

Identifikace rizikových změn struktury a diverzity

MOKŘADNÍCH OLŠIN a OLŠOVÝCH LUHŮ

v důsledku invaze plísně olšové (*Phytophthora alni*) a stanovení perspektivy vývoje společenstev



T A
Č R

Identifikace rizikových změn struktury a diverzity mokřadních olšin a olšových luhů v důsledku invaze plísně olšové (*Phytophthora alni*) a stanovení perspektivy vývoje společenstev

Souhrnná výzkumná zpráva

VÚKOZ Průhonice

Prosinec 2024

Autorský kolektiv: Jaroslav Vojta¹, Štěpán Pecka^{1,3}, Alena Havrdová², Eva Chumanová¹, Jan Douda², Karel Černý¹, Karel Boublík², Ondřej Koukol³, Jana Doudová², Gabriela Šrámková³, Daniel Zahradník¹, Veronika Strnadová¹, Přemysl Král², Julie Sucharová¹

¹Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v.v.i.

²Česká zemědělská univerzita v Praze – Fakulta životního prostředí

³Univerzita Karlova – Přírodovědecká fakulta

Výzkum byl podpořen se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci programu Prostředí pro život 5, projekt č. SS05010191

<https://www.vukoz.cz/project/identifikace-rizikovych-zmen-struktury-a-diverzity-mokradnich-olsin-a-olsovy-ch-luhu-v-dusledku-invaze-plisne-olsove-phytophthora-alni-a-stanoveni-perspektivy-vyvoje-spolecenstev/>

ISBN 978-80-87674-55-0 (online; pdf)

1	Úvod.....	3
2	Rozšíření <i>P. alni</i> a její vliv na vegetaci lužních a mokřadních olšin.....	5
2.1	Úvod.....	5
2.1.1	Vliv invazních patogenů na biodiverzitu	5
2.2	Metody	7
2.2.1	Sběr dat	7
2.2.1.1	Opakování starých fytoocenologických snímků	7
2.2.1.2	Monitoring <i>P. alni</i>	8
2.2.1.3	Izolace a determinace <i>P. alni</i>	9
2.2.2	Proměnné prostředí pro analýzu vegetace	9
2.2.3	Statistická analýza dat.....	10
2.2.4	Tvorba map	11
2.3	Výsledky	12
2.3.1	Základní popis dat.....	12
2.3.2	Mapy	14
2.3.2.1	Pravděpodobnost výskytu patogenu dle podmínek prostředí.....	14
2.3.2.2	Změna pokryvnosti olše ve stromovém patře	15
2.3.2.3	Diverzita rostlin v bylinném patře – predikce vývoje při absenci/prezenci patogenu a různé míře poškození stromového patra.....	18
2.3.2.4	Šíření vybraných invazních druhů v olšinách	22
2.3.2.5	Obsah fosforu v půdě	25
2.3.3	Analýza vegetace	26
2.4	Diskuze.....	32
3	Genetická variabilita a variabilita virulence patogenu na krajinné úrovni	34
3.1	Úvod.....	34
3.2	Metody	34
3.2.1	Sběr dat	34
3.2.2	Laboratorní analýzy	35
3.2.2.1	Určení genotypu <i>Phytophthora alni</i> s.l.	35
3.2.2.2	Výběr izolátů pro testování jejich biologické zdatnosti	35
3.2.2.3	Testování růstových teplot	36
3.2.2.4	Tvorba sporangií	36
3.2.2.5	Patogenita izolátů	36
3.2.2.6	Sériové pasážování <i>P. ×alni</i> in vitro	37
3.2.3	Statistická analýza dat.....	37
3.2.3.1	Porovnání populace <i>P. ×alni</i> v čase	37

3.3	Výsledky	37
3.3.1	Základní popis recentní populace <i>P. alni</i> s.l.	37
3.3.2	Mikrosatelitové profily izolátů <i>P. alni</i>	38
3.3.3	Rozdíly ve struktuře populace <i>P. ×alni</i>	38
3.3.4	Diverzita populace	39
3.3.5	Analýza Minimum Spanning Network (MSN).....	40
3.3.6	Variabilita populace.....	40
3.3.7	Distribuce MLG	41
3.3.8	Kardinální teploty	42
3.3.9	Růst in vitro a ztráta alel	42
3.3.10	Produkce sporangií.....	43
3.3.11	Patogenita izolátů	45
3.3.12	Sériové in vitro pasážování <i>P. ×alni</i>	48
3.4	Diskuze.....	48
3.4.1	Odběr vzorků a izolace v kultuře	49
3.4.2	Struktura populace <i>P. ×alni</i> a její změny.....	49
3.4.3	Genetická rozmanitost <i>P. ×alni</i>	50
3.4.4	Vznik odvozených genotypů.....	50
3.4.5	Ztráta heterozygosity	50
3.4.6	Testy fitness.....	51
3.4.7	Další izolované taxony mimo druhový komplex <i>P. alni</i> s. l.....	52
3.5	Závěr	53
4	Doporučení pro ochranu přírody a management porostů.....	53
5	Literatura a zdroje	54

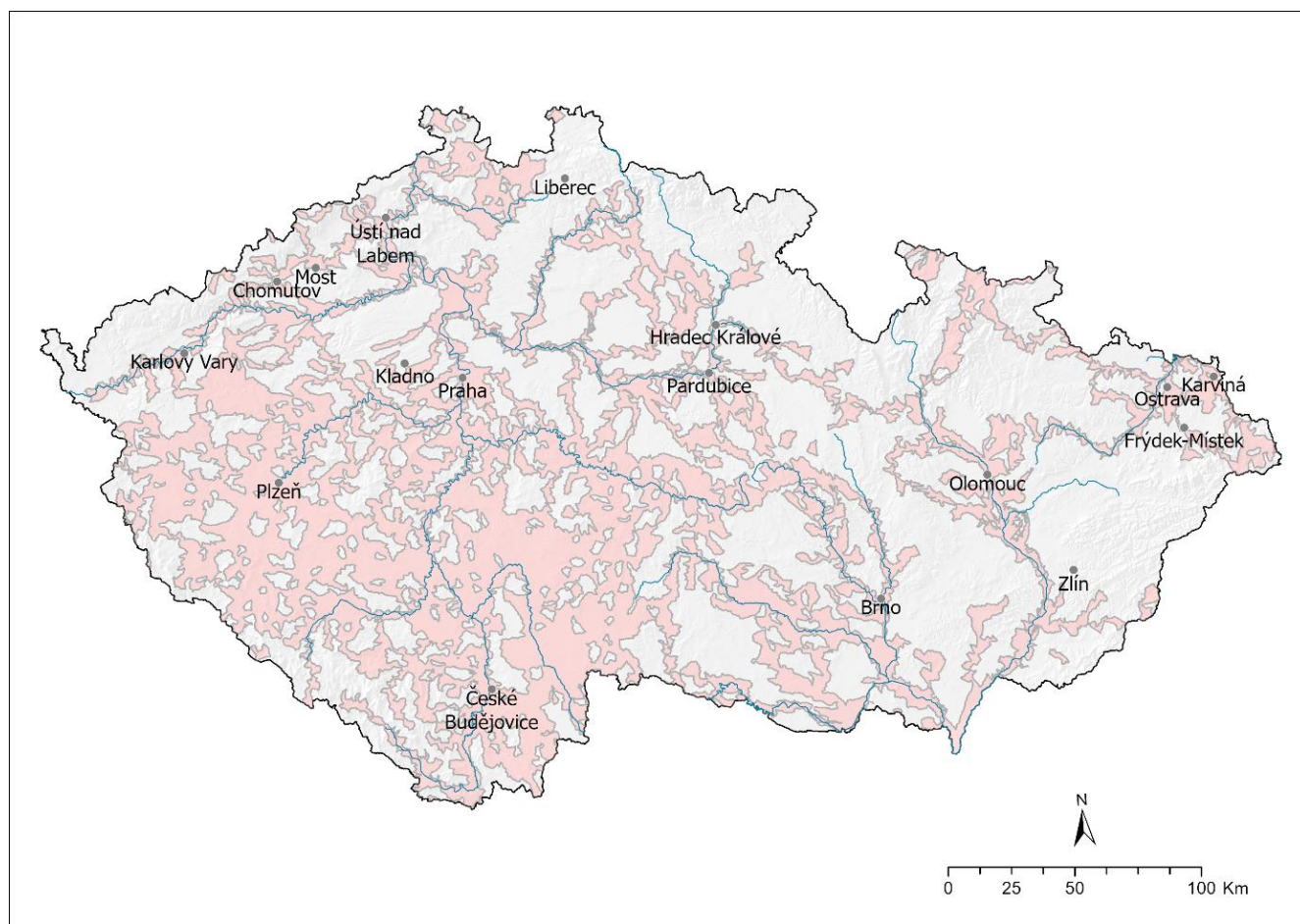
1 Úvod

Šíření nepůvodních patogenů a škůdců je globálním jevem, který přináší řadu ekonomických i environmentálních problémů. Některé z těchto organismů jsou schopny zásadním způsobem měnit složení a strukturu invadovaných společenstev a trvale je ovlivnit, nebo dokonce zcela rozvrátit (např. Ellison et al., 2005; Fleming et al., 2021). V 90. letech minulého století se na území ČR začala šířit plíseň olšová (*Phytophthora alni*), která napadá významné dominanty mokřadních a lužních společenstev olši lepkavou a olši šedou. Způsobuje defoliaci, chřadnutí a následné odumírání napadených jedinců (Černý a Strnadová, 2010). Patogen tak představuje významné riziko pro společenstva mokřadních olšin svazu *Alnion glutinosae* (biotop L1 podle Katalogu biotopů ČR (Chytrý et al., 2010) a potočních luhů svazu *Alnion incanae* (L2.1 a L2.2). Jsou to ekosystémy zásadně ovlivňující retenci vody v krajině a také společenstva významná z hlediska biodiverzity. Jedná se o významné mokřadní biotopy, na které je specificky vázána řada živočišných i rostlinných druhů a potoční luhy jsou prioritním stanovištěm soustavy Natura 2000 (91E0, Council Directive 92/43/EEC).

Plíseň olšová – *Phytophthora alni* je nejnebezpečnějším patogenem olší, způsobujícím na evropském kontinentu plošná poškození populace svého hostitele. Plíseň olšová byla poprvé izolována v roce 1993 z chřadnoucích porostů olše lepkavé v jižní Anglii (Brasier, 2008). Dnes je patogen rozšířen ve velké části Evropy – jeho areál se táhne od Irska na západě až po linii spojující Pobaltí a Slovinsko na východě. Nejvýznamnější škody byly zaznamenány v Anglii, Švédsku, Norsku, Francii, na Pyrenejském poloostrově, v Itálii, Německu a České republice (Bjelke et al., 2016). V ČR byla plíseň olšová potvrzena poprvé v r. 2001 na Karlovarsku, typické symptomy choroby z různých částí Čech a chřadnutí olší na Jindřichohradecku však byly pozorovány již v 80. a 90. letech minulého století (Jančařík 1993). V současnosti se *P. alni* vyskytuje v povodí všech velkých toků v ČR a v západních a jižních Čechách téměř plošně (obr. 1) s výjimkou některých menších povodí a vyšších nadmořských výšek (i když i sem proniká podél menších vodních toků).

Phytophthora alni s. l. je vlastně druhový komplex tří na olše specializovaných taxonů – *P. ×alni* Brasier & S. A. Kirk, *P. uniformis* (Brasier & S. A. Kirk) Abad a *P. ×multiformis* (Brasier & S. A. Kirk) Abad (Abad et al. 2023; Brasier et al. 2004). Zatímco *P. uniformis* je diploidní druh (Brasier et al. 2004; Husson et al. 2015), pocházející ze Severní Ameriky a zavlečený do Evropy (Aguayo et al. 2013), *P. ×multiformis* je poměrně vzácný tetraploidní hybrid neznámého původu (Brasier et al. 2004). Nejvýznamnějším a nejčastěji se vyskytujícím druhem v rámci komplexu je allotriploidní hybrid *P. ×alni*, který vznikl opakovanou hybridizací prvně jmenovaných druhů (Aguayo et al. 2016; Husson et al. 2015). Díky jeho hybridnímu původu je *P. ×alni* nejvirulentnějším taxonem druhového komplexu, s velkým invazním potenciálem a schopností způsobovat rozsáhlé epidemie v populacích olší (Brasier a Kirk 2001; De Merlier et al. 2005; Depotter et al. 2016).

Velká nebezpečnost *P. ×alni* spočívá v kombinaci genomů obou rodičovských druhů napadajících olše (jelikož *P. ×multiformis* je také hybridní druh, získal *P. ×alni* geny vlastně od tří různých druhů; Husson et al. 2015) a v introdukci do prostředí s hostitelskými druhy, které nejsou na tento patogen adaptovány (Aguayo et al. 2013). Zastoupení jednotlivých druhů částečně odráží jejich rozšíření v Evropě s výjimkou severního okraje areálu, kde *P. uniformis* převažuje nad *P. ×alni*, pravděpodobně díky vyšší toleranci ke chladu (Redondo et al. 2015). V jiných oblastech druh *P. ×alni* zřejmě vytlačil méně agresivní rodičovský druh *P. uniformis*, čímž ho omezil na reziduální a fragmentovaná stanoviště, druh *P. ×multiformis* je nalézán pouze velmi vzácně (Aguayo et al. 2016; Depotter et al. 2016; Štěpánková et al. 2013).



Obr. 1 Území se známým či předpokládaným výskytem *P. alni* v ČR k roku 2023. Mapa je syntézou dat získaných v rámci předchozích projektů VZ002707301, MŽP SP/2d1/36/07, QI92A207, QI1220219, TH03030306 a SS02030018. Do mapy byla zařazena všechna povodí IV. řádu a záplavová území stoleté vody (databáze DIBAVOD VÚV TGM (Fojtík et al., 2022)) se zaznamenanou lokalitou výskytu patogenu a/nebo s úsekem vodního toku s potvrzeným výskytem patogenu nebo s úsekem vodního toku v jehož okolí do 50 m byl zaznamenan výskyt patogenu nebo tento úsek leží po proudu od některého úseku s předchozí charakteristikou a patogen se tam může samovolně šířit. Podrobněji viz metadata v online verzi mapy (<https://vukoz.maps.arcgis.com/home/index.html>).

V podmínkách mokřadních olšin je olše lepkavá jediným stromem, který je zde schopný prosperovat (Douda 2013) a zároveň zásadním způsobem určuje strukturu, heterogenitu a dynamiku společenstva (Douda et al. 2012). Olše má také rozhodující vliv na fertilitu substrátu díky symbiotické fixaci dusíku (Bjelke et al. 2016). V potočních luzích svazu *Alnion incanae* se na stromovém patře kromě olše lepkavé a olše šedé podílí i několik málo dalších druhů, i zde jsou ale oba druhy olše zásadní dominantou určující charakter společenstva (Boublík et al. 2013). Hynutí takové strukturující dominanty ("Foundation species" sensu Dayton 1972) má za následek změny společenstev i celých ekosystémů. Náhrada olše jinou dominantou je obtížná, v případě mokřadních olšin může být nahrazena pouze několika druhy křovitých vrb (zejména *Salix cinerea*), případně střemchou obecnou (*Prunus padus*). V případě potočních luhů sice existuje několik málo potenciálních náhradních dominant, ale ta nejdůležitější, jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) v současné době podléhá jinému invazivnímu patogenu, houbě *Hymenoscyphus fraxineus* (Havrdová et al. 2017). Nepůvodní patogeny tak ohrožují oba typy biotopů s olší v jejich existenci. Přesto nebyly změny těchto společenstev indukované plísní olšovou dosud podrobně studovány.

Tato výzkumná zpráva je shrnutím odborných výsledků projektu „Identifikace rizikových změn struktury a diverzity mokřadních olšin a olšových luhů v důsledku invaze plísně olšové (*Phytophthora alni*) a stanovení perspektivy vývoje společenstev“ financovaného Technologickou agenturou ČR v rámci programu

Prostředí pro život 5, projekt č. SS05010191. Projekt se zabýval dopady plísňe olšové na lužní a mokřadní lesy a genetickou a ekologickou variabilitou patogenu. Výsledky jsou také postupně publikovány v odborných časopisech a online.

2 Rozšíření *P. alni* a její vliv na vegetaci lužních a mokřadních olšin

2.1 Úvod

2.1.1 Vliv invazních patogenů na biodiverzitu

Původní druhy patogenů a škůdců jsou považovány za integrální složku ekosystémů a mají spíše pozitivní než negativní vliv na biodiverzitu v krátkodobém i dlouhodobém měřítku (e.g. Kortmann et al., 2021), často patří k mechanismům podporujícím koexistenci druhů ve společenstvech (Gilbert 2002) a často se jejich patogenita v důsledku dlouhé koevoluce s hostitelskými organismy projevuje jen velmi omezeně (Brasier, 2008; Gilbert, 2002; Jung et al., 2021). V důsledku globálního pohybu zboží a zejména četných introdukcí užitkových a okrasných rostlin se však stále častěji objevují nové nepůvodní patogeny téměř ve všech typech vegetace (Bačová et al., 2024; Brasier, 2008; Dennert et al., 2024; Jung et al., 2024, 2021, 2018; Tsykun et al., 2022). Některé z těchto patogenů jsou příčinou zásadních a často nevratných změn ekosystémů (Fleming et al., 2021; Loo, 2009; Metz et al., 2012). Například *Phytophthora ramorum* způsobila na západě USA hromadné hynutí dubů a příbuzného druhu *Notholithocarpus densiflorus*. Ekosystémové důsledky jsou dalekosáhlé, patogen způsobil změnu požárového režimu v lesích (Kuljian and Varner, 2010; Metz et al., 2011), změnil cyklus dusíku (Cobb et al., 2013) a způsobil řadu kaskádových reakcí, které ovlivňují populace ostatních organismů (Metz et al., 2013, 2012; Monahan and Koenig, 2006; Ramage and O'Hara, 2010; Swei et al., 2011). Jiný patogen, *Bretziella fagacearum*, urychluje v Minnesotě přeměnu dubových lesů v savany a násobí tak vliv klimatických změn (Pellegrini et al., 2021).

Invazní patogeny samozřejmě snižují biodiverzitu eliminací hostitele minimálně v části lokalit či areálu. Obvykle však přežívají rezistentní jedinci nebo populace, jako je to v případě jilmů, které byly v Evropě zasaženy několika vlnami grafiozy (Brunet et al., 2023; Ghelardini and Santini, 2009; Harwood et al., 2011). Ve vzácných případech může dojít k faktické eliminaci hostitelského druhu, jak se to stalo v případě severoamerického kaštanovníku *Castanea dentata*, který je v současné době na hranici vyhynutí (Loo, 2009; Paillet, 2002). Některé patogeny mají široké spektrum hostitelů, výše zmíněný patogen *P. ramorum* má potenciál přímo ovlivnit populace desítek hostitelských druhů včetně křovin a bylin (Parke a Peterson, 2019). Častěji lze předpokládat spíše nepřímý vliv invazního patogenu na biodiverzitu zejména v případě, že ovlivňuje klíčový druh v ekosystému (Ellison et al., 2005; Fleming et al., 2021; Mitchell et al., 2016). Chřadnutí a odumírání stromových dominant v důsledku epidemie nepůvodních patogenů či jiných škodlivých organismů může mít rozličné důsledky pro lesní organismy a zahrnuje zmenšení i zvětšení jejich populací (Fleming et al., 2021; Sackett et al., 2011). Ptáci, savci a bezobratlí mohou profitovat ze zvýšení přísunu slunečního záření, zvýšení množství mrtvého dřeva, zvětšení množství dutin a obecně ze zvýšení heterogenity prostředí (Fleming et al., 2021; Sackett et al., 2011). Vliv na diverzitu cévnatých rostlin také není jednoznačný. Několik desetiletí po katastrofickém poškození blahovičnickových lesů patogenem *Phytophthora cinnamomi* byl v Austrálii zaznamenán výrazný pokles druhové diverzity nejspíše v důsledku expanze konkurenčně silných druhů trav a ostřic a zastínění bylinného patra hustým vegetativním zmlazením zasažených stromů (Weste et al., 2002). Masové odumírání jedlovce východního v důsledku invaze korovnice jedlovcové (*Adelges tsugae*, *Hemiptera*) mělo za následek spíše nárůst počtu druhů rostlin (Ellison et al., 2016; Kizlinski et al., 2002; Small et al., 2005). I v tomto případě je však odumírání dominanty potenciálním rizikem pro biodiverzitu, protože k nárůstu druhů výrazně přispěly běžné druhy se širokou ekologickou amplitudou a invazní druhy. Hrozí tedy homogenizace bioty na velkém prostorovém měřítku a ztráta druhů specializovaných na prostředí vytvářené hostitelským druhem (Ellison et al., 2016, 2005).

Ve střední Evropě jsou invazními patogeny zvláště ohroženy lužní a mokřadní lesy, dotkla se jich epidemie grafiozy jilmů v nedávné minulosti (Brunet et al., 2023; Harwood et al., 2011) a v současné době jsou silně zasaženy voskovičkou jasanovou (*Hymenoscyphus fraxineus*, Brunet et al., 2023; Chumanová et

al., 2019; Kowalski, 2006) a probíhající invazí plísně olšové (Černý a Strnadová, 2010; Chumanová et al., 2019). V některých ekosystémech je chybějící dominanta nahrazena jinou (Loo, 2009), například po ústupu jedle nahrazuje její roli buk, byť samozřejmě mění původní vlastnosti stanoviště (Nagel et al., 2019). V případě lužních lesů je v důsledku minulých nebo probíhajících epidemií nabídka náhradních dominant velmi omezená, lze očekávat expanzi druhů spíše mezofilnějších stanovišť (javory, buk, habr, lípa srdčitá, případně smrk) nebo křovin (*Frangula alnus*, *Prunus padus*, *Sambucus nigra*). V případě mokřadních olšin je nabídka náhradních dominant ještě menší a omezuje se v podstatě jen na křoviny (*Salix cinerea*, případně *Prunus padus*).

Informací o vlivu invazních patogenů na diverzitu cévnatých rostlin v lužních a mokřadních lesích je přitom velmi málo. V lesích původně dominovaných jasanem ve Švédsku byl zaznamenán úbytek druhů bylinného patra po invazi voskovičkou, zatímco plochy původně dominované jilmem (*Ulmus glabra*) zůstaly stejně druhově bohaté jako před více než 30 lety. V obou případech došlo k posunu druhového složení ve všech patrech (Brunet et al., 2023). Ve světlinách jasanových lesů napadených voskovičkou byl zaznamenán vyšší podíl vysokých světlomilných druhů typických pro živinami bohaté lesní lemy, a naopak úbytek druhů stínomilných (Turczański et al., 2019). Nárůst pokryvnosti bylinného patra, zejména travin představuje konkurenční nevýhodu pro semenáčky stromů (Jochner-Oette et al., 2021) a potenciálně i pro konkurenčně slabší byliny. Vliv *Phytophthora alni* může být výraznější, protože olše vytváří výrazně stinnější porosty než jasan a navíc je významným fixátorem dusíku. Vegetační studie dynamiky mokřadních olšin (Pielech a Malicki, 2018) z Dolního Slezska (Polsko) připisuje změny společenstev autogenní cyklické dynamice. Pokryvnost stromového patra v opakovaných snímcích klesla za 20 let z cca 52 na 34 % a výsledky této studie tak mohou být analogické změnám po invazi *Phytophthora alni*. Nejzásadnější změnou byl nárůst pokryvnosti druhů šlenků včetně plovoucích makrofyt a naopak úbytek druhů vázaných na buly. Tato změna souvisí s nárůstem světla ve společenstvu a zejména se zvýšením vodní hladiny, která je pravděpodobně důsledkem snížené evapotranspirace po úhynu stromového patra.

Biodiverzita lužních a mokřadních lesů je ohrožena mnoha dalšími faktory jako jsou klimatické změny, invaze nepůvodních rostlin, změny vodního režimu, fragmentace, eutofizace, lesní hospodaření a podobně (rešerše viz Havrdová et al., 2023). Klimatické faktory limitují areály patogenů (Caballol et al., 2024; Redondo et al., 2015; Romportl et al., 2016), jejich šíření lze předpokládat zejména ve spojení s nárůstem teplot (zejména zimních) a s dostatkem srážek ve vegetační sezóně (Bjelke et al., 2016; Caballol et al., 2024; Jung et al., 2018; Simler-Williamson et al., 2019). Hostitelské stromy jsou navíc oslabovány klimatickými extrémů, suchem nebo naopak zaplavením, což zvyšuje jejich citlivost vůči patogenům i jejich životaschopnost jako takovou (Adams et al., 2009; Bjelke et al., 2016; Jung et al., 2018; Simler-Williamson et al., 2019; Strnadová et al., 2010) a zároveň lze předpokládat vliv klimatických extrémů také na bylinné patro (Havrdová et al., 2023).

Lužní lesy se také mění přirozeně, 75 % jihočeských lužních lesů vzniklo až v průběhu posledních 200 let na místech nivních luk nebo mokřadů (Douda, 2010). Ve středověku až do poloviny 20. století v nivách zcela převažovaly vlhké louky. Zbytky potočních a prameništích olšin byly v minulosti využívány jako pařeziny a běžně se v nich páslo (Boublík et al., 2013). Novodobá expanze olše v nivách pravděpodobně přispěla ke snížení diverzity rostlin, ale i dalších světlomilných organismů (Douda et al., 2009). Vliv invazního patogenu může s těmito procesy poměrně komplikovaně interagovat, odumírání olše může například přispět k opětovnému šíření některých světlomilných druhů. Oproti minulosti je však většina niv také silně obohacena o živiny a prosvětlení porostů může vést naopak k redukci diverzity díky šíření živinově náročných bylin a keřů. Nezanedbatelné je také riziko šíření dalších invazních druhů v narušených porostech (Schei et al., 2024).

Předpokladem pro studium vegetačních změn je opakovaný záznam vegetace na trvalých výzkumných plochách. Ne vždy však takové plochy v dostatečném počtu a náležitě lokalizovaných s ohledem na potenciální změny prostředí, které jsou často těžko předvídatelné (například šíření nového patogenu). S úspěchem se proto využívá starších vegetačních záznamů, původně provedených z jiných důvodů (např. Brunet et al., 2023). Pro vegetační studii změn vegetace olšin se jeví jako ideální opakování fytoecologických snímků provedených J. Doudou v Jižních Čechách ještě v době, kdy se *P. alni* v oblasti

teprve začínala šířit (Douda, 2010) a jsou velmi dobře lokalizované. Na základě opakování těchto záznamů budeme schopni splnit následující cíle studie:

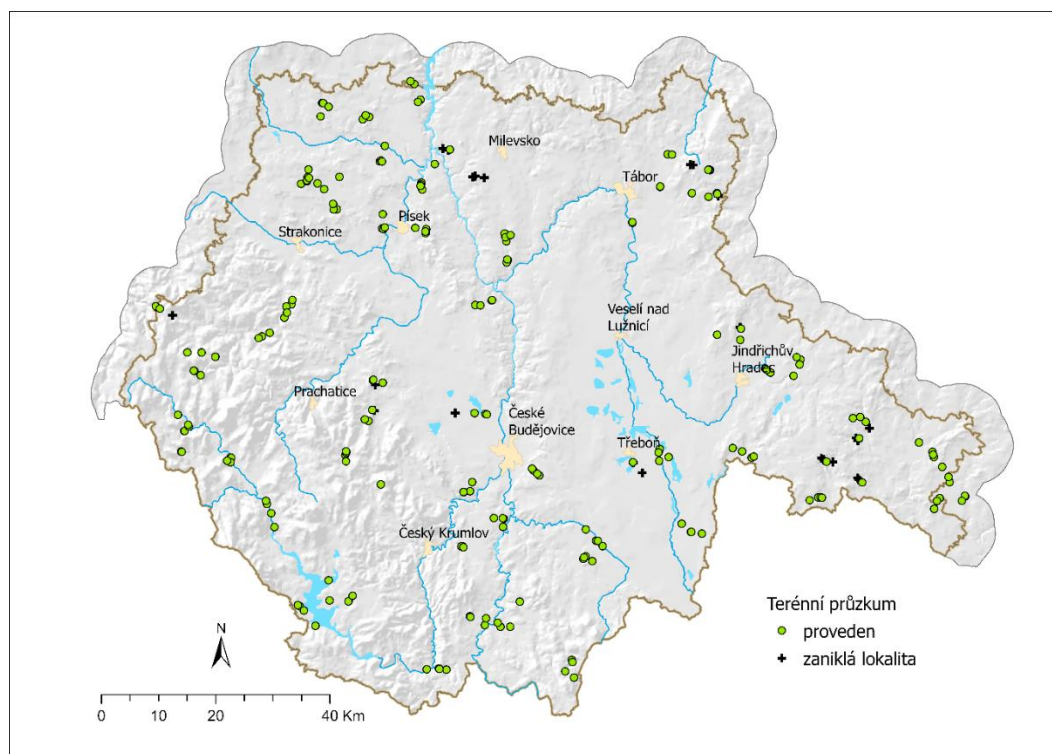
- 1) Ve vybrané síti lokalit zopakovat historická fytoocenologická hodnocení a identifikovat rozsah poškození stromového patra olšin a popsat vybrané měnící se parametry prostředí.
- 2) Na základě výsledků (1) identifikovat změny ve složení a struktuře invadovaných společenstev a zobecnit je.
- 3) Na základě krajinných, hydrologických, klimatických, porostních a dalších charakteristik a míry poškození biotopů vypracovat statistický model popisující citlivost biotopů olšin a změny v olšinách probíhající.
- 4) Vizualizace statistického modelu a tvorba mapového výstupu popisující změny biotopů a citlivost lokalit

2.2 Metody

2.2.1 Sběr dat

2.2.1.1 Opakování starých fytoocenologických snímků

V rámci výzkumu byly opakovány fytoocenologické snímky olšin a lužních lesů zaznamenaných J. Doudou v letech 2004–2006 (Douda, 2010). Dohledání lokalit probíhalo na základě souřadnic historických fytoocenologických snímků. Přesnější lokalizaci jsme následně prováděli na základě složení stromového patra (pokud bylo zachováno), reliéfu, originální klasifikace biotopu a dalších údajů z původních záznamů. Snímek se prováděl i v případě úplného zániku stromového patra. Neprováděl se a byl označen jako nedohledatelný pouze v případě zjevně chybné původní lokalizace nebo v případě velmi drastických změn (např. výstavba v místě snímku, zcela změněný reliéf). Záznam vegetace se prováděl podle zavedené metodiky sběru fytoocenologických snímků s využitím devítičlenné (rozšířené) Braun-Blanquetovy stupnice (r, +, 1, 2m, 2a, 2b, 3, 4, 5; Westhoff a van der Maarel, 1973). Dále jsme provedli odběr půdních vzorků na 5 místech v rámci snímku (uprostřed snímku, poblíž rohů snímku na diagonále cca 1 m od rohu snímku směrem k jeho středu) z 10 cm minerální vrstvy pod povrchem. Ještě na lokalitě byly vzorky smíchány, homogenizovány a pro další zpracování byl předán směsný vzorek. Celkem se nám podařilo zopakovat 214 z původních 240 historických snímků (Obr. 2). V dalších analýzách používáme 198 dvojic snímků, kde se v původních datech vyskytovala ve stromovém patře olše.



Obr. 2 Přehled zopakovaných fytoocenologických snímků

2.2.1.2 Monitoring *P. alni*

Monitoring napadení plísní olšovou byl proveden na 213 lokalitách (Obr. 4, Obr. 5). Konkrétní lokality a jejich počty se mírně liší od fytoocenologické části (kap. 2.2.1.1), protože ne na všech lokalitách se olše vyskytovala v původních vegetačních záznamech a některé plochy byly prozkoumány fytopatolog, ale nesplňovaly kritéria k opakování fytoocenologického snímku. Na všech 198 lokalitách fytoocenologických snímků s olší však proběhl monitoring *P. alni*. Na zaměřených plochách s olšinami byla zjišťována přítomnost typických symptomů fytoftorové hniloby olší. Jako symptomy charakteristické pro toto onemocnění byly reflektovány jazykovité léze s přítomností formací exsudátů na povrchu kůry a nekrotizovanými vodivými pletivy (akutní poškození) a dále starší poškození tohoto typu charakteristické vpádným vzhledem (bez přítomnosti exsudátů) a oddělováním se kalusem od pletiv zdravých, případně jazykovité či klínovité léze oddělené kalusem, případně i s odhaleným dřevem (s případnou sekundární kolonizací bazidiomycety). V případě přítomnosti pouze symptomů staršího poškození byly v nejbližším okolí (v poloměru cca 10–20 m) hledány symptomy poškození akutního. Pokud se na lokalitě vyskytovaly mrtvé stromy a pařezy, byly rovněž posouzeny z hlediska přítomnosti symptomů dřívějšího napadení.

Na trvalých plochách s výskytem typických symptomů choroby byl spočten počet všech olší včetně mrtvých jedinců a pařezů a dále zjištěn počet jedinců napadených – s přítomností výše popsaných symptomů a stromů s výraznějším poškozením korun (prosychání nad cca 25 %; Jung a Blaschke 2004). Odumření dřevin (mrtvé stromy, pařezy) v důsledku infekce bylo připsáno patogenu pouze v případě 1) přítomnosti typických symptomů přímo na pařezech a mrtvých stromech či 2) v případě přítomnosti symptomů na nejbližších jedincích, kdy lze předpokládat, že v důsledku ohniskovitého šíření byly tyto dřeviny rovněž napadeny. Pařezy a mrtvé stromy nebyly chorobě připsány v případě, kdy byl patogen na lokalitu recentně zavlečen (a nevyskytují se zde tedy symptomy typické pro postepidemickou fázi) a v případě, kdy se zjevně jednalo o úmyslné odštěpení dřeviny z jiného důvodu nebo zjevně odumření např.

z důvodů nadměrné konkurence stromů v horním patře či rozvoje korových nekrotů v důsledku poškození zvěří (vytloukání). Pro další vyhodnocení byl určen podíl jedinců s výskytem symptomů napadení a podíl jedinců odumřelých z důvodů napadení. Podíl napadených a odumřelých jedinců byl hodnocen ve stupních napadení: 0, 1–25, 26–50, 51–75, 76–99, 100 %.

Dále byly na ploše identifikovány symptomy typické pro akutní napadení (exsudáty, čerstvé léze vodivých pletiv) a odebrán materiál pro izolaci patogenu. Na lokalitě, pokud to bylo možné, byly odebrány alespoň 2–3(4) vzorky pro zvýšení pravděpodobnosti izolace patogenu či případné podchycení možné genetiky variability patogenu (ta se ovšem v rámci lokality či širšího porostu předpokládá spíše jako vzácnější případ). Pokud nebyl přímo na ploše identifikován akutně napadený strom (typický příklad pro postepidemickou fázi či v případě značně poškozených lokalit) byly symptomy hledány postupně v bližším (desítky m) až vzdálenějším okolí (stovky m). U blízkých lokalit (vzdálených max. stovky metrů a lokalizovaných v jednom porostu) lze předpokládat, že mohly být s vysokou pravděpodobností kolonizovány v průběhu jedné vlny identickým kmenem.

2.2.1.3 Izolace a determinace *P. alni*

Izolace byly prováděny z báze olší vykazujících charakteristické příznaky fytoftorové hniloby (Černý a Strnadová 2010). Z každého napadeného stromu byl odebrán jeden vzorek (tj. nebyly prováděny opakované izolace ze stejného stromu). Postup pro odběr vzorků z bazálních částí stromů byl prováděn podle standardní metodiky (Černý et al. 2010). Kůra na horním okraji léze (viditelné díky černému exsudátu) byla odstraněna a vodivá pletiva byla odebrána z přechodu mezi zdravou a napadenou oblastí. Odebrané vzorky byly umístěny do sterilního sáčku, označeny, rychle transportovány do laboratoře nebo krátce skladovány v chladničce. Nástroje byly před a po každém odběru dezinfikovány 95% ethanolem.

V laboratoři byly vzorky nakrájeny na kousky o velikosti přibližně 4×4×4 mm, povrchově sterilizovány v 95% ethanolu, opláchnuty v čisté vodě, vysušeny sterilním filtračním papírem a přeneseny na Petriho misky s V8-PARPH agarem selektivním pro oomycety (Jung et al. 1996). Na každou misku bylo umístěno maximálně 10 kousků. Poté byly misky umístěny do tmy, inkubovány při teplotě 20 °C a denně kontrolovány. Když se objevilo charakteristické hyalinní coenocytické mycelium, byly části mycelia z okraje kolonie přeneseny na V8 agar (200 ml šťávy V8, 15 g agaru a 3 g CaCO₃ na litr) a kmeny byly dále subkultivovány. Pro dlouhodobé skladování byly kmeny uchovávány na ovesném agaru (20 g ovesné mouky a 15 g agaru na litr) při 12 °C.

Čisté kultury *P. alni* s.l. byly rozpoznány podle typického vzhledu kolonií (mycelium přisedlé k agaru, vzdušné mycelium řídké, často nepravidelný okraj, relativně rychlý růst, homothalické s charakteristickými oogonií). Případné chyby v určení dle vzhledu kolonií byly odhaleny následnou analýzou mikrosatelitů. Příbuzný druh *P. ×cambivora*, který se může také vyskytovat na olších, je heterothalický a v nepřítomnosti druhého párovacího typu netvoří oogonia. Jeden izolát *P. ×cambivora* byl záměrně podroben stejné analýze mikrosatelitů jako *P. alni* s.l. (viz kap. 3.2.2.1), aby se vyloučila chybná interpretace výsledků, při případné záměně.

2.2.2 Proměnné prostředí pro analýzu vegetace

Průměrná teplota a množství srážek byly získány z nejbližší klimatické stanice ČHMÚ pro období pěti let před rokem sběru dat pro obě období sběru dat. Pokud byl rozdíl mezi nadmořskou výškou stanice a výzkumnou plochou větší než 100 m, použili jsme hodnoty z další nejbližší stanice až do vzdálenosti 30 km.

Půdní vzorky odebrané na lokalitách byly vysušeny a prosety přes 2 mm (hrubá frakce) a 0,25 mm (jemná frakce) síto. Proběhla analýza pH(H₂O), celkového uhlíku (C), dusíku (N), obsahu výměnných kationtů Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ a rostlinám dostupného fosforu (P). Půdní pH bylo měřeno v suspenzi 5 g hrubé frakce půdy a 25 ml destilované vody standardní skleněnou elektrodou. Celkový

obsah C a N byl zjištěn pomocí C/N analyzátoru (LECO 928 Series). Z jemné frakce byly extrahovány dostupné prvky (Ca, K, Mg a P) Mehlichovou metodou 3 (Mehlich, 1984), obsah prvků byl analyzován přístrojem ICP-OES (PerkinElmer Avio 500). Hladina podzemní vody (vlhkost stanoviště) byla odhadována pouze v minulosti (Douda, 2010) jako hloubka redukčního horizontu v půdě (Héroult a Honnay, 2005). Pokud nemohla být hloubka redukčního horizontu určena (například písčité půdy), byla hladina podzemní vody určena relativně k hladině vodního toku.

2.2.3 Statistická analýza dat

Testovali jsme změny ve vegetaci olšin mezi oběma obdobími sběru dat, všechny analýzy probíhaly v programu R (R Core Team, 2024). Vlastnosti bylinného patra jsme vyjádřili pomocí tří charakteristik, které jsme spočetli pomocí knihovny *vegan* (Oksanen et al., 2024): počet druhů bylin ve snímku, index dominance v bylinném patře pomocí Simpsonova indexu: $\sum_{i=1}^S p_i^2$, kde p_i je podíl druhu i a S je počet druhů ve snímku, a míru nepodobnosti vegetace v průběhu času. Míru nepodobnosti mezi historickými a současnými snímky jsme kalkulovali pomocí Bray-Curtis indexu ($\sum |x_{ij} - x_{ik}| / \sum (x_{ij} + x_{ik})$), kde x_{ik} jsou logaritmicky transformované pokryvnosti v současných snímcích a x_{ij} jsou obdobně pokryvnosti v historických snímcích. Rozdíly v diverzitě jsme testovali zobecněnými lineárními modely se smíšenými efekty (GLMM) s Poissonovým rozdělením. Číslo plochy vstupovalo jako náhodný efekt (definující intercept). Období sběru, typ společenstva a interakce těchto proměnných byly vysvětlujícími proměnnými. Podobně jsme použili lineární smíšené modely pro analýzu dominance a pokryvnosti olše. Modely byly spočítány pomocí knihovny *lme4* (Bates et al., 2015). Párová porovnání pomocí Tukey post-hoc testu byly provedeny v knihovně *emmeans* (Lenth, 2024).

Změny druhového složení mezi oběma obdobími jsme analyzovali pomocí kanonické korespondenční analýzy (CCA) v prostředí knihovny *vegan*. Analýza proběhla s logaritmicky transformovanými pokryvnostmi druhů vyskytujících se ve více než 5 % snímků. ID plochy bylo použito jako kovariáta omezující porovnání na starý a nový snímek z téže lokality. Čas jako faktor byl jedinou vysvětlující proměnnou a analýzu jsme provedli odděleně pro tři různé typy vegetace. Statistická významnost proměnné byla testována Monte-Carlo permutačním testem. Interpretaci změn ve vegetaci umožnilo použití několika vlastností druhů, které byly pasivně promítnuty do ordinačního diagramu, pokud byly průkazně korelované s 1. ordinační osou. Použili jsme obsah sušiny v listu (leaf dry matter content, LDMC) a specifickou listovou plochu (specific leaf area, SLA), které souvisí s dostupností světla a vody. Dále jsme použili výšku rostliny a schopnost vegetativního šíření z databázi LEDA (Kleyer et al., 2008) a CloPla (Klimešová et al., 2017). Použity byly také Ellenbergovy indikační hodnoty pro teplotu (temperature), světlo (light), vlhkost (moisture) a živiny (nutrients) (Chytrý et al., 2018).

Abychom určili vliv napadení *P. alni* na strukturu a složení olšin, vytvořili jsme dílčí strukturální modely, které zahrnovaly přímé i nepřímé vlivy jednotlivých proměnných. Ve všech modelech byly použity rozdíly mezi současným a historickým obdobím (Δ) a hodnoty faktorů v historickém období jako kovariáty. Napadení *P. alni* bylo sledováno pouze v současném období a vlhkost stanoviště byla měřena v historickém období. Při tvorbě modelů jsme zohlednili vliv různých prostorových měřítek. Regionální klima bylo vyjádřeno jako změny teploty (Δ Temp) a srážek (Δ Prec). Napadení *P. alni* (Phyth) bylo vyjádřeno jako podíl odumřelých napadených stromů. Předpokládali jsme, že tento faktor působí na bylinné patro a půdní vlastnosti na lokální úrovni, kdy ovlivňuje stromový zápoj olší (Δ Alnus cover) a podíl mrtvého dřeva. Vlhkost byla měřena jako hloubka hladiny podzemní vody, přičemž záporné hodnoty označovaly hladinu pod povrchem a nulové hodnoty označovaly podmáčené lokality. Půdní podmínky byly vyjádřeny změnami koncentrace Ca^{2+} (Δ Ca) a dostupného fosforu (Δ P), které nebyly významně korelovány a reprezentují přísuny živin ze zemědělství (P) a kvalitu opadu (Ca). SEM jsme použili k vysvětlení změn v bylinné diverzitě, dominanci a disimilaritě. Před úpravou modelu byla provedena logaritmická transformace proměnných P, Ca, teploty a dominance. Modely byly hodnoceny pomocí Fisherova C testu a AIC kritéria. Nejlepší model byl určen postupným odstraňováním

nevýznamných proměnných. Standardizované koeficienty byly použity k hodnocení vlivu prediktorů a vysvětlená variabilita byla vyjádřena hodnotou R^2 . Analýzy byly provedeny pomocí balíčku *piecewiseSEM* (Lefcheck, 2016).

2.2.4 Tvorba map

Tvorba mapových výstupů pro Jihočeský kraj se soustředila na statistické modelování prostorové distribuce vybraných charakteristik olšových luhů a mokřadů a tvorbu jednoduchých predikcí za různých stavů rozšíření patogenu. Prostorová složka má v analýzách významnou roli, i když nemusí být vždy přímo interpretovatelná jako ostatní prediktory, které do analýzy vstupují. Prostorová složka slouží pro charakterizování prostorové dynamiky jednotlivých jevů, slouží k odfiltrování prostorových autokorelací a tím spolehlivější interpretaci statistických závislostí (Václavík et al., 2012) a nakonec může sloužit ke generování nových hypotéz. Jako vysvětlující proměnné jsme použili pouze data velkého geografického rozsahu, která jsou běžně dostupná (Tab. 1). Abychom mohli co nejpřesněji modelovat prostorovou složku, využili jsme zobecněných aditivních modelů (Generalized Additive Model (GAM)) v prostředí programu R (R Core Team, 2024), knihovna *mgcv* (Wood, 2017). Prostor byl modelován jako hladký povrch na základě souřadnic X a Y (v jednotkách m mapového souřadnicového systému S-JTSK). Tam, kde to mělo smysl (opakovaná měření na lokalitách), byla testována také interakce prostorové složky a období. Oprávněnost této interakce byla posuzována pomocí AIC (Sakamoto et al., 1986). Ostatní proměnné vstupovaly do modelu jako parametrické členy včetně jejich vybraných interakcí. Výchozí model byl zjednodušen postupným odebráním proměnných s $p > 0,1$. Výsledné rastrové mapy byly spočítány na základě výsledných modelů. Některé mapy vznikly v několika variantních řešeních – scénářích (minulost, současnost, míra napadení patogenem). Základní mapy vznikly v rozlišení 10 m pro jednotlivé biotopy L2.2, L2.1 a L1, pro lepší reprezentaci na velké prostorové škále byly následně tyto mapy přepočítány na rozlišení 2500 m průměrováním. Mapy zobrazují pouze oblast, kde je statistický model dostatečně spolehlivý.

Tab. 1 Přehled vysvětlujících proměnných použitých pro tvorbu rastrových map

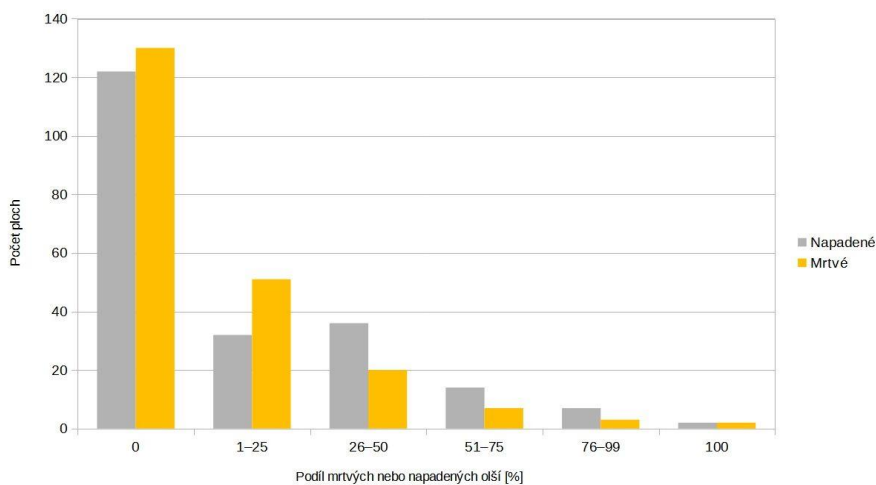
Proměnná	Transformace	Charakteristika	Původ
periodcode	periodcode	Období, po které je modelováno (období sběru dat). Kategoriální proměnná (1,2)	Vlastní data
AlnDec	AlnDec	Míra narušení porostu plísní olšovou (podíl mrtvých olší vztahený k původní pokryvnosti olší v porostu).	Vlastní data
HabitatNumber1km	HabitatNumber1km	Počet biotopů Natura 2000 v okolí o poloměru 500 m.	Mapování biotopů Natura 2000 (AOPK ČR, 2024)
LuhyMokr1km	$\log_{10}(\text{LuhyMokr1km}+0,001)$	Plocha biotopů L1, L2.1 a L2.2, v okolí o poloměru 500 m.	Mapování biotopů Natura 2000 (AOPK ČR, 2024)
UrbanDistance	$\sqrt{\text{UrbanDistance}}$	Vzdálenost k nejbližší zastavěné ploše.	ČÚZK (2021)
Kvalita121km	$\log_{10}(\text{Kvalita121km}+0,001)$	Plocha přírodních biotopů kvality 1 nebo 2 v okolí o poloměru 500 m.	Mapování biotopů Natura 2000 (AOPK ČR, 2024)
RoadsDistance	$\sqrt{\text{RoadsDistance}}$	Vzdálenost od silnice.	ČÚZK (2021)
WaterDistance	$\sqrt{\text{WaterDistance}}$	Vzdálenost od vodního toku nebo vodní plochy.	ČÚZK (2021)

ModifiedCatchmentArea	$\sqrt{\text{ModifiedCatchmentArea}}$	Velikost povodí nad lokalitou.	DMR 4G (ČÚZK 2015) výpočet (Böhner & Selige 2006) v prostředí SAGA (Conrad et al. 2015)
TopographicWetnessIndex	TopographicWetnessIndex	Topografický vlhkostní index.	DMR 4G (ČÚZK 2015) výpočet (Böhner and Selige, 2006) v prostředí SAGA (Conrad et al., 2015)
Agro1km	$\log_{10}(\text{Agro1km}+0,001)$	Plocha orné půdy v okolí o poloměru 500 m.	CORINE Land Cover 2006 (2020), CORINE Land Cover 2018 (2020)
biotopcode	biotopcode	Kód biotopu (příslušnost biotopu). Kateriální, biotopy L1 jsou kategorie 1, biotopy L2.1 a L2.2 jsou sloučeny v kategorii 2.	Mapování biotopů Natura 2000 (AOPK ČR, 2024)
Elevation	Elevation	Nadmořská výška.	DMR 4G (ČÚZK 2015)
Elevationsd	Elevationsd	Variabilita nadmořské výšky – standardní odchylka.	DMR 4G (ČÚZK 2015)
X	X	souřadnice X [m]	Vlastní data
Y	Y	souřadnice Y [m]	Vlastní data

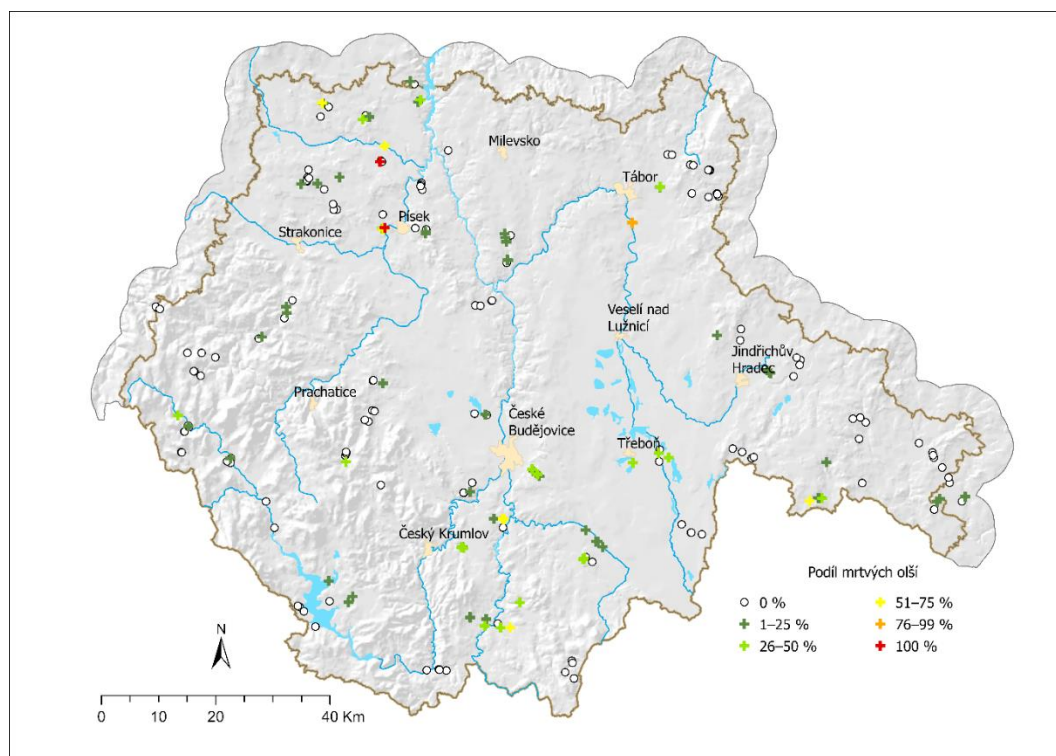
2.3 Výsledky

2.3.1 Základní popis dat

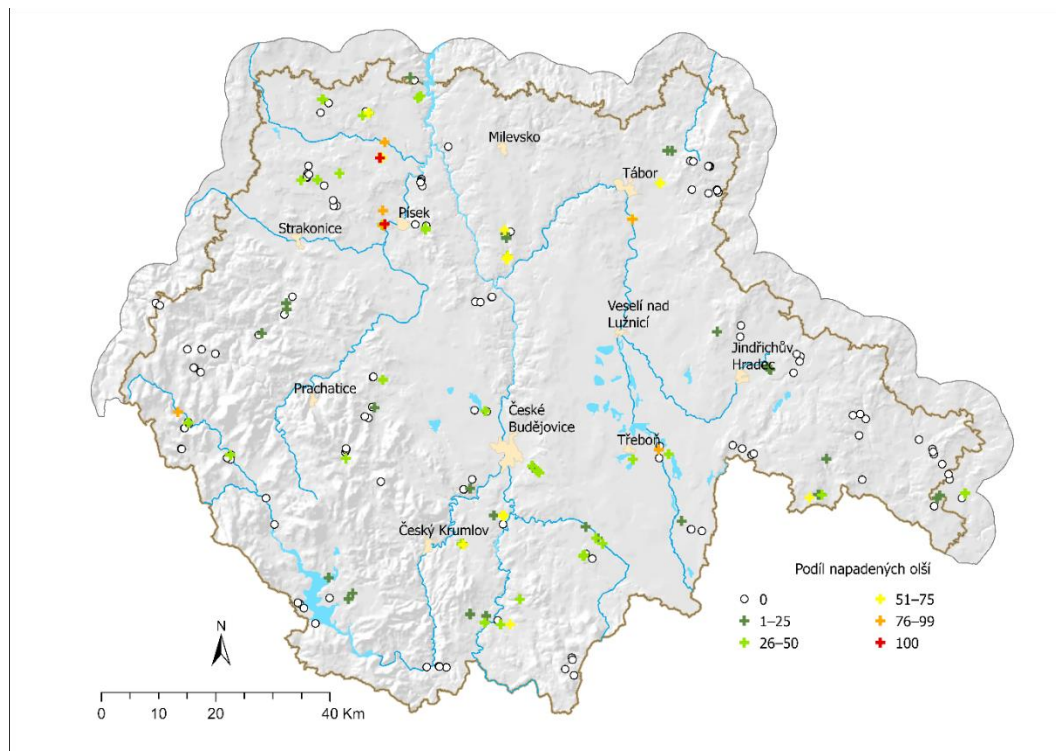
Rozsah napadení hostitele na jednotlivých plochách byl velmi různorodý, u 21 ploch (23 %) s výskytem patogenu bylo napadeno více než 50 % jedinců hostitele a celkem na dvanácti plochách (13 %) byl úbytek olší větší než 50 %. Rozložení míry poškození v rámci výzkumných ploch ukazuje Obr. 3. Zajímavá je prostorová distribuce napadení olše. Dosud lze nalézt malé oblasti, kde *Phytophthora* téměř chybí (např. okolí Dolní Hořice). Jinak je velmi široce rozšířena, ale i ve velmi silně zasažených oblastech je dopad na porosty olše velmi různorodý a najdeme i nezasazené lokality (Obr. 4 a Obr. 5).



Obr. 3 Poškození porostů olší na výzkumných plochách



Obr. 4 Podíl mrtvých olší na prozkoumaných lokalitách



Obr. 5 Podíl napadených olší na prozkoumaných lokalitách

2.3.2 Mapy

Mapové výstupy jsou samostatným výsledkem projektu a jsou publikovány v plném rozsahu na geoportálu VÚK (<https://vukoz.maps.arcgis.com/home/index.html>). Zde uveřejňujeme vybrané výsledky.

2.3.2.1 Pravděpodobnost výskytu patogenu dle podmínek prostředí

Model pravděpodobnosti výskytu *P. alni* v JČ kraji neodhalil výraznou prostorovou akumulaci v některé části území, která by nebyla vysvětlitelná podmínkami prostředí (obr. 6) a celkově model vysvětluje poměrně malou část variability dat (necelých 12 %). Model ukazuje negativní závislost výskytu na nadmořské výšce a na variabilitě reliéfu (nadmořské výšky). V modelu nebyl signifikantní vliv původní pokryvnosti olší ani plocha olšin v okolí. Specifikace a výsledky modelu následují:

```
Family: binomial
Link function: logit
```

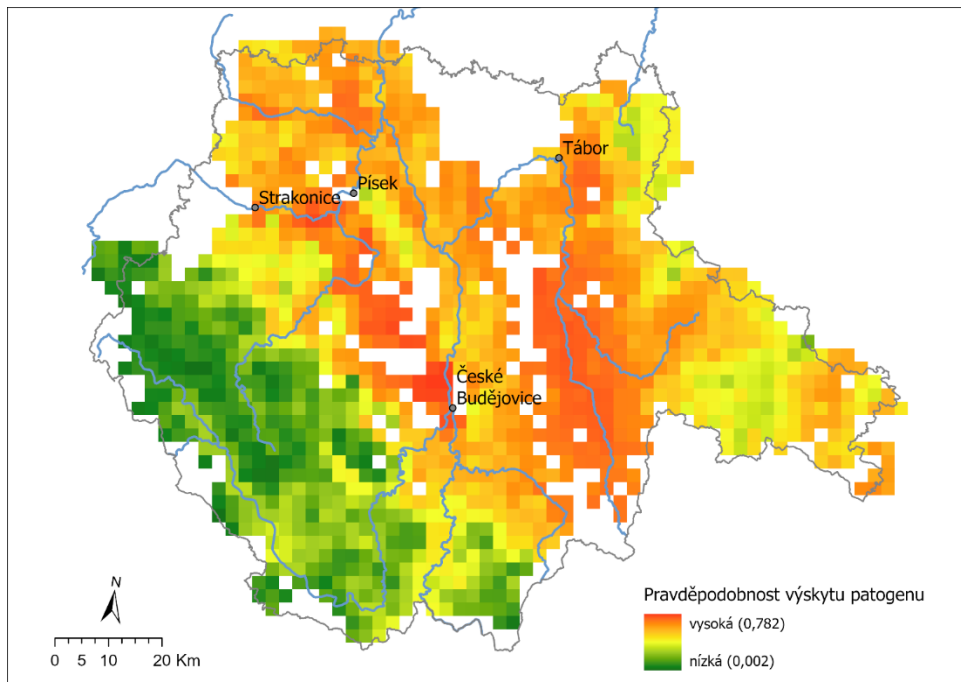
```
Formula:
presence ~ Elevation + Elevationsd
```

```
Parametric coefficients:
```

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	3.020969	0.738381	4.091	4.29e-05	***
Elevation	-0.004465	0.001462	-3.053	0.00226	**
Elevationsd	-0.041567	0.016629	-2.500	0.01243	*

```
---
```

```
R-sq. (adj) = 0.139   Deviance explained = 11.7%
UBRE = 0.24932   Scale est. = 1           n = 196
```



Obr. 6 Modelovaná pravděpodobnost výskytu *P. alni*.

2.3.2.2 Změna pokryvnosti olše ve stromovém patře

Model změn pokryvnosti olše (*Alnus glutinosa* a *Alnus incana*, případně kříženci) ukázal, že prostorová distribuce se mezi starými a současnými daty změnila (z dat víceméně bez prostorové struktury v minulosti v data s výraznou strukturou v současnosti, obr. 7, obr. 8, obr. 9). Kromě prostoru a jeho interakce s obdobím v konečném modelu vystupují jako prediktory: období (ukazuje, že pokryvnost olše se výrazně plošně snížila, ale nikoliv všude stejně), rozloha kvalitních biotopů v okolí (-), variabilita reliéfu (+), rozloha olšových luhů a mokřadů v okolí (+), vzdálenost od silnic (+), topografický index vlhkosti (+), a interakce období a vzdálenosti k zastavěné oblasti, která ukazuje, že v porovnání s minulostí se v současnosti pokryvnost olše snížila méně ve větší vzdálenosti od zastavěných ploch. Zajímavé je, že přítomnost *P. alni* nebyla v konečném modelu významná, pokryvnost olše se tedy snižuje bez ohledu na přítomnost patogenu. Model vysvětluje 18,4 % variability dat. Specifikace a výsledky modelu následují:

```
Family: gaussian
Link function: identity
```

```
Formula:
asin(sqrt(AlnusE3/100)) ~ periodcode + log10(Kvalita121km + 0.001) +
  DMRsd + log10(LuhyMokr1km + 0.001) + sqrt(RoadsDistance) +
  TopographicWetnessIndex + sqrt(UrbanDistance) + s(X, Y, bs = "gp",
  by = periodcode) + periodcode:sqrt(UrbanDistance)
```

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	0.711053	0.101772	6.987	1.32e-11	***
periodcode2	-0.190359	0.063788	-2.984	0.003032	**
log10(Kvalita121km + 0.001)	-0.039932	0.019221	-2.078	0.038441	*
Elevationsd	0.001737	0.001043	1.665	0.096684	.
log10(LuhyMokr1km + 0.001)	0.071136	0.019157	3.713	0.000236	***
sqrt(RoadsDistance)	0.002282	0.001159	1.969	0.049732	*
TopographicWetnessIndex	0.019665	0.010148	1.938	0.053411	.
sqrt(UrbanDistance)	-0.002539	0.002128	-1.193	0.233716	
periodcode2:sqrt(UrbanDistance)	0.006202	0.002993	2.072	0.038967	*

Approximate significance of smooth terms:

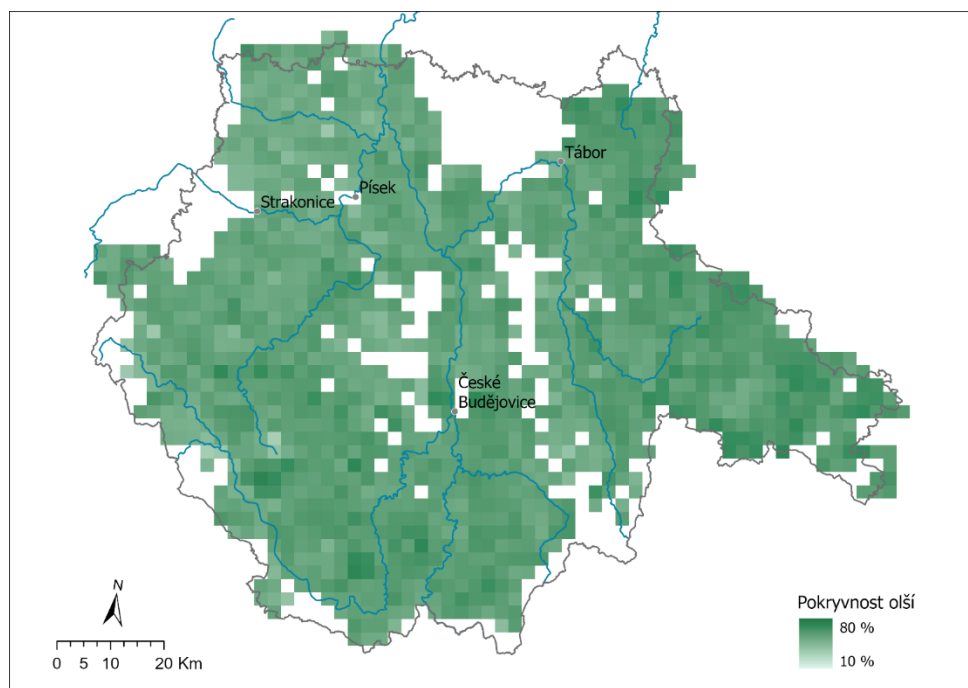
	edf	Ref.df	F	p-value	
s(X,Y):periodcode1	2.000	2.00	1.534	0.21700	
s(X,Y):periodcode2	9.457	12.07	2.652	0.00219	**

Rank: 63/73

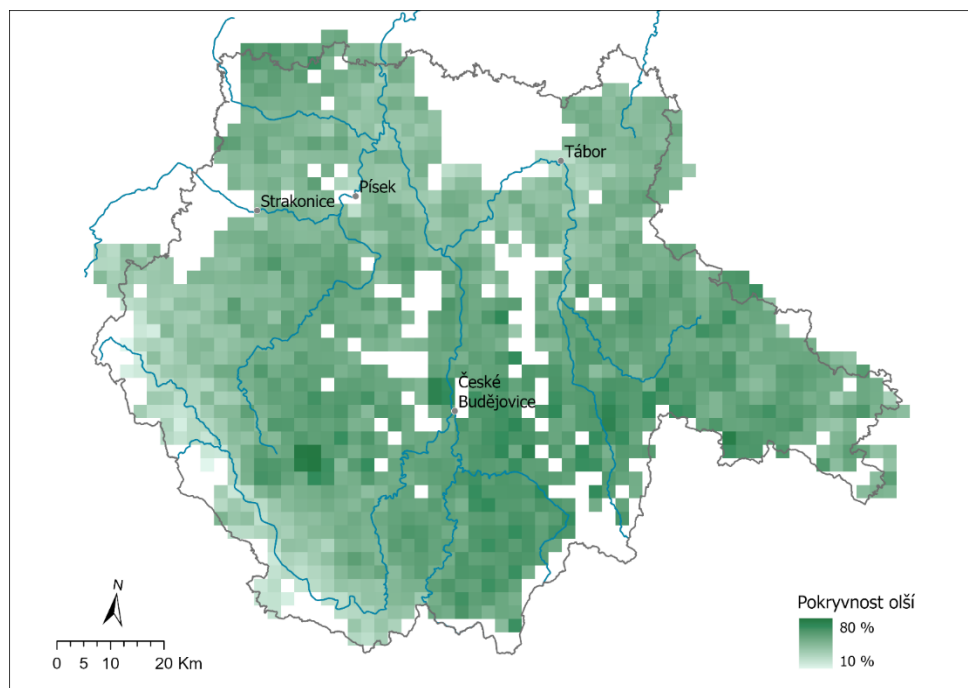
R-sq. (adj) = 0.141 Deviance explained = 18.4%

GCV = 0.04223 Scale est. = 0.040015 n = 390

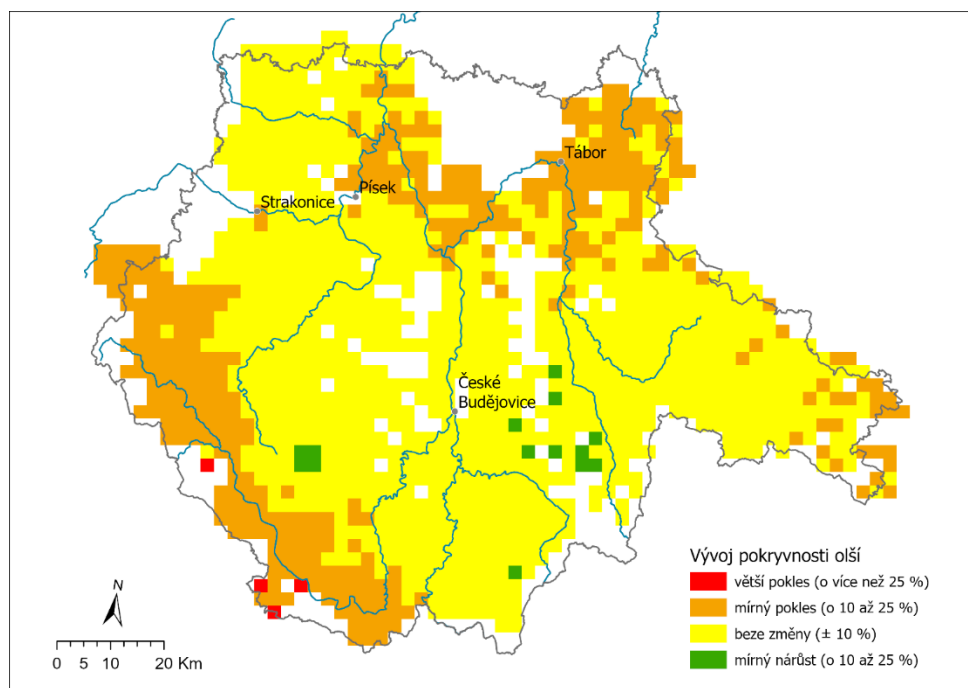
Data jsme v tomto případě transformovali arcsinovou transformací, v mapě však vystupují data zpětně transformovaná. Základem pro vytvoření jednotlivých interpolací je manipulace vždy s jednou zájmovou proměnnou (období).



Obr. 7 Model průměrné pokrývnosti olší v minulosti.



Obr. 8 Model průměrné pokrývnosti olší v současnosti.



Obr. 9 modelovaný vývoj průměrné pokrývnosti olší mezi lety 2004 a 2023.

Mapy dobře ukazují změnu prostorové distribuce pokrývnosti olší na velké prostorové škále i absenci korelace s výskytem patogenu (na velké prostorové škále, srv. s obr. 6).

2.3.2.3 Diverzita rostlin v bylinném patře – predikce vývoje při absenci/prezenci patogenu a různé míře poškození stromového patra

Kromě prostoru a jeho interakce s obdobím v konečném modelu vystupují jako prediktory: období (ukazuje, že počet druhů se snížil), biotop (počet druhů je nižší v L1 než ve sloučeném typu L2.2 a L2.1), plocha kvalitních biotopů v okruhu 1 km (ovlivňuje počet druhů pozitivně), plocha povodí (+), vzdálenost od silnic (+), vzdálenost od nejbližší výstavby (-), vzdálenost od toků a vodních ploch (-), interakce období a biotopu (výrazněji se snížil počet druhů v biotopech L2.1 a L2.2 než v biotopech L1), interakce období a míry napadení (ukazuje, že míra napadení přispěla k rozdílu mezi starým a novým počtem druhů), interakce stáří a vzdálenosti od nejbližší výstavby (počet druhů se snížil méně ve větší vzdálenosti od výstavby). Model vysvětluje 43,8 % variability dat.

Family: poisson
Link function: log

Formula:

```
Specnum ~ periodcode + AlnDec + biotopcode + log10(Kvalita121km +  
  0.001) + sqrt(ModifiedCatchmentArea) + sqrt(RoadsDistance) +  
  sqrt(UrbanDistance) + sqrt(WaterDistance) + s(X, Y, bs = "gp",  
  by = periodcode) + periodcode:sqrt(UrbanDistance) + periodcode:AlnDec  
+  
  periodcode:biotopcode
```

Parametric coefficients:

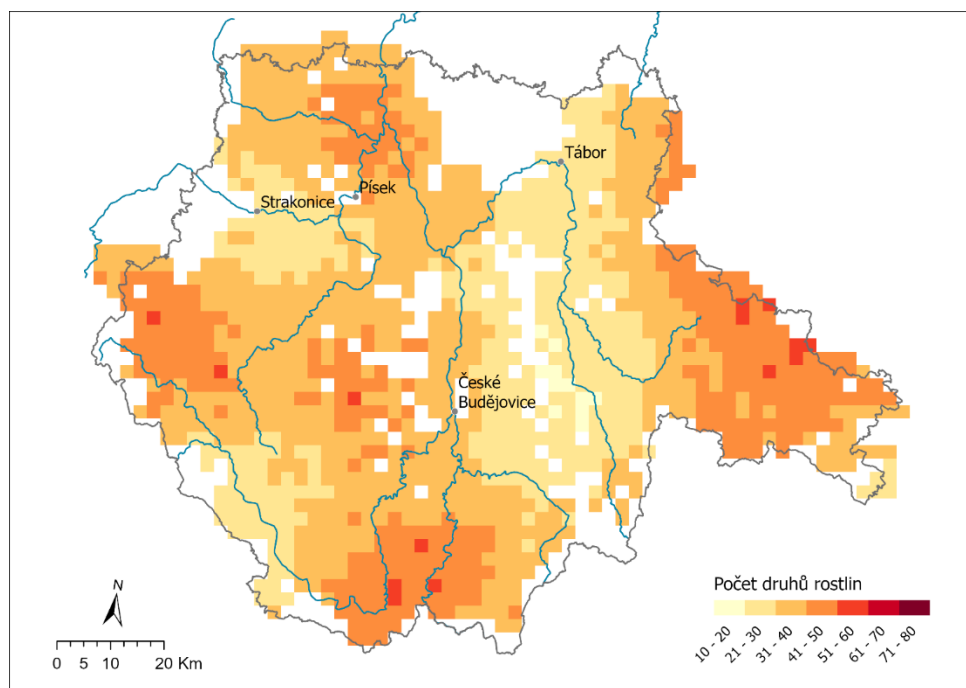
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	3.4978120	0.0699949	49.972	< 2e-16	***
periodcode2	-0.1562453	0.0771141	-2.026	0.042749	*
AlnDec	0.0005802	0.0014152	0.410	0.681830	
biotopcode2	0.1596983	0.0361922	4.413	1.02e-05	***
log10(Kvalita121km + 0.001)	0.0479172	0.0220861	2.170	0.030040	*
sqrt(ModifiedCatchmentArea)	0.0004917	0.0001354	3.630	0.000283	***
sqrt(RoadsDistance)	0.0057978	0.0011496	5.043	4.58e-07	***
sqrt(UrbanDistance)	-0.0098415	0.0021640	-4.548	5.42e-06	***
sqrt(WaterDistance)	0.0046117	0.0024065	1.916	0.055318	.
periodcode2:sqrt(UrbanDistance)	0.0064029	0.0030198	2.120	0.033979	*
periodcode2:AlnDec	-0.0048525	0.0021321	-2.276	0.022853	*
periodcode2:biotopcode2	-0.1463385	0.0528972	-2.766	0.005667	**

Approximate significance of smooth terms:

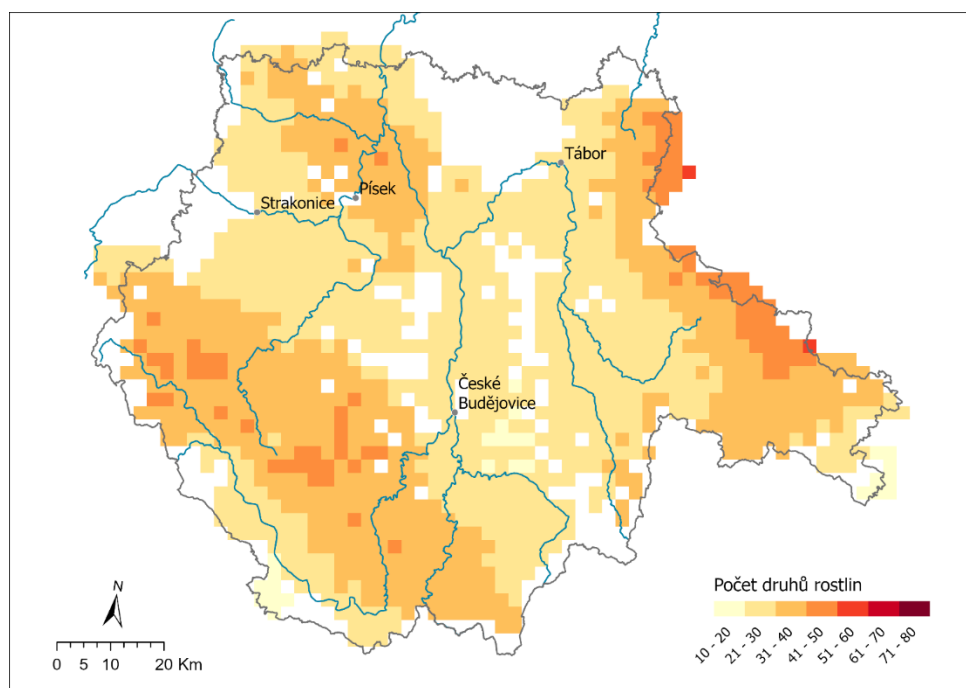
	edf	Ref.df	Chi.sq	p-value	
s(X,Y):periodcode1	26.49	28.64	177.9	<2e-16	***
s(X,Y):periodcode2	25.78	28.34	155.9	<2e-16	***

R-sq.(adj) = 0.314 Deviance explained = 43.8%
UBRE = 1.3806 Scale est. = 1 n = 390

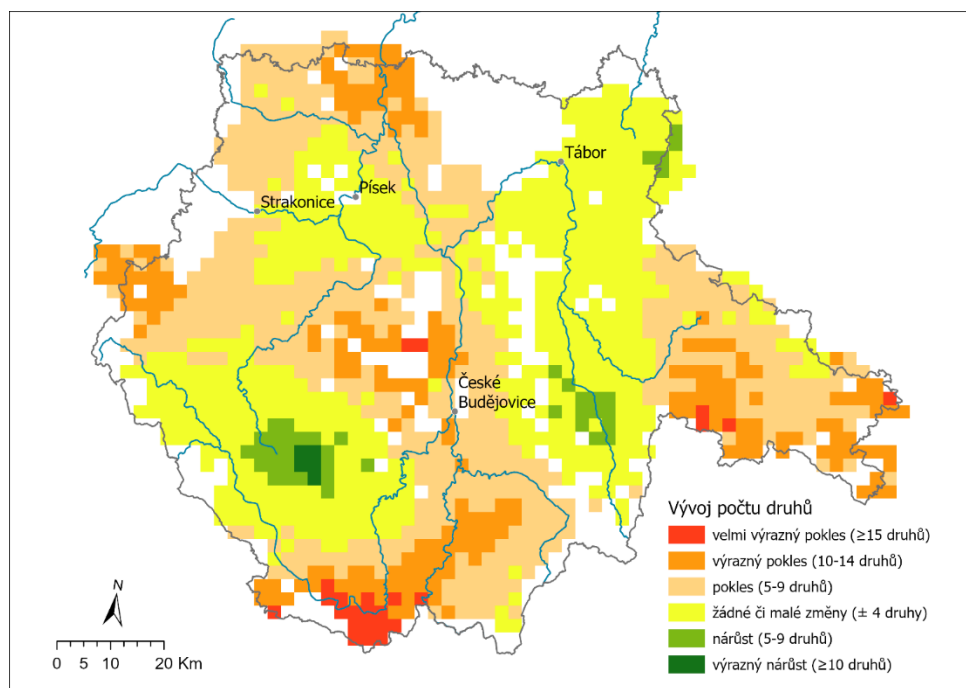
Základem pro vytvoření jednotlivých interpolací je manipulace vždy s jednou zájmovou proměnnou (období nebo míra napadení porostu), mapy tak umožňují posoudit pro konkrétní lokalitu potenciální riziko při napadení patogenem.



Obr. 10 Průměrný modelovaný počet druhů bylinného patra ve společenstvu (snímku) v minulosti (2004–2006).

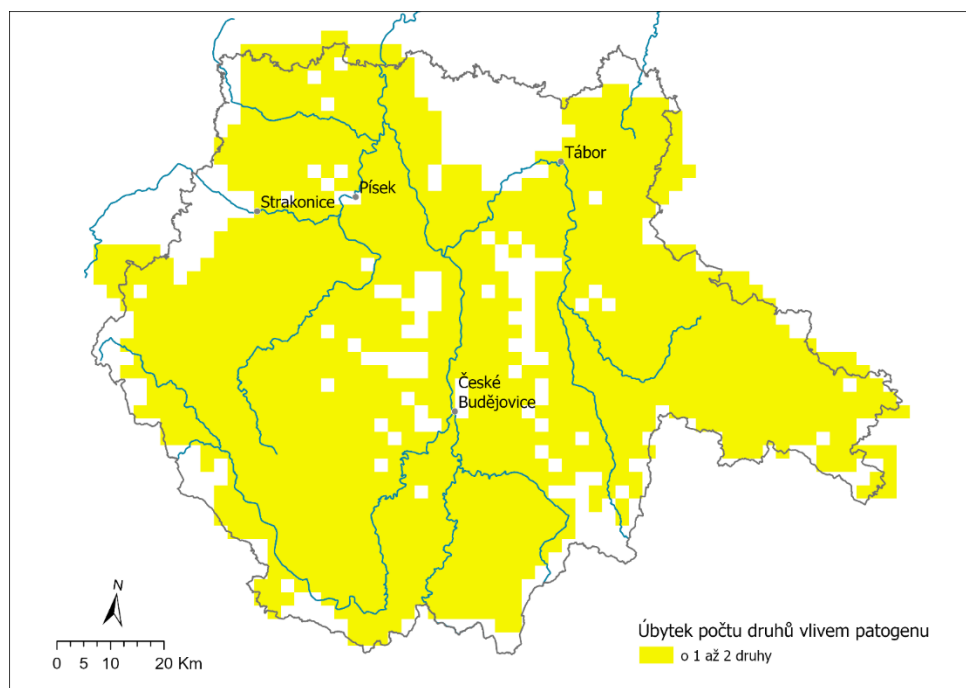


Obr. 11 Průměrný modelovaný počet druhů bylinného patra ve společenstvu (snímku) v současnosti (2022–2023) za předpokladu absence patogenu.

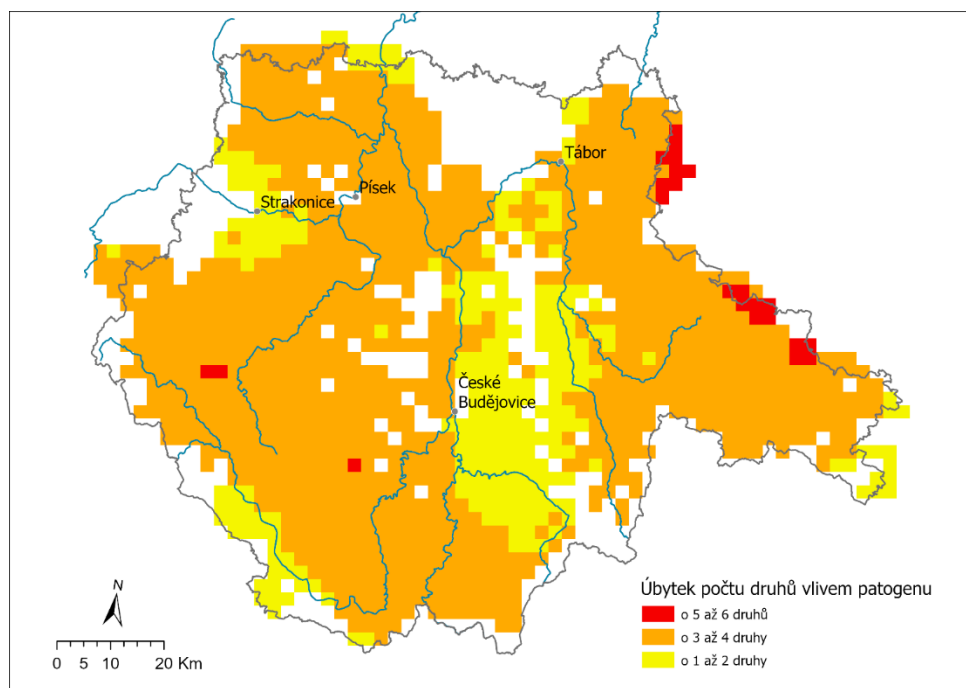


Obr. 12 Modelovaný vývoj počtu druhů v období 2004–2023 za předpokladu absence patogenu (rozdíl mezi obr. 11 a obr. 10).

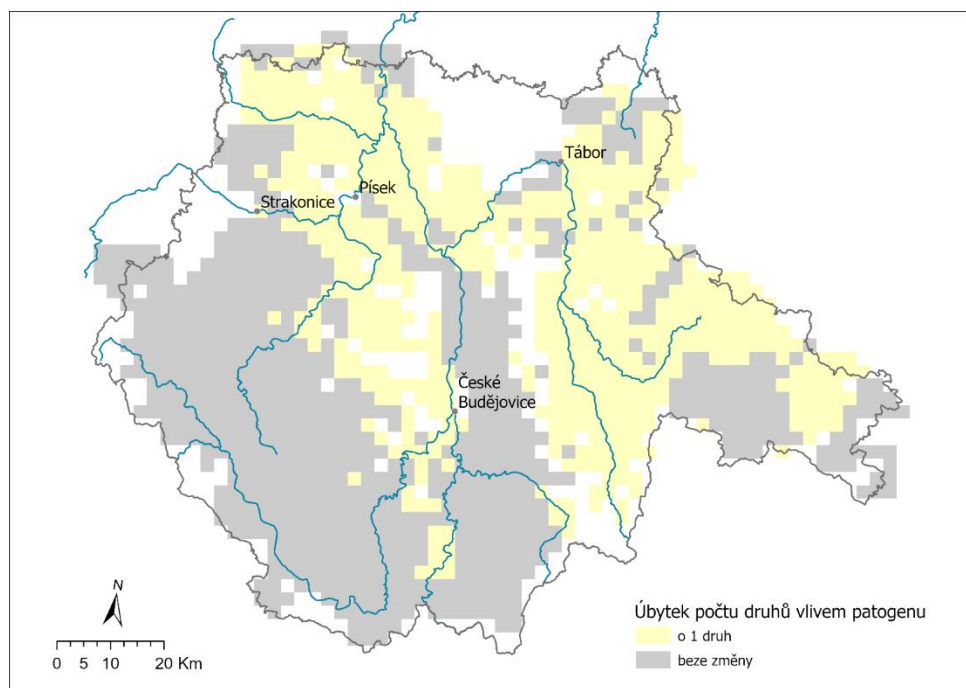
Porovnání map z obou období (obr. 10, obr. 11, obr. 12) ukazuje, že ve většině území počet druhů poměrně výrazně klesl i bez přičinění patogenu, ale existují i oblasti s nárůstem počtu druhů. Celkově se pattern druhové diverzity v olšinách poměrně výrazně změnil, a to v nížinách i v horách. Zajímavý je nárůst počtu druhů v části Šumavy v kontrastu s jeho poklesem u Vyššího Brodu nebo u Vimperku, podobně v nížině kontrastuje Třeboňsko s oblastí SZ od Českých Budějovic. Je potřeba si uvědomit, že absolutní hodnota změny je ovlivněna také výchozím počtem druhů (druhově bohatá společenstva se pravděpodobněji změní více kterýmkoliv směrem).



Obr. 13 Průměrný modelovaný úbytek počtu druhů bylinného patra ve společenstvu (snímku) v současnosti (2022–2023), který lze přisoudit patogenu za předpokladu obvyklého poškození stromového patra patogenem (poškození odpovídá mediánu poškození).



Obr. 14 Průměrný modelovaný úbytek počtu druhů bylinného patra ve společenstvu (snímku) v současnosti (2022–2023), který lze přisoudit patogenu za předpokladu extrémního poškození stromového patra patogenem (poškození odpovídá 10 % nejzasaženějších porostů).



Obr. 15 Průměrný modelovaný úbytek počtu druhů bylinného patra ve společenstvu (snímku) v současnosti (2022–2023), který lze přisoudit patogenu za předpokladu skutečného poškození stromového patra patogenem (poškození odpovídá modelu na obr. 6).

V porovnání s amplitudou změn v čase způsobených jinými faktory nemá invaze *P. alni* velký význam, při obvyklém poškození porostů způsobí průměrný úbytek o 1–2 druhy (obr. 13) v nejhorším scénáři může způsobit poměrně zásadní úbytek druhů (obr. 14), je však nepravděpodobné, že by se tak extrémní poškození vyskytlo plošně. Realistický odhad současného stavu (obr. 15) ukazuje téměř zanedbatelné změny v průměrném počtu druhů ve společenstvech.

2.3.2.4 Šíření vybraných invazních druhů v olšínách

Modelovali jsme šíření netýkavky malokvěté (*Impatiens parviflora*) a netýkavky žláznaté (*I. glandulifera*). Vstupními bodovými daty byla terénní současná a historická fytoocenologická data převedená na presenci/absenci obou druhů. V případě netýkavky malokvěté nebyl prostorový člen významný, významné bylo období (v současnosti je druh výrazně častější), nadmořská výška (ovlivňuje výskyt negativně), plocha kvalitních biotopů v okolí (-), plocha povodí (+) a vzdálenost od silnic (-). Z modelu je tedy zřejmé kontinuální obsazování dalších lokalit (obr. 16, obr. 17). Model vysvětluje 28,3 % variability dat:

Family: binomial
Link function: logit

Formula:

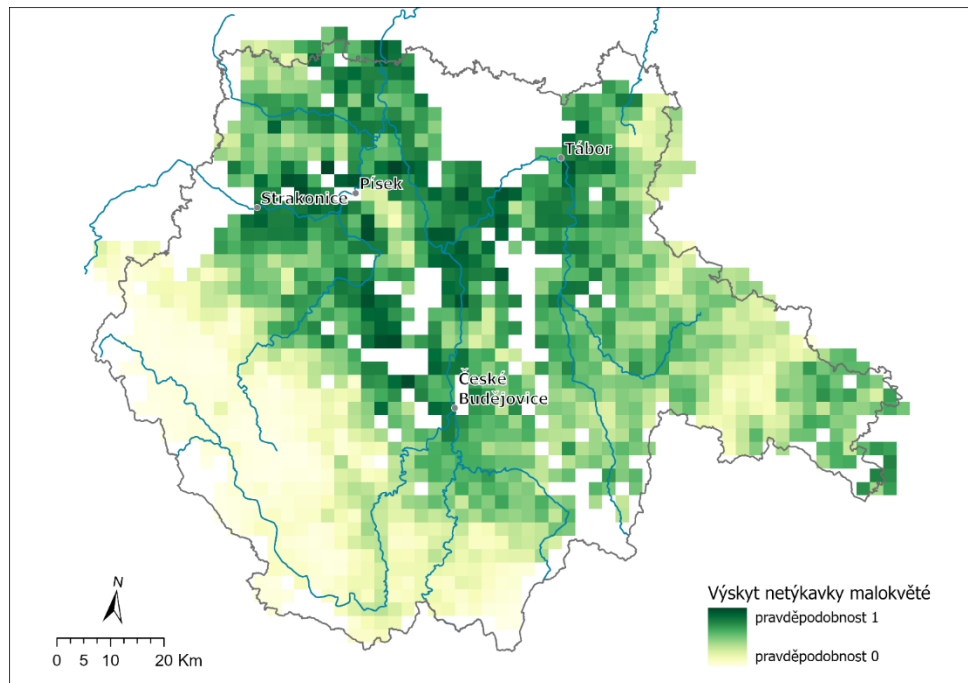
```
ImpParvi ~ periodcode + Elevation + log10(Kvalita121km + 0.001) +
sqrt(ModifiedCatchmentArea) + sqrt(RoadsDistance)
```

Parametric coefficients:

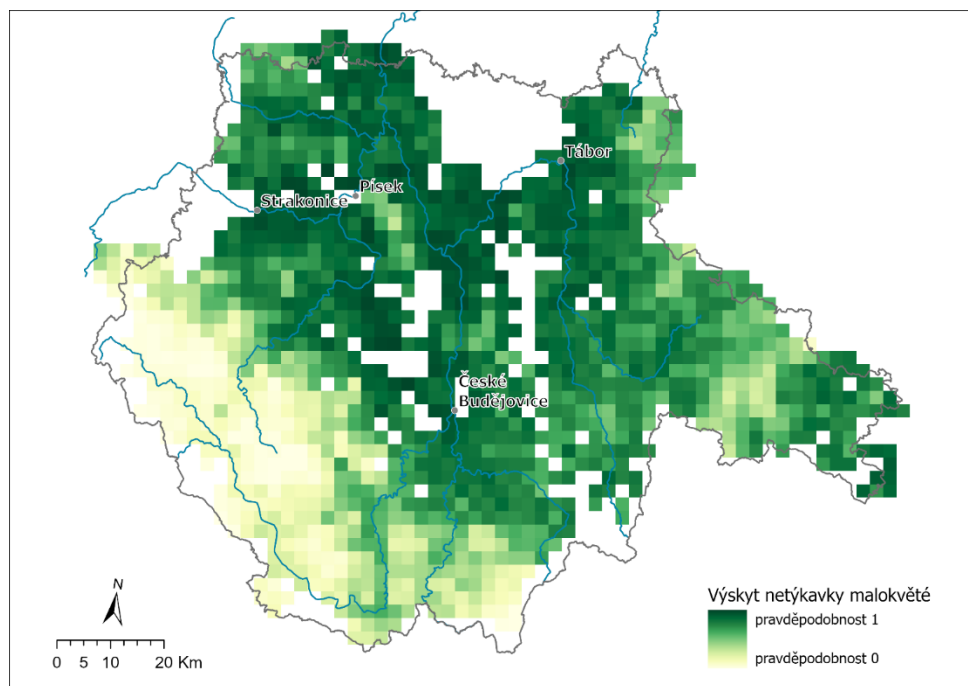
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	4.344425	0.995282	4.365	1.27e-05	***
periodcode2	1.372620	0.257925	5.322	1.03e-07	***
Elevation	-0.010889	0.001513	-7.196	6.19e-13	***
log10(Kvalita121km + 0.001)	-0.532336	0.212732	-2.502	0.01234	*
sqrt(ModifiedCatchmentArea)	0.005199	0.001940	2.679	0.00738	**

sqrt(RoadsDistance) -0.041111 0.014445 -2.846 0.00443 **

R-sq.(adj) = 0.323 Deviance explained = 28.3%
UBRE = 0.018359 Scale est. = 1 n = 390



Obr. 16 Modelovaný výskyt netýkavky malokvěté v minulosti (2004-2006).



Obr. 17 Modelovaný výskyt netýkavky malokvěté v současnosti (2022-2023).

V případě netýkavky žláznaté obsahuje výsledný model prostorovou složku včetně interakce s obdobím (indikuje skutečnost, že celkové rozšíření se v čase významně změnilo; obr. 18, obr. 19), dále nadmořskou výšku (ovlivňuje výskyt druhu negativně), počet biotopů v okolí (+), variabilitu reliéfu (+), plochu povodí (-) a topografický vlhkostní index (+). Model vysvětluje 58,6 % variability dat:

Family: binomial
Link function: logit

Formula:
ImpGland ~ periodcode + Elevation + HabitatNumber1km + DMRsd +
sqrt(ModifiedCatchmentArea) + TopographicWetnessIndex + s(X,
Y, bs = "gp", by = periodcode)

Parametric coefficients:

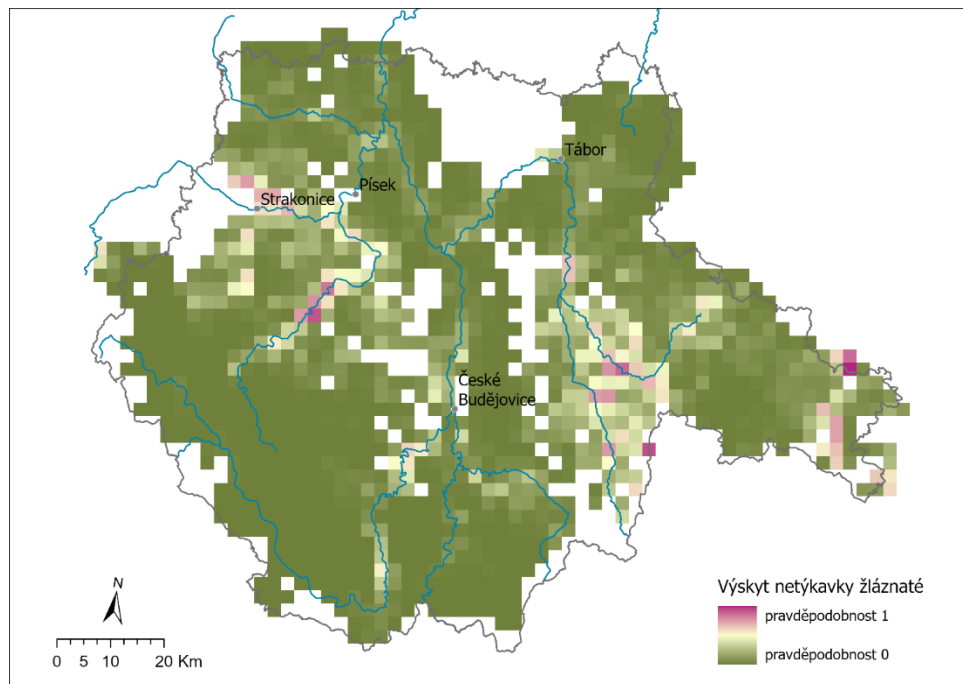
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2.501610	4.076063	0.614	0.539392
periodcode2	0.387919	0.993843	0.390	0.696298
Elevation	-0.027911	0.007492	-3.726	0.000195 ***
HabitatNumber1km	0.273921	0.079611	3.441	0.000580 ***
DMRsd	0.074316	0.038363	1.937	0.052722 .
sqrt(ModifiedCatchmentArea)	-0.012044	0.006622	-1.819	0.068940 .
TopographicWetnessIndex	0.713173	0.297354	2.398	0.016467 *

Approximate significance of smooth terms:

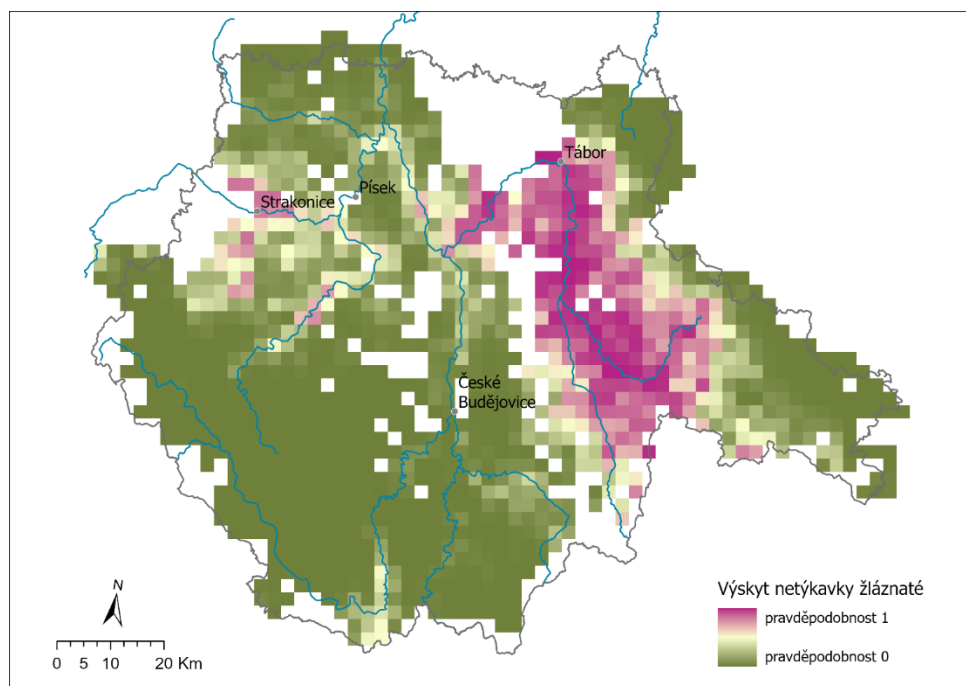
	edf	Ref.df	Chi.sq	p-value
s(X,Y):periodcode1	6.534	8.634	13.14	0.13379
s(X,Y):periodcode2	17.998	21.557	41.22	0.00659 **

R-sq. (adj) = 0.537 Deviance explained = 58.6%

UBRE = -0.51938 Scale est. = 1 n = 392



Obr. 18 Modelovaný výskyt netýkavky žláznaté v minulosti (2004-2006).



Obr. 19 Modelovaný výskyt netýkavky žláznaté v současnosti (2022-2023).

2.3.2.5 Obsah fosforu v půdě

Model vychází z dat získaných v současnosti. K dispozici byla také data historická, vzhledem k rozdílným metodikám však nebyly hodnoty přímo srovnatelné. Samostatnou analýzou centrovaných hodnot jsme však ověřili, že přes rozdíly v absolutních hodnotách zůstala relativní prostorová distribuce stejná. Dále modelujeme pouze současné hodnoty (obr. 20). Jako hladký člen byl modelován prostor se vstupními souřadnicemi X a Y. Kromě prostorového pattern byla ve výsledném modelu významná nadmořská výška (ovlivňuje množství fosforu negativně), plocha olšových luhů a mokřadů v okolí (-), plocha povodí (-) a vzdálenost od silnic (-). Model vysvětluje 33,1 % variability dat.

Family: gaussian

Link function: identity

Formula:

```
log10(P) ~ Elevation + log10(LuhyMokr1km + 0.001) +
sqrt(ModifiedCatchmentArea) +
sqrt(RoadsDistance) + s(X, Y, bs = "gp")
```

Parametric coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	1.6314913	0.1752980	9.307	< 2e-16	***
Elevation	-0.0006396	0.0003259	-1.963	0.05122	.
log10(LuhyMokr1km + 0.001)	-0.0985080	0.0346746	-2.841	0.00502	**
sqrt(ModifiedCatchmentArea)	-0.0007649	0.0002608	-2.933	0.00379	**
sqrt(RoadsDistance)	-0.0041492	0.0019941	-2.081	0.03887	*

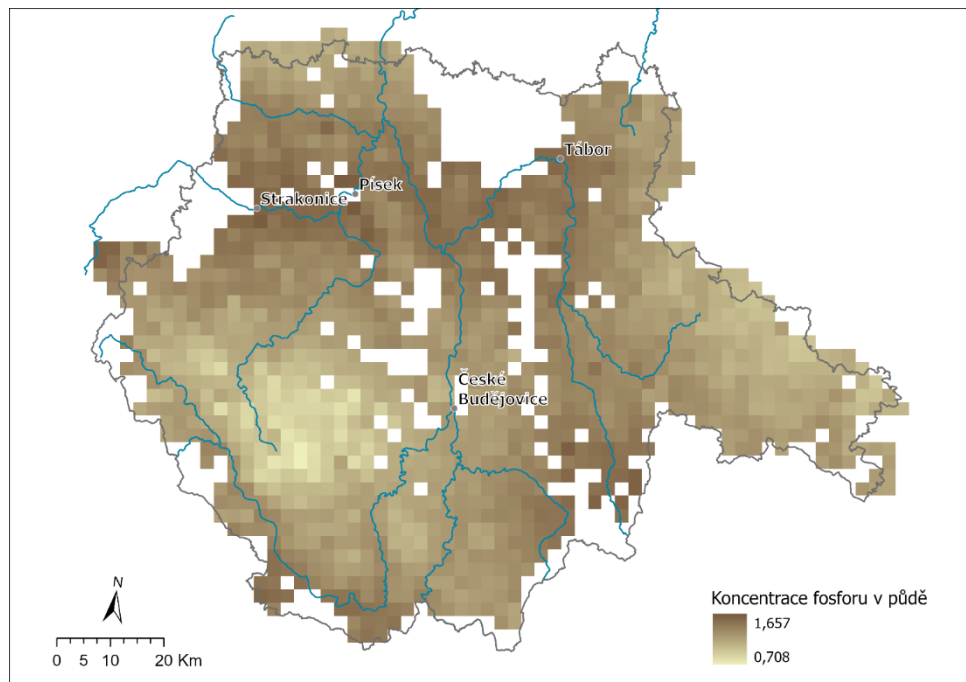
Approximate significance of smooth terms:

	edf	Ref.df	F	p-value	
s(X,Y)	12.64	13.43	4.558	1.44e-06	***

Rank: 20/37

R-sq. (adj) = 0.269 Deviance explained = 33.1%

GCV = 0.064817 Scale est. = 0.059042 n = 198

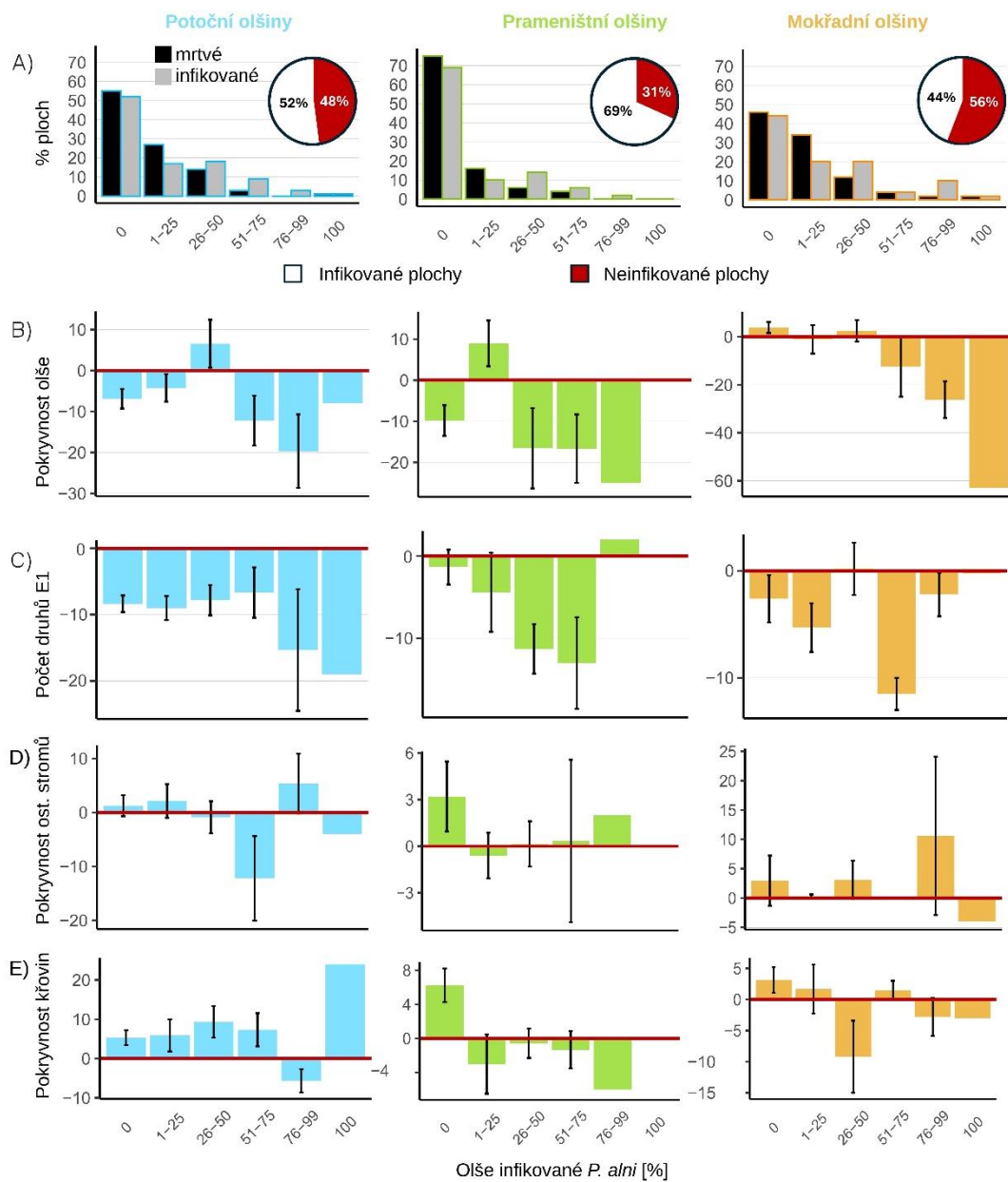


Obr. 20 Model koncentrace fosforu v půdě ($[\log_{10}(\text{mg}/\text{kg})]$), průměrné hodnoty v olšínách) pro současnost

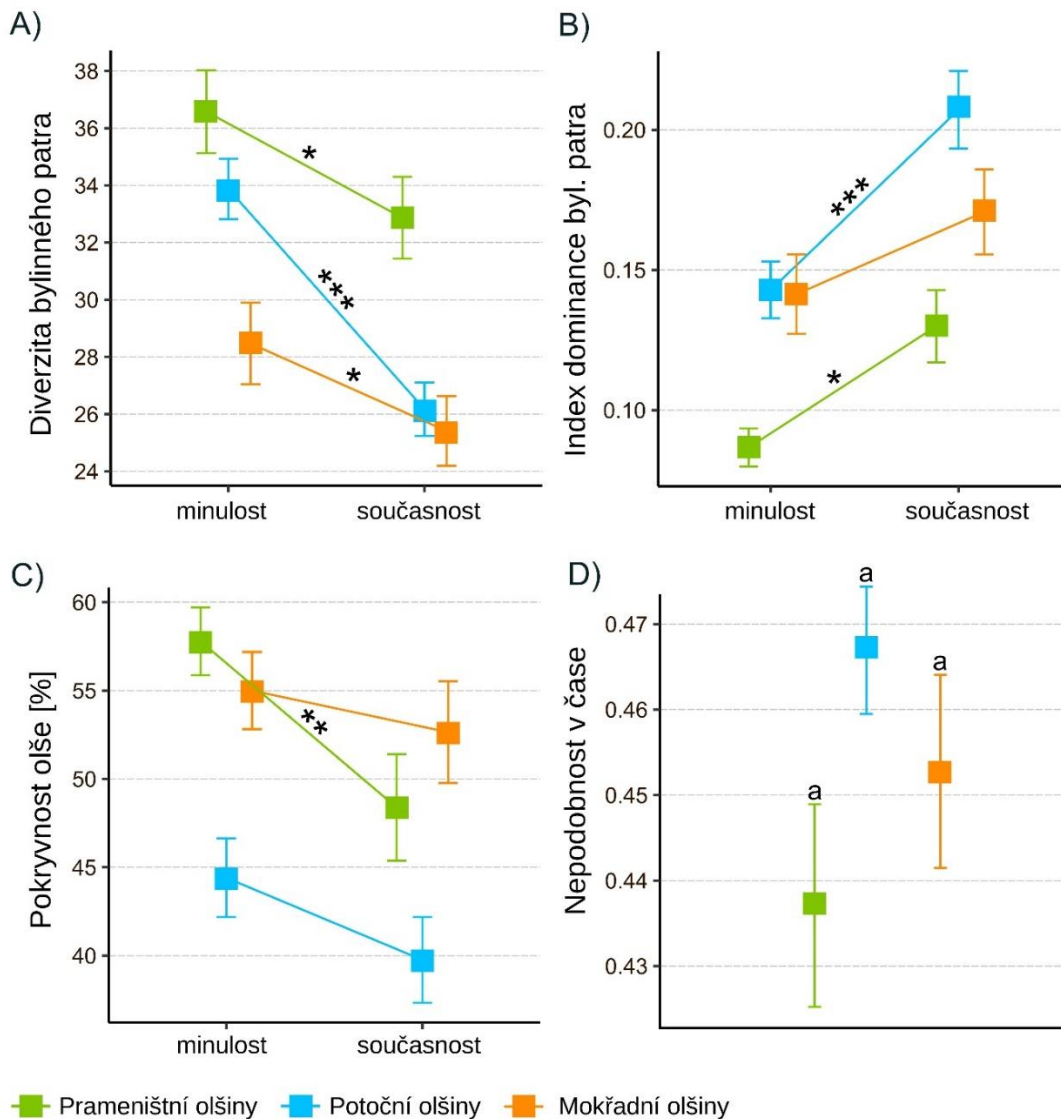
2.3.3 Analýza vegetace

Data použitá pro analýzu vegetace mají poněkud jinou strukturu, než data použitá pro prostorovou analýzu a tvorbu map. Pro analytické účely jsme mohli použít podrobnější informace o datových bodech, které nejsou použitelné pro účely interpolace. Například půdní vlastnosti, které nejsou dostupné na velké prostorové škále a zejména jsme analýzy strukturovali na základě podrobnější informace o klasifikaci vegetace, kdy bylo možné odlišit prameniště olšiny od potočních luhů (které jsou zahrnuty pod biotopem L2 v předchozí analýze), místo dvou kategorií jsou tedy data vztažena ke kategoriím třem (mokřadní olšiny, potoční olšiny a prameniště olšiny).

Ze všech zkoumaných porostů bylo 45 % napadeno plísní olšovou, nejvíce napadené byly mokřadní olšiny a nejméně prameniště olšiny (Obr. 21A), podíl napadených stromů v porostech bývá nejčastěji do 50 % a intenzivněji napadené porosty jsou vzácné, obdobná je situace i u podílu mrtvých olší. Napadení se odrazilo ve snížení pokryvnosti olší v porostech v současnosti v porovnání s minulostí (Obr. 21B), zajímavé ovšem je, že s výjimkou mokřadních olšin poklesla pokryvnost olší i v nenapadených porostech. Pokryvnost ostatních druhů stromů se v zásadě nezměnila (Obr. 21D). Změnila se pokryvnost křovin, v potočních olšinách mírně narostla, ovšem nezávisle na napadení a v prameniště olšinách narostla pouze v nenapadených porostech (Obr. 21E). Úbytek olše byl významný i ve statistickém porovnání minulého a současného stavu porostů, ovšem pouze v potočních olšinách (Obr. 22C). Statisticky významný byl pokles počtu druhů mezi obdobími ve všech společenstvech (Obr. 22A), v potočních a prameniště olšinách se projevila nevyrovnanost v pokryvnostech druhů (Obr. 22B). Změny druhového složení byly ve všech společenstvech kvantitativně stejné (Obr. 22D). Změny mezi jednotlivými obdobími ovšem nelze přičítat pouze invazi plísně olšové, na změnách vlastností společenstev se podílela celá řada dalších faktorů, a navíc vztah mezi infekcí a biodiverzitou nemusí být čistě negativní, v poměrně vzácných případech silného napadení zůstal počet druhů v bylinném patře stejný jako v minulosti (Obr. 21C).



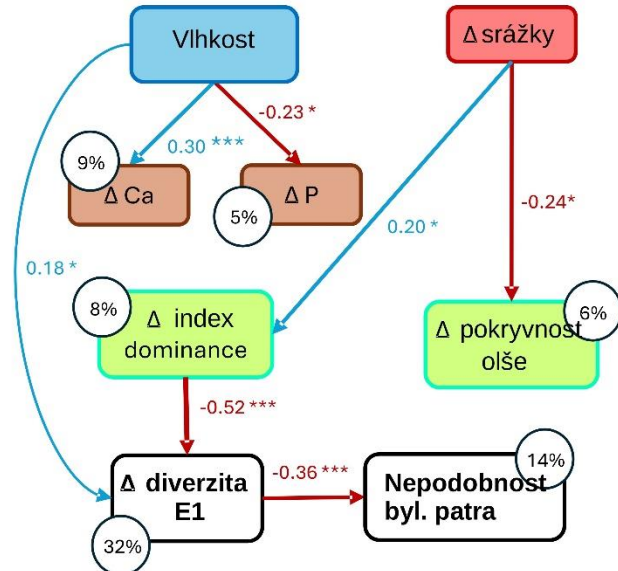
Obr. 21 Vliv *P. alni* v olšínách podle typu vegetace. A) Rozložení počtu ploch podle šesti kategorií míry infekce (podíl mrtvých olší) infikované stromy jsou světle šedé a mrtvé tmavě šedé. Koláčové diagramy ukazují podíl infikovaných ploch v jednotlivých vegetačních typech (červeně). B) Změny pokryvnosti olše v současných záznamech oproti historickým. C) Změny diverzity rostlin. D) Změny pokryvnosti jiných stromů. E) Změny pokryvnosti křovin.



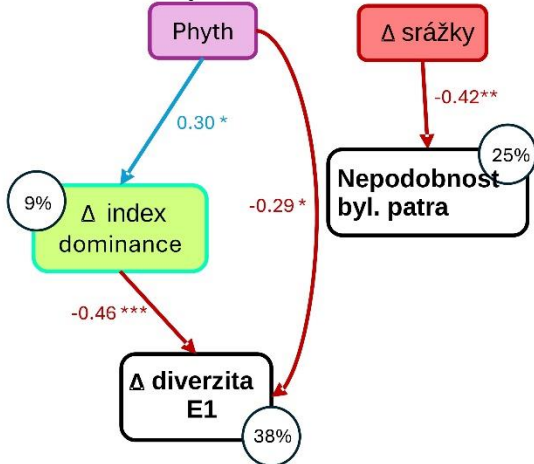
Obr. 22 Změny ve společenstvech olšin mezi lety 2004-2023. A) diverzita rostlin bylinného patra. B) index dominance bylinného patra. C) pokryvnost olše. D) podobnost bylinného patra mezi starými a novými snímky. Rozdíly mezi minulostí a současností jsou indikovány: ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$, testováno Tukey post-hoc testem. Data jsou průměry \pm standardní odchylka.

V dalším kroku jsme podrobněji analyzovali příčiny změn společenstev olšin. Diverzita rostlin v potočních olšinách byla primárně ovlivněna dostupností vody a dominancí v bylinném patře (Obr. 23A). Zejména na sušších stanovištích došlo k výraznému poklesu diverzity bylinného patra, zatímco druhová diverzita na vlhčích místech byla stabilnější. Pravděpodobným mechanismem úbytku druhů a změn druhového složení byla zejména zvýšená konkurence několika dominantních druhů. V prameništních olšinách byla významným faktorem infekce *P. alni* (Obr. 23B), která ovlivňovala počet druhů bylinného patra přímo a také nepřímo skrz zvýšenou dominanci. Snížení srážek považujeme za významný mechanismus změny složení bylinného patra v tomto biotopu. V mokřadních olšinách vedla infekce *P. alni* k posunu složení bylinného patra společně se změnami ve srážkách a druhová diverzita byla negativně ovlivněna nárůstem fosforu v půdě a nárůstem pokryvnosti dominantních druhů (Obr. 23C).

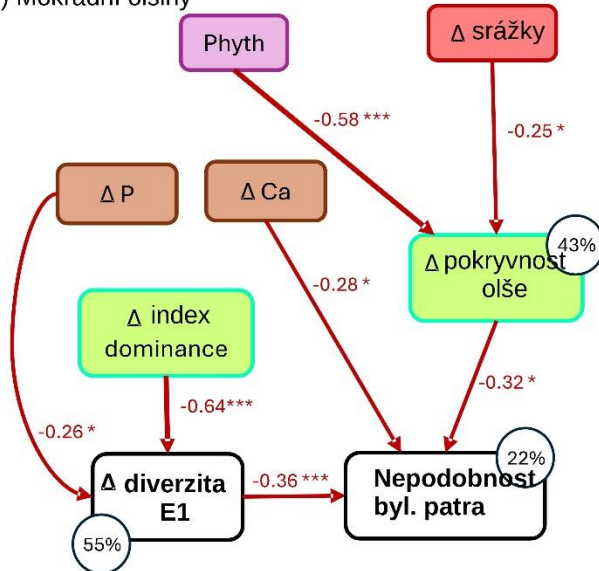
A) Potoční olšiny



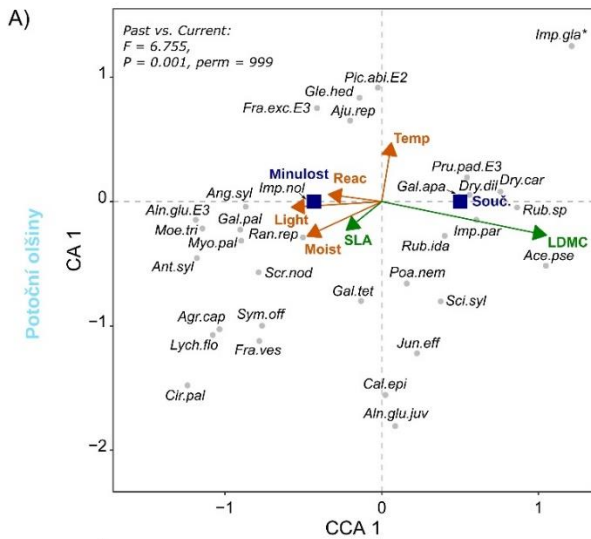
B) Prameništění olšiny



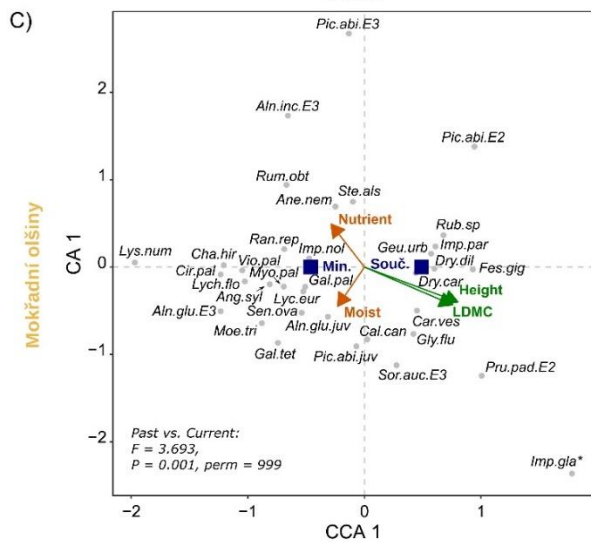
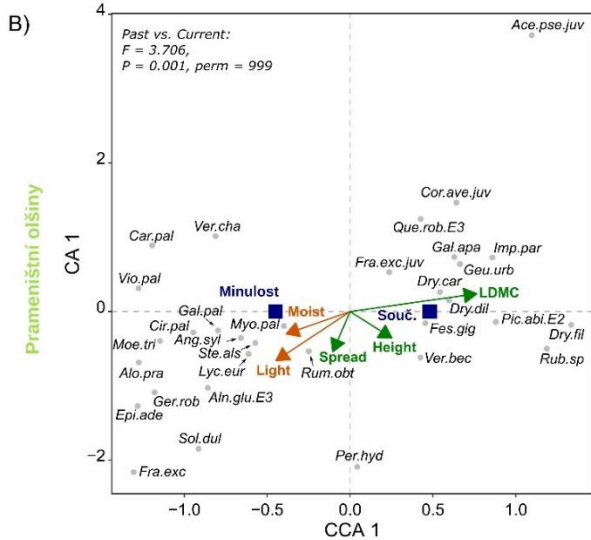
C) Mokřadní olšiny



Obr. 23 Analýzy pomocí strukturálních modelů kombinují efekt *P. alni* s ostatními významnými faktory pro bylinné patro v každém typu společenstva. A) potoční olšiny, B) prameništění olšiny, C) mokřadní olšiny. Diagramy ukazují nejlepší model. Významné efekty jsou indikovány (* p<0.05, ** p<0.01, ***, p<0.001). Šířka šipek indikuje hodnotu standardizovaných koeficientů. Modré šipky ukazují pozitivní a červené negativní závislosti. Čísla v kroužcích znamenají procento variability (R²) pro každou proměnnou.



Obr. 24 diagramy změn v čase pro jednotlivá společenstva. Funkční a ekologické vlastnosti druhů, které byly průkazně korelovány s 1. ordinační osou jsou přidány pasivně. V diagramech je zachováno 5 % druhů s nejvyšším skóre na ordinačních osách



Změny v druhovém složení porostů za poslední dvě dekády ilustruje Obr. 24. Zejména přibyly druhy s vysokým LDMC a expandovaly mezofilní druhy (případně ubyly vlhkomilné), jak ukazuje pokles indikačních hodnot pro vlhkost. Mezi druhy s vysokým LDMC expandujícími v současných snímčích patří *Acer pseudoplatanus*, *Dryopteris* spp., *Festuca gigantea* a *Prunus padus* (Obr. 24). V mokřadních olšínách přibyly druhy vysokého vzrůstu jako *Carex vesicaria*, *Dryopteris* spp., *Festuca gigantea*, *Glyceria fluitans* a *Rubus* spp (Obr. 24C, tab. 2, tab. 3). Invazní druhy *Impatiens parviflora* a *I. glandulifera* přibyly ve frekvenci i v pokryvnosti (Obr. 24C, tab. 2, tab. 3). V potočných a prameništích olšínách znatelně ubyly světlomilné druhy (Obr. 24A a B), vlhkomilné druhy jako *Myosotis palustris* agg., *Angelica sylvestris* a *Cirsium palustre* vymizely z více než 20 % ploch ve všech typech lesa a *Viola palustris* ustoupila v potočných a mokřadních olšínách (Obr. 24C, tab. 2, tab. 3).

Tab. 2 Seznam druhů jejichž frekvence se v uplynulých dvaceti letech změnila nejvíce. Tabulka udává procento (a počet) ploch, ve kterých daný druh vymizel, nebo byl nově zaznamenán alespoň ve 20 % ploch. Červeně jsou druhy, které ubyly, zeleně druhy, které přibyly, **tučně** jsou druhy, jejichž frekvence se významně změnila ve všech společenstvech. * značí invazní druhy.

Potoční olšiny		Prameništří olšiny		Mokřadní olšiny	
Druh	% (nu)	Druh	% (nu)	Druh	% (nu)
<i>Myosotis palustris</i> agg.	-35 (-39)	<i>Galium palustre</i> agg.	-33 (-17)	<i>Alnus glutinosa</i> (E1)	-37 (-19)
<i>Moehringia trinervia</i>	-31 (-34)	<i>Viola palustris</i>	-33 (-17)	<i>Cirsium palustre</i>	-35 (-18)
<i>Angelica sylvestris</i>	-29 (-32)	<i>Cirsium palustre</i>	-31 (-16)	<i>Viola palustris</i>	-27 (-14)
<i>Anthriscus sylvestris</i>	-29 (-32)	<i>Myosotis palustris</i> agg.	-31 (-16)	<i>Angelica sylvestris</i>	-25 (-13)
<i>Ranunculus repens</i>	-26 (-29)	<i>Angelica sylvestris</i>	-25 (-13)	<i>Myosotis palustris</i> agg.	-25 (-13)
<i>Scrophularia nodosa</i>	-23 (-25)	<i>Moehringia trinervia</i>	-25 (-13)	<i>Lycopus europaeus</i>	-22 (-11)
<i>Cirsium palustre</i>	-20 (-22)	<i>Carex pallescens</i>	-21 (-11)	<i>Festuca gigantea</i>	20 (10)
<i>Impatiens parviflora</i> *	21 (23)	<i>Dryopteris carthusiana</i>	19 (10)	<i>Phalaris arundinacea</i>	20 (10)
		<i>Geum urbanum</i>	21 (11)	<i>Dryopteris carthusiana</i>	22 (11)
		<i>Impatiens parviflora</i> *	23 (12)	<i>Rubus</i> spp.	24 (12)
				<i>Impatiens glandulifera</i> *	28 (14)
		<i>Rubus</i> spp.	29 (15)	<i>Impatiens parviflora</i> *	28 (14)
		<i>Dryopteris dilatata</i>	31 (16)		

Tab. 3 Seznam druhů jejichž pokrývnost se v uplynulých dvaceti letech změnila nejvíce. Tabulka udává průměrnou změnu pokrývnosti a ukazuje druhy, které se změnilo alespoň ve 20 % ploch. Červeně jsou druhy, které ubyly, zeleně druhy, které přibýly. * značí invazní druhy.

Potoční olšiny		Prameniště olšiny		Mokřadní olšiny	
Druh	Změna pokrývnosti	Druh	Změna pokrývnosti	Druh	Změna pokrývnosti
<i>Stellaria nemorum</i>	-8	<i>Alnus incana</i> (E2+E3)	-9	<i>Cardamine amara</i>	-5
<i>Lamium maculatum</i>	-6	<i>Fraxinus excelsior</i> (E2+E3)	-8	<i>Phalaris arundinacea</i>	-5
<i>Impatiens noli-tangere</i>	-6	<i>Lysimachia nummularia</i>	-5	<i>Impatiens noli-tangere</i>	-5
<i>Fraxinus excelsior</i> (E2+E3)	-6	<i>Phalaris arundinacea</i>	-5	<i>Prunus padus</i> (E2+E3)	5
<i>Betula pubescens</i> (E2+E3)	-6	<i>Urtica dioica</i>	-5	<i>Impatiens glandulifera</i> *	5
<i>Impatiens glandulifera</i> *	5	<i>Carex remota</i>	5	<i>Salix cinerea</i> (E2+E3)	8
<i>Carex brizoides</i>	6	<i>Agrostis capillaris</i>	5	<i>Calamagrostis canescens</i>	9
<i>Prunus padus</i> (E2+E3)	7	<i>Cirsium oleraceum</i>	6		
<i>Quercus robur</i> (E2+E3)	7	<i>Picea abies</i> (E2+E3)	6		
<i>Calamagrostis villosa</i>	16	<i>Carex brizoides</i>	9		

2.4 Diskuze

Phytophthora alni je v současné době v ČR již běžně rozšířený patogen, vyskytuje se v povodích všech velkých řek a zejména v Z a JZ Čechách i v okolí menších toků (obr. 1), přesto stále existují lokality potenciálně citlivé ale patogenem neobsazené (Chumanová et al., 2021; Romportl et al., 2016). V našem výzkumu jsme potvrdili výskyt patogenu na méně než 50 % lokalit s mortalitou ne vyšší než 25 % na většině lokalit. To je situace méně závažná než u ostatních invazních patogenů, například voskovička jasanová (*Hymenoscyphus fraxineus*) ovlivnila více než 80 % porostů jasanu v Evropě (Gil et al., 2006; Havrdová et al., 2017) s mortalitou často vyšší než 50 % (George et al., 2022). Na rozdíl od voskovičky se *P. alni* nešíří vzduchem, ale primárně nepohlavními zoosporami vodou, což způsobuje její rychlé šíření podél vodních toků a hromadné hynutí olší v jejich bezprostřední blízkosti a v zaplavovaných oblastech (Bjelke et al., 2016; Černý and Strnadová, 2010; Jung et al., 2018), ale na druhou stranu omezuje infekci izolovanějších a sušších lokalit (Romportl et al., 2016). Tomu odpovídají i naše data (obr. 21), u kterých je nejmenší podíl infikovaných lokalit v prameništěních olšinách, které bývají nejvíce izolované od ostatních olšin a toků nebo souvislých vodních ploch (Douda et al., 2016), následují potoční olšiny, které mívají přímý kontakt s tokem a nejčastěji byly napadeny mokřadní olšiny, které bývají v kontaktu s kontaminovanou stojatou vodou (Jung et al., 2018). V mokřadních olšinách se patogen také rychle šíří lokálně a mívají proto také nejvyšší podíl napadených olší i mortalitu, v extrémních případech i 100 % (a tím zároveň vyšší pravděpodobnost detekce patogenu, obr. 21), v rámci sušších biotopů se patogen šíří pomaleji a lze tak často pozorovat mozaiku napadených i nenapadených ploch v rámci jednoho porostu. V naší analýze jsme nenašli žádné výrazné prostorové pattern (obr. 6), které by případně indikovalo neukončené šíření patogenu a nenašli jsme ani závislost na lokálních podmínkách prostředí. To naznačuje, že zkoumané území se jako celek nachází v postepidemické fázi a další šíření patogenu lze předpokládat především lokálně (v rámci již zasažených lokalit, nebo na lokality blízké, ale ještě neobsazené). Plíseň olšová je v území limitována v podstatě pouze klimatickými faktory (obr. 6, obr. 23), což odpovídá jejím známým ekologickým vlastnostem, zejména citlivosti k nízkým zimním teplotám a vysokému růstovému optimu (Bjelke et al., 2016; Černý a Strnadová, 2010; Redondo et al., 2015). Významnější rozšiřování areálu v území lze proto očekávat s postupujícími klimatickými změnami (Caballol et al., 2024; Redondo et al., 2015; Simler-Williamson et al., 2019).

Plíseň olšová způsobuje defoliaci a postupně hynutí olší, lze tedy předpokládat, že při jejím obecném rozšíření bude hlavním faktorem redukcí pokrývnosti olše ve společenstvech. Paradoxně však přítomnost patogenu nebyla mezi prediktory pokrývnosti olše a jejích změn v naší prostorové analýze (kap. 2.3.2.2), její pokrývnost se oproti minulosti snížila i v nenapadených lokalitách (obr. 21) a nejvyšší plošné a souvislé snížení její pokrývnosti jsme zaznamenali v oblastech, kde je pravděpodobnost výskytu *P. alni* nízká (srv. obr. 9 a obr. 6). Příčinou je zjevně relativně nízká mortalita olší v napadených porostech (obr. 21), při které jsou ostatní jedinci v porostu schopni kompenzovat ztrátu pokrývnosti. S narůstající frekvencí napadených olší v porostu samozřejmě vliv patogenu roste (obr. 17), ale tento vztah se podařilo prokázat pouze v mokřadních olšinách (obr. 23C), ve kterých bývá napadení plošnější a méně mozaikovitě a tedy chybí zdraví sousední jedinci, kteří by vzniklé mezery ve stromovém patře nahradili. Hlavní příčinu úbytku pokrývnosti olše je tedy třeba hledat jinde než v infekci plísní olšovou. Hlavním kandidátem jsou klimatické změny, zejména pokles srážek (obr. 23A, C), tuto hypotézu podporuje také ústup vlhkomilných bylin z podrostu (Obr. 24, tab. 2, tab. 3). Jistou roli mohou hrát také lokální antropogenní faktory, kdy ústup olše je do určité míry zmírněn vzdáleností od lidských sídlišť a celkově má pozitivní vliv např. vzdálenost od komunikací nebo přítomnost olšin v okolí (kap. 2.3.2.2). Zdá se, že několik málo druhů dřevin (*Picea abies*, *Prunus padus*, *Salix cinerea*, *Quercus robur*, *Prunus padus*) se nově úspěšně rozšířilo do olšin (Obr. 24), ale nepodařilo se nám prokázat náhradu olší jinými druhy dřevin (Brunet et al., 2023; Flower et al., 2013; Nagel et al., 2019). Příčinou je pravděpodobně relativně krátká doba mezi historickým a současným výzkumem (Brunet et al., 2023) a malé množství potenciálních dominant, které v těchto podmínkách rostou (Boublík et al., 2013).

Vzhledem k celkovým změnám diverzity za uplynulá dvě desetiletí jsou změny způsobené plísní olšovou relativně malé (kap. 2.3.2.3). Pouze u mokřadních olšin jsou změny diverzity částečně zprostředkovány poklesem pokrývnosti olše (obr. 23C). U prameništích olšin je vliv na bylinné patro přímý a zvyšuje pokrývnost několika dominantních druhů, a také ovlivňuje počet druhů v podrostu (obr. 23B). Zdánlivě přímý vliv patogenu na bylinné patro je však pravděpodobně také zprostředkován nějakým námi neměřeným faktorem, neboť mechanismus přímého vlivu *P. alni* na bylinné patro je těžko představitelný. Vliv může být zprostředkován snížením aktivity dusík fixujících symbiotických bakterií. Studie na jedlovcích (*Tsuga* spp.) napadených korovnicí jedlovcovou však ukázaly, že symbiotické bakterie do určité míry pokračují ve fixační aktivitě i přes poškození hostitele (Lovett et al., 2006; Orwig et al., 2013). Navíc dekompozice opadu z napadených stromů může půdu výrazně obohacovat o dusík (Cobb et al., 2013; Ferreira et al., 2022) a mrtvé rozkládající se dřevo může sloužit jako zdroj živin po desetiletí (Wallace et al., 2001). Ovlivnění živinových poměrů patogenem je tedy pravděpodobné, ovšem může probíhat oběma směry. Dalším možným vysvětlením zdánlivě přímého vlivu patogenu je setrvačnost bylinného patra, které bylo vystaveno dočasnému snížení pokrývnosti stromového patra, které následně regenerovalo. Ačkoliv uvažujeme především o snižování počtu druhů v důsledku invaze plísně olšové, naše data také naznačují, že v silně napadených mokřadních olšinách mohl počet druhů zůstat stejný jako v minulosti, nebo se dokonce zvýšil (obr. 21) a v podstatě došlo k obnovení druhově bohatých mokřadů. Případů s velmi silnou mortalitou olše je však zatím poměrně málo.

Změny druhového složení společenstev a jejich vlastností ukazují, že významným hybatelem změn v olšinách byla sukcese. Ve všech třech typech lesů ubyly světlomilné druhy, ubývající druhy jako *Lychnis flos-cuculi*, *Cirsium palustre*, *Lysimachia vulgaris* a *Ranunculus repens* mohou dokonce představovat zbytky původních populací dřívějších vlhkých luk a mokřadů, které zarůstají lesem. Podobný ústup světlomilných druhů byl v mnoha případech dokumentován již dříve, zejména na vlhkých a živinami bohatých místech, kde je sukcese navíc podpořena klimatickými změnami (např. Amatangelo et al., 2011; Hédl et al., 2010). Obecně také narostla dominance (tj. klesla vyváženost společenstev a narostla pokrývnost několika málo druhů; Obr. 23) a narostla pokrývnost vysokých druhů (Obr. 24). To svědčí o nárůstu intenzity konkurence v bylinném patře. V případě mokřadních olšin byly změny v dominanci spojeny s nárůstem dostupného fosforu (Obr. 23C). Zvýšená dostupnost fosforu často

zvyšuje dominanci druhů náročných na živiny, zejména v podmínkách dobré dostupnosti světla v podrostu (Hippis et al., 2005). Nápadná je koincidence prostorové distribuce koncentrace fosforu s diverzitou bylinného patra (Obr. 11, Obr. 20). Negativní vliv zvýšeného obsahu fosforu na diverzitu v mokřadních lesích byl doložen také v jiných studiích (Holeštová et al., 2024; Strubelt et al., 2017). Nárůst dominance také může souviset se šířením expanzivních a invazních druhů, zejména *Impatiens parviflora* a *I. glandulifera* (Obr. 24, kap. 2.3.2.4).

Na změnách druhového složení se zejména v případech potočních a prameništích olšin výrazně podílí úbytek vlhkostních druhů (případně nárůst mezofilních; Obr. 24), na sušší podmínky v recentních snímčích ukazuje také nárůst druhů s vysokým LDMC (Doudová et al., 2022; Havrdová et al., 2023). Změny k sušším podmínkám mohou být způsobeny snížením srážek, ale také sukcesními procesy, kdy růst stromů způsobuje vysoušení stanoviště, nebo se mohou synchronně projevat oba procesy. Druhy s vyšším LDMC dokáží lépe hospodařit s vodou (Wang et al., 2022). Podobné změny indukující šíření stres tolerantních druhů během sukcese prokázal také (Lanta et al., 2024).

3 Genetická variabilita a variabilita virulence patogenu na krajinné úrovni

3.1 Úvod

Předpoklad vysoké genetické variability v rámci tří taxonů existoval dlouho (Brasier et al. 2004), ale detailní genetická analýza byla provedena až v rámci studií Aguayo et al. (2016) a Mizeriene et al. (2020), které použily analýzu mikrosatelitových markerů (STR) pro zkoumání evropských populací tohoto druhového komplexu. Tyto markery jsou vhodné pro analýzu populační struktury díky své rychlejší mutační schopnosti ve srovnání s jinými částmi genomu. Aguayo et al. (2016) zjistili vysokou genetickou diverzitu, zejména u triploidního druhu *P. ×alni*, ve srovnání s rodičovskými druhy, a tento závěr potvrdila i studie Mizeriene et al. (2020). Celkem bylo identifikováno 45 multilokusových genotypů (MLG) *P. ×alni*, oproti pěti MLG *P. ×multiformis* a pouhým třem MLG u *P. uniformis*.

Populační struktura v Evropě je ovlivněna zakladatelskými genotypy (Aguayo et al. 2016) a říční sítí (Mizeriene et al. 2020). Dominance multilokusového genotypu Pxa-1 byla potvrzena v obou studiích, přičemž frekvence ostatních MLG (odvozených od Pxa-1) byla podstatně nižší. Nicméně výsledky studií se lišily ohledně populační dynamiky a podílu genotypu Pxa-1 v čase. Aguayo et al. (2016) zjistili, že frekvence tohoto dominantního MLG vzrůstala v průběhu času, zatímco diverzita ostatních MLG klesla, což přisuzovali genetickým mechanismům, jako je drift nebo selekce. Naopak Mizeriene et al. (2020) zaznamenali narůstající genotypovou diverzitu během invaze.

Tato studie se zaměřila na:

- Populační strukturu *P. ×alni* v malém měřítku s vysokou hustotou izolací.
- Srovnání populací *P. ×alni* ve fázích epidemické a post-epidemické.
- Testování fyziologických vlastností a patogenity různých MLG.

3.2 Metody

3.2.1 Sběr dat

Jako studijní oblast bylo vybráno povodí řeky Vltavy z důvodu dlouhodobé přítomnosti *P. alni*, která se zde značně rozšířila během povodní v roce 2002 (Černý a Strnadová 2010). Kmeny patogenu získané během epidemické fáze onemocnění v letech 2005–2010 byly uloženy do České sbírky fytopatogenních oomycetů (CCPO) a doplněny metadaty (datum, hostitel, lokalita, souřadnice izolace apod.). Z těchto uložených vzorků bylo pro tuto srovnávací studii vybráno 42 původních kmenů z této oblasti.

Nové izoláty byly získány během dvou odběrových sérií. V letech 2020–2022 byla navštívena původní místa izolace a izolace byly zopakovány. Vzhledem k tomu, že stromy napadené původními kmeny *P. alni* byly většinou již odumřelé, byly vzorky odebrány z nejbližších symptomatických stromů. Tento soubor kmenů je dále označován jako recentní I.

Pro vytvoření nezávislého kontrolního souboru recentních izolací byly v letech 2022–2024 izolovány další kmeny z téže oblasti, ale z jiných lokalit (viz kap. 2.3.1). Celkem bylo mezi lety 2020 a 2024 navštíveno a vzorkováno 90 lokalit s charakteristickými příznaky onemocnění fytoftorové hniloby olší. Z každé nové lokality byl pro srovnání použit pouze jeden izolát, přičemž lokality s více genotypy byly vynechány. Tento soubor kmenů je dále označován jako recentní II.

Navíc byl získán větší počet izolátů ze dvou konkrétních lokalit – osm z Chrastin a sedm z Jemnice, které se nacházejí v epidemické fázi invaze.

3.2.2 Laboratorní analýzy

3.2.2.1 Určení genotypu *Phytophthora alni* s.l.

Izolace kmenů, kultivace a determinace do druhu proběhly stejně jako v bodě 2.2.1.3. Čisté kultury byly pro izolaci DNA pěstovány na V8 agaru ve tmě při 20 °C po dobu alespoň 4 dnů, v závislosti na rychlosti jejich růstu. Mycelium *P. alni* bylo poté seškrábáno sterilním skalpelem přibližně z poloviny Petriho misky do mikrozkušavky a okamžitě zpracováno. Bylo testováno několik metod izolace DNA, přičemž metoda na bázi NaOH (Osmundson et al. 2013) byla vybrána jako nejspolehlivější pro následnou amplifikaci mikrosatelitů. Před analýzou byla koncentrace DNA měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky náležející k jinému taxonu než *P. alni* s. l., nebo ty u kterých bylo nejisté jejich morfologické určení byly určeny pomocí PCR, následné sekvenace mtDNA (COX), popř. rDNA (ITS, aj.), které jsou vhodné k odlišení jednotlivých druhů, a porovnáním pomocí algoritmu BLAST v databázi GenBank.

Některé původní kmeny *P. alni* ze sbírky CCPO byly do genotypu určeny v předchozí studii (Mizeriene et al. 2020), což umožnilo snadné ověření spolehlivosti našeho určení genotypu porovnáním našeho určení s původním výsledkem (Pxa-1 a Pu-E1).

MLG byly určeny pomocí analýzy mikrosatelitů, přičemž byla použita stejná lokusová sada jako v předchozích dvou studiích (Aguayo et al. 2016, Mizeriene et al. 2020). Pro určení MLG byla použita sada deseti mikrosatelitových lokusů: PA17, PA23 (Ioos et al. 2007), M-PAU3, M-PAU9, M-PAU32 (Aguayo et al. 2013), M-PAU11, M-PAU14, M-PAU15, M-PAU56 a M-PAU72 (Aguayo et al. 2016).

Vzorky byly dále zpracovány na automatickém sekvenátoru (3130xl Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems) v DNA sekvenační laboratoři Univerzity Karlovy. Výsledky fragmentační analýzy byly manuálně vyhodnoceny pomocí softwaru GeneMarker (SoftGenetics, USA).

3.2.2.2 Výběr izolátů pro testování jejich biologické zdatnosti

Bylo vybráno 15 izolátů reprezentujících 11 genotypů (Tab. 4), zahrnující původní i nové kmeny. Součástí souboru byly čtyři izoláty dominantního Pxa-1 MLG a osm odvozených MLG (Pxa-5, Pxa-8, Pxa-19, Pxa-21, Pxa-33, Pxa-38, Pxa-39, Pxa-51) s různým počtem ztracených alel. Pro srovnání byly přidány čtyři izoláty *P. uniformis* zastupující dva MLG (Pu-E1, Pu-E4).

Tab. 4 Seznam kmenů použitých pro testy fitness

kmen	MLG	Počet ztracených alel	populace
211779	Pxa-1	0	současná
211785	Pxa-1	0	současná
P.103/07	Pxa-1	0	původní
211880	Pxa-1	0	současná
K47	Pxa-5	1	současná
211948	Pxa-19	1	současná
S06 2B2	Pxa-21	1	současná
212134	Pxa-51	1	současná
211849/2	Pxa-8	2	současná
P.28/06	Pxa-33	3	původní
212045/2	Pxa-38	3	současná
P.11/06	Pxa-39	3	původní
239/08X	Pu-E1	0	původní
211951/1	Pu-E1	0	současná
211828/2	Pu-E1	0	současná
211776/1	Pu-E4	0	současná

3.2.2.3 Testování růstových teplot

Izoláty dlouhodobě uchovávané na ovesném agaru byly nově napěstovány na V8 agaru při 20 °C ve tmě. Po kontrole životaschopnosti byly agarové segmenty (průměr 0,5 cm) odebrány z okraje kolonií starých jeden týden a umístěny myceliem dolů na V8 agar v Petriho miskách (tři opakování pro každou teplotu v rozsahu 4–36 °C). Po pěti dnech byla každá rostoucí kolonie změřena dvakrát a tato měření byla zprůměrována, byl odečten průměr vloženého segmentu agaru a růst přepočítán na mm/den.

3.2.2.4 Tvorba sporangií

Izoláty byly pěstovány jeden týden při 20 °C ve tmě na super V8 agaru (SV8A; receptura obsahuje 100 ml/l V8 šťávy, 30 mg/l beta-sitosterolu, 20 mg/l L-tryptofanu, 100 mg/l CaCl₂·2H₂O, 1 mg/l thiaminu HCl, 15 g/l agaru a destilovanou vodu). Agarové kruhové segmenty s myceliem (průměr 0,5 cm) byly přeneseny do Petriho misek s 40 ml filtrované vody z potoka (filtr 5 µm) a ponechány ve tmě při 20 °C po dobu 24 hodin. Sporangia byla počítána pod binokulárním mikroskopem ve dvou standardizovaných fokálních rovinách.

3.2.2.5 Patogenita izolátů

Patogenita kmenů byla testována inokulací segmentů větví olše lepkavé. Segmenty (délka cca 10 cm, šířka 2–4 cm) byly povrchově sterilizovány 95% ethanolem a uprostřed byl odebrán raznicí segment borky (průměr 6 mm). Na místo byl vložen agarový disk shodné velikosti s aktivně rostoucím myceliem a rána byla uzavřena parafilmem. Pro kontrolu byl použit sterilní V8 agar. Po 7 dnech při 20 °C ve tmě

bylo nekrotizované lýko obnaženo, obrysy překresleny na průsvitný papír a digitalizovány. Plocha léze byla vypočtena pomocí softwaru ImageJ 1.54. Po experimentu byl *P. alni* opět izolován z vybraných vzorků. Experiment byl pro kontrolu zopakován s menším počtem větví (5 na každý kmen; ponechány 8 dní).

3.2.2.6 Sériové pasážování *P. ×alni* in vitro

Pro ověření potenciální ztráty alel u triploidního *P. ×alni* během kultivace bylo vybráno 10 izolátů Pxa-1 MLG (211880, 211791/1, 211890, 212006/4, P.103/07, P.49/07, 211967, 211779, 211785, 212180/1). Tyto izoláty byly týdně subkultivovány na V8 agaru. Vzorky byly odebírány z pomaleji rostoucího okraje často nepravidelné kolonie. Po 20 přeočkováních byly izoláty znovu identifikovány pomocí analýzy mikrosatelitů.

3.2.3 Statistická analýza dat

3.2.3.1 Porovnání populace *P. ×alni* v čase

Pro srovnání populací jsme použili 42 starších kmenů *P. ×alni* ze sbírky CCPO (původní kmeny, izolované v letech 2005–2008), 42 recentních kmenů získaných na stejných lokalitách jako původní v letech 2020–2022 (kolekce recentní I) a 29 dalších recentních kmenů získaných z jiných lokalit v povodí Vltavy izolovaných v letech 2020–2023 (kolekce recentní II, doplňková tabulka S1).

Po provedení molekulární analýzy byla porovnána zastoupení jednotlivých genotypů. Pro srovnání původní kolekce a dvou současných kolekcí (recentní I a recentní II) byly vypočteny klonální bohatost, genotypová diverzita, genotypová bohatost a rovnoměrnost. Pro zhodnocení rozdílnosti populací byla použita Fí statistika implementovaná v AMOVA (Meirmans et al. 2018; Ronfort et al. 1998).

Na základě Bruvovy genetické vzdálenosti byla vytvořena Minimum spanning network, která vizualizovala genetické vztahy mezi genotypy *P. ×alni*. Analýzy byly provedeny pomocí balíčku *poppr* verze 2.9.4 (Kamvar et al. 2014) v softwaru R verze 4.2.3 (R Core Team 2023).

Statistické vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými kmeny v testech přírůstu kultur v závislosti na kmenu a teplotě bylo provedeno dvoufaktorovou analýzou s interakcemi pro kmen a teplotu a Tukeyovým mnohonásobným porovnáním. Kmeny byly následně sdruženy do skupin dle počtu ztracených alel (0–3) pro *P. ×alni*, izoláty *P. uniformis* byly sdruženy do jedné samostatné skupiny. Tyto skupiny byly porovnány stejným způsobem jako jednotlivé kmeny předtím.

Při testu patogenity byly porovnávány plochy lézí. Pro vyloučení možnosti že velikost léze závisí na průměru segmentu větve byl použit Pearsonův korelační koeficient (a tuto možnost vyloučil). Rozdíly mezi kmeny byly vyhodnoceny pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání. A stejně tak, když byly kmeny sloučeny do skupin stejně jako v případě rozdílů v růstových teplotách.

Při porovnání produkce sporangií mezi kmeny byla použita opět jednofaktorová analýza rozptylu a Tukeyho metoda mnohonásobného porovnání. Vzhledem k charakteru hodnocené veličiny – počty sporangií – byla použita transformační funkce $t(x)=\sqrt{(x+3/8)}$. Následně byly porovnány stejným způsobem i rozdíly mezi skupinami kmenů.

3.3 Výsledky

3.3.1 Základní popis recentní populace *P. alni* s.l.

Celkem bylo během recentní fáze studie zkoumáno a vzorkováno 90 lokalit. Původní místa odběru vzorků se nacházela převážně v břehových porostech olší podél břehů vodních toků. V těchto

porostech byl od doby původních izolací zaznamenán významný pokles populací olší. Aktivní léze *P. alni* na bázi kmenů byly následně častěji nalezeny v hustších doprovodných porostech, často mimo linii břehových porostů. Úspěšnost izolace byla přibližně 50 %, protože mnoho lézí na bázi stromů, zejména starších, bylo často kolonizováno saprotrofními a jinými parazitickými houbami (např. *Armillaria* spp.). Některé původní lokality byly navštíveny opakovaně, aby bylo dosaženo úspěšné izolace *P. alni*.

Z těchto 90 lokalit v postepidemické fázi bylo získáno celkem 183 kmenů *P. alni* s. l. Z těchto izolátů bylo 107 kmenů *P. ×alni* s. str. z 75 lokalit a 23 kmenů *P. uniformis* z 22 lokalit. Podíl *P. uniformis* na všech současných izolátech *P. alni* s.l. činil 18 % (24 % lokalit) (viz Doplňková tabulka S1). Rozšíření *P. ×alni* a *P. uniformis* se obecně překrývá, ale ve většině případů byl nalezen pouze jeden z těchto druhů. Lokality obou druhů se lišily podél výškového gradientu – průměrná nadmořská výška činila 433 m. n. m. pro *P. ×alni* (SD ± 71,6) a 528 m. n. m. pro *P. uniformis* (SD ± 124,5). Tento rozdíl byl statisticky významný (jednostranný Welchův t-test, p-hodnota <0,001). *P. ×multiformis* nebyl izolován ani jednou.

Dalšími izolovanými druhy byly *P. plurivora* (dvě lokality) a *P. lacustris* (jedna lokalita). Oba druhy se vyskytovaly společně s *P. ×alni*, v případě *P. lacustris* dokonce na stejném stromě. Oba druhy byly izolovány z charakteristických fytoftorových lézí na kmenech olší, které jsou obvykle oprávněně připisovány *P. alni*.

3.3.2 Mikrosatelitové profily izolátů *P. alni*

Všechny izoláty předběžně identifikované jako *P. alni* s.l. byly podrobeny analýze pomocí sady 10 mikrosatelitů (nebo 12 v případě nových izolací 2022–2024; další mikrosatelity však neodhalily žádnou novou variabilitu – výsledky nejsou prezentovány). Dva izoláty identifikované nově a stejně tak i v dřívější práci (Mizeriene et al., 2020) jako genotypy Pxa-1 a Pu-E1 potvrdily funkčnost naší metody (viz Doplňková tabulka S1). Abychom vyloučili možnost záměny, otestovali jsme kulturu *P. ×cambivora* (CCPO P.288/09) stejnou sadou mikrosatelitů. Tento izolát sdílel některé mikrosatelitní lokusy s *P. alni*, ale celkově byl geneticky vzdálený od všech izolátů *P. alni* s.l.

Dohromady i s původními izoláty bylo na úroveň genotypu nově identifikováno 129 izolátů *P. ×alni* a 28 izolátů *P. uniformis*. Mezi 151 izoláty *P. ×alni* (včetně 22 izolátů identifikovaných v práci Mizeriene et al., 2020) bylo odhaleno 23 různých genotypů. Objevili jsme šest nových a dosud neznámých MLG (viz Doplňkové tabulky S1 a S2), přestože nebyly nalezeny žádné nové alely ve srovnání s předchozími studii. Nově objevené genotypy byly označeny jako MLG 46–51. Většina izolátů *P. uniformis* náležela ke genotypu Pu-E1; jeden izolát představoval nově objevený genotyp Pu-E4.

3.3.3 Rozdíly ve struktuře populace *P. ×alni*

Celkem bylo analyzováno 42 kmenů z původních izolací, 42 kmenů z recentních izolací I (získané ze identických lokalit) a 29 kmenů z kontrolních recentních sběrů II (z jiných lokalit v oblasti). Celkově bylo mezi všemi těmito izoláty 22 různých MLG (multilokusových genotypů). Mezi původními izoláty bylo identifikováno 16 unikátních MLG, v recentních izolacích I bylo identifikováno 5 MLG a v menším souboru recentních izolací II pouze 4 MLG. Nejčastějším genotypem byl Pxa-1, který tvořil 82 % všech izolátů *P. ×alni*. Tento genotyp dominoval ve všech souborech izolátů a jeho podíl se v průběhu času postupně zvyšoval – 64 % v původních sběrech, 88 % a 90 % v recentních sběrech I a II.

Žádný z izolátů kromě Pxa-1 nebyl opakovaně nalezen na stejné lokalitě. Některé další genotypy (Pxa-19, Pxa-8, Pxa-38, Pxa-26) byly identifikovány jak v původních, tak v recentních sběrech, avšak vždy na různých lokalitách, často značně vzdálených. Genotyp Pxa-48 byl jediný, který byl nalezen dvakrát v recentní populaci patogenu, přičemž ale byly lokality od sebe vzdálené přibližně 80 km. Ostatní MLG *P. ×alni* byly izolovány pouze jednou. Genotyp Pu-E1 druhu *P. uniformis* byl opakovaně izolován na stejné lokalitě ve třech případech.

Při porovnání izolátů ze stejných lokalit (původní a recentní sběry I) byl dominantní genotyp opakovaně izolován na 23 lokalitách (55 %). Na 4 lokalitách (10 %) byl původně izolován Pxa-1, ale později byl izolován jiný genotyp. Naopak ve 33 % případů byl původně izolován odvozený genotyp, který byl nahrazen dominantním genotypem. Ve 2 % případů byl odvozený genotyp nahrazen jiným odvozeným genotypem. Pokud byl odvozený genotyp nahrazen dominantním nebo jiným odvozeným genotypem, vyskytoval se mezi nimi ve většině případů pouze rozdíl ztráty jedné alely.

Ve dvou případech (epidemické fáze invaze) bylo z jedné lokality izolováno více kmenů. V lokalitě Chrastiny byl izolován jeden kmen Pxa-26 a sedm kmenů Pxa-1. V lokalitě Jemnice bylo izolováno šest kmenů Pxa-1 a jeden kmen Pu-E4, přičemž izolát *P. uniformis* ale nebyl v těsné blízkosti ostatních.

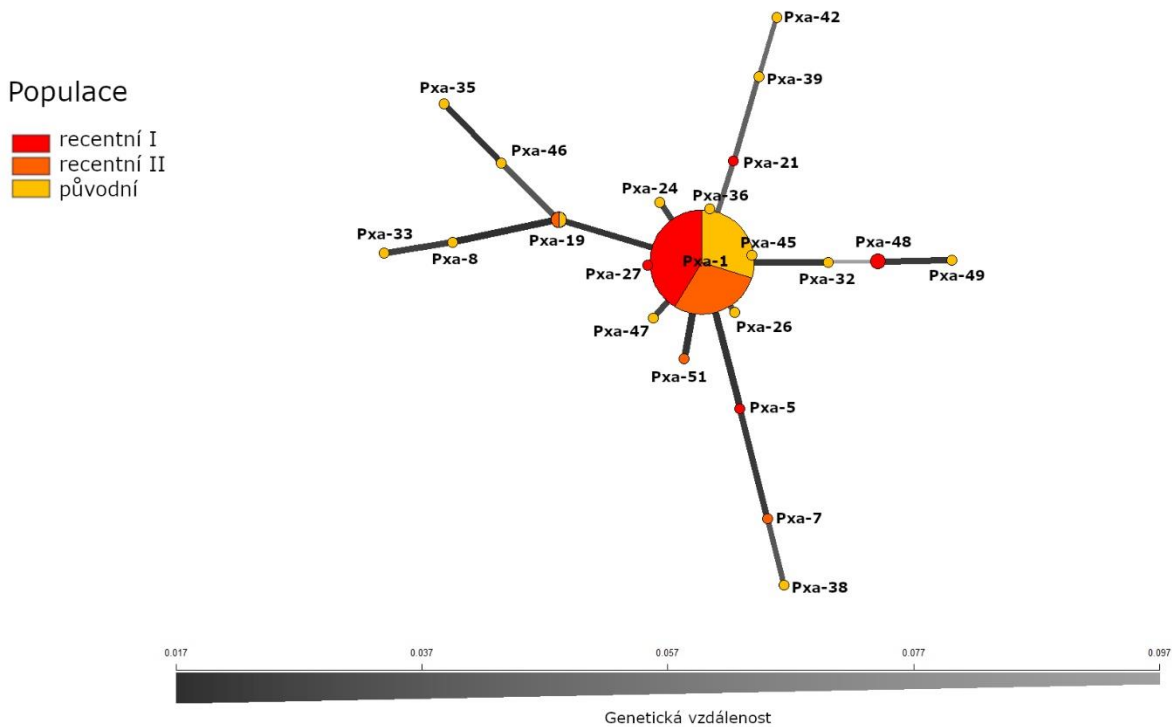
3.3.4 Diverzita populace

Shannon-Wiener index diverzity, který zohledňuje bohatost genotypů a rovnoměrnost jejich distribuce, vykázal nízké hodnoty pro původní populaci (1,619) a velmi nízké hodnoty pro recentní sběry (0,524 a 0,446). Podobné výsledky vykázaly i další ukazatele diverzity. Simpsonův index diverzity (genotypová diverzita), který vyjadřuje pravděpodobnost, že dva náhodně vybrané izoláty patří k různým MLG, vykázal střední hodnotu pro původní sběry a nízké hodnoty pro recentní (0,578 vs. 0,220 a 0,193). Rovnoměrnost zastoupení MLG v populacích (Evenness = E5) vykazovala podobně nízké hodnoty pro všechny tři soubory izolátů (0,339 vs. 0,410 a 0,424), což potvrzuje dominanci genotypu Pxa-1. Klonální bohatost ukázala vysokou klonalitu populací a její nárůst v průběhu času (0,37 vs. 0,1 a 0,08).

Celkově jsou rozdíly mezi původní a oběma recentními soubory izolátů významné, zatímco rozdíly mezi recentními soubory I a II (kontrolní) jsou zanedbatelné. Lze tedy konstatovat, že v průběhu času došlo k poklesu diverzity a k nárůstu dominance genotypu Pxa-1 v populaci (tab. 5).

Tab. 5 Porovnání genetické diverzity v rámci jednotlivých souborů izolátů *P. xalni*

	Počet izolátů	Počet MLG	Pxa-1 %	Shannon–Wiener index	Rovnoměrnost zastoupení MLG	Simpsonův index diverzity	Klonální bohatost
původní	42	16	64 %	1.619	0.339	0.578	0.37
recentní	42	5	88 %	0.524	0.410	0.220	0.10
recentní II	29	4	90 %	0.446	0.424	0.193	0.11



Obr. 25 Minimum spanning network na základě Bruvovy genetické vzdálenosti (Bruvo et al. 2004). Jsou zobrazeny genotypy *P. xalni* z původních (2005–2008), recentních I (2020–2022) a recentních II (2020–2023) souborů izolátů. Čím větší uzel v grafu tím více kmenů konkrétního genotypu

3.3.5 Analýza Minimum Spanning Network (MSN)

Analýza Minimum Spanning Network (viz Obr. 25), která ukazuje podobnosti mezi izoláty na základě Bruvovy vzdálenosti, odhalila několik klíčových faktů. Především nejpočetnější část kmenů patřila k dominantnímu MLG *Pxa-1* ve všech třech souborech kmenů. Velká část odvozených MLG vznikla přímo z dominantního genotypu *Pxa-1*, přičemž rozdíly mezi nimi spočívají pouze v jediné změně. Pouze čtyři "větve" propojují izoláty na základě sdílené ztráty alel na stejných lokusech nebo sdílením odlišných alel od *Pxa-1*. Nicméně, ve srovnání s geografickým rozložením MLG (viz Obr. 26 a Obr. 27) nebyla pozorována žádná geografická spojitost mezi izoláty z konkrétních větví.

Navíc není patrný žádný trend formování alespoň částečně stabilních linií odvozených od *Pxa-1*. Odvozené genotypy z recentních sběrů jsou v grafu více koncentrovány kolem *Pxa-1* než genotypy z původních sběrů, což poukazuje na to, že v průběhu času nejen přibylo dominantního genotypu ale i zastoupení genotypů z něj přímo odvozených.

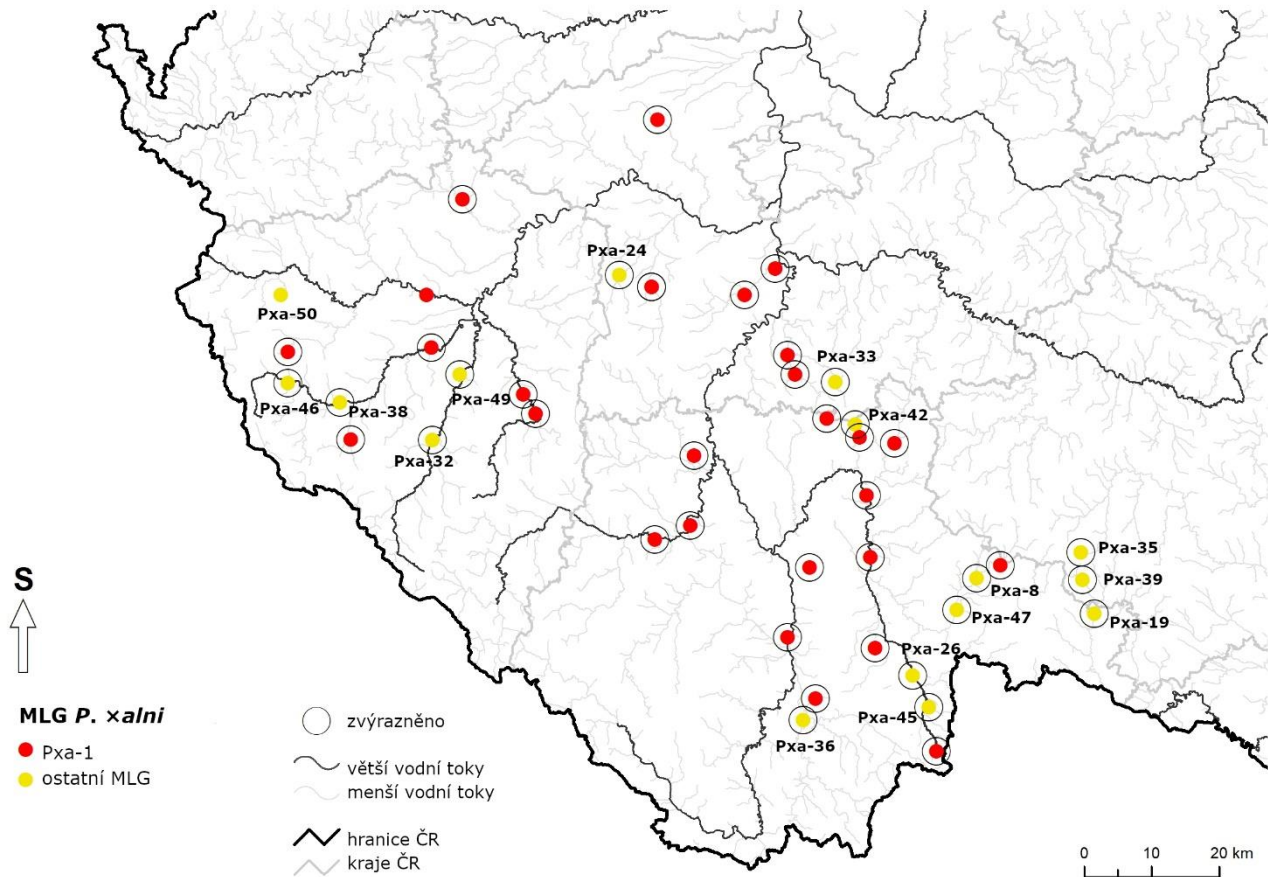
3.3.6 Variabilita populace

Phi-statistika (implementovaná v AMOVA) byla použita pro porovnání původních a recentních I kmenů. Výsledná hodnota 0,019 indikuje velmi nízkou diferenciaci mezi původní a současnou populací. Vysvětlená variabilita mezi populacemi činila pouze 7 %, ale tento výsledek byl statisticky nevýznamný s pravděpodobností 20 %, že výsledek nastal náhodou.

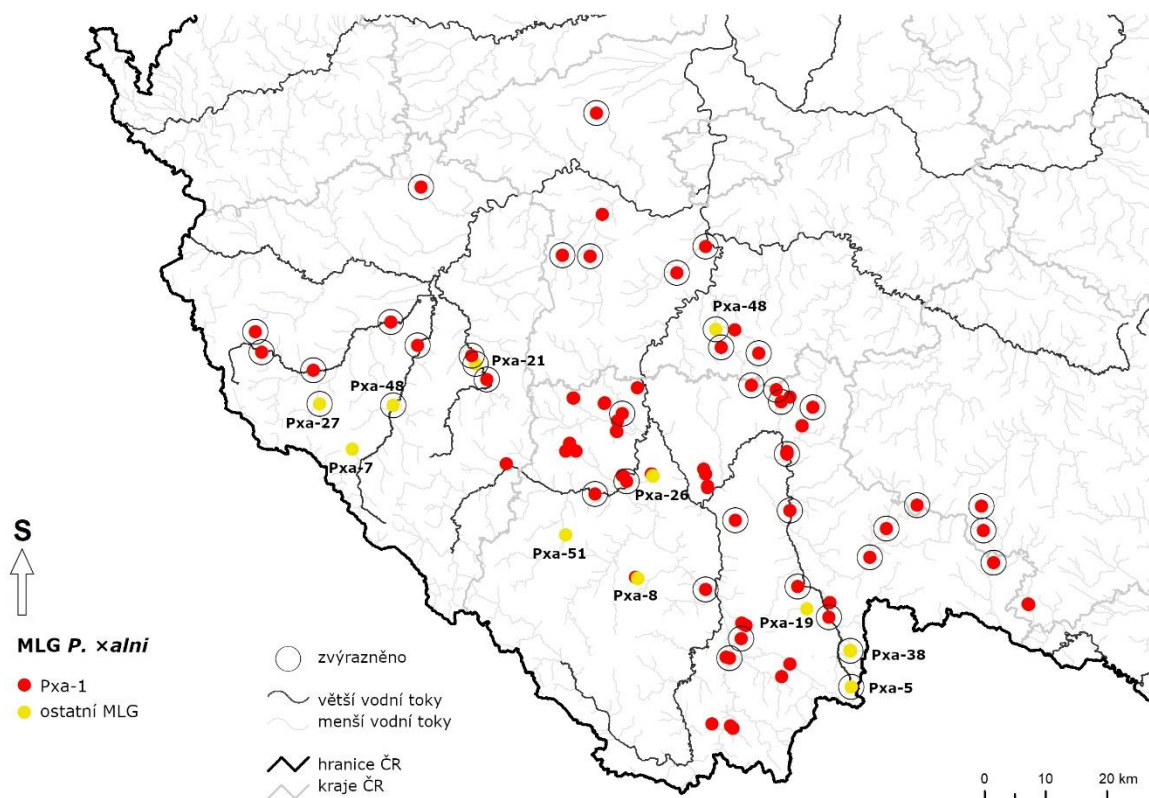
Tento výsledek odpovídá faktu, že tyto populace nejsou odděleny geograficky, ale spíše časově, a variabilita tedy není mezi populacemi, ale spíše uvnitř jednotlivých populací. Pokud zahrneme všechny kmeny ze všech lokalit, výsledky jsou obdobné: Phi 0,011 (p-hodnota 0,187) a vysvětlená variabilita 5 %.

3.3.7 Distribuce MLG

Distribuci všech identifikovaných genotypů z původní populace lze vidět na Obr. 26. Distribuce všech aktuálně získaných genotypů ve studované oblasti je zobrazena na Obr. 27. Odvozené genotypy byly nalezeny téměř rovnoměrně po celé oblasti bez jakéhokoliv geografického vzoru. Z porovnání obou obrázků vyplývá nápadný úbytek odvozených genotypů v recentní populaci.



Obr. 26 Distribuce MLG kmenů *P. xalni* izolovaných v letech 2005–2010. Lokality odkud máme původní i nově izolované kmeny *P. xalni* zvýrazněny kroužkem



Obr. 27 Distribuce MLG kmenů *P. xalni* izolovaných v letech 2020–2024. Lokality odkud máme původní i nově izolované kmeny *P. xalni* zvýrazněny kroužkem

3.3.8 Kardinální teploty

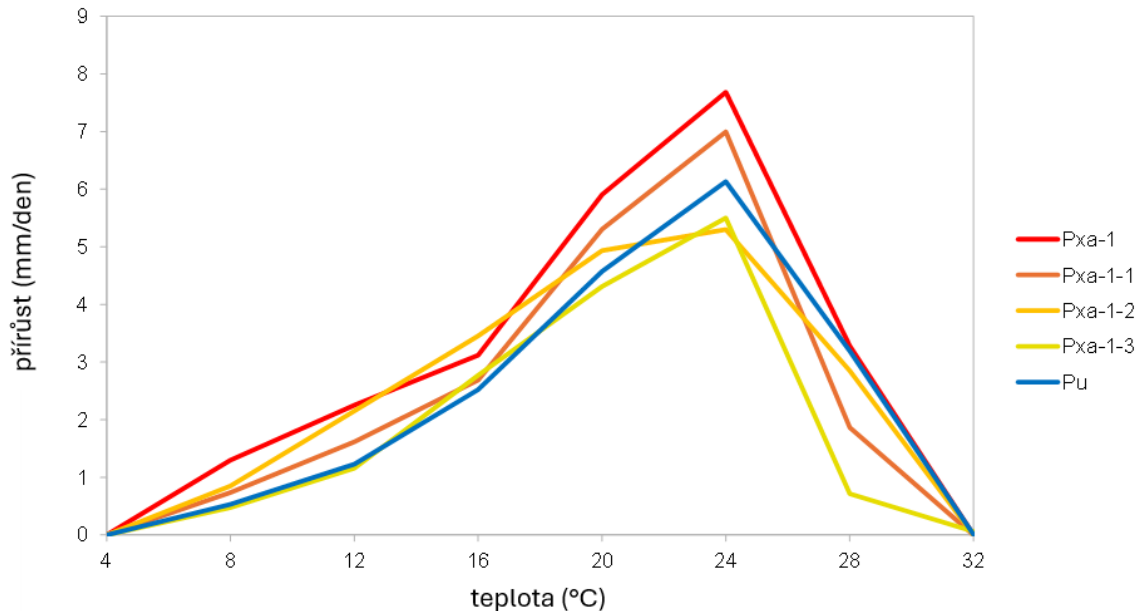
Obecné kardinální teploty pro druhy *P. xalni* a *P. uniformis* byly identifikovány následovně: 4 °C (minimum), 24 °C (optimum) a 32 °C (maximum). Některé izoláty se však od tohoto schématu lišily. Například nejvyšší minimální teplota byla identifikována u kmene P.11/06 (Pxa-39; ztráta tří alel) na 12 °C (kmen nerostl při 8 °C).

3.3.9 Růst in vitro a ztráta alel

Při porovnání růstu jednotlivých kmenů na celé teplotní škále byly pozorovány významné rozdíly mezi velikostí kolonií podle kmenů, teplot a interakcí kmen-teplota. Reziduální variabilita (rozdíly mezi koloniemi jednoho kmene při jedné teplotě) měla hodnotu 0,06, přičemž odpovídající reziduální směrodatná odchylka byla $\sqrt{0,06} = 0,24$ mm. Nejslabší růst byl pozorován u izolátů *P. xalni* P.11/06 (Pxa-39) a 212045/2 (Pxa-38) se třemi ztracenými alelami a u izolátu *P. uniformis* 211 951/1 (Pu-E1). Naopak nejlepší růst byl zaznamenán u izolátů *P. xalni* 211 785, P.103/07 a 211 779 (všechny Pxa-1).

Při porovnání skupin izolátů sloučených podle počtu ztracených alel měla reziduální variabilita (rozdíly mezi koloniemi kmenů jedné skupiny při jedné teplotě) hodnotu 0,62 mm², přičemž odpovídající reziduální směrodatná odchylka byla $\sqrt{0,62} = 0,79$ mm. Signifikantně nejhorší růst byl pozorován u skupin kmenů *P. xalni* se ztrátou tří alel, zatímco nejlepší růst byl zaznamenán u kmenů *P. xalni* dominantního genotypu (Pxa-1; viz Obr. 28).

Rozdíly v růstu jednotlivých skupin kmenů lze nejlépe ilustrovat při identifikovaném růstovém optimu komplexu druhů (*P. alni* s.l.) při 24 °C (viz Tab. 6). Genotypy *P. ×alni* bez ztráty alel nebo s jednou ztracenou alelou rostly významně lépe ($p = 0,05$) než genotypy se ztrátou dvou nebo tří alel.



Obr. 28 Průměrný růst jednotlivých skupin izolátů v závislosti na teplotě. (Pxa-1: dominantní genotyp bez ztráty alely, Pxa-1-1: genotypy s jednou ztracenou alelou, Pxa-1-2: genotypy se dvěma ztracenými alelami; Pxa-1-3: genotypy se třemi ztracenými alelami; Pu

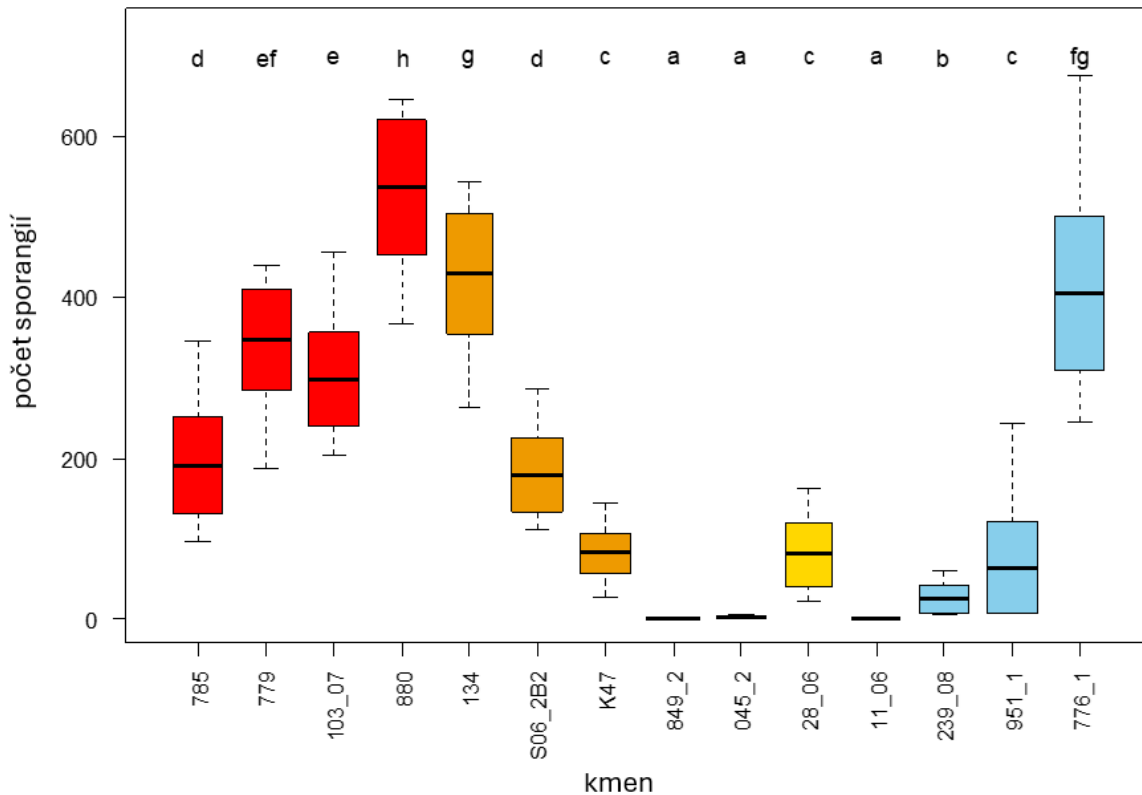
Tab. 6 Tukeyho mnohonásobné porovnání růstu skupin kmenů *P. alni* s. l. při 24 °C. (Pxa-1: dominantní genotyp bez ztráty alely, Pxa-1-1: genotypy s jednou ztracenou alelou, Pxa-1-2: genotypy se dvěma ztracenými alelami; Pxa-1-3: genotypy se třemi ztracenými alelami; Pu: *P. uniformis*)

1.	Skupina	přírůstek (mm/den)	homogenní skupiny
2.	Pxa-1-2	5.3	
3.	Pxa-1-3	5.5	
4.	Pu	6.133	
5.	Pxa-1-1	6.994	
6.	Pxa-1	7.683	

3.3.10 Produkce sporangií

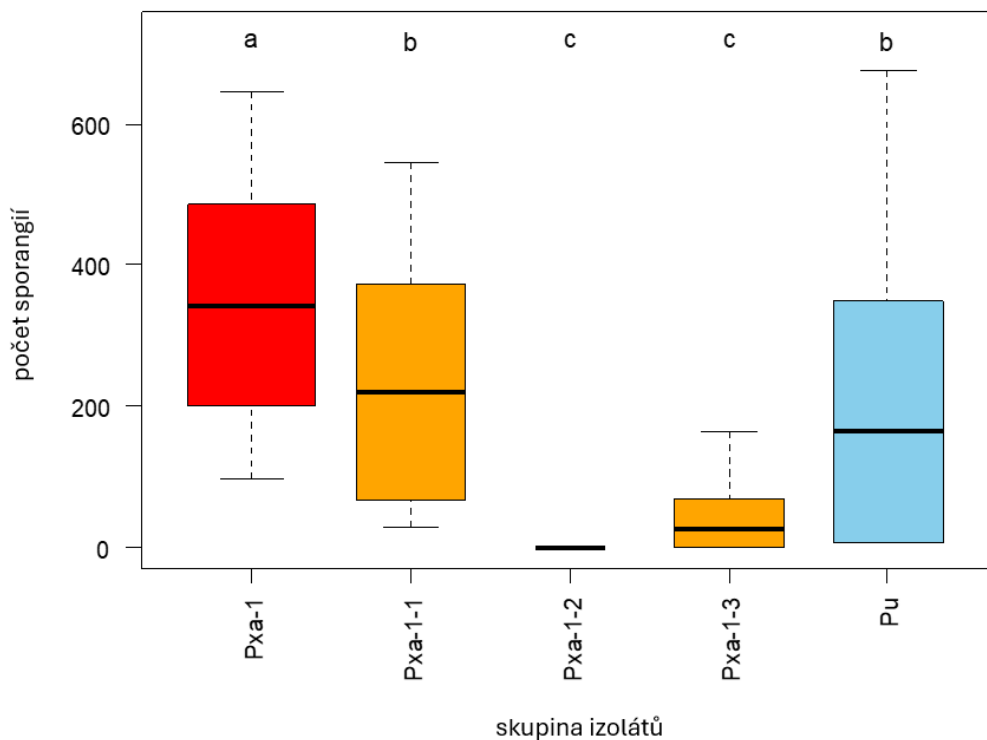
Výsledky ukazují významné rozdíly v produkci sporangií mezi jednotlivými kmeny a genotypy po 1 dni inkubace. Průměrný počet sporangií produkovaných kmeny *P. ×alni* a *P. uniformis* se pohyboval od 0 do 537 sporangií na jeden agarový segment. Kmeny 211849/2 (genotyp Pxa-8, ztraceny dvě alely) a P.11/06 (Pxa-39, ztraceny tři alely) neprodukovaly žádná sporangia, zatímco kmen 212045/2 (Pxa-38, ztraceny tři alely) produkoval v průměru 1,55 sporangia na agarový disk po jednom dni inkubace. Nejvyšší průměrný počet sporangií byl zaznamenán u kmene 211880 (Pxa-1; žádná ztracená alela):

537,05 sporangií, následován kmenem 212134 (Pxa-51, jedna ztracená alela): 429,94 a kmenem 211776/1 (Pu-E4): 404,75 sporangií na jeden agarový segment (viz Obr. 29).



Obr. 29 Produkce sporangií kmenů *P. alni* s.l. v závislosti na ztrátě alel. Graf znázorňuje produkci sporangií kmeny *P. alni* s.l. na základě ztráty alel (červená - *P. ×alni* bez ztráty alel, oranžová až žlutá - *P. ×alni* se ztrátou jedné až tří alel a modrá - *P. uniformis*). Různá písmena nad boxploty indikují významné rozdíly mezi skupinami (Tukeyho post hoc test)

Při porovnání skupin izolátů sloučených podle počtu ztracených alel bylo zjištěno, že signifikantně nejvyšší produkce sporangií (343,13 sporangia na agarový disk) byla zaznamenána u genotypu Pxa-1 (bez ztráty alel). Genotypy *P. ×alni* se ztrátou jedné alely (Pxa-51, Pxa-19, Pxa-5) a genotypy *P. uniformis* (Pu-E1, Pu-E4) vykazovaly výrazně nižší produkci sporangií, v průměru 220,0 a 164,03 sporangia na agarový disk. Genotypy *P. ×alni* se ztrátou dvou (Pxa-8) nebo tří alel (Pxa-33, Pxa-38, Pxa-39) vykazovaly žádnou nebo velmi nízkou produkci sporangií (Obr. 30).



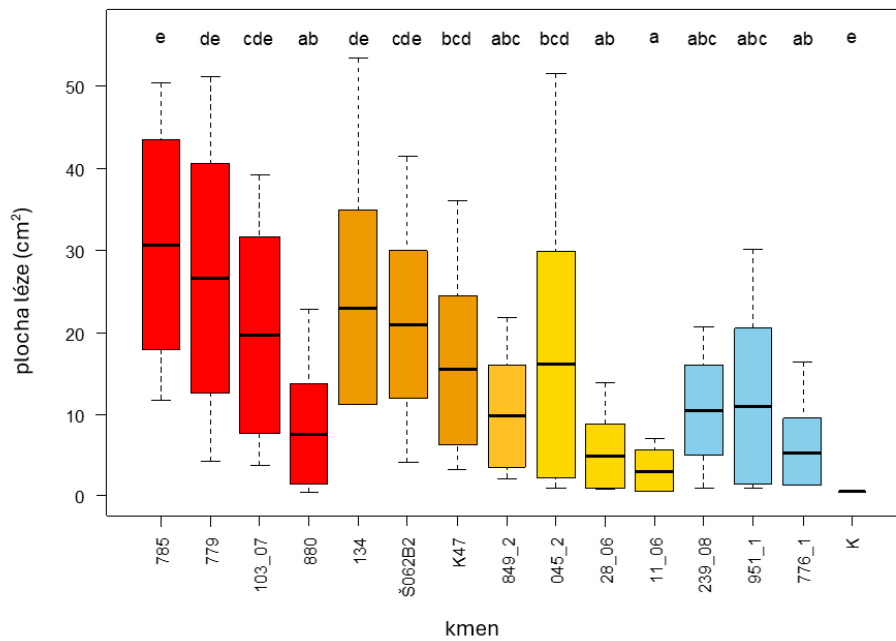
Obr. 30 Produkce sporangií jednotlivých skupin izolátů v závislosti na ztrátě alel (Pxa-1: dominantní genotyp bez ztráty alely, Pxa-1-1: genotypy s jednou ztracenou alelou, Pxa-1-2: genotypy se dvěma ztracenými alelami; Pxa-1-3: genotypy se třemi ztracenými alelami; Pu: *P. uniformis*). Různá písmena nad boxploty indikují statisticky významné rozdíly mezi skupinami (Tukeyho post hoc test)

3.3.11 Patogenita izolátů

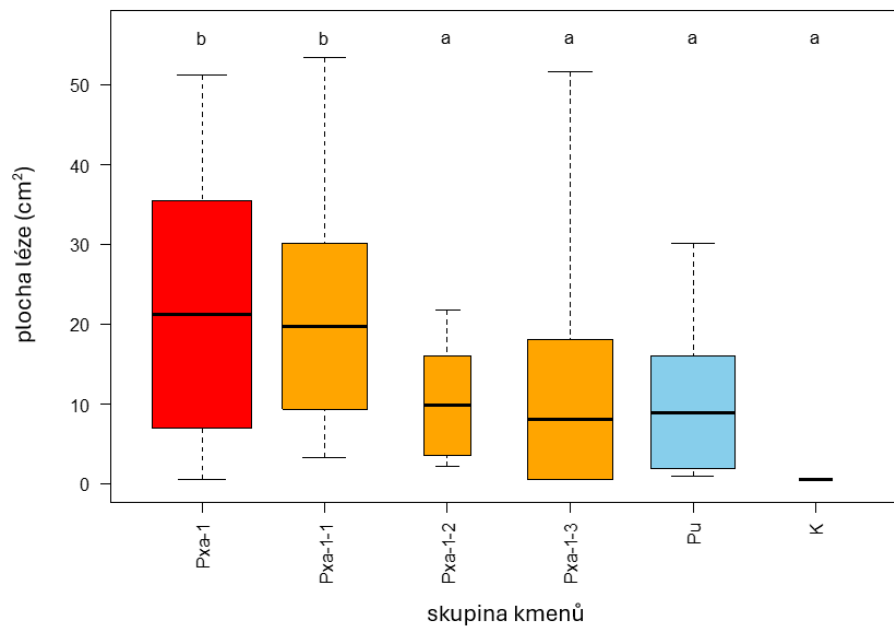
Průměr segmentů neměl žádný signifikantní vliv na rozsah lézí způsobených inokulací, což dokládá Pearsonův korelační koeficient $-0,02$ ($p=0,71$). Kontrolní segmenty inokulované čistým agarem zároveň vykazovaly zanedbatelné plochy odumírajících tkání (v průměru $0,58 \text{ cm}^2$) kolem míst inokulace, a tento vliv na rozvoj lézí lze tedy také vyloučit. Rozsah lézí byl tedy ovlivněn výhradně patogenním kmenem ($p<0,05$).

Rozdíly mezi patogenitou jednotlivých kmenů byly extrémní. Nejnižší patogenitu vykazaly kmeny P.28/06 a P.11/06 (Pxa-33 a Pxa-39, oba se třemi ztracenými alelami), které způsobily léze o průměrné velikosti $4,91 \text{ cm}^2$ a $3,03 \text{ cm}^2$. Naopak nejvíce patogenní kmeny 211779 a 211785 (oba genotyp Pxa-1) způsobily léze o průměrné velikosti $26,54 \text{ cm}^2$ a $30,67 \text{ cm}^2$ (Obr. 31).

Při analýze skupin izolátů bylo zjištěno, že signifikantně nejnižší patogenitu měla skupina kmenů se třemi ztracenými alelami, která způsobila léze o průměrné velikosti $8,01 \text{ cm}^2$. Následovaly kmeny *P. uniformis* a kmeny *P. ×alni* se dvěma ztracenými alelami, přičemž rozdíly v patogenitě mezi těmito třemi skupinami nebyly významné. Významně vyšší patogenitu ($p<0,05$) vykazovaly skupiny kmenů *P. ×alni* s jednou ztracenou alelou ($19,78 \text{ cm}^2$) nebo bez jakékoli ztracené alely ($21,16 \text{ cm}^2$; Obr. 32).



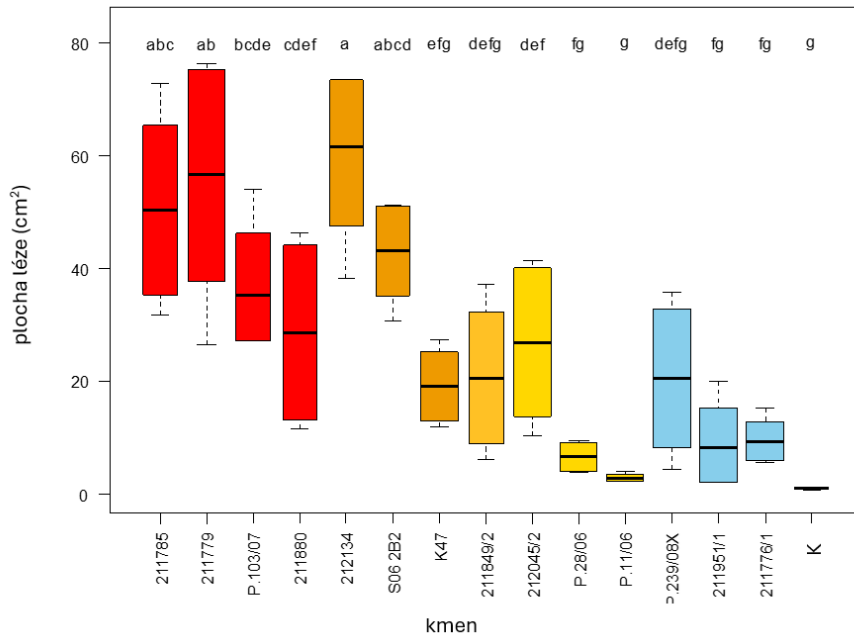
Obr. 31 Plocha lézí (cm²) způsobená jednotlivými kmeny barevně vyznačenými podle druhu a počtu ztracených alel (červená - P. xalni bez ztráty alel, oranžová až žlutá - P. xalni se ztrátou jedné až tří alel a modrá - P. uniformis K: kontrola). Různá čísla nad boxploty ukazují statisticky významné rozdíly (Tukeyho post hoc test)



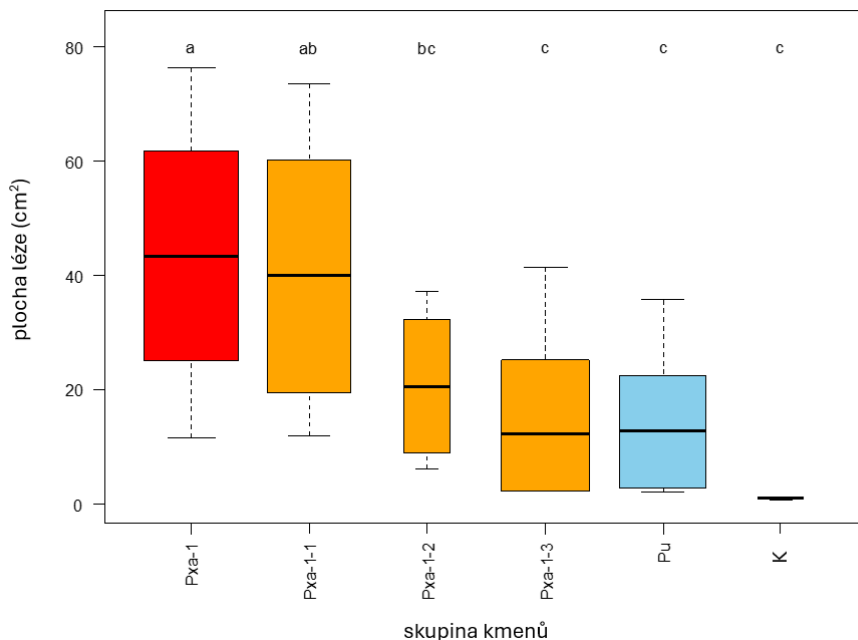
Obr. 32 Plocha lézí (cm²) způsobená jednotlivými skupinami kmenů barevně vyznačených podle druhu a počtu ztracených alel (Pxa-1: dominantní genotyp bez ztráty alely, Pxa-1-1: genotypy s jednou ztracenou alelou, Pxa-1-2: genotypy se dvěma ztracenými alelami; Pxa-1-3: genotypy se třemi ztracenými alelami; Pu: P. uniformis, K: kontrola). Různá písmena nad boxploty indikují statisticky významné rozdíly mezi skupinami (Tukeyho post hoc test)

Kontrolní test patogenity provedený s nižším počtem izolátů a měření výsledky potvrdil. Nejagresivnějšími kmeny zůstaly kmeny dominantního genotypu Pxa-1 nebo kmeny se ztrátou jedné alely (Pxa-21, Pxa-51; Obr. 33). Skupiny izolátů se rovněž významně lišily v patogenitě, přičemž kmeny

Pxa-1 byly opět významně agresivnější než skupiny kmenů se ztrátou dvou nebo tří alel či kmeny *P. uniformis* (Obr. 34). Velikost lézí ve druhém experimentu byla obecně větší, což bylo způsobeno delší dobou inkubace.



Obr. 33 Plocha lézí (cm²) způsobená jednotlivými kmeny barevně vyznačenými podle druhu a počtu ztracených alel (červená - *P. xalni* bez ztráty alel, oranžová až žlutá - *P. xalni* se ztrátou jedné až tří alel a modrá - *P. uniformis* K: kontrola). Různá čísla nad boxploty ukazují statisticky významné rozdíly (Tukeys post hoc test)



Obr. 34 Plocha lézí (cm²) způsobená jednotlivými skupinami kmenů barevně vyznačených podle druhu a počtu ztracených alel (Pxa-1: dominantní genotyp bez ztráty alely, Pxa-1-1: genotypy s jednou ztracenou alelou, Pxa-1-2: genotypy se dvěma ztracenými alelami; Pxa-1-3: genotypy se třemi ztracenými alelami; Pu: *P. uniformis*, K: kontrola). Různá písmena nad boxploty indikují statisticky významné rozdíly mezi skupinami (Tukeyho post hoc test)

3.3.12 Sériové *in vitro* pasážování *P. ×alni*

Všechny zkoumané kmeny (10) byly na začátku i na konci experimentu určeny na úroveň MLG. Na počátku byly všechny izoláty identifikovány jako MLG Pxa-1. Po 20 pasážích byla u dvou kmenů pozorována ztráta alel, což vedlo ke vzniku genotypů MLG Pxa-19 (kmen 211890) a MLG Pxa-26 (kmen P.103/07). U tří kmenů (211880, 211791/1, 211890) došlo k úplnému zastavení růstu, a proto byly genotypizovány předtím, než k zastavení růstu došlo, nicméně u těchto kmenů nebyla ztráta alel pozorována.

3.4 Diskuze

Polyploidizace u patogenů rodu *Phytophthora* může vést k výskytu velmi patogenních linií a epidemií. Například v případě plísně bramborové (*P. infestans*) jsou nejrozsáhlejší epidemie známé v tomto rodu, obvykle způsobeny triploidními asexuálními liniemi, přestože diploidní populace rozmnožující se pohlavně převažují v jeho přirozeném areálu v Mexiku (Knaus et al. 2020). Podobně polyploidní klonální linie, často vznikající hybridizací mezi různými genotypy, byly velmi úspěšné během invazí *P. ×cambivora* (Mullett et al. 2023). Polyploidizace u *P. ×alni* vedla v konečném důsledku k rozsáhlému odumírání olší v Evropě. Klíčovou výhodou *P. ×alni* je heteróza, která je důsledkem genetické kombinace obou rodičovských druhů napadajících olše (genom *P. ×alni* zahrnuje geny vlastně ze tří různých druhů, protože *P. ×multiformis* je již sám o sobě hybridem; Husson et al. 2015) a jeho zavlečení do nového hostitelského prostředí nepřizpůsobeného jeho přítomnosti (Aguayo et al. 2013). Vznik nových polyploidních, virulentnějších linií lépe adaptovaných na obranné systémy rostlin představuje evoluční výhodu, která může převažovat nad nevýhodami spojenými s velkým genomem (Raffale a Kamoun 2012). Je pozoruhodné, že triploidní *P. ×alni* již nyní disponuje jedním z největších genomů v rámci rodu *Phytophthora* (Van Poucke et al. 2021). Mezi výhody polyploidie a heterozygotnosti patří také hojnost genů, která může zmírnit účinky škodlivých recesivních mutací během asexuální reprodukce (Comai 2005; Ioos et al. 2006).

Nicméně triploidní *P. ×alni* je geneticky nestabilní a vysoké procento oospor je abortováno nejspíše kvůli problémům při meióze (Brasier et al. 2004). Pouze sudá ploidie by mohla umožnit správné párování chromozomů a vyřešit problémy během meiózy (Husson et al. 2015). Potenciální změna ploidie by mohla triploidnímu *P. ×alni* umožnit obnovit normální tvorbu oospor, což by mohlo vést k lepšímu přezimování (Černý a Strnadová 2012; Delcán a Brasier 2001; Schumacher et al. 2006) a pravděpodobně k další devastaci zbývajících populací hostitelů. Byly zaznamenány náznaky změn ploidie, ale dosud nebyl nalezen žádný kmen *P. ×alni* s potvrzenou sudou ploidí nebo vyřešenými problémy při tvorbě oospor (Husson et al. 2015; Van Poucke et al. 2021). Proto se triploidní *P. ×alni* šíří primárně asexuálně (Aguayo et al. 2016) a neustále generuje nové genotypy ztrátou alel a v některých případech také ztrátou heterozygoty (Aguayo et al. 2016; Mizeriene et al. 2020; tato studie). Přítomnost mnoha odvozených genotypů v divokých populacích byla zaznamenána téměř na celém areálu výskytu tohoto druhu (Aguayo et al. 2016; Mizeriene et al. 2020).

Jak však tato studie odhaluje, není neobvyklé, že se v jedné lokalitě během epidemické fáze onemocnění vyskytují různé genotypy. Izoláty dominantního genotypu (Pxa-1) vždy převládaly v porostech, ale blízké příbuzné genotypy se ztrátou obvykle jedné alely byly nalezeny na sousedních stromech (například na lokalitě Chrastiny bylo získáno sedm izolátů Pxa-1 a jeden izolát Pxa-26). Vysoký potenciál pro vývoj nových genotypů v krátkém čase byl také prokázán v kultuře, protože opakované kultivace kmenů dominantního genotypu (bez přítomnosti stresu) potvrdily vznik odvozených genotypů se ztrátou jedné alely během krátkého času (20 cyklů subkultivace).

3.4.1 Odběr vzorků a izolace v kultuře

Populace *P. ×alni* je ovlivňována zakladatelskými MLG (více-locusovými genotypy) (Aguayo et al. 2016) a také charakteristikami povodí (Mizeriene et al. 2020). Tyto dvě rozsáhlé studie provedené na kontinentální úrovni však dospěly k odlišným závěrům ohledně evoluce populace tohoto druhu v průběhu času. První tvrdí, že genetická diverzita se z dlouhodobého hlediska snižuje, zatímco druhá uvádí pravý opak. Směr vývoje genetické diverzity by proto mohl být lépe objasněn lokálními studiemi – na úrovni jednoho povodí, kde lze spíše předpokládat vliv jednoho zakladatelského genotypu a jedné introdukční události. Výhodou této studie, která hodnotí vlastnosti populace patogenu ve dvou časových úrovních, je opakované a metodicky identické mapování výskytu genotypů *P. ×alni* na stejných lokalitách. Izolace provedené v letech 2005–2009 v povodí řeky Vltavy byly po přibližně 15 letech (2020–2022) zopakovány. Oba soubory kmenů byly následně zkoumány a porovnány.

Opakovaný odběr vzorků ze stejných stromů však byl téměř nemožný, protože mnoho původně vzorkovaných stromů mezitím uhynulo a bylo odstraněno. Byly proto vzorkovány nejbližší symptomatické stromy a izolován patogen. Na některých lokalitách bylo nutné provést několik návštěv, protože nalezení vhodných stromů a úspěšná izolace patogenu si někdy vyžádaly značný čas. To bylo především důsledkem postepidemické fáze onemocnění v mnoha porostech, kde byly populace olší již značně prořídle, příznaky aktivně rostoucího patogenu byly vzácné a úspěšnost izolace relativně nízká. Stromy vzorkované v druhé části studie tak obvykle nebyly totožné s původními, ale šlo o jejich sousedy ve stejných porostech, vzdálené obvykle desítky, maximálně však nižší stovky metrů od původních míst izolace.

Možnost izolace z půdy nebo vody z původních míst odběru byla také zvažována, ale nakonec zamítnuta jako příliš časově náročná (Burgess et al. 2021). Izolace z půdy z přesných míst původních sběrů by pravděpodobně byla obtížná nebo neúspěšná, protože *P. alni* pravděpodobně nepřežívá v půdě bez svého hostitele déle než dva roky (Jung a Blaschke 2004). Navíc nelze vyloučit další selekční tlaky v půdě – například rozdíly v produkci nebo životaschopnosti oospor (Delcán a Brasier 2001) a potenciální saprofytické schopnosti různých genotypů *P. ×alni* (podobně jako u jiných druhů popsanych McCarrenem 2006 a Aramem a Rizzem 2018) by mohly ovlivnit přežití jednotlivých genotypů mimo hostitele. Izolace z vody byla rovněž zamítnuta, protože izoláty získané z volně plovoucích zoospor by mohly mít neznámý a potenciálně vzdálený původ. Zamítnutí izolace z půdy a vody zároveň snížilo počet izolátů necílových druhů, jejichž identifikace by také byla časově náročná.

Získání recentních izolátů z živých stromů v blízkosti původních míst odběru a použití konzistentní metodologie umožnilo lépe izolovat vztah mezi hostitelem a patogenem od vlivů prostředí. To mohlo přispět k lepšímu pochopení změn v populaci patogenu a jeho schopnosti adaptace. Dalším praktickým důvodem bylo to, že pouze několik dalších druhů rodu *Phytophthora* může způsobovat podobné symptomy u olší (Bregant et al. 2020) a úspěšná izolace tak téměř vždy znamenala přítomnost *P. alni*, což bylo v této studii potvrzeno.

3.4.2 Struktura populace *P. ×alni* a její změny

Pomocí analýzy mikrosatelitů jsme identifikovali genotypy obou druhů, *P. ×alni* a *P. uniformis*. V rámci komplexu převládá druh *P. ×alni*, přičemž podíl *P. uniformis* mezi všemi novými izoláty *P. alni* s.l. činí přibližně 18 %, což je srovnatelné s 12 % pozorovanými v celé České republice v letech 2005–2010 (Štěpánková et al. 2013). Z roztrošeného výskytu *P. uniformis* se zdá, že je postupně vytlačován *P. ×alni* (Mizeriene et al. 2020; Štěpánková et al. 2013). Po celé Evropě je *P. uniformis* častěji nalézán v blízkosti menších toků (Štěpánková et al. 2013), ve vyšších nadmořských výškách (Corcobado et al. 2023) nebo v chladnějších oblastech (Redondo et al. 2015). To však pravděpodobně odráží spíše toleranci než preferenci, protože byl také izolován v teplejších oblastech, například ve Španělsku (Varela et al. 2012), a ve vícero případech i v nadmořských výškách srovnatelných s těmi, kde se vyskytuje *P. ×alni* (Corcobado et al. 2023). Naše studie neprokázala lepší růst *P. uniformis* při nižších teplotách, což

naznačuje, že tento druh spíše toleruje chladnější podmínky díky své schopnosti produkovat velké množství životaschopných oospor, které mohou pravděpodobně lépe přežít zimu (Brasier et al. 2004; Černý a Strnadová, 2010, 2012; Schumacher et al. 2006).

P. uniformis pravděpodobně expandoval po Evropě jako první, následně došlo k hybridizaci s druhem *P. ×multiformis* (Aguayo et al. 2016; Husson et al. 2015; Van Poucke et al. 2021), což vedlo ke vzniku a rozšíření *P. ×alni*, který dosud neobsadil všechna vhodná stanoviště.

Během této studie se podařilo objevit čtvrtý evropský genotyp *P. uniformis*, označený jako Pu-E4.

3.4.3 Genetická rozmanitost *P. ×alni*

Identifikovali jsme celkem 22 genotypů *P. ×alni*, přičemž šest z nich (viz Doplňující tabulky S1 a S2) dosud nebylo popsáno. Během epidemické fáze onemocnění v povodí Vltavy byla genetická diverzita *P. ×alni* relativně vysoká (bylo nalezeno 16 MLG) a podíl genotypu Pxa-1 činil 64 %. V pozdější post-epidemické fázi však genetická diverzita klesla (v menším datasetu byly nalezeny pouze 4–5 MLG) a dominance Pxa-1 se zvýšila na cca 88–90 %. Tyto výsledky odpovídají datům z předchozích studií zkoumajících toto území, přičemž genotyp Pxa-1 byl dominantní také v dalších lokalitách (Aguayo et al. 2016; Mizeriene et al. 2020).

Z výsledků lze vyvodit, že po introdukci byla genetická diverzita velmi nízká (nulová) a podíl zakladatelského genotypu Pxa-1 dosahoval 100 %. Typickým příkladem jsou horské oblasti Švýcarska, kde byl patogen poprvé zaznamenán v roce 2008, nebo pravděpodobnému místu vzniku druhu dosti vzdálená Litva (Mizeriene et al. 2020). V epidemické fázi dochází k rychlému zvýšení genotypové diverzity a poklesu dominance Pxa-1. V post-epidemické fázi však genetická diverzita znovu klesá a dominance Pxa-1 opět roste. Tyto změny lze vysvětlit vývojem a šířením druhu *P. ×alni* v Evropě, který pravděpodobně začal v západní Evropě v 70. nebo 80. letech 20. století a postupně se šířil na východ.

3.4.4 Vznik odvozených genotypů

Všechny ostatní genotypy byly odvozeny od Pxa-1 a odlišovaly se od něj pouze minimálně, typicky ztrátou alel na jednom či více lokusech. Tyto genotypy byly reprezentovány jedním nebo dvěma izoláty, často z různých a vzdálených lokalit. Ztráta alel pravděpodobně vede k opakovanému vzniku geneticky podobných genotypů, což odpovídá častému výskytu LOH (ztráty heterozygosity) u tohoto druhu (Aguayo et al. 2016; Mizeriene et al. 2020).

Žádný geografický vzorec rozložení jednotlivých genotypů nebyl nalezen, což lze přičíst lokálnímu charakteru studie a absenci stabilnější evoluce více odvozených genotypů. Je pravděpodobné, že některé odvozené genotypy vyhynuly kvůli horší fitness ve srovnání s dominantními genotypy, jako je Pxa-1.

3.4.5 Ztráta heterozygosity

Většina izolátů *P. ×alni* vykazuje vysokou míru heterozygosity díky kombinaci genomů *P. uniformis* a *P. ×multiformis*, přičemž druhý jmenovaný je sám allotetraploidním hybridem (Husson et al., 2015; Ioos et al., 2006). Ztráta heterozygosity může nastat prostřednictvím mechanismů, jako je mitotická rekombinace nebo genová konverze, což vede k homozygotním lokusům, kde jsou různé rodičovské alely nahrazeny identickými alelami od jednoho rodiče. Tento jev je běžný u asexuálních organismů (Smukowski Heil, 2023) a může také nastat v důsledku ztráty celých chromozomů, přičemž je častější u polyploidních jedinců (Dutta et al., 2022; Mayer et al., 1990).

Dalším možným mechanismem ztráty heterozygosity, alespoň u kvasinek, je přerušena (předčasně ukončená) meióza, po níž následuje obnova růstu prostřednictvím mitotického dělení, což

vede k rekombinaci a rozsáhlé ztrátě heterozygoty ve velkých oblastech DNA (Mozzachioidi et al., 2021). Tento mechanismus odpovídá pozorování, že ztráta heterozygoty se objevuje pouze u triploidní *P. ×alni*, která je charakterizována vysokým počtem abortovaných oogonií, a nikoliv u dalších dvou druhů tohoto komplexu (Aguayo et al., 2016; Brasier et al., 2004).

Ztráta heterozygoty byla zdokumentována i u jiných invazivních druhů rodu *Phytophthora*, například u *P. ramorum*, kde byla pozorována společně s částečnou aneuploidií, což bylo přičítáno stresu způsobenému fenolovými sloučeninami v dubové kůře (Kasuga et al., 2016), nebo u *P. capsici* v Číně, kde byla spojena se změnami virulence a párovacím typem (Lamour et al., 2012; Hu et al., 2013). Velmi podobný případ byl pozorován u *P. cinnamomi* v Austrálii (Dobrowolski et al., 2003), kde bylo odhaleno několik klonálně se šířících linií, kde docházelo ke ztrátě heterozygoty pravděpodobně v důsledku mitotické rekombinace. Tato rekombinace může odkrýt recesivní alely, což potenciálně zvyšuje nebo snižuje fitness daných linií.

Podobné jevy byly pozorovány u linií *P. cinnamomi*, kde docházelo ke ztrátě heterozygoty v prostředí s hojností hostitelů. V těchto stabilních prostředích se sexuální reprodukce ukázala jako nevýznamná, a proto nebyla pozorována (Dobrowolski et al., 2003). U *P. ramorum* může ztráta heterozygoty sloužit jako mechanismus rychlé adaptace na stresory, jako je rezistence hostitele, mění se podmínky prostředí nebo expozice fungicidům (Dale et al., 2019). V případě *P. ×alni* by možným stresorem mohly být vysoké letní nebo nízké zimní teploty (Aguayo et al., 2014; Černý a Strnadová, 2012).

Ztráta alel může také nastat v důsledku genetického driftu v malých izolovaných populacích (bez vlivu na fitness), které tento patogen vytváří díky své vysoké agresivitě vůči hostiteli (Young et al., 1996; Mizeriene et al., 2020). Mizeriene et al. (2020) rovněž naznačují, že ztráta heterozygoty může stabilizovat nestabilní subgenom odvozený od hybridu *P. ×multiformis* (většina alel byla ztracena z tohoto subgenomu).

Naše studie však ukázala omezenou schopnost odvozených genotypů dlouhodobě přežít nebo vytvořit větší populace v prostředí, což naznačuje, že ztráta alel u *P. ×alni* pravděpodobně vede ke snížení fitness (což bylo také potvrzeno) a vzniká pravděpodobně často během mitotické rekombinace, zvláště během explozivního asexuálního šíření v epidemické fázi onemocnění.

V případě *P. capsici* byla mitotická ztráta heterozygoty (také spojená se ztrátou patogenity) častěji pozorována ve volné přírodě, ale vyskytovala se i při dlouhodobém uložení kultur (Hu et al., 2013; Lamour et al., 2012). Naše testy prokázaly stejný jev u genotypu *P. ×alni* Pxa-1. Mimo jiné to naznačuje možnost ztráty alel během práce s kulturami v laboratoři. Naše (původní) kmeny byly během skladování v ČSFO pasážovány nejčastěji pouze čtyřikrát (M. Hrabětová, osobní sdělení), takže jako vysvětlení vyššího počtu genotypů mezi staršími izoláty je tato možnost nepravděpodobná. Mnohé z nich byly navíc genotypovány již dříve (Mizeriene et al., 2020). Přesto nelze zcela vyloučit, že k nějaké ztrátě alel během uchování nedošlo, nemělo by však být rozhodně příliš významné.

3.4.6 Testy fitness

Test produkce zoosporangií prokázal, že dominantní genotyp Pxa-1 a jemu blízké genotypy (se ztrátou jedné alely) produkovaly první den po zaplavení filtrovanou říční vodou významně více sporangií než jiné genotypy. Ostatní genotypy sice také produkovaly sporangia, ale většinou v menším množství nebo s delším zpožděním. Variabilitu mezi izoláty v produkci sporangií zaznamenali také Chandelier et al. (2016). Nejefektivnější kmen v jejich studii byl později identifikován jako genotyp Pxa-1 (Aguayo et al., 2016).

Testy agresivity genotypů *P. ×alni* ukázaly, že Pxa-1 je nejagresivnější genotyp a že s rostoucím počtem ztracených alel se kmeny stávají méně škodlivými. To odpovídá předchozím výsledkům, kde byl použit menší počet kmenů, ale byly pozorovány významné rozdíly mezi Pxa-1 a ostatními genotypy (P. Štochlová, nepublikovaná data). Rozdíly v patogenitě *P. alni* s.l. byly potvrzeny několikrát (Brasier a

Kirk, 2001; Haque et al., 2015; Santini et al., 2003; Zamora-Ballesteros et al., 2017). Podobné výsledky zaznamenal Haque et al. (2015), kdy v některých testech byly některé izoláty *P. ×alni* virulentnější než jiné, zatímco tyto byly srovnatelné ve virulenci s izoláty *P. uniformis* a *P. ×multiformis*. Rozdíly v patogenitě mezi genotypy byly také pozorovány u druhů jako *P. ramorum*, kde byly tři genotypy testovány na 25 druzích okrasných rostlin za účelem identifikace potenciálních hostitelů a environmentálních zdrojů tohoto polyfágního patogenu (Garbelotto et al., 2021). Rozdíly v patogenitě mezi genotypy byly také zaznamenány u *P. cinnamomi* (Linde et al., 1999). Významné rozdíly v patogenitě byly pozorovány i mezi geneticky vzdálenými genotypy *P. infestans* (Velasquez-Vasconez et al., 2024).

Výsledky mohly být do jisté míry ovlivněny buď použitými metodami, nebo stářím izolátů. Při testech produkce zoosporangií mohlo docházet k podhodnocení výsledků u kmenů s vysokou produkcí zoosporangií, to však nemohlo ovlivnit výsledky opačným směrem. Pro testy patogenity byla použita metoda inokulace segmentů větví olše, která poskytovala velmi dobré a srovnatelné výsledky při opakování experimentu. Doporučovaná metoda použití koncových větvíček s listy inokulovaných roztokem zoospor, (Chandelier et al. 2016), nebyla v našem případě použitelná kvůli nízké produkci zoospor u mnoha testovaných kmenů. Tato metoda se zdá být vhodnější pro porovnání rezistence genotypů olše za použití menšího počtu kmenů *P. alni* s dobrou produkcí sporangií, ideálně patřících ke genotypu Pxa-1. Výsledky testů virulence mohly být ovlivněny délkou uložení jednotlivých kmenů v kultuře. V případě MLG Pxa-1 měl však kmen P.103/07 výsledky srovnatelné s jinými kmeny tohoto genotypu. V případě ztráty tří alel způsobily starší izoláty P.28/06 (Pxa-33) a P.11/06 (Pxa-39) menší léze než izolát 212045/2 (Pxa-38). Na druhé straně při produkci sporangií byl starší izolát P.28/06 úspěšnější než nově izolovaný 212045/2. Současně při srovnání původních starších kmenů mezi sebou dosahoval P.103/07 (MLG Pxa-1) lepších výsledků ve všech testech. U kmenů *P. uniformis* nebyly rozdíly mezi staršími a novými izoláty významné, starší izolát pouze produkoval méně sporangií. Zdá se tedy, že délka uložení kmenů v kultuře nemusí způsobit významný pokles fitness a pravděpodobně nijak významně tuto studii neovlivnila.

Testy fitness různých MLG *P. ×alni* a *P. uniformis* tedy potvrdily, že kmeny dominantního genotypu dosahují nejrychlejšího růstu, produkují nejvíce zoosporangií a způsobují největší poškození v hostitelských vodivých pletivech. S rostoucím počtem ztracených alel v genomu odvozených genotypů *P. ×alni* (od jedné do tří) se jejich nositelé postupně zhoršují ve všech sledovaných parametrech. Odvozené genotypy tak vykazují výrazně nižší fitness. Fitness *P. uniformis* je ve srovnání s dominantním MLG Pxa-1 slabší ve všech parametrech a je srovnatelná s odvozenými genotypy *P. ×alni*, které ztratily jednu nebo dvě alely. Nízká fitness odvozených genotypů je tak pravděpodobně pro své nositele fatální v konkurenci s dominantními nebo méně odvozenými genotypy a může pro ně znamenat minimální možnost přežívání či šíření v rámci populace hostitele s výrazně sníženou denzitou jedinců v postepidemické fázi invaze, což v dlouhodobější perspektivě jednoznačně musí vést k pokračující dominanci Pxa-1 v oblasti povodí Vltavy.

3.4.7 Další izolované taxony mimo druhový komplex *P. alni* s. l.

Další druh izolovaný z aktivních krčkových lézí olší vedle *P. alni* s.l. byl *P. plurivora*. Tento druh byl vždy izolován na lokalitě spolu s *P. alni*. Na rozdíl od *P. alni* je *P. plurivora* polyfágní, napadající vícero hostitelů jako například dub (*Quercus*), buk (*Fagus*) a javor (*Acer*), zároveň může způsobit viditelné léze krčku i na olši. Je rozšířen po celé Evropě, včetně České republiky (Jung & Burgess, 2009; Mrázková et al., 2013). Například v rakouských porostech olší byl druh *P. plurivora* často nalezen na lokalitě i bez viditelných lézí (Corcobado et al. 2023). Podobně byla hlášena z porostů olší v Portugalsku (Bregant et al. 2023) a dalších evropských zemích. Po *P. alni* s.l. představuje *P. plurivora* největší hrozbu pro olše (Corcobado et al. 2023). *P. lacustris* je běžný říční druh, který je k olším slabě až středně agresivní (Nechwatal et al. 2013).

3.5 Závěr

Z výsledků vyplývá následující hypotéza: Je velmi pravděpodobné, že zakladatelem nové lokální populace je nejčastěji genotyp Pxa-1 s nejvyšší fitness (produkce sporangii, růst, patogenita) a zároveň nejvíce rozšířený v Evropě. Během expanze druhu v epidemické fázi onemocnění následuje rychlé asexuální množení, vyštěpování méně či více odvozených genotypů a jejich šíření. Tyto odvozené genotypy mají nižší fitness (čím více mutací, tím horší) a v prostředí přežívají pravděpodobně díky minimální konkurenci o nové zdroje. V průběhu dalšího vývoje a poklesu hostitelské populace dochází ke zvýšení konkurence o přístupné hostitele v porostech, což vede k postupnému vymírání odvozených genotypů v důsledku tlaku dominantního genotypu na hostitelskou populaci.

Nicméně díky relativně vysoké mutabilitě triploidu se v této fázi v prostředí objevují další nové odvozené genotypy, avšak stupeň jejich odvozenosti je nižší (jedna mutace), což jim umožňuje (alespoň dočasně) přežít v prostředí s vysokou konkurencí. Možná některé z nich přežívají z epidemické fáze podobně jako *P. uniformis*, pravděpodobně v nízkých frekvencích. Tento proces se pravděpodobně odehrává pouze v lokálním měřítku.

V širší oblasti (zejména v zemi s proměnlivým prostředím, členitou geografii, říční sítí a socio-ekonomickými rozdíly) může být vývoj populace velmi heterogenní. Některé lokální populace se mohou nacházet v epidemické fázi s vysokou diverzitou, jiné ve fázi zakladatele na čele šíření nemoci, nebo naopak v post-epidemické fázi s nízkou diverzitou.

Tato práce ukázala, že v post-epidemické fázi nemoci v povodí Vltavy bude převládat dominantní a nejvíce patogenní genotyp Pxa-1. Podobné schéma je známo i u jiných vysoce agresivních rostlinných patogenů, jako je *Ophiostoma novo-ulmi*, kdy výrazný pokles virulence nemusí nutně následovat ani po výrazném úbytku hostitelů (Brasier a Webber 2019).

Výsledky jasně ukazují na značný význam vhodného managementu nemoci i v její post-epidemické fázi, kdy se situace zdánlivě stabilizuje a je možné obnovení hostitelské populace. Rozsáhlejší vysazování olší v břehových porostech a invadovaných lesích by však vedlo pouze k dalšímu epidemickému rozvoji nemoci a dalším ztrátám.

4 Doporučení pro ochranu přírody a management porostů

Změny v olšových mokřadech a luzích za posledních 20 let jsou důsledkem především pokračujících sukcesních změn, eutrofizace a změn klimatu. Přestože je plíseň olšová závažným patogenem a její patogenita neklesá, má na změnách biodiverzity a obecně fungování lužních a mokřadních lesů jen omezený podíl (významnější důsledky může mít například pro břehové porosty a tím i dynamiku toků, tyto efekty jsme však v této studii nezkoumali). Pokusy o její vymýcení, například nahrazování olší nepůvodními nebo stanovištně nevhodnými druhy dřevin, by mohly mít pro naši přírodu závažnější následky než patogen sám. Vhodnější je uvažovat o preventivních opatřeních, která je možné uplatnit v oblastech, kde se patogen zatím nevyskytuje. Dále jsou to opatření konsolidační, kterými se pokoušíme vliv patogenu omezit a zachovat původní stav bez ohledu na jeho přítomnost a nakonec adaptivní, kdy akceptujeme jeho přítomnost a přizpůsobíme se změnám, které způsobuje.

K nejdůležitějším preventivním opatřením patří zamezení zavlečení *P. alni* s výsadbovým materiálem (který může být asymptomatický, ale infikovaný), tedy především využívat přirozené obnovy a v případě umělé obnovy používat lokálně sbíraná semena.

Konsolidační opatření spočívají zejména v omezení populace patogenu odpovědným managementem břehových porostů a zachováním určitých zásad v lesnickém hospodaření. Pokud jsou

vysazovány olše, je třeba aby byly v dostatečné vzdálenosti od toků a krčky vysazovaných jedinců nebyly v přímém kontaktu s vodou, omezíme tím možné škody i množství inokula patogenu. V rámci lesního hospodaření je vhodné napadené olše odstraňovat, avšak práce je vhodné provádět mimo období hlavní aktivity patogenu, nejlépe až po zámrazu. Vytěžený materiál, zejména báze kmenů, je nutno považovat za infekční a je vhodné jej spálit, případně zpracovat na místech vzdálených od porostů olší a vodotečí. Vhodná jsou sanitární opatření, zejména omytí techniky a desinfekce nástrojů či obuvi. V napadených porostech je potřeba omezit provoz, zejména pojezdy těžkou technikou a další činnosti většího rozsahu, které by výrazně poškozovaly půdní povrch a kořeny, zhutňovaly půdu či zanechávaly vyjeté koleje; všechny tyto činnosti mohou napomoci lokálnímu šíření patogenu. Ve vytěžených porostech by měla být obnova olší minimálně tři roky vyloučena, poté je možná umělá obnova (výsev). Odolnost populace olše je vhodné posílit využitím semen přeživších, a tedy možná rezistentních jedinců.

Adaptační opatření mají smysl zejména z pohledu ochrany přírody a biodiverzity. Plíseň olšovou lze považovat za agens, který může iniciovat vznik otevřených stanovišť v mokřadech a v nivách toků. Obnova nivních luk a otevřených mokřadů může významně přispět k ochraně řady mizejících světlomilných druhů jejichž populace byly omezeny historickou expanzí olše. Zároveň taková bezlesí mohou sloužit jako dodatečná bariéra proti šíření patogenu. Takový přístup ovšem předpokládá aktivní management v ohrožených oblastech směřující k udržení bezlesí.

5 Literatura a zdroje

- Abad, Z. G., Burgess, T. I., Bourret, T., Bensch, K., Cacciola, S. O., Scanu, B., Mathew, R., Kasiborski, B., Srivastava, S., Kageyama, K., Bienapf, J. C., Verkleij, G., Broders, K., Schena, L., and Redford, A. J. 2023. *Phytophthora*: taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Stud Mycol* 106:259–348. <https://doi.org/10.3114/sim.2023.106.05>.
- Adams, H.D., Guardiola-Claramonte, M., Barron-Gafford, G.A., Villegas, J.C., Breshears, D.D., Zou, C.B., Troch, P.A., Huxman, T.E., 2009. Temperature sensitivity of drought-induced tree mortality portends increased regional die-off under global-change-type drought. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7063–7066. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901438106>
- Aguayo, J., Adams, G. C., Halkett, F., Catal, M., Husson, C., Nagy, Z. Á., Hansen, E. M., Marçais, B., and Frey, P. 2013. Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. *Phytopathology* 103:190–199. <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-12-0116-R>.
- Aguayo, J., Elegbede, F., Husson, C., Saintonge, F. X., and Marçais, B. 2014. Modeling climate impact on an emerging disease, the *Phytophthora alni*-induced alder decline. *Glob Chang Biol* 20:3209–3221. <https://doi.org/10.1111/GCB.12601>.
- Aguayo, J., Halkett, F., Husson, C., Nagy, Z., Szigethy, A., Bakonyi, J., Frey, P., and Marçais, B. 2016. Genetic diversity and origins of the homoploid-type hybrid *Phytophthora* × *alni*. *Appl Environ Microbiol* 82:7142–7153. <https://doi.org/10.1128/AEM.02221-16>.
- Alexander Velasquez-Vasconez, P., Yair Chaves-Ordoñez, R., Unigarro, P., Diaz, H., Mora, L., García, B., Genetic, C., Hossain, A., David Pantoja Unigarro, J., Yadhannia Hernandez Diaz, T., Estela Lagos Mora, L., Betancourth García, C., and Salazar-Gonzalez, C. 2024. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Phytophthora infestans* Isolates on Four *Solanum tuberosum* (Potato) Cultivars in Nariño, Colombia. *International Journal of Plant Biology* 2024 15:1021–1031. <https://doi.org/10.3390/IJPB15040072>.
- Amatangelo, K.L., Fulton, M.R., Rogers, D.A., Waller, D.M., 2011. Converging forest community composition along an edaphic gradient threatens landscape-level diversity. *Divers. Distrib.* 17, 201–213. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2010.00730.x>

- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., and Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19:535–544. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2004.07.021>.
- AOPK ČR 2024. Vrstva mapování biotopů. [elektronická georeferencovaná databáze]. Verze 2024. Praha. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. [citováno 2024-11-08]
- Aram, K., and Rizzo, D. M. 2018. Distinct trophic specializations affect how phytophthora ramorum and clade 6 phytophthora spp. Colonize and persist on umbellularia californica leaves in streams. *Phytopathology* 108:858–869. <https://doi.org/10.1094/PHTO-06-17-0196-R>.
- Bačová, A., Cooke, D.E.L., Milenković, I., Májek, T., Nagy, Z.Á., Corcobado, T., Randall, E., Keillor, B., Cock, P.J.A., Jung, M.H., Jung, T., Tomšovský, M., 2024. Hidden Phytophthora diversity unveiled in tree nurseries of the Czech Republic with traditional and metabarcoding techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* 170, 131–156. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02886-1>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bjelke, U., Boberg, J., Oliva, J., Tattersdill, K., McKie, B.G., 2016. Dieback of riparian alder caused by the Phytophthora alni complex: projected consequences for stream ecosystems. *Freshw. Biol.* 61, 565–579. <https://doi.org/10.1111/fwb.12729>
- Böhner, J., Selige, T., 2006. Spatial prediction of soil attributes using terrain analysis and climate regionalisation. *Gött. Geogr. Abh.* 115, 17.
- Boublík, K., Douda, J., Hédli, R., Chytrý Milan, 2013. Mezofilní a vlhké opadavé lesy. Mesic and wet deciduous broad-leaved forests, in: Chytrý Milan (Ed.), *Vegetace České Republiky 4. Lesní a Křovinná Vegetace. Vegetation of the Czech Republic 4. Forest and Scrub Vegetation.* pp. 193–295.
- Brasier, C. M., and Kirk, S. A. 2001. 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 Pathol* 50:218–229. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3059.2001.00553.X>.
- Brasier, C. M., and Webber, J. F. 2019. Is there evidence for post-epidemic attenuation in the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*? *Plant Pathol* 68:921–929. <https://doi.org/10.1111/PPA.13022>.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcan, J., Cooke, D. E. L., Jung, T., and Man In't Veld, W. A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycol Res* 108:1172–1184. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001005>.
- Brasier, C. M., Rose, J., and Gibbs, A. N. 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain.
- Brasier, C.M., 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol.* 57, 792–808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x>
- Bregant, C., Batista, E., Hilário, S., Linaldeddu, B. T., and Alves, A. 2023. *Phytophthora* Species Involved in *Alnus glutinosa* Decline in Portugal. *Pathogens* 12:276. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12020276>.
- Bregant, C., Sanna, G. P., Bottos, A., Maddau, L., Montecchio, L., and Linaldeddu, B. T. 2020. Diversity and Pathogenicity of *Phytophthora* Species Associated with Declining Alder Trees in Italy and Description of *Phytophthora alpina* sp. nov. *Forests* 2020, Vol. 11, Page 848 11:848. <https://doi.org/10.3390/F11080848>.
- Brunet, J., Felton, A., Hedwall, P.-O., 2023. Vegetation responses to pathogen-induced tree loss: Swedish elm and ash forests revisited after 32 years. *Plant Ecol.* 224, 875–884. <https://doi.org/10.1007/s11258-023-01342-0>

- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'Souza, T. G., and Schulenburg, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol Ecol* 13:2101–2106. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2004.02209.X>.
- Burgess, T. I., López-Villamor, A., Paap, T., Williams, B., Belhaj, R., Crone, M., Dunstan, W., Howard, K., and Hardy, G. E. S. J. 2021. Towards a best practice methodology for the detection of *Phytophthora* species in soils. *Plant Pathol* 70:604–614. <https://doi.org/10.1111/PPA.13312>.
- Caballol, M., Redondo, M.Á., Catalán, N., Corcobado, T., Jung, T., Marçais, B., Milenković, I., Nemesio-Gorrioz, M., Stenlid, J., Oliva, J., 2024. Climate acts as an environmental filter to plant pathogens. *ISME J.* 18, wræ010. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae010>
- Claessens, H., Oosterbaan, A., Savill, P., and Rondeux, J. 2010. A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry: An International Journal of Forest Research* 83:163–175. <https://doi.org/10.1093/FORESTRY/PPP038>.
- Cobb, R.C., Eviner, V.T., Rizzo, D.M., 2013. Mortality and community changes drive sudden oak death impacts on litterfall and soil nitrogen cycling. *New Phytol.* 200, 422–431. <https://doi.org/10.1111/nph.12370>
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 2005 6:11 6:836–846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>.
- Conrad, O., Bechtel, B., Bock, M., Dietrich, H., Fischer, E., Gerlitz, L., Wehberg, J., Wichmann, V., Böhner, J., 2015. System for Automated Geoscientific Analyses (SAGA) v. 2.1.4. *Geosci. Model Dev.* 8, 1991–2007. <https://doi.org/10.5194/gmd-8-1991-2015>
- Corcobado, T., Cech, T. L., Daxer, A., Ďatková, H., Janoušek, J., Patra, S., Jahn, D., Hüttler, C., Milenković, I., Tomšovský, M., Jung, M. H., and Jung, T. 2023. *Phytophthora*, *Nothophytophthora* and *Halophytophthora* diversity in rivers, streams and riparian alder ecosystems of Central Europe. *Mycological Progress* 2023 22:7 22:1–18. <https://doi.org/10.1007/S11557-023-01898-1>.
- CORINE Land Cover 2006 (2020). European Union's Copernicus Land Monitoring Service information. <https://land.copernicus.eu/en/products/corine-land-cover/clc-2006>. DOI: <https://doi.org/10.2909/08560441-2fd5-4eb9-bf4c-9ef16725726a>
- CORINE Land Cover 2018 (2020). European Union's Copernicus Land Monitoring Service information. <https://land.copernicus.eu/en/products/corine-land-cover/clc2018>. DOI: <https://doi.org/10.2909/960998c1-1870-4e82-8051-6485205ebbac>
- Černý, K., and Strnadová, V. 2010. *Phytophthora* Alder Decline: Disease Symptoms, Causal Agent and Its Distribution in the Czech Republic. *Plant protection science* 46:12–18.
- Černý, K., and Strnadová, V. 2012. Winter survival of *Phytophthora alni* subsP. *alni* in aerial tissues of black alder. *J For Sci (Prague)* 58:328–336.
- Černý, K., Strnadová, V., Gregorová, B., and Mrázková, M. 2010. Onemocnění olší způsobené druhem *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk – identifikace choroby, odběr vzorků. *Certifikovaná metodika*.
- ČÚZK (2015): ZABAGED® -Altimetry – DMR 4G. <https://geoportal.cuzk.cz> [verze 21. 3. 2015]
- ČÚZK (2021): Data50. Český úřad zeměměřický a katastrální. <https://ags.cuzk.gov.cz/opendata/>
- Dale, A. L., Feau, N., Everhart, S. E., Dhillon, B., Wong, B., Sheppard, J., Bilodeau, G. J., Brar, A., Tabima, J. F., Shen, D., Brasier, C. M., Tyler, B. M., Grünwald, N. J., and Hamelin, R. C. 2019. Mitotic recombination and rapid genome evolution in the invasive forest pathogen *phytophthora ramorum*. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02452-18>.
- De Merlier, D., Chandelier, A., Debruxelles, N., Noldus, M., Laurent, F., Dufays, E., Claessens, H., and Cavelier, M. 2005. Characterization of Alder *Phytophthora* Isolates from Wallonia and

- Development of SCAR Primers for their Specific Detection. *Journal of Phytopathology* 153:99–107. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0434.2005.00936.X>.
- Delcán, J., and Brasier, C. M. 2001. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthora*. *For Pathol* 31:65–83. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0329.2001.00223.X>.
- Dennert, F., Augustinus, B.A., Ruffner, B., Queloz, V., 2024. Bacterial Diseases: An Emerging Threat for Central European Forest and Urban Trees? *For. Pathol.* 54, e70002. <https://doi.org/10.1111/efp.70002>
- Depotter, J. R. L., Seidl, M. F., Wood, T. A., and Thomma, B. P. H. J. 2016. Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Curr Opin Microbiol* 32:7–13. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2016.04.005>.
- Dobrowolski, M. P., Tommerup, I. C., Shearer, B. L., and O'Brien, P. A. 2003. Three Clonal Lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia Revealed by Microsatellites. *Ecology and population biology* 93:695–704. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.695>.
- Douda, J., 2010. The role of landscape configuration in plant composition of floodplain forests across different physiographic areas: Role of landscape configuration for floodplain forests. *J. Veg. Sci.* 21, 1110–1124. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2010.01213.x>
- Douda, J., Boublík, K., Slezák, M., Biurrun, I., Nociar, J., Havrdová, A., Doudová, J., Ačić, S., Brisse, H., Brunet, J., Chytrý, M., Claessens, H., Csiky, J., Didukh, Y., Dimopoulos, P., Dullinger, S., FitzPatrick, Ú., Guisan, A., Horschler, P.J., Hrivnák, R., Jandt, U., Kački, Z., Kevey, B., Landucci, F., Lecomte, H., Lenoir, J., Paal, J., Paternoster, D., Pauli, H., Pielech, R., Rodwell, J.S., Roelandt, B., Svenning, J., Šibík, J., Šilc, U., Škvorc, Ž., Tsiripidis, I., Tzonev, R.T., Wohlgemuth, T., Zimmermann, N.E., 2016. Vegetation classification and biogeography of European floodplain forests and alder carrs. *Appl. Veg. Sci.* 19, 147–163. <https://doi.org/10.1111/avsc.12201>
- Douda, J., čEJKOVÁ, A., Douda, K., Kochankova, J., 2009. Development of alder carr after abandonment of wetland grasslands during the last 70 years. *Ann Sci* 66, 1–13.
- Doudová, J., Douda, J., Boublík, K., 2022. Traditional human practices protect diversity of open forests threatened by ticking nutrient time bomb. *Biol. Conserv.* 275, 109758. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109758>
- Dutta, A., Dutreux, F., and Schacherer, J. 2022. Loss of Heterozygosity Spectrum Depends on Ploidy Level in Natural Yeast Populations. *Mol Biol Evol* 39. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAC214>.
- Ellison, A.M., Bank, M.S., Clinton, B.D., Colburn, E.A., Elliott, K., Ford, C.R., Foster, D.R., Kloeppel, B.D., Knoepp, J.D., Lovett, G.M., Mohan, J., Orwig, D.A., Rodenhouse, N.L., Sobczak, W.V., Stinson, K.A., Stone, J.K., Swan, C.M., Thompson, J., Holle, B.V., Webster, J.R., 2005. Loss of foundation species: consequences for the structure and dynamics of forested ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 3, 479–486. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2005\)003\[0479:LOFSCF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2005)003[0479:LOFSCF]2.0.CO;2)
- Ellison, A.M., Barker Plotkin, A.A., Khalid, S., 2016. Foundation Species Loss and Biodiversity of the Herbaceous Layer in New England Forests. *Forests* 7, 9. <https://doi.org/10.3390/f7010009>
- Ferreira, V., Pazianoto, L.H.R., Solla, A., 2022. Invasive forest pathogens affect the characteristics, microbial colonisation, and decomposition of leaf litter in streams. *Freshw. Biol.* 67, 416–429. <https://doi.org/10.1111/fwb.13851>
- Fleming, P.A., Wentzel, J.J., Dundas, S.J., Kreplins, T.L., Craig, M.D., Hardy, G.E.S.J., 2021. Global meta-analysis of tree decline impacts on fauna. *Biol. Rev.* 96, 1744–1768. <https://doi.org/10.1111/brv.12725>
- Flower, C.E., Knight, K.S., Gonzalez-Meler, M.A., 2013. Impacts of the emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) induced ash (*Fraxinus* spp.) mortality on forest carbon cycling and

- successional dynamics in the eastern United States. *Biol. Invasions* 15, 931–944. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0341-7>
- Fojtík, T., Jašíková, L., Kurfiřtová, J., Makovcová, M., Mařařovská, V., Mayer, P., Nováková, H., Závřelová, J., Zbořil, A., 2022. GIS a kartografie ve VÚV TGM. *Vodohospodářské Tech.-Ekon. Inf.* 64, 47–52.
- Garbelotto, M., Schmidt, D., and Popenuck, T. 2021. Pathogenicity and infectivity of *Phytophthora ramorum* vary depending on host species, infected plant part, inoculum potential, pathogen genotype, and temperature. *Plant Pathol* 70:287–304. <https://doi.org/10.1111/PPA.13297>.
- George, J.-P., Sanders, T.G.M., Timmermann, V., Potočić, N., Lang, M., 2022. European-wide forest monitoring substantiate the necessity for a joint conservation strategy to rescue European ash species (*Fraxinus* spp.). *Sci. Rep.* 12, 4764. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08825-6>
- Ghelardini, L., Pepori, A. L., Luchi, N., Capretti, P., and Santini, A. 2016. Drivers of emerging fungal diseases of forest trees. *For Ecol Manage* 381:235–246. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2016.09.032>.
- Ghelardini, L., Santini, A., 2009. Avoidance by early flushing: a new perspective on Dutch elm disease research. *IForest - Biogeosciences For.* 2, 143–153. <https://doi.org/10.3832/ifer0508-002>
- Gil, W., Łukaszewicz, J., Paluch, R., Zachara, T., 2006. An analysis of regional and temporal aspects of ash dieback in Poland, in: *Symposium on Broadleaved Trees Decline in Europe*. pp. 91–96.
- Gilbert, G.S., 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 13–43. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.021202.110417>
- Haque, M. M. U., Martín-García, J., and Diez, J. J. 2015. Variation in pathogenicity among the three subspecies of *Phytophthora alni* on detached leaves, twigs and branches of *Alnus glutinosa*. *For Pathol* 45:484–491. <https://doi.org/10.1111/EFP.12198>.
- Harwood, T.D., Tomlinson, I., Potter, C.A., Knight, J.D., 2011. Dutch elm disease revisited: past, present and future management in Great Britain. *Plant Pathol.* 60, 545–555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02391.x>
- Havrdová, A., Douda, J., Doudová, J., 2023. Threats, biodiversity drivers and restoration in temperate floodplain forests related to spatial scales. *Sci. Total Environ.* 854, 158743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158743>
- Havrdová, L., Zahradník, D., Romportl, D., Peřková, V., Černý, K., 2017. Environmental and Silvicultural Characteristics Influencing the Extent of Ash Dieback in Forest Stands. *Balt. For.* 23, 168–182.
- Hédl, R., Kopecký, M., Komárek, J., 2010. Half a century of succession in a temperate oakwood: from species-rich community to mesic forest. *Divers. Distrib.* 16, 267–276. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2010.00637.x>
- Hérault, B., Honnay, O., 2005. The relative importance of local, regional and historical factors determining the distribution of plants in fragmented riverine forests: an emergent group approach. *J. Biogeogr.* 32, 2069–2081. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01351.x>
- Hipps, N.A., Davies, M.J., Dodds, P., Buckley, G.P., 2005. The effects of phosphorus nutrition and soil pH on the growth of some ancient woodland indicator plants and their interaction with competitor species. *PLANT SOIL* 271, 131–141.
- Holeřtová, A., Doudová, J., Havrdová, A., Černá, M., Boublík, K., Douda, J., 2024. Contrasting responses of forest phenological guilds to complex floodplain change. *J. Ecol.* 112, 1397–1412. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.14310>
- Hu, J., Diao, Y., Zhou, Y., Lin, D., Bi, Y., Pang, Z., Fryxell, R. T., Liu, X., and Lamour, K. 2013. Loss of Heterozygosity Drives Clonal Diversity of *Phytophthora capsici* in China. *PLoS One* 8:e82691. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0082691>.

- Husson, C., Aguayo, J., Revellin, C., Frey, P., Ioos, R., and Marçais, B. 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genetics and Biology* 77:12–21. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2015.02.013>.
- Chandelier, A., Husson, C., Druart, P., and Marçais, B. 2016. Assessment of inoculation methods for screening black alder resistance to *Phytophthora ×alni*. *Plant Pathol* 65:441–450. <https://doi.org/10.1111/PPA.12418>.
- Chumanová, E., Černý, K., Brestovanská, T., Haňáčková, Z., Havrdová, L., Zýka, V., 2021. Atlas potenciální distribuce vybraných druhů invazních patogenů dřevin a jejich impaktu na lesní ekosystémy v ČR. Specializovaná mapa s odborným obsahem. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Průhonice.
- Chumanová, E., Romportl, D., Havrdová, L., Zahradník, D., Pešková, V., Černý, K., 2019. Predicting ash dieback severity and environmental suitability for the disease in forest stands. *Scand. J. For. Res.* 34, 254–266. <https://doi.org/10.1080/02827581.2019.1584638>
- Chytrý, M., Kučera, T., Kočí, M., Grulich, V., Lustyk, P., Masarykova Univerzita (Eds.), 2010. Katalog biotopů České republiky; Habitat catalogue of the Czech Republic, Druhé vydání\$Second edition. ed. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.
- Chytrý, M., Tichý, L., Dřevojan, P., Sádlo, J., Zelený, D., 2018. Ellenberg-type indicator values for the Czech flora. *Preslia* 90, 83–103. <https://doi.org/10.23855/preslia.2018.083>
- Ioos, R., Andrieux, A., Marçais, B., and Frey, P. 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* 43:511–529. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2006.02.006>.
- Ioos, R., Barrès, B., Andrieux, A., and Frey, P. 2007. Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni* ssP. *alni*, and cross-amplification with related taxa. *Mol Ecol Notes* 7:133–137. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2006.01554.X>.
- Jančařík Vlastislav. 1993. Usuchání olší. *Lesnická práce* 72:14–16.
- Jochner-Oette, S., Rohrer, T., Eisen, A.-K., Tönnies, S., Stammel, B., 2021. Influence of Forest Stand Structure and Competing Understory Vegetation on Ash Regeneration—Potential Effects of Ash Dieback. *Forests* 12, 128. <https://doi.org/10.3390/f12020128>
- Jung, M.H., Maia, C., Mora-Sala, B., Abad-Campos, P., Schena, L., Mosca, S., Carella, G., Moricca, S., Nechwatal, J., Dionísio, L., Cravador, A., Jung, T., 2024. High diversity of *Phytophthora* species in natural ecosystems and nurseries of Portugal: Detrimental side effect of plant introductions from the age of discovery to modern globalization. *Plant Pathol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/ppa.14022>
- 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(2), 197-208.
- Jung, T., and Burgess, T. I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 22:95–110. <https://doi.org/10.3767/003158509X442612>.
- Jung, T., Blaschke, H., and Neumann, P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* 26:253–272. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0329.1996.TB00846.X>.
- Jung, T., Horta Jung, M., Webber, J.F., Kageyama, K., Hieno, A., Masuya, H., Uematsu, S., Perez-Sierra, A., Harris, A.R., Forster, J., Rees, H., Scanu, B., Patra, S., Kudlacek, T., Janousek, J., Corcobado, T., Milenkovic, I., Nagy, Z., Csorba, I., Bakonyi, J., Brasier, C.M., 2021. The Destructive Tree Pathogen *Phytophthora ramorum* Originates from the Laurosilva Forests of East Asia. *J. Fungi* 7, 226. <https://doi.org/10.3390/jof7030226>

- Jung, T., Pérez-Sierra, A., Durán, A., Jung, M.H., Balci, Y., Scanu, B., 2018. Canker and decline diseases caused by soil- and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 40, 182–220. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.08>
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., and Grünwald, N. J. 2014. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2014:1–14. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.281/TABLE-6>.
- Kasuga, T., Bui, M., Bernhardt, E., Swiecki, T., Aram, K., Cano, L. M., Webber, J., Brasier, C., Press, C., Grünwald, N. J., Rizzo, D. M., and Garbelotto, M. 2016. Host-induced aneuploidy and phenotypic diversification in the Sudden Oak Death pathogen *Phytophthora ramorum*. *BMC Genomics* 17:1–17. <https://doi.org/10.1186/S12864-016-2717-Z>.
- Kizlinski, M.L., Orwig, D.A., Cobb, R.C., Foster, D.R., 2002. Direct and indirect ecosystem consequences of an invasive pest on forests dominated by eastern hemlock. *J. Biogeogr.* 29, 1489–1503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00766.x>
- Kleyer, M., Bekker, R. m., Knevel, I. c., Bakker, J. p., Thompson, K., Sonnenschein, M., Poschlod, P., Van Groenendael, J. m., Klimeš, L., Klimešová, J., Klotz, S., Rusch, G. m., Hermy, M., Adriaens, D., Boedeltje, G., Bossuyt, B., Dannemann, A., Endels, P., Götzenberger, L., Hodgson, J. g., Jackel, A.-K., Kühn, I., Kunzmann, D., Ozinga, W. a., Römermann, C., Stadler, M., Schlegelmilch, J., Steendam, H. j., Tackenberg, O., Wilmann, B., Cornelissen, J. h. c., Eriksson, O., Garnier, E., Peco, B., 2008. The LEDA Traitbase: a database of life-history traits of the Northwest European flora. *J. Ecol.* 96, 1266–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2008.01430.x>
- Klimešová, J., Danihelka, J., Chrtek, J., de Bello, F., Herben, T., 2017. CLO-PLA: a database of clonal and bud-bank traits of the Central European flora. *Ecology* 98, 1179–1179. <https://doi.org/10.1002/ecy.1745>
- Knaus, B. J., Tabima, J. F., Shakya, S. K., Judelson, H. S., and Grünwald, N. J. 2020. Genome-wide increased copy number is associated with emergence of dominant clones of the Irish potato famine pathogen *phytophthora infestans*. *mBio* 11:1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00326-20>
- Kortmann, M., Müller, J.C., Baier, R., Bässler, C., Buse, J., Cholewińska, O., Förschler, M.I., Georgiev, K.B., Hilszczański, J., Jaroszewicz, B., Jaworski, T., Kaufmann, S., Kuijper, D., Lorz, J., Lotz, A., Łubek, A., Mayer, M., Mayerhofer, S., Meyer, S., Morinière, J., Popa, F., Reith, H., Roth, N., Seibold, S., Seidl, R., Stengel, E., Wolski, G.J., Thorn, S., 2021. Ecology versus society: Impacts of bark beetle infestations on biodiversity and restorativeness in protected areas of Central Europe. *Biol. Conserv.* 254, 108931. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108931>
- Kowalski, T., 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *For. Pathol.* 36, 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x>
- Kuljian, H., Varner, J.M., 2010. The effects of sudden oak death on foliar moisture content and crown fire potential in tanoak. *For. Ecol. Manag.* 259, 2103–2110. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.02.022>
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., and Huitema, E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol Plant Pathol* 13:329–337. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00754.X>.
- Lanta, V., Wiatzková, A., Altman, J., Bartoš, M., Černý, T., Chlumská, Z., Dvorský, M., Hauck, D., Hummel, J., Karlík, P., Samraoui, K., Čížek, L., Doležal, J., 2024. Changes in plant diversity of European lowland forests: Increased homogenization and expansion of shade-tolerant trees. *Biol. Conserv.* 296, 110719. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2024.110719>
- Lefcheck, J.S., 2016. piecewiseSEM: Piecewise structural equation modelling in r for ecology, evolution, and systematics. *Methods Ecol. Evol.* 7, 573–579. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12512>

- Lenth, R., 2024. emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.10.2
- Linde, C., Kemp, G. H. J., and Wingfield, M. J. 1999. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Eur J Plant Pathol* 105:231–239. <https://doi.org/10.1023/A:1008780429770>.
- Loo, J.A., 2009. Ecological impacts of non-indigenous invasive fungi as forest pathogens. *Biol. Invasions* 11, 81–96. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9321-3>
- Lovett, G.M., Canham, C.D., Arthur, M.A., Weathers, K.C., Fitzhugh, R.D., 2006. Forest Ecosystem Responses to Exotic Pests and Pathogens in Eastern North America. *BioScience* 56, 395. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)056\[0395:FERTEP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)056[0395:FERTEP]2.0.CO;2)
- Mayer, V. W., and Aguilera, A. 1990. High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 231:177–186. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(90\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90024-X).
- McCarren Kathryn. 2006. Saprophytic ability and the contribution of chlamydospores and oospores to survival of *Phytophthora cinnamomi*. Dissertation, Murdoch University, Western Australia.
- McVean, D. N. 1953. *Alnus Glutinosa* (L.) Gaertn. *J Ecol* 41:447. <https://doi.org/10.2307/2257070>.
- Mehlich, A., 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15, 1409–1416. <https://doi.org/10.1080/00103628409367568>
- Meirmans, P. G., Liu, S., and Van Tienderen, P. H. 2018. The Analysis of Polyploid Genetic Data. *Journal of Heredity* 109:283–296. <https://doi.org/10.1093/JHERED/ESY006>.
- Metz, M.R., Frangioso, K.M., Meentemeyer, R.K., Rizzo, D.M., 2011. Interacting disturbances: wildfire severity affected by stage of forest disease invasion. *Ecol. Appl.* 21, 313–320. <https://doi.org/10.1890/10-0419.1>
- Metz, M.R., Frangioso, K.M., Wickland, A.C., Meentemeyer, R.K., Rizzo, D.M., 2012. An emergent disease causes directional changes in forest species composition in coastal California. *Ecosphere* 3, art86. <https://doi.org/10.1890/ES12-00107.1>
- Metz, M.R., Varner, J.M., Frangioso, K.M., Meentemeyer, R.K., Rizzo, D.M., 2013. Unexpected redwood mortality from synergies between wildfire and an emerging infectious disease. *Ecology* 94, 2152–2159. <https://doi.org/10.1890/13-0915.1>
- Misra, B. B., and Chaturvedi, R. 2015. When plants brace for the emerging pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol* 92:181–185. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2015.03.004>.
- Mitchell, R.J., Hewison, R.L., Hester, A.J., Broome, A., Kirby, K.J., 2016. Potential impacts of the loss of *Fraxinus excelsior* (Oleaceae) due to ash dieback on woodland vegetation in Great Britain. *New J. Bot.* 6, 2–15. <https://doi.org/10.1080/20423489.2016.1171454>
- Mizeriene, G., Cerny, K., Zyka, V., Bakonyi, J., Nagy, Z. Á., Oliva, J., Redondo, M. A., Corcobado, T., Martín-García, J., and Prospero, S. 2020. Patterns of genetic diversification in the invasive hybrid plant pathogen *phytophthora × alni* and its parental species *P. uniformis*. *Phytopathology* 110:1959–1969. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-19-0475-R>.
- Monahan, W.B., Koenig, W.D., 2006. Estimating the potential effects of sudden oak death on oak-dependent birds. *Biol. Conserv.* 127, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.08.005>
- Mozzachiodi, S., Tattini, L., Llored, A., Irizar, A., Škofljanc, N., D'Angiolo, M., De Chiara, M., Barré, B. P., Yue, J. X., Lutazi, A., Loeillet, S., Laureau, R., Marsit, S., Stenberg, S., Albaud, B., Persson, K., Legras, J. L., Dequin, S., Warringer, J., Nicolas, A., and Liti, G. 2021. Aborting meiosis allows recombination in sterile diploid yeast hybrids. *Nature Communications* 12:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26883-8>.
- Mrázková, M., Černý, K., Tomšovský, M., Strnadová, V., Gregorová, B., Holub, V., Pánek, M., Havrdová, L., and Hejná, M. 2013. Occurrence of *Phytophthora multivora* and *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci* 49:155–164.

- Mullett, M. S., Van Poucke, K., Haegeman, A., Focquet, F., Cauldron, N. C., Knaus, B. J., Horta Jung, M., Kageyama, K., Hieno, A., Masuja, H., Uematsu, S., Webber, J. F., Brasier, C. M., Bakonyi, J., Heungens, K., Grünwald, N. J., and Jung, T. 2023. Phylogeography and population structure of the global, wide host-range hybrid pathogen *Phytophthora* × *cambivora*. *IMA Fungus* 2023 14:1–18. <https://doi.org/10.1186/S43008-023-00109-6>.
- Nagel, T.A., Iacopetti, G., Javornik, J., Rozman, A., De Frenne, P., Selvi, F., Verheyen, K., Wulf, M., 2019. Cascading effects of canopy mortality drive long-term changes in understorey diversity in temperate old-growth forests of Europe. *J. Veg. Sci.* 30, 905–916. <https://doi.org/10.1111/jvs.12767>
- Nechwatal, J., Bakonyi, J., Cacciola, S. O., Cooke, D. E. L., Jung, T., Nagy, Z. Á., Vannini, A., Vettraino, A. M., and Brasier, C. M. 2013. The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon *Salix*soil and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. *Plant Pathol* 62:355–369. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2012.02638.X>.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O’Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M., Ribeiro, C., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C., Weedon, J., 2024. *vegan: Community Ecology Package*.
- Orwig, D.A., Barker Plotkin, A.A., Davidson, E.A., Lux, H., Savage, K.E., Ellison, A.M., 2013. Foundation species loss affects vegetation structure more than ecosystem function in a northeastern USA forest. *PeerJ* 1, e41. <https://doi.org/10.7717/peerj.41>
- Osmundson, T. W., Eyre, C. A., Hayden, K. M., Dhillon, J., & Garbelotto, M. M. (2013). Back to basics: An evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 66-74.
- Paillet, F.L., 2002. Chestnut: history and ecology of a transformed species. *J. Biogeogr.* 29, 1517–1530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00767.x>
- Parke, J.L., Peterson, E.K., 2019. Sudden oak death, sudden larch death, and ramorum blight. *Plant Health Instr.* 19.
- Pellegrini, A.F.A., Hein, A.M., Cavender-Bares, J., Montgomery, R.A., Staver, A.C., Silla, F., Hobbie, S.E., Reich, P.B., 2021. Disease and fire interact to influence transitions between savanna–forest ecosystems over a multi-decadal experiment. *Ecol. Lett.* 24, 1007–1017. <https://doi.org/10.1111/ele.13719>
- Pielech, R., Malicki, M., 2018. Changes in Species Composition in Alder Swamp Forest Following Forest Dieback. *Forests* 9, 316. <https://doi.org/10.3390/f9060316>
- R Core Team, 2024. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raffaele, S., and Kamoun, S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* 10:417–430. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2790>.
- Ramage, B.S., O’Hara, K.L., 2010. Sudden Oak Death-Induced Tanoak Mortality in Coast Redwood Forests: Current and Predicted Impacts to Stand Structure. *Forests* 1, 114–130. <https://doi.org/10.3390/f1030114>
- Redondo, M.A., Boberg, J., Olsson, C.H.B., Oliva, J., 2015. Winter Conditions Correlate with *Phytophthora alni* Subspecies Distribution in Southern Sweden. *Phytopathology*® 105, 1191–1197. <https://doi.org/10.1094/PHTO-01-15-0020-R>
- Romportl, D., Chumanová, E., Havrdová, L., Pešková, V., Černý, K., 2016. Potential risk of occurrence of *Phytophthora alni* in forests of the Czech Republic. *J. Maps* 12, 280–284. <https://doi.org/10.1080/17445647.2016.1198996>

- Ronfort, J., Jenczewski, E., Bataillon, T., and Rousset, F. 1998. Analysis of Population Structure in Autotetraploid Species. *Genetics* 150:921–930. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/150.2.921>.
- Sackett, T.E., Record, S., Bewick, S., Baiser, B., Sanders, N.J., Ellison, A.M., 2011. Response of macroarthropod assemblages to the loss of hemlock (*Tsuga canadensis*), a foundation species. *Ecosphere* 2, art74. <https://doi.org/10.1890/ES11-00155.1>
- Sakamoto, Y., Ishiguro, M., Kitagawa, G., 1986. Akaike Information Criterion Statistics. Springer Netherlands.
- Santini, A., Barzanti, G. P., and Capretti, P. 2003. Susceptibility of some Mesophilic Hardwoods to Alder Phytophthora. *Journal of Phytopathology* 151:406–410. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0434.2003.00739.X>.
- Schei, F.H., Arnberg, M.P., Grytnes, J.-A., Johanesen, M.S., Johansen, J., Milford, A.B., Røynstrand, A., Tollefsrud, M.M., 2024. Ash dieback: A single-species catastrophe or a cascade of ecological effects in the ground flora? *For. Ecol. Manag.* 572, 122322. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.122322>
- Schumacher, J., Leonhard, S., Grundmann, B. M., & Roloff, A. 2006. New alder disease in Spreewald biosphere reserve – causes and incidental factors of an epidemic. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 58:141-147.
- Simler-Williamson, A.B., Rizzo, D.M., Cobb, R.C., 2019. Interacting Effects of Global Change on Forest Pest and Pathogen Dynamics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 50, 381–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024934>
- Small, M.J., Small, C.J., Dreyer, G.D., 2005. Changes in a hemlock-dominated forest following woolly adelgid infestation in southern New England ¹. *J. Torrey Bot. Soc.* 132, 458–470. [https://doi.org/10.3159/1095-5674\(2005\)132\[458:CIAHFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3159/1095-5674(2005)132[458:CIAHFF]2.0.CO;2)
- Smukowski Heil, C. 2023. Loss of Heterozygosity and Its Importance in Evolution. *Journal of Molecular Evolution* 2023 91:3 91:369–377. <https://doi.org/10.1007/S00239-022-10088-8>.
- Solheim, H., and Hietala, A. M. 2017. Spread of Ash Dieback in Norway. 144-149.
- Strnadová, V., Černý, K., Holub, V., Gregorová, B., 2010. The effects of flooding and *Phytophthora alni* infection on black alder. *J. For. Sci.* 56, 41–46. <https://doi.org/10.17221/67/2009-JFS>
- Strubelt, I., Diekmann, M., Zacharias, D., 2017. Changes in species composition and richness in an alluvial hardwood forest over 52 yrs. *J. Veg. Sci.* 28, 401–412. <https://doi.org/10.1111/jvs.12483>
- Swei, A., Ostfeld, R.S., Lane, R.S., Briggs, C.J., 2011. Effects of an invasive forest pathogen on abundance of ticks and their vertebrate hosts in a California Lyme disease focus. *Oecologia* 166, 91–100. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1796-9>
- Štěpánková, P., Černý, K., Strnadová, V., Hanáček, P., and Tomšovský, M. 2013. Special Issue: S3-S10 Identification of *Phytophthora alni* Subspecies in Riparian Stands in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci* 49.
- Tsykun, T., Prospero, S., Schoebel, C.N., Rea, A., Burgess, T.I., 2022. Global invasion history of the emerging plant pathogen *Phytophthora multivora*. *BMC Genomics* 23, 153. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08363-5>
- Turczański, K., Rutkowski, P., Dyderski, M.K., Wrońska-Pilarek, D., Nowiński, M., 2019. Soil pH and Organic Matter Content Affects European Ash (*Fraxinus excelsior* L.) Crown Defoliation and Its Impact on Understory Vegetation. *Forests* 11, 22. <https://doi.org/10.3390/f11010022>
- Václavík, T., Kupfer, J.A., Meentemeyer, R.K., 2012. Accounting for multi-scale spatial autocorrelation improves performance of invasive species distribution modelling (iSDM). *J. Biogeogr.* 39, 42–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02589.x>
- Van Poucke, K., Haegeman, A., Goedefroit, T., Focquet, F., Leus, L., Jung, M. H., Nave, C., Redondo, M. A., Husson, C., Kostov, K., Lyubenova, A., Christova, P., Chandelier, A., Slavov, S., de Cock, A., Bonants, P., Werres, S., Palau, J. O., Marçais, B., Jung, T., Stenlid, J., Ruttink, T., and

- Heungens, K. 2021. Unravelling hybridization in *Phytophthora* using phylogenomics and genome size estimation. *IMA Fungus* 12:1–24. <https://doi.org/10.1186/S43008-021-00068-W>.
- Varela, C. P., Martínez, C. R., Casal, O. A., Vázquez, J. P. M., and Yebra, A. A. 2012. First Report of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* on Black Alder in Spain. 96:589–589. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0891-PDN>.
- Wallace, J.B., Webster, J.R., Eggert, S.L., Meyer, J.L., Siler, E.R., 2001. Large Woody Debris in a Headwater Stream: Long-Term Legacies of Forest Disturbance. *Int. Rev. Hydrobiol.* 86, 501–513. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<501::AID-IROH501>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<501::AID-IROH501>3.0.CO;2-8)
- Wang, J., Wang, X., Ji, Y., Gao, J., 2022. Climate factors determine the utilization strategy of forest plant resources at large scales. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.990441>
- Weste, G., Brown, K., Kennedy, J., Walshe, T., 2002. *Phytophthora cinnamomi* infestation — a 24-year study of vegetation change in forests and woodlands of the Grampians, Western Victoria. *Aust. J. Bot.* 50, 247–274. <https://doi.org/10.1071/bt01073>
- Westhoff, V., van der Maarel, E., 1973. The Braun-Blanquet approach, in: Whittaker, R.H. (Ed.), *Ordination and Classification of Plant Communities*. W. Junk, The Hague, the Netherlands, pp. 617–737.
- Wood, S.N., 2017. *Generalized additive models: an introduction with R*, Second edition. ed, Texts in statistical science. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton ; London ; New York.
- Young, A., Boyle, T., and Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11:413–418. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10045-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10045-8).
- Zamora-Ballesteros, C., Haque, M. M. U., Diez, J. J., and Martín-García, J. 2017. Pathogenicity of *Phytophthora alni* complex and *P. plurivora* in *Alnus glutinosa* seedlings. *For Pathol* 47:e12299. <https://doi.org/10.1111/EFP.12299>.