj. červenec až listopad. Patogen je možné detekovat pouze z okraje aktivně rostoucí léze, pokud jsou viditelné čerstvé exudáty a pod nimi aktivní nekrózy, které obsahují mycelium živého patogenu (ČERNÝ et al. 2010). Vzorek musí obsahovat hranici mezi zdravými a napadenými vodivými pletivy. Jakmile je odebraný vzorek pletiva povrchově sterilizován, měl by být přenesen přímo na vhodné selektivní médium (DRENTH, SENDALL 2001).

V případě lézí na kmenech a krčících, MRÁZKOVÁ et al. (2011, 2013) odstranili vnější kůru z apikální části aktivních lézí. Vzorky pletiv (včetně kambia), veliké cca 100 - 200 cm<sup>2</sup> byly odebrány pomocí dláta a poté umístěny do sterilních polyethylenových sáčků. Nadále byly vzorky pečlivě omyty a očištěny pod tekoucí vodou z vodovodu a nařezány na segmenty (3 x 3-5 x 5 mm nebo 5 x 5 x 5 mm velké), které byly opakovaně promyty destilovanou vodou a povrchově sterilizovány 95% ethanolom. Tyto segmenty byly znovu promyty v destilované vodě, vysušeny a umístěny na selektivní agarové médium PARPNH V8-juice.

#### **2.6.1.2 Izolace z půdy**

V případě izolace patogenu z půdy, by měly být odebírány vzorky z vlhké půdy v blízkosti zdravých kořenů, alespoň 5 cm pod povrchem půdy. Povrch půdy je často vystavený vysokým teplotám a tím ztrácí druhy rodu *Phytophthora*

svou životaschopnost, proto se vzorky nejlépe odebírají během vlhka nebo bezprostředně po něm, což typicky zvyšuje pravděpodobnost aktivity patogenu rodu *Phytophthora*. Vzorky by se měly zpracovat během několika dnů po jejich odebrání, ale lze je skladovat a uchovávat i několik měsíců (DRENTH, SENDALL 2001).

Pokud chceme patogen rodu *Phytophthora* izolovat z půdy, používají se tzv. „baiting“ metody, během nichž můžeme použít různé „návnady“, např. plody, semena, sazenice/semenáčky, děložní lístky, listy, listové disky/proužky, okvětní lístky a další. Jsou známy tři „baiting“ techniky:

- 1) Vložení půdy nebo infikovaného pletiva do otvoru vytvořeného na nějakém druhu velkého plodu – ovoci (jablko, hruška, vodní meloun).
- 2) Sazení semen, sazenic/semenáček nebo zakořeněných řízků do půdy s následným častým nadbytečným zaléváním – tím se uměle vyvolá infekce.
- 3) Plovoucí „návnady“ různých typů (např. listy) ponořených do směsi vody a odebrané půdy (DRENTH, SENDALL 2001).

Jemné kořenové vlášení se substrátem je odděleno od vzorků půdy, umístěno do plastových boxů a zaplaveno destilovanou vodou do výšky 1–2 cm nad hladinu vzorku. Na hladinu vody jsou umístěny mladé, zdravé a omyté listy rododendronu. Celý „baiting“ je proveden při pokojové teplotě cca 20 °C po dobu jednoho týdne. Pro zabránění růstu bakterií, je možné vodu vyměnit za čerstvou. Po uplynulém čase se nekrotické listy očistí, usuší a rozřezají se na části – segmenty, které se přemístí na PARPNH V8 juice agarové médium (MRÁZKOVÁ et al. 2013).

Podobnou techniku použil JUNG et al. (2002). Jednolitrové vzorky půdy jsou přeneseny do laboratoře, pečlivě jsou promíchány a 200 ml dílčí vzorky jsou zality destilovanou vodou. Na hladinu vody jsou jednotlivě vloženy 2–5 dnů staré listy *Quercus robur* (JUNG et al. 2000a, 1999, 1996) nebo větvičky druhu *Chamaecyparis lawsoniana* (HANSEN, DELATOUR 1999). Vzorky se nechají po dobu 2–7 dnů při 18–20 °C. Po tuto dobu jsou viditelné barevné změny na těchto listových návnadách. Následně jsou návnady vysušeny, nakrájeny na malé kousky a přemístěny na selektivní PARPNH V8 agar.

Druhy *Phytophthora* spp. lze také izolovat z nekrotického jemného kořenového vlášení dubů přímým nanesením na PARPNH agarové médium (JUNG et al. 1996).

## 2.6.2 Kultivace patogenů rodu *Phytophthora*

Oomycety nejsou pravé houby, a proto jsou pro jejich izolaci zapotřebí speciální techniky. Většina druhů rodu *Phytophthora* roste *in vitro* poměrně pomalu ve srovnání s některými saprofyty a bakteriemi. Kromě toho je třeba omezit růst bakterií, které naopak mohou potlačit růst patogenů *Phytophthora* jejich přímou konkurencí. Následkem toho jsou vyvinuty techniky přípravy selektivních médií. Za účelem potlačení růstu bakterií se do selektivních médií přidávají antibiotika. Je dobré volit média, která jsou z nutričního hlediska méně výživná, aby se snížila rychlost růstu ostatních kontaminantů a aby se mohly kolonie patogenu *Phytophthora* nerušeně rozrůstat. Nejčastěji

používaným základním médiem pro izolaci z napadeného pletiva, je kukuřičný agar. Antibiotika, účinná proti bakteriím jsou např. ampicilin, penicilin, rifampicin a vankomycin. Mezi vhodná antibiotika s antifungální aktivitou patří např. nystatin (levnější a dostupnější) a pimaricin, ale i mnoho dalších – viz Tab. 1 (DRENTH, SENDALL 2001).

Tab. 1: Přehled chemikálií používaných při přípravě selektivních médií pro izolaci patogenů rodu *Phytophthora* (upraveno podle DRENTH, SENDALL et al. 2001).

Chemikálie	Aktivita	Cílový organismus	Příprava	Množství [µg/ml]
Ampicillin	Antibakteriální	Grampozitivní bakterie	Rozpustit 1 g v 10 ml destilované vody. Filtrovat – sterilizovat.	250-500
Benomyl	Antifungální	Většina hub kromě Zygomycetes a Oomycetes	Přidat před klávováním do média.	10-25
Hymexazol	Antifungální	Většina <i>Pythium</i> spp.	Rozpustit 500 mg v 10 ml destilované vody. Filtrovat – sterilizovat.	25-50
Nystatin	Antifungální	Většina hub kromě Peronosporales	Rozpustit 500 mg v 5 ml destilované vody. Filtrovat – sterilizovat.	10-100
Penicillin G	Antibakteriální	Grampozitivní bakterie; Gramnegativní koky; Grampozitivní bacilli	Rozpustit 500 mg v 10 ml destilované vody. Filtrovat – sterilizovat.	50-100
Pentachloronitrobenzen (PCNB)	Antifungální	Úzké antimykotické spektrum	Přidat před klávováním do média.	10-100
Pimaricin	Antifungální	Většina hub kromě Pythiaceae	Smíchat 250 g v 10 ml destilované vody. Nesterilizovat filtrací.	2-100 (5-10)
Polymixin B	Antibakteriální	Gramnegativní bakterie	Rozpustit 500 mg v 10 ml destilované vody. Filtrovat – sterilizovat.	20-50
Rifampicin	Antibakteriální	Grampozitivní bakterie; Gramnegativní bakterie (v menší míře)	Rozpustit 100 mg v 10 ml ethanolu (95 %). Filtrovat – sterilizovat.	10
Vancomycin	Antibakteriální	Grampozitivní bakterie; Gramnegativní bakterie (v menší míře)	Rozpustit 1 g v 10 ml destilované vody. Filtrovat – sterilizovat.	100-200

Optimální růstové podmínky většiny druhů rodu *Phytophthora* se pohybují okolo 15–25 °C, a proto by měla kultivace probíhat v tomto rozmezí. V důsledku zrychleného růstu některých bakterií, je lepší kultivovat patogen při nižších teplotách. Petriho misky obsahující kultury se uchovávají ve tmě, kde propagule druhů *Phytophthora* pomalu klíčí. Kolonie mohou být viditelné až po 2–20 dnech (DRENTH, SENDALL 2001). Hyfové špičky čistých kultur se udržují především na V8, MEA nebo CA agarovém médiu bez antibiotik při 15–25 °C ve tmě (REDONDO et al. 2015; MRÁZKOVÁ et al. 2013; JUNG et al. 2002; DRENTH, SENDALL 2001). Kultury by se měly přenášet na nové agarové médium každé 2–4 týdny, aby se zachovala jejich vitalita (DRENTH, SENDALL 2001).

### 2.6.3 Genetická analýza získaných izolátů

Pro detekci jednotlivých druhů a poddruhů patogenů rodu *Phytophthora* jsou používány metody molekulární genetiky Polymerase Chain Reaction (PCR). Polymerázová řetězová reakce PCR je metoda sloužící k amplifikaci vybraného úseku DNA. Poskytuje rychlé zmnožení segmentu DNA v bezbuněčném systému *in vitro*, při níž se využívá termostabilní DNA polymerázy. K celé reakci je zapotřebí několika látek – řetězec DNA (DNA-matrice získaná denaturací), krátké oligonukleotidy (primery syntezující se uměle), deoxyribonukleotidy (dNTP) a enzym, DNA polymeráza. V reakční směsi se nacházejí primery – krátké oligonukleotidové sekvence (obvykle okolo 20 bází), komplementární s určenou sekvencí na DNA, který je poté kopírován. Dvacet nukleotidů tvoří zcela unikátní sekvenci na to, aby se v genomu vyskytovala unikátně. Dalšími složkami jsou volné nukleotidy a ionty potřebné k úspěšnému průběhu polymerace (BARLETT, STIRLING 2003).

PCR je snadná a rychlá replikace úseku DNA. K zahájení řetězové reakce dojde ohříváním a ochlazováním sekvence DNA společně s polymerázou a čtyř bází do směsi. Úseky, které se musí amplifikovat, musí být označeny primery označující konec a začátek sekvence DNA (BARTOŠ 2007). PCR umožňuje provést analýzu DNA i z malého množství vzorku (JONES 2003).

Na základě metody PCR vzniklo její rozšíření – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase. PCR („real-time“) je důležitý nástroj pro diagnostiku a studium fytopatogenních hub (SCHENA et al. 2004). Tato metoda umožňuje amplifikaci i zkoumání jejího výsledku v jedné zkumavce za pomoci světelného signálu z fluoroforů a je jedinečná v tom, že lze sledovat aktuální průběh syntézy v každém cyklu, nikoliv až v závěrečné fázi celého PCR procesu a také dovoluje kvantifikaci vložené matrice, a ne pouze kvalitativní vyhodnocení vzorku (BARTOŠ 2007).

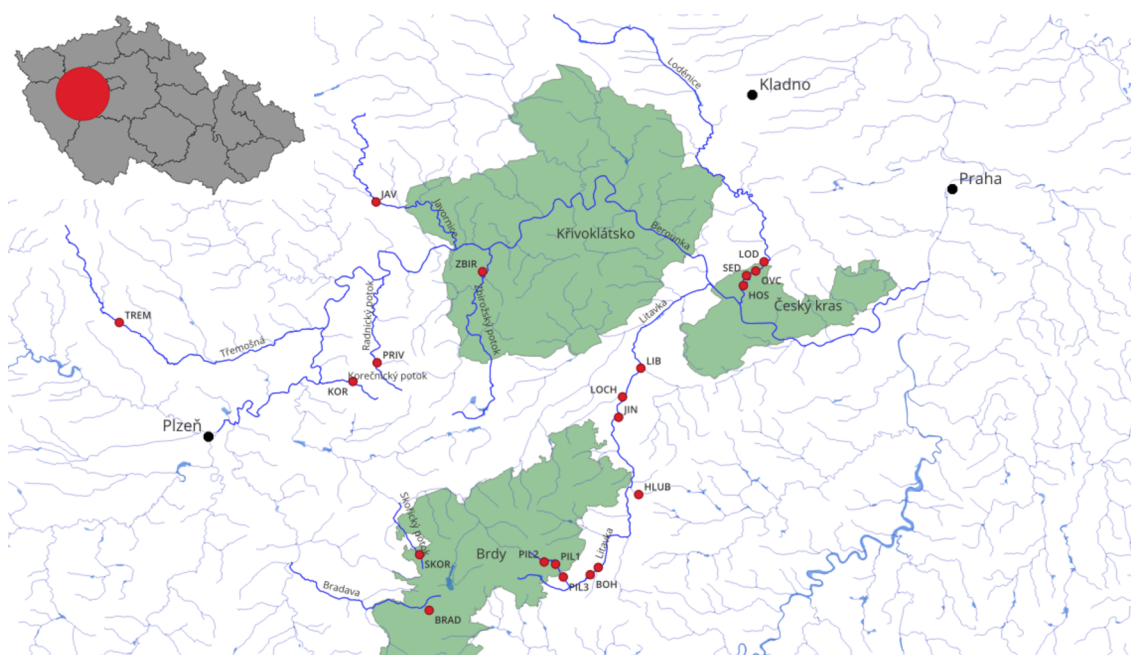
### 3. Metodika

#### 3.1 Výzkumná oblast

Výzkum proběhl na již založených (od roku 2019) 20 plochách ve středních Čechách (oblast Českého masivu – CHKO Český Kras, CHKO Křivoklátsko a severní Plzeňsko, CHKO Brdy) podél vodních toků v povodí Vltavy a přítoků Berounky (Litavka, Loděnice, Klabava, Úslava) – (Obr. 5). Všechny výzkumné plochy byly založené v rámci 5 výškových gradientů (200–300 m n.m., 301–400 m n. m., 401–500 m n. m., 501–600 m n. m., 601–700 m n. m.) – (Tab. 2). Jednotlivé plochy představovaly úsek pobřežní vegetace o délce 100 m podél vodního toku a šířce max. 6 m od vodního toku. Podíl zastoupení olše lepkavé v porostu dosahoval minimálně 50 %. Na každé lokalitě byly hodnoceni všichni jedinci olše s průměrem kmenu ve výčetní výšce (1,3 m) nad 10 cm (Tab. 3). Pařezy nebyly hodnoceny.

Tab. 2: Rozdělení jednotlivých ploch podle gradientu nadmořské výšky

Gradient nadmořské výšky	Počet a název ploch v gradientu
200–300 m n. m.	6 (LOD, OVC, SED, HOS, ZBIR, LIB)
301–400 m n. m.	4 (JAV, KOR, LOCH, JIN)
401–500 m n. m.	3 (PRIV, TREM, HLUB)
501–600 m n. m.	4 (PRIB, BOH, SKOR, PIL 3)
601–700 m n. m.	3 (PIL 1, PIL 3, BRAD)



Obr. 5: Mapa s lokalitami výzkumných ploch v rámci povodí Vltavy



Tab. 3: Přehled základních charakteristik výzkumných ploch (detailní popisy každé plochy jsou uvedeny v kap. 8 Přílohy)

Název plochy	Název vodního toku	Nadmořská výška	Souřadnice	Počet hodnocených jedinců OL
<b>Loděnice</b>	Loděnice Berounka	273 m n. m.	N 49.990645 E 14.15513	30
<b>Ovčín</b>	Loděnice Berounka	270 m n. m.	N 49.980765 E 14.14473	26
<b>Sedlec</b>	Loděnice Berounka	237 m n. m.	N 49.97518 E 14.13216	24
<b>Hostím</b>	Loděnice Berounka	253 m n. m.	N 49.96518 E 14.12961	33
<b>Zbirožský potok</b>	Berounka	291 m n. m.	N 49.942755 E 13.7431	30
<b>Javornice</b>	Berounka	375 m n. m.	N 49.99393 E 13.571545	31
<b>Korečnický potok</b>	Berounka	395 m n. m.	N 49.820445 E 13.57685	45
<b>Přívětice</b>	Berounka	414 m n. m.	N 49.84162 E 13.60822	30
<b>Třemošná</b>	Berounka	424 m n. m.	N 49.8428 E 13.221495	46
<b>Libomyšl</b>	Litavka Berounka	258 m n. m.	N 49.87294 E 13.99623	31
<b>Lochovice</b>	Litavka Berounka	316 m n. m.	N 49.843285 E 13.975435	22
<b>Jince</b>	Litavka Berounka	339 m n. m.	N 49.823345 E 13.97397	23
<b>Hlubošský potok</b>	Litavka Berounka	445 m n. m.	N 49.752715 E 14.01959	72
<b>Příbram</b>	Litavka Berounka	507 m n. m.	N 49.678095 E 13.9758	67
<b>Bohutín</b>	Litavka Berounka	524 m n. m.	N 49.67005 E 13.965525	62
<b>Skořický potok</b>	Klabava Berounka	534 m n. m.	N 49.66560 E 13.71197	33
<b>Pod Pílskou nádrží</b>	Litavka Berounka	644 m n. m.	N 49.67528 E 13.91266	24
<b>Pilský potok</b>	Litavka Berounka	683 m n. m.	N 49.67588 E 13.89558	20
<b>Pilský potok u Bohutína</b>	Litavka Berounka	595 m n. m.	N 49.66423 E 13.92668	17
<b>Bradava</b>	Úslava Berounka	630 m n. m.	N 49.614085 E 13.73789	45

### 3.2 Monitoring terénu

Terénní výzkum zahrnoval monitoring oblasti Středních Čech podél vodních toků v letech 2019, 2020, 2021. Na lokalitách byly v rámci porostu zhodnoceny následující parametry:

- Nadmořská výška [m n.m.]
- Šířka vodního toku [m]
- Podíl olše lepkavé [%]
- Pokryvnost [%]

V prvním roce terénního výzkumu zde byly vybrány stromy olše lepkavé (olše šedá se na lokalitách nevyskytovala), u kterých byly stanoveny dendrometrické parametry – výška [m] a průměr kmenu ve výčetní výšce [cm]. Také byla pozorována vzdálenost kmenu od vodního toku [m] (Tab. 4), přítomnost dalších patogenů (např. *Inonotus radiatus*) a jeden z hlavních ukazatelů fyziologické vitality jedince – úroveň defoliace [%] – (Příloha 23 - Obr. II). Pro jeho hodnocení byla využita metodika podle ICP Forests (EICHHORN et al. 2016). Dalším pozorovaným faktorem byl výskyt symptomů napadení typických pro druh *Phytophthora alni*, které byly hodnoceny jako stupně napadení [0–4] (Tab. 5). Pro hodnocení bylo použito materiálové vybavení dostupné na FLD (výškoměr Nikon, lesnická průměrka s přesností na cm, GPS lokátor, dalekohled).

Tab. 4: Kategorie vzdálenosti kmene olše lepkavé od vodního toku

Vzdálenost od vodního toku	
Kategorie	Vzdálenost
1	Ve vodě až 0,5 m
2	1–2 m
3	3–4 m
4	5–6 m

Tab. 5: Hodnocení symptomů napadení plísní olšovou na stupnici [0–4]

Stupeň napadení	Popis
0	zdravý, bez příznaků napadení
1	ojediněle výskyt exudátů a nekrotických lézí, v koruně bez výraznějších příznaků
2	střední výskyt exudátů, rozsáhlejší léze, možný výskyt chlorotizace olistění, příp. prosychání
3	silné napadení, příznaky výskytu <i>Phytophthora alni</i> , propadlé rozsáhlé léze, silný výtok exudátů na větší ploše
4	Odumírající nebo mrtvý strom v důsledku napadení <i>Phytophthora alni</i> – potvrzeno dle symptomů a izolací patogenu

### **3.3 Odběr vzorků z pletiv kmenu olší**

Vzorky kůry *Phytophthora alni* byly odebrány na základě modifikované metodiky dle ČERNÉHO et al. (2010), který doporučuje odběr v červenci až listopadu v období největší aktivity patogenu v napadené dřevině. Z každé plochy byly vybrány olše v závislosti na úrovni napadení, ze kterých byly odebrány vzorky kůry a napadeného pletiva. Na bázi kmenu, kde se vyskytovaly exudáty na borce byl proveden samotný odběr pomocí dláta, kterým byla nejprve odstraněna svrchní část kůry. V místě, kde byla viditelná hranice mezi napadenými a zdravými vodivými pletivy byly odebrány horní růstové okraje nekrózy. Vzorky pletiv byly vloženy do plastových láhví s destilovanou vodou, která slouží ke spláchnutí přebytečných fenolických látek a dalších sloučenin sekundárního metabolismu olší. Destilovaná voda byla měněna 3krát až 4krát denně z důvodu snížení rostoucích populací bakterií ve vodě (JUNG, BLASCHKE 2004).

#### **3.3.1 Izolace a kultivace patogenu**

Odebrané vzorky kůry byly po 2–3 dnech skladování v laboratoři byly vzorky kůry opatrně vysušeny papírovými utěrkami a pomocí skalpelu byla odstraněna vrchní část kůry. Z různých hloubek peridermu byly nařezány segmenty o velikosti cca 0,5 x 0,3 x 0,3 cm, u kterých byla průběžně odstraněna přebytečná voda. Odebrané kousky pletiv byly následně umístěny na Petriho misky se selektivním PARPNH agarem (příprava dle metodiky: JUNG et al. 2017; JUNG, BLASCHKE 2004; JUNG et al. 1996; (Tab. 6)). Petriho misky s agarem byly inkubovány v termostatu při laboratorní teplotě cca 20 °C ve tmě po dobu cca 7 dní, až do nárůstu mycelia. Segmenty pletiv byly každý den kontrolovány na přítomnost oomycet dle tvorby bílých hyfových vláken, které byly přeneseny na V8 agarové médium (příprava dle metodiky: REDONDO et al. 2015; SCHMITTHENNER, BHAT 1994; (Tab. 6)). Identifikace patogenu byla provedena na základě morfologických charakteristik porovnáním s literaturou (JUNG et al. 1996; ERWIN, RIBEIRO 1996) a v rámci spolupráce s externím pracovištěm *Phytophthora Research Centre* v Brně.



Obr. 6: Mycelium *Phytophthora xalni* vyrůstající ze vzorků napadeného pletiva na selektivním agarovém médiu po 5 dnech kultivace (foto: J. Šindelářová)

Tab. 6: Použitá agarová média při izolaci *Phytophthora xalni*

<b>V8 agar (V8A)</b>	
agar	16 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
V8 juice	100 ml
destilovaná voda	900 ml

<b>V8-PARPNH agarové médium</b>	
neprojasněný V8A	
pimaricin	10 µg ml <sup>-1</sup>
ampicillin	200 µg ml <sup>-1</sup>
rifampicin	10 µg ml <sup>-1</sup>
pentachloronitrobenzene (PCNB)	25 µg ml <sup>-1</sup>
nystatin	50 µg ml <sup>-1</sup>
hymexazol	50 µg ml <sup>-1</sup>

Antibiotika byla rozpuštěna v roztoku 10 ml absolutního ethanolu a 10 ml destilované vodě a přidána do V8 agaru poté, co teplota agarového média klesla na 45 °C.

### 3.4 Odběr vzorků z půdy pro izolaci patogenu

Na každé lokalitě byly vybrány 3 olše bez příznaků napadení a 3 olše vykazující symptomy napadení (nikoliv odumírání) patogenem *Phytophthora alni*. Odběr vzorků by měl být proveden pod okrajem koruny stromu, protože tam je růst kořenů intenzivnější než v bezprostřední blízkosti kmene (DRENTH, SENDALL 2001). Metodika byla upravena dle JUNG et al. (1996). Ve vzdálenosti 50–150 cm od báze kmene stromu a cca 5 cm pod povrchem půdy bylo odebráno 3–5 půdních monolitů. Poté byla vytvořena ze všech půdních monolitů směs (1–3 l), která byla umístěna do plastových uzavíratelných sáčků. Vzorky, které nebyly zpracovány během několika dnů po odebrání nebo v případě, že jejich následná izolace nebyla možná, byly skladovány při teplotě 10–20 °C po dobu až 3–4 týdnů. V případě, že vzorky půdy během skladování vyschly, byly před izolací znovu navlhčeny po dobu 1–7 dnů.

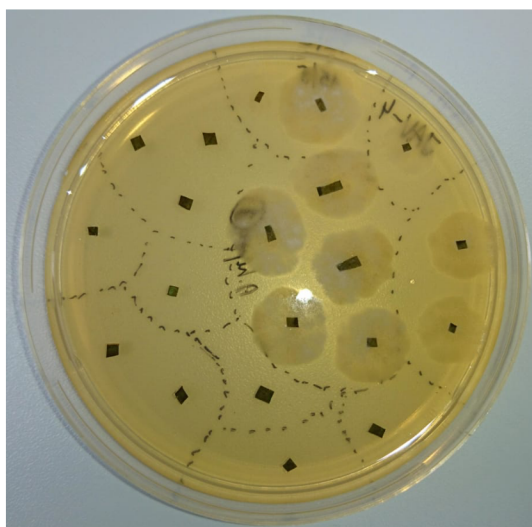
#### 3.4.1 Izolace a kultivace patogenu

V případě izolace patogenu z půdy byla použita tzv. „baiting“ metoda. Půda byla důkladně promíchána a poté z ní bylo odebráno cca 200 ml množství půdního vzorku. Tento vzorek byl vložen do plastového boxu a půda byla nejprve navlhčena přes noc. Další den byla půda zalita destilovanou vodou tak, aby vzdálenost mezi hladinou vody a povrchem půdy byla cca 3–4 cm. Nečistoty plovoucí na hladině byly odstraněny pomocí síta a papírových ubrousků. Po pár hodinách sedimentace půdních částic byly vloženy na hladinu vody mladé hydrofobní listy různých dřevin (*Quercus robur*, *Quercus suber*, *Quercus ilex*, *Fagus sylvatica*, *Aesculus hippocastanum*), které slouží jako návnady pro plovoucí zoospory uvolňující se z půdy.



Obr. 7: Mladé listy sloužící k zachycení plovoucích zoospor půdních oomycet, tzv. leaf-baiting metoda (foto: J. Šindelářová)

Inkubace probíhala po dobu 2–7 dnů při laboratorních teplotách okolo 20 °C. Po pár dnech se na listových návnadách objevily tmavé, černé, nekrotické skvrny (Obr. 7), které byly nařezány na jednotlivé segmenty o rozměrech cca 2–3 mm, byla odstraněna přebytečná voda pomocí papírových utěrek a jednotlivé kousky byly umístěny na selektivní PARPNH agar (Tab. 6) a inkubovány ve tmě při 20 °C (Obr. 8). Po nárůstu mycelia byly okrajové části mycelia přeočkovány na V8 agar.



Obr. 8 Mycelium *Phytophthora plurivora* vyrůstající z listových nekróz na selektivním médiu (foto: J. Šindelářová)

### 3.5 Identifikace druhů rodu *Phytophthora*

Identifikace jednotlivých druhů a poddruhů patogenů rodu *Phytophthora* byla provedena pomocí metod molekulární genetiky („real-time“ PCR). K extrakci DNA byly použity čisté kultury izolátů rodu *Phytophthora* kultivované cca 7 dní na V8A médiu ve tmě. Vzorek mycelia byl odebrán sterilní pipetovací špičkou a dále zhomogenizován pomocí keramické kuličky a skleněné drti na oscilačním mlýnu. K extrakci DNA byl použit Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs), a postup byl proveden dle protokolu uvedeného výrobcem.

Dále byla provedena PCR reakce s použitím OneTaq® Hot Start Quick-Load® 2X Master Mix (New England Biolabs). Postup při přípravě PCR reakce byl upravený dle protokolu uvedeného výrobcem reakční směsi. Jako primery byly použity univerzální primery ITS1/4 a ITS4/6. Při neúspěšné amplifikaci DNA některých izolátů s použitím primerů ITS regionu byly použity další primery specifické pro skupinu Oomycota: TUBUF2/TUBUR1 a OomCox1-levlo/OomCox1-levup. Celkový objem reakční směsi byl 25 µl (viz Tab. 7) a průběh amplifikace probíhal podle následujícího teplotního schématu:

Program PCR reakce s použitím ITS4/6 primerů:

- 1) počáteční denaturace 94 °C, 30 sec
  - 2) denaturace 94 °C, 30 sec
  - 3) přisednutí primeru 56 °C, 30 sec
  - 4) polymerace DNA 68 °C, 1 min
  - 5) konečná elongace 68 °C, 5 min
- } 30 x cyklus

Tab. 7 Výpočet reakční PCR směsi (upraveno dle návodu)

Reagent	Množství
<b>Master Mix</b>	12,5 µl
<b>Forward Primer</b>	0,5 µl
<b>Reverse Primer</b>	0,5 µl
<b>Deionizovaná voda</b>	10 µl
<b>Templátová DNA</b>	1,5 µl
<b>Celkový objem</b>	25 µl

Dalším krokem byla analýza produktů PCR pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. K dělení fragmentů DNA byl použitý horizontálně uložený gel připravený ze směsi 55 ml 1x TAE pufru a 0,7 g agarózy. Dále bylo přidáno kontrastní barvivo GellRed o objemu 1 µl. Takto připravený gel byl nalit do tzn. vložné vany ke ztuhnutí, kam byl přidán hřeben pro vytvoření jamek k pipetování PCR produktu. Po ztuhnutí byl vložná vana umístěna do větší vany předem naplněné roztokem, který se skládá z 35 ml 10x TBE a 315 ml destilované vody. Do připravených jamek byla poté napipetováno 5 µl PCR produktu pod hladinu pufru a jako velikostní standardy byly použity vždy 5 µl 100 bp DNA Ladder na koncích řad. Následně byla vana připojena ke zdroji elektrického napětí (100 V) na dobu 30 minut. Na základě pohybu molekul DNA v elektrickém poli je odvozena schopnost jednotlivých primerů amplifikovat templátovou DNA, jelikož fragmenty o stejné délce postupují stejně rychle a vytvoří proužek.

Vizualizace gelu byla proveden pod UV zářením a podle získaných výsledků (viditelné proužky) byly vybírány vzorky, u kterých došlo k úspěšné amplifikaci úseků DNA v rámci PCR reakce. Tyto PCR produkty byly dále odeslány k sekvenování u firmy Eurofins Genomics. Získané sekvence byly vyhodnoceny ve spolupráci s Phytophthora Research Centre v Brně. Finální determinace byla provedena porovnáním sekvence nukleotidů s veřejnou databází NCBI a také s databází Phytophthora Research Centre.

### 3.6 Statistické zpracování dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Excel a v programu R balík dplyr (WICKHAM et al. 2023). Pro tvorbu grafů byl použit balík ggplot2 (WICKHAM 2016). Korelace mezi defoliací a stupněm napadení byla hodnocena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Rozdíl ve stupni napadení a defoliací mezi jednotlivými byl zjišťován pomocí Párového t-testu.

Pro analýzu vztahu mezi ordinální závislou proměnnou  $y$  (stupeň napadení: 0 až 4) a nezávislými proměnnými (defoliace, nadmořská výška, šířka vodního toku, vzdálenost od vodního toku, podíl olší, pokryvnost olší, průměr kmene, výška porostu) byla použita ordinální logistická regrese, balík ordinal (CHRISTENSEN 2022). Rovnice tohoto modelu je:

$$\text{logit}[P(Y \leq j)] = \beta_0j + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \dots + \beta_pX_p$$

kde:

- $\text{logit}[P(Y \leq j)]$ : logit transformace pravděpodobnosti, že pozorovaná hodnota kategorického ordinálního výstupu (zde označené jako  $Y$ ) je menší nebo rovna nejvyšší kategorii  $j$ .
- $\beta_0j$ : Intercept pro kategorii  $j$ , který udává úroveň log-odds pro tuto kategorii, když jsou všechny nezávislé proměnné nulové.
- $\beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \dots + \beta_pX_p$ : Vysvětluje, jak každá z  $p$  nezávislých proměnných  $X_1$  až  $X_p$  ovlivňuje pravděpodobnost pozorovaného výstupu, když jsou ostatní proměnné konstantní. Každý koeficient  $\beta_1$  až  $\beta_p$  ukazuje, jaká je změna v log-odds pozorovaného výstupu pro každou jednotkovou změnu v příslušné nezávislé proměnné.

Meteorologická data za období 2019–2021, která byla využita v rámci posouzení vlivu počasí na zdravotní stav stromů, byla získána z veřejně dostupné databáze ČHMÚ, a graficky zpracována v kapitole 4.3 Výsledky (ČHMÚ, 2023).



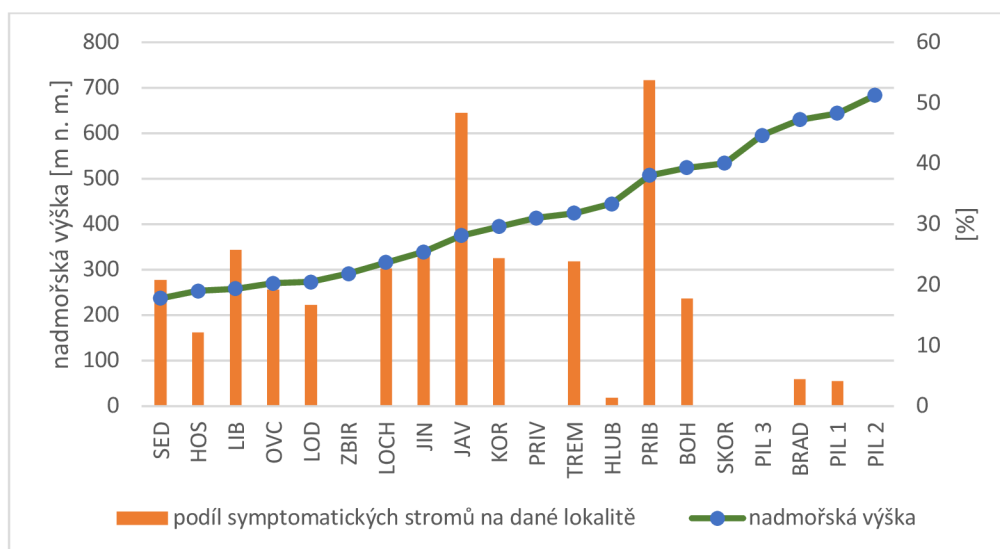
## 4. Výsledky

### 4.1 Terénní průzkum

V rámci diplomové práce celkem bylo zhodnoceno celkem 711 stromů olše lepkavé během let 2019 až 2021. V prvním roce bylo založeno 19 ploch s celkovým počtem 680 stromů, v dalším roce bylo založena 20. plocha. Z celkového počtu 20 ploch byly stromy s příznaky napadení *Phytophthora alni* zaznamenány na 15 lokalitách. Na 9 z 15 lokalit byla úspěšně izolována *Phytophthora xalni*.

Zastoupení příznakových stromů na výzkumných plochách se pohybovalo na většině ploch od 12 % do 54 % (Graf 1). Ve vyšších nadmořských výškách (lokality SKOR, PIL3, BRAD, PIL1, PIL2) se vyskytovaly zdravé porosty olše lepkavé bez příznaků napadení. U několika stromů, které vykazovaly slabé příznaky napadení, odběry vzorků přítomnost zkoumaných patogenů neprokázaly.

Největší podíl [%] příznakových stromů byl zjištěn na lokalitách Příbram (PRIB - 53,7 %) a Javornice (JAV - 48,4 %) (Graf 1; Přílohy – Tabulka I). Výsledky ukázaly rozšíření druhu *Phytophthora xalni* na obou lokalitách a výskyt druhu *Phytophthora uniformis* na lokalitě Příbram. Na obou těchto lokalitách bylo během tří let hodnocení zaznamenáno zhoršení zdravotního stavu porostů. Přestože byly zjištěny nové napadené stromy, nedošlo zde k odumření žádných z již napadených jedinců olše.



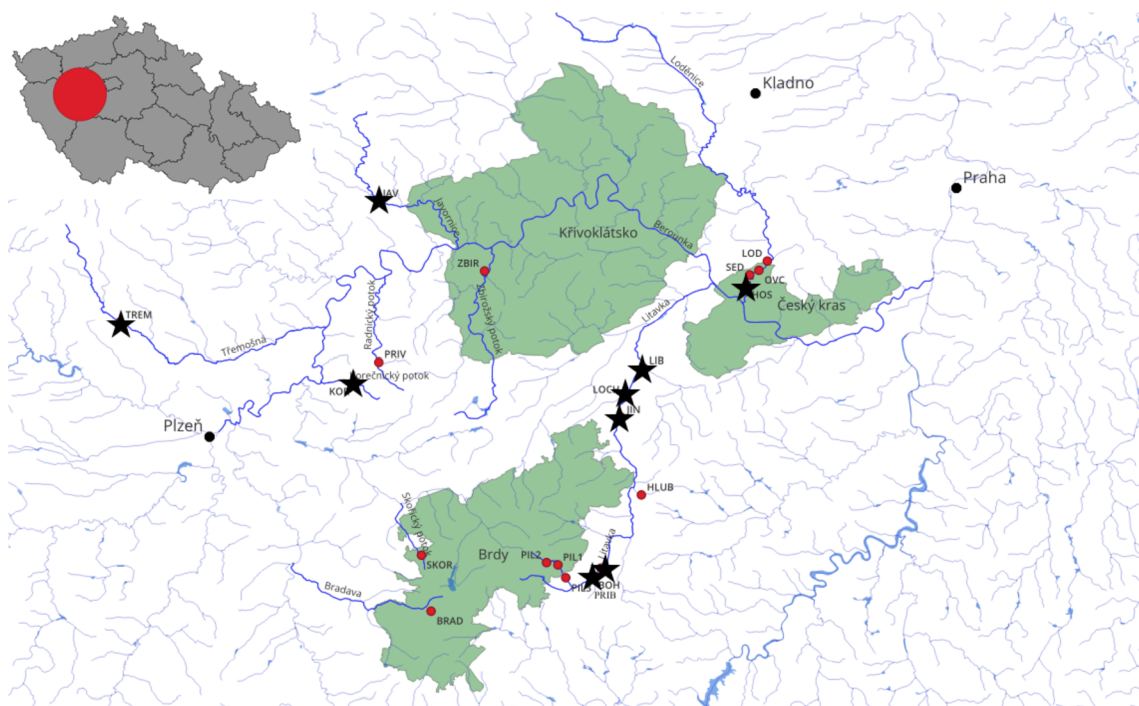
Graf 1: Zastoupení stromů s příznaky napadení *Phytophthora alni* na jednotlivých lokalitách podle nadmořské výšky (v r. 2021)

## 4.2 Izolace a determinace patogenů rodu *Phytophthora*

U symptomatických jedinců olše lepkavé na 15 z 20 lokalit byly z korových lézí odebrány vzorky kůry a podkorních pletiv k izolaci patogenu v rámci komplexu *Phytophthora alni*. Celkově byly odebrány vzorky z více než 30 stromů v období od září do prosince v letech 2020 a 2021. V některých případech neúspěšné izolace byly odběry opakovány a metoda izolace upravována dle potřeby.

Výsledky genetické analýzy získaných izolátů ukázaly rozšíření *Phytophthora xalni* (Obr. 10) v povodí Vltavy na 9 z 20 výzkumných ploch zejména v nižších polohách na toku Litavka, Loděnice a další (Obr. 9). Druh *Phytophthora uniformis* byl zaznamenán jen jednou na lokalitě Příbram (PRIB) na toku Litavka, kde byl izolován ze stejného stromu spolu s *Phytophthora xalni* v rámci odběru z jedné nekrotické léze (Tab. 8).

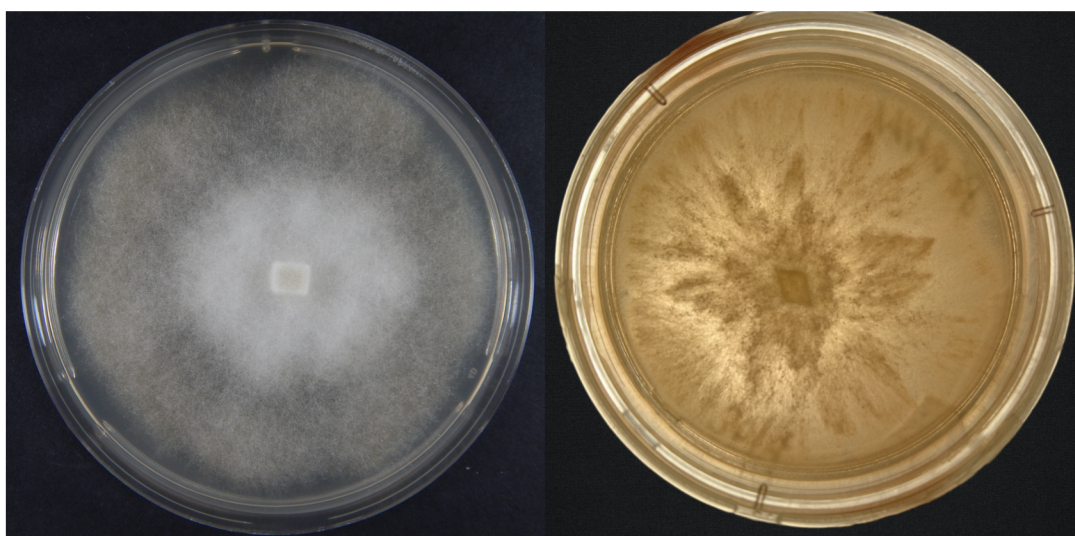
Z každé z 20 výzkumných ploch byly odebrány 3 směsné vzorky půdy na jaře a na podzim roku 2020. Celkem bylo zpracováno cca 120 vzorků půdy tzv. „leaf-baiting“ metodou. Patogeny rodu *Phytophthora* byly izolovány celkem ze 4 ploch (OVC, SED, HOS, JAV) nacházejících se na 2 tocích – Loděnice a Javornice. Nejvíce zastoupeným druhem byl druh *Phytophthora plurivora* (Obr. 10), *Phytophthora lacustris* a v menším počtu *Phytophthora gallica*. Dále v menší míře vzorků bylo izolováno *Phytophthora litorale* a další druhy rodu *Pythium* a *Phytophthora*. Tyto druhy byly zjištěny na celkem 9 lokalitách (Tab. 8).



Obr. 9: Výzkumné plochy s pozitivní izolací *Phytophthora xalni* (označeno hvězdičkou)

Tab. 8: Výsledky izolace ze vzorků kůry a půdy na výzkumných plochách

	Plocha	Izolace – kůra	Izolace – půda	
			<i>Phytophthora</i> sp.	Ostatní oomycety
1	LOD			<i>Pythium</i> sp.
2	OVC		<i>P. plurivora</i> , <i>P. lacustris</i> , <i>P. gallica</i>	<i>Pythium</i> sp.
3	SED		<i>P. plurivora</i> , <i>P. lacustris</i> , <i>P. gallica</i>	<i>Pythium</i> sp., <i>Phytopythium litorale</i>
4	HOS	<i>P. xalni</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>Pythium</i> sp., <i>Phytopythium litorale</i>
5	ZBIR			
6	JAV	<i>P. xalni</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>Pythium</i> sp., <i>Phytopythium</i> sp.
7	KOR	<i>P. xalni</i>		<i>Pythium</i> sp.
8	PRIV			<i>Pythium</i> sp.
9	TREM	<i>P. xalni</i>		
10	LIB	<i>P. xalni</i>		
11	LOCH	<i>P. xalni</i>		<i>Pythium</i> sp.
12	JIN	<i>P. xalni</i>		
13	HLUB			
14	PRIB	<i>P. xalni</i> , <i>P. uniformis</i>		<i>Pythium</i> sp.
15	BOH	<i>P. xalni</i>		
16	SKOR			
17	PIL 1			
18	PIL 2			
19	PIL 3			
20	BRAD			



Obr. 10: Kultura *Phytophthora xalni* (nalevo) a *Phytophthora plurivora* (napravo) po 7 dnech kultivace na V8 agarovém médiu ve tmě (foto: M. Macháčová)

### **4.3 Vývoj zdravotního stavu porostů v letech 2019-2021**

Hodnocení zdravotního stavu porostů, které probíhalo vždy v průběhu září v letech 2019 až 2021 a ukázalo, že porosty oslabené vlivem několik let trvajících sucha (s kulminací v letech 2018–2020) vykazují zhoršující se trend. Srážkově i teplotně příznivější rok 2021 (Graf 2, 3, 4, 5) vedl k částečné regeneraci porostů a stabilizaci vývoje napadení, přestože i nadále byly zjišťovány nově napadené stromy.

K porovnání rozdílu ve stupni napadení a úrovni defoliace mezi jednotlivými roky byl použitý párový t-test. Test byl proveden k porovnání dvou proměnných, tzv. vždy dvou let mezi sebou.

#### **Stupeň napadení olší patogenem**

Při porovnání průměrného stupně napadení patogenem v jednotlivých letech byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Hodnota průměrného stupně napadení od roku 2019 se postupně zvyšovala, jelikož přibývalo napadených jedinců olše a zároveň se zhoršoval jejich zdravotní stav. Nejvyšší rozdíl byl zaznamenán mezi roky 2019 a 2021 ( $t = 2.771$ ,  $p = 0,005$ ), kdy průměrná hodnota stupně napadení byla v roce 2019 nižší než v roce 2021 (Tab. 9).

#### **Defoliace stromů**

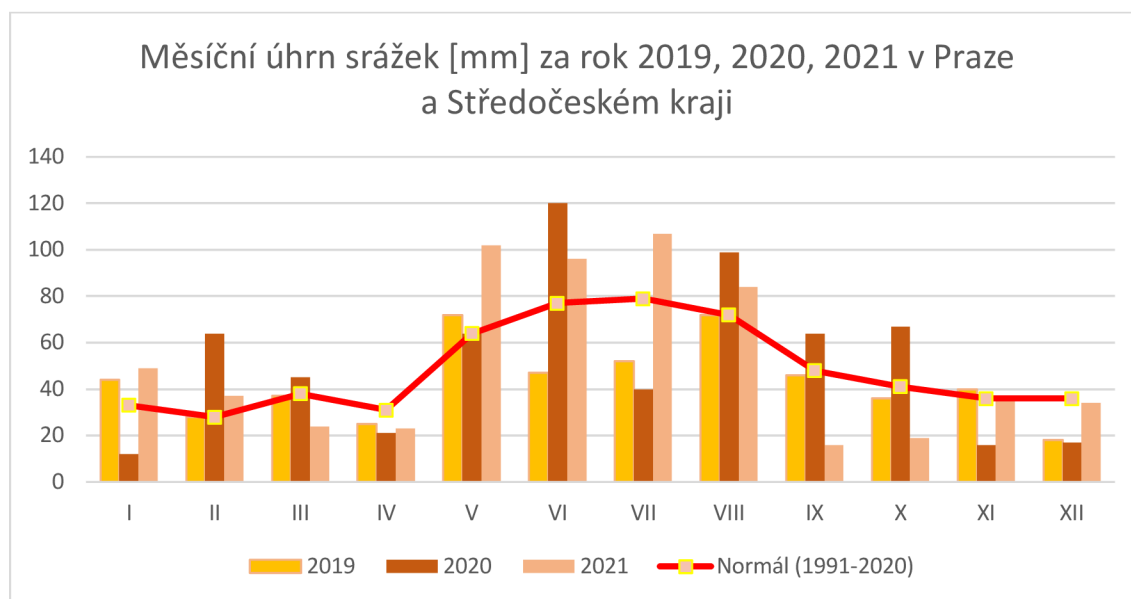
Mezi roky 2019 a 2020 byl zjištěn staticky významný rozdíl defoliace ( $t = 9.312$ ,  $p < 0.001$ ), průměrná hodnota defoliace se mezi lety 2019 a 2020 významně zvýšila. V těchto letech přetrvával trend několika velmi suchých ročníků jdoucích po sobě (Graf 2, 3) a zvýšená defoliace byla pozorována i u zdravých stromů bez příznaků. Rok 2021 byl srážkově příznivější, což se pozitivně projevilo na zdravotním stavu všech porostů. Přestože nenapadené stromy vykazovaly nižší míru defoliace, vlivem celkově se zhoršujícího zdravotního stavu napadených olší, tak byla celkově průměrná defoliace v roce 2021 vyšší v porovnání s rokem 2020. Mezi těmito dvěma roky byl zjištěn statisticky významný rozdíl, který byl nižší v porovnání s předchozími dvěma lety ( $t = 4.273$ ,  $p < 0.001$ ) (Tab. 9).

V porovnání s roky 2019 a 2020 byl rok 2021 teplotně i srážkově podstatně příznivější, přestože zejména hodnoty průměrných srážek v jarních měsících nedosahovaly hodnot dlouhodobého normálu (1991–2020). V období od května do srpna 2021 však byly srážky nadprůměrné, což bylo u zkoumaných porostů hodnoceno celkově nižší mírou defoliace. Nicméně u napadených jedinců bylo i nadále pozorováno řidnutí a prosychání v koruně a v některých případech chlorotizace. U silně napadených jedinců (stupeň napadení 3 a 4) byla pozorována kmenová výmladnost jako reakce na zvýšený úhrn srážek, přestože kosterní větve a větší část koruny už byly u těchto stromů odumřelé (Graf 4,5).

Tab. 9: Výsledky párového t-testu při porovnání průměrného stupně napadení a průměrné defoliace mezi jednotlivými roky

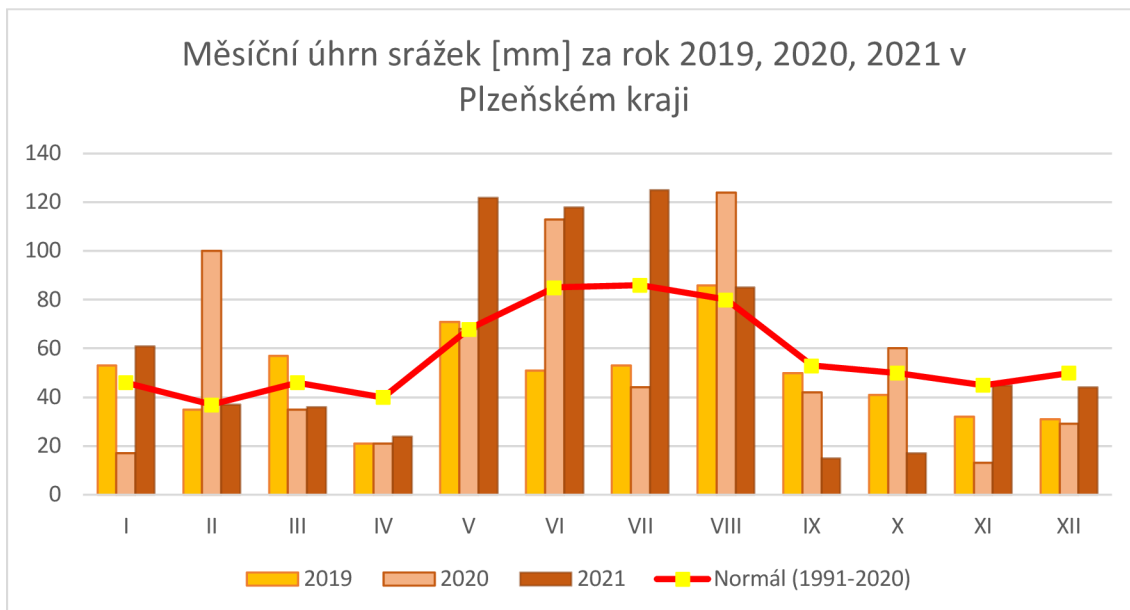
	t-value	df	p-value	95% confidence interval	mean difference
<b>Stupeň napadení</b>					
<b>2020 a 2019</b>	2.065	679	0,039	0.063 – 0.001	0.032
<b>2021 a 2020</b>	2.068	710	0.038	0.038 – 0.001	0.019
<b>2021 a 2019</b>	2.771	679	0.005	0.087 – 0.015	0.051
<b>Defoliace</b>					
<b>2020 a 2019</b>	9.312	679	<0.001	2.902 – 1.891	2.397
<b>2021 a 2020</b>	4.273	710	<0.001	1.177 – 0.657	1.216
<b>2021 a 2019</b>	9.241	679	<0.001	4.368 – 2.837	3.602

\*Poznámka: V roce 2019 bylo hodnoceno 19 ploch (680 stromů), v roce 2020 a 2021 bylo hodnoceno již 20 ploch (711 stromů) – tomu odpovídají i stupně volnosti v použité analýze (df) při porovnání jednotlivých let mezi sebou.



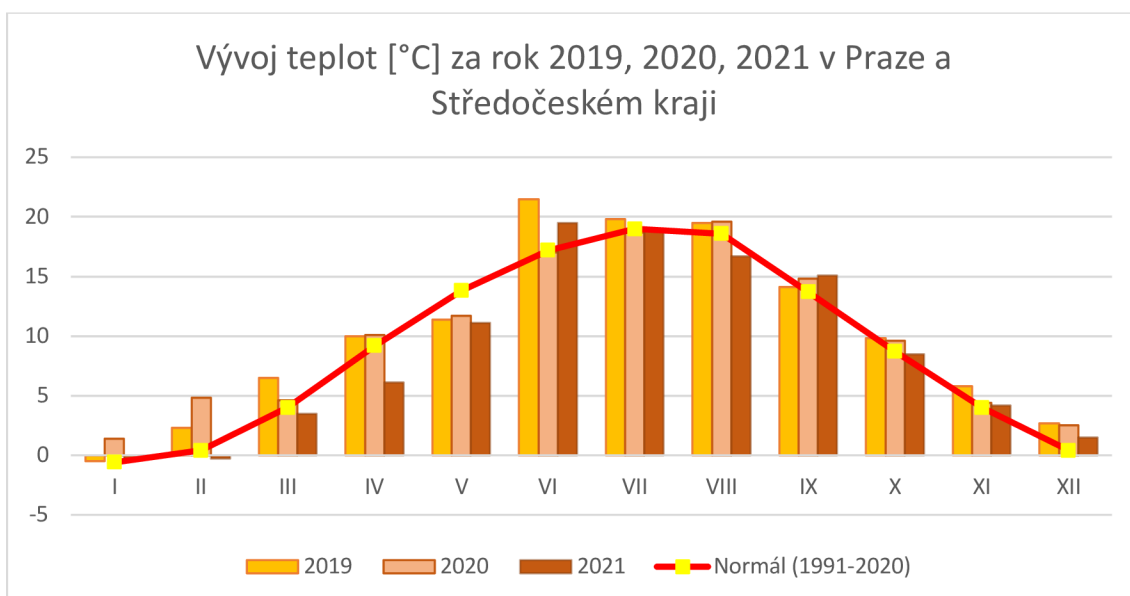
Graf 2: Měsíční úhrn srážek [mm] za rok 2019, 2020, 2021 v Praze a Středočeském kraji (zdroj: veřejně dostupná databáze ČHMÚ)

\*Poznámka: Uvedená data jsou vztažena k výzkumným plochám spadajícím do Středočeského kraje (Přílohy č. 1-5, 10-20)

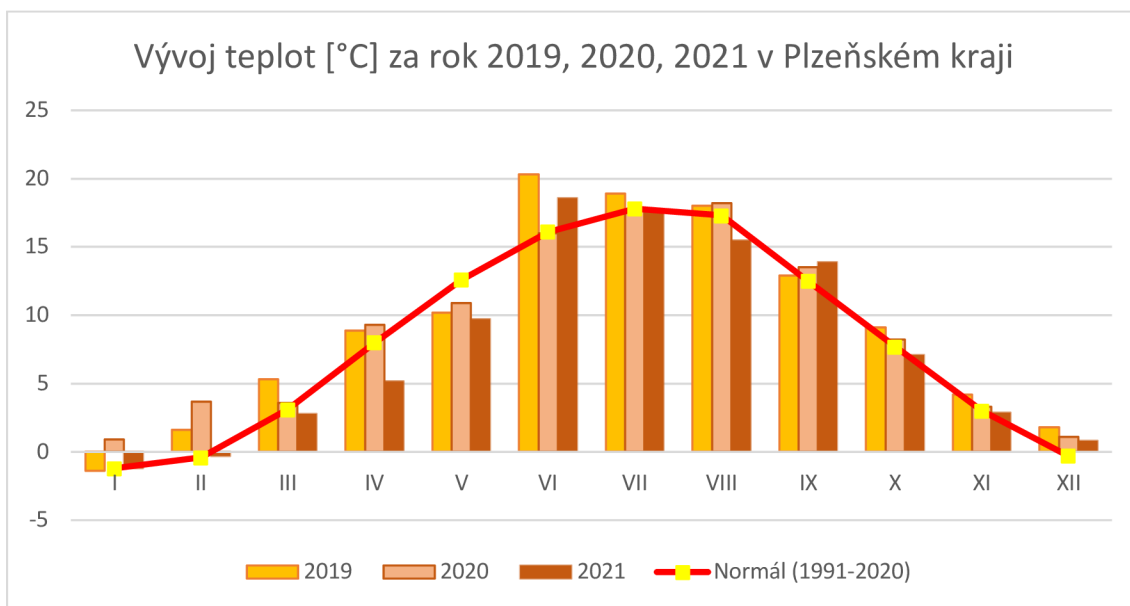


Graf 3: Měsíční úhrn srážek [mm] za rok 2019, 2020, 2021 v Plzeňském kraji (zdroj: veřejně dostupná databáze ČHMÚ)

\*Poznámka: Uvedená data jsou vztažena k výzkumným plochám „JAV“, „KOR“, „PRIV“, „TREM“ (Přílohy č. 6, 7, 8, 9)



Graf 4: Vývoj teplot [°C] za rok 2019, 2020, 2021 v Praze a Středočeském kraji (zdroj: veřejně dostupná databáze ČHMÚ)

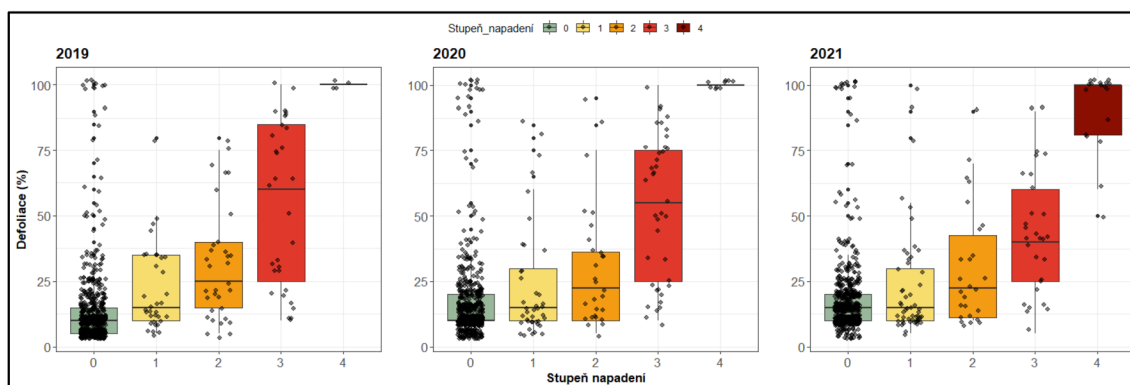


Graf 5: Vývoj teplot [°C] za rok 2019, 2020, 2021 v Plzeňském kraji (zdroj: veřejně dostupná databáze ČHMÚ)

#### 4.4 Vliv faktorů prostředí na stupeň napadení

##### Vztah mezi defoliací stromů a stupněm napadení olší

Z Grafu 6 je vidět, že u kategorie stupně napadení [0-3] se vyskytovaly stromy s úrovní defoliací 0 až 100 %. Zejména u zdravých stromů bez příznaků napadení byla diverzita v defoliace velmi vysoká, jelikož celkový počet těchto stromů byl 585 z celkových 711 hodnocených jedinců a vyskytovaly se zde i stromy přestálé nebo poškozené abiotickými vlivy. Během 3 let hodnocení je patrný nárůst jedinců v kategoriích napadení [3] a [4], kde je už patrná vyšší hodnota defoliace.



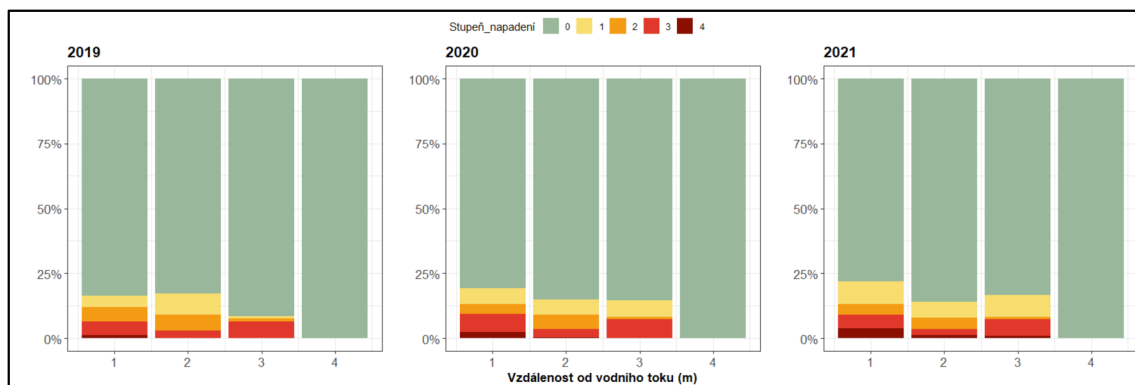
Graf 6: Zastoupení napadených jedinců olše lepkavé a porovnání v letech 2019, 2020, 2021 (box-and-whisker diagram)

Korelace mezi defoliací a stupněm napadení byla provedena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Korelace byla ve všech 3 letech statisticky významná. Již v prvním roce hodnocení (2019) analýza potvrdila středně silný pozitivní vztah mezi oběma proměnnými ( $df(678) = 0.506, p < 0.001$ ). Bylo potvrzeno, že stromy s vyšším stupněm napadení mají zároveň i vyšší míru defoliace, a to i přesto, že v tomto roce nebyl zaznamenán ještě tak vysoký počet odumírajících či již mrtvých jedinců s vysokou mírou defoliace. V letech 2020 a 2021 bylo hodnoceno již celkem 20 ploch a 711 jedinců (byla založena jedna další výzkumná plocha), a analýza ukázala téměř shodné výsledky pro oba dva roky ( $df(709) = 0.532, p < 0.001$ ). V těchto letech se zvýšil počet jedinců s vyšším stupněm napadení a zároveň vysokou defoliací.

### **Faktory prostředí ovlivňující napadení olší patogenem**

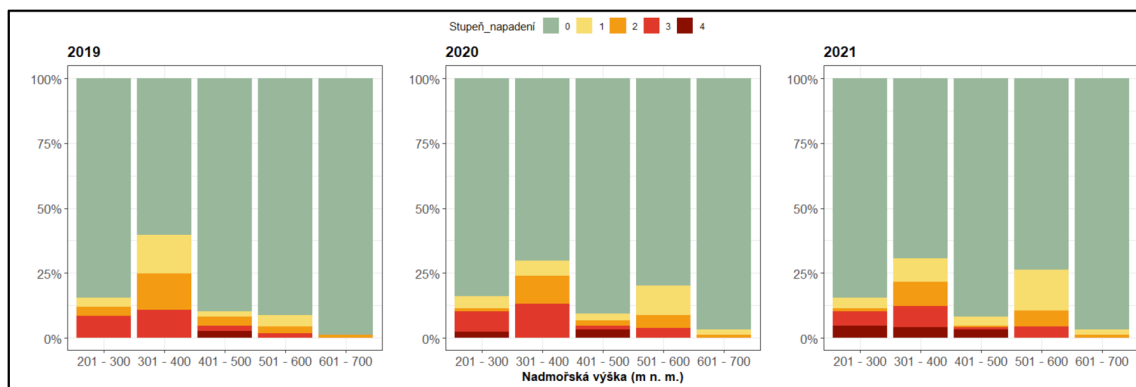
Nejvýznamnější faktor ovlivňující úroveň napadení olší byla vzdálenost kmene od vodního toku, kde byl zaznamenán nejvýraznější stoupající trend. Z Grafu 7 vyplývá, že během 3 let narostl počet symptomatických jedinců se stupněm napadení [1-4] ve vzdálenosti do 0,5 m od vodního toku (kategorie 1), zatímco stromy rostoucí v největší vzdálenosti (5-6 m) nebyly napadené vůbec.

Graf 8 ukazuje podíl napadených jedinců v jednotlivých výškových gradientech, kde byl patrný vyšší nárůst vyšších stupňů napadení v nadmořské výšce 200–500 m n. m. v průběhu 3 let.



Graf 7: Podíl jedinců s jednotlivými stupni napadení [0-4] podle kategorie vzdálenosti od vodního toku a porovnání v letech 2019, 2020, 2021 (kategorie vzdálenosti – viz kap. 3.9, Tab. 4)





Graf 8: Podíl jedinců s jednotlivými stupni napadení [0-4] v pěti gradientech nadmořské výšky a porovnání v letech 2019, 2020, 2021

### **Model ordinální logistické regrese pro zjištění vlivu faktorů na stupeň napadení**

Ke zjištění vlivu faktorů na stupeň napadení byla použita ordinální logistická regrese, pomocí které byla zpracována data z roku 2021. V rámci analýzy dat bylo porovnáno několik modelů pomocí metody ANOVA (Likelihood ratio tests) v programu R.

Výsledek porovnání modelů:

```
Likelihood ratio tests: anova( m0, m1, m2)

formula:
m0 Nap_2021 ~ 1
m2 Nap_2021 ~ nadm_vyska + prumer + sirka_toku + vzdalenost +
podil_olsi + pokryvnost_olsi
m1 Nap_2021 ~ nadm_vyska + prumer + sirka_toku + vzdalenost +
podil_olsi + pokryvnost_olsi + vyska

no.par    AIC  logLik LR.stat df Pr(>Chisq)
m0         4 1001.39 -496.70
m2        10  928.15 -454.07 85.2446  6 2.938e-16 ***
m1        11  929.43 -453.71  0.7202  1  0.3961
---
Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Nejvhodnějším modelem je model **m2**, který obsahuje následující proměnné: nadmořskou výšku, průměr kmene, šířku toku, vzdálenost od vodního toku, podíl olší a pokryvnost olší. Tento model má nejnižší hodnotu AIC a poměrně vysokou hodnotu likelihood ratio testu. Model **m1**, který obsahuje stejné proměnné jako model m2 a navíc proměnnou „výška“, není signifikantně lepší než model m2. Z výsledků našeho výzkumu také vyplývá, že výška stromu není pro šíření choroby významná a z pohledu dendrometrických veličin je důležitým faktorem průměr kmene. To naznačuje, že model

m2 je nejvhodnějším modelem pro vysvětlení variability závislé proměnné (stupeň napadení) s použitím těchto proměnných.

Vlastní model popisuje vztah mezi nezávislými proměnnými (nadmořská výška, průměr kmene, šířka toku, vzdálenost od vodního toku, podíl olší a pokryvnost olší) a závislou proměnnou (stupeň napadení). Podrobnější analýza koeficientů pro každou nezávislou proměnnou ukazuje, jaký vliv má každá z proměnných na pravděpodobnost výskytu daného stupně napadení. Hodnoty koeficientů popisují, jaký vliv má změna jednotlivé proměnné na pravděpodobnost změny kategorie stupně napadení o jednu úroveň.

```

formula:
napadeni ~ nadm_vyska + prumer + sirka_toku + vzdalenost +
podil_olsi + pokryvnost_olsi

link threshold nobs logLik AIC niter max.grad cond.H
logit flexible 711 -454.07 928.15 8(0) 2.15e-10 2.0e+07

Coefficients:
                Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
nadm_vyska      -0.001996  0.001275  -1.565 0.117516
prumer           0.025431  0.008356   3.044 0.002338 **
sirka_toku       0.090372  0.064538   1.400 0.161430
vzdalenost      -0.503741  0.147467  -3.416 0.000636 ***
podil_olsi       0.023241  0.009448   2.460 0.013894 *
pokryvnost_olsi  0.019459  0.006044   3.220 0.001283 **
---
Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Threshold coefficients:
      Estimate Std. Error z value
0|1    4.1338    0.8807    4.694
1|2    4.8372    0.8887    5.443
2|3    5.3542    0.8953    5.980
3|4    6.3933    0.9163    6.977

```

Z výsledků modelu je patrné, že vzdálenost od vodního toku má nejsilnější vliv na pravděpodobnost napadení ( $\beta=-0,503$ ,  $p=0,0006$ ). To znamená, že se zvyšující se vzdáleností klesá pravděpodobnost výskytu vyššího stupně napadení. Průměr kmene má také vliv na pravděpodobnost napadení ( $\beta=0,025$ ,  $p=0,002$ ), což znamená, že s větším průměrem stromu roste pravděpodobnost výskytu vyšších stupňů napadení. Podobně také pokryvnost olší ( $\beta=0,019$ ) a podíl olší ( $\beta=0,023$ ) mají pozitivní vliv na pravděpodobnost vyššího stupně napadení.

Nadmořská výška má negativní vliv na napadení, což znamená, že s rostoucí nadmořskou výškou klesá napadení porostu. V tomto případě však regresní koeficient

nebyl statisticky signifikantní ( $\beta=-0,001$ ,  $p=0,117$ ). Podobně i šířka toku ( $\beta=0,090$ ,  $p=0,16$ ) nemá signifikantní vliv na pravděpodobnost napadení. V tomto případě je však pozorován trend pozitivního vlivu, což znamená, že s rostoucí šířkou toku roste pravděpodobnost napadení.

Ve výstupu modelu se odhadované prahové koeficienty („Threshold coefficients“) zvyšují z 4,1338 pro přechod mezi kategoriemi stupně napadení [0] a [1] na 4,8372 pro přechod mezi kategoriemi [1] a [2], na 5,3542 pro přechod mezi kategoriemi [2] a [3] a na 6,3933 pro přechod mezi kategoriemi [3] a [4]. To naznačuje, že skrytá proměnná má větší vliv na pohyb z jedné kategorie do druhé, když se zvyšuje.

## 5. Diskuze

Patogen *Phytophthora alni* v Česku poškozuje břehové porosty, jeho invazi je nejvíce zatíženo povodí Vltavy (ČERNÝ et al. 2010), proto cílem výzkumu bylo zhodnotit zdravotní stav olšových porostů na vybraných tocích v rámci povodí Vltavy, vyhodnotit faktory prostředí, izolovat a identifikovat jednotlivé druhy rodu *Phytophthora*.

Hodnocení výskytu a šíření fytoftorového onemocnění olše lepkavé bylo založeno na vizuálním posouzení symptomů poškození v povodí Vltavy ve Středních Čechách. Z celkového počtu 20 ploch byly symptomy napadení nalezeny na 15 plochách. Genetickými analýzami získaných izolátů bylo zjištěno, že agresivní patogen *Phytophthora xalni* se vyskytuje ve 45 % zkoumaných olšových porostech (9 ploch). Pouze na jedné zkoumané lokalitě byl izolován druh *Phytophthora uniformis* spolu s *Phytophthora xalni*. Je pravděpodobné, že toto zjištění souvisí s mírou patogenity mezi druhy. Populace druhu *Phytophthora uniformis* se spíše soustřeďuje na drobnější toky ve středních a vyšších polohách a zmenšuje se v důsledku kompetice druhu *Phytophthora xalni* (IOOS et al. 2006; BRASIER et al. 2004). Vytlačit *Phytophthora uniformis* a dlouhodobě se udržet v teplejších oblastech *Phytophthora xalni* dovede nejspíše také díky vyšší produkci zoospor v teplejším vodním prostředí (REDONDO et al. 2015; CHANDELIER et al. 2006).

Patogen *Phytophthora xalni* je možné běžně izolovat ze vzorků podkorních pletiv, půdních vzorků (rhizosféra s jemnými kořeny) i z kontaminované vody (TRZEWIK et al. 2021; ČERNÝ et al. 2011; JUNG, BLASCHKE 2004). Největší úspěšnost izolace je u vzorků podkorních pletiv, kde patogen přežívá nejdéle (JUNG, BLASCHKE 2004). Během našeho výzkumu byl izolován druh *Phytophthora xalni* pouze ze vzorků kůry, nikoliv z půdních vzorků. To může být způsobeno tím, že vzorky byly odebrány v blízkosti olší, které vykazovaly viditelné symptomy napadení patogenem. Je možné předpokládat, že aktivita patogenu mohla být v půdním prostředí již nízká. Rod *Phytophthora* obvykle dokáže způsobit infekci v kořenovém systému stromu už mnoho let před smrtí stromu nebo před určením přítomnosti choroby. To znamená, že k odumírání kořenů a kořenových krčků dochází mnohem dříve než k odumírání korun stromů (VINCENT 1991; TSAO 1990).

Na poškození břehových a lesních porostů olší v ČR se nejspíš nepodílí jen *Phytophthora alni*, ale pravděpodobně i další druhy rodu *Phytophthora*, které byly u nás v ČR na olších identifikovány – např. *Phytophthora gonapodyides*, *Phytophthora plurivora* nebo *Phytophthora multivora* (ČERNÝ et al. 2010). Stejně jako *Phytophthora alni*, tak i např. *Phytophthora plurivora* může často napadat jemné kořenové vlášení a způsobovat hniloby kořenů, kořenových krčků, rakoviny na kmenech a tím přispět k chřadnutí olší. V průběhu našeho zkoumání, půdní vzorky odhalily přítomnost běžných druhů *Phytophthora plurivora*, *Phytophthora lacustris* a *Phytophthora gallica*, které se mohou rovněž podílet na odumírání olšových porostů (JUNG et al. 1996; BRASIER et al. 1993). V rámci našeho výzkumu byly tyto druhy izolovány z lokalit na řece Loděnice a Javornice s pomalu tekoucími toky, kde stanoviště odpovídá typu jasanovo-olšový lužní les. Význam těchto patogenů je v rámci celé České republiky v porostech ve srovnání

s druhem *Phytophthora alni* více méně zanedbatelný (ČERNÝ et al. 2015b). Během našeho experimentu byly na těchto tocích ve větší míře izolovány také další druhy skupiny Oomycetes (*Pythium* sp., *Phytopythium* sp.), které také preferují podmáčená stanoviště se směsí listnatých dřevin a mohou částečně přispívat k poškození kořenových systému (TKACZYK 2020; HO 2018). Nicméně jedná se o druhy velmi rozšířené i ve zdravých porostech, jak bylo zjištěno izolací z lokality „Přivětice“ (PRIV), kde se nachází zdravé stromy bez příznaků napadení.

V rámci experimentu nebyl zjištěn výskyt druhu *Phytophthora xmultiformis*. Absence tohoto druhu lze vysvětlit polohou českého říčního systému, zejména izolací od možných zdrojů inokula *Phytophthora xmultiformis* (např. od Německa na západě). Dalším důvodem absence *Phytophthora xmultiformis* v ČR může být omezený import olšového sadebního materiálu ze zemí západní Evropy (ŠTĚPÁNKOVÁ et al. 2013).

V rámci tříletého hodnocení olšových porostů/zkoumaných ploch bylo pozorováno zhoršení zdravotního stavu, které se projevilo vyšším průměrným stupněm napadení a vyšší průměrnou defoliací. Porovnání roku 2019 a 2021 ukázalo statisticky významný rozdíl v obou hodnocených parametrech. Z celkového počtu 711 hodnocených stromů bylo 82 % hodnoceno stupněm napadení 0, tedy zdravé stromy bez příznaků napadení, avšak symptomatické stromy se vyskytovaly na 15 z 20 lokalit. Tyto stromy vykazovaly zhoršující se stav, což vedlo k vyššímu stupni napadení. Nově napadené stromy však zaznamenány nebyly, nebo jen minimálně u již silně napadených porostů („PRIB“). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky monitoringu v rámci ČR (MZe 2021). Lze tedy konstatovat, že pravděpodobně dochází k určité stabilizaci porostů, jelikož nedochází k dalšímu hromadnému šíření a odumírání olší. Olše má velmi dobrou regenerační schopnost a rychle reaguje na změny prostředí. To bylo pozorováno ve srážkově příznivějším roce 2021 v podobě silné kmenové výmladnosti především na napadených jedincích. Nicméně patogen v napadených porostech přežívá a již napadené stromy postupně chřadnou, průběh však není tak dramatický jako před více než 10 lety, kdy probíhal první rozsáhlý monitoring napadení tímto patogenem v ČR (ČERNÝ et al. 2008).

Distribuce patogenu je vázána na celou řadu environmentálních faktorů (ROMPORTL et al. 2016; ČERNÝ et al. 2015a, 2015c). Vliv na distribuci patogenu může mít nadmořská výška. Je možné předpokládat, že olše v nižších nadmořských výškách obecně vykazují více příznaky napadení patogenem, jehož zoospory se šíří po proudu dolů, a proto bude infekční tlak a škody způsobené na níže položených úsecích a širších tocích vyšší (ČERNÝ et al. 2010; THORAIN et al. 2007; GIBBS et al. 1999). Další příčinou může být plocha povodí jako potenciální zdrojová oblast infekčního inokula. Také lze usuzovat, že v úsecích s malým prouděním vody (typické pro níže položené toky) budou škody významnější (ČERNÝ et al. 2016b). Zároveň jsou níže položené lokality teplejší, čímž lze předpokládat pozitivní vliv teplot na přežití patogenu (ČERNÝ, STRNADOVÁ 2012), i na rozsah poškození (AGUAYO et al. 2014). ČERNÝ et al. (2016d) udávají, že největší škody v břehových porostech v ČR jsou mezi 250–450 m n. m. V rámci našeho experimentu byly největší podíly příznakových stromů zjištěny v nadmořských výškách do cca 500 m n. m. Lokalita „PRIB“ (507 m n. m.),

kteřá vykazovala největší podíl příznakových stromů se nacházela v osídlených oblastech s vyšší mírou antropogenní zátěže, což se může projevit ve vyšší intenzitě onemocnění (ČERNÝ et al. 2016d). Z našich výsledků vyplývá, že s rostoucí nadmořskou výškou klesá napadení porostu, tento vliv však nebyl statisticky průkazný. Podobný trend uvádí i ČERNÝ et al. (2016d). Významnou roli může hrát i acidita vody. Nejvyšší produkce zoosporangíí patogenu byla zjištěna při pH 6,5 (SCHUMACHER et al. 2006). Nižší pH (5,5 a nižší), které je typické pro vodní toky zalesněných horských či pánevních poloh, může vytvářet pro patogen nevhodné prostředí (ČERNÝ et al. 2016d).

Mírný pozitivní vliv na podíl a stupeň napadení olší lze nalézt ve vztahu k přítomnosti a šířce vodního toku. Z našich výsledků vyplývá, že více napadeny byly olšové porosty nacházející se v blízkosti širšího vodního toku, ale tento vztah nebyl statisticky významný. Také pozice kořenových krčků vůči hladině vody se zdá být velmi zásadní v poškození porostů olší. Většina napadených olší v břehových porostech se nachází v blízkosti vodních toků do vzdálenosti 1 m od břehu (THORAIN et al. 2007; GIBBS et al. 1999). To může znamenat, že drtivá většina výsadeb olší je potencionálně vystavená napadení patogenem šířícího se spontánně přirozenou cestou vodními toky (GIBBS et al. 1999). V rámci našeho experimentu byla zjištěna podobná situace – silně napadené, či již mrtvé stromy (stupeň napadení 3, 4) se vyskytovaly v těsné blízkosti (0–2 m) nebo zcela výjimečně do 4 m od vodního toku. Na stupeň napadení má statisticky signifikantní vliv vzdálenost kmene od vodního toku, to znamená, že s vyšší vzdáleností klesá pravděpodobnost napadení *Phytophthora xalni*. Z toho lze tedy vyvodit, že druh *Phytophthora alni* je typický a nejvýznamnější patogen břehových porostů (ČERNÝ et al. 2010).

Další roli může hrát i věk porostů. Pro výsadby olší v oblastech, kde dominuje tento způsob šíření patogenu, převažuje nízký věk infikovaných porostů. Například v Bavorsku jsou nejčastěji infikovány porosty do 20 let (JUNG, BLASCHKE 2004). V ČR tato skutečnost však potvrzena nebyla. V rámci našeho výzkumu, kdy byly hodnoceny průměry kmene stromů, lze odhadnout i věk hodnocených olší. U nejvíce napadených stromů se průměr kmene pohyboval okolo 30–50 cm (věk cca 30–60 let) a nejnižší stupeň napadení byl zaznamenán u olší s průměrem 20–40 cm. V této řadě byl prokázán pozitivní vliv věku olší, resp. průměru kmene na stupeň napadení. Také pokryvnost a podíl olší mají pozitivní vliv na rozsah napadení. Všechny tři faktory (průměr kmene – věk stromů, podíl a pokryvnost olší) hrají zásadní roli při napadení patogenem, a to se shoduje s výsledky ČERNÉHO et al. (2016d).

Vlivem změny klimatu lze předpokládat možný nárůst škod na břehových porostech. Patogen je schopen způsobit vyšší škody v teplejších obdobích, a proto oteplování velmi pravděpodobně vede k rozvoji choroby (ČERNÝ, STRNADOVÁ 2012). V důsledku změny klimatu jsou pozorovány v průběhu roku vyšší teploty a nižší úhrny srážek. Dle meteorologických dat ČHMÚ lze říci, že na námi zkoumaném území (Střední Čechy, Plzeňsko) byly během roků 2019 a 2020 zaznamenány vyšší teploty a nižší úhrny srážek, jak bylo vzhledem k oteplování očekáváno. Následující rok 2021 byl srážkově nadprůměrný, a to se pozitivně projeví v rámci hodnocení zdravotního stavu olší.

Význam druhu *Phytophthora alni* v břehových porostech netkví pouze v přímém napadení olší, ale také v tom, že svým působením otvírá cestu k napadení hmyzem či infekci dalšími houbovými patogeny. Na lokalitách postižených tímto patogenem bylo zaznamenáno lokální přemnožení pilořítek rodu *Xiphodria* (ŠRŮTKA et al. 2007). V souvislosti s oslabením olší onemocněním způsobené patogenem *Phytophthora alni* je třeba zmínit i parazitické dřevní houby – *Inonotus radiatus* (Sowerby) P. Karst., *Schizophyllum commune* Fr., *Fomitopsis pinicola* (Sowerby) P. Karst. a další. V důsledku infekce rezavcem lesknavým jsou časté zlomy kmenů v pařezových částech (ČERNÝ 1989), což odpovídá i pozorování našeho výzkumu, kdy byl zaznamenán výskyt plodnic tohoto patogenu na napadených lokalitách u starších stromů a pařezů.

## 6. Závěr

Výsledkem předložené práce bylo zhodnocení zdravotního stavu olšových porostů na dvaceti lokalitách ve Středních Čechách v povodí Vltavy se zaměřením na přítomnost druhů rodu *Phytophthora*, zejména na druh *Phytophthora xalni*, který způsobuje v posledních letech významné škody v porostech olší.

V letech 2019, 2020, 2021 proběhl průzkum výskytu fytoftorového onemocnění olší v břehových a lesních porostech ČR. Bylo zjištěno, že choroba, způsobená nejčastěji druhem *Phytophthora xalni*, se nachází ve 45 % zkoumaných porostech na území Středních Čech a severního Plzeňska. Přítomnost a význam choroby jsou vázány na vzdálenost kmene od vodního toku, průměr kmene, podíl a pokryvnost olší. Dále byl pozorován trend ve výskytu druhu *Phytophthora alni* v souvislosti s nadmořskou výškou, ale vliv nebyl statisticky průkazný. Nejvyšší podíl napadení byl zjištěn v nižších nadmořských výškách u stromů s větším průměrem (= vyšší věk), a v těsné blízkosti vodního toku.

V současné době počet nových invazních druhů rodu *Phytophthora* ve světě exponenciálně roste. Význam klimatických faktorů na šíření těchto patogenů je zásadní (ERWIN, RIBEIRO 1996). Současné oteplování klimatu podporuje šíření a osídlení nových areálů invazivními patogeny. Absence koevolučních mechanismů mezi hostitelskými druhy dřevin a nově zavedenými patogeny rodu *Phytophthora* představuje vážnou hrozbu pro původní hostitelské druhy dřevin na většině kontinentů. Velká hrozba může nastat v případě, kdy se v lesních školkách společně setkají různé druhy rodu *Phytophthora* a to s sebou nese riziko náhodného vytvoření mezidruhových hybridů s neznámou mírou patogenity a rozsahem hostitelských druhů, jak tomu bylo například v případě druhu *Phytophthora xalni* (BRASIER et al. 2004). Klíčem k omezení šíření patogenu jsou vhodné některé opatření. Důležitá je produkce a výsadba zdravého kontrolovaného materiálu z ověřených zdrojů. V lesních školkách je třeba efektivně změnit pěstební postupy, ověřovat zdroj zavlažovací vody, používat fungicidy a tím docílit k produkci zdravých olšových sazenic. V lesních porostech by měly probírky a těžební práce probíhat nejdříve ve zdravých a poté v napadených porostech nebo ideálně by mělo být hospodaření v napadených a zdravých porostech zcela odděleno. Těžba v porostech postižených patogenem by měla probíhat zejména v zimním období, kdy je patogen nejméně aktivní. Vytěžený materiál je třeba skládkovat mimo okolí vodních zdrojů, vodotečí a drenáží a mimo zdravé porosty ve vzdálenosti minimálně 300–500 m. V případě, že patogen v porostech zdomácní, je jeho eliminace prakticky nemožná. Pokud jsou porosty napadeny v menším rozsahu, lze uvažovat o jejich úplném smýcení a je vhodné dlouhodobě udržovat co nejnižší podíl olše.



## 7. Seznam použitých zdrojů

1. ADAMS, G. C., CATAL, M., TRUMMER, L. Distribution and Severity of Alder *Phytophthora* in Alaska. In: FRANKEL, S. J., KLIEJUNAS, J. T., PALMIERI, K. M., eds. *Proceedings of the Sudden Oak Death Fourth Science Symposium. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-229*. Albany, CA, USA: Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station, 2010, s. 29–49.
2. ADL, S. M., SIMPSON, A. G. B., LANE, CH. E., LUKEŠ, J., BASS, D., BROWSER, S. S., BROWN, M. W., BURKI, F., DUNTHORN, M., HAMPL, V., HEISS, A., HOPPENRATH, M., LARA, E., LE GALL, L., LYNN, D. H., MCMANUS, H., MITCHELL, E. A. D., MOZLEY-STANRIDGE, S. E., PARFREY, L. W., PAWLOWSKI, J., RUECKERT, S., SHADWICK, L., SCHOCH, C. L., SMIRNOV, A., SPIEGEL, F. The revised classification of eukaryotes. *Journal of eukaryotic mikrobiology*. 2012, **59**(5), s. 429–514.
3. AGUAYO, J., ADAMS, G. C., HALKETT, F., CATAL, M., HUSSON, C., NAGY, Z. Á., HANSEN, E. M., MARÇAIS, B., FREY, P. Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. *Phytopathology*. 2013, **103**(2), s. 190–199.
4. AGUAYO, J., ELEGBEDE, F., HUSSON, C., SAINTONGE, F. X., MARÇAIS, B. Modeling climate impact on an emerging disease, the *Phytophthora alni* – induced alder decline. *Global Change Biology*. 2014, **20**(10), s. 3209–3221.
5. AGUAYO, J., HALKETT, F., HUSSON, C., NAGY, Z. Á., SZIGETHY, A., BAKONYI, J., PASCAL, F., MARÇAIS, B. Genetic diversity and origins of the homoploid-type hybrid *Phytophthora* × *alni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82**(24), s. 7142–7153.
6. BAKONYI, J., NAGY, Z. A., ÉRSEK, T. PCR-based DNA markers for identifying hybrids within *Phytophthora alni*. *Journal of Phytopathology*. 2006, **154**(3), s. 168–177.
7. BAKONYI, J., NAGY, Z. Á., ERSEK, T. A novel hybrid with the nuclear background of *Phytophthora alni* subsp. *alni* exhibits a mitochondrial DNA profile characteristic of *P. alni* subsp. *uniformis*. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica*. 2007, **42**, s. 1–7.
8. BARTLETT, J., STIRLING, D. *PCR protocols*. Humana Press, 2003. ISBN 9781592593842.
9. BARTOŠ, M. Základy farmakogenomiky. *Farmakogenomika*[online]. 2007 [cit. 2023-03-25].  
Dostupné z: <http://www.farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=9>  
[2](#)
10. BERGOT, M., CLOPPET, E., PÉRARNAUD, V., DÉQUÉ, M., MARÇAIS, B., DESPREZ-LOUSTAU, M.-L. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology*. 2004, **10**(9), s. 1539–1552.

11. BJELKE, U., BOBERG, J., OLIVA, J., TATTERSDILL, K., MCKIE, B. G. Dieback of riparian alder caused by the *Phytophthora alni* complex: projected consequences for stream ecosystems. *Freshwater Biology*. 2016, **61**(5), s. 565–579.
12. BRASIER, C. M. *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor in European oak declines. 1993. In: LUISI, N., P. LERARIO a A. VANNINI, eds. *Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Bari, Italy: Universita degli Studi, Dipt. Di Patologia Vegetale, 1992, s. 49–58.
13. BRASIER, C. M., ROSE, J., GIBBS, J. N. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology*. 1995, **44**(6), s. 999–1007.
14. BRASIER, C. M., COOKE, D. E. L., DUNCAN, J. M. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, **96**(10), s. 5878–5883.
15. BRASIER, C. M., KIRK, S. A. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophthoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology*. 2001, **50**(2), s. 218–229.
16. BRASIER, C. M., KIRK, S. A., DELCAN, J., COOKE, D. E. L., JUNG, T., MAN IN'T VELD, W. A. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research*. 2004, **108**(10), s. 1172–1184.
17. BRAUNS, M., GARCIA, X. F., PUSCH, M. T., WALZ, N. Eulittoral macroinvertebrate communities of lowland lakes: discrimination among trophic states. *Freshwater Biology*. 2007, **52**(6), s. 1022–1032.
18. BRAZEE, N. J., WICK, R. L., HULVEY, J. P. *Phytophthora* species recovered from the Connecticut River Valley in Massachusetts, USA. *Mycologia*. 2016, **108**(1), s. 6–19.
19. CAHILL, D. M., HARDHAM, A. R. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*. 1994, **84**, s. 193–200.
20. CECH, T. L. *Phytophthora*-Krankheit der Erle in Österreich. *Forstschutz Aktuell*. 1997, **19**(20), s. 14–16.
21. CLAESSENS, H. The alder populations of Europe. *Forestry Commission Bulletin*. 2003, **126**, s. 5–14.
22. COAKLEY, S. M., SCHERM, H. Plant disease in a changing global environment. *Aspects of Applied Biology*. 1996, **45**, s. 227–238.
23. ČERNÝ, A. *Parazitické dřevokazné houby*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. ISBN 80-209-0090-X.
24. ČERNÝ, K., GREGOROVÁ, B., HOLUB, V., STRNADOVÁ, V. First records of "alder – *Phytophthora*" in the Czech Republic. *Czech Mycology*. 2003, **55**(3), s. 291–296.

25. ČERNÝ, K., GREGOROVÁ, B., STRNADOVÁ, V., HOLUB, V., TOMŠOVSKÝ, M., ČERVENKA, M. *Phytophthora alni* causing decline of black and grey alders in the Czech Republic. *Plant Pathology*. 2008, **57**(2), s. 370–370.
26. ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., GREGOROVÁ, B., MRÁZKOVÁ, M. *Onemocnění olší způsobené druhem Phytophthora alni Brasier & S.A. Kirk. Identifikace choroby, odběr vzorků. Certifikovaná metodika*. Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i., 2010.
27. ČERNÝ, K., TOMŠOVSKÝ, M., MRÁZKOVÁ, M., STRNADOVÁ, V. The Present State of Knowledge of *Phytophthora* spp. Diversity in Forest and Ornamental Woody Plants in the Czech Republic. *New Zealand Journal of Forestry*. 2011, **41**, s. 75–82.
28. ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V. Winter survival of *Phytophthora alni* subsp. *alni* in aerial tissues of black alder. *Journal of Forest Science*. 2012, **58**(7), s. 328–336.
29. ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., PEŠKOVÁ, V. Pliseň olšová *Phytophthora alni* Brasier & S.A Kirk. *Lesnická práce*. 2013a, **92**(příloha), s. 1–6.
30. ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., ROMPORTL, D., eds. Landscape typology of Vltava River Basin and impact of *Phytophthora alni* subsp. *alni* invasion. In: LEBEDA, A., BURDON, J. J. *1st. International Conference Wild Plant Pathosystems. Conference Proceedings*. Olomouc: UPOL, 2013b.
31. ČERNÝ, K., FILIPOVÁ, N., STRNADOVÁ, V. Climate change can affect the impact of *Phytophthora alni* subsp. *alni*. In: SUTTON, W., REESER, P. W., HANSEN, E. M., tech. coords. *Proceedings of the 7th meeting of the International Union of Forest Research Organization (IUFRO) Working Party S07.02.09: Phytophthoras in forests and natural ecosystems*. 2015a, s. 115 - 117.
32. ČERNÝ, K., PEŠKOVÁ, V., MODLINGER, R. Rozšíření fytoftorového onemocnění olší v lesních porostech ČR – předběžné výsledky. *Zprávy Lesnického Výzkumu*. 2015b, **60**(4), s. 201 - 211.
33. ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., ROMPORTL, D., MRÁZKOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L., HRABĚTOVÁ, M., MODLINGER, R., PEŠKOVÁ, V. Factors affecting *Phytophthora alni* distribution in State Forests of the Czech Republic. In: SUTTON, W., REESER, P. W., HANSEN, E. M., tech. coords. *Proceedings of the 7th meeting of the International Union of Forest Research Organization (IUFRO) Working Party S07.02.09: Phytophthoras in forests and natural ecosystems*. 2015c, s. 121–123.
34. ČERNÝ, K., ROMPORTL, D., STRNADOVÁ, V., FEDUSIV, L., GABRIELOVÁ, Š., HAŇÁČKOVÁ, Z., HAVRDOVÁ, L., HRABĚTOVÁ, M., MRÁZKOVÁ, M., NOVOTNÁ, K., PEŠKOVÁ, V., ŠTOCHLOVÁ, P., ZAHRADNÍK, D. *Hodnocení a predikce současných ekonomických škod způsobených plísní olšovou v břehových porostech povodí Vltavy podle Vyhlášky Ministerstva financí 441/2013 Sb. Specializovaná mapa s odborným obsahem*. Praha, Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, 2016a, s. 1 - 16.

35. ČERNÝ, K., ROMPORTL, D., STRNADOVÁ, V., FEDUSIV, L., GABRIELOVÁ, Š., HAŇÁČKOVÁ, Z., HAVRDOVÁ, L., HRABĚTOVÁ, M., MRÁZKOVÁ, M., NOVOTNÁ, K., PEŠKOVÁ, V., ŠTOCHLOVÁ, P., ZAHRADNÍK, D. *Predikce potenciálních dlouhodobých ekonomických škod způsobených plísní olšovou v břehových porostech povodí Vltavy podle Vyhlášky Ministerstva financí č. 441/2013 Sb. Specializovaná mapa s odborným obsahem.* Praha, Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, 2016b. ISBN 978- 80- 87674- 16-1.
36. ČERNÝ, K., ROMPORTL, D., STRNADOVÁ, V., ZAHRADNÍK, D. *Současné rozšíření fytoftorové hniloby olší v břehových porostech povodí Vltavy. Specializovaná mapa s odborným obsahem.* Praha, Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, 2016c. ISBN 978- 80- 87674- 17- 8.
37. ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., FEDUSIV, L., GABRIELOVÁ, Š., HAŇÁČKOVÁ, Z., HAVRDOVÁ, L., HRABĚTOVÁ, M., MRÁZKOVÁ, M., NOVOTNÁ, K., PEŠKOVÁ, V., ŠTOCHLOVÁ, P., ROMPORTL, D. Ekonomické škody způsobené plísní olšovou v břehových porostech vodních toků a nádrží s dominantní olší v modelové oblasti povodí Vltavy. Předběžné výsledky. *Vodní hospodářství.* 2016d, **66**(8), s. 1 - 5.
38. ČERNÝ, K., ROMPORTL, D., STRNADOVÁ, V., ZAHRADNÍK, D., VAIT, J., BÁRTA, V. Současné rozšíření fytoftorové hniloby olší v břehových porostech vodních toků povodí Vltavy a faktory ovlivňující rozsah škod. *Vodní hospodářství.* 2017a, **67**(4), s. 20–25.
39. ČERNÝ, K., ZAHRADNÍK, D., CHUMANOVÁ, E., HAVRDOVÁ, L., STRNADOVÁ, V., ROMPORTL, D. Fytoftorová hniloba olše – predikce rozšíření a rozsahu choroby v lesních porostech olší v ČR. *Rostlinolékař.* 2017b, **2017**(4), s. 20–24.
40. ČERNÝ, K., HAVRDOVÁ, L., NĚMEC, P., HRABĚTOVÁ, M., MRÁZKOVÁ, M., ZAHRADNÍK, D., GRÍGEL, J., ŠETINOVÁ, D. *Integrovaná ochrana sazenic v lesních školkách před patogeny z r. Phytophthora. Certifikovaná metodika 68354/2020-MZE-16222/M216.* Průhonice: Výzkumný ústav pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i., 2020. ISBN 978-80-87674-37-6.
41. DAVISON, E. M., STUKELY, M. J. C., CRANE, C. E., TAY, F. C. S. Invasion of phloem and xylem of woody stems and roots of *Eucalyptus marginata* and *Pinus radiata* by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology.* 1994, **84**, s. 335–340.
42. DE MERLIER, D., CHANDELIER, A., DEBRUXELLES, N., NOLDUS, M., LAURENT, F., DUFAYS, E., CLAESSENS, H., CAVELIER, M. Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primers for their specific detection. *Journal of Phytopathology.* 2005, **153**(2), s. 99–107.
43. DEACON, J. W., DONALDSON, S. P. Molecular recognition in the homing responses of zoosporic fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. *Mycological Research.* 1993, **97**(10), s. 1153–1171.

44. DELCAN, J., BRASIER, C. M. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthora*. *Forest Pathology*. 2001, **31**(2), s. 65–83.
45. DIMITROVSKÝ, K. *Zemědělské, lesnické a hydrické rekultivace území ovlivněných báňskou činností*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000. ISBN 80-7271-065-6.
46. DRENTH, A., SENDALL, B. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. *CRC for Tropical Plant Protection*. Brisbane, 2001, (Vol. 1).
47. EICHHORN, J., ROSKAMS, P., POTOČÍK, N., TIMMERMANN, V., FERRETTI, M., MUES, V., SZEPESI, A., DURRANT, D., SELETKOVIČ, I., SCHRÖCK, H.-W., NEVALAINEN, S., BUSSOTTI, F., GARCIA, P., WULFF, S. Part IV: Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. In: UNECE ICP FORESTS PROGRAMME COORDINATING CENTRE, ed. *Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests..* Thünen Institute of Forest Ecosystems, 2016, s. 1–49 + Annex. ISBN 978-3-86576-162-0.
48. ELLENBERG, H. H. *Vegetation Ecology of Central Europe*. Čtvrté vydání. Cambridge University Press, 2009. ISBN 9780521115124.
49. ERWIN, D. C., RIBEIRO, O. K. *Phytophthora* diseases worldwide. *American Phytopathological Society (APS Press)*, 1996. ISBN 9780890542125.
50. FLORY, E. A., MILNER, A. M. Influence of riparian vegetation on invertebrate assemblages in a recently formed stream in Glacier Bay National Park, Alaska. *Journal of the North American Benthological Society*. 1999, **18**(2), s. 261–273.
51. GIBBS, J. N. *Phytophthora* root disease of alder in Britain. *Bulletin OEPP*. 1995, **25**(4), s. 661–664.
52. GIBBS, J. N., LIPSCOMBE, M. A., PEACE, A. J. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *European Journal of Forest Pathology*. 1999, **29**(1), s. 39–50.
53. GIBBS, J. N., VAN DIJK, C., WEBBER, J., eds. *Phytophthora* disease of alder in Europe. *Forestry Commission Bulletin*. Edinburgh: Forestry Commission, 2003, **126**.
54. GIESBRECHT, M. B., HANSEN, E. M., MITIN, P. Histology of *Phytophthora ramorum* in *Notholithocarpus densiflorus* bark tissues. *New Zealand Journal of Forestry Science*. 2011, **41**, s. 89–100.
55. GREGOROVÁ, B., ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., ČERVENKA, M., HOLUB, V. Chřadnutí olší v ČR. *Lesnická práce*. 2003, **82**(8), s. 265–266.
56. HANSEN, E., DELATOUR, C. *Phytophthora* species in oak forests of northeast France. *Annales des Sciences Forestière*. 1999, **56**(7), s. 539–547.
57. HAQUE, M. M. U., HIDALGO, E., MARTÍN-GARCÍA, J., DE-LUCAS, A. I., DIEZ, J. J. Morphological, physiological and molecular characterization of *Phytophthora alni* isolates from Western Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 2015, **142**(4), s. 731–745.

58. HARDHAM, A. R. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology*. 2001, **30**(2), s. 91–98.
59. HARTMANN, G. Root collar rot of alder (*Alnus glutinosa*) - a previously unknown fungal disease caused by *Phytophthora cambivora*. *Forst und Holz*. 1995, **50**(18), s. 555–557.
60. Historická data – meteorologie a klimatologie. *Český hydrometeorologický ústav* [online]. Ministerstvo životního prostředí České republiky [cit.2023- 03- 26]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/zakladni-informace>
61. HON, H HO. The Taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 2018, **6**(1), s. 40–45.
62. CHANDELIER, A., ABRAS, S., LAURENT, F., DEBRUXELLES, N., CAVELIER, M. Effect of temperature and bacteria on sporulation of *Phytophthora alni* in river water. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 2006, **71**, s. 873–880.
63. CHRISTENSEN, R. H. B. Ordinal – Regression Models for Ordinal Data. R package version 2022. s. 11–16. 2022. <https://CRAN.R-project.org/package=ordinal>.
64. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate change 2007: the physical science basis. In: *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
65. IOOS, R., HUSSON, C., ANDRIEUX, A., FREY, P. SCAR–based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 2005, **112**(4), s. 323–335.
66. IOOS, R., ANDRIEUX, A., MARÇAIS, B., FREY, P. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology*. 2006, **43**(7), s. 511–529.
67. IVERSEN, T. Ingestion and growth in *Sericostoma personatum* (Trichoptera) in relation to the nitrogen content of ingested leaves. *Oikos*. 1974, **25**(3), s. 278–282.
68. JANČAŘÍK, V. Usychání olši. *Lesnická práce*. 1993, **72**, s. 14–16.
69. JEGER, M. J., PAUTASSO, M. Plant disease and global change – The importance of long-term data set. *New Phytologist*. 2008, **177**(1), s. 8–11.
70. JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia*. 12. vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2021. ISBN 978–80–7182–345–2.
71. JONES, S., VAN LOON, B. *Genetika*. Praha: Portál, 2003. ISBN 80- 7178- 708- 6.
72. JUNG, T., BLASCHKE, H., NEUMANN, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*. 1996, **26**(5), s. 253–272.
73. JUNG, T., COOKE, D. E. L., BLASCHKE, H., DUNCAN, J. M., OSSWALD, W. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research*. 1999, **103**(7), s. 785–798.

74. JUNG, T., BLASCHKE, H., OSSWALD, W. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology*. 2000a, **49**, s. 706–718.
75. JUNG, T., OßWALD, W., BLASCHKE, H. Involvement of *Phytophthora* species in Central and Western European oak decline and the influence of site factors and nitrogen input on the disease. In: HANSEN, E. M., SUTTON, W., eds. *Proceedings of the First International Meeting on Phytophthora's in Forest and Wildland Ecosystems*. USA, Oregon: Oregon State University, 2000b, s. 28 - 33.
76. JUNG, T., HANSEN, E. M., WINTON, L., OßWALD, W., DELATOUR, C. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research*. 2002, **106**(4), s. 397–411.
77. JUNG, T., BLASCHKE, M. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology*. 2004, **53**, s. 197–208.
78. JUNG, T., BURGESS, T.I. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*. 2009, **22**(1), s. 95–110.
79. KANOUN-BOULÉ, M., VASCONCELOS, T., GASPAS, J., VIEIRA, S., DIAS – FERREIRA, C., HUSSON, C. *Phytophthora* × *alni* and *Phytophthora lacustris* associated with common alder decline in Central Portugal. *Forest Pathology*. 2016, **46**(2), s. 174–176.
80. KONG, P., LEA-COX, J. D., HONG, C. X. Effect of electrical conductivity on survival of *Phytophthora alni*, *P. kernoviae* and *P. ramorum* in a simulated aquatic environment. *Plant Pathology*. 2012, **61**(6), s. 1179–1186.
81. KOVÁCS, J., LAKATOS, F., SZABÓ, I. Occurrence and diversity of soilborne *Phytophthoras* in a declining black walnut stand in Hungary. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*. 2014, **9**(1), s. 57–69.
82. KOVÁCS, J., LAKATOS, F., SZABÓ, I. Post-epidemic Situation of a Previously *Phytophthora alni*-infected Common Alder Stand. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*. 2015, **11**(1), s. 27–38.
83. KOVANDA, M. *Alnus* Mill. - olše. In: HEJNÝ, S. a B. SLAVÍK, ed. *Květena České republiky 2*. Praha: Academia, 1990, s. 46–50. ISBN 80-200-1089-0.
84. KOZŁOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Three Physiology Monograph No. 1*. Oxford University Press, 1997, **17**(7), p. 1-29.
85. KUPKA, I., DIMITROVSKÝ, K. Výsledky testování vybraných dřevin pro lesnické rekultivace na Sokolovsku: Review. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2011, **56**(special), s. 52–56. ISSN 0322-9688.
86. LA PORTA, N., CAPRETTI, P., THOMSEN, I. M., KASANEN, R., HIETALA, A. M., VON WEISSENBERG, K. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2008, **30**(2) s. 177–195.
87. LONSDALE, D. *Phytophthora* disease of alder: sources of inoculum, infection and host colonisation. *Forestry Commission Bulletin*. 2003, **126**, s. 65–72.

88. MALANSON, G. P. Riparian Landscapes. Cambridge: *Cambridge University Press*, 1993. ISBN 9780511565434.
89. MARÇAIS, B., HUSSON, C. *Phytophthora* on *Alnus* spp. (alders). *JKI Data Sheets – Plant Diseases and Diagnosis*. Quedlinburg: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen, 2014.
90. MATHERON, M. E., MIRCETICH, S. M. Seasonal variation in susceptibility of *Juglans hindisii* and Paradox rootstocks of English walnut trees to *Phytophthora citricola*. *Phytopathology*. 1985, **75**(9), s. 970–972.
91. MCVEAN, D. N. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Journal of Ecology*. 1953, **41**(2), s. 447–466.
92. MCVEAN, D. N. Ecology of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn: IV. Root System. *Journal of Ecology*. 1956, **44**(1), s. 219–225.
93. MEZERA, A. *Středoevropské nížinné luhy II*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1958.
94. MIRCETICH, S. M., ZENTMYER, G. A. Production of oospores and chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* in roots and soil. *Phytopathology*. 1966, **56**(9), s. 1076–1078.
95. MRÁZKOVÁ, M., ČERNÝ, K., TOMŠOVSKÝ, M., HOLUB, V., STRNADOVÁ, V., ZLATOHLÁVEK, A., GABRIELOVÁ, S. First report of root rot of pedunculate oak and other forest tree species caused by *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic. *Plant Disease*. 2010, **94**(2), s. 272–272.
96. MRÁZKOVÁ, M., ČERNÝ, K., TOMŠOVSKÝ, M., STRNADOVÁ, V. *Phytophthora plurivora* T. Jung & T. I. Burgess and other *Phytophthora* species causing important diseases of ericaceous plants in the Czech Republic. *Plant Protection Science*. 2011, **47**(1), s. 13–19.
97. MRÁZKOVÁ, M., ČERNÝ, K., TOMŠOVSKÝ, M., STRNADOVÁ, V., GREGOROVÁ, B., HOLUB, V., PÁNEK, M., HAVRDOVÁ, L., HEJNÁ, M. Occurrence of *Phytophthora multivora* and *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*. 2013, **49**(4), s. 155–164.
98. MUNDA, A., ŽERJAV, M., JAKŠA, J. Occurrence and characterisation of alder *Phytophthora*, *Phytophthora alni*, in Slovenia. 2006. In: *Proceeding of III IUFRO Internation Conference Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Freising, Germany, 2004.
99. NAGY, Z., BÁKONYI, J., ÉRSEK, T. Standard and Swedish variant types of the hybrid alder *Phytophthora* attacking alder in Hungary. *Pest Management Science*. 2003, **59**, s. 484–492.
100. NECHWATAL, J., BAKONYI, J., CACCIOLA, S. O., COOKE, D. E. L., JUNG, T., NAGY, Z. A., VANNINI, A., VETTRAINO, A.M., BRASIER, C.M. The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon Salixsoil and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. *Plant Pathology*. 2013, **62**(2), s. 355–369.
101. NOWAK, K.J., TRZEWIK, A., TUŁACZ, D., ORLIKOWSKA, T., ORLIKOWSKI, L.B. Characterization of Polish *Phytophthora lacustris* Isolates



- Obtained from Water Environments. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2015, **24**(2), s. 619–630.
102. OH, E., HANSEN, E. A. Histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant port-orford-cedar by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology*. 2007, **97**(6), s. 684–693.
  103. OBWALD, W., FLEISCHMANN, F., RIGLING, D., COELHO, A. C., CRAVADOR, A., DIEZ, J., DALIO, R. J., JUNG, M. H., PFANZ, H., ROBIN, C., SIPOS, G., SOLLA, A., CECH, T., CHAMBERY, A., DIAMANDIS, S., HANSEN, E., JUNG, T., ORLIKOWSKI, L. B., PARKE, J., PROSPERO, S., WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant – *Phytophthora* interactions. *Forest Pathology*. 2003, **44**(3), s. 169–190.
  104. PARKE, J. L., OH, E., VOELKER, S., HANSEN, E. M., BUCKLES, G., LACHENBRUCH, B. *Phytophthora ramorum* colonizes tanoak xylem and is associated with reduced stem water transport. *Phytopathology*. 2007, **97**(12), s. 1558–1567.
  105. PECKA, Š. *Invaze Phytophthora alni v Evropě*. Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky. Vedoucí práce Karel Černý.
  106. PIETZARKA, U., ROLOFF, A. Handbuch und Atlas der Dendrologie. In: ROLOFF, A., WEISGERBER, H., LANG, U. M., STIMM, B., SCHÜTT, P., eds. *Enzyklopädie der Holzgewächse*. Weinheim: Wiley-Vch Verlag, 2000.
  107. PINTOS VARELA, C., RIAL MARTÍNEZ, C., MANSILLA VÁZQUEZ, J. P., AGUÍN CASAL, O. First Report of *Phytophthora* Rot on Alders Caused by *Phytophthora alni* subsp. *alni* in Spain. *Plant disease*. 2010, **94**(2), s. 273–273.
  108. PINTOS VARELA, C., RIAL MARTÍNEZ, C., AGUÍN CASAL, O., MANSILLA VÁSQUEZ, J.P., ARES YEBRA, A. First report of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* on black alder in Spain. *Plant Disease*. 2012, **96**(4), s. 589–589.
  109. POGODA, F., WERRES, S. Histological studies of *Phytophthora ramorum* in *Rhododendron* twigs. *Canadian Journal of Botany*. 2004, **82**(10), s. 1481–1489.
  110. REDONDO, M. A., BOBERG, J., OLSSON, C. H. B., OLIVA, J. Winter conditions correlate with *Phytophthora alni* subspecies distribution in southern Sweden. *Phytopathology*. 2015, **105**(9), s. 1191–1197.
  111. RIBEIRO, O. K. *A source book of the genus Phytophthora*. Liechtenstein, Vaduz: Cramer, 1978. ISBN 9783768212007.
  112. ROMPORTL, D., CHUMANOVÁ, E., HAVRDOVÁ, L., PEŠKOVÁ, V., ČERNÝ, K. Potential risk of occurrence of *Phytophthora alni* in forests of Czech Republic. *Journal of Maps*. 2016, **12**(1), s. 280–284.
  113. SANTINI, A., BARZANTI, G. P., CAPRETTI, P. A new *Phytophthora* root disease of alder in Italy. *Plant Disease*. 2001, **85**(5), s. 560-560.
  114. SAWADA, K. Descriptive catalogue of the Formosan fungi. *Report of the Government Research Institute Department of Agriculture Formosa*. 1927, **27**, s. 21–24

115. SCOTT, P. M., BURGESS, T. I., BARBER, P. A., SHEARER, B. L., STUKELY, M. J. C., HARDY, G. E. ST. J., JUNG, T. *Phytophthora multivora* sp. nov., a new species recovered from declining *Eucalyptus*, *Banksia*, *Agonis* and other plant species in Western Australia. *Persoonia*. 2009, **22**, s. 1–13.
116. SCHENA, L., NIGRO, F., IPPOLITO, A., GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 2004, **110**(9), s. 893–908.
117. SCHMITTHENNER, A. F., BHAT, R. G. Useful Methods for Studying Phytophthora in the Laboratory. *Oardc special circular*. Ohio: The Ohio State University, 1994, s. 1–10.
118. SCHUMACHER, J., LEONHARD, S., GRUNDMANN, B. M., ROLOFF, A. New alder disease in Spreewald biosphere reserve – causes and incidental factors of an epidemic. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*. 2006, **58**(6), s. 141–147.
119. SCHÜTT, P., SCHUCK, H. J., STIMM, B. *Lexikon der Baum – und Straucharten: Das Standardwerk der Forstbotanik*. Hamburg: Nikol, 2002. ISBN 978-3868206593.
120. SIMS, L. L., SUTTON, W., REESER, P., HANSEN, E. M. The *Phytophthora* species assemblage and diversity in riparian alder ecosystems of western Oregon, USA. *Mycologia*. 2015, **107**(5), s. 889–902.
121. SKALICKÝ, M., NOVÁK, J. *Botanika*. Čtvrté vydání. Praha: Powerprint, 2017. ISBN 978-80-7568-036-5.
122. SOLLA, A., PÉREZ-SIERRA, A., CORCOBADO, T., HAQUE, M.M., DIEZ, J.J., JUNG, T. *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* reported for the first time in Spain. *Plant Pathology*. 2010, **59**(4), s. 798–798.
123. STREITO, J. C., LEGRAND, P., TABARY, F., JARNOUEN DE VILLARTAY, G. *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France: investigations between 1995 and 1999. *Forest Pathology*. 2002, **32**(3), s. 179–191.
124. STRNADOVÁ, V., ČERNÝ, K., BREJCHOVÁ, P., GREGOROVÁ, B., HOLUB, V., GABRIELOVÁ, Š. The Epidemy of Alder Decline in the Czech Republic – the Effect of *Phytophthora alni* and Floods in 2002. In: *Kniha příspěvků, XVII česká a slovenská konference o ochraně rostlin*. Praha, 2006, s. 356–361.
125. STRNADOVÁ, V., ČERNÝ, K., HOLUB, V., GREGOROVÁ, B. The effects of flooding and *Phytophthora alni* infection on black alder. *Journal of Forest Science*. 2010, **56**(1), s. 41–46.
126. SZABÓ, I., NAGY, Z., BAKONYI, J., ÉRSEK, T. First report of *Phytophthora* root and collar rot of alder in Hungary. *Plant Disease*. 2000, **84**(11), s. 1251–1251.
127. SZABÓ, I., LAKATOS, F., SIPOS, G. Occurrence of soilborne *Phytophthora* species in declining broadleaf forests in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*. 2013, **137**(1), s. 159–168.

128. ŠRŮTKA, P., PAŽOUTOVÁ, S., KOLAŘÍK, M. *Daldinia decipiens* and *Entonaema cinnabarina* as fungal symbionts of *Xiphydria* wood wasps. *Mycological research*. 2007, **111**(2), s. 224–231.
129. ŠTĚPÁNKOVÁ, P., ČERNÝ, K., STRNADOVA, V., HANÁČEK, P., TOMŠOVSKÝ, M. Identification of *Phytophthora alni* subspecies in riparian stands in the Czech Republic. *Plant Protection Science*. 2013, **49**(10), s 3-10.
130. THOIRAIN, B., HUSSON, C., MARÇAIS, B. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of alder in Northeastern France. *Phytopathology*. 2007, **97**(1), s. 99–105.
131. TIPPETT, J. T., SHEA, S. R., HILL, T. C., SHEARER, B. L. Development of lesions caused by *Phytophthora cinnamomi* in the secondary phloem of *Eucalyptus marginata*. *Australian journal of botany*. 1983, **31**(2), s. 197–210.
132. TKARZYK, M. *Phytophythium*: Origin, Differences and Meaning in Modern Plant Pathology. *Folia Forestalia Polonica, Series A*. 2020, **62**(3), s. 227–232.
133. TRZEWIK, A., ORLIKOWSKA, T. Detection and identification of *Phytophthora alni*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 2010, **75**(4), s. 655–658.
134. TRZEKWIK, A., MACIOROWSKI, R., ORLIKOWSKA, T. Pathogenicity of *Phytophthora*× *alni* Isolates Obtained from Symptomatic Trees, Soil and Water against Alder. *Forests*. 2021, **13**(1), s. 1–13.
135. TSAO, P. H. Why many *Phytophthora* root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 1990, **20**(1), s. 11–17.
136. ÚRADNÍČEK, L., MADĚRA, P., KOLIBÁČOVÁ, S., KOBLÍŽEK, J., ŠEFL, J. *Dřeviny České republiky*. Písek: Matice lesnická, 2001. ISBN 80- 86271- 09-9.
137. ÚRADNÍČEK, L., MADĚRA, P., TICHÁ, S., KOBLÍŽEK, J. *Dřeviny České republiky*. 2., přeprac. vyd. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 2009. ISBN 978-80-87154-62-5.
138. VENABLES, W. N., RIPLEY, B. D. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth edition. New York: Springer, 2002. ISBN 0-387-95457-0.
139. VINCENT, J. M. Oak decline: alteration of the fine root biomass with the progress of the disease. 1991. In: LERARIO, P., SIWECKI, R. a W. LIESE, eds. *Oak Decline in Europe*. Kornik, Poland: Tomaszowskie Zakłady Graficzne, 1990, s. 173–175.
140. VYHLÍDKOVÁ, I., PALOVČÍKOVÁ, D., RYBNÍČEK, M., ČERMÁK, P., JANKOVSKÝ, L. Some aspects of alder decline along the Lužnice River. *Journal of Forest Science*. 2005, **51**(9), s. 381–391.
141. WICKHAM, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer, 2016. ISBN 978-3-319-24277-4.
142. WICKHAM, H., FRANÇOIS, R., HENRY, L., MÜLLER, K., VAUGHAN, D. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.1.1. 2023. <<https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>>.

143. ZENTMYER, G. A. Chemotaxis of zoospores for root exudates. *Science*. 1961, **133**(3464), s. 1595–1596.
144. ZPRÁVA O STAVU LESA A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ 2021: Výroční zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2021 v knižní podobě. [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2022 [cit. 2023-03-28]. ISBN 978-80-7434-669-9.  
Dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/715438/Zprava\\_o\\_stavu\\_lesa\\_2021\\_web.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/715438/Zprava_o_stavu_lesa_2021_web.pdf)

## 8. Přílohy

### Seznam příloh

Příloha 1: Výzkumná plocha č. 1 Loděnice – Jánská.....	70
Příloha 2: Výzkumná plocha č. 2 Ovčín.....	70
Příloha 3: Výzkumná plocha č. 3 Sedlec.....	71
Příloha 4: Výzkumná plocha č. 4 Hostim.....	71
Příloha 5: Výzkumná plocha č. 5 Zbizožský potok.....	72
Příloha 6: Výzkumná plocha č. 6 Javornice.....	72
Příloha 7: Výzkumná plocha č. 7 Korečnický potok.....	73
Příloha 8: Výzkumná plocha č. 8 Radnický potok (Přívětice).....	73
Příloha 9: Výzkumná plocha č. 9 Třemošná.....	74
Příloha 10: Výzkumná plocha č. 10 Libomyšl.....	74
Příloha 11: Výzkumná plocha č. 11 Podlužský potok (Lochovice).....	75
Příloha 12: Výzkumná plocha č. 12 Jince.....	75
Příloha 13: Výzkumná plocha č. 13 Hlubošský potok.....	76
Příloha 14: Výzkumná plocha č. 14 Příbram u stadionu.....	76
Příloha 15: Výzkumná plocha č. 15 Bohutín.....	77
Příloha 16: Výzkumná plocha č. 16 Skořický potok pod Kolvínem.....	77
Příloha 17: Výzkumná plocha č. 17 Pod Pilskou nádrží, Pilský potok.....	78
Příloha 18: Výzkumná plocha č. 18 Mokřina nad Pilskou nádrží, Pilský potok.....	78
Příloha 19: Výzkumná plocha č. 19 Pilský potok u Bohutína.....	79
Příloha 20: Výzkumná plocha č. 20 Bradava.....	79
Příloha 21: Počet hodnocených stromů a příznakových stromů na jednotlivých lokalitách.....	80
Příloha 22: Kořeny olše lepkavé s hlízkami (foto: J. Šindelářová).....	81
Příloha 23: Ukázka hodnocení defoliace na olši lepkavé: 1) zdravý strom – 10 %, 2) chlorotizace – 45 %, 3) silné prosychání kosterních větví – 75 %, 4) odumřelý strom – 100 % (foto: J. Šindelářová, M. Macháčová).....	82

**Příloha 1: Výzkumná plocha č. 1 Loděnice – Jánská („LOD“)**

Název vodního toku / přítoku	Loděnice - Berounka	
Souřadnice	N	49.990645
	E	14.15513
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Loděnice u Berouna	
Nadmořská výška [m n. m.]	273	
Šíře vodního toku [m]	3	
Vzdálenost od vodního toku [m]	2 - 3	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 24	
Počet hodnocených jedinců	30	
Podíl olší [%]	90	
Pokryvnost [%]	20	
Podíl příznakových stromů [%]	16,7	

**Příloha 2: Výzkumná plocha č. 2 Ovčím („OVC“)**

Název vodního toku / přítoku	Loděnice - Berounka	
Souřadnice	N	49.980765
	E	14.14473
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Svatý Jan pod Skalou	
Nadmořská výška [m n. m.]	270	
Šíře vodního toku [m]	4	
Vzdálenost od vodního toku [m]	1 - 2	
Průměrná výška porostu [m]	24	
Počet hodnocených jedinců	26	
Podíl olší [%]	80	
Pokryvnost [%]	50	
Podíl příznakových stromů [%]	19,2	

**Příloha 3: Výzkumná plocha č. 3 Sedlec („SED“)**

Název vodního toku / přítoku	Loděnice - Berounka	
Souřadnice	N	49.97518
	E	14.13216
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Svatý Jan pod Skalou	
Nadmořská výška [m n. m.]	237	
Šíře vodního toku [m]	3	
Vzdálenost od vodního toku [m]	1 - 2	
Průměrná výška porostu [m]	25	
Počet hodnocených jedinců	24	
Podíl olší [%]	50	
Pokryvnost [%]	60	
Podíl příznakových stromů [%]	20,8	

**Příloha 4: Výzkumná plocha č. 4 Hostim („HOS“)**

Název vodního toku / přítoku	Loděnice - Berounka	
Souřadnice	N	49.96518
	E	14.12961
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Hostim u Berouna	
Nadmořská výška [m n. m.]	253	
Šíře vodního toku [m]	3,5	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 6	
Průměrná výška porostu [m]	28 - 30	
Počet hodnocených jedinců	33	
Podíl olší [%]	60	
Pokryvnost [%]	60	
Podíl příznakových stromů [%]	12,1	

**Příloha 5: Výzkumná plocha č. 5 Zbirožský potok („ZBIR“)**

Název vodního toku / přítoku	Berounka	
Souřadnice	N	49.942755
	E	13.7431
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Ostrovec u Terešova	
Nadmořská výška [m n. m.]	291	
Šíře vodního toku [m]	3	
Vzdálenost od vodního toku [m]	2 - 3	
Průměrná výška porostu [m]	20	
Počet hodnocených jedinců	30	
Podíl olší [%]	75	
Pokryvnost [%]	60	
Podíl příznakových stromů [%]	0	

**Příloha 6: Výzkumná plocha č. 6 Javornice („JAV“)**

Název vodního toku / přítoku	Berounka	
Souřadnice	N	49.99393
	E	13.571545
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Kožlany	
Nadmořská výška [m n. m.]	375	
Šíře vodního toku [m]	1,5	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 0,5	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 25	
Počet hodnocených jedinců	31	
Podíl olší [%]	95	
Pokryvnost [%]	90	
Podíl příznakových stromů [%]	48,4	



**Příloha 7: Výzkumná plocha č. 7 Korečnický potok („KOR“)**

Název vodního toku / přítoku	Berounka	
Souřadnice	N	49.820445
	E	13.57685
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Stupno	
Nadmořská výška [m n. m.]	395	
Šíře vodního toku [m]	1,5	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 (ve vodě)	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 25	
Počet hodnocených jedinců	45	
Podíl olší [%]	90	
Pokryvnost [%]	90	
Podíl příznakových stromů [%]	24,4	

**Příloha 8: Výzkumná plocha č. 8 Radnický potok (Přivětice) („PRIV“)**

Název vodního toku / přítoku	Berounka	
Souřadnice	N	49.84162
	E	13.60822
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Přivětice	
Nadmořská výška [m n. m.]	414	
Šíře vodního toku [m]	3	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 (ve vodě)	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 25	
Počet hodnocených jedinců	30	
Podíl olší [%]	70	
Pokryvnost [%]	70	
Podíl příznakových stromů [%]	0	

**Příloha 9: Výzkumná plocha č. 9 Třemošná („TREM“)**

Název vodního toku / přítoku	Berounka	
Souřadnice	N	49.8428
	E	13.221495
PLO (přírodní lesní oblast)	6 - Západočeská pahorkatina	
Katastrální území	Všeruby u Plzně	
Nadmořská výška [m n. m.]	424	
Šíře vodního toku [m]	1	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 (ve vodě)	
Průměrná výška porostu [m]	20	
Počet hodnocených jedinců	46	
Podíl olší [%]	85	
Pokryvnost [%]	80	
Podíl příznakových stromů [%]	23,9	

**Příloha 10: Výzkumná plocha č. 10 Libomyšl („LIB“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.87294
	E	13.99623
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Libomyšl	
Nadmořská výška [m n. m.]	258	
Šíře vodního toku [m]	9	
Vzdálenost od vodního toku [m]	1 - 6	
Průměrná výška porostu [m]	15 - 18	
Počet hodnocených jedinců	31	
Podíl olší [%]	90	
Pokryvnost [%]	40	
Podíl příznakových stromů [%]	25,8	

**Příloha 11: Výzkumná plocha č. 11 Podlužský potok (Lochovice) („LOCH“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.843285
	E	13.975435
PLO (přírodní lesní oblast)	8 - Křivoklátsko a Český kras	
Katastrální území	Lochovice	
Nadmořská výška [m n. m.]	316	
Šíře vodního toku [m]	1	
Vzdálenost od vodního toku [m]	1 - 2	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 25	
Počet hodnocených jedinců	22	
Podíl olší [%]	60	
Pokryvnost [%]	50	
Podíl příznakových stromů [%]	22,7	

**Příloha 12: Výzkumná plocha č. 12 Jince („JIN“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.823345
	E	13.97397
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Rejkovice	
Nadmořská výška [m n. m.]	339	
Šíře vodního toku [m]	6	
Vzdálenost od vodního toku [m]	1 - 2	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 25	
Počet hodnocených jedinců	23	
Podíl olší [%]	50	
Pokryvnost [%]	20	
Podíl příznakových stromů [%]	26,1	

**Příloha 13: Výzkumná plocha č. 13 Hlubošský potok („HLUB“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.752715
	E	14.01959
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Hluboš	
Nadmořská výška [m n. m.]	445	
Šíře vodního toku [m]	1	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 2	
Průměrná výška porostu [m]	15 - 20	
Počet hodnocených jedinců	72	
Podíl olší [%]	60	
Pokryvnost [%]	30	
Podíl příznakových stromů [%]	1,4	

**Příloha 14: Výzkumná plocha č. 14 Příbram u stadionu („PRIB“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.678095
	E	13.9758
PLO (přírodní lesní oblast)	10 - Středočeská pahorkatina	
Katastrální území	Lazec	
Nadmořská výška [m n. m.]	507	
Šíře vodního toku [m]	1,5	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0,5 - 2	
Průměrná výška porostu [m]	20 - 25	
Počet hodnocených jedinců	67	
Podíl olší [%]	85	
Pokryvnost [%]	90	
Podíl příznakových stromů [%]	53,7	

**Příloha 15: Výzkumná plocha č. 15 Bohutín („BOH“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.67005
	E	13.965525
PLO (přírodní lesní oblast)	10 - Středočeská pahorkatina	
Katastrální území	Lazec	
Nadmořská výška [m n. m.]	524	
Šíře vodního toku [m]	4	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0,5 - 1	
Průměrná výška porostu [m]	18 - 20	
Počet hodnocených jedinců	62	
Podíl olší [%]	90	
Pokryvnost [%]	95	
Podíl příznakových stromů [%]	17,7	

**Příloha 16: Výzkumná plocha č. 16 Skořický potok pod Kolvínem („SKOR“)**

Název vodního toku / přítoku	Klabava - Berounka	
Souřadnice	N	49.66560
	E	13.71197
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Skořice v Brdech	
Nadmořská výška [m n. m.]	534	
Šíře vodního toku [m]	1,5	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 3	
Průměrná výška porostu [m]	30	
Počet hodnocených jedinců	33	
Podíl olší [%]	50	
Pokryvnost [%]	20	
Podíl příznakových stromů [%]	0	

**Příloha 17: Výzkumná plocha č. 17 Pod Pilskou nádrží, Pilský potok („PIL1“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.67528
	E	13.91266
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Obecnice v Brdech	
Nadmořská výška [m n. m.]	644	
Šíře vodního toku [m]	1	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 6	
Průměrná výška porostu [m]	18 - 20	
Počet hodnocených jedinců	24	
Podíl olší [%]	55	
Pokryvnost [%]	50	
Podíl příznakových stromů [%]	4,2	

**Příloha 18: Výzkumná plocha č. 18 Mokřina nad Pilskou nádrží, Pilský potok („PIL2“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.67588
	E	13.89558
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Obecnice v Brdech	
Nadmořská výška [m n. m.]	683	
Šíře vodního toku [m]	mokřina	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 6	
Průměrná výška porostu [m]	18 - 22	
Počet hodnocených jedinců	20	
Podíl olší [%]	60	
Pokryvnost [%]	75	
Podíl příznakových stromů [%]	0	

**Příloha 19: Výzkumná plocha č. 19 Pilský potok u Bohutína („PIL3“)**

Název vodního toku / přítoku	Litavka - Berounka	
Souřadnice	N	49.66423
	E	13.92668
PLO (přírodní lesní oblast)	7 - Brdská vrchovina	
Katastrální území	Bohutín	
Nadmořská výška [m n. m.]	595	
Šíře vodního toku [m]	1	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 0,5	
Průměrná výška porostu [m]	15	
Počet hodnocených jedinců	17	
Podíl olší [%]	20	
Pokryvnost [%]	25	
Podíl příznakových stromů [%]	0	

**Příloha 20: Výzkumná plocha č. 20 Bradava („BRAD“)**

Název vodního toku / přítoku	Úslava - Berounka	
Souřadnice	N	49.614085
	E	13.73789
PLO (přírodní lesní oblast)	6 - Západočeská pahorkatina	
Katastrální území	Míšov	
Nadmořská výška [m n. m.]	630	
Šíře vodního toku [m]	0,5	
Vzdálenost od vodního toku [m]	0 - 4	
Průměrná výška porostu [m]	10 - 20	
Počet hodnocených jedinců	45	
Podíl olší [%]	85	
Pokryvnost [%]	60	
Podíl příznakových stromů [%]	4,4	

## Příloha 21:

Tab. I: Počet hodnocených stromů a příznakových stromů na jednotlivých plochách

Plocha	nadmořská výška [m n.m.]	počet hodnocených stromů	počet příznakových stromů	[%] podíl příznakových stromů z $\Sigma$
LOD	273	30	5	16,7
OVC	270	26	5	19,2
SED	237	24	5	20,8
HOS	253	33	4	12,1
ZBIR	291	30	0	0,0
JAV	375	31	15	48,4
KOR	395	45	11	24,4
PRIV	414	30	0	0,0
TREM	424	46	11	23,9
LIB	258	31	8	25,8
LOCH	316	22	5	22,7
JIN	339	23	6	26,1
HLUB	445	72	1	1,4
PRIB	507	67	36	53,7
BOH	524	62	11	17,7
SKOR	534	33	0	0,0
PIL 1	644	24	1	4,2
PIL 2	683	20	0	0,0
PIL 3	595	17	0	0,0
BRAD	630	45	2	4,4

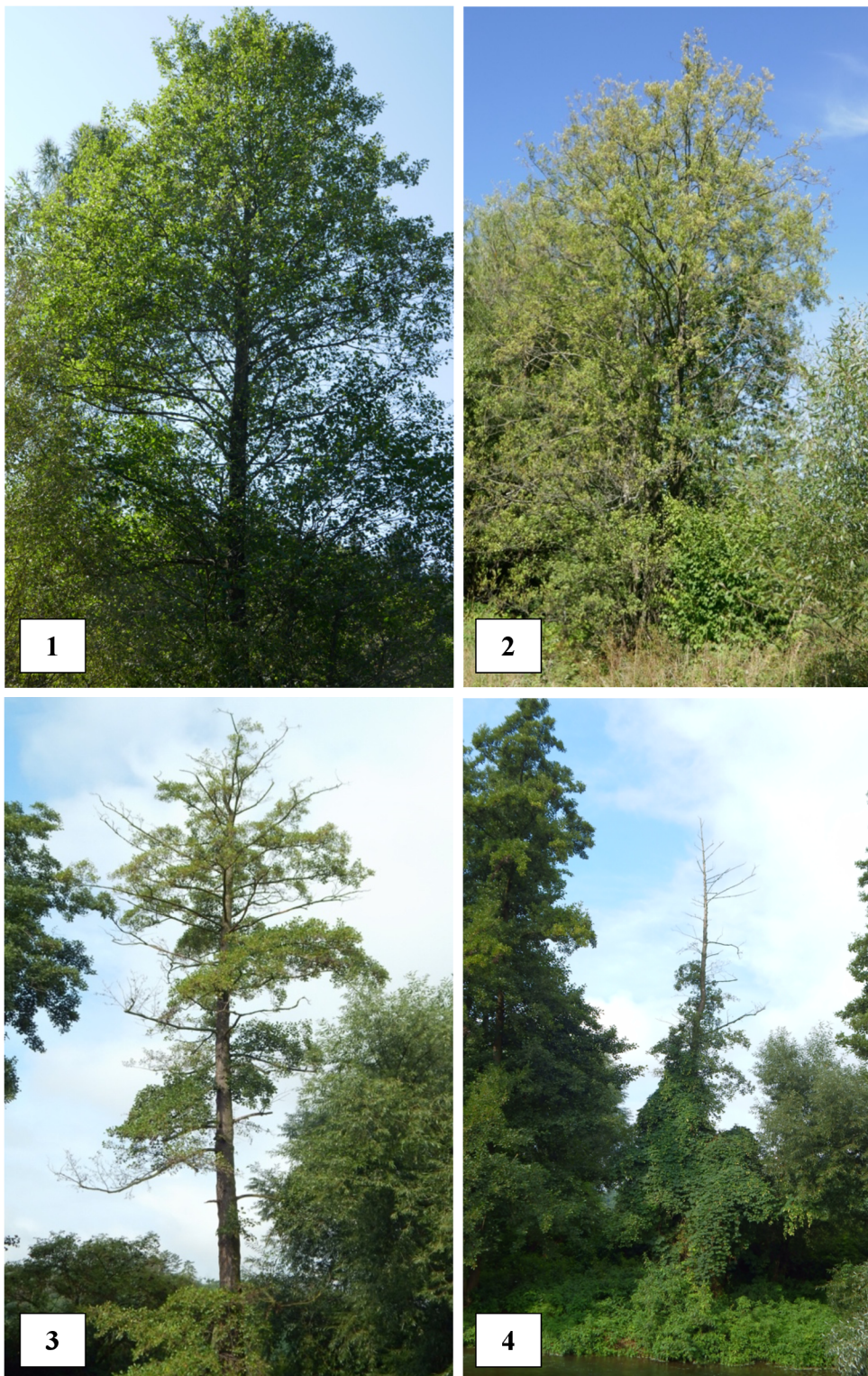


**Příloha 22:**



Obr. I: Kořeny olše lepkavé s hlízkami (foto: J. Šindelářová)

**Příloha 23:**



Obr. II: Ukázka hodnocení defoliace na olši lepkavé: 1) zdravý strom – 10 %, 2) chlorotizace – 45 %, 3) silné prosychání kosterních větví – 75 %, 4) odumřelý strom – 100 % (foto: J. Šindelářová, M. Macháčová)