

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Viktorie Oramová

Vztah fyziologických a optických vlastností listu k projevům napadení olše  
lepkavé (*Alnus glutinosa*) patogenem *Phytophthora × alni*

Leaf physiological and optical properties in relation to the *Phytophthora ×*  
*alni* infection of black alder (*Alnus glutinosa*)

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.  
Konzultanti: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.,  
Ing. Markéta Macháčová

Praha 2024

Charles University

Faculty of science

Study programme: Biologiy

Branch of study: Experimental Plant Biology



Bc. Viktorie Oramová

Leaf physiological and optical properties in relation to the *Phytophthora × alni* infection of black alder (*Alnus glutinosa*)

Vztah fyziologických a optických vlastností listu k projevům napadení olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) patogenem *Phytophthora × alni*

Master's thesis

Supervisor: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Consultants: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.,  
Ing. Markéta Macháčová

Prague 2024

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. a za konzultace prof. RNDr. Jany Albrechtové, Ph.D. a Ing. Markéty Macháčové, že jsem řádně citovala všechny použité prameny i literaturu a že práce nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia či k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne 30. dubna 2024

Viktorie Oramová

## Poděkování

Svůj velký vděk musím vyjádřit v první řadě mé školitelce Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D., která svým laskavým, ale bezesporu důsledným vedením umožnila vznik této diplomové práce.

Velké díky patří také Ing. Markétě Macháčové, jež svou odborností na poli fytopatologie zaštiťovala průběh všech praktických prací, a prof. Janě Albrechtové, Ph.D., jejíž podpora, nadhled a zkušenosti mne inspirovaly nejenom při psaní této diplomové práce, ale i k dalšímu směřování ve vědecké kariéře.

Množství času, které mi Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D., Ing. Markéta Macháčová a prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D. věnovaly, je největším darem a já jim jsem za to neskonale vděčná.

Naprosto klíčovou roli sehráli také kolegové z Fakulty lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity, jmenovitě Ing. Jan Stejskal, Ph.D. a Ing. Daniel Provazník, kteří s velkou ochotou asistovali při sběru dat na půdě jejich ústavu a Ing. Jan Stejskal dále napomáhal i s jejich následnou analýzou.

Děkuji také všem mým blízkým, bez jejichž láskyplné podpory by má studia i práce byly násobně náročnější, ne-li nemožné.

## Abstrakt

Napadení olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) patogenem *P. × alni* je současný problém, který zpříčiňuje úbytek olšových porostů a narušuje břehové ekosystémy. K šíření „fytoftorového onemocnění“ dochází vodou, hostitel je infikován skrze kořenový systém a patogen napadá vodivá pletiva. V důsledku onemocnění strom postupně přichází o kořenový systém, objevují se mokvající léze na kmenech, dochází k defoliaci a nevyhnutelně i smrti jedince. Jediným řešením vzniklé situace jsou preventivní opatření zabráňující dalšímu šíření a opatrná likvidace napadených olšových porostů.

Cílem této práce je nahlédnout do vztahu olše a *P. × alni* v kontextu fyziologických změn reflektovaných v listoví napadeného jedince. Za použití neinvazivních metod byly měřeny funkční znaky listoví, fluorescence chlorofylu a optické vlastnosti olše lepkavé vystavené působení *P. × alni* (inokulace do půdy či potvrzený výskyt patogenu v přírodních podmínkách).

Výsledky komorových experimentů naznačují, že průměrné hodnoty měřených parametrů se v počátečních fázích infekce signifikantně nemění, ovšem dochází k rozšíření rozptylů hodnot u napadených jedinců. Testovali jsme, zda do projevu infekce ve funkčních znacích a fluorescenčních parametrech listoví zasáhne faktor genetického původu olše (česká a norská provenience), zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> nebo sterility pěstebního substrátu. Výsledky byly nejednoznačné, spíše naznačují, že genetický původ olše ani zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> se v reakci na inokulaci *P. × alni* neprojeví. Terénní šetření v povodí řeky Litavky s prokázaným výskytem patogenů komplexu *P. alni* přineslo zjištění, že s intenzitou napadení stromu roste šíře rozptylů měřených fyziologických parametrů listoví. Jako nejvíce slibné ze všech parametrů pro detekci symptomatických stromů se zdají být AnthM, ABS/RC, DI<sub>0</sub>/RC, LMA a reflektance v oblasti absorpčních pásů chlorofylu. Výsledky této práce mohou být využity pro další výzkum zaměřený na dálkový průzkum Země s cílem monitoringu a managementu fytoftorového onemocnění olše lepkavé.

## Klíčová slova

*Phytophthora × alni*, olše lepkavá (*Alnus glutinosa*), fluorescenční parametry, relativní obsah pigmentů, reflektance, transmitance, břehové porosty, komorový experiment, dálkový průzkum.

## Abstract

A current problem is the infestation of the black alder (*Alnus glutinosa*) by the pathogen *P. × alni*, which causes the loss of alder stands and disrupts riparian ecosystems. The spread of the '*phytophthora* disease' occurs through water, the host is infected through the root system and the pathogen attacks the conductive tissues. As a result of the disease, the tree gradually loses its root system, lesions appear on the trunk, defoliation occurs and the individual inevitably dies. The only solution to the situation is preventive measures to prevent further spread by careful removal of infected alder trees.

The aim of this paper is to discuss the relationship between black alder and *P. × alni* in the context of the physiological changes that occur in the foliage of the infested individual. Leaf functional traits, chlorophyll fluorescence and optical properties of black alder exposed to *P. × alni* (inoculation into soil or confirmed occurrence of the pathogen in natural conditions) were measured using non-invasive methods.

The results of the chamber experiments suggest that the mean values of the measured parameters do not change significantly in the initial stages of infection, but there is a widening of the variance of the values in infected individuals. We tested whether the genetic origin of the alder (Czech and Norwegian provenance), elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration or sterility of the growing substrate interfered with the expression of infection in functional traits of leaf and fluorescence parameters. The results were equivocal, rather suggesting that neither the genetic origin of alder nor the elevated CO<sub>2</sub> concentration would be reflected in the response to *P. × alni* inoculation. A field investigation in the Litavka river basin with evidence of occurrence of the *P. alni* complex yielded the finding that the range of variance of measured foliar physiological parameters increased with the intensity of tree infestation. AnthM, ABS/RC, DI<sub>0</sub>/RC, LMA and reflectance in the chlorophyll absorption bands appear to be the most promising of all parameters for detecting symptomatic trees. The results of this work can be used for further remote sensing research aimed at monitoring and management of *phytophthora* disease in blackalder.

## Key words

*Phytophthora × alni*, black alder (*Alnus glutinosa*), fluorescent parameters, relative pigment content, reflectance, transmittance, riparian forest, chamber experiment, remote sensing.

## Obsah

1	Úvod do tématu.....	10
1.1	Cíle práce.....	11
1.2	Hypotézy .....	11
2	Literární úvod .....	12
2.1	Chřadnutí olší způsobené komplexem <i>Phytophthora alni</i> .....	12
2.2	Patogen <i>Phytophthora</i> – taxonomické zařazení, životní cyklus, mechanismus infekce.....	14
2.3	Funkční znaky listové v kontextu napadení patogenem rodu <i>Phytophthora</i> .....	18
2.3.1	Změny obsahu fotosyntetických a ochranných pigmentů v listové při napadení patogenem rodu <i>Phytophthora</i> .....	18
2.3.2	Změna obsahu vody v listové a specifické listové hmotnosti při napadení patogenem rodu <i>Phytophthora</i> .....	19
2.4	Fluorescence chlorofylu v kontextu napadení patogenem rodu <i>Phytophthora</i> .....	20
2.5	Optické vlastnosti listu v kontextu napadení patogenem rodu <i>Phytophthora</i> .....	20
3	Materiály a metody.....	23
3.1	Hlavní komorový experiment 2022 .....	23
3.2	Doplňující komorový experiment 2023 .....	26
3.3	Terénní šetření 2023 .....	29
3.3.1	Charakteristika zkoumaných lokalit.....	33
3.4	Metodika měření ekofyziologických parametrů .....	36
3.4.1	Měření relativního obsahu fotosyntetických a ochranných pigmentů .....	36
3.4.2	Měření rychlé kinetiky fluorescence chlorofylu.....	36
3.4.3	Měření spektrálních vlastností listové.....	38
3.4.4	Měření obsahu vody .....	40
3.4.5	Měření specifické listové hmotnosti (LMA).....	40
3.5	Analýza dat.....	40
4	Výsledky.....	42
4.1	Hlavní komorový experiment 2022 .....	42
4.1.1	Relativní obsah fotosyntetických a ochranných pigmentů .....	44
4.1.2	Fluorescenční parametry .....	50
4.2	Doplňující komorový experiment 2022 .....	59
4.2.1	Relativní obsah fotosyntetických a ochranných pigmentů .....	60
4.2.2	Fluorescenční parametry .....	62

4.2.3	Optické vlastnosti .....	65
4.2.4	Biofyzikální parametry listu .....	68
4.3	Terénní šetření 2023 .....	69
4.3.1	Funkční znaky listoví a fluorescenční parametry .....	69
4.3.2	Optické vlastnosti .....	73
5	Diskuze .....	77
5.1	Hlavní komorový experiment 2022 .....	77
5.2	Doplňující komorový experiment 2023 .....	79
5.3	Terénní šetření v povodí řeky Litavky 2023 .....	81
5.4	Využití získaných poznatků v managementu fytoftorového onemocnění.....	84
6	Závěr .....	87
	Seznam literatury .....	89



## Seznam použitých zkratek

ABS/RC	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
ANOVA	analysis of variance; analýza variance
AnthM	relativní obsah anthokyanů
asymptom	faktor absence symptomů fytoftorového onemocnění (terén 2023)
BCA	biocontrol agents; biokontrolní agens
DI <sub>0</sub> /RC	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
ET <sub>0</sub> /RC	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
F700	fluorescence chlorofylu v 700 nm vlnové délky
F735	fluorescence chlorofylu v 735 nm vlnové délky
FLD ČZU	Fakulta lesná a dřevařská, Česká zemědělská univerzita
FlvM	relativní obsah flavonoidů
Fm/F <sub>0</sub>	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
ChlM	relativní obsah chlorofylů
KEBR PŘF UK	Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
LMA	leaf mass area; specifická listová hmotnost
M <sub>0</sub>	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
MPM-100	přístroj multi pigmentr metr, model 100
N	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
NFI	dušík-flavonolový index
NIR	near infrared; blízká infračervená oblast elektromagnetického záření
ns	non-significant; nesignifikantní
OJIP	křivka fluorescence chlorofylu
P. × alni	druh Phytophthora × alni
P. alni	komplex druhů Phytophthora alni
PCA	poly-component analysis; analýza hlavních komponent
PGPR	plant growth-promoting rhizobacteria; rhizobakteria podporující růst rostlin
PhiD <sub>0</sub>	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
PhiPav	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
phyto	faktor přítomnosti P. × alni (experiment 2022)
PI <sub>ABS</sub>	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
prov	faktor provenience olše lepkavé (experiment 2022, hladiny česká × norská)
PSI	společnost Photon Systems Instruments
Psio	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
PSII	photosystem II; fotosystém dva
RH	relative humidity; relativní vlhkost vzduchu
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
S <sub>s</sub>	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
steril	faktor sterility substrátu (experiment 2023, hladiny ano × ne)
SWIR	shortwave infrared; krátkovlnná infračervená oblast elektromagnetického záření
symptom	faktor přítomnosti symptomů fytoftorového onemocnění (terén 2023)
TR <sub>0</sub> /RC	fluorescenční parametr (podrobně vysvětleno v tabulce 1)
VIS	visible spectrum; viditelná oblast elektromagnetického záření
WC	water content; obsah vody

## 1 Úvod do tématu

**Phytophthora jako ekologický problém.** Stromy rodu olše (*Alnus sp.*) jsou klíčovými dřevinami břehových porostů. Jejich opad zásobuje vodní ekosystém živinami, svými kořeny zpevňují břehy a poskytují životní prostor mnoha živočichům vázaným na vodní plochy. Populace olší ale v posledních 30 letech kolísají a jejich zastoupení v ekosystému klesá. Na vině je tzv. „fytoftorové onemocnění“, které se šíří vodními toky a způsobuje nekrózy kořenů, mokvající léze na kmeni, defoliaci a v konečné fázi smrt napadených olší. Původcem onemocnění je komplex druhů *Phytophthora alni*, což jsou rostlinné patogeny ze skupiny Oomycetes, napadající stromy rodu *Alnus sp.*

**Phytophthora sp. je houbám podobný organismus.** Vytváří mycelia, kterými prostupuje vodivá pletiva a způsobuje jejich nekrózy. Infekce začíná pod zemí, kde patogen vstupuje do rostliny skrze kořenový systém a postupně ji připravuje o možnost čerpání vody, minerálů a živin z půdy. V konečné fázi infekce strom vyčerpá všechny své zásoby, ztrácí listí a umírá.

**Nejhorší fáze epidemie je za námi.** Nákaza stromů patogenem rodu *Phytophthora* není v Evropě nic nového. Již od 80. let minulého století probíhá v břehových porostech olší přirozená selekce a lze očekávat, že přeživší stromy budou vůči nákaze odolnější (Bjelke et al., 2016; Štochlová et al., 2016). Pro náš výzkum jsme si zvolili jako modelový příklad olší lepkavou (*Alnus glutinosa*) a jejího patogena *Phytophthora × alni*, který je hybridním druhem z již zmíněného komplexu druhů *Phytophthora alni*. Kolegové z Katedry genetiky a fyziologie lesa (ČZU) poskytli pro společný komorový experiment nejenom inokulum tohoto patogenu, ale také dvě rozdílné genetické linie olší, čímž přinesli do projektu dimenzi hledání potenciálně rezistentnějších variant olší. Konkrétně se jednalo o provenienci českou a norskou. Zajímalo nás, zda genetický původ stromů ovlivní jejich reakci na infekci patogenem *P. × alni*.

**Klimatická změna může dát věci do pohybu.** Dalším, a naprosto stěžejním, faktorem ve vztahu strom–patogen může být právě probíhající změna klimatu. S narůstajícím tlakem lidské populace na Zemi dochází k zásadním změnám v globálním měřítku, které budou mít komplexní dopady na biosféru. Jedním konkrétním faktorem je pozvolné navyšování koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře, a právě na to jsme se v našem experimentu rozhodli zaměřit. Zajímalo nás, zda navýšená hladina vzdušného CO<sub>2</sub> (830 ppm) ovlivní schopnost olší odolávat napadení patogenem *P. × alni*.

**Využití metod dálkového průzkumu.** Hlavním zaměřením této práce byla otázka možnosti detekce infekce olše lepkavé patogenem *P. × alni* pomocí funkčních znaků listoví, fluorescence chlorofylu a optických vlastností listoví. Jedná se o neinvazivní metody s potenciálním využitím v monitoringu nákazy v přírodním prostředí. První dvě fáze prací byly komorové experimenty sledující vývoj fyziologických parametrů listoví olší při napadení *P. × alni* a za doprovodu faktoru genetického původu, koncentrace CO<sub>2</sub> či sterility pěstebního substrátu. Třetí fáze spočívala v terénním měření stejných parametrů na symptomatických a asymptomatických jedincích olší lepkavých, rostoucích v lokalitě s potvrzených výskytem komplexu *P. alni*.

## 1.1 Cíle práce

Hlavními cíli této práce je určit, zda:

1. se napadení olše lepkavé kořenovým patogenem *Phytophthora × alni* projeví změnou fyziologických vlastností listu dříve, než se projeví typické symptomy lézí na kořenovém krčku či bázi kmene.
2. jsou zvolené fyziologické parametry listové vhodné pro rozeznání časného napadení olše lepkavé kořenovým patogenem *Phytophthora × alni*.

Vedlejší cíl této práce je otestovat, jaký vliv mají na napadení olše lepkavé kořenovým patogenem *Phytophthora × alni* dva doplňující faktory, které by mohly do této symbiózy zasáhnout – totiž genetický původ olše a zvýšená koncentrace atmosférického CO<sub>2</sub>.

## 1.2 Hypotézy

V této práci jsem si nadefinovala několik vstupních hypotéz, jejichž platnost jsem chtěla experimentálně ověřit.

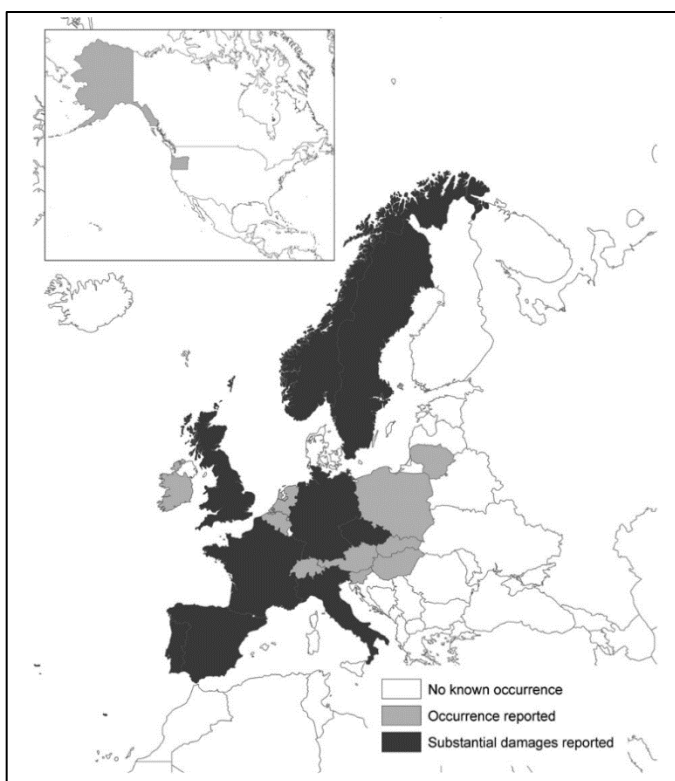
- H1: Infekce *P. × alni* se projevuje ve funkčních znacích listové, fluorescenci chlorofylu a optických vlastnostech listu olše lepkavé.
- H2: Existuje rozdíl v reakci české a norské proveniencí olše lepkavé na infekci *P. × alni*, který se projeví ve funkčních znacích listové a fluorescenci chlorofylu.
- H3: Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje funkční znaky listové a fluorescenci chlorofylu v závislosti na rozvoji infekce *P. × alni* v olši lepkavé.
- H4: Sterilita pěstebního substrátu má vliv na funkční znaky listové, fluorescenci chlorofylu a optické vlastnosti listu olše lepkavé ve vztahu k infekci *P. × alni*.
- H5: Na základě funkčních znaků listové, fluorescence chlorofylu a optických vlastnostech listu olše lepkavé lze odlišit symptomatické a asymptomatické jedince napadené patogenem z komplexu *P. alni* ve volné přírodě.

## 2 Literární úvod

### 2.1 Chřadnutí olší způsobené komplexem *Phytophthora alni*

Rod *Alnus sp.* je v Evropě původním druhem dřeviny. Tyto stromy jsou přizpůsobeny k odolávání podmínek dlouhodobě podmáčeného prostředí a typicky se vyskytují v bažinných porostech, břehovém porostu a v záplavových oblastech dolních toků řek. Všechny druhy *Alnus sp.* vstupují do kořenové symbiózy s dusík fixujícími bakteriemi druhu *Frankia alni* ze skupiny aktinomycetes. Tento mutualistický vztah vytváří na kořenech olší klasické hlízky. V minulosti byly olše v kontextu nemocí a škůdců považovány za relativně neproblematické dřeviny. To se však změnilo v roce 1995, kdy (Brasier et al., 1995) upozornil na hnilobu kořenů a kmenových krčků, která decim olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) podél říčních břehů na jihu Británie. V následujících letech byla choroba se stejnými příznaky zaznamenána na dalších druzích olší, a to napříč celou Evropou (Bjelke et al., 2016; Černý et al., 2015.; Sárándi-Kovács et al., 2015) (obrázek 1).

Zpočátku neznámá olšová hniloba byla později identifikována jako patogen s názvem *Phytophthora alni sensu lato*, který obsahoval tři poddruhy (Brasier et al., 2004). Až pozdější výzkum ukázal, že se ve skutečnosti jedná o tři samostatné druhy, které nyní nesou název *P. uniformis*, *P. × multiformis* a *P. × alni* (Husson et al., 2015). Dohromady jsou označovány jako „komplex druhů *P. alni*“. Současný konsenzus věří, že druhy *P. uniformis* (původem nejspíš z Aljašky) a *P. × multiformis* (dávný hybrid neznámého původu) se zkřížily v jedné z pěstitelských školek v Evropě a daly vznik novému hybridnímu druhu *P. × alni* (Brasier et al., 2004; Husson et al., 2015).



Obrázek 1: Přehled výskytu komplexu *P. alni* v roce 2016 podle Bjelke et al., 2016.

Šíření fytoftorového onemocnění olší do dnešních rozměrů zapříčinila nedostatečná kontrola školkového materiálu, z něž byly infikované sazenice distribuovány po celé Evropě (Evans and Oszako, 2007). Přepokládá se, že mezi lety 1990 a 2010 bylo infikovanými sazenicemi osázeno až 22 miliónu hektarů (Bjelke et al., 2016; Jung et al., 2018). Jakmile je fytoftorové onemocnění jednou v lokalitě přítomno, šíří se dále vodními toky a infikuje nová území (Bjelke et al., 2016). Teoreticky tak k zamoření velké

oblasti stačí jeden nakažený jedinec a vhodné podmínky pro rozvoj patogena. V přírodních podmínkách jsou zoospory patogena rodu *Phytophthora* přenášeny vodou na dlouhé vzdálenosti a

infikují břehové porosty olší. Stromy se typicky nachází v blízkém kontaktu s vodním tělesem, zoospory se tedy snadno dostanou ke kmenové bázi, kde vstupují do těla rostliny skrze velké lenticely, nebo ke kořenům, kde využijí nesuberinizované adventivní kořeny (Jung et al., 2018).

Příznaky napadení patogeny komplexu *P. alni* jsou v koruně poměrně nespecifické. Makroskopické projevy na koruně zahrnují postupnou defoliaci až odumírání částí koruny, produkci menších listů vyskytujících se v náhodných klastrech a případně nadprodukcii plodů (obrázek 2A). Toto vše je doprovázeno nekrózami kořenů, kořenového krčku a kmene. S postupem patogenního mycelia výše uvnitř kmene se na borce objevují léze, z nichž vytékají černé či rezavě zabarvené exudáty (obrázek 2B). Pokud bychom odstranili svrchní vrstvy borky, nalezneme bychom rezavě zabarvené dřevo, sladce páchnoucí (obrázek 2C) (Černý et al., 2021).



Obrázek 2: A) Olšový porost v obci Lochovice v povodí řeky Litavka s prokázaným výskytem patogenu komplexu *Phytophthora alni*. Na snímku vlevo jsou stromy vykazující příznaky infekce – defoliaci. B) Nekrotické léze na kmeni jedince olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) způsobené patogenem z rodu *Phytophthora*. C) Červeně zabarvené a sladce páchnoucí dřevo indikující napadení patogenem rodu *Phytophthora*. Foto V. Oramová

Situace v ČR byla důkladně prozkoumána v roce 2013, kdy Černý et al. (2013) provedli rozsáhlé dotazníkové šetření mezi zaměstnanci Lesy ČR. Ohodnotili celkem asi polovinu všech předpokládaných olšových porostů na území republiky. Hodnotili řadu faktorů, mezi nimi především

počet a zastoupení symptomatických jedinců, tj. stromů s nekrotizací na bázi kmenů, kořenech a/nebo s otevřenými lézemi na borci. Výsledky hovoří o přítomnosti fytoftorového onemocnění na 52 % všech zkoumaných lokalit – tedy minimálně na ¼ všech olšových porostů u nás. Zásadním faktorem byla přítomnost vodního toku, protože ta znamenala napadení v 76 % případů. Na základě tohoto šetření lze předpokládat, že se v následujících letech nákaza prostřednictvím vodních toků rozšířila dále a dnes by mohla být přítomna na většině dolních toků řek.

Fytoftorovým onemocněním olší jsou však zasaženy i okolní státy. V Rakousku byl pozorován rozdíl v rozložení druhů z komplexu *P. alni* způsobujících fytoftorové onemocnění. *P. × alni*, kterou se zabývám v této práci, infikuje stromy v nížinách, zatímco ve vyšších nadmořských výškách ji zastupuje *P. uniformis* (Corcobado et al., 2023). Shodný trend byl zaznamenán i ve Švédsku, ovšem ve vztahu k zeměpisné šířce (Redondo et al., 2015). Na Slovensku je nejčastějším původcem fytoftorového onemocnění olší *P. pluvivora* (Tkaczyk et al., 2023a) a z Polska je hlášený výskyt hned několika druhů rodu *Phytophthora* způsobujících fytoftorové onemocnění olší (Tkaczyk et al., 2023b). Výskyt onemocnění olší způsobeného patogeny rodu *Phytophthora* je hlášeno od Skandinávie a pobaltí (Kļaviņa et al., 2024; Matsiakh and Menkis, 2023) až po Pyrenejský poloostrov (Bregant et al., 2023; Rial-Martínez et al., 2023). Pokud bychom se podívali mimo evropský kontinent, nalezneme zprávy o onemocnění olší způsobené kořenovým patogenem s typickými příznaky pro rod *Phytophthora* prakticky napříč celým světem (Mullett et al., 2023)

Přírodní selekce je ale všudypřítomná a je nasnadě, že se zákonitě musela projevit i na vztahu *P. × alni* a olše lepkavá. Na území České republiky se tímto zabývala práce (Štochlová et al., 2016), ve které autoři vybrali 90 různých genotypů olší lepkavých odebraných napříč celým územím ČR, ve snaze nalézt jedince k nauce *P. × alni* odolné, či úplně imunní. Výsledky hovoří o značných rozdílech ve velikostech kmenových lézí, především ve vztahu ke zvolenému izolátu *P. × alni*, ale také se do toho promítl původ jedince v kontextu nadmořské výšky – stromy z nižších v.n.m. vykazují vyšší odolnost vůči napadení. Jako imunní se však neukázal žádný. Toto nastiňuje možný výzkum v oblasti šlechtitelství rezistentních variant, které by pomohly obnovit zdecimované břehové porosty olší.

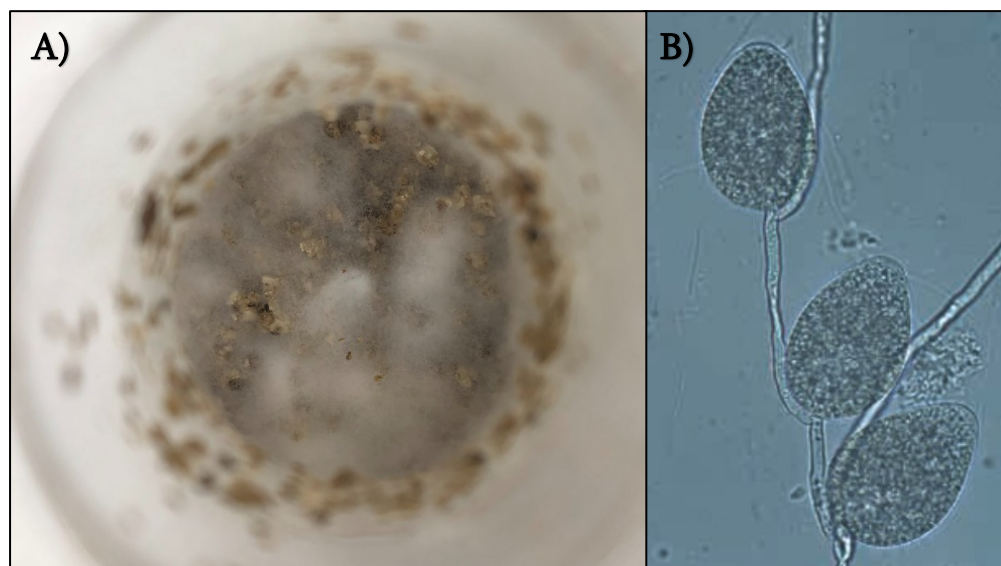
## 2.2 Patogen *Phytophthora* – taxonomické zařazení, životní cyklus, mechanismus infekce

Rod *Phytophthora* jsou houbám podobné organismy ze skupiny *Peronosporales* (*Peronosporomycetes*, *Stramenopila*; převzato z Jung et al., 2018), které způsobují řadu onemocnění rostlin. Mezi nejznámější příklady patří bezpochyby *Phytophthora infestans* napadající brambory, která zapříčinila Velký irský hladomor v 19. století.

Název rodu *Phytophthora* vychází z řeckých slov φυτόν (phytón), "rostlina" a φθορά (phthorá), "zničení"; dohromady tedy "ničitel rostlin". *Phytophthora* sp. je primární rostlinný patogen, většinou nekrotrofní či hemibiotrofní, s občasnými výjimkami v podobě saprofytních a

oportunistických nekrotrofních strategií (shrnutí podle Jung et al., 2018). Napadají tisíce druhů dřevin, polodřevin a bylin po celém světě, včetně významných hospodářských plodin. Základní rozdělení všech patogenů rodu *Phytophthora* vychází z toho, kde probíhá hlavní část jejich životního cyklu. Půdní druhy způsobují ztráty jemných kořínků, které postupně přerůstají v nekrózy kořenového systému a krčku. Vzduchem přenášené druhy napadají listy, výhonky a plody, kde zapříčiňují hniloby. Společným znakem všech patogenů rodu *Phytophthora* jsou mokvající léze na kmeni v pokročilé fázi infekce (shrnutí podle Jung et al., 2018).

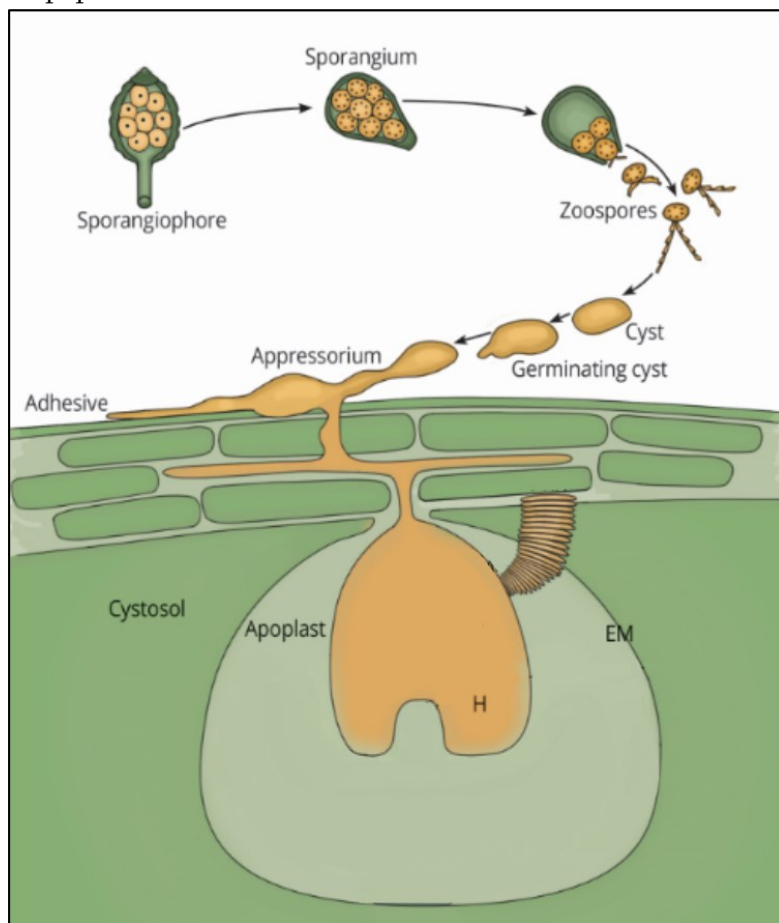
Způsob infekce je pro všechny půdní druhy rodu *Phytophthora* velmi podobný. V půdě se vyskytující dormantní stádia (oospory) při vhodných environmentálních podmínkách klíčí a vytváří sporangia. Ta uvolňují pohyblivé biflagelátní zoospory (obrázek 3A), které se pohybují půdní vodou. K hostitelské rostlině jsou přitahovány chemotakticky, vnímáním gradientu organických kyselin uvolňovaných z elongační zóny kořenů. Jakmile zoospory dosáhnou rhizosféry, penetrují rhizodermis kořene a začínají se přetvářet v rostoucí mycelium (obrázek 3B). Hyfy jsou vždy větvené a bez sept. Zda patogen postupuje pouze mezibuněčným prostorem, nebo penetruje plazmatickou membránu, je druhově specifické. Z hostitelské rostliny *Phytophthora sp.* odčerpává značné množství živin, což vede ke graduálnímu úpadku vitality až smrti rostliny. V průběhu celé infekce mycelia produkují další sporangia, která vypouštějí do prostředí další zoospory, které se dále šíří a infikují další kořeny. Nepřetržitá produkce mobilních infekčních partikulí má za následek velmi rychlé šíření nákazy v rámci stanoviště. Tento obecný popis životního cyklu je parafrázováním review Jung et al., 2018.



Obrázek 3: A) Inokulum porostlé myceliem *P. × alni*. B) Mikroskopický snímek zoospor *P. alni* z práce Černý et al., 2021, měřítko neuvedeno.

Cheperson et al., 2020 navrhuje následující model infekce rostliny patogenem *Phytophthora sp.* (obrázek 4). Mnohoaderné sporangium uvolní pohyblivé zoospory. V blízkosti hostitele se zoospory mění v cysty, jež následně klíčí a tisknou se k povrchu kořene. K průniku do pletiv slouží tzv. apresorium, což se pozměněná hyfa. Uvnitř pletiv se v mezibuněčných prostorech rozrůstají

infekční hyfy, které místy vytváří haustoria a patogen tak proniká do intrabuněčného prostoru. Nedochází však k penetraci plazmatické membrány, *Phytophthora* sp. vždy zůstává pouze v apoplastu.



Obrázek 4: Hypotetický model infekce rostliny patogenem rodu *Phytophthora*. Sporangiofor dozrává ve sporangium a uvolňují se zoospory. V blízkosti rostliny zoospory encystují. Cysta bobtná a klíčí. Pro přilnutí k hostitelské rostlině vytváří adhezivní hyfy, k proniknutí do pletiv slouží apresorium. V mezibuněčných prostorech prorůstají infekční hyfy. Do prostoru buňky proniká haustorium (H), jež invaginuje endoplazmatickou membránu hostitele (EM), ovšem setrvává v apoplastu. Převzato a upraveno z [Chepsergon et al., 2020](#).

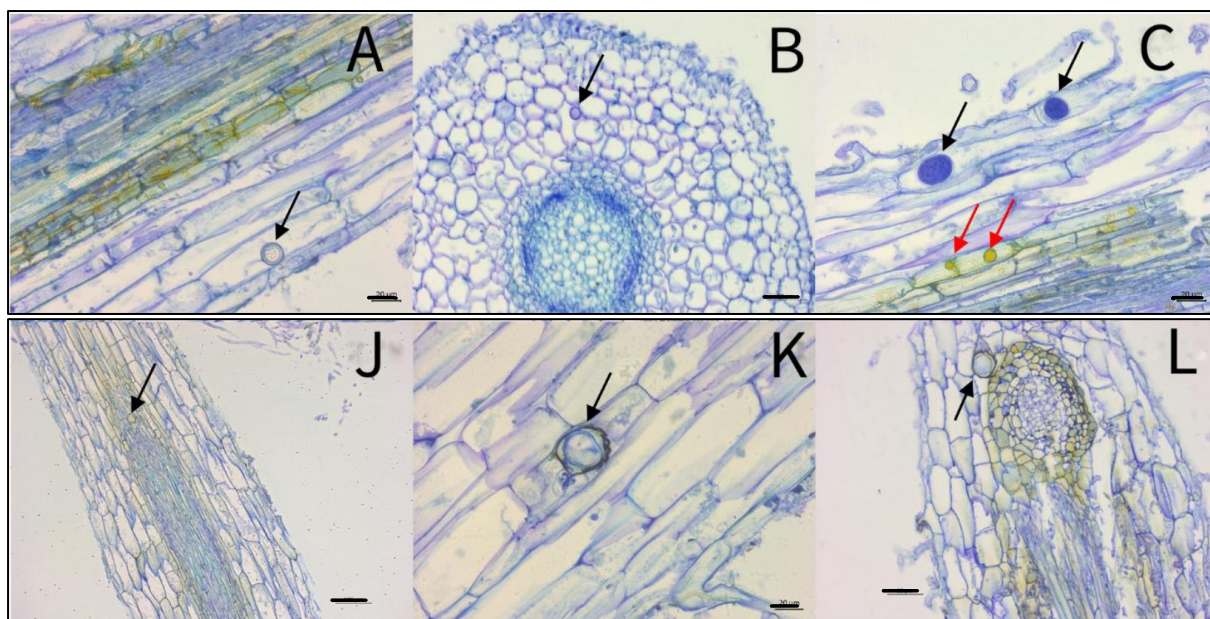
Komplex druhů *P. alni* je hostitelsky specifický a napadá pouze stromy rodu *Alnus* sp. (Brasier and Kirk, 2001; Jung et al., 2018). To ovšem neznamená, že jsou olše napadány pouze *P. alni*. Naopak je potvrzeno

napadení olšových porostů různými druhy patogenů z rodu *Phytophthora*, například *P. pluvivora* (Corcobado et al., 2023). Zajímavostí je změna dominantního druhu z komplexu *P. alni* v napadených olších v závislosti na nadmořské výšce. *P. × alni* je více prevalentní v nízkých nadmořských výškách, ve vyšších oblastech ji zastoupí *P. uniformis* (Corcobado et al., 2023). Stejný trend se projeví i ve vztahu k zeměpisné šířce – tedy že v severněji položených oblastech se *P. × alni* vyskytuje s nižší prevalencí než *P. uniformis* (Redondo et al., 2015). Je tedy zřejmé, že *P. × alni* bude citlivější na chladné klimatické podmínky, což by v kontextu s právě probíhající klimatickou změnou mohlo hrát roli v dalším šíření phytophrotového onemocnění do nových regionů.

Je toho pouze málo známo o tom, kde a jak *P. alni* uvnitř rostliny přežívá. Práce Nave et al., 2021 se zaměřila na histologické pozorování kořenů olše lepkavé inokulované *P. × alni* a *P. uniformis*. Autoři objevili přítomnost různých vývojových stádií patogena. Co je velmi zajímavé je, že i v asymptomatických jedincích olše lepkavé se nacházela pokročilá stádia vývoje patogena: oogonium *P. × alni* s oosporami intrabuněčně (obrázek 5A), mycelium a další oogonium interbuněčně v kortexu (obrázek 5C). S narůstající příznakovostí inokulovaných jedinců se zvyšoval počet nalezených oogníí a také se měnila jejich pozice – byly častěji nalézány intrabuněčně a také blíže či uvnitř centrálního válce kořene (obrázek 5C). Přítomnost živé *Phytophthora* v kořenech již



usmrčených rostlin potvrzuje fakt, že komplex *P. alni* jsou hemobiotrofní patogeni. Rostlinu napadají jako biotrofové, svým působením se však stávají více parazitickými, až napadeného jedince usmrtí.



Obrázek 5: Řezy kořeny olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) tři týdny po inokulaci *Phytophthora* × *alni*. Snímky A-C pochází z asymptomatických jedinců, snímky J-K pochází ze silně zasažených rostlin, snímek L pochází z rostliny mrtvé. A) podélný řez, černá šipka označuje intrabuněčné oogonium s oosporou, kortex; úsečka pro měřítko 20  $\mu\text{m}$ . B) příčný řez, černá šipka označuje interbuněčné oogonium; úsečka pro měřítko 50  $\mu\text{m}$ . C) podélný řez, černé šipky označují intrabuněčná oogonia, červené šipky označují intrabuněčné patogenní mycelium; úsečka pro měřítko 20  $\mu\text{m}$ . J) podélný řez, černá šipka označuje oogonium s oosporou uvnitř centrálního válce; úsečka pro měřítko 500  $\mu\text{m}$ . K) podélný řez, černá šipka označuje intrabuněčné oogonium s oosporou; úsečka pro měřítko 20  $\mu\text{m}$ . L) podélný řez, černá šipka označuje oogonium s antheridiem v růstové tkáni; úsečka pro měřítko 50  $\mu\text{m}$ . Barveno toluidinovou modří, podrobnosti o světelném poli nejsou uváděny. Převzato a upraveno z Nave et al., 2021.

Napadení stromu patogenem rodu *Phytophthora* lze bezpečně určit podle přítomnosti lézí na kmenech a kořenovém krčku. Toto je ovšem již pokročilá fáze infekce, kdy došlo k nekrotizaci vodivých pletiv. Patogen ze svého hostitele již od prvního okamžiku čerpá živiny a s postupným rozvojem infekce postupuje od jemných kořínků přes hlavní kořeny až do kmene. Jakmile bychom se pouhým okem podívali na kořenový systém napadeného jedince, uvidíme rozsáhlé nekrózy (obrázek 24). Na mikroskopických řezech lze pozorovat přítomnost hyf v prostoru buněk floému i xylému, poškození cév, nekrózy kortexu a poškození parenchymu (Vieites-Blanco et al., 2023). Jakmile patogen rodu *Phytophthora* pronikne do vodivých pletiv, napadená rostlina reaguje produkcí tyložy – tedy prorůstání parenchymatických buněk do cév xylému, důsledkem čehož lze očekávat snížení hydraulické vodivosti (Vieites-Blanco et al., 2023). Toto otestoval Clemenz et al., 2008 a došel k závěru, že *Phytophthora* sp. neomezuje hydrauliku vodivých pletiv, protože účinnost využití vody listem se nezměnila a nesnížil se ani vodní potenciál listů. Nicméně skutečnost, že průduchy byly v této situaci zavřené, vysvětluje zničením floému patogenem, v důsledku čehož byl narušen transport asimilátů z listů do kořenů. Akumulace škrobu v listech zapříčinila uzavření průduchů a

snížení rychlosti fotosyntézy a růstu. S tvrzením o změně floémového toku v důsledku napadení patogenem rodu *Phytophthora* částečně souhlasí Fleischmann et al., 2004, který ve své práci reportuje výrazný pokles obsahu dusíku v listech, a zároveň jeho výrazné zvýšení v kořenech. Ovšem hladiny obsahu vápníku a hořčíku v listoví zůstaly nezměněny. Další důležité zjištění, které tato práce přinesla, byl nárůst obsahu pigmentů xantofylového cyklu v listech, což svědčí o zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) při infekci.

Právě tyto diskuze o alteraci s hospodařením s vodou a živinami v rostlině hostící patogena z rodu *Phytophthora* nás přivedly na myšlenku, zda je možné zachytit změny ve fyziologických vlastnostech listu v rané fázi infekce. Vizí do budoucna by bylo využití metod dálkového průzkumu k identifikaci napadených jedinců, jejich eliminaci a omezení šíření nákazy v prostředí.

### 2.3 Funkční znaky listoví v kontextu napadení patogenem rodu *Phytophthora*

Pojmem „funkční znak“ lze označit jakékoli morfologické, fyziologické a fenologické znaky, které mají vliv na výkonnostní vlastnosti jedince a potažmo i na výslednou fitness (Violle et al., 2007). V této práci se zabýváme různými vlastnostmi listů a jejich schopností vypovídat o celkovém stavu rostliny v souvislosti s napadením kořenů patogenem *Phytophthora × alni*. Pod slovním spojením „funkční znaky listoví“ zde rozumíme obsah fotosyntetických a ochranných pigmentů, specifickou listovou plochu a obsah vody v listu – tedy vlastnosti, které jsou kvantitativně definovatelné a odrážejí skutečné poměry uvnitř listu jakožto samostatného orgánu rostlin.

Koncept projekce stresu z kořenového systému do funkčních znaků listoví není v rostlinných vědách nic nového. Již dříve zmiňované práce (Clemenz et al., 2008; Fleischmann et al., 2004) studovaly změny ve fyziologii listoví způsobené fytoftorovým onemocněním. Z novějších prací se tímto vztahem zabývá například (Corcobado et al., 2022), jež provedl rozsáhlou metabolickou analýzu, nebo (Macháčová et al., 2024), která přináší nejnovější poznatky o změnách v transpiraci v kontextu napadení patogenem rodu *Phytophthora*.

#### 2.3.1 Změny obsahu fotosyntetických a ochranných pigmentů v listoví při napadení patogenem rodu *Phytophthora*

Obsah pigmentů v listech se obecně považuje za jeden ze zásadních znaků vypovídajících o fyziologickém stavu rostliny. Obsah chlorofylu slouží jako proxy pro odhad fotosyntetické kapacity listu, a změny v jeho koncentraci mohou odrážet nejrůznější působení stresorů či deficiencie (zejména Mg a N). Karotenoidy slouží jako pomocné a ochranné pigmenty, zejména karotenoidy xantofylového cyklu se podílí na disipaci světelné energie na teplo v případě, že rostlina nemá kapacitu tuto energii využít fotochemicky. Nefotosyntetické pigmenty, také nazývané ochranné, ze své podstaty plní doprovodnou funkci a například brání rostlinu před poškozením ROS. Jedná se o flavonoidy a jejich podskupinu antokyany. Obsah ochranných pigmentů nebo poměr karotenoidů ku chlorofylu se používá jako proxy pro stanovení míry stresu, kterému je rostlina vystavena. Právě zvýšená koncentrace pigmentů xantofylového cyklu byla potvrzena v případě napadení buku lesního (*Fagus sylvatica*) druhem *Phytophthora citricola* a *Phytophthora cambivora* (Fleischmann et al., 2004), tudíž je na místě zajímat se o podobné projevy i v případě *P. × alni* a olše. Další prací podporující naši tezi je [Dorado et al., 2023](#), která přinesla informaci o zásadních změnách ve složení

metabolitů listoví při napadení stromu *Castanea sativa* patogenem *Phytophthora cinnamomi*. Zároveň tvrdí, že změna byla markantnější v listech, ne v kořenech.

Obsah pigmentů bývá standardně stanovován biochemicky, případně nepřímo z poměru fluorescence chlorofylu v různých emisních vlnových délkách (Lichtenthaler, 2021). Obsah chlorofylu lze stanovit i pomocí kapesních přístrojů fungujících na principu propustnosti listu pro červené záření (absorbované chlorofylem) a infračervené záření (chlorofylem neabsorbované) (Parry et al., 2014). Jde o rychlejší metodu než biochemické stanovení a některé přístroje jsou konstruované i pro měření fluorescence a pomocí specifických indexů je možné detekovat i flavonoly a antokyany (Goulas et al., 2004). Pro stanovování relativního obsahu pigmentů v listech napadených a nenapadených olší jsme zvolili přístroj MPM-100, který na základě odstínění chlorofylové fluorescence ochrannými pigmenty lokalizovanými zejména v epidermis určí relativní obsah flavonolů a anthokyanů (Cerovic et al., 2008), a z propustnosti listu pro červené záření stanoví relativní obsah chlorofylů.

Na příkladu napadení dubu *Quercus ilex subsp. Ballota* patogenem *Phytophthora cinnamomi* bylo z hyperspektrální odrazivosti listoví možno vysledovat změny v obsahu anthokyanů, chlorofylů, obsahu vody a dalších parametrů (Hornero et al., 2021). V kontextu této práce je ale nejzajímavější fakt, že změny ve funkčních parametrech listoví byly touto metodou detekovatelné u ještě asymptomatických jedinců.

### 2.3.2 Změna obsahu vody v listoví a specifické listové hmotnosti při napadení patogenem rodu *Phytophthora*

Jak již bylo zmíněno výše, patogeny rodu *Phytophthora* v hostitelské rostlině způsobují nekrózy kořenů, čímž omezují kapacitu příjmu vody a živin z prostředí, a napadají vodivá pletiva, čímž zasahují do toku mízních tekutin. Pokud jsou omezeny možnosti kořenů olší přijímat vodu, dochází ke snížení listové plochy, suché listové hmotnosti a růstu. Celkové narušení poměru kořene ku prýtu vede ke snížení vodního potenciálu listu až vodnímu deficitu, snížení vodivosti průduchů a poklesu transpiračního toku (Tschaplinski and Blake, 1985). Je tedy nasnadě, že podobné projevy očekáváme i na jedincích olší infikovaných patogenem rodu *Phytophthora*.

Experimentální práce (Clemenz et al., 2008), uskutečněná v přirozených klimatických podmínkách, dokládá, že olše podléhající nákaze *P. ×alni* budou mít menší přírůstky, nižší příjem CO<sub>2</sub> a méně negativní vodní potenciál listoví, ale vyšší obsah škrobu v listech a silně oscilující hodnoty transpiračního toku. Výkyvy v transpiraci reportuje i (Ďurkovič et al., 2021), který provedl podobný experiment na topolech, nebo (Macháčová et al., 2024), která navíc přináší rozměr zvýšené koncentrace atmosférického CO<sub>2</sub>, který oscilace transpiračního toku ještě umocňuje. Tvrzení o snížené stomatální vodivosti potvrzuje v kontextu fytoftorového onemocnění (Corcobado et al., 2022). Na druhou stranu, (Ďurkovič et al., 2021) sice změnu ve vodivosti průduchů nezaznamenal, ale naznačuje snížení účinnosti primární fáze fotosyntézy a efektivity využití vody.

Nejsou mi známy práce, které by v souvislosti s fytoftorovým onemocněním fyzicky měřily změny v obsahu vody v listoví (WC, z anglického „water content“) nebo specifické listové hmotnosti (LMA, z anglického „leaf mass area“). Pouze práce [Hornero et al., 2021](#) tyto parametry

zkoumala (akorát převrácenou hodnotu LMA), ale skrze hyperspektrálních obrazová data. Jejich výsledky jsou velice slibné a naznačují trend poklesu hodnot obou parametrů s postupující intenzitou napadení fytoftorovým onemocněním. To zavrhuje dobrý důvod, proč právě tyto dva fyziologické parametry zařadit do našeho měření. Oba dva jsou obecně uznávanými ukazateli vodního stresu (Poorter et al., 2009) a mohou nám poskytnout informace o vodním statusu napadené rostliny, přeneseně vypovídajícím o míře nekrotického kořenového systému.

## 2.4 Fluorescence chlorofylu v kontextu napadení patogenem rodu *Phytophthora*

Obsah chlorofylů nepřímo určuje fotosyntetický potenciál vegetace a jedná se tedy o důležitý ukazatel produktivity jedince, potažmo i celého ekosystému. Každá molekula chlorofylu obsahuje jádro tvořené jedním atomem hořčíku a čtyřmi atomy dusíky – je to tedy poměrně „drahá“ molekula, v níž se váže nezanedbatelné množství živin. Celková výkonnost fotosyntetického aparátu může být určena na základě poměru excitačního záření a zpětně vyzážené fluorescence ve vlnových délkách F735 a F700 nm (Bussotti et al., 2020; Strasser et al., 2000). Fluorescence chlorofylu je široce užívaný způsob určení fyziologického stavu rostliny, jelikož se do něj promítá mnoho vnějších i vnitřních faktorů, včetně stresu způsobeného napadením patogeny. Často využívaným přístupem pro detekci abiotického i biotického stresu je měření rychlé kinetiky fluorescence chlorofylu (tzv. OJIP test, (Strasser et al., 2000) na temnotně aklimovaných listech jak v terénních studiích (Bussotti et al., 2020) tak kontrolovaných experimentech (Corcobado et al., 2022).

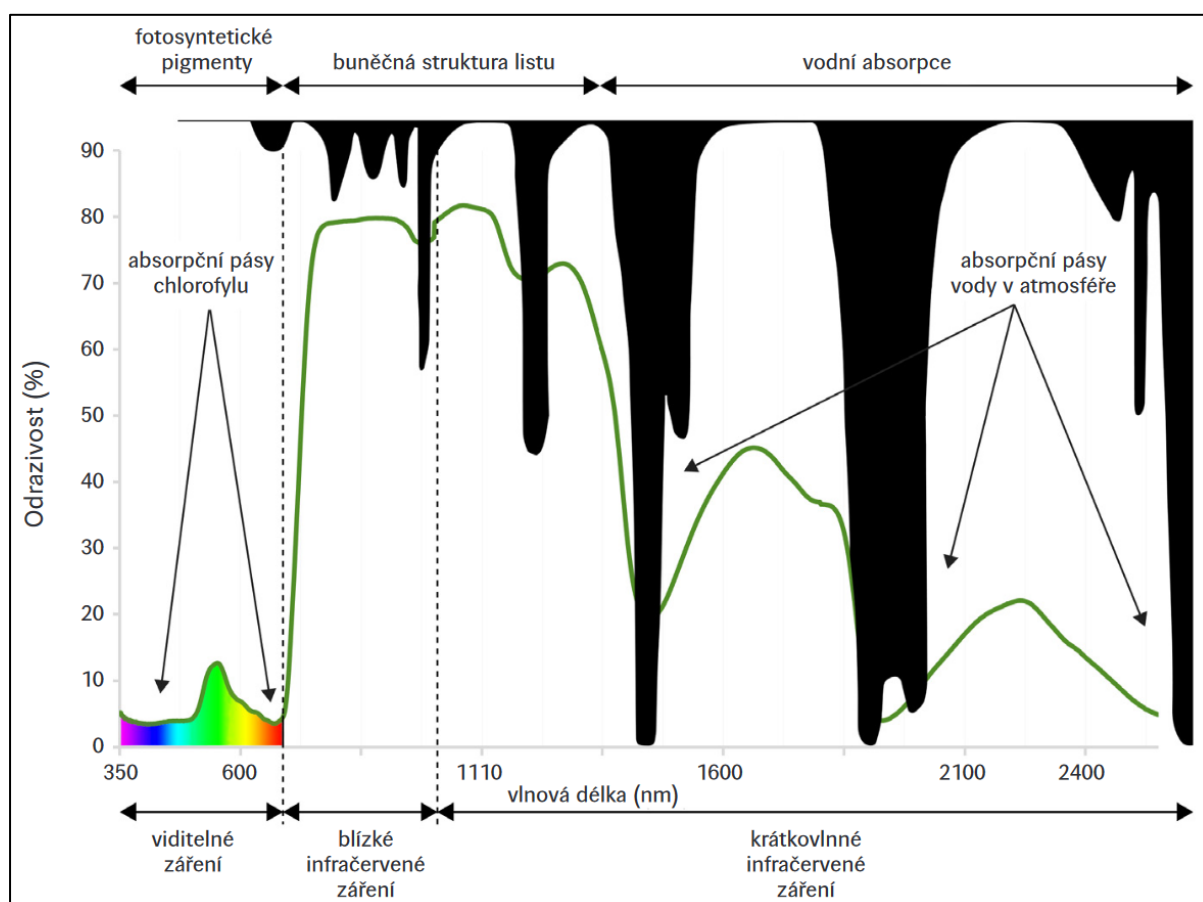
V kontextu fytoftorové infekce jsou fluorescenční parametry často používaným parametrem hodnocení vitality napadených stromů (Corcobado et al., 2022; Ďurkovič et al., 2021; Macháčková et al., 2024; Pfanz et al., 2015). Práce provedené na buku lesním (Corcobado et al., 2022) či topolu osice (Ďurkovič et al., 2021) shodně potvrzují pokles fluorescenčních parametrů v brzkých fázích infekce způsobené různými patogeny z rodu *Phytophthora*. Tyto výsledky jasně značí negativní vliv patogenu na výkonnost fotochemického aparátu listoví. Na příkladu olše lepkavé a *P. ×alni* je zajímavý rapidní pokles fluorescence kortexového chlrenchymu, která záhy po inokulaci klesla téměř na nulu (Pfanze et al., 2015).

Nejnovější práce na poli vztahu mezi infekcí patogenem rodu *Phytophthora* a jejími projevy v listoví přináší následující zjištění: míra primární fotosyntézy mírně klesá již 4 týdny po podkorní inokulaci semenáče olše lepkavé patogenem *P. ×alni*, a tento efekt je ještě umocněn při podmínkách zvýšené koncentrace vzdušného CO<sub>2</sub> (Macháčková et al., 2024). Tento výsledek zavrhuje podnět pro další zkoumání fyziologických hodnot listoví v reakci na kombinaci infekce patogenem a zvýšené koncentrace vzdušného CO<sub>2</sub>.

## 2.5 Optické vlastnosti listu v kontextu napadení patogenem rodu *Phytophthora*

Základním optickým parametrem používaným v laboratorní či terénní spektroskopii je reflektance neboli odrazivost. Jedná se o podíl z celkového záření, který se od vzorku odrazí. V rámci této práce pracujeme i s parametrem spektrální propustnosti (transmittance), která je podílem záření, které vzorkem projde. Spektrální složení záření dopadajícího na vzorek je velmi přesně definováno. Většina přístrojů měřících reflektanci, spektrometrů, se používá se světelnými

zdroji, které emitují záření o vlnové délce 300 – 2500 nm, což zhruba odpovídá rozmezí vlnových délek slunečního záření dopadajícího na povrch Země a zároveň je v tomto spektrálním rozsahu přístroj schopný radiaci měřit. Na úrovni listu nám optické vlastnosti poskytují mnoho informací o buněčné struktuře, obsahu vody a především o obsahu pigmentů a dalších biochemických látek. Každá z těchto kategorií má specifické spektrální chování, a právě to se propíše do výsledné spektrální křivky. Například chlorofyly absorbují záření ve viditelných vlnových délkách, což se na křivce odrazivosti charakteristicky projeví jako “absorpční pás chlorofylů” (obrázek 6) (shrnutí podle Albrechtová et al., 2017). Je tedy nasnadě, že díky komplexitě výstupů získaných z optických měření listoví, je naším záměrem vysledovat projevy napadení patogenem *P. ×alni* ze spektrálních vlastností listoví.



Obrázek 6: Hlavní charakteristiky spektrální křivky odrazivosti zdravé vegetace: absorpční minima způsobená přítomností chlorofylu (chlorofyl a: 430 nm a 660 nm, chlorofyl b: 450 nm a 650 nm), absorpční pásma vody (1 400 nm, 1 900 nm a 2 700 nm), vysoká odrazivost. Převzato z Albrechtová et al., 2017.

Existuje mnoho prací zabývajících se použitím spektrálních vlastností listoví pro detekci rostlinných stresorů, ale já zde vyberu příklady pouze takových, které se přímo pojí k fytoftorovému onemocnění. Použití optických parametrů listoví se ukázalo být úspěšným indikátorem napadení rostliny patogeny rodu *Phytophthora* na dřevinách (Abdulridha et al., 2016; Corcobado et al., 2022; Croeser et al., 2022; Guerra-Hernández et al., 2021; Hornero et al., 2021).

Použití spektrometrie k rozlišení rostlin napadených patogenem rodu *Phytophthora* od zdravých potvrdil Abdulridha et al., 2016. Dokonce bylo z odrazivosti možné vysledovat vývoj postupující infekce. Navíc také nastínil možnost použití této metody k rozlišení působení různých stresorů na rostlinu. Přesně na to navázal (Gold et al., 2020), jež použil parametr spektrální odrazivosti listové pro odlišení napadení patogenem rodu *Phytophthora* a jiným patogenem. Jejich měření ukazují výkyvy hodnot již 2-4 dny před projevením prvních makroskopických příznaků. Celkově se jim podařilo rozlišovat mezi dvěma patogeny s přesností >90 %. Jako stěžejní úsek spektra, kam se aktuální fyziologický stav rostliny promítl nejvíce, se ukázalo být odražené červené krátkovlnné záření. Ovšem v tomto experimentu se jednalo o *P. infestans* na bramborách, tudíž výsledky musíme brát v kontextu dřevin dosti s rezervou.

Zásadním přínosem spektrometrické metody je neinvazivnost měření. Optické vlastnosti listové se dají měřit na úrovni jednotlivých listů, koruny či celého ekosystému. Za použití metod dálkového průzkumu Země studoval projevy napadení komplexem *P. alni* na olšových porostech Guerra-Hernández et al., 2021. V této práci se zaměřili na defoliaci a určili čtyři stadia infekce: stromy asymptomatické, stromy defoliované pod 50 %, stromy defoliované nad 50 % a stromy mrtvé. Z bezpilotních letadel snímali odrazivost porostu a následně určili stupeň napadení s 67% přesností. Z laboratorních experimentů prováděných na olši lepkavé a *P. ×alni* žádný neměřil optické vlastnosti rostlin. Naše práce proto staví na znalostech získaných z jiných příkladů vztahu dřevina-*Phytophthora*. Slibné výsledky předvídá například Corcobado et al., 2022, kde měřili spektrální fyziologické indexy (vypočítané na základě hodnot reflektance v určitých vlnových délkách), a ty se prokázaly být dobrými ukazateli olšového onemocnění semenáčů buku lesního (*Fagus sylvatica*; infikováno *P. pluvivora* nebo *P. ×cambivora*). Největší rozdíl v porovnání s kontrolními rostlinami byl patrný již dva týdny po inokulaci ve všech parametrech. Naprosto stěžejní poznatky přinesla práce Hornero et al., 2021, v níž byli autoři schopni detekovat různé stupně napadení stromů patogenem rodu *Phytophthora*, včetně identifikace asymptomatických jedinců.

### 3 Materiály a metody

Ústředním motivem celé práce je pre-symptomatická detekce napadení olše lepkavé, *Alnus glutinosa* (dále označované jako „olše“) patogenem *Phytophthora × alni*. Výzkum se odehrával ve dvou samostatných systémech.

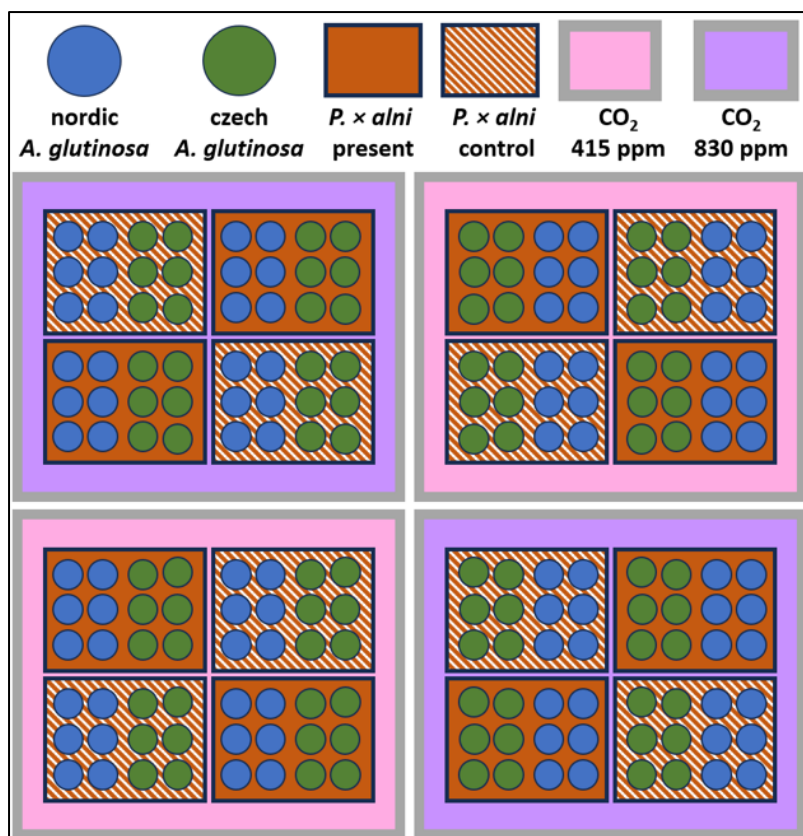
První část práce proběhla v kontrolovaných podmínkách růstových komor s juvenilním materiálem olší na půdě ČZU. V rámci této spolupráce jsem zastupovala Laboratoř ekofyziologie rostlin, KEBR, PřF UK a prováděla jsem ekofyziologická měření na rostlinách. Kolegové z Katedry genetiky a fyziologie lesa, FLD ČZU poskytli používané prostory, rostlinný materiál a aktivně se účastnili ekofyziologických měření. Práce s patogenním inokulem byla v režii Ing. Markéty Macháčové z Katedry ochrany lesa a entomologie, FLD ČZU, která také dohlížela na průběh celého experimentu.

Druhá, samostatná část prací proběhla jako terénní výzkum povodí řeky Litavky. V této oblasti byla potvrzena přítomnost *P. × alni*, ale ne všechny tamější olše vykazují symptomy napadení. Provedla jsem tedy sérii ekofyziologických měření, jakožto metodu neinvazivního hodnocení přítomnosti nákazy.

#### 3.1 Hlavní komorový experiment 2022

Hlavní experiment probíhal od března do září 2022 na půdě Fakulty lesnické a dřevařské, ČZU. Jednalo se o pěstební experiment sazenic druhu *Alnus glutinosa* v kontrolovaných podmínkách růstových komor značky PSI. Cílem bylo porovnat reakce české a norské linie olše na infekci patogenem *Phytophthora × alni* ve dvou režimech koncentrace CO<sub>2</sub>.

Celkem bylo použito 192 jedinců olše, z nichž polovina pocházela z české genetické linie (Semenářský závod v Týništi nad Orlicí; semenný porost u Moravského Šternberku) – takzvaná provenience česká, a druhá polovina z linie pocházející z Norska (Norwegian Forest Seed; semenný sad Hamar) – tedy provenience norská. Semen byla povrchově sterilizována ve flow-boxu (SAVO 5 %, 2 min). Klíčení probíhalo v růstových komorách v Petriho miskách na filtračním papíru. Pikýrování následovalo po 13 dnech od výsevu. Semenáče byly pěstovány odděleně v sazebních květináčích kónického tvaru (šířka na bázi 8 cm, šířka nahoře 11,4 cm, objem 2 l), které byly rozděleny do 45litrových boxů (56 × 39 × 28 cm) po 12 kusech, jež byly umístěny do komor po čtyřech boxech. V každém boxu bylo 6 zástupců provenience české a 6 zástupců od provenience norské. Celkem byly obsazeny 4 komory s následujícím režimem: fotoperioda 12h/12h, teplota 20°C ve dne a 15°C v noci, relativní vlhkost vzduchu 80 %, záření s 10% podílem modrého světla, 8 % červeného světla a 2 % dlouhovlnného červeného záření. Dvě z komor byly nastaveny na hodnotu přibližně odpovídající současné koncentraci CO<sub>2</sub>: 415 ppm, druhé dvě na zvýšený obsah CO<sub>2</sub>: 830 ppm (obrázek 7 a 8). Použitý byl propařovaný substrát pro výsev a množení značky Forestina PROFÍK, obsahující světlou rašelinu, tmavou rašelinu, perlit. Dvakrát v průběhu experimentu došlo k přihnojení hnojivem Osmocote. Zálivka probíhala podle potřeby.



Obrázek 7: Schéma rozvržení komorového experimentu 2022. Modré kolečka: jedinci norské provenience olše lepkavé. Zelené kolečka: jedinci české provenience olše lepkavé. Plně vybarvený box: box s přítomností patogena *P. xalni*. Šrafovaný box: box bez přítomnosti patogena *P. xalni*. Růžový rámeček: růstová komora s koncentrací atmosférického CO<sub>2</sub> 415 ppm. Fialový rámeček: růstová komora s koncentrací atmosférického CO<sub>2</sub> 830 ppm.

Po 3 měsících od výsevu byla polovina rostlin inokulována patogenem *P. xalni*. (izolát MM123, odebrán z dřeva infikovaného stromu na řece Litavka, lokalita Příbram, 2020). Infekční inokulát byl pěstován v loupaných jáhlách na agaru po dobu 5 týdnů (obrázek 10). Kontrolní polovina rostlin obdržela čisté inokulum bez patogenu. Vlastní inokulace *P. xalni* proběhla 20. června vložím inokulátu přímo ke kořenům s následným zaplavením. Kontrolní jedinci dostali inokulum bez patogenu. Toto mělo simulovat přirozenou formu infekce přes kořenový systém. Po uplynutí 8 týdnů, tedy 15. srpna, byla provedena jedna podpůrná inokulace. Pro ujištění, že se patogen uchytil, byly provedeny dvě reizolace. Všechny úkony týkající se manipulace s inokulem a reizoláty byly v režii Ing. Markéty Macháčové z Katedry ochrany lesa a entomologie, která se prací s patogeny z komplexu druhů *Phytophthora alni* věnuje v rámci svého doktorského studia.



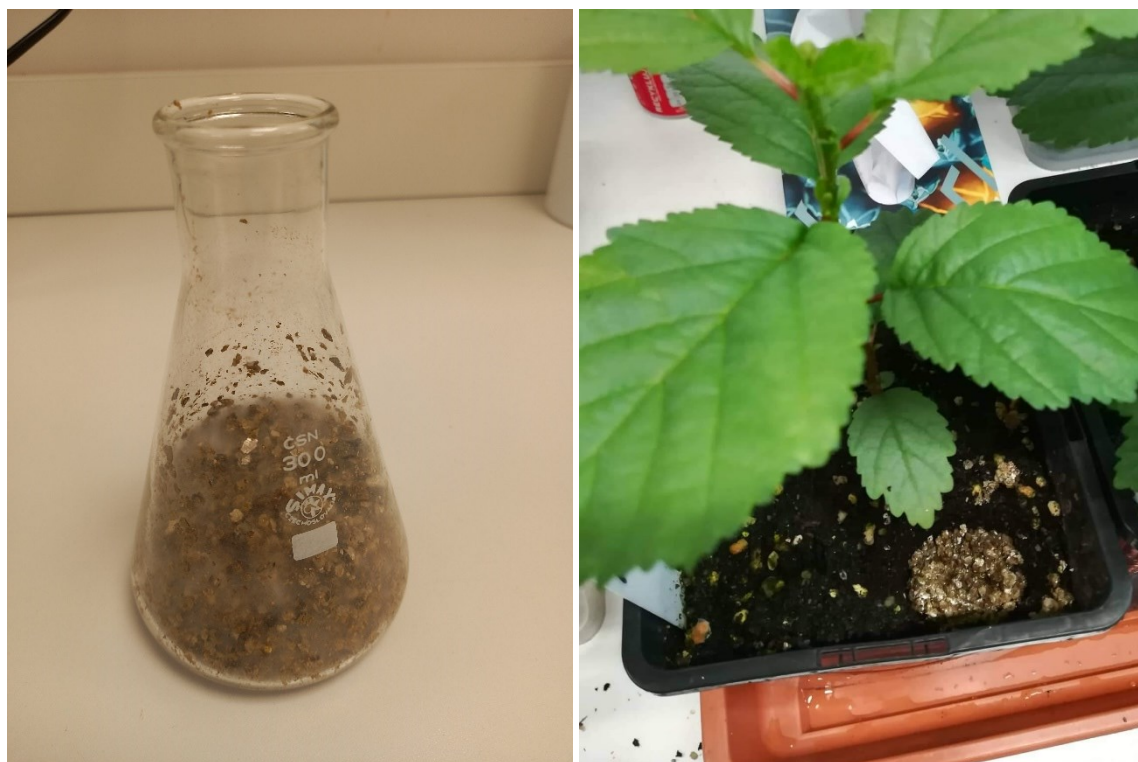
Obrázek 8: Raná fáze experimentu: sazenice v květináčích s tubou, na jejíž místo bude později aplikováno inokulum. Fotografie: Ing. Markéta Macháčová.



V rámci své diplomové práce jsem já, jakožto člen Laboratoře Ekofyziologie rostlin, KEBR, PŘF UK, provedla ekofyziologická měření na olších za použití neinvazivních metod pro hodnocení jejich fyziologického stavu. Rozhodli jsme se pro měření tří parametrů: rychlé kinetiky fluorescence chlorofylu za použití přístroje FluorPen, relativního obsahu pigmentů pomocí přístroje MPM-100 a reflektance listu ve viditelném a blízkém infračerveném spektru měřené spektrometrem ASD FieldSpec 4 Wide-Res s kontaktní sondou leaf clip.

První set měření proběhl před inokulací za účelem posouzení homogenity experimentálního materiálu v různě ošetřených skupinách. Následná měření probíhala s frekvencí cca 7 dní po dobu dvou měsíců, třetí měsíc se 14denní frekvencí. V průběhu experimentu bylo čtyřikrát simulováno zaplavení z důvodu absence viditelných příznaků infekce. Každé zaplavení sahalo do výšky cca 15 cm a trvalo tři dny. Společně se čtvrtým zaplavením byla provedeni i druhá, podpůrná inokulace.

Experiment musel být po 3 měsících z kapacitních důvodů ukončen. Jelikož se v průběhu na rostlinách neprojevil žádné jednoznačné symptomy infekce, Ing. Markéta Macháčová provedla rozbor kořenového systému za účelem izolace patogena přímo z pletiv. Domníváme se, že *P. ×alni* byla v nesterilním substrátu vykompetována jinými mikroby a výsledná míra infekce rostlin tak byla nízká. Za účelem potvrzení této hypotézy jsme provedli druhý, doplňující experiment.

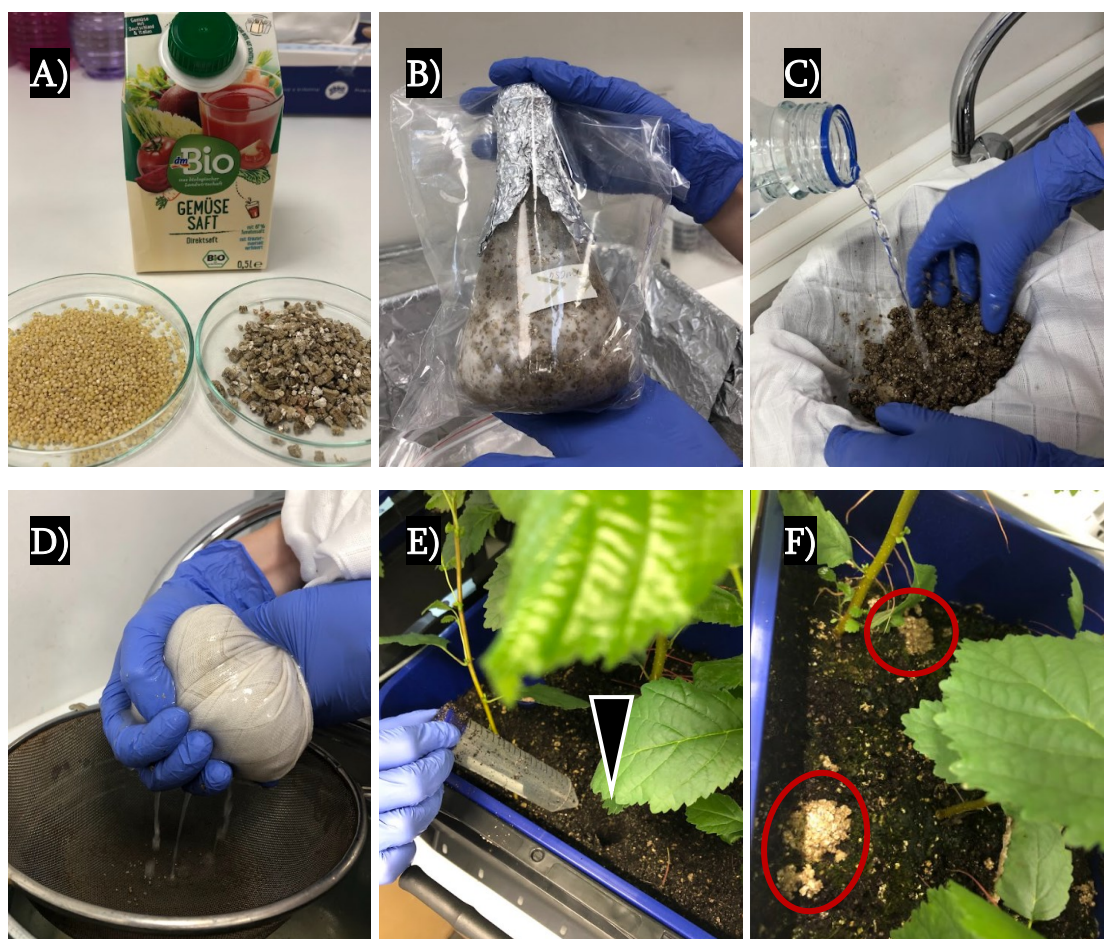


Obrázek 9: Inokulum *P. ×alni* vypěstované v elrenmeyerově baňce (vlevo) a zavedeno do půdy ke kořenům olše lepkavé (vpravo).

### 3.2 Doplnující komorový experiment 2023

Podpurný experiment probíhal od dubna do září 2023, opět na půdě Fakulty lesnické a dřevařské, ČZU. Jeho cílem bylo porovnat intenzitu infekce patogenem *Phytophthora × alni* na olši lepkavé v podmínkách sterilního a nesterilního substrátu.

Osazeno bylo celkem osm 45l boxů (56 x 39 x 28 cm), z nichž čtyři obsahovaly nezměněný propařovaný substrát pro výsev a množení značky Forestina PROFÍK, a čtyři tentýž substrát sterilizovaný klávováním v 5l sklenicích. V zájmu simulace přirozenějších podmínek byly rostliny v boxu pěstovány neodděleně, v jednom substrátu (obrázek 11 a 12). Pro analýzu optických vlastností bylo vybráno celkem 40 rostlin (tedy 5 jedinců na box). Všechny olše byly provenience české. Experiment probíhal pouze v jedné růstové komoře s následujícím nastavením: fotoperioda 12h/12h, teplota 20°C ve dne a 15°C v noci, relativní vlhkost vzduchu 80 % (později sníženo na 65 %), záření s 10% podílem modrého světla, 8 % červeného světla a 2 % dlouhovlnného červeného záření, koncentrace CO<sub>2</sub> 415 ppm.



Obrázek 10: Proces inokulace substrátu patogenem *P. × alni*. Postup a příprava podle Ing. Markéty Macháčové. A) Ingredience pro přípravu inokulátu – zeleninový džus, jáhly a vermikulit. B) Napěstované inokulum. C) Propláchnutí inokula destilovanou vodou. D) Odstranění přebytečné vody. E) Vyjmutí prázdných ampulí ze substrátu; šipkou označen otvor pro vložení inokula. F) Inokulum v půdě (červené kroužky).

Tři měsíce staré semenáče byly inokulovány tímtež inokulem *Phytophthora × alni* a stejnou metodou jako v předchozím experimentu z roku 2022 (obrázek 10).

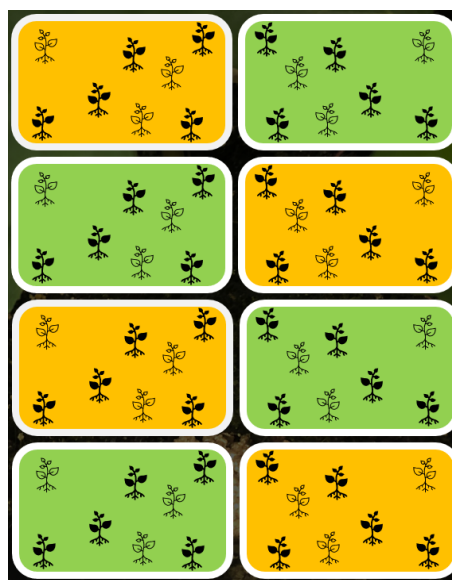
I zde jsme jako parametry pro sledování fyziologického stavu rostlin zvolili rychlou kinetiku fluorescence chlorofylu (FluorPen), relativní obsahu pigmentů (MPM-100) a spektrální vlastnosti listu ve viditelném a blízkém infračerveném spektru (ASD FieldSpec 4 Wide-Res). Na rozdíl od předchozího experimentu jsme pro měření spekter použili integrační sféru *ASD RTS-3ZC*, která umožňuje změřit reflektanci i transmitanci listu (obrázek 14).



Obrázek 11: Sazenice olše lepkavé v růstové komoře (vlevo) a první jedinci vykazující příznaky nákazy patogenem *P. ×alni* (vpravo).

První měření optických vlastností listů proběhlo před inokulací. Další série měření probíhala s frekvencí přibližně 21 dní. V průběhu experimentu došlo třikrát k zaplavení půdy, jakožto simulaci přirozených podmínek podporujících infekci. Jelikož předmětem zájmu doplňujícího experimentu byla kompetice mikroorganismů v substrátu, průběžně byly odebrány vzorky půdy na genetický rozbor. Další vzorky byly odebrány ze symptomatických rostlin pro izolaci patogena (obrázek 13). Tyto a další doplňující analýzy byly opět v režii Ing. Markéty Macháčové, při čemž autorka této práce asistovala s odběrem.

Poslední úkony před ukončením bylo subjektivní hodnocení vitality rostlin a změření tloušťky v krčku a výšky prýtu. Experiment byl



Obrázek 12: Schéma rozvržení komorového experimentu 2023. Zelené boxy: sterilní substrát, žluté nesterilní. Plně vybarvené rostliny značí náhodný výběr 5 sazenic olší lepkavých pro následná měření.

ukončen 3 měsíce po první inokulaci. Následně byla hodnocena míra nekrózy kořenového systému.



Obrázek 13: Odběr (vlevo) a příprava (vpravo) vzorků lézí kořenového krčku sazenice olše lepkavé napadené *P. ×alni* pro reizolaci patogena.



Obrázek 14: Měření optických vlastností listů olše lepkavé za použití integrační sféry.

### 3.3 Terénní šetření 2023

V červenci roku 2023 proběhl první terénní výjezd, jehož cílem bylo vytipovat jedince na lokalitách s výskytem nákazy patogenem *P. × alni* na dospělých jedincích olše lepkavé. Společně s Ing. Markétou Macháčovou, Mgr. Zuzanou Lhotákovou, Ph.D. a prof. Janou Albrechtovou, Ph.D. jsme vybraly 5 stanovišť v povodí řeky Litavky (obrázek 20), která obsahovala symptomatické i asymptomatické olše. Na horním toku Litavky byla potvrzena přítomnost *P. × alni* již dříve, v roce 2020 zde byly odebrány izoláty pro další experimenty. V historii byly na Litavce provedeny proseky porostu, právě z důvodu rozsáhlé infekce olší. Námi zvolené lokality pokrývají větší část toku.



Obrázek 15: Jedinec olše lepkavé napadený patogenem z komplexu *Phytophthora alni* (vlevo, označen šipkou). Vpravo nahoře léze na kmeni, označená kroužkem. Vpravo dole léze na kořenovém krčku, označeny kroužky.

Při výběru jedinců, které zařadíme do výzkumu, jsme se řídily pravidlem, že strom ve vzdálenosti větší než 6 m od vody lze považovat za nenakažený (Ing. Macháčová, ústní sdělení). U každého jedince jsme také určovaly defoliaci v procentech. Zásadním kritériem však byly symptomy onemocnění. Vytvořily jsme kategorii stromů „symptomatických“, které nesly známky nekrózy krčku nebo na nich byly přítomné léze (obrázek 15 a 16). Stromy bez těchto jednoznačných příznaků, bez ohledu na míru defoliaci (obrázek 17), byly zařazeny do kategorie „asymptomatické“.



Obrázek 16: Olše lepkavá napadená patogenem z komplexu *Phytophthora alni*. Léze na kmeni byly opracovány dlátem za účelem posouzení rozsahu poškození pletiv. Vlevo pohled na kmen ilustrující postup infekce od kořenového krčku výše po kmeni. Vpravo nahoře detail nejvyšší léze s počínající nekrózou pletiv. Vpravo dole detail nejnižší léze s rozsáhlou nekrózou pletiv.

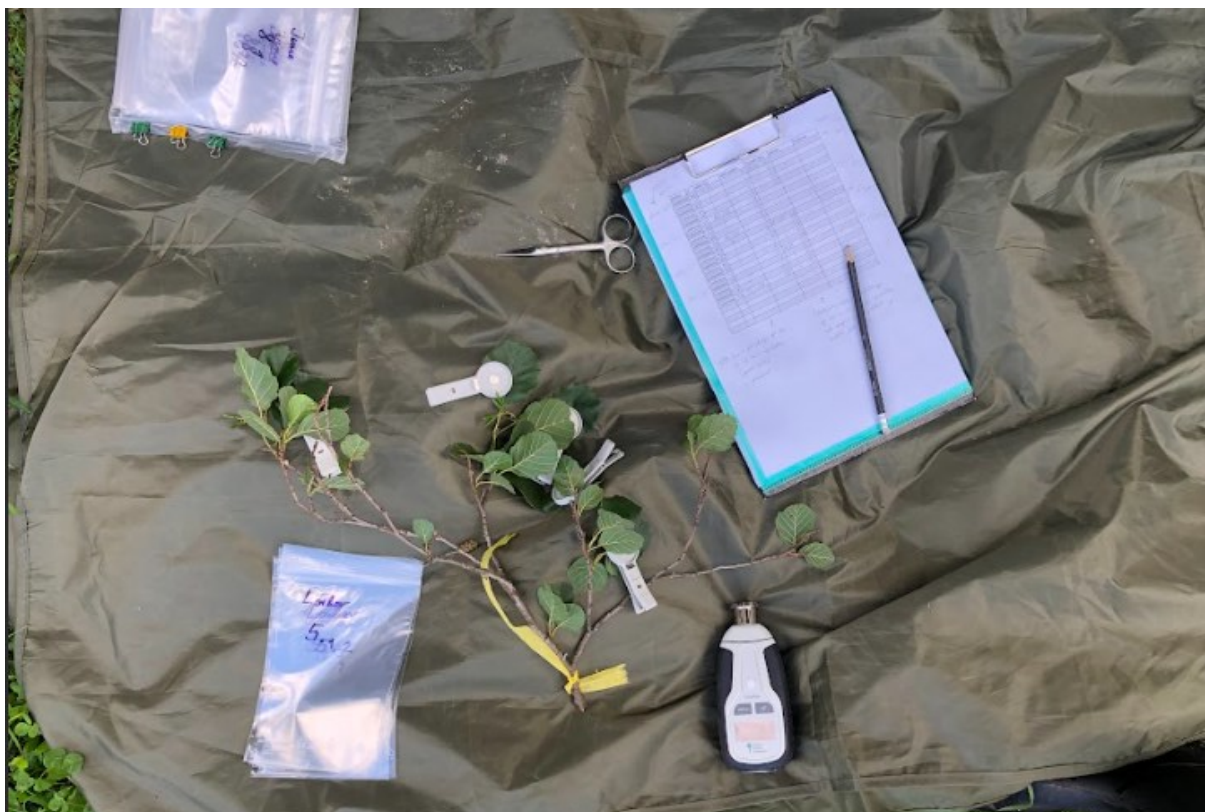
Naším cílem bylo v každé lokalitě vybrat a označit jedince pro měření optických vlastností listů, které proběhlo v srpnu 2023. Důraz byl kladen na identifikaci alespoň jednoho spolehlivě symptomatického jedince na každé lokalitě. Celkem jsme vybraly 20 stromů, z nichž 8 bylo symptomatických (obrázek 17 a 19).



Obrázek 17: Jedinci olší lepavých v povodí řeky Litavka s potvrzenou přítomností patogena z komplexu *Phytophthora alni*. A) strom asymptomatický. B) Strom symptomatický vykazující pokročilou defoliaci. C) strom symptomatický, dosahující téměř 100% defoliace.

Druhý terénní výjezd se uskutečnil v na konci srpna 2023. Ve společnosti Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. jsem navštívila všechny výše zmiňované lokality a společně jsme provedly měření ekofyziologických vlastností na předem označených olších. Z praktických důvodů jsme pro terénní měření zvolily přístroje FluorPen (obrázek 18) a MPM-100, které detekují fluorescenci chlorofylu a relativní obsah pigmentů. Tyto parametry jsme měřily 5krát na jedné větvi na strom, celkem tedy máme 100 vzorků.

Na odebraných vzorcích jsme posléze v laboratoři změřily reflektanci a transmitanci pomocí kontaktní sondy. Dodatečně jsme určily i obsah vody listů a specifickou listovou hmotnost.



Obrázek 18: Měření fluorescenčních parametrů s následným odběrem vzorků na odebraných větvích olše lepkavé v povodí řeky Litavka.





Obrázek 19: Příklady větví odebraných ze stromů označených jako symptomatické (na obrázcích vpravo) a asymptomatické (na obrázcích vlevo) ve vztahu k napadení patogenem z komplexu *Phytophthora alni*.

### 3.3.1 Charakteristika zkoumaných lokalit

#### Lokalita Bohutín

Po proudu Litavky nejvýše položená lokalita se nachází u chatové osady v obci Velká Pec, Bohutín, v 525 m n.m (obrázek 21A). Na levém břehu říčky vede naučná stezka Lesopark Litavka a tok je zde křižován brodem. Břehový porost je zapojený, s převahou olše lepkavé. Je to právě tato lokalita, odkud pochází první úspěšná izolace *Phytophthora × alni* z předchozích let. Podařilo se nám nalézt přímo konkrétní strom, který je prokazatelně infikován a zařadily jsme ho do našeho souboru dat. Celkem jsme zde označily 4 jedince – dva hodnocené jako symptomatické, dva jako asymptomatické.

#### Lokalita Příbram

Po proudu druhá lokalita se nachází na konci naučné stezky Litavka na okraji města Příbram, ve výšce 510 m n. m., přibližně 1 km od předchozí (obrázek 21B). Vybrané stromy rostou na levém břehu Litavky, mezi hlavním tokem a bočním ramenem (patrně starým náhonem na mlýn). Tyto podmínky vytváří silně podmáčené stanoviště, které lze považovat za ukázkové prostředí pro šíření patogena *P. × alni*. Zde jsme vybraly dva silně symptomatické jedince a dva asymptomatické.

#### Lokalita Jince

Zhruba 23 km dále po proudu se nachází třetí lokalita zájmu, úsek řeky Litavky poblíž objektu zvaného Lopatárna, v obci Jince, ve výšce 335 m n. m (obrázek 21C). Zde je řeka přístupná pouze z pravého břehu, na druhém straně se nachází hustě porostlý svah. Odtud pochází další

pozitivní izolace *P. ×alni* z pletiv dospělého stromu. Tento strom jsme samozřejmě zařadily do výběru a k němu další jeden symptomatický a dva asymptomatické.

#### Lokalita Lochovice

O 3 km dále, v nadmořské výšce 310 m se v obci Lochovice do Litavky vlévá Podlužský potok (obrázek 21D). Zde jsme si dovolily vykročit z hlavního toku do malého bočního ramene. Tam se nachází úzký pruh pobřežního porostu, obklopeného loukou z obou stran. I zde byla v minulosti úspěšná izolace patogena z poměrně silně napadené olše. Tento jedinec byl však jediný symptomatický v této oblasti, proto další tři měření pochází z jedinců asymptomatických.

#### Lokalita Libomyšl

Poslední lokalita se nachází pouhé 4 km dále po proudu, ve výšce 280 m n. m. a zasahuje do obydlené zóny obce Libomyšl (obrázek 21E). Právě zde byly v minulosti markantní prořezy v břehovém porostu z důvodu odumírání stromů. Jedna ze zbývajících olší byla silně symptomatická (téměř odumřelá), další tři stromy se nacházely dále od vody a vyhodnotily jsme je jako asymptomatické.



Obrázek 20: Řeka Litavka (červeně) s vyznačenými lokalitami měření a odběrů vzorků listoví olše lepkavé.



Obrázek 21: Lokality v povodí řeky Litavka s vyznačenými pozicemi jedinců olší lepkavých, na kterých proběhlo ekofyziologické měření vlastností listoví. A) Bohutín, B) Příbram, C) Jince, D) Lochovice, E) Libomyšl.

### 3.4 Metodika měření ekofyziologických parametrů

Přestože se tato práce skládá ze tří výzkumných celků, metodika odběru vzorků a měření byla víceméně jednotná. Hlavním jednotícím prvkem je výběr prvního plně vyvinutého listu z apikálního výhonu semenáče či odebrané větve. Tak bylo zajištěno, že vždy sledujeme aktuální fyziologický stav rostliny. Na listě byla provedena měření fluorescence chlorofylu, relativního obsahu pigmentů a reflektance (v případě prvního experimentu 2022) nebo reflektance s transmitancí (v případě experimentu a výjezdu 2023), následovalo vážení a sušení vzorku.

Důraz byl kladen na to, aby co nejvíce měření probíhalo na listech stále spojených s rostlinou. V prvním laboratorním experimentu takto proběhla všechna měření. Ve druhém laboratorním experimentu byla první změřena fluorescence chlorofylu a relativní obsah pigmentů, až následně byly listy od rostliny odděleny pro měření transmitance v integrační sféře. Při terénním výjezdu jsme z vybraného stromu odebrali jednu osluněnou větev ve výšce zhruba 4-7 metrů za použití teleskopických nůžek Fiskars se speciálním nástavcem vlastní výroby. Na větvi bylo vybráno 5 plně vyvinutých listů, které rovnoměrně pokrývají rozsah osluněnosti v rámci příslušné větve. Na listech stále spojených s větví proběhlo měření fluorescence chlorofylu a relativního obsahu pigmentů. Tytéž listy byly následně označeny a odebrány pro pozdější měření kontaktní sondou.

Závěrečnou fází zpracování odebraných vzorků bylo jejich vážení za čerstva, měření plochy listu, sušení a konečné vážení.

Všechny postupy, dílčí úkony a použité přístroje, se kterými jsem já osobně přišla do kontaktu, popisují v následujících kapitolách.

#### 3.4.1 Měření relativního obsahu fotosyntetických a ochranných pigmentů

Měření relativního obsahu fotosyntetických a ochranných pigmentů v pletivech probíhalo za použití přístroje Multi Pigment Meter (MPM-100, Opti-Sciences, Hudson, NH, USA), který k tomuto přímo určený. Přístroj je přenosný a má velice jednoduchou obsluhu – stačí list sevřít do zabudovaného kolíčku a během pár vteřin vidíme na obrazovce hodnoty chlorofylového, antokyanovového, flavonoidového a dusíkatého indexu.

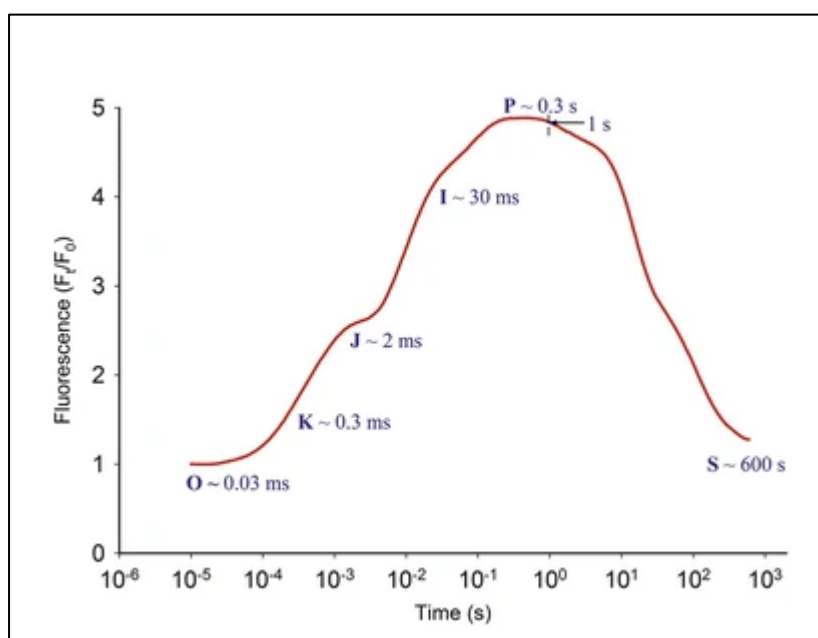
Princip měření stojí na poměru transmitance a fluorescence v určitých vlnových délkách. Chlorofylový index (ChlM) je počítán jako poměr transmitance listu v 850 a 720 nm vlnové délky. Antokyanový index (AnthM) je dekadickým logaritmem intenzity fluorescence při excitaci paprsky o vlnové délce 660 a 525 nm. Totéž platí pro flavonoidový index (FlvM), ovšem při excitaci paprsky 660 a 375 nm vlnové délky. Dodatečným parametrem je tzv. „nitrogen-flavonol index“ (NFI), který je vypočítán jako poměr zjištěných obsahů chlorofylu a flavonoidů (“Multi Pigment Meter,” 2020).

#### 3.4.2 Měření rychlé kinetiky fluorescence chlorofylu

K měření fluorescence primární fotosyntézy jsme použili přístroj FluorPen (PAR-FluorPen FP 110/D) a zatemňovací kolíčky. Tento přístroj umožňuje měřit rozdílné fotosyntetické parametry,

my jsme se však zaměřili jsme se tzv. OJIP parametry, které vypovídají o indukční kinetice chlorofylové fluorescence.

Na vybraný list byl připevněn kolíček se zavřeným stínítkem. Takto byl list ponechán 15-20 minut, což v zatemněné oblasti navodilo adaptaci fotosyntetického aparátu na temnostní podmínky – neboli utlumení fotosyntézy fotochemických procesů. Na buněčné úrovni to znamená, že reakční centra PSII jsou připravena na příjem energie a molekuly specifického páru chlorofylu a na oddělení elektronů. Po opatrném přiložení přístroje a otevření stínítka byl spuštěn záblesk modrého záření o vlnové délce 470 nm a intenzitě  $3\,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Toto je tzv. saturační pulz – tedy záření, které způsobí plné nasycení reakčních center PSII a emisi přebytečné energie v podobě fluorescenčního záření o vlnové délce 665 – 750 nm. Detektor přístroje toto záření zachytí a na základě jeho intenzity vypočítá maximální fluorescenci chlorofylu našeho vzorku (PSI, 2021). Nárůst fluorescence se na OJIP křivce projeví čtyřmi nezaměnitelnými lokálními maximy, které nám poskytují informaci o průběhu fotochemické reakce v listu (obrázek 22).



Obrázek 22: Standardní indukční křivka fluorescence chlorofylu OJIP s hlavními kroky a dobou jejich vzniku (převzato z Ingle et al., 2017).

Výstupem byly dva sady měření: soubor s hodnotami fluorescence po milisekundách (OJIP) pro každý měřený list a soubor již vypočítaných fluorescenčních parametrů. Při analýze dat byly OJIP křivky použity

k identifikaci a eliminaci chybových měření. Z velkého množství získaných fluorescenčních parametrů byly pro další analýzy vybrány pouze takové, které nejlépe odrážejí fyziologický stav rostlin v každém experimentu (tabulka 1).

Fluorescenční parametr	Základní definice
$F_m - F_0$	Poměr mezi max. a min. fluorescencí temnotně adaptovaného listu. Vyjadřuje amplitudu přechodného vzestupu chlorofylové fluorescence.
$M_0$	Přibližná hodnota počátečního sklonu pro křivku relativní proměnné fluorescence.
Area	Maximální plocha mezi křivkou fluorescence a maximální naměřenou fluorescencí.
HACH Area	V manuálu uvedena pouze jako „pro použití výrobce“

<b>Ss</b>	Normalizovaná „Area“ pro jeden obrat plastochinonu.
<b>N</b>	Počet obrátů plastoquinonu mezi PSII a cytochromem b <sub>6</sub> f. Vyjadřuje počet redukci potřebných k dosažení max. fluorescence.
<b>Psio</b>	Účinnost, s jakou excitovaný elektron dojde dále než na plastochinon.
<b>Phi Do</b>	Kvantový výtěžek disipace energie.
<b>Phi Pav</b>	Čas dosažení maximální fluorescence
<b>Pi<sub>ABS</sub></b>	Výkonnostní index zachování energie fotonů do momentu redukce akceptoru.
<b>ABS/RC</b>	Tok fotonů absorbovaných fotosyntetickými pigmenty v přepočtu na počet reakčních center.
<b>TR<sub>0</sub>/RC</b>	Energetický tok, který je zachován jako volná energie pro primární fotochemické reakci v čase 0, přepočteno na počet reakčních center.
<b>ET<sub>0</sub>/RC</b>	Elektronový transport vedoucí k fixaci CO <sub>2</sub> v čase 0, přepočteno na počet reakčních center.
<b>DI<sub>0</sub>/RC</b>	Tok disipované excitační energie v čase nula v přepočtu na počet reakčních center.

Tabulka 1: Seznam vybraných fluorescenčních parametrů se základními definicemi jejich významu. Převzato z a upraveno podle (Bussotti et al., 2020; Strasser et al., 2000; Tropiano, 2021)

### 3.4.3 Měření spektrálních vlastností listů

Měření spektrálních vlastností listů probíhalo dvěma různými způsoby. Vždy byl použit spektrometr značky ASD FieldSpec 4 Wide-Res, ovšem s připojením rozdílných nástavců. V prvním laboratorním experimentu v roce 2022 jsem společně s kolegy z Fakulty lesnické a dřevařské měřila reflektanci listů za použití kontaktní sondy s nástavcem „leaf clip“. Kontaktní sonda byla použita z důvodu efektivnějšího měření vysokého počtu hodnocených rostlin a také proto, že nástavec „leaf clip“ umožňuje měření přímo na rostlině bez oddělení listu. Ve druhém laboratorním experimentu v roce 2023 jsem za pomoci kolegů z Laboratoře ekofyziologie rostlin měřila reflektanci a transmitanci listů s použitím integrační sféry ASD RTS-3ZC (Malvern Panalytical, USA).

Při výběru listů určených k měření byl, stejně jako v předchozích případech, dodržen jednotný postup. Měření bylo provedeno na prvním plně vyvinutém listu od apikálního výhonu semenáče. V případě terénního výjezdu jsme měřili pět plně vyvinutých listů, které pokryly rozptýl osluněnosti v rámci odebrané větve. Vždy se jednalo o jedno měření na list.

Při použití kontaktní sondy proběhlo měření na rostlinách vyňatých z komor, ale na listu stále spojeném s rostlinou. Při měření integrační sférou v laboratoři musel být list z rostliny oddělen, ale stalo se tak ještě v komoře. Na tomto listu bylo ještě před oddělením od rostliny provedeno měření fluorescence chlorofylu (FluorPen) a obsahu pigmentů (MPM-100). Vzorok odebrané při terénním výjezdu byly v integrační sféře změřeny až po návratu do laboratoře. Do té doby byly uchovány v označených pytlících v chladícím boxe.

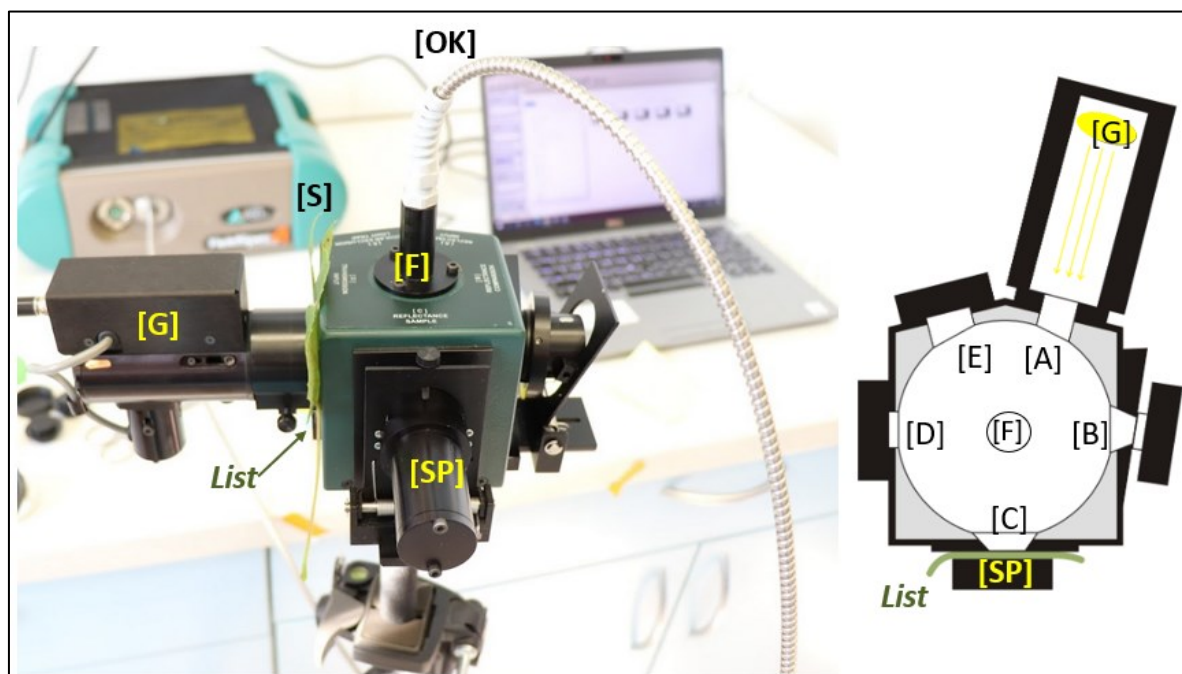
Přístoj ASD FieldSpec 4 Wide-Res detekuje záření v rozmezí vlnových délek 350 – 2500 nm, čímž pokrývá viditelné (VIS), blízké červené (NIR) i krátkovlnné infračervené (SWIR)

spektrum. Na optický kabel vycházející z přístroje mohou být napojeny různé nástavce. Pro účely této práce byla zvolena kontaktní sonda pro měření reflektance vzorku, později nahrazena integrační sférou měřící reflektanci a transmitanci.

Před zahájením každého setu měření je doporučeno spektrometr nejprve zahřát po dobu přibližně 30 minut. Takto bylo vždy učiněno. Následně byl napojen příslušný nástavec a přístroj byl připojen k počítači. Vlastní měření se skládá z několika kroků: optimalizace, záznam odrazivosti bílé reference a sběr spektrálních dat vzorku. Optimalizace přizpůsobuje senzitivitu detektorů na dané světelné podmínky a provádí se pouze jednou, pokud světelné podmínky prostředí zůstávají stejné po celou dobu měření. Bílá reference je měření reflektance bílého kalibračního panelu a provádí se opakovaně, v intervalu zhruba 15 minut. Sběr spektrálních dat se liší podle použitého nástavce.

Kontaktní sonda + leaf clip: Optimalizace probíhá otočením leaf-clip nástavce na bílou stranu svorky. Stejným způsobem se měří i bílá reference. Pro vlastní měření vzorku musí být svorka obrácena na černou stranu, která se stává pozadím měřeného listu. Aby bylo minimalizováno rušivé záření a měření byla co nejpřesnější, v pravidelných intervalech po 15 měření byla změřena bílá reference.

Integrační sféra: Integrační sféra ASD RTS-3ZC je dutá koule z vysoce odrazivého materiálu v celém spektrálním rozsahu 350-2500 nm v robustním těle s několika vstupními porty, do kterých je možno podle účelu měření připojit světlený zdroj, bílý referenční panel nebo vzorek (obrázek 23). Zdroj záření s wolframovou žárovkou poskytuje kolimované záření (rovnoběžné paprsky) o



Obrázek 23: Vpravo – integrační sféra v nastavení pro měření propustnosti listu. [G] zdroj záření, [S] spektroradiometr, [OK] optický kabel, [SP] světelná past, [F] port pro optický kabel. Vlevo - schématické znázornění sféry shora v nastavení pro měření odrazivosti. [A-E] vstupní porty sféry, [G] zdroj záření, [F] horní port pro optický kabel ke spektroradiometru. Foto L. Červená, schéma poskytnuto školitelkou.

spektrálním složení podobném záření slunečnímu. Před měřením je též třeba provést optimalizaci na dané světelné podmínky, a to v konfiguraci, kdy všechny porty sféry jsou umístěny bílé panely či záslepky. Při měření odrazivosti je vzorek v pozici naproti zdroji záření, záření od něj odražené je integrováno přes polokouli sféry a snímáno optickým kabelem. Za list je připevněna světelná past, která absorbuje záření listem procházející. Při měření propustnosti je nutné změnit pozici zdroje světla tak, aby záření procházelo přes tunel a vzorek do integrační sféry. Pro každé nastavení sféry (měření odrazivosti i propustnosti) je třeba provést měření bílé reference (do portů se umístí bílé referenční panely podobně jako při optimalizaci). Snímání bílé reference je prováděno vždy pro 2-3 po sobě měřené vzorky listů.

#### 3.4.4 Měření obsahu vody

Po úspěšném změření všech optických a fluorescenčních parametrů byly odebrané listy zváženy a označeny. Následně byly usušeny v sušárně alespoň 48 hodin při 60°C do konstantní hmotnosti a opět zváženy. Dosazením hodnot (v gramech) do následujícího vzorce jsem získala obsah vody, kterou daný list v momentě měření obsahoval:

$$1 - (\text{suchá hmotnost} / \text{čerstvá hmotnost})$$

Takto byly zpracovány všechny odebrané vzorky z terénního výjezdu 2023 a většina měřených listů z doplňujícího laboratorního experimentu 2023. V průběhu hlavního laboratorního experimentu byly také některé listy podrobeny první části tohoto procesu, ovšem suché hmotnosti nebyly z časových důvodů zpracovány.

#### 3.4.5 Měření specifické listové hmotnosti (LMA)

Morfologický index *Leaf Mass per Area* (zkrácené LMA; v českém překladu specifická listová hmotnost) se vypočítá na základě poměru suché hmotnosti (v gramech) a plochy listu (v metrech čtverečních).

Plocha listu byla měřena za čerstva, obvykle po prvním vážení. Byla k tomu použita mobilní aplikace LeafByte (Zoe & Abigail Getman-Pickering, USA, verze 1.3.0, Oct 9, 2019), přímo určená k měření plochy listů, kdy list je vyfotografován na bílém pozadí mezi čtyřmi kontrastními body o známé vzdálenosti. Plocha listu je oddělena od pozadí na základě prahování a dle vzdálenosti kalibračních bodů aplikace vypočte plochu objektu.

### 3.5 Analýza dat

Analýza všech sesbíraných dat probíhala v aplikaci RStudio za použití programu R 4.3.3.

Nejprve byla na třech datových souborech (relativní obsahy pigmentů, fluorescenční parametry, optické vlastnosti listoví) provedena analýza hlavních komponent (PCA) pro zjištění, zda vzorce ve variabilitě dat korespondují s některými vybranými faktory experimentálního ošetření (inokulace *P. alni*, genetický původ olše, koncentrace CO<sub>2</sub>, sterilita substrátu či viditelné symptomy na stromech z terénu). Na základě PCA byly také vybrány fluorescenční parametry pro další hodnocení a to takové, které přispívaly k hlavním komponentám variability.



Dále byly porovnávány rozdíly ve funkčních, fluorescenčních a optických vlastnostech listoví podle faktorů v experimentech. Pro testování normality rozložení hodnot jsem použila Shapiro test. Normálně rozložená data byla dále analyzována parametrickými testy: ANOVA nebo Studentův t-test. Data, která neměla normální rozložení, byla analyzována neparametrickými testy: Wilcoxonův test či Kruskalův-Wallisův test. Hladina významnosti  $\alpha$  byla pro všechna měření stanovena na 0,05.

Pro vyhodnocení efektu více fixních a náhodných faktorů a jejich interakcí (inokulace *P. alni*, genetický původ olše, koncentrace CO<sub>2</sub>, čas) byl použit model ASReml, což je lineární model operující na principu „restricted maximum likelihood“, který zároveň umožňuje modelovat data pocházející z tzv. mixed-effect designu – tedy náhodné i fixní faktory zároveň. Hladina významnosti  $\alpha$  byla i zde stanovena na 0,05.

Při zpracování dat byly použity následující knihovny: asreml, data.table, dplyr, dunn.test, factoextra, FactoMineR, ggfortify, ggplot2, RColorBrewer.

Při analýze dat z terénního výjezdu 2023 jsem pracovala s průměrnými hodnotami na strom. Dataset se skládal ze dvou kategorických vysvětlujících proměnných. Tou první je míra napadení stromu ve dvou úrovních: asymptomatický a symptomatický jedinec. Tou druhou je lokalita na řece Litavka, kde se strom nacházel – Bohutín, Příbram, Jince, Lochovice, Libomyšl; tedy pět úrovní, řazeno ve směru po proudu. Tyto dvě vysvětlující proměnné musely být analyzovány vždy samostatně, jelikož pro analýzu interakce jsme neměli dostatek vzorků (málo stromů na lokalitu). Počet rezponzivních kontinuálních proměnných byl na základě analýzy hlavních komponent zredukován vybrané fluorescenční parametry, které měly výrazný vliv na rozložení hodnot (graf 13, 14, 15).

## 4 Výsledky

V této části práce věcně hodnotím data a nastiňuji výsledky, jež vyplynuly z jejich grafického a analytického zpracování. Podrobně rozebírám oba laboratorní experimenty a jedno terénní pozorování, vždy v ohledu na použitou metodu sběru dat (tedy přístroj MPM – pigmenty, FluorPen – fluorescenční parametry, ASD FieldSpec - optické vlastnosti a biofyzikální měření). Na doporučení kolegů z ČZU byla měření z komorových experimentů hodnocena pomocí linerárních mixovaných modelů v programu ASReml.

### 4.1 Hlavní komorový experiment 2022

Hlavní komorový experiment se konal v roce 2022 na 192 jedincích olše lepkavé (*Alnus glutinosa*), jež byli pěstováni v růstových komorách PSI. Předmětem zkoumání byly tři hlavní faktory: inokulace substrátu kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*, provenience olší (česká či norská) a koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře (415 ppm a 830 ppm). Fyziologický stav rostlin byl sledován z listoví za pomoci měření relativního obsahu pigmentů, fluorescenčních parametrů a optických vlastností (reflektance). Z časových důvodů v této práci neuvádím výsledky optických měření, ale budou součástí dalších publikací.

Primárním cílem práce bylo identifikovat fyziologické parametry listoví, do nichž se promítne nákaza patogenem *P. ×alni*. Sekundárně jsme se zajímali o způsob, jak do vztahu strom-patogen zasáhne faktor provenience a koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší.

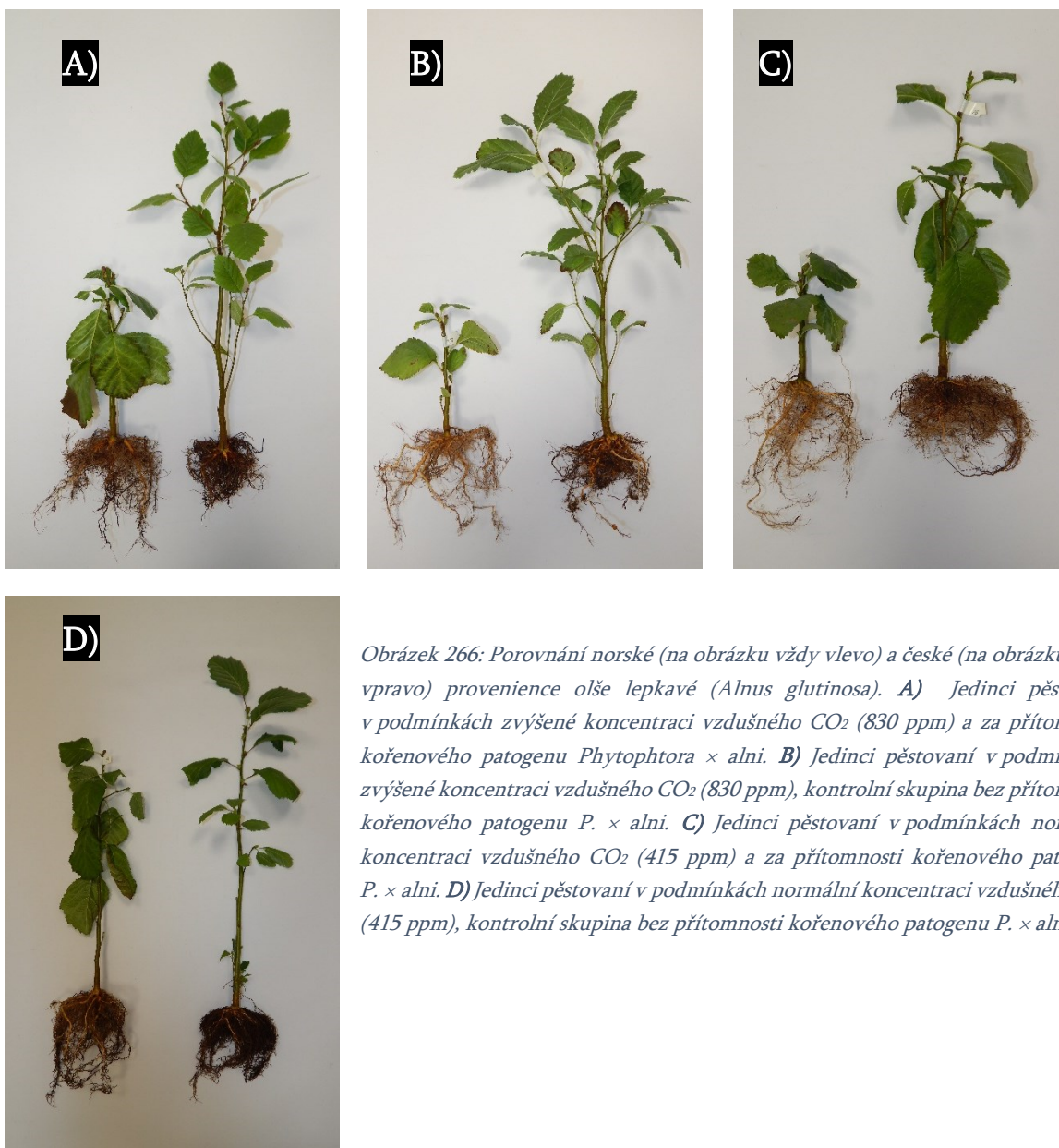
Po ukončení experimentu Ing. Markéta Macháčová provedla reizolace *P. ×alni* z kořenů olší a výsledky ukazují, že úspěšnost infekce byla 62,5 % (36 z 96 inokulovaných sazenic mělo negativní reizolace). Makroskopické symptomy nákazy (léze, chloróza, defoliace) se však neprojevily na žádném z inokulovaných jedinců. Až po rozebrání kořenového balu byly patrné nekrózy kořenového systému u některých infikovaných jedinců (obrázek 24, 25 a 26).



Obrázek 244: Kořenový bal a krček kmene dvou jedinců olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) s pozitivní reizolací *P. ×alni*. Šipka ukazuje na lézi kořenového krčku. Fotografie: Ing. Markéta Macháčová.



Obrázek 255: Kořenový bal dvou jedinců olše lepkavé (*Alnus glutinosa*). Jedinec vlevo pochází ze skupiny inokulované patogenem *P. × alni*, ovšem reisolace patogena zde byla negativní. Jedinec vpravo je z kontrolní skupiny, bez kontaktu s patogenem. Fotografie: Ing. Markéta Macháčová.

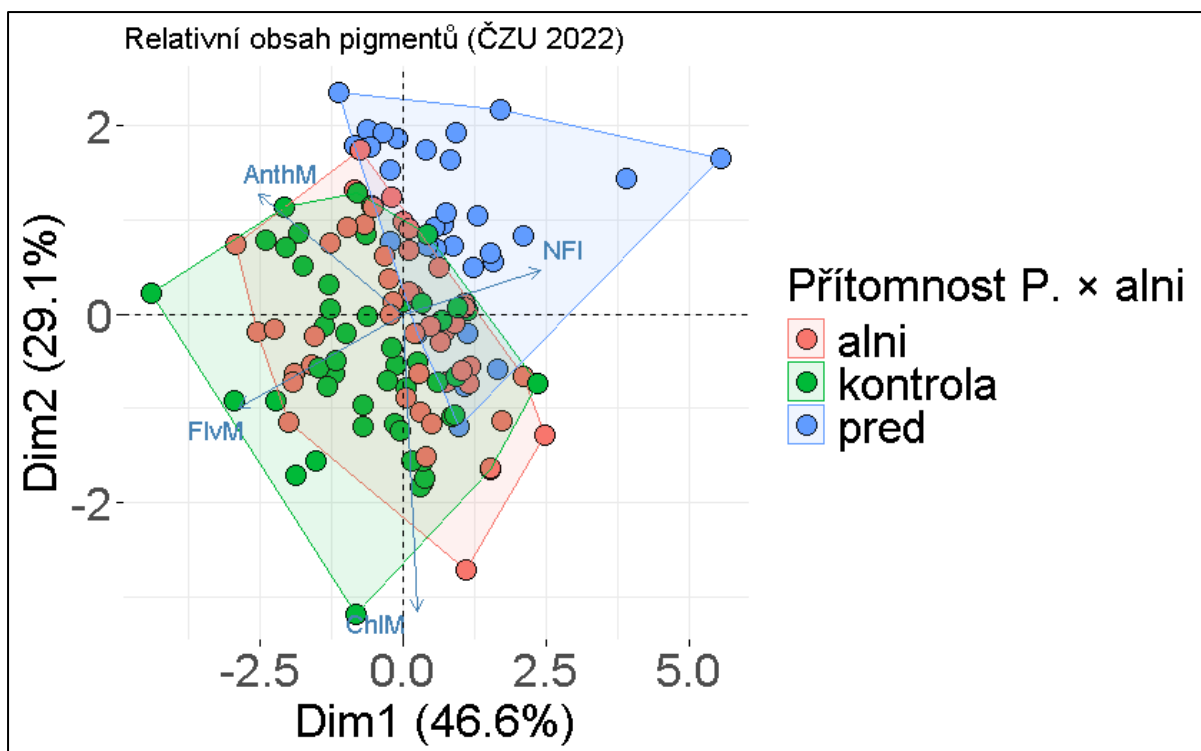


Obrázek 266: Porovnání norské (na obrázku vždy vlevo) a české (na obrázku vždy vpravo) provenience olše lepkavé (*Alnus glutinosa*). **A)** Jedinci pěstovaní v podmínkách zvýšené koncentraci vzdušného  $\text{CO}_2$  (830 ppm) a za přítomnosti kořenového patogenu *Phytophthora × alni*. **B)** Jedinci pěstovaní v podmínkách zvýšené koncentraci vzdušného  $\text{CO}_2$  (830 ppm), kontrolní skupina bez přítomnosti kořenového patogenu *P. × alni*. **C)** Jedinci pěstovaní v podmínkách normální koncentraci vzdušného  $\text{CO}_2$  (415 ppm) a za přítomnosti kořenového patogenu *P. × alni*. **D)** Jedinci pěstovaní v podmínkách normální koncentraci vzdušného  $\text{CO}_2$  (415 ppm), kontrolní skupina bez přítomnosti kořenového patogenu *P. × alni*.

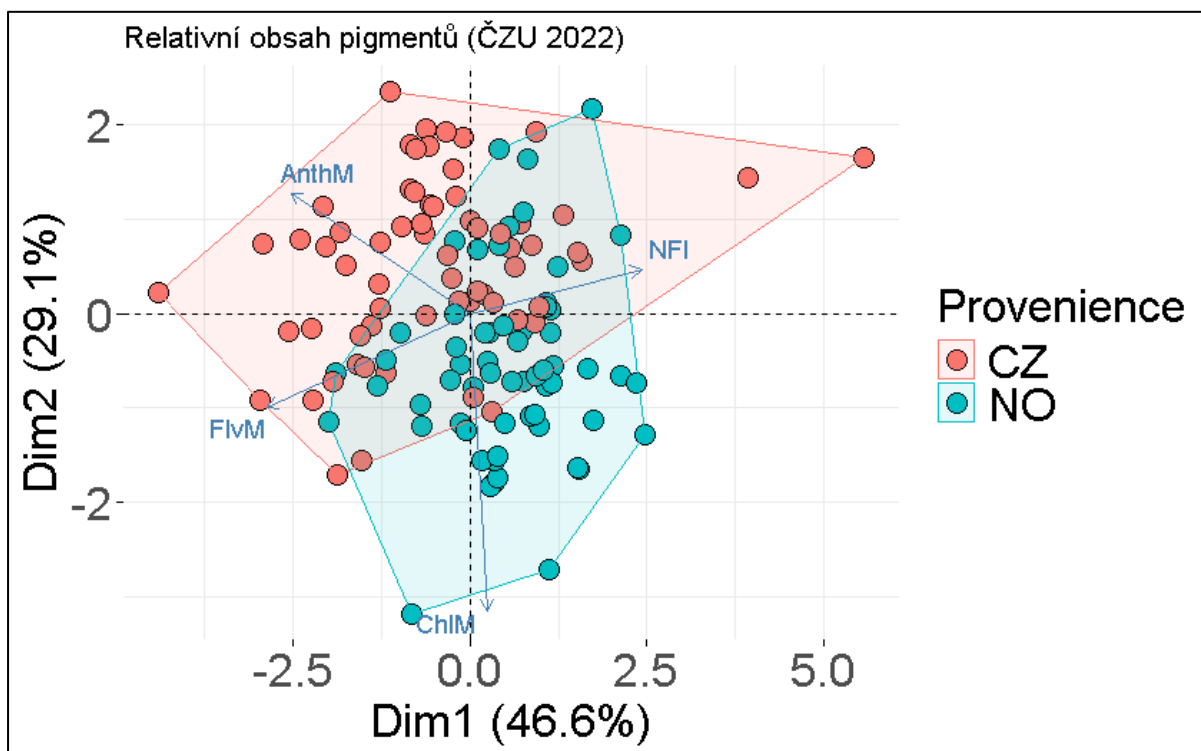
#### 4.1.1 Relativní obsah fotosyntetických a ochranných pigmentů

Za použití přístroje MPM byl měřen obsah čtyř parametrů listových pigmentů: relativní obsah chlorofylů (ChlM), anthokyanů (AnthM), flavonoidů (FlvM) a dusík-flavonolový index (NFI).

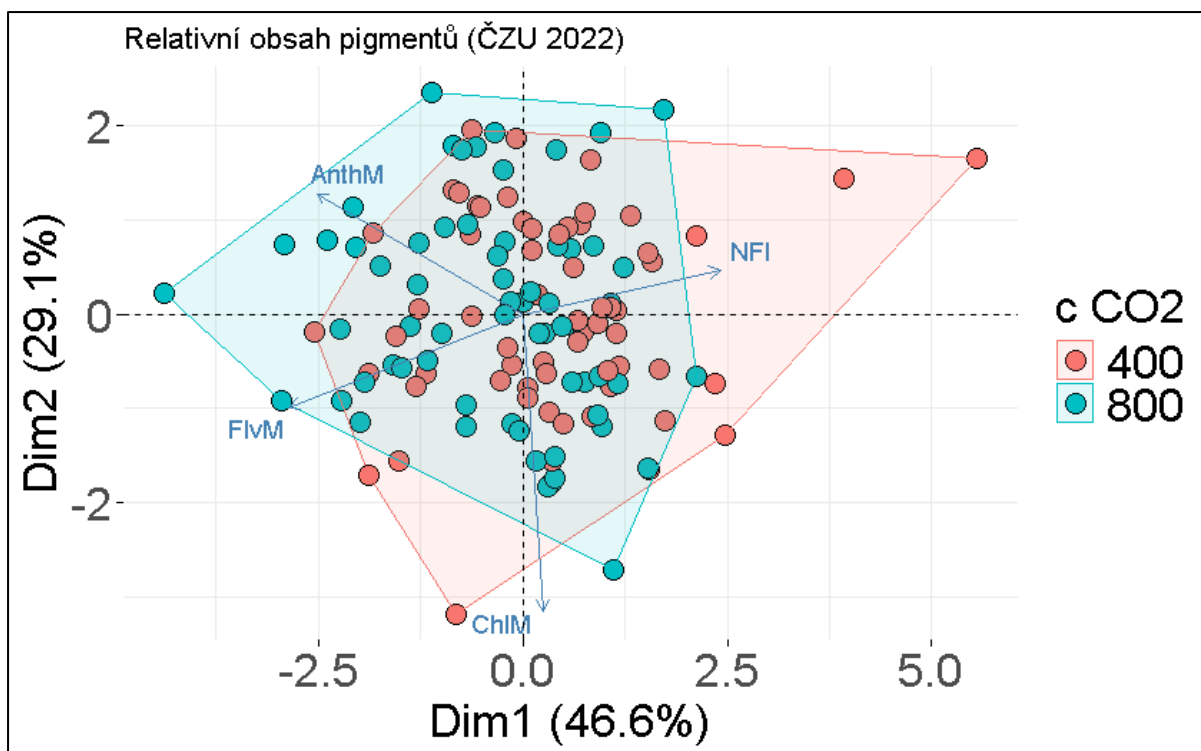
Prvotní analýza hlavních komponent pro jednotlivé faktory nastínila poměrně slibné výsledky, co se týče rozdílů v obsahu pigmentů v listech mezi jedinci před a po inokulaci patogenem. Jasný rozdíl se projevil v listech všech olší ještě před inokulací patogenem oproti inokulovaným i kontrolním jedincům. V pozdější fázi experimentu, tedy po inokulaci *P. × alni*, již rozdíl mezi kontrolou a patogenem ošetřenými rostlinami není tak zjevný (graf 1). I přes důsledný výběr listů ve stejné vývojové fázi není možné vyloučit vliv ontogeneze na obsahy pigmentů. Částečný překryv shluků vykazují i hodnoty pigmentů v kontextu provenience, přesto je zde patrný rozdíl, který ukazuje na obsah anthokyanů a chlorofylů jako hlavní ukazatele podmiňující trend k rozdílům mezi proveniencemi (graf 2). V případě faktoru koncentrace CO<sub>2</sub> se shluky bodů odpovídající obsahu pigmentů v listoví u obou ošetření téměř překrývá (graf 3). Pro úplnost jsem do analýzy hlavních komponent zařadila i datum měření jako faktor, protože tento graf nám umožňuje sledovat celkový vývoj všech hodnocených rostlin v čase a potažmo v interpretacích zohlednit faktor růstu a dospívání semenáčů (graf 4). Pozice shluků bodů odpovídajících měření v jednotlivých datech naznačují zejména akumulaci flavonoidů, případně chlorofylu.



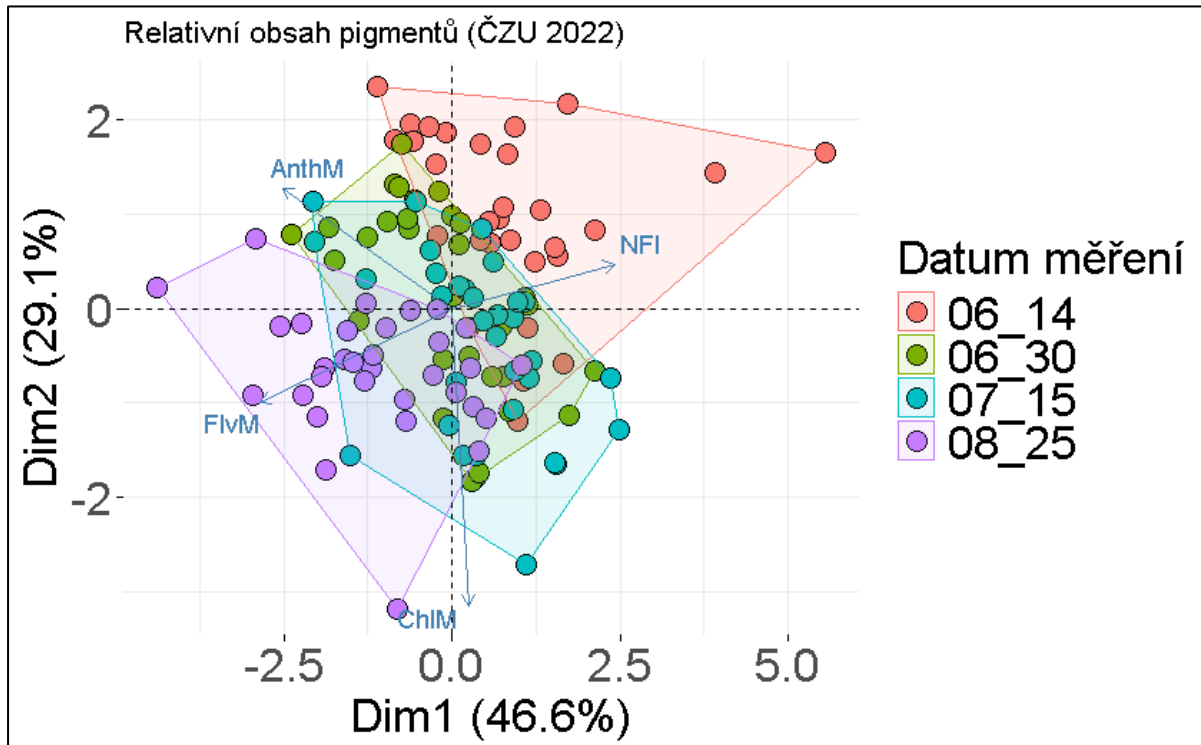
Graf 1: Analýza hlavních komponent pro parametry relativního obsahu pigmentů v listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k přítomnosti kořenového patogena *Phytophthora* × alni (všechny rostliny před inokulací: modře; rostliny s kontrolním inokulem bez patogena: zeleně; rostliny s inokulem obsahujícím *P. × alni*: červeně).



Graf 2: Analýza hlavních komponent pro parametry relativního obsahu pigmentů v listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k provenienci jedinců (česká provenience: červeně; norská provenience: modře).

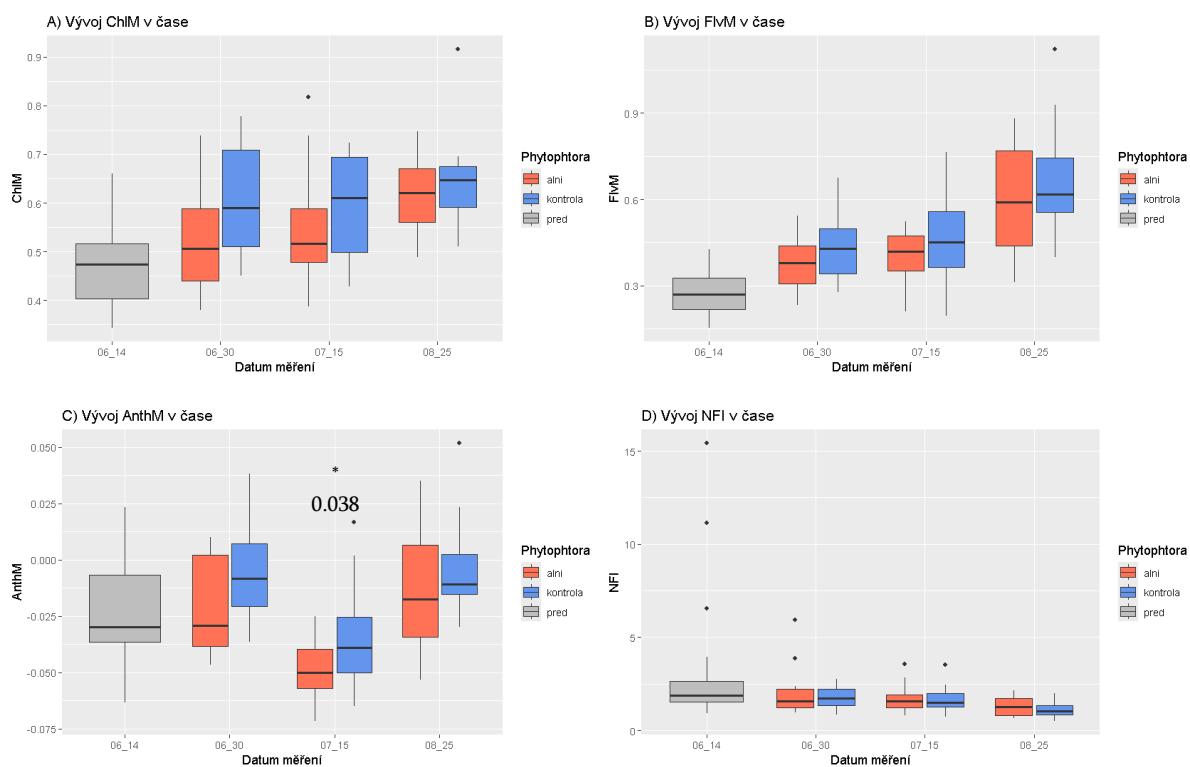


Graf 3: Analýza hlavních komponent pro parametry relativního obsahu pigmentů v listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke koncentraci CO<sub>2</sub> v atmosféře růstové komory (400 ppm: červeně; 800 ppm: modře).



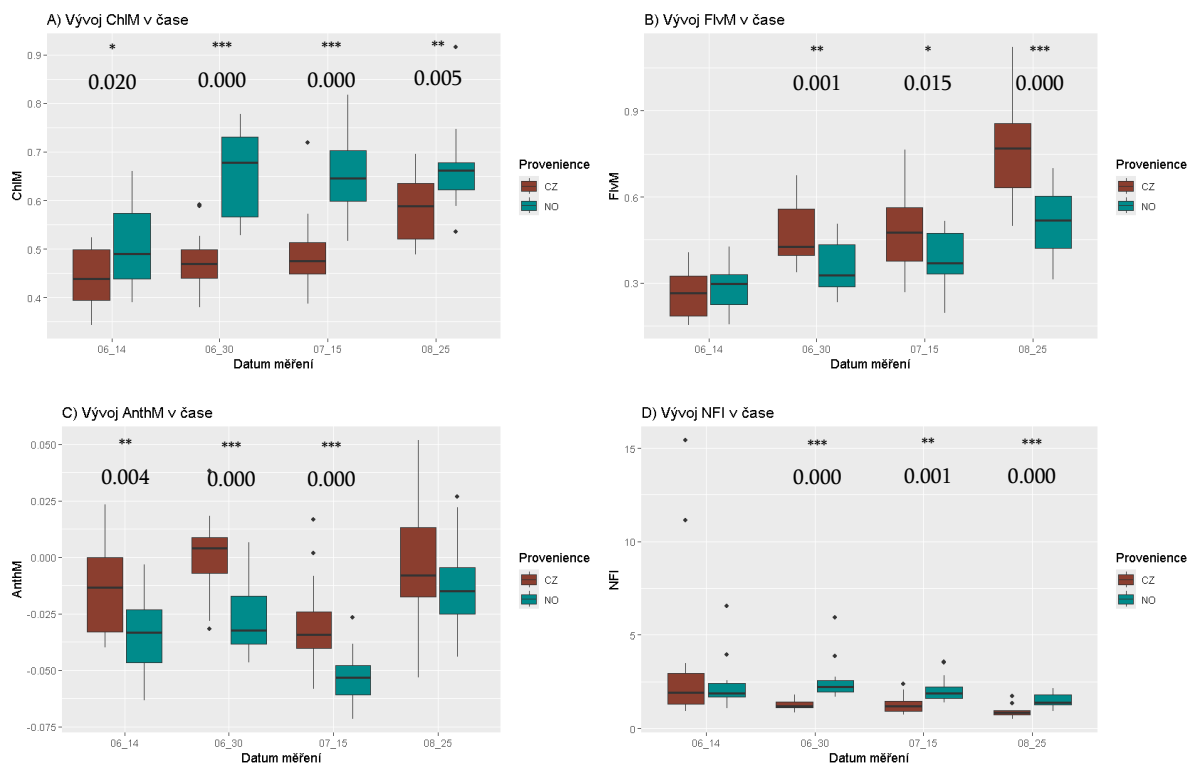
Graf 4: Analýza hlavních komponent pro parametry relativního obsahu pigmentů v listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k datumu měření (14. června – před inokulací: červeně; 30. června: zeleně; 15. července: modře; 25. srpna: fialově).

Následná analýza jednotlivých parametrů se zabývala jejich vývojem v čase ve vztahu vždy k jednomu faktoru. Ošetření patogenem *P. ×alni* přineslo celkem jeden signifikantní rozdíl, a to v parametru AnthM v datu měření 15. července (tedy čtvrtý týden po inokulaci; p-hodnota 0.038; soubor grafů 1C). Z dat je patrný náznak trendu nárůstu průměrného obsahu ChlM a FlvM v čase (soubor grafů 1A a 1B) a naopak pokles NFI (soubor grafů 1D).



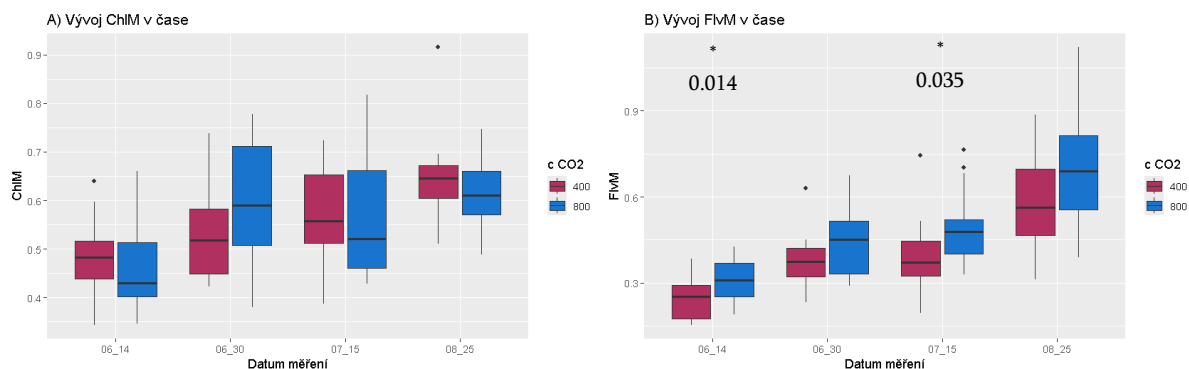
Soubor grafů 1: Porovnání středových tendencí parametrů relativního obsahu pigmentů v listech olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k přítomnosti kořenového patogena *Phytophthora ×alni* (všechny rostliny před inokulací: šedě; rostliny s kontrolním inokulem bez patogena: modře; rostliny s inokulem obsahujícím *P. ×alni*: červeně). Inokulace byla provedena 20. června. Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl v ošetření signifikantní ( $< 0,05$ , *t*-test), *p*-hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí.

Mnohem zajímavější výsledky přineslo testování rozdílů mezi hladinami pigmentových parametrů pro faktor provenience. Česká provenience měla signifikantně vyšší hodnoty flavonoidů a anthokyanů (soubor grafů 2B a 2C), zatímco norská provenience vykazuje vyšší obsah chlorofylů a hodnot NFI (soubor grafů 2A a 2D). Stejně jako v předchozím případě, z dat vyplývá náznak trendu nárůstu obsahu ChlM a FlvM v čase (soubor grafů 2A a 2B) a naopak pokles NFI (soubor grafů 2D).

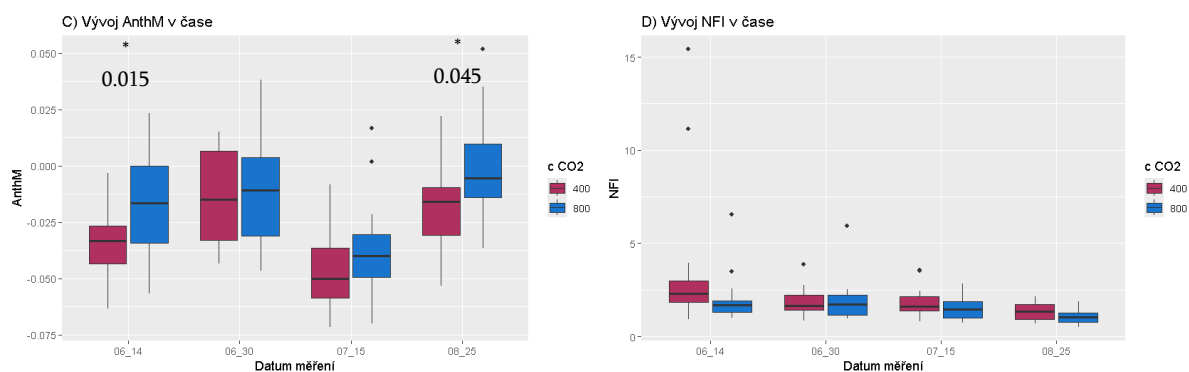


Soubor grafů 2: Porovnání středových tendencí parametrů relativního obsahu pigmentů v listech olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k jejich provenienci (provenience česká: hnědě; provenience norská: zeleně). Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl v provenienci signifikantní ( $< 0,05$ ),  $p$ -hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí.

Hodnocení vlivu koncentrace atmosférického  $\text{CO}_2$  v prostředí růstových komor na obsah listových pigmentů nepřineslo mnoho pozitivních výsledků. Celkem se projevil signifikantní rozdíl u dvou parametrů ve třech časových bodech: obsah FlvM byl průkazně vyšší u rostlin pěstovaných při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  před inokulací a 4 týdny po inokulaci (soubor grafů 3B). Obsah AnthM byl též vyšší u rostlin pěstovaných při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  před inokulací a 9 týdnů po inokulaci (soubor grafů 3C). Z dat je patrný trend nárůstu obsahu FlvM v čase (soubor grafů 3B).







Soubor grafů 3: Porovnání středových tendencí parametrů relativního obsahu pigmentů v listech olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k koncentraci vzdušného CO<sub>2</sub> v prostředí růstových komor (koncentrace 400 ppm: fialové; koncentrace 800 ppm: modře). Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl v koncentraci CO<sub>2</sub> signifikantní (< 0,05), p-hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí.

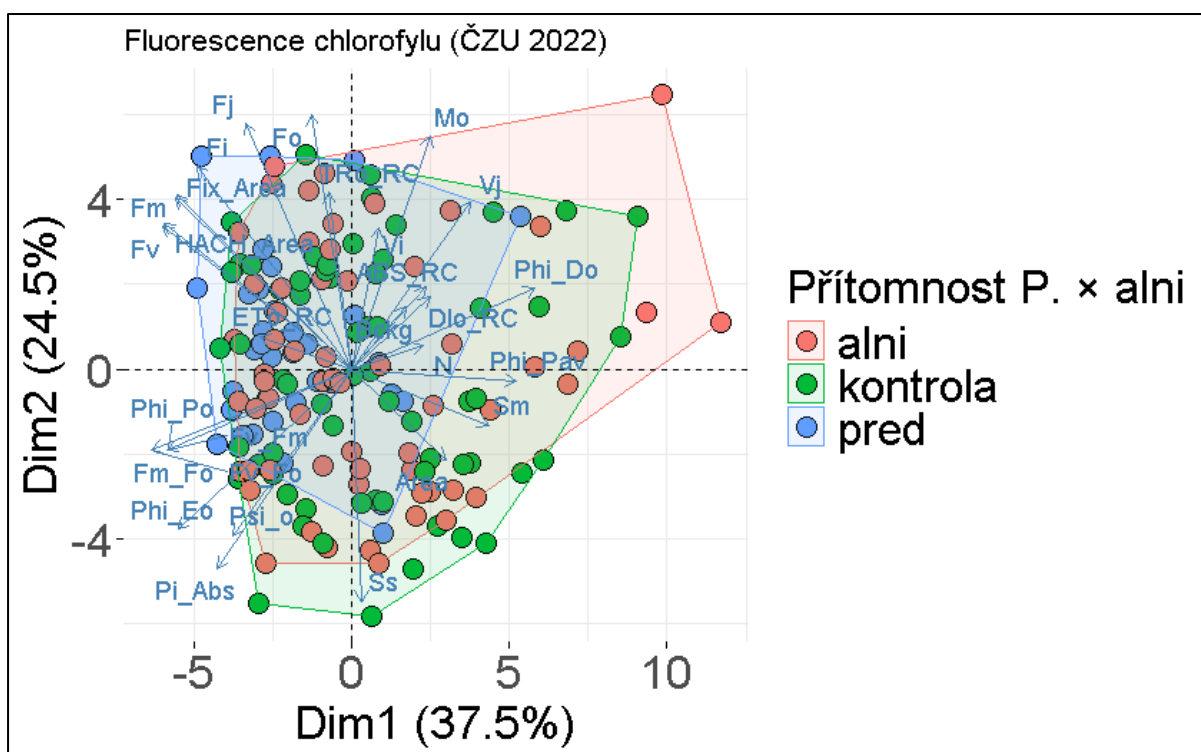
Další analýza za použití lineárního mixovaného modelu ASReml potvrdila vysoce průkazný efekt provenience, nikoliv však zásadní rozdíly mezi ošetřením patogenem *P. ×alni*, a to ani v kombinaci s dalšími faktory. Dle očekávání, faktor koncentrace atmosférického CO<sub>2</sub> v prostředí komor nepřinesl téměř žádný efekt na obsah pigmentů v listovní olší lepkavých. Signifikance efektu jednotlivých faktorů a jejich interakcí jsou obsaženy v tabulce 2.

	phyto	prov	CO2	phyto:prov	phyto:CO2	prov:CO2	phyto:prov:CO2
<b>06_14</b>							
ChlM		<b>0.017</b>	ns			ns	
FlvM		ns	ns			ns	
AnthM		<b>0.001</b>	ns			ns	
NFI		ns	ns			ns	
<b>06_30</b>							
ChlM	<b>0.024</b>	<b>0.000</b>	<b>0.045</b>	ns	ns	ns	ns
FlvM	ns	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
AnthM	<b>0.008</b>	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
NFI	ns	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>07_15</b>							
ChlM	ns	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
FlvM	ns	<b>0.001</b>	ns	ns	ns	ns	ns
AnthM	<b>0.007</b>	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
NFI	ns	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>08_25</b>							
ChlM	ns	<b>0.009</b>	ns	ns	ns	ns	ns
FlvM	<b>0.036</b>	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	<b>0.016</b>	ns
AnthM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NFI	<b>0.030</b>	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns

Tabulka 2: Signifikantní p-hodnoty modelu ASReml pro parametry relativního obsahu pigmentů v listech olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k faktorům „phyto“ – přítomnost *P. ×alni* v substrátu (ano / ne), „prov“ – provenience (česká / norská), „CO2“ – koncentrace vzdušného CO<sub>2</sub> (400 / 800 ppm) a všem jejich interakcím. Tabulka je rozdělena na úseky podle data měření. Nesignifikantní výsledky (p-hodnota > 0,05) jsou označeny zkratkou „ns“.

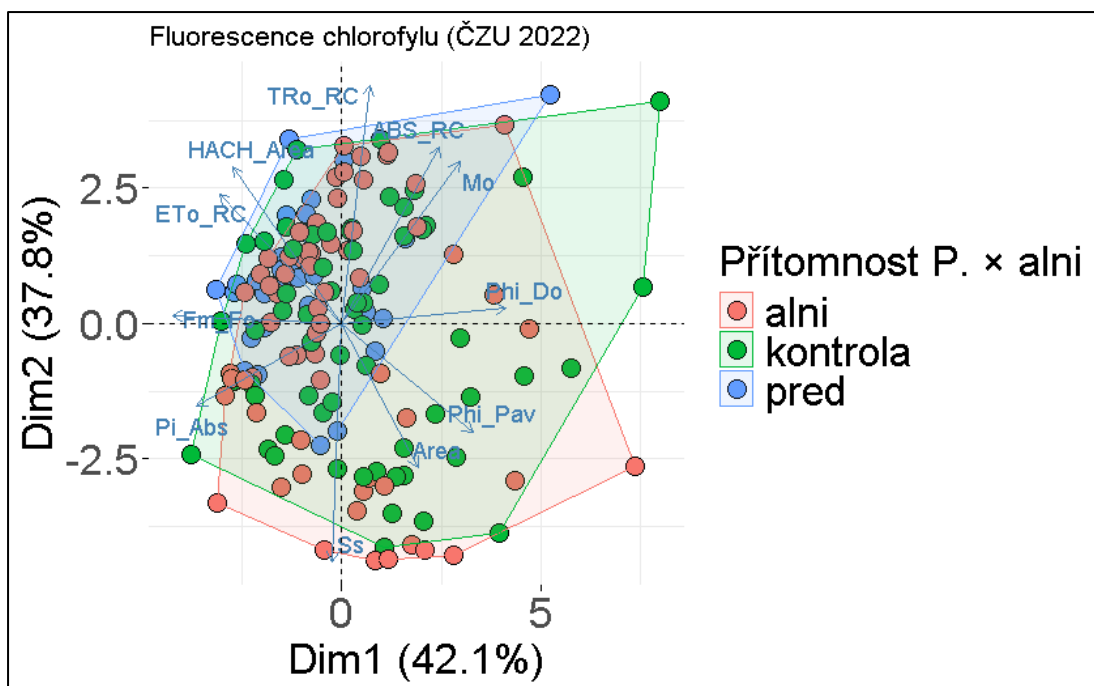
#### 4.1.2 Fluorescenční parametry

Přístroj FluorPen vypočítá velké množství fluorescenčních parametrů při každém měření. Z praktických důvodů jsem na základě analýzy hlavních komponent vybrala takové parametry, které mají největší potenciál být fyziologickými ukazateli vztahu, který nás v této práci zajímal především. V grafu 5 pro faktor přítomnosti *P. ×alni* jsem ze shluků parametrů, jejichž vektory mají stejný směr, vybrala vždy jeden zástupný parametr (graf 6). Tyto vybrané parametry byly nadále analyzovány. Z analýzy hlavních komponent pro všechny fluorescenční parametry nevyplývaly výrazné rozdíly mezi rostlinami před inokulací, kontrolou a inokulovanými rostlinami.

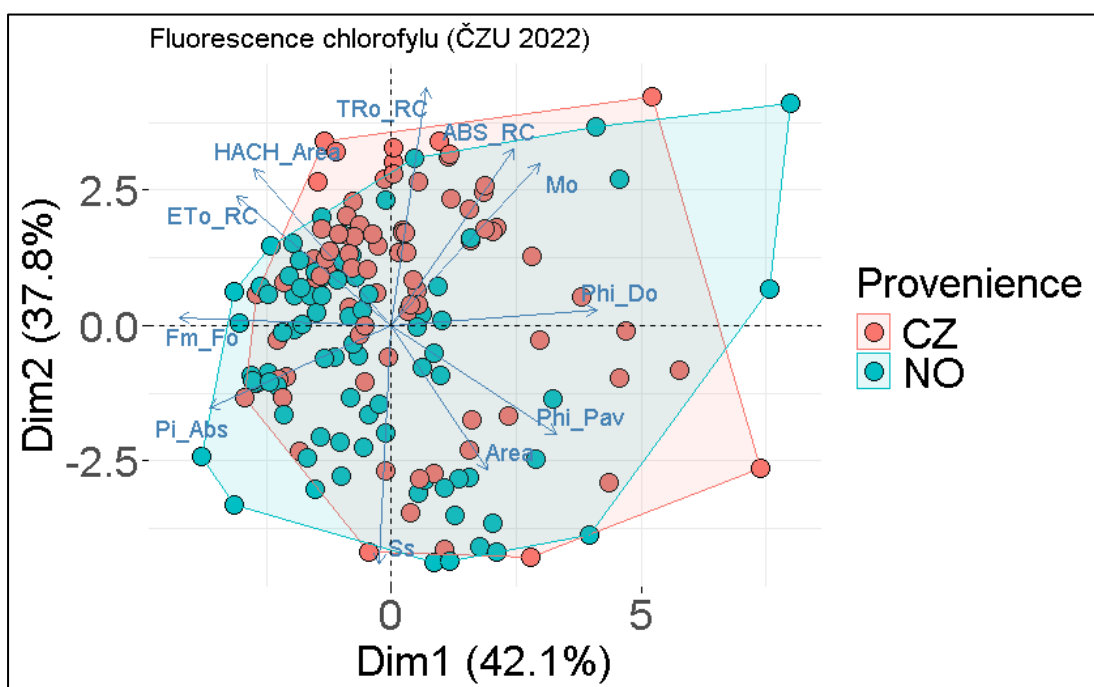


Graf 5: Kompletní analýza hlavních komponent všech fluorescenčních parametrů pro listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k přítomnosti kořenového patogeny *Phytophthora ×alni* (všechny rostliny před inokulací: modře; rostliny s kontrolním inokulem bez patogeny: zeleně; rostliny s inokulem obsahujícím *P. ×alni*: červeně).

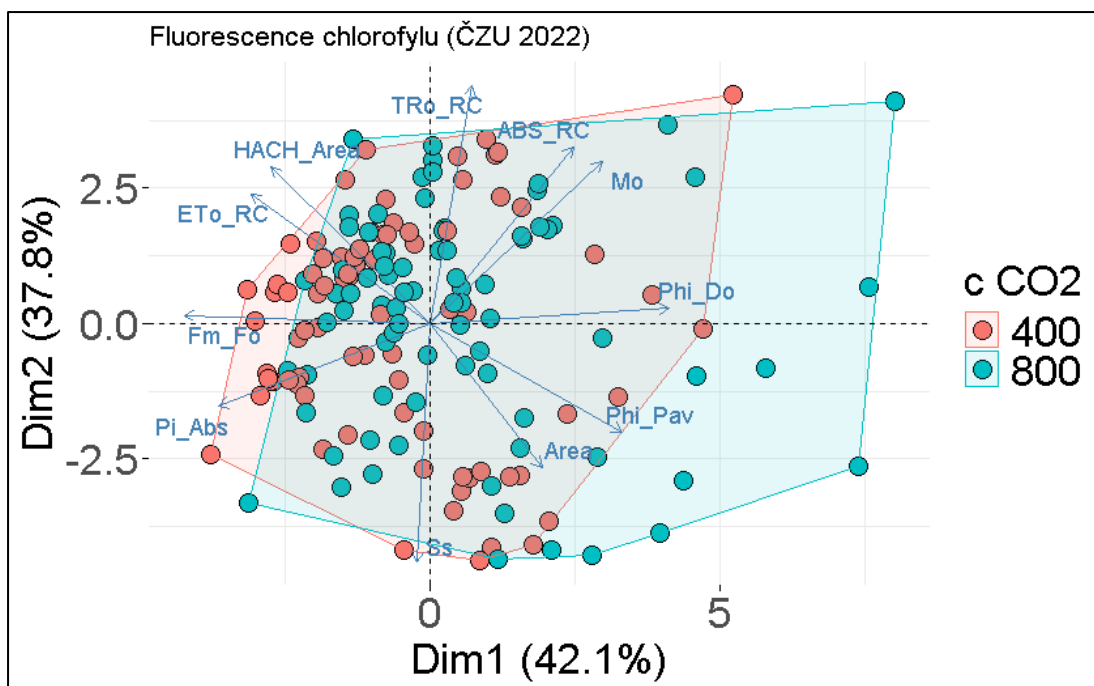
Analýza hlavních komponent na zúženém výběru fluorescenčních parametrů pro faktor přítomnosti *P. ×alni* ilustruje téměř neexistující rozdíl mezi stromy kontrolními a inokulovanými z pohledu fluorescenčních parametrů (graf 6). Pouze hodnoty měřené před inokulací vykazují nižší rozptýlení v porovnání s měřeními po inokulaci. Absence jasněho shlukování platí pro faktory provenience (graf 7) a koncentrace atmosférického CO<sub>2</sub> (graf 8). Rozmístění pozorování pro hladiny obou faktorů jsou téměř shodné a z větší části se překrývají. Na základě těchto zjištění nelze očekávat mnoho průkazných výsledků, co se týče použití fluorescenčních parametrů k detekci napadení olší *P. ×alni*. Zajímavý výsledek nastínil graf analýzy hlavních komponent pro všechny rostliny, zobrazující posun jejich fluorescenčních parametrů v čase (graf 9). Na tom je viditelný výrazný posun hodnot v poslední den měření, tedy 25. srpna, oproti všem předchozím měřením (před i po inokulaci), která se víceméně překrývají.



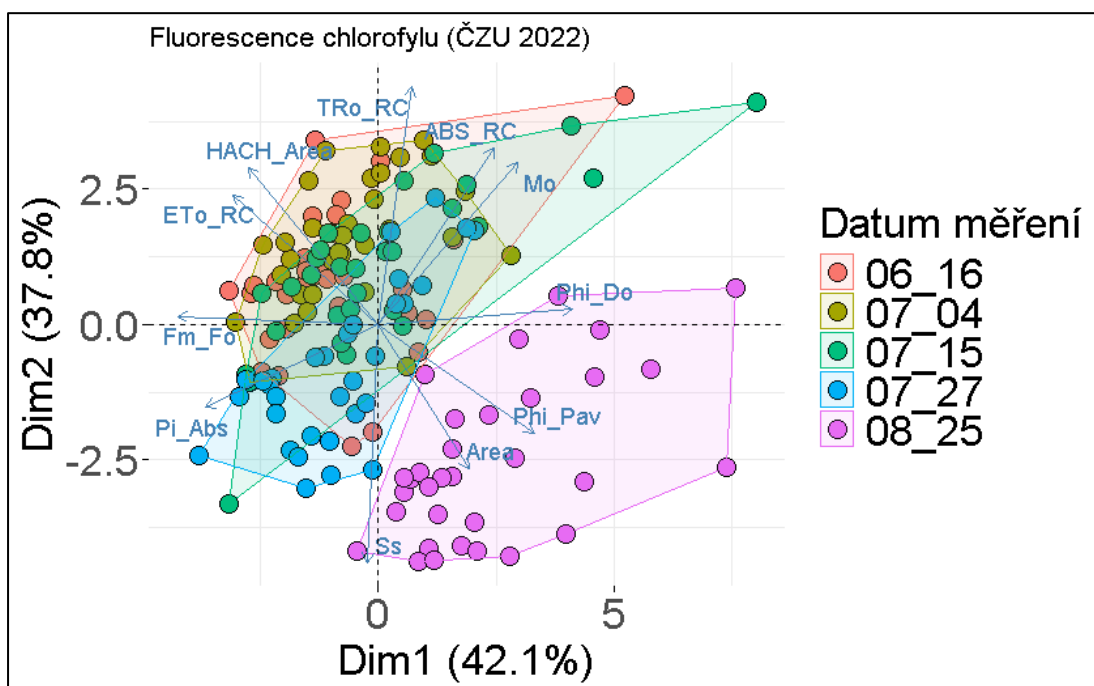
Graf 6: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních parametrů pro listoví olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k přítomnosti kořenového patogena *Phytophthora* × alni (všechny rostliny před inokulací: modře; rostliny s kontrolním inokulem bez patogena: zeleně; rostliny s inokulem obsahujícím *P. × alni*: červeně).



Graf 7: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních parametrů pro listoví olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k provenienci (provenience česká: červeně; provenience norská: modře).



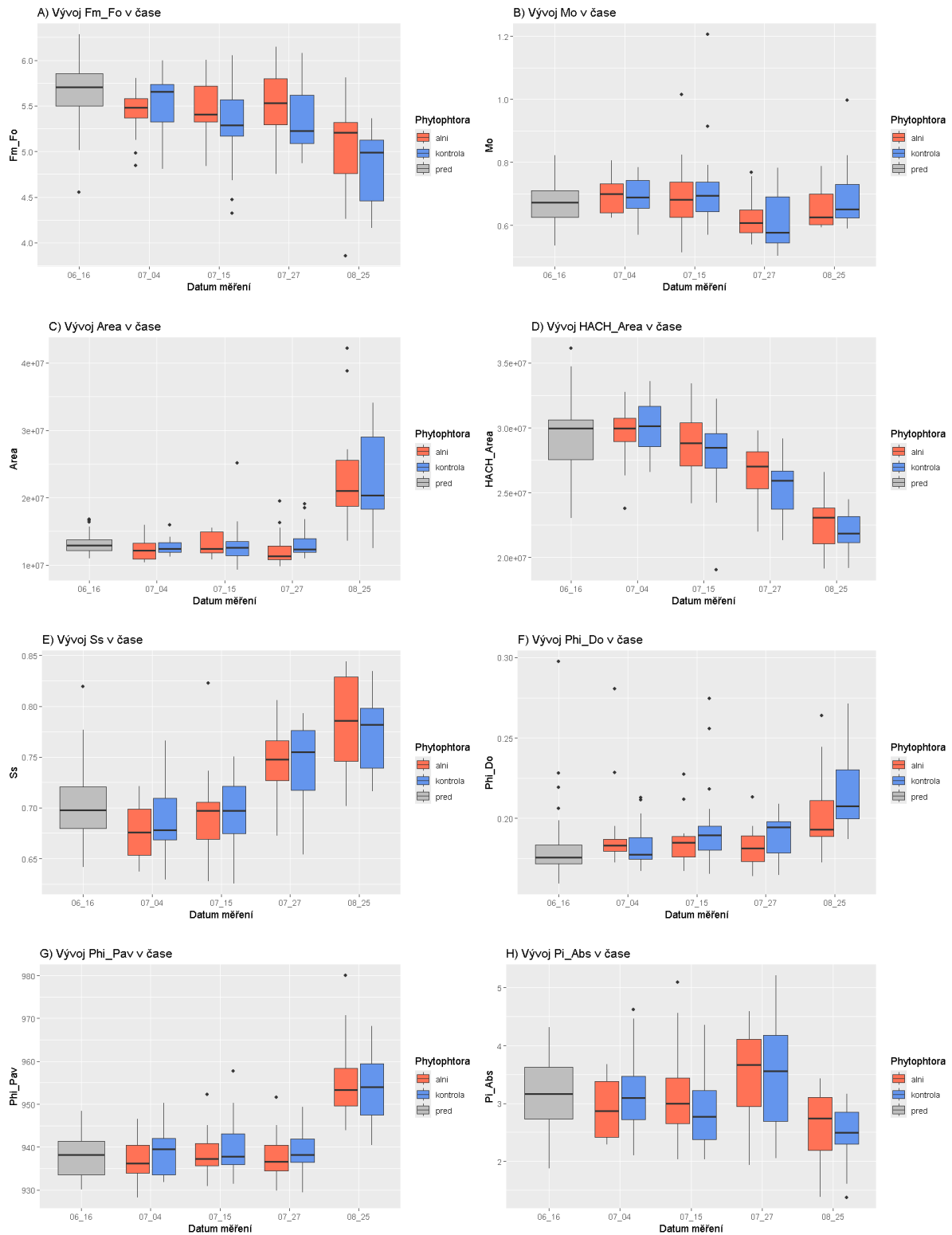
Graf 8: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních parametrů pro listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke koncentraci atmosférického CO<sub>2</sub> v prostředí růstových komor (400 ppm CO<sub>2</sub>: červeně; 800 ppm CO<sub>2</sub>: modře).

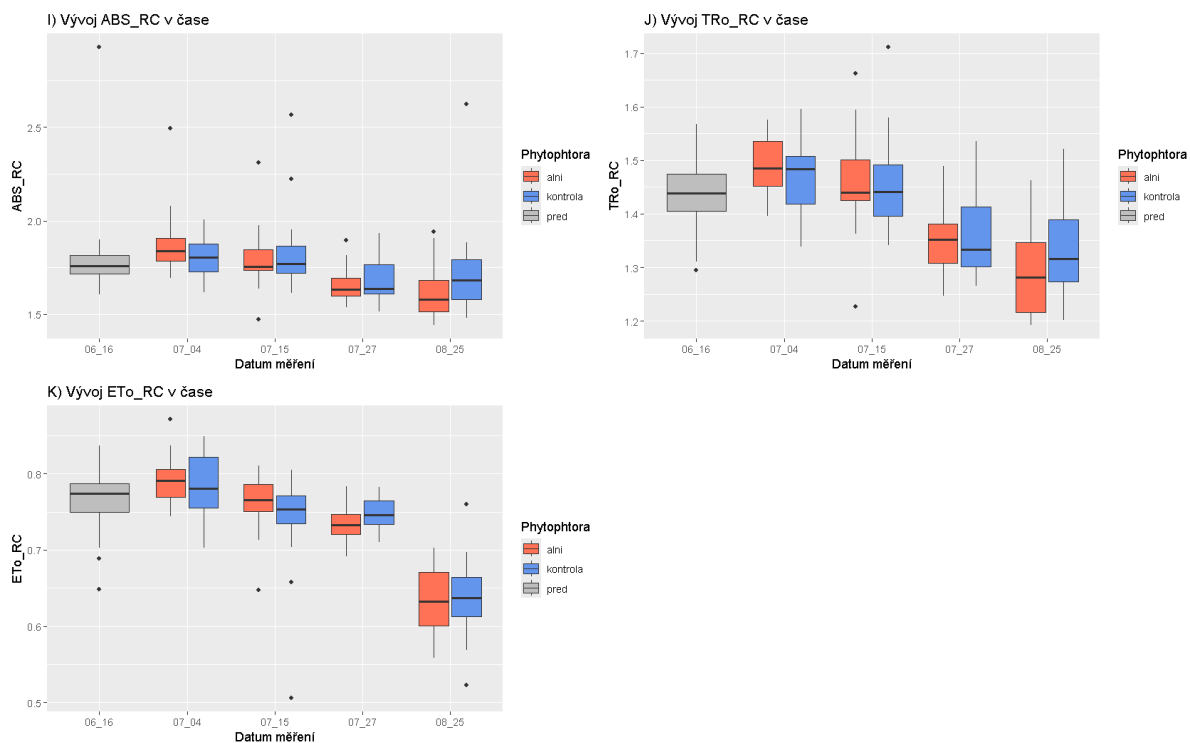


Graf 9: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních parametrů pro listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k datumu měření (16. června – před inokulací: červeně; 4. července: žlutě; 15. července: zeleně; 27. července: modře; 25. srpna: fialově).

Každý vybraný fluorescenční parametr byl dále podrobněji testován na rozdíl mezi hladinami pro každý faktor v každém datu měření.

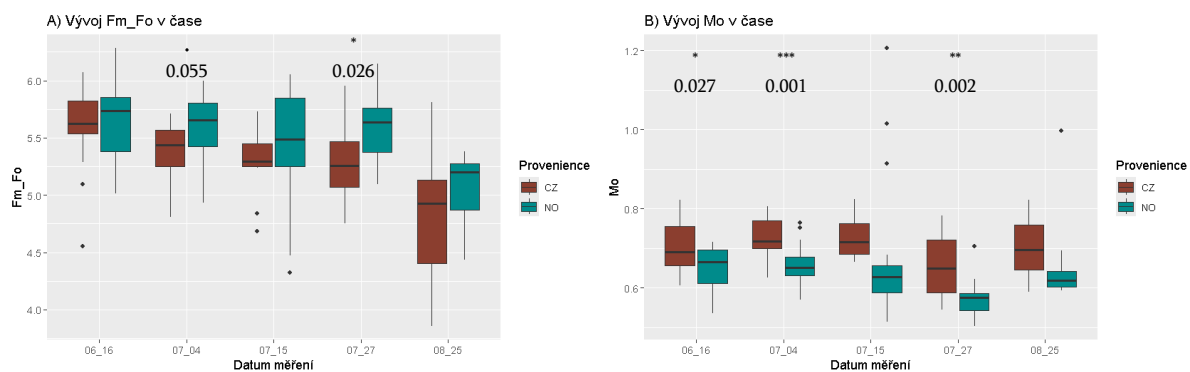
Hodnocení faktoru přítomnosti *P. ×alni* nepřineslo žádný signifikantní rozdíl mezi hladinami žádného fluorescenčního parametru (soubor grafů 4). V některých parametrech byl patrný jistý trend nárůstu nebo poklesu hodnot v čase (např. soubor grafů 4D, 4E, 4J, 4K), nikdy se však ode sebe nelišilo ošetření patogenem a kontroly.

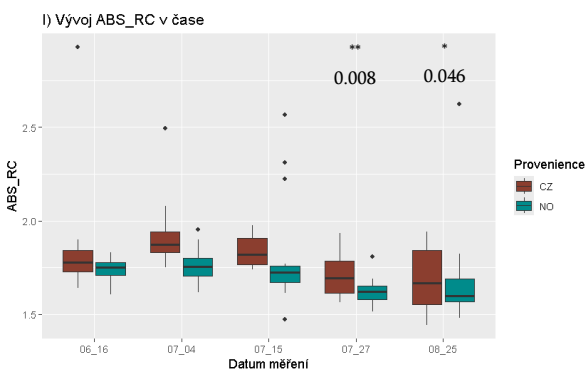
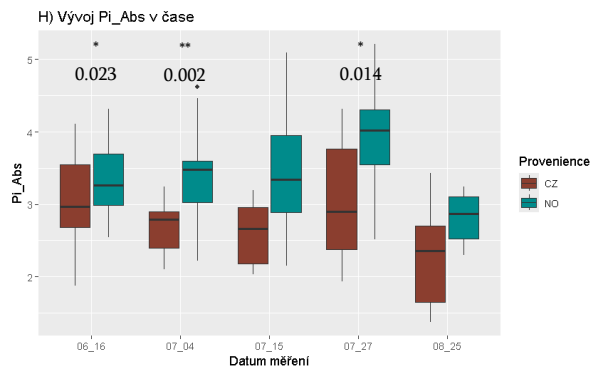
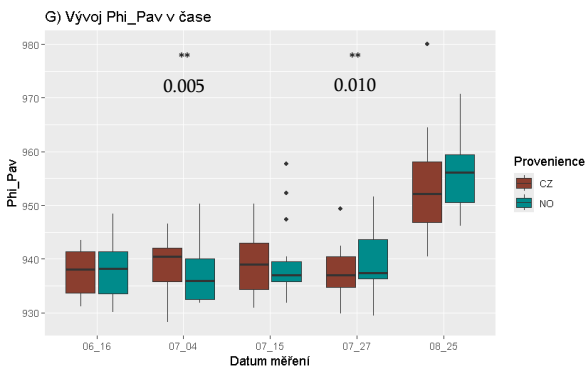
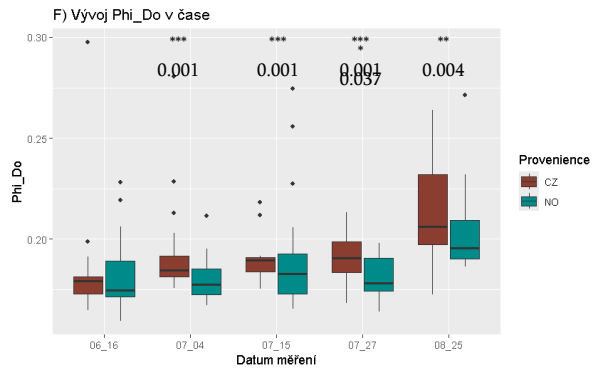
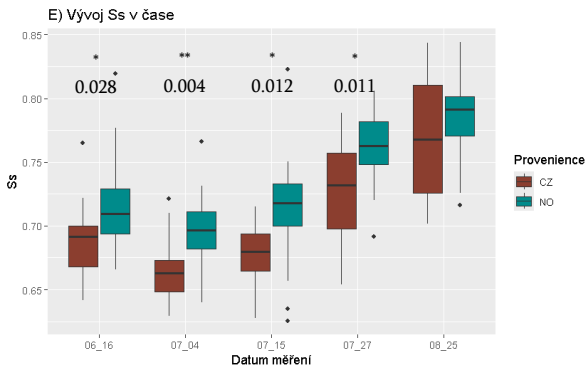
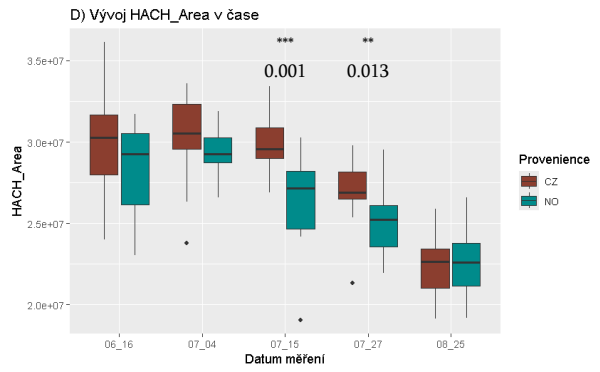
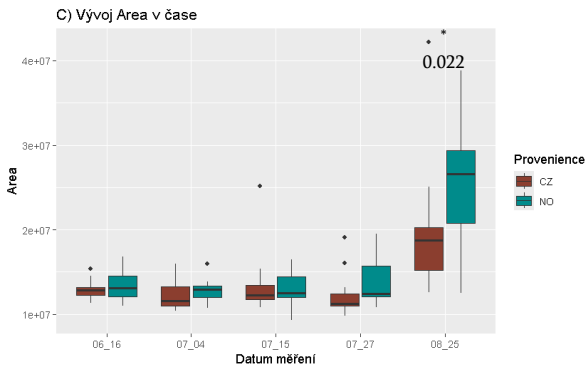




Soubor grafů 4: Porovnání středových tendencí fluorescenčních parametrů pro listy olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k přítomnosti kořenového patogena *Phytophthora* × alni (všechny rostliny před inokulací: šedě; rostliny s kontrolním inokulem bez patogena: modře; rostliny s inokulem obsahujícím *P.* × alni: červeně). Inokulace byla provedena 20. června. Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl v ošetření signifikantní ( $< 0,05$ ),  $p$ -hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí (zde nic).

Oproti tomu faktor provenience vykazuje řadu signifikantních rozdílů u mnoha fluorescenčních parametrů, často hned v několika datech měření (soubor grafů 5). Mezi nejlepší ukazatele rozdílu mezi českou a norskou proveniencí patří parametry  $Pi_{Abs}$ ,  $Mo$ ,  $SS$  a  $HACH\_Area$  (soubor grafů 5H, 5B, 5E, 5D). Především  $Pi_{Abs}$  ukazuje poměrně konstantní navyšování rozdílu mezi proveniencemi v čase. Fyziologické interpretace výše zmíněných parametrů jsou popsány v diskuzi. Kromě signifikantních rozdílů, téměř všechny vybrané fluorescenční parametry ukazují jistý trend vývoje v čase – negativní i pozitivní.

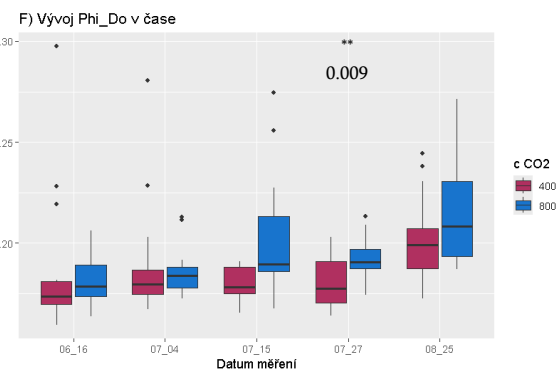
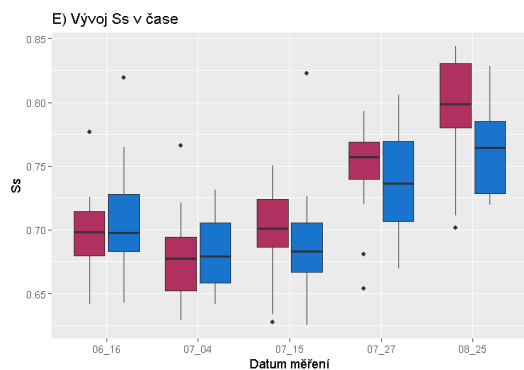
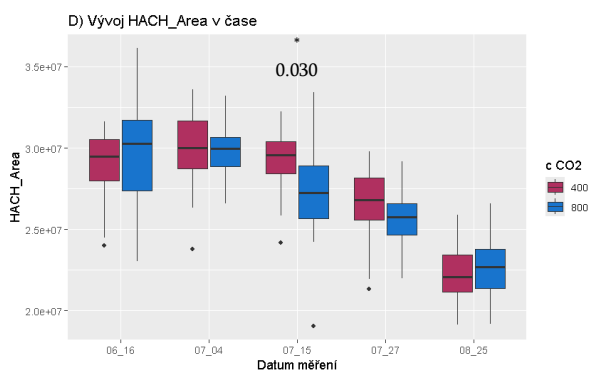
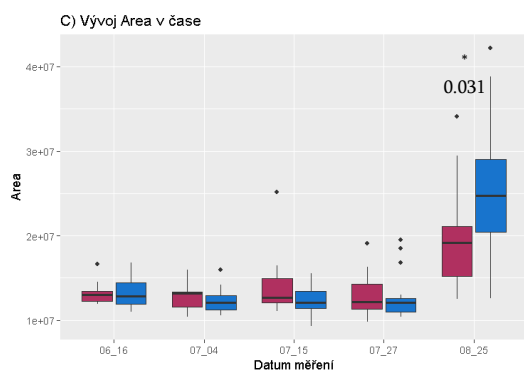
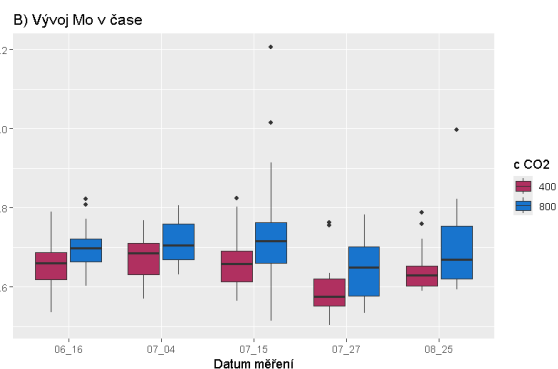
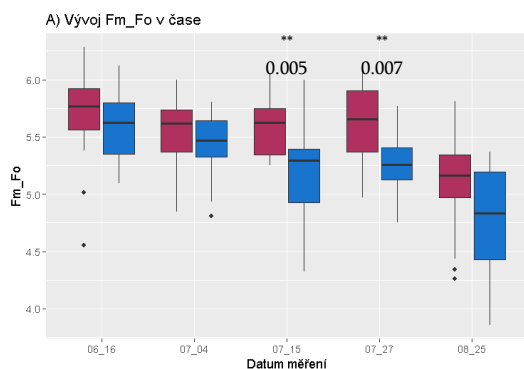




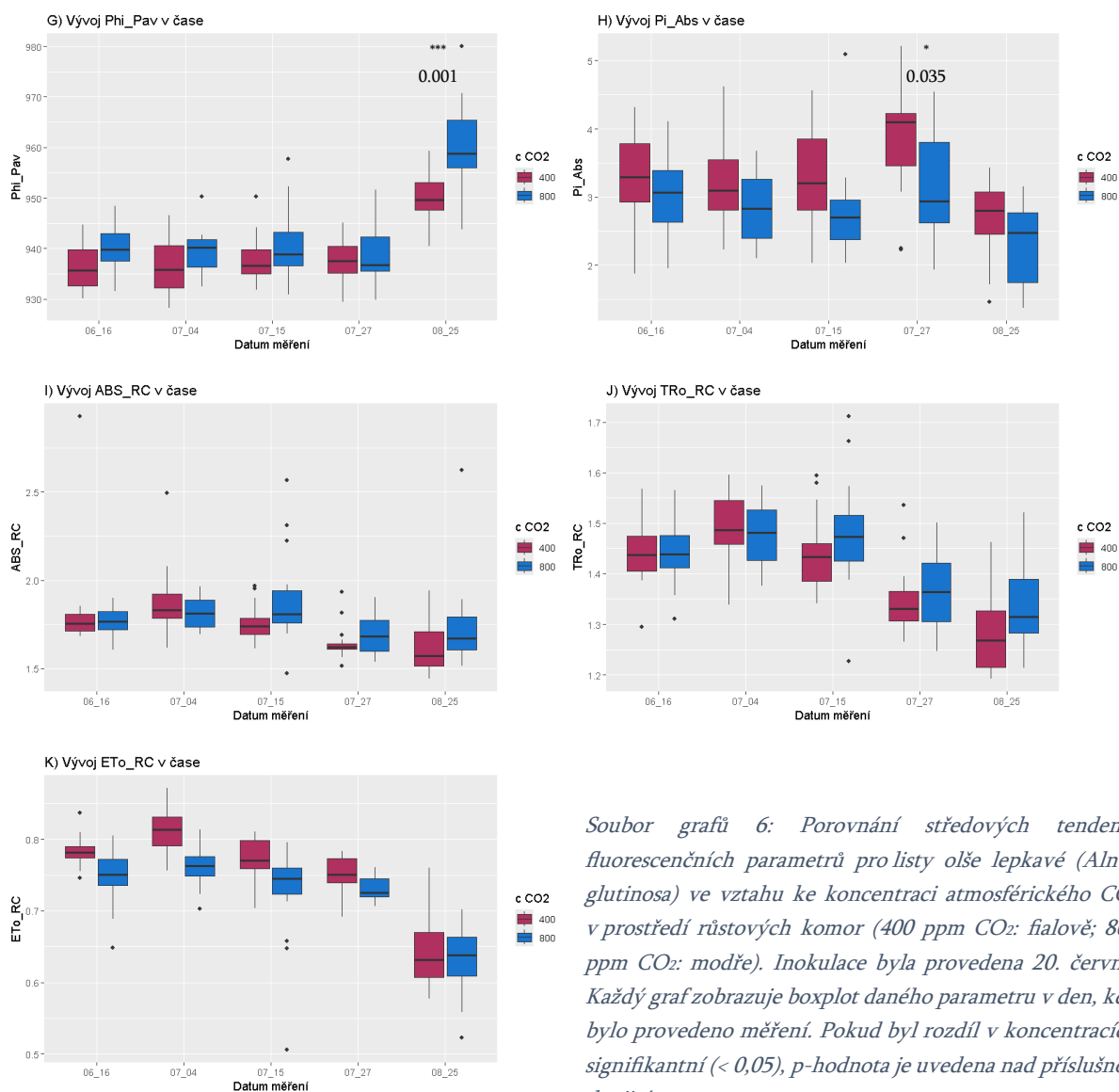


Soubor grafů 5: Porovnání středových tendencí fluorescenčních parametrů pro listy olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k provenienci (provenience česká: hnědě; provenience norská: zeleně). Inokulace byla provedena 20. června. Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl v provenienci signifikantní ( $< 0,05$ ),  $p$ -hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí.

Faktor koncentrace oxidu uhličitého v prostředí růstové komory vykazuje pouze sporadické signifikantní rozdíly v příslušných parametrech a datech měření (soubor grafů 6). Pouze parametr ETo\_RC vykazuje konzistentně vyšší hodnoty pro rostliny pěstované při 400 ppm oproti 800 ppm CO<sub>2</sub> (soubor grafů 6K). Většina parametrů naznačuje trend vývoje v posledních dvou až třech měřeních, kde shodně dochází k velkému posunu oproti předchozím hodnotám (ovšem bez ohledu na případný rozdíl ve faktoru koncentrace CO<sub>2</sub>).







Soubor grafů 6: Porovnání středových tendencí fluorescenčních parametrů pro listy olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke koncentraci atmosférického CO<sub>2</sub> v prostředí růstových komor (400 ppm CO<sub>2</sub>: fialově; 800 ppm CO<sub>2</sub>: modře). Inokulace byla provedena 20. června. Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl v koncentracích signifikantní (< 0,05), p-hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí.

Modelování fluorescenčních parametrů za použití lineárního mixovaného modelu ASReml přineslo zajímavé výsledky, zejména z pohledu interakcí mezi faktory (tabulka 3). Signifikance vlivu jednotlivých faktorů na hodnoty fluorescenčních parametrů dopadla poměrně podle očekávání: faktor přítomnosti patogenu *P. ×alni* se projeví pouze ve dvou parametrech (Fm\_Fo a Phi\_Do), faktor provenience ve všech sledovaných parametrech a faktor koncentrace atmosférického CO<sub>2</sub> ve čtyřech parametrech (Fm\_Fo, Mo, Phi\_Do a Eto\_RC). Interakce inokulace a provenience měla průkazný vliv na tři fluorescenční parametry v posledních fázích experimentu (Phi\_Pav, Fm\_Fo a Phi\_Do). Interakce inokulace a CO<sub>2</sub> se neprokázala významná nikde. Interakce mezi proveniencí a CO<sub>2</sub> byla průkazná naopak v počátečních fázích experimentu. A konečně interakce všech tří faktorů se ukázala být v modelu signifikantní pro Fm\_Fo a Mo na počátku experimentu a pro Eto\_RC na konci experimentu.

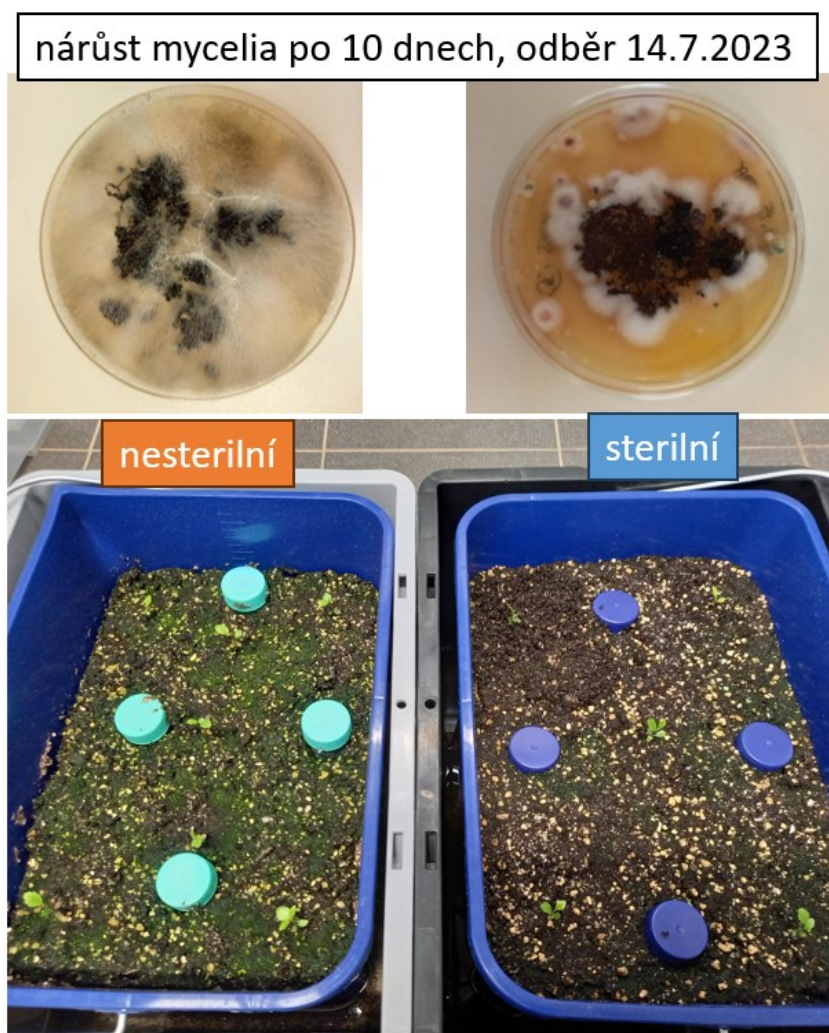
06_16	phyto	prov	CO2	phyto:prov	phyto:CO2	prov:CO2	phyto:prov:CO2
Fm_Fo		ns	ns			ns	
Mo		<b>0.008</b>	ns			ns	
Ss		<b>0.021</b>	ns			ns	
Phi_Do		ns	ns			ns	
Phi_Pav		ns	ns			ns	
Pi_Abs		ns	ns			ns	
ABS_RC		ns	ns			ns	
TRo_RC		<b>0.012</b>	ns			ns	
ETo_RC		ns	<b>0.012</b>			ns	
07_04	phyto	prov	CO2	phyto:prov	phyto:CO2	prov:CO2	phyto:prov:CO2
Fm_Fo	ns	<b>0.040</b>	ns	ns	ns	ns	<b>0.036</b>
Mo	ns	<b>0.000</b>	<b>0.036</b>	ns	ns	ns	<b>0.045</b>
Ss	ns	<b>0.005</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Phi_Do	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi_Pav	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0.044</b>	ns
Pi_Abs	ns	<b>0.001</b>	ns	ns	ns	ns	ns
ABS_RC	ns	<b>0.002</b>	ns	ns	ns	ns	ns
TRo_RC	ns	<b>0.003</b>	ns	ns	ns	ns	ns
ETo_RC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
07_15	phyto	prov	CO2	phyto:prov	phyto:CO2	prov:CO2	phyto:prov:CO2
Fm_Fo	ns	ns	<b>0.002</b>	ns	ns	ns	ns
Mo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ss	ns	<b>0.015</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Phi_Do	ns	ns	<b>0.004</b>	ns	ns	ns	ns
Phi_Pav	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0.022</b>	ns
Pi_Abs	ns	<b>0.001</b>	ns	ns	ns	ns	ns
ABS_RC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TRo_RC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ETo_RC	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0.024</b>	ns
07_27	phyto	prov	CO2	phyto:prov	phyto:CO2	prov:CO2	phyto:prov:CO2
Fm_Fo	<b>0.031</b>	<b>0.007</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Mo	ns	<b>0.001</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Ss	ns	<b>0.008</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Phi_Do	<b>0.026</b>	<b>0.014</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Phi_Pav	ns	ns	ns	<b>0.037</b>	ns	ns	ns
Pi_Abs	ns	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	ns
ABS_RC	ns	<b>0.008</b>	ns	ns	ns	ns	ns
TRo_RC	ns	<b>0.012</b>	ns	ns	ns	ns	ns
ETo_RC	ns	<b>0.000</b>	ns	ns	ns	ns	<b>0.008</b>
08_25	phyto	prov	CO2	phyto:prov	phyto:CO2	prov:CO2	phyto:prov:CO2
Fm_Fo	ns	ns	ns	<b>0.039</b>	ns	ns	ns
Mo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ss	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi_Do	ns	ns	ns	<b>0.026</b>	ns	ns	ns
Phi_Pav	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi_Abs	ns	<b>0.002</b>	ns	ns	ns	ns	ns
ABS_RC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TRo_RC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ETo_RC	ns	<b>0.018</b>	ns	ns	ns	ns	<b>0.039</b>

Tabulka 3: Signifikantní p-hodnoty modelu ASReml pro fluorescenční parametry listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k faktorům „phyto“ – přítomnost *P. × alni* v substrátu (ano / ne), „prov“ – provenience (česká / norská), „CO2“ – koncentrace vzdušného CO<sub>2</sub> (400 / 800 ppm) a všech jejich kombinací. Tabulka je rozdělena na úseky podle data měření. Nesignifikantní výsledky (p-hodnota > 0,05) jsou označeny zkratkou „ns“.

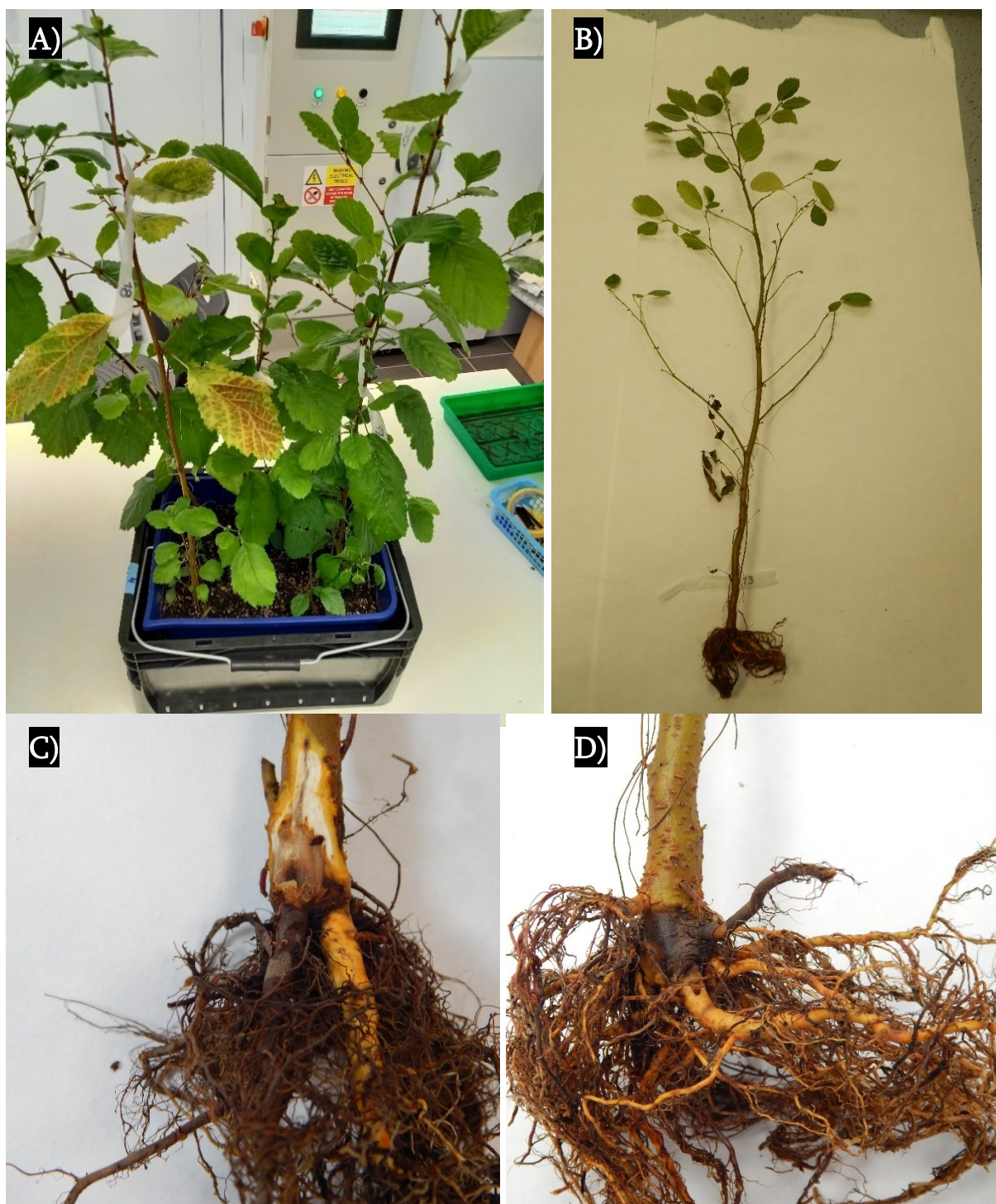
## 4.2 Doplnující komorový experiment 2022

Druhý laboratorní experiment se konal v roce 2022, obsahoval 40 semenáčů olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) a jeho cílem bylo zjistit, zda se ve sterilním substrátu silněji rozvine infekce kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*. Premisa byla, že sterilizace substrátu limituje kompetici půdních mikroorganismů na minimum a patogen *P. ×alni* bude intenzivněji kolonizovat zasazené olše. Cílem experimentu bylo zjistit, zda se tento předpokládaný efekt projeví v listoví olší a bude zjištělný za použití alespoň jedné analytické metody: měření relativního obsahu pigmentů, fluorescenčních parametrů, optických vlastností (reflektance a transmitance) a biofyzikálních parametrů LMA a WC.

Získaná data tuto hypotézu přesvědčivě nepotvrdila, pouze některé fluorescenční a biofyzikální parametry to ve svých lineárních modelech naznačují (tabulka 5 a 6). V mnoha parametrech se projevil rozdíl v rozptylu hodnot: vyšší rozptyl pro olše pěstované ve sterilním substrátu či nižší rozptyl pro olše rostoucí v nesterilním substrátu. Především analýzy hlavních komponent naznačují širší rozptyly souborů měřených parametrů listoví u olší rostoucích ve sterilním substrátu (graf 10, 11 a soubor grafů 9).



Obrázek 277: Nárůst mycelia ze vzorků půdy před inokulací patogenem *P. ×alni*. Nesterilní substrát vlevo dole a vzorek pocházející něj vlevo nahoře. Sterilní substrát vpravo dole s příslušnou kulturou vpravo nahoře. Fotografie i materiál

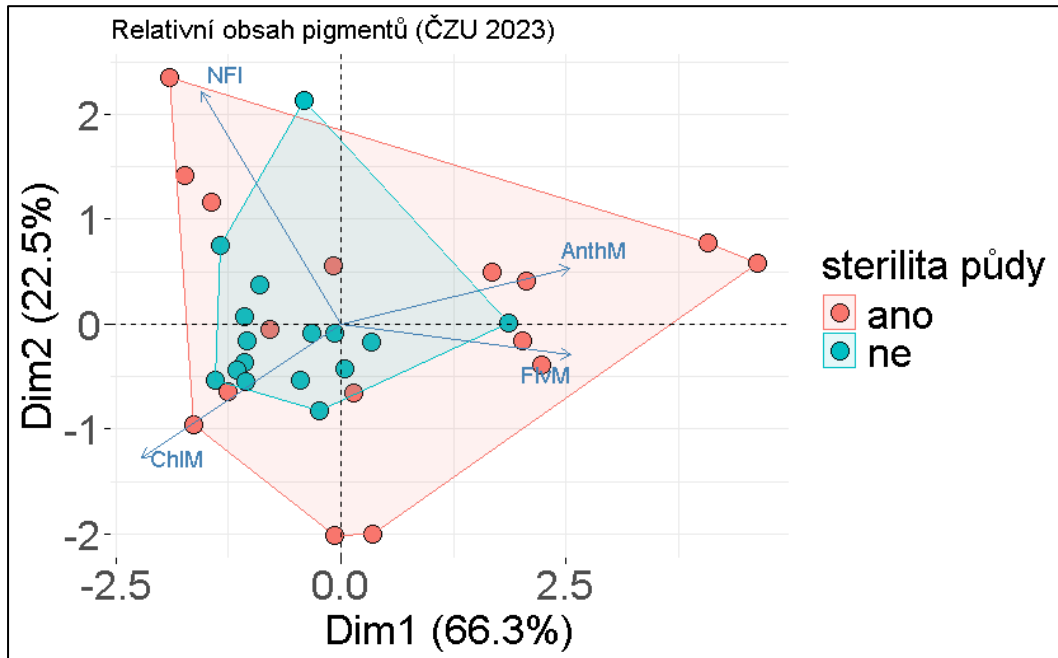


Obrázek 288: A) První jedinec olše lepkavé vykazující příznaky fytoftorového onemocnění (chloróza). Později byla u téhož jedince objevena léze kořenového krčku (C). B) Jedinec olše lepkavé po vyjmutí ze substrátu, také vykazující příznaky napadení patogenem *P. × alni*. I něj byla patrná nekróza kořenového krčku (D). Obě rostliny pocházejí ze substrátu, jež byl před inokulací *P. × alni* sterilizován. Fotografie poskytla Ing. Markéta Macháčová.

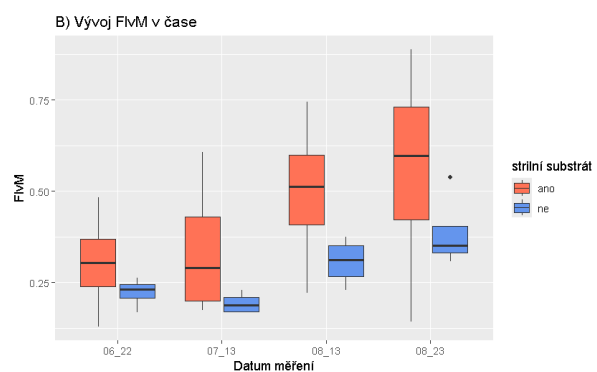
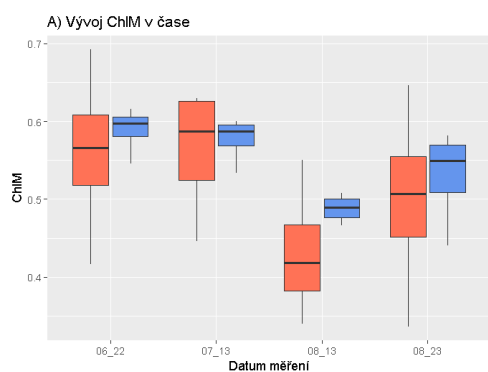
#### 4.2.1 Relativní obsah fotosyntetických a ochranných pigmentů

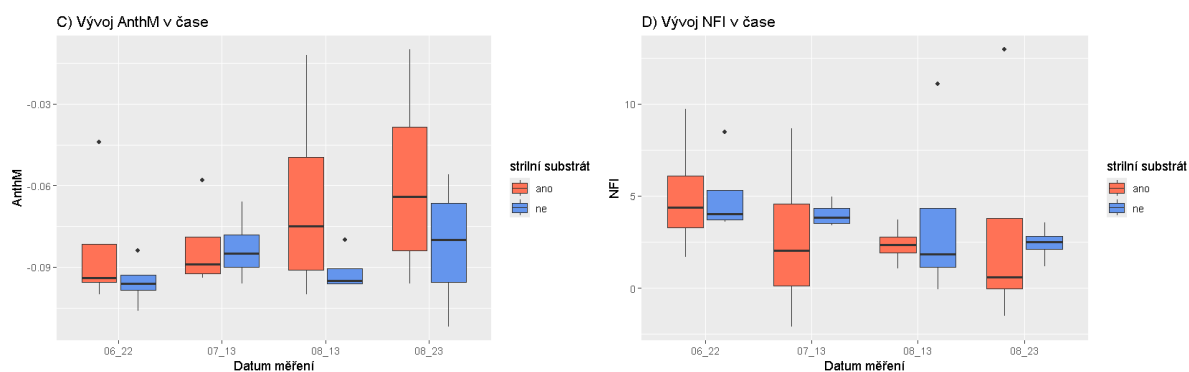
Měření relativního obsahu pigmentů v listech za použití přístroje MPM-100 přineslo poněkud nejasné výsledky. Žádný z měřených parametrů (relativní obsah chlorofylů, flavonoidů,

anthokyanů a dusík-flavonolový index) nevykazuje signifikantní rozdíl mezi rostlinami ve sterilním a nesterilním substrátu (soubor grafů 7). Přesto je v datech viditelný jistý rozdíl, a to v rozptylech. Především analýza hlavních komponent ukázala, že olše rostoucí ve sterilním substrátu mají větší rozptyl obsahu pigmentů v listech (graf 10).



Graf 10: Analýza hlavních komponent pro parametry relativního obsahu pigmentů v listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke sterilitě pěstebního substrátu (sterilní červeně, nesterilní modře), který však obsahoval kořenového patogena *Phytophthora ×alni*. Zahrnuje data měření před i po inokulaci patogenem.





Soubor grafů 7: Porovnání středových tendencí parametrů relativního obsahu pigmentů v listech olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke sterilitě substrátu (sterilní červeně, nesterilní modře), jež byl 23. 6. 2023 inokulován kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*. Každý graf zobrazuje hodnoty daného parametru ve dnech, kdy bylo provedeno měření.

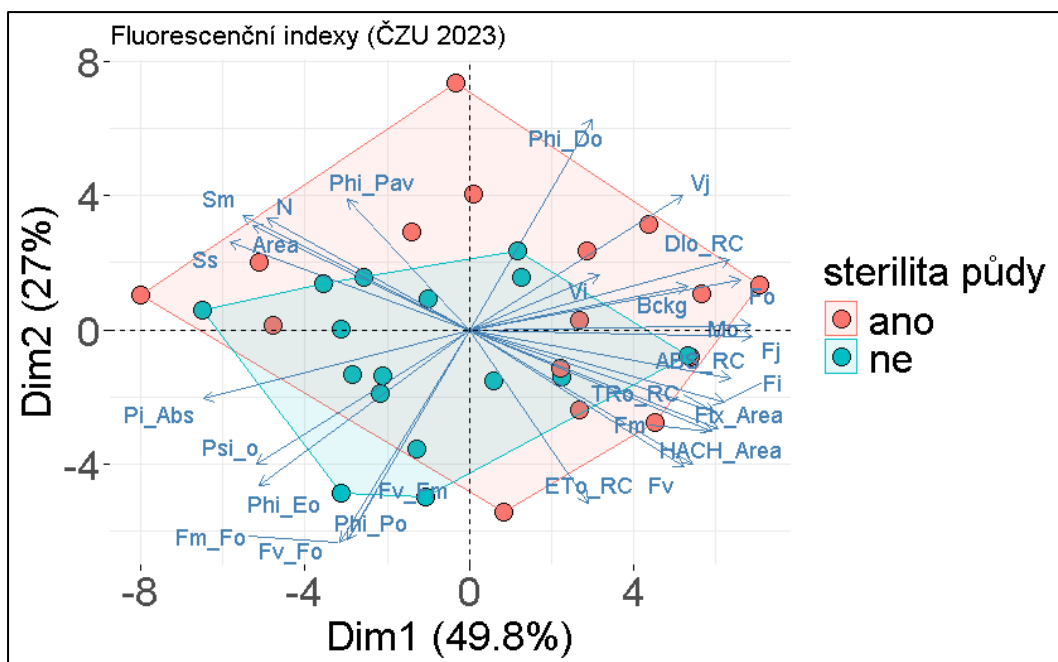
Další analýza za použití modelu ASReml přinesla signifikantní výsledek pouze pro faktor „datum“ (viz tabulka 4), který odkazuje na čtyři data odběru vzorků. Tento výsledek lze interpretovat jako fakt, že hodnoty pigmentů v listech se budou za přítomnosti patogenu měnit v čase, ne však ve vztahu ke sterilitě půdy, a tedy hypotetický rozdíl v intenzitě napadení patogenem *P. ×alni* se v obsahu listových pigmentů neprojeví.

	steril	datum	steril:datum
ChlM	ns	<b>0.000</b>	ns
FlvM	ns	<b>0.000</b>	ns
AnthM	ns	<b>0.044</b>	ns
NFI	ns	ns	ns

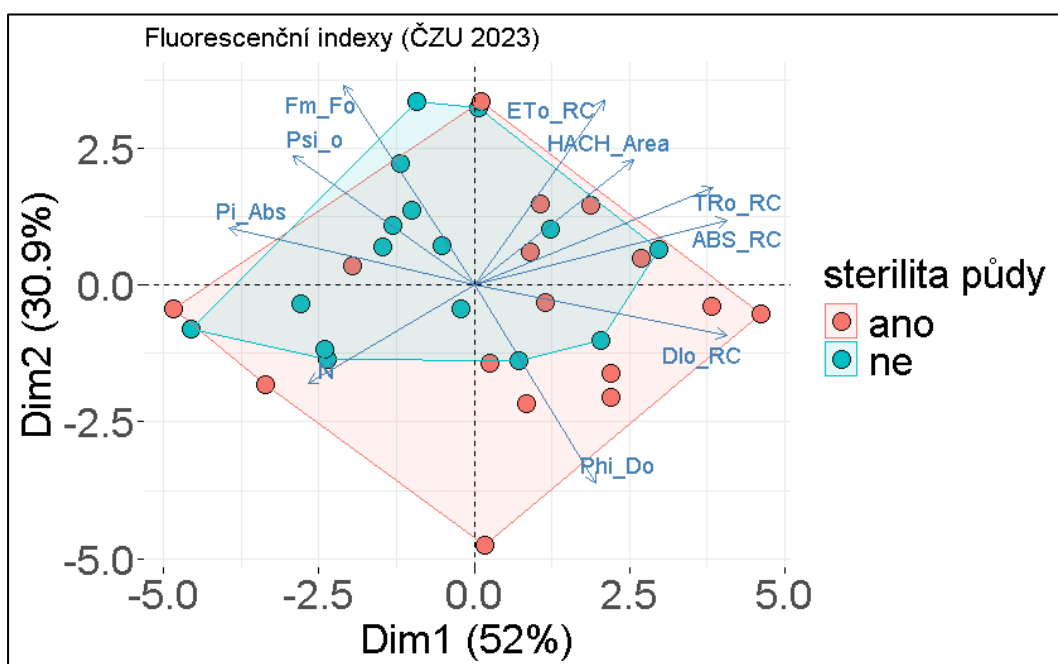
Tabulka 4: P-hodnoty modelu ASReml pro parametry relativního obsahu pigmentů v listech olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k faktoru sterility substrátu (sterilní × nesterilní), datumu měření (4 opakování) a jejich kombinaci. Všechny rostliny byly v průběhu inokulované kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*. Nesignifikantní výsledky (p-hodnota > 0,05) jsou označeny zkratkou „ns“.

#### 4.2.2 Fluorescenční parametry

Z původního kompletního souboru fluorescenčních parametrů měřených přístrojem FluorPen byly na základě analýzy hlavních komponent vybrány pouze takové, u kterých lze předpokládat, že nejlépe odráží faktor sterility substrátu (graf 11 a 12). Ostatní parametry byly považovány za redundantní a nebyly dále analyzovány.



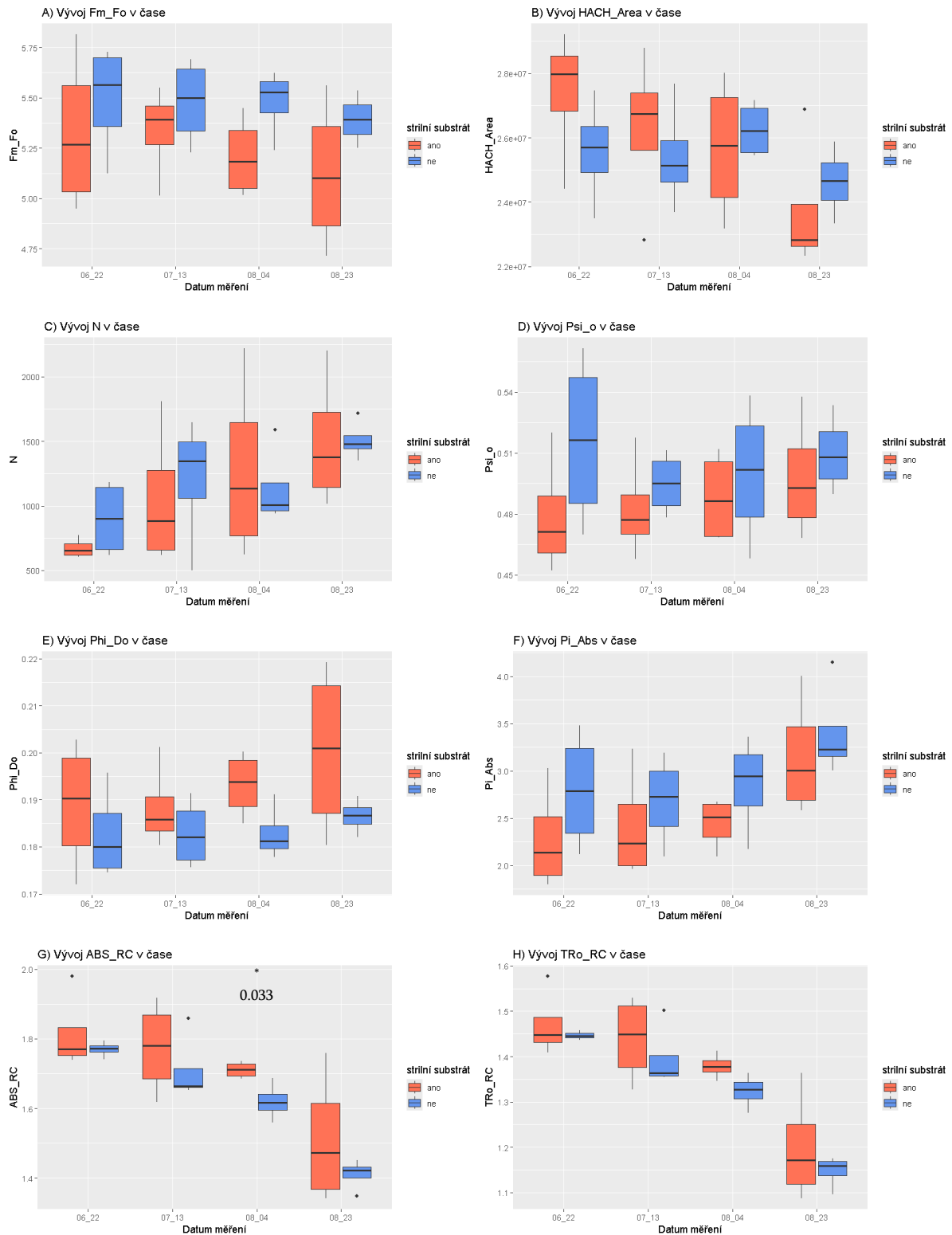
Graf 11: Analýza hlavních komponent všech fluorescenčních parametrů měřených na listech olší lepkavých (*Alnus glutinosa*) pěstovaných v substrátu obsahujícím kořenového patogena *Phytophthora ×alni*. Polovina stromů byla pěstována v substrátu, který před inokulací prošel sterilizací. Dataset obsahuje všechna měření, tedy před i po inokulaci.



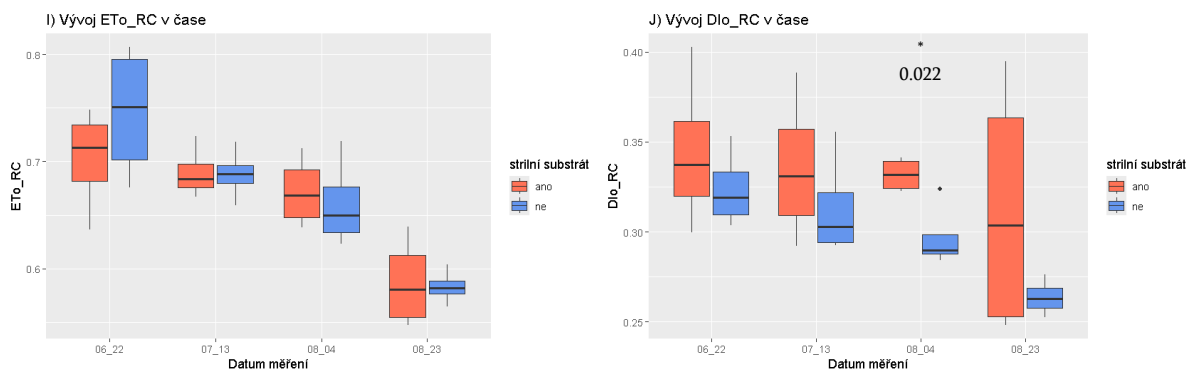
Graf 12: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních parametrů pro listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke sterilitě pěstebního substrátu (sterilní červeně, nesterilní modře), který však obsahoval kořenového patogena *Phytophthora ×alni*. Dataset obsahuje všechna měření, tedy před i po inokulaci.

Rozdíly mezi hodnotami jednotlivých parametrů rostlin ve sterilním a nesterilním substrátu byly dále porovnávány vždy odděleně pro jednotlivá data měření. K hodnocení rozdílu byl použit t-test a výsledné p-hodnoty < 0,05 jsou zaznamenány v příslušných boxplotech (soubor grafů 8). Signifikantní rozdíl mezi rostlinami ve sterilním a nesterilním substrátu se projevil v hodnotách

parametru ABS\_RC přesně 6 týdnů po inokulaci (datum 08\_04) a DIo\_RC v témže časovém bodě (soubor grafů 8G a 8J). Rozdíly v rozptylech hodnot jednotlivých parametrů naznačují v některých případech trend vyššího rozptylu u rostlin ze sterilního substrátu (např. Fm\_Fo, Phi\_Do, Abs\_RC, Tro\_RC), výsledky však nejsou jednoznačné.







Soubor grafů 8: Porovnání středových tendencí fluorescenčních parametrů listů olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke sterilně substrátu (sterilní červeně, nesterilní modře), jež byl 23. 6. 2023 inokulován kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*. Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Pokud byl rozdíl ve faktoru sterility substrátu signifikantní ( $< 0,05$ ),  $p$ -hodnota je uvedena nad příslušnou dvojicí.

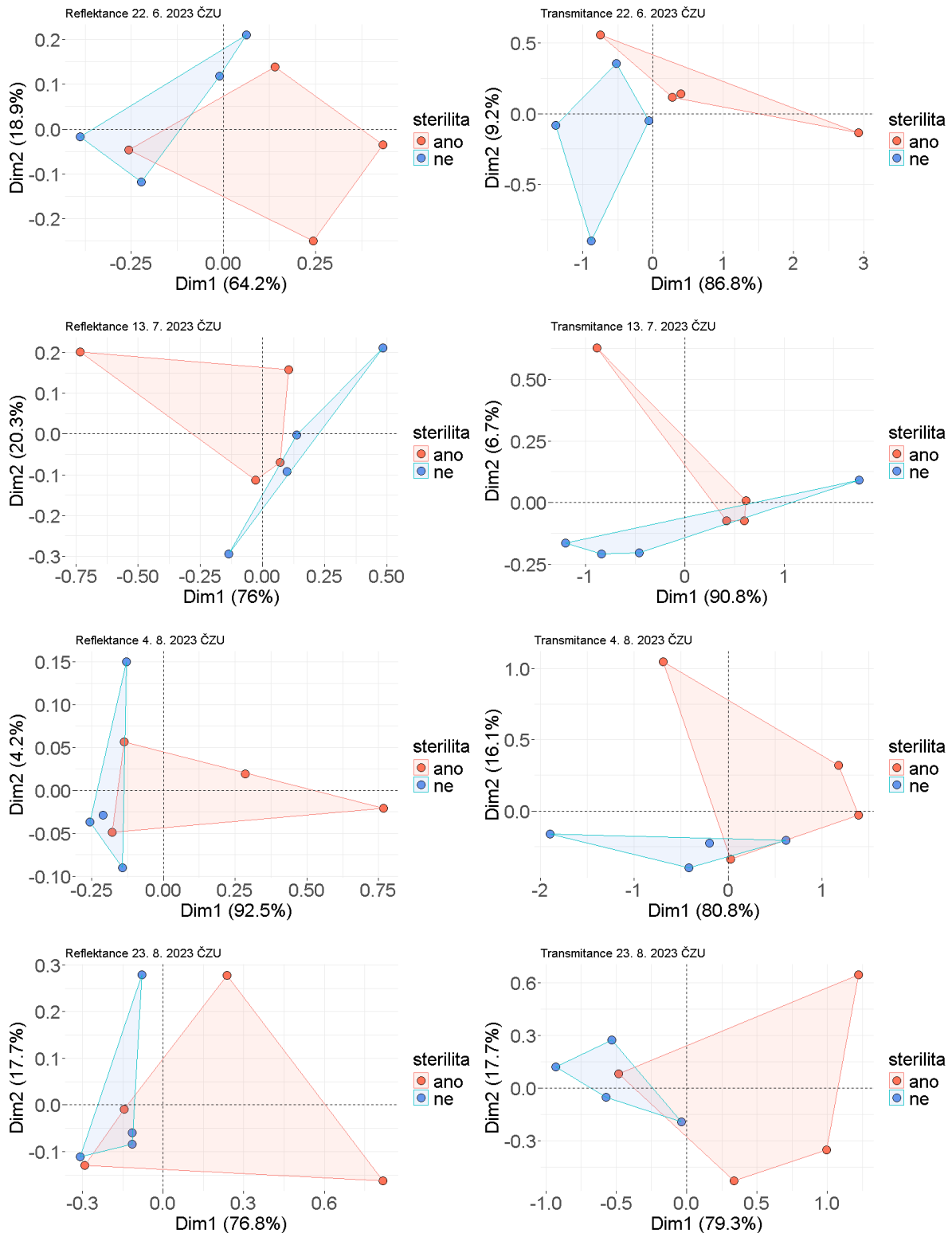
Vybrané fluorescenční parametry byly dále zpracovány modelem ASReml, který odhalil signifikantní vliv faktoru sterility půdy i data měření, ne však v kombinaci (tabulka 5). Parametry, jež reagují na rozdíl ve sterilně půdy, nevykazují rozdíl v čase a totéž platí obráceně. Pakliže je signifikantní faktor „datum“, znamená to, že v daném parametru je možno sledovat ontogenetický vývoj rostliny. V případě signifikance faktoru „steril“ lze v příslušném parametru vysledovat rozdíl v reakci olší na sterilitu půdy. Žádný z analyzovaných fluorescenčních parametrů jednoznačně nepotvrzuje hypotézu o vlivu sterility substrátu na rozvoj infekce *P. ×alni* na sazenicích olše lepkavé.

	steril	datum	steril:datum
Fm_Fo	<b>0.014</b>	ns	ns
N	ns	<b>0.000</b>	ns
Psi_o	<b>0.021</b>	ns	ns
Phi_Do	<b>0.039</b>	ns	ns
Pi_Abs	ns	<b>0.006</b>	ns
ABS_RC	ns	<b>0.000</b>	ns
TRO_RC	ns	<b>0.000</b>	ns
ETo_RC	ns	<b>0.000</b>	ns
Dlo_RC	0.066	<b>0.025</b>	ns

Tabulka 5:  $P$ -hodnoty modelu ASReml pro fluorescenční parametry listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k faktoru sterility substrátu (sterilní  $\times$  nesterilní), datumu měření (4 opakování) a jejich kombinaci. Všechny rostliny byly v průběhu inokulované kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*. Nesignifikantní výsledky ( $p$ -hodnota  $> 0,05$ ) jsou označeny zkratkou „ns“.

### 4.2.3 Optické vlastnosti

Pro měření optických vlastností listové olše lepkavé byla použita integrační sféra, která umožňuje měření odrazivosti (reflektance) i propustnosti (transmitance) listu. Analýza hlavních komponent na reflektance a transmitance v rozsahu 400–2300 nm ukazuje výrazný rozdíl mezi optickými vlastnostmi olší pěstovaných ve sterilním a nesterilním substrátu, a to před i po inokulaci patogenem *P. ×alni* (soubor grafů 9). V transmitanci je patrný nárůst rozptylu hodnot s postupující infekcí patogenem u rostlin pocházející ze sterilního substrátu.

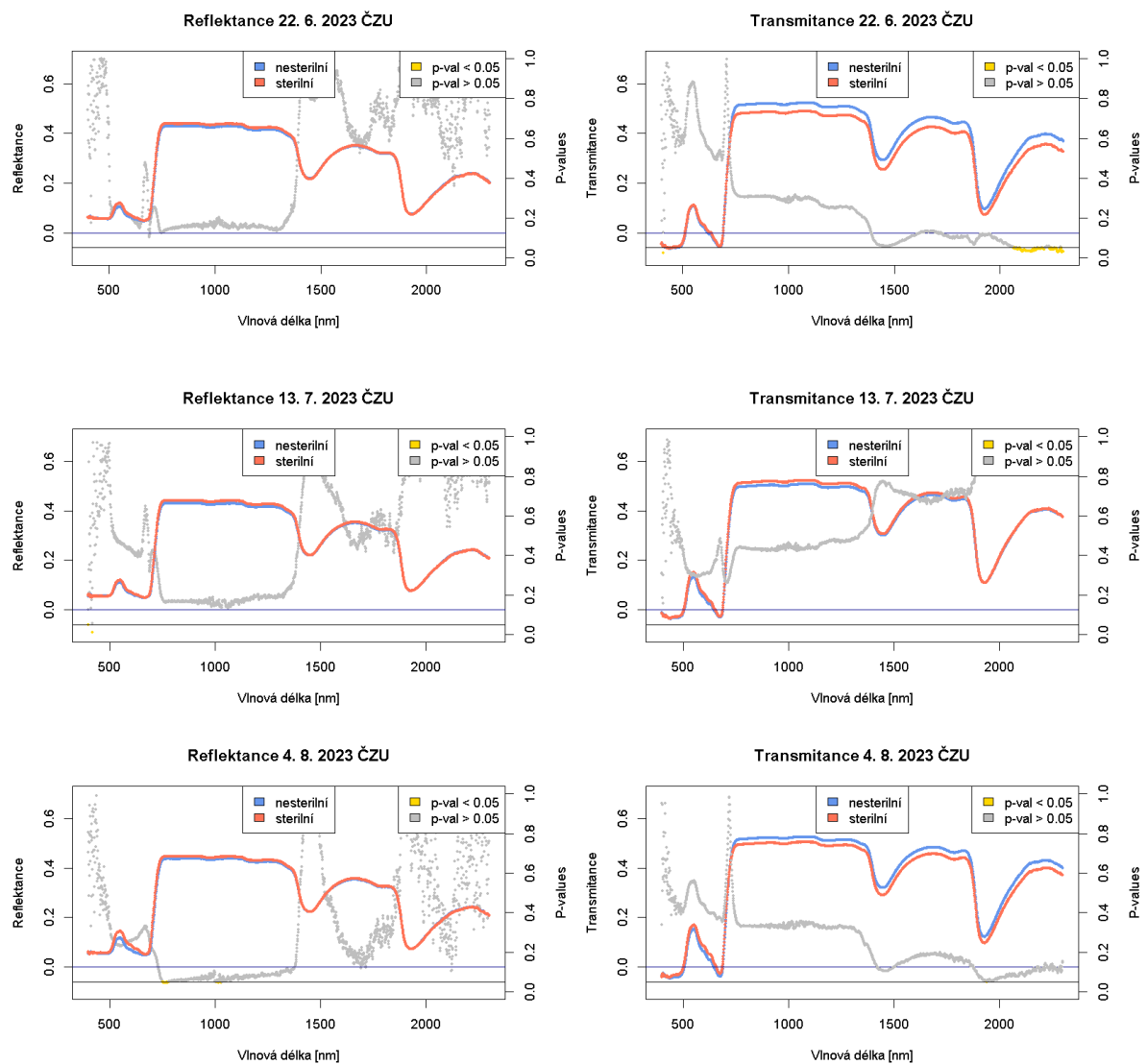


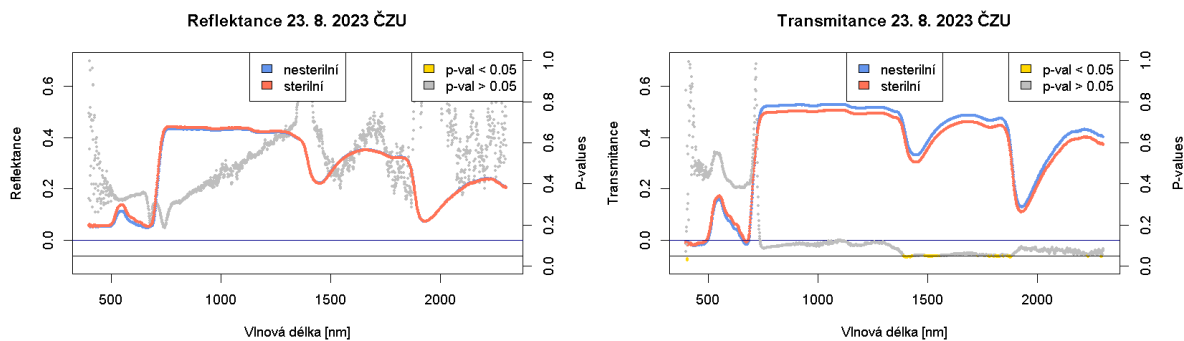
Soubor grafů 9: Analýzy hlavních komponent pro odrazivost (reflektanci) a propustnost (transmitanci) listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) v jednotlivých datech měření. Rostliny byly pěstovány ve dvou typech substrátů: sterilní (červeně) a nesterilní (modře). Dne 23. 6. 2023 proběhla inokulace všech substrátů kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*.

Analýza rozdílu spektrálních křivek v každé vlnové délce t-testem neodhalila mnoho signifikantních rozdílů mezi rostlinami pěstovanými s různou sterilitou substrátů. Asi největší rozdíl byl v transmitanci ještě před inokulací a to ve vlnových délkách > 2000 nm, v nichž se

promítá obsah vody v listu (soubor grafů 10 – transmittance 22. 6.). Další jemné signifikantní rozdíly optických vlastností po inokulaci patogenem *P. ×alni* se projevily v reflektanci v oblasti absorpčního pásu chlorofylu (soubor grafů 10 – reflektance 13. 7.) a v oblasti červeného okraje (soubor grafů 10 – reflektance 4. 8.). Nejvýznamnější rozdíl mezi rostlinami v různém substrátu se projevil v posledním měření v transmittanci v oblasti absorpčního pásu chlorofylu a zároveň v absorpčním pásu vody (soubor grafů 10 – transmittance 23. 8.).

Žádný z těchto výsledků jednoznačně nepotvrzuje hypotézu o rozdílu intenzity napadení patogenem *P. ×alni* na olši lepkavé ve vztahu ke sterilitě substrátu, který by byl pozorovatelný v optických vlastnostech listu.

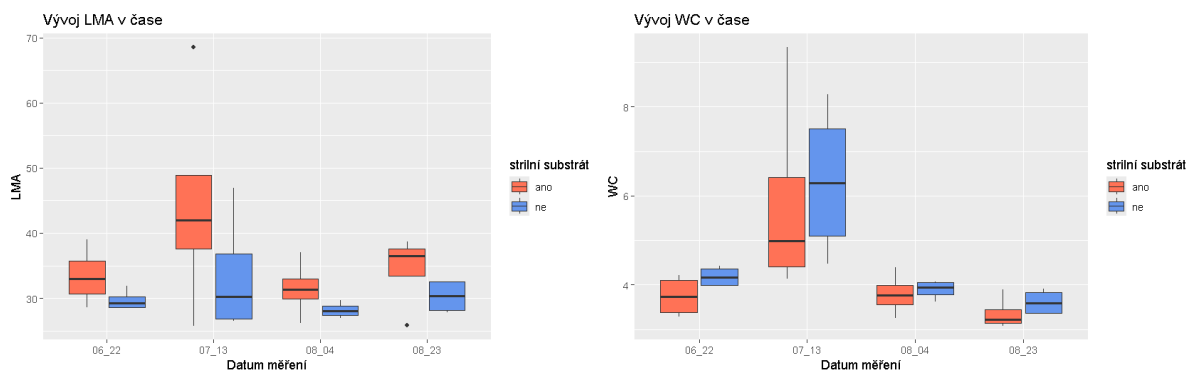




Soubor grafů 10: Spektrální křivky odrazivosti (reflektance; vlevo) a propustnosti (transmitance; vpravo) listové sazenice olše lepkavé (*Alnus glutinosa*), pěstované ve sterilním (červeně) či nesterilním (modře) substrátu. Dne 23. 6. byly všechny pěstební substráty inokulovány kořenovým patogenem *Phytophthora × alni*. Pro každé měření vlnové délky byl proveden t-test. Výsledné p-hodnoty menší než hladina významnosti 0,05 jsou v grafu znázorněny žlutou barvou, p-hodnoty větší než hladina významnosti 0,05 šedou barvou.

#### 4.2.4 Biofyzikální parametry listu

Z každého hodnoceného jedince olše lepkavé byl odebrán jeden list pro hodnocení biofyzikálních parametrů: LMA („leaf mass per area“ neboli specifická listová hmotnost) a WC („water content“ neboli obsah vody). Jedinci rostoucí ve sterilním substrátu s předpokládaným snazším rozvojem patogenu vykazovali trend k vyšší LMA a nižšímu obsahu vody v listech. Hodnocení t-testem žádný signifikantní rozdíl nepotvrdilo (soubor grafů 11), a tudíž tyto parametry nelze považovat za ukazatele hypotetického rozdílu v intenzitě napadení olší patogenem *P. × alni* při pěstování ve sterilním a nesterilním substrátu.



Soubor grafů 11: Porovnání středových tendencí parametrů LMA a WC pro listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu ke sterilitě substrátu (sterilní červeně, nesterilní modře), jež byl 23. 6. 2023 inokulován kořenovým patogenem *Phytophthora × alni*. Každý graf zobrazuje boxplot daného parametru v den, kdy bylo provedeno měření. Jelikož žádný rozdíl ve faktoru sterility substrátu nebyl signifikantní ( $< 0,05$ ), p-hodnoty nejsou uvedeny.

Zajímavý je výsledek modelování za použití smíšeného lineárního modelu ASReml (tabulka 6). Ten potvrdil vliv sterility substrátu na hodnoty jednotlivých parametrů a zároveň potvrdil i vliv data měření, ovšem ne v kombinaci.

	steril	datum	steril:datum
LMA	<b>0.052</b>	<b>0.048</b>	ns
WC	<b>0.093</b>	<b>0.000</b>	ns

Tabulka 6: P-hodnoty modelu ASReml parametrů LMA a WC pro listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k faktoru sterility substrátu („steril“: sterilní × nesterilní), datumu měření (4

opakování) a jejich kombinaci. Všechny rostliny byly v průběhu inokulované kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*. Nesignifikantní výsledky ( $p$ -hodnota > 0,05) jsou označeny zkratkou „ns“.

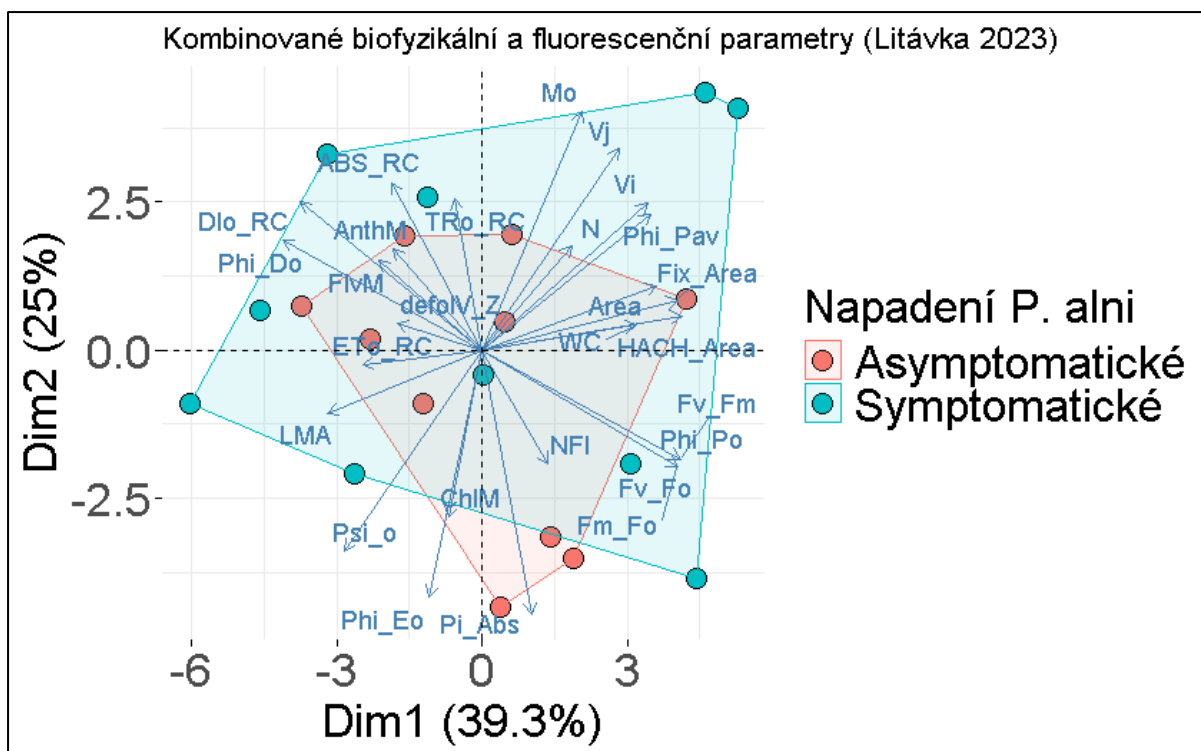
### 4.3 Terénní šetření 2023

Dvacet stromů olše lepkavé na pěti výzkumných plochách v povodí řeky Litavka bylo kategorizováno jako symptomatické či asymptomatické, podle toho, zda se na nich vyskytovaly makroskopické příznaky nákazy *P. alni* - léze na kmenech. Symptomatictí jedinci vykazovali celkově větší rozptyl měřených parametrů listoví, oproti stromům bez jasných symptomů napadení (graf 14 a 16). Avšak hypotéza, že přítomnost symptomů napadení *P. alni* se projeví v jednotlivých biofyzikálních či fluorescenčních parametrech se nepotvrdila. V optických vlastnostech listoví se rozdíl mezi symptomatickými a asymptomatickými olšemi projevil ve viditelné části spektra, což potvrzuje hypotézu o projevu míry napadení *P. alni* v optických vlastnostech listů olše lepkavé.

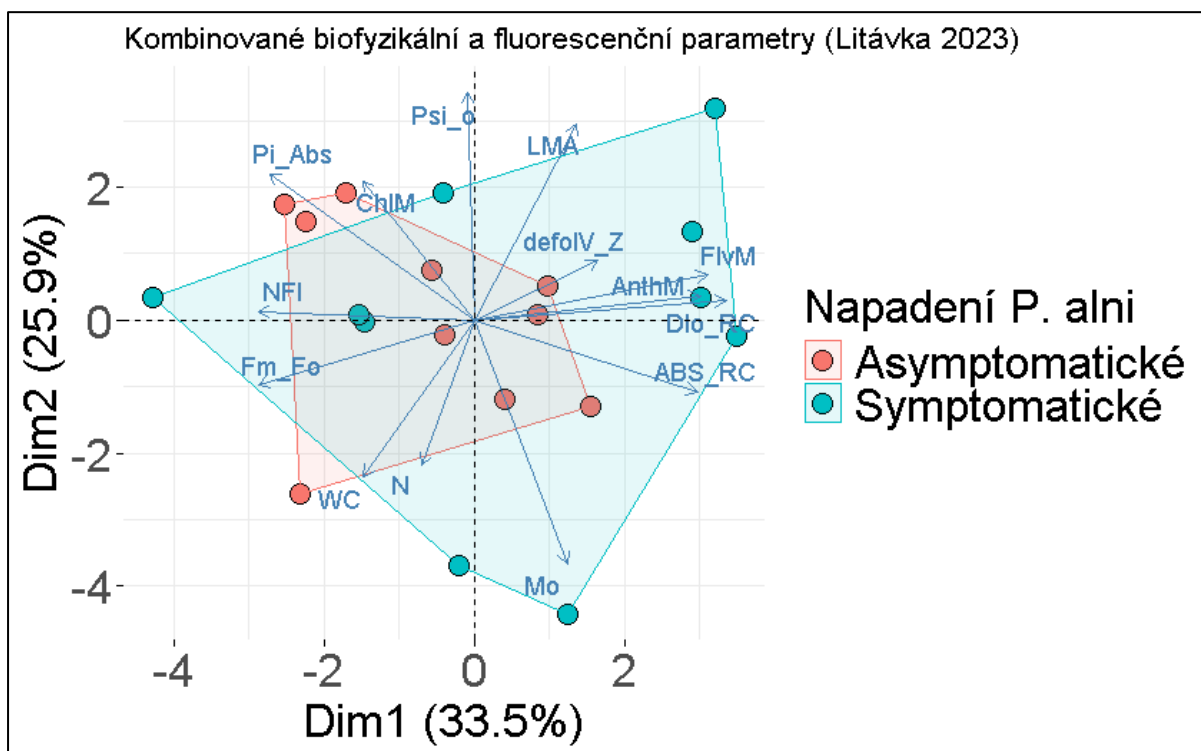
#### 4.3.1 Funkční znaky listoví a fluorescenční parametry

Z původního plného počtu všech naměřených parametrů, vycházejících z přístroje MPM, FluorPen a z biofyzikálních měření, bylo na základě grafu analýzy hlavních komponent (graf 13) vybráno menší množství parametrů (graf 14), které se zdají být hlavními ukazateli rozdílu v míře napadení olší *P. alni*. Z praktických důvodů byly dále analyzovány pouze tyto vybrané parametry.

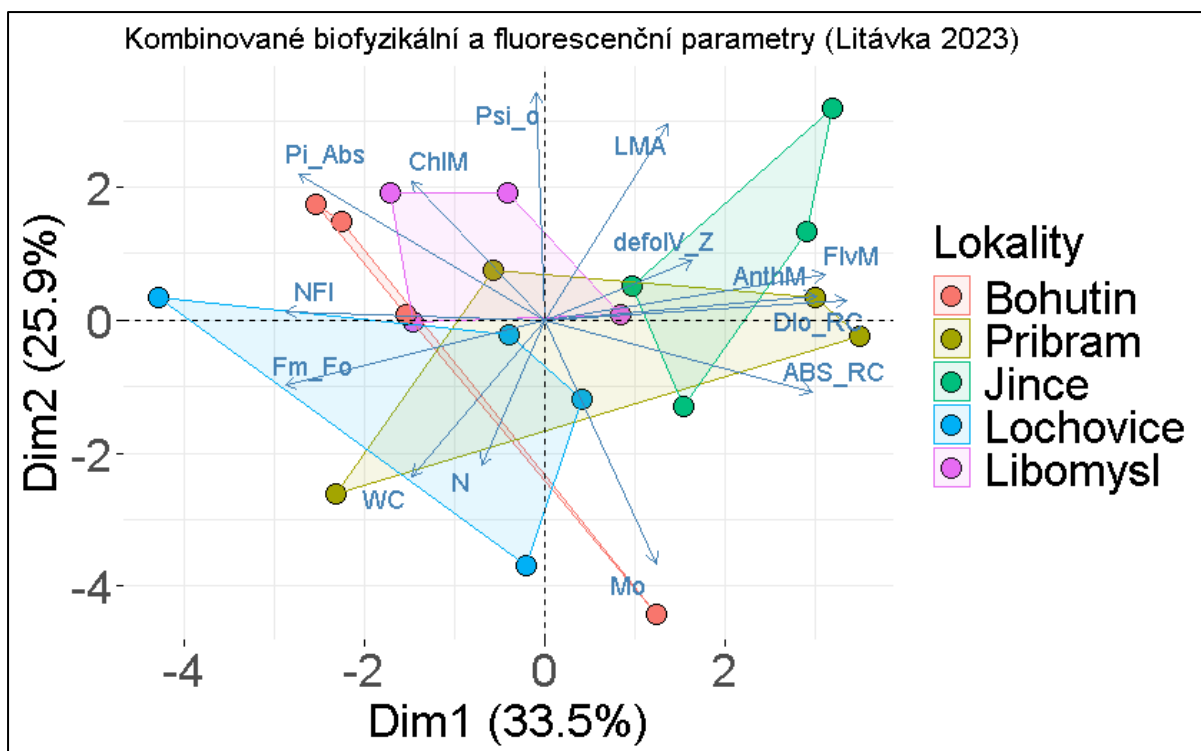
Analýzou hlavních komponent byl také prověřen rozdíl v hodnotách vybraných parametrů mezi jednotlivými stanovišti na řece Litavka (graf 15). Body reprezentující stromy na různých lokalitách nevykazovaly žádný trend ke shlukování po stanovištích, a tak jsem se touto otázkou v souvislosti s funkčními znaky listoví a fluorescenčními parametry dále nezabývala. Jednotlivé lokality sběru reprezentovaly biologická opakování.



Graf 13: Analýza hlavních komponent všech měřených fluorescenčních a biofyzikálních parametrů listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k napadení patogenem *Phytophthora alni* v povodí řeky Litávky v srpnu 2023.



Graf 14: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních a biofyzikálních parametrů listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k napadení patogenem *Phytophthora alni* v povodí řeky Litávky v srpnu 2023.

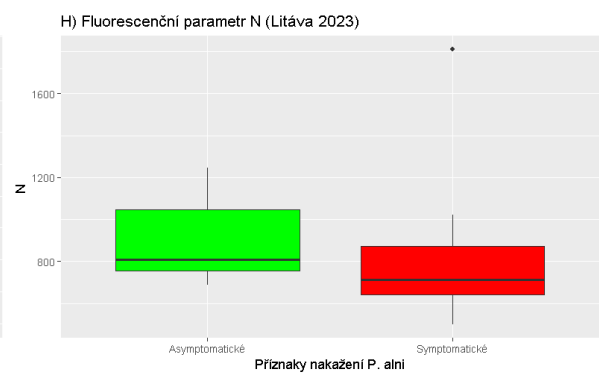
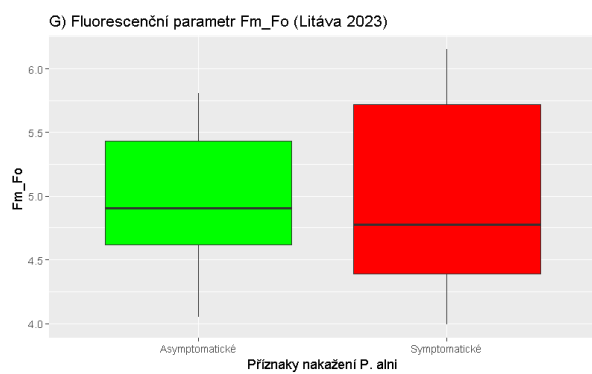
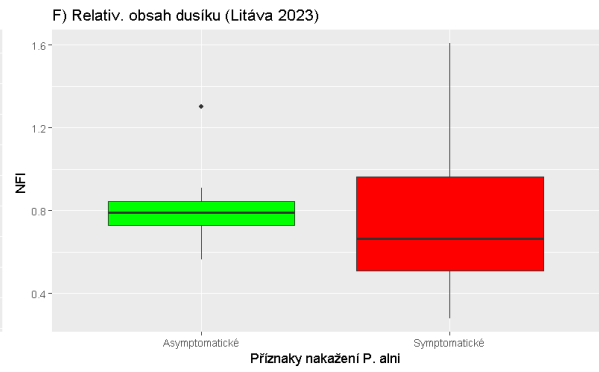
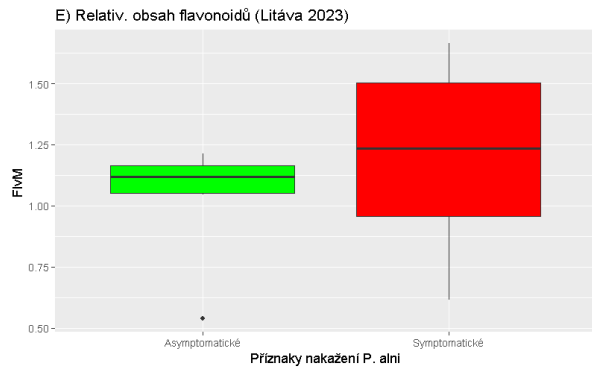
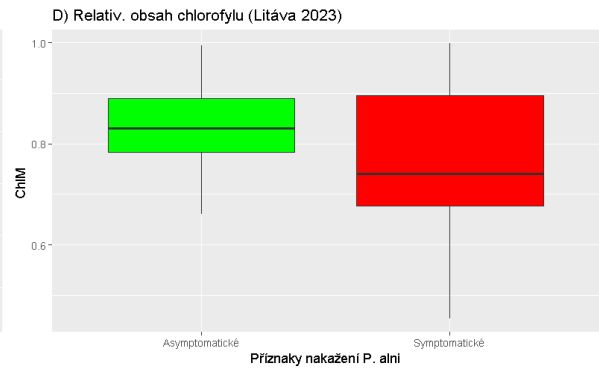
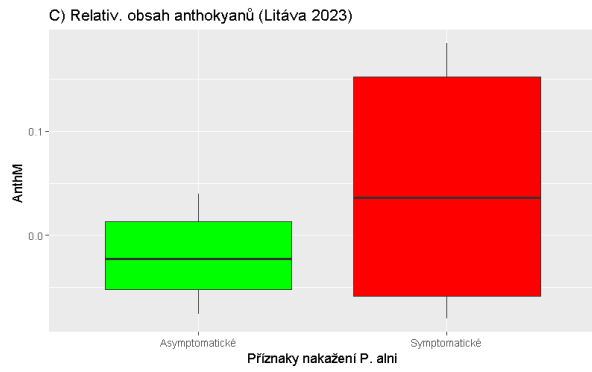
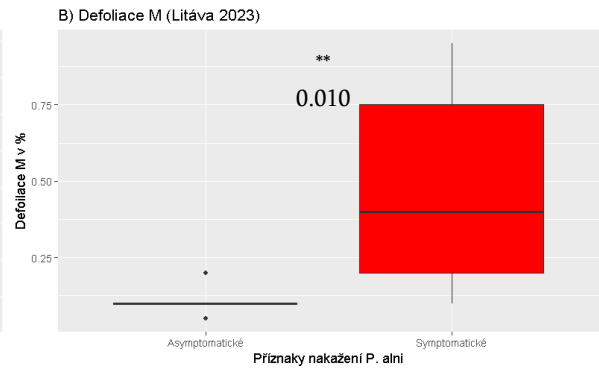
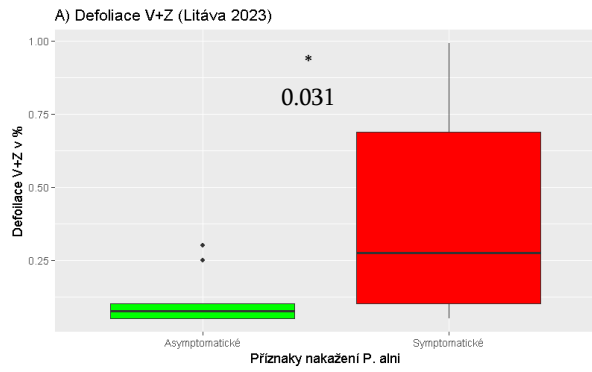


Graf 15: Analýza hlavních komponent vybraných fluorescenčních a biofyzikálních parametrů listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k místu odběru vzorků na řece Litávce v srpnu 2023; řazeno ve směru po proudu toku.

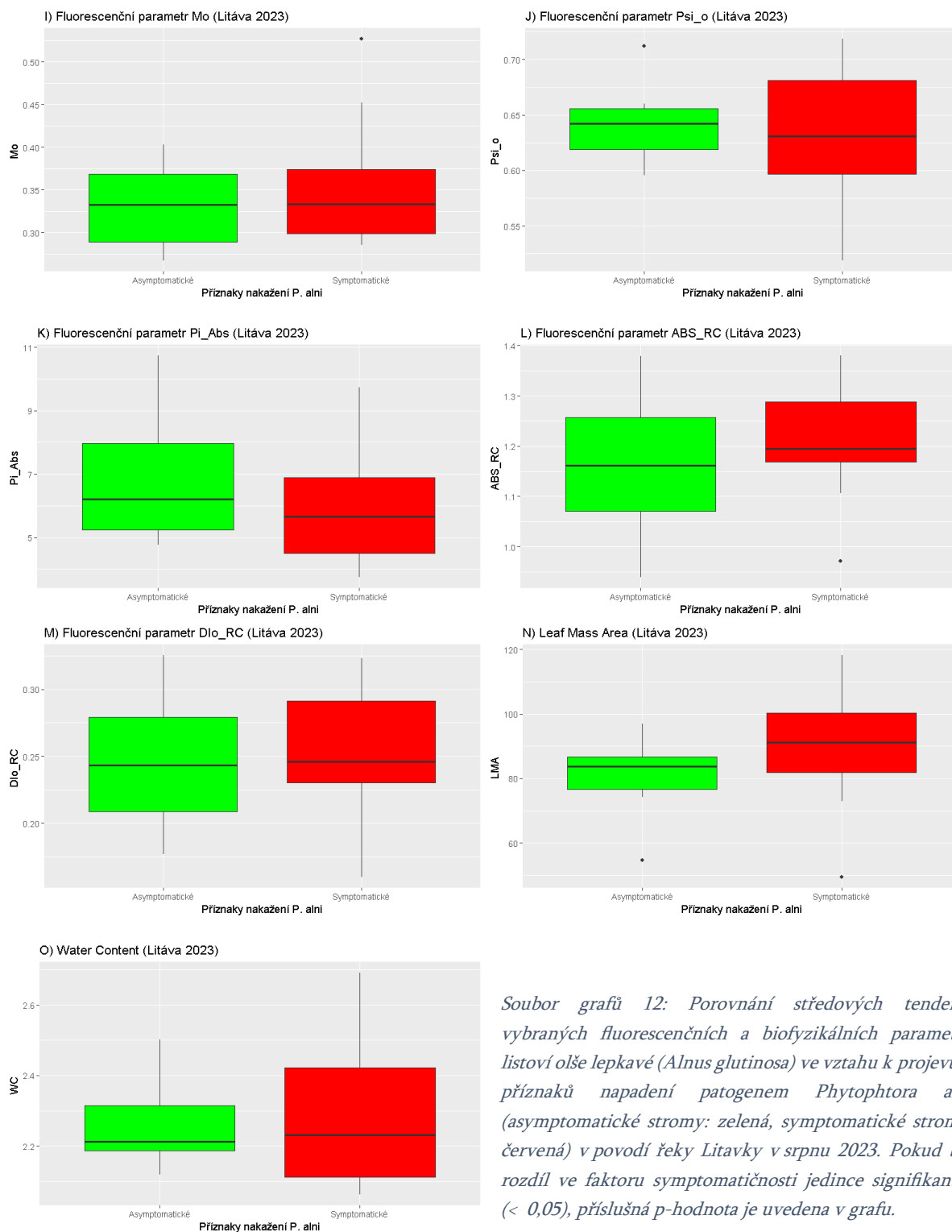
U mnoha jednotlivých parametrů je dobře patrný trend v rozdílnosti jejich rozptýlů u symptomatických a asymptomatických stromů, avšak průměrné hodnoty se neliší a výsledný rozdíl je tudíž neprůkazný (soubor grafů 12).

Jediný parametr, který vykazuje signifikantní rozdíl mezi dvěma hladinami faktoru symptomatičnosti napadení, je defoliace (soubor grafů 12A a 12B). Ta však nebyla hlavním předmětem zájmu této práce, spíše se jednalo o doprovodný ukazatel napadení. Hodnocení defoliace stromů proběhlo dvakrát nezávisle – poprvé 10. srpna 2023 spolu s ostatními měřeními, které jsem provedla společně s Mgr. Zuzanou Lhotákovou, Ph.D. (p-hodnota 0,031; soubor grafů 12A); podruhé 4. října 2023 Ing. Markétou Macháčovou (p-hodnota 0,010; soubor grafů 12B).

Žádné fluorescenční ani biofyzikální (relativní obsah pigmentů, LMA, WC) parametry nevykazují signifikantní rozdíl mezi faktory (soubor grafů 12C-12O), a tudíž nemohou sloužit jako ukazatel napadení olše lepkavé patogenem komplexu *P. alni*.



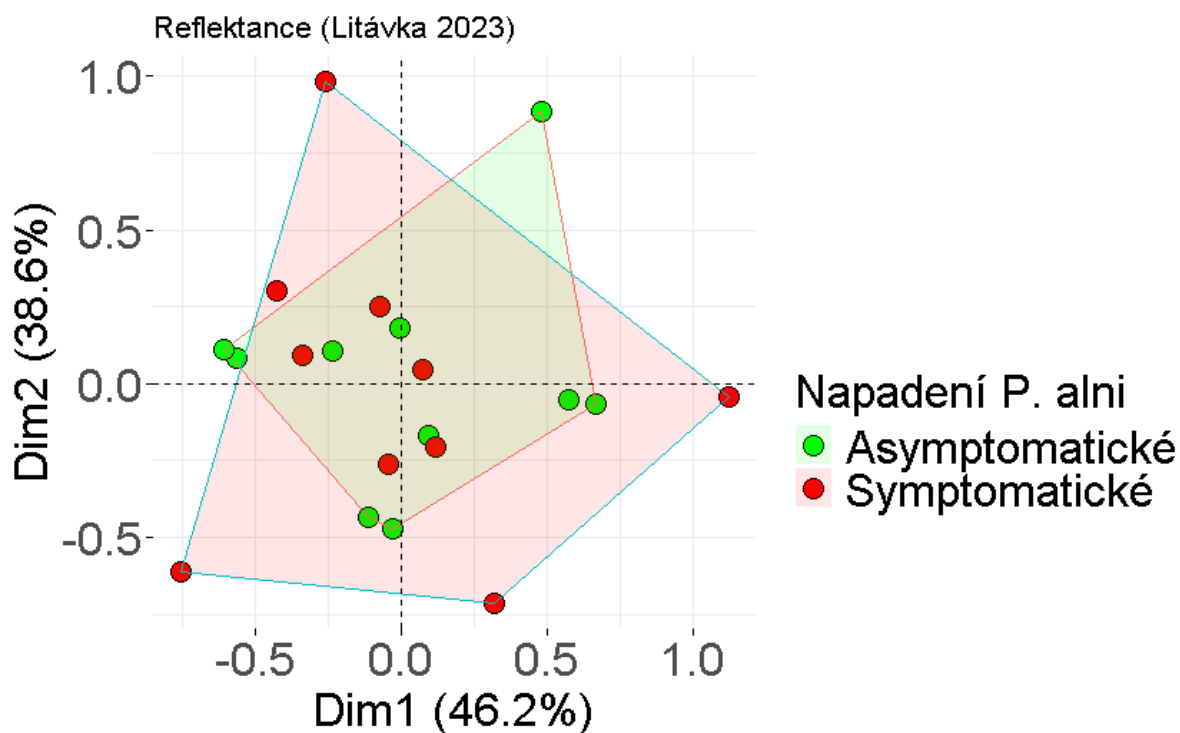




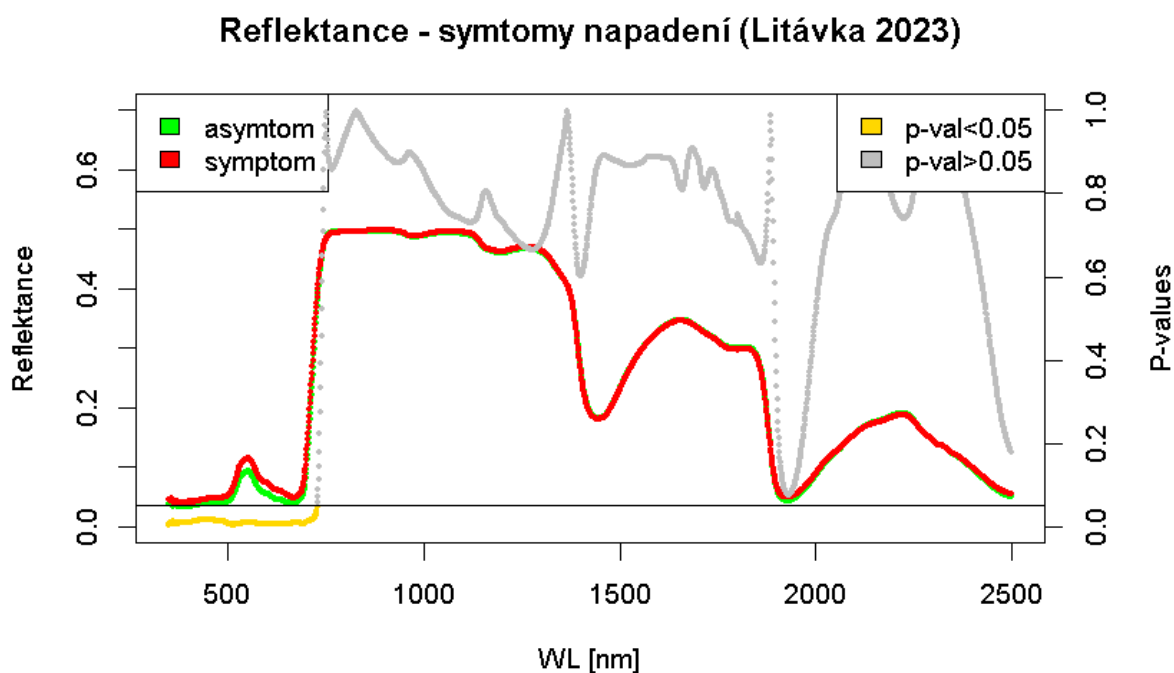
Soubor grafů 12: Porovnání středových tendencí vybraných fluorescenčních a biofyzikálních parametrů listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k projevům příznaků napadení patogenem *Phytophthora alni* (asymptomatické stromy: zelená, symptomatické stromy: červená) v povodí řeky Litavky v srpnu 2023. Pokud byl rozdíl ve faktoru symptomatickosti jedince signifikantní ( $< 0,05$ ), příslušná  $p$ -hodnota je uvedena v grafu.

### 4.3.2 Optické vlastnosti

Měření odrazivosti (reflektance) listovní olše lepkavé potvrdilo trend většího rozptylu spektrálních hodnot (graf 16) pro jedince vykazující jednoznačné symptomy napadení patogenem *P. alni*. Další analýzy prokázaly signifikantní rozdíl v odrazivosti listovní v oblasti viditelného záření (zhruba 380 – 700 nm; graf 17).

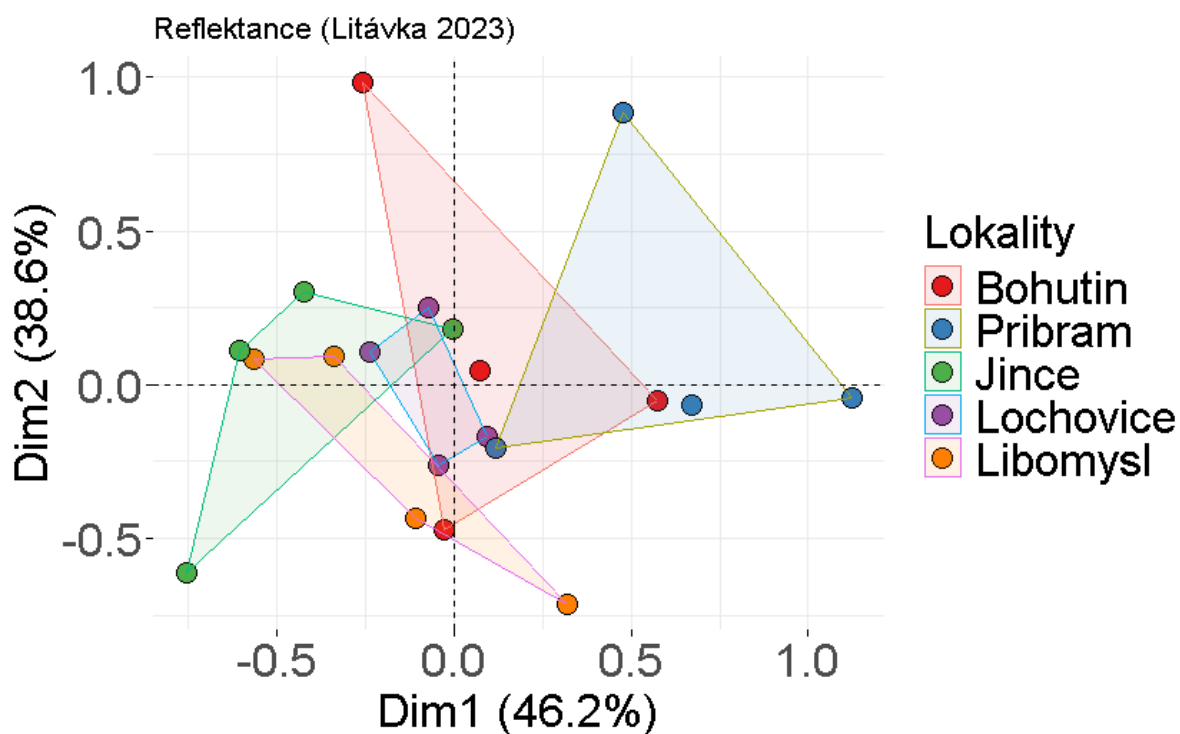


Graf 16: Analýza hlavních komponent reflektance listovní olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k napadení patogenem *Phytophthora alni* v povodí řeky Litávky v srpnu 2023.



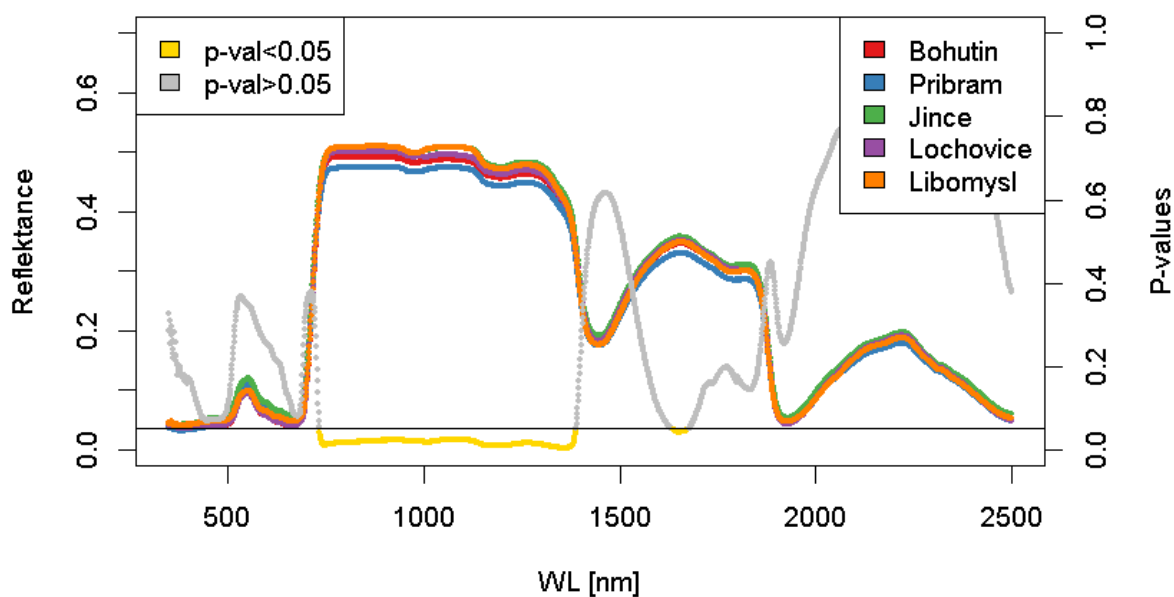
Graf 17: Křivky spektrální odrazivosti listovní asymptomatických (zelená) a symptomatických (červená) jedinců olše lepkavé (*Alnus glutinosa*), rostoucích se v břehových porostech řeky Litávky s potvrzeným výskytem patogena *Phytophthora alni*. Pro každé měření vlnové délky byl proveden t-test. Výsledné p-hodnoty menší než hladina významnosti 0,05 jsou v grafu znázorněny žlutou barvou, p-hodnoty větší než hladina významnosti 0,05 šedou barvou.

Mezi lokalitami na řece Litávka byl již na základě analýzy hlavních komponent patrný jistý rozdíl (graf 18) a tento byl potvrzen i další analýzou (ANOVA), která ukázala signifikantní rozdíl mezi alespoň dvěma lokalitami v oblasti blízkého a krátkovlnného červeného záření (přibližně 700 – 1400 nm; graf 19). Z dat, která zde nejsou zahrnuta, však nebyl patrný žádný jednoznačný trend vývoje intenzity napadení ve směru po nebo proti proudu. Z důvodu nedostatku informací o ekologických podmínkách jednotlivých stanovišť se otázkou rozdílu mezi nimi již dále nebudu zabývat, neboť další interpretace by mohla být velmi zavádějící.



Graf 18: Analýza hlavních komponent reflektance listové olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) ve vztahu k místě odběru v povodí řeky Litávky v srpnu 2023. Lokality jsou řazeny ve směru po proudu od horní části toku.

### Reflektance - lokality (Litávka 2023)



Graf 19: Křivky spektrální odrazivosti listoví olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) pocházející z pěti lokalit na řece Litávka. Lokality jsou řazeny ve směru po proudu od horní části toku. Pro každé měření vlnové délky byl proveden t.test. Výsledné p-hodnoty menší než hladina významnosti 0,05 jsou v grafu znázorněny žlutou barvou, p-hodnoty větší než hladina významnosti 0,05 šedou barvou.

## 6 Diskuze

### 6.1 Hlavní komorový experiment 2022

První komorový experiment byl postaven na premise, že *Phytophthora × alni* je agresivní půdní patogen a mladé semenáče olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) velmi rychle oslabí až usmrtí (Chandelier et al., 2016). Očekávané příznaky zahrnovaly chlorózy, léze na krčku kmenů a potažmo nekrózy kořenového systému. Z důvodu očekávaného rychlého odumření olší byly do experimentu zařazeny i další faktory, které mohly vztahu strom-patogen potenciálně zasáhnout. U faktoru provenience nás zajímalo, zda norský genetický pool, který v kontaktu v přirozeně se vyskytující nákazou není tak dlouho jako český (Bjelke et al., 2016), bude patogenu odolávat lépe či hůře (Štochlová et al., 2016). Faktor rozdílné koncentrace vzdušného CO<sub>2</sub> v růstových komorách měl přinést rozměr probíhající klimatické změny a prozkoumat, jak bude v tomto kontextu ovlivněn vztah strom-patogen (Smith and Luna, 2023). Přestože tyto předpoklady stavěly na rešerši a zkušenostech mnoha vědeckých pracovníků (Macháčová et al., 2024), realita tohoto experimentu dopadla naprosto mimo naše očekávání.

Detekovali jsme nízkou patogenezí *P. × alni*, která, přestože byla podporována opakovaným zaplavitím a dodatečnou inokulací v průběhu experimentu, nezasáhla rostliny s předpokládanou silou a symptomy onemocnění se vůbec neprojevily. Druh *P. × alni* má vysokou vnitrodruhovou variabilitu v agresivitě, s jakou olše napadá (Štochlová et al., 2016). Není známo, zda je tato vlastnost podmíněná morfologicky, fyziologicky či jinak. Trzewik et al. (2021) poukázal na rozdíly mezi izoláty *P. × alni* podle země původu a podle metody odběru. Z jejich výsledků jasně vyplývá, že nejagresivnější jsou inokula pocházející ze vzorků *P. × alni* odebraných z půdy. Inokulum použité v obou našich komorových experimentech pocházela z odběrů z kmene infikovaných olší lepkavých z povodí řeky Litavka. A práce (Clemenz et al., 2008), kde byla provedena inokulace *P. × alni* pod kůru mladých olší, ukázala, že i v rámci izolátů pocházejících ze stejného zdroje (odebrány z lézí napadených dospělých stromů) je vysoká variabilita v agresivitě. Značný rozdíl v agresivitě infekce byl prokázán i u dalších druhů *Phytophthora* (mimo komplex *P. alni*), které napadají další druhy evropských dřevin (Corcobado et al., 2022; Milenković et al., 2018).

Důvodem absence projevu patogenu může být i snaha simulovat přírodní podmínky způsobem inokulace do půdy s následným zaplavením kořenů, narozdíl od více invazivní metody podkorní inokulace prováděné v různých předchozích pracích (Chandelier et al., 2016; Macháčová et al., 2024; Trzewik et al., 2021). Na druhou stranu absence běžných symptomů, totiž lézí kořenového krčku a kmene, spolu s pozitivní reizolací patogenu nabízela posouzení sledovaných parametrů jako markerů presymptomatické či asymptomatické infekce.

Z pigmentů se jako jediný potenciální marker podle signifikantního rozdílu v jednom měření a trendu nižší akumulace u inokulovaných rostlin jevíly anthokyany. Tato skupina pigmentů plní v listu roli antioxidantů či fotoprotektivních látek a jejich hodnoty se zvyšují v reakci na stres (Close and Beadle, 2003). Pro další studium by bylo vhodné kromě příručního optického přístroje pro detekci antokyanů a flavonolů využít biochemické stanovení širšího spektra sekundárních metabolitů fenolického charakteru. Například quercetin 3-O-glucuronid, etylester kyseliny gallové

a další fenolické látky se ukázaly jako markery pro zvýšenou odolnost k infekci *P. cinnamomi* u kaštanovníku setého (Dorado et al., 2023). Absenci makroskopických příznaků si vysvětlujeme příliš dobrými růstovými podmínkami, které rostlinám umožnily efektivní obranu proti napadení.

Všechny fluorescenční parametry odvozené z OJIP testu se k inokulaci patogenem ukázaly jako necitlivé, což je v souladu s výsledky studie Macháčová et al., 2024. Na druhou stranu to byly právě fluorescenční parametry, které se prokázaly být jasným ukazatelem rozdílu ve fyziologii primární fotosyntézy české a norské provenience olše lepkavé. Následné analýzy interakcí faktorů přinesly pouze sporadické signifikantní výsledky. Z toho lze usuzovat, že obě provenience mají jisté geneticky podmíněné rozdíly ve fyziologii, ovšem tyto rozdíly nezasáhnou do reakcí na infekci *P. ×alni* či na zvýšenou koncentraci atmosférického CO<sub>2</sub>. Je nezbytné také zmínit zřetelné makroskopické rozdíly mezi proveniencemi – české olše byly celkově vyšší než norské. Z toho důvodu muselo nezbytně docházet ke kompetici o světlo, jelikož provenience byly pěstovány v boxech společně.

Jako nejvýznamnější ukazatel fyziologického rozdílu mezi českou a norskou proveniencí se projevil fluorescenční parametr Pi\_Abs (v literatuře uváděný jako PI<sub>ABS</sub>). Zkratka PI<sub>ABS</sub> pochází z anglického „performance index in absorption“ a parametr je definován jako „výkonnostní index (potenciál) pro zachování energie z fotonů absorbovaných PSII až po redukci mezisystémových akceptorů elektronů“ (Bussotti et al., 2020). Parametry PI jsou obecně považovány za velmi citlivé ukazatele stresu, protože v sobě zahrnují mnoho dílčích fluorescenčních parametrů (Strasser et al., 2000). V kontextu tohoto experimentu to přináší zjištění, že dvě rozdílné provenience olší reagovaly v účinnosti přenosu fotochemické energie na stres. To, zda se jednalo o stresor *P. ×alni*, či například kompetici o světlo, se můžeme pouze domnívat, z dat to jednoznačně nevyplývá.

Z časových důvodů nebyly zanalyzovány optické vlastnosti získané přístrojem ASD FieldSpec, ovšem na základě výsledků z měření pigmentů a fluorescenčních parametrů nelze předpokládat, že by se v nich objevily nějaké závratně pozitivní výsledky. To ale nic nemění na skutečnosti, že optická měření budou zahrnuta v pozdějších publikacích.

V průběhu celého experimentu nebylo na rostlinách patrné žádné makroskopické poškození, ba ani ztráta vitality v důsledku infekce patogenem. To mohlo být zapříčiněno řadou vlivů, například nízkou agresivitou použitého izolátu, zvolenou technikou získání onoho izolátu, způsobem inokulace pěstovaných rostlin, vysokou mírou kompetice mikroorganismů v substrátu, či nadstandardně vhodnými podmínkami pro růst a zdraví sazenic olší. Rozdíly v patogenitě *P. ×alni* podle způsobu odběru izolátu se zabývá práce Trzewik et al., 2021, v níž autoři provedli jednoduchý test patogenity s listy a větévkami olší plovoucími na hladině vody obsahující určitý izolát *P. ×alni*. Následné inokulace semenáčů olší prokázaly, že nejvíce potentní izolát z předchozího pokusu způsobil největší škody i na mladých stromech. Není to však zaručeně spolehlivé – Ďurkovič et al., 2021 v diskuzi zmiňuje, že izoláty *Phytophthora* sp., které se v laboratorním experimentu chovají agresivně, se v následujícím experimentu na mladých stromech rostoucích venku, ukázaly být dost mírné. Přesto si myslím, že před zahájením rozsáhlého experimentu, jako byl ten náš, by bylo na místě mít více rozdílných izolátů *P. ×alni*, otestovat jejich

agresivitu a následně vybrat ten nejvíce potentní. V obou experimentálních částech této práce jsme vždy pracovali se stejným izolátem *P. ×alni* odebraným z pletiv nakažených olší z povodí toku Litavka. Kromě původu izolátu je pro úspěšnost infekce určující také způsob inokulace. My jsme zvolili inokulaci do půdy ke kořenům s následným zaplavením, jelikož jsme chtěli co nejvěrněji simulovat přírodní způsob napadení olší *P. ×alni*. Nicméně práce (Chandelier et al., 2016; Ďurkovič et al., 2021) ilustrují, jak efektivní by byla inokulace přímo pod kůru za použití agarového disku s patogenním inokulem. Na druhou stranu, práce (Milenković et al., 2018) ukazuje, že úspěšnost inokulace nezáleží na metodě – pod kůru nebo do půdy, obojí bylo stejně úspěšné.

Hypotézu, že *P. ×alni* mohla být v substrátu vykompetována jiným půdním mikroorganismem, jsme se rozhodli ověřit v druhém, doplňujícím laboratorním experimentu. Ten stavěl na obecném přesvědčení, že rod *Phytophthora* je relativně slabý půdní kompetitor (Jönsson, 2004). Neúspěch prvního komorového experimentu však nemusel být způsoben pouze nízkou agresivitou či schopností kompetice vybraného izolátu *P. ×alni*. V půdě mohly být přítomny takzvané “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR), tedy rhizobakterie podporující růst rostlin, které se v přirozených podmínkách v půdě vyskytují. Jejich role spočívá v produkci nespočtu regulačních molekul, které napomáhají růstu a vývoji rostlin. Činí tak cestou fixace dusíku, produkcí fytohormonů a enzymů, nebo již zmiňované kompetice s patogenními mikroby (Fuller et al., 2023). Byly provedeny odběry použitého substrátu právě pro genetickou analýzu složení mikroorganismálního společenstva, ovšem výsledky těchto analýz zatím nejsou k dispozici, a tak naše úvahy na toto téma jsou prozatím čistě literárně podložené.

## 6.2 Doplnující komorový experiment 2023

Druhý komorový experiment, manipulující se sterilitou substrátu, měl sloužit jako ověření jedné z možných teorií o neúspěšnosti prvního komorového experimentu – tedy o nízkém míře infekce olší lepkavých jejich kořenovým patogenem *Phytophthora ×alni*, zapříčiněné kompeticí mikroorganismů v pěstebním substrátu. Z toho důvodu byl tento experiment koncipován jako malý doplňující pokus, nikoliv jako samonosný experiment. I přes výhrady Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. nebyla do pokusu zahrnutá kontrola bez inokulace *Phytophthorou ×alni*, ovšem z důvodu obsazenosti růstových komor to nebylo dobře proveditelné. Naneštěstí se právě tato skutečnost zpětně ukázala být zásadním nedostatkem experimentu. Výsledky totiž naznačují větší rozptyl v hodnotách měřených parametrů pro rostliny rostoucí ve sterilním substrátu oproti substrátu bez sterilizace, nikoliv však signifikantní rozdíly v průměru mezi ošetřeními. Ke smysluplné interpretaci a vyvození závěrů by bylo potřeba znát středové tendence neinokulovaných semenáčů pěstovaných ve sterilním a nesterilním substrátu. Rozdíl v rozptylech může být dán čistě náhodným efektem spojeným se sterilitou, jelikož tento rozdíl byl mnohdy patrný ještě před inokulací. S přítomností patogenu *P. ×alni* tak nemusí vůbec souviset. Na druhou stranu Štochllová et al. 2016 argumentují, že rezistence k *P. ×alni* ve zkoumaných populacích na území Česka je založena spíše na odolnosti individuálních genotypů než lokálních populacích. Zvýšený rozptyl v měřených funkčních znacích listoví by mohl být důsledkem různých reakcí odolných a citlivých jedinců.

Pro další vysvětlení mikrobiální kompetice ve sterilním a nesterilním substrátu z něj byly odebrány vzorky pro analýzu nukleových kyselin, která by měla přinést informaci o podílu zastoupení mikroorganismů – bakterií, oomycet a hub. Tyto analýzy však nebyly provedeny v době dokončení diplomové práce. Bude ale velmi zajímavé sledovat, co tyto analýzy přinesou. Je známo, že v půdě se vyskytující PGPR mohou oslabit patogenicitu *P. cinnamomi* na sazenicích avokáda, jak se zmiňuje ve svém zajímavém review (Fuller et al., 2023). Tento efekt je připisován celulózové aktivitě PGPR, které tímto značně poškozují schopnost patogenu produkovat sporangia. Přítomnost PGPR v substrátu obou komorových experimentů by mohla vysvětlit výkyvy v patogenези, které jsme pozorovali.

Dalším zásadním nedostatkem, se kterým je při interpretaci výsledků druhého komorového experimentu nutno počítat, je špatná kalibrace relativní vzdušné vlhkosti (RH, „relative humidity“) v růstových komorách. Olše byly vysety a pěstovány v růstové komoře s nastavenou hladivou RH 80 %. S postupujícím růstem sazenic se však RH pohybovala kolem 95 %, protože růstová komora nebyla schopná efektivně regulovat své vnitřní prostředí. Při inokulaci a zaplavení substrátu (23. 6. 2023 v 6 měsících stáří) byly rostliny přemístěny do jiné komory v domnění, že bude zde budou hodnoty RH při stejném nastavení nižší. Nestalo se tak a v době druhého zaplavení (14. 7. 2023) byla RH nastavena na 65 %, což konečně vedlo ke snížení skutečné RH pod 90 %. V datech se tento krok velmi výrazně projevil a pravděpodobně ovlivnil veškeré výsledky. Olše lepkavá je ze své podstaty strom obývající vlhká prostředí, a protože my jsme se snažili tyto podmínky co nejvěrohodněji simulovat, i v našem experimentu rostly sazenice v silně promáčeném substrátu. To mohlo vést k intenzivní transpiraci a v důsledku také k rozvoji listové plochy, což zpětnovazebně opět posílí transpirační tok. Velmi názorný je rozdíl v LMA a WC parametrech mezi druhým a třetím měřením (soubor grafů 11), ale rozdíl před a po změně nastavení růstových komor je znatelný i v dalších parametrech. Proto by měření před a po změně měla být porovnávána jen opatrně. Do rozvoje *P. × lani* v substrátu tato změna s velkou pravděpodobností nezasáhla, protože ten zůstal stále permanentně vlhký. Naopak snížení míry transpirace mohlo alterovat s fyziologickými poměry v rostlině, díky čemuž mohlo být napadení *P. × alni* lépe viditelné v měřených parametrech. Toto okrajově koresponduje s výsledky práce Ďurkovič et al., 2021, která přinesla poznatky o oscilacích transpiračního toku při napadení patogenem *Phytophthora* sp. Další studie potvrzují, že fytoftorové onemocnění zapříčiňuje zavírání průduchů a v důsledku i pokles rychlosti čisté fotosyntézy (Oßwald et al., 2014).

Při bližším pohledu na dva fluorescenční parametry, které vykazují signifikantní rozdíl mezi ošetřeními, si musíme povšimnout, že se v obou případech jedná o měření ze 4. 8. 2023 - tedy 6 týdnů po inokulaci a po snížení vzdušné vlhkosti v růstových komorách. Konkrétně se jedná o parametry ABS/RC a DI<sub>0</sub>/RC (z technických důvodů v grafech uváděny jako ABS\_RC a DI<sub>0</sub>\_RC; soubor grafů 8G a 8J). První z nich, ABS/RC, je zkratkou pro anglické „absorption per active reaction center“, což znamená „absorpce na aktivní reakční centrum“ a vyjadřuje celkovou absorpci energie PSII dělenou počtem aktivních reakčních center. Druhý fluorescenční parametr, DI<sub>0</sub>/RC, vyjadřuje tok disipované excitační energie (na teplo a fluorescenci) v čase měření nula, dělený počtem aktivních reakčních center (Strasser et al., 2000) a jeho hodnoty jsou tedy řádově nižší, než



ABS/RC, protože se jedná pouze o frakci z celkové zachycené energie. Hodnoty ABS/RC i DIO/RC se obecně zvyšují, dojde-li k inaktivaci většího počtu reakčních center, protože se zvýší poměr absorpce či disipace v poměru na jedno reakční centrum (Strasser et al., 2000.). Právě zvýšení hodnot obou parametrů je velice dobře patrné ve zmiňovaném měření v případě sterilního substrátu. Lze spekulovat, zda to bylo zapříčiněno změnou relativní vlhkosti vzduchu v komoře, či zda to můžeme připsat postupující infekci patogenem. Je dost dobře možné, že došlo k interakci těchto dvou faktorů a náhlá změna prostředí umocnila vliv *P. ×alni* ve sterilní půdě. To mohlo zapříčinit odpojení většího množství reakčních center v elektron-transportním řetězci jakožto prevenci proti vzniku ROS.

Celkově vzato, fluorescenční parametry jsou poměrně nekonzistentní ukazatele napadení patogenem *Phytophthora* sp. Například práce (Corcobado et al., 2022) zjistila, že napadení *P. plurivora* a *P. cambivora* na buku lesním (*Fagus sylvatica*) se ve fluorescenci chlorofylu projeví pouze v rané fázi infekce (dva týdny po inokulaci do kůry). Později se tyto hodnoty buď vrátily zpátky do normálu, nebo rostliny ztratily olistění úplně a záhy uhynuly. S prvním z těchto zjištění koresponduje (Ďurkovič et al., 2021), který v diskuzi podotýká, že v průběhu léta byla nižší elektron-akceptorová kapacita PSII, ale některé stromy v létě regenerovaly a kompenzovaly ztráty, nejspíše proto, že zvolená *Phytophthora* sp. nebyla tak agresivní.

Otázka možnosti sledování vztahu olše a *P. ×alni* z optických vlastností listu nebyla v našem experimentu uspokojivě potvrzena, ale ani vyvrácena. Spektrální křivky transmitance i reflektance naznačují jisté rozdíly v absorpčních spektrech chlorofylu a vody (soubor grafů 10 – reflektance + transmitance 4. 8. a 23. 8.), rozdíl to však není statisticky významný. Vztahem olše lepkavé a *P. ×alni* se z pohledu optických vlastností zabývá práce Croeser et al., 2022, kde autoři dochází k velmi nejednoznačným výsledkům. Existují práce, které řeší obdobný vztah na příkladu jiných druhů dřevin a jiných druhů rodu *Phytophthora*, například (Croeser et al., 2022) na australské dřevině *Corymbia calophylla* a patogenech *Phytophthora cinnamomi* a *Phytophthora multivora* nebo (Hornero et al., 2021) na španělském dubu *Quercus ilex* subsp. *ballota* a patogenu *Phytophthora cinnamomi*. První zmíněná práce prezentuje poněkud nejednoznačné výsledky detekce napadení z vegetačních indexů vypočítaných na základě spektrální odrazivosti. Druhá z výše zmíněných prací určuje napadení patogenem ze spektrální křivky reflektance u ještě asymptomatických jedinců. Jedná se tedy opět o konfliktní výsledky a tento vztah si jistě zaslouží další prozkoumání.

### 6.3 Terénní šetření v povodí řeky Litavky 2023

Terénní měření velmi názorně potvrdilo naši hypotézu o celkovém větším rozptylu ekofyziologických parametrů u stromů viditelně napadených patogeny z komplexu *P.alni*. Tento jev si vysvětlují individualitou každého jedince a rozdílnými schopnostmi vypořádat se s postupujícím patogenem (Štochlová et al., 2016). V našem terénním šetření v povodí Litavky byl příslušný strom ohodnocen jako příznakový na základě přítomnosti čerstvých lézí na kmeni. Léze způsobuje přímo patogenní komplex *P.alni*, který z kořenového systému postupuje výše do kmene a způsobuje nekrózy vodivých pletiv. Je to tedy znak přítomnosti silného patogenu, se kterým se

strom musí aktivně vypořádávat (Černý et al., 2021). Lze předpokládat, že každý dospělý strom bude k obraně přistupovat rozdílně – v závislosti na podmínkách stanoviště, předchozím fyziologickém stavu, genetické výbavě (Štochlová et al., 2016), a že tato symbióza s patogenem se bude v čase vyvíjet. Celkový rozdíl v rozptylech měřených parametrů, který můžeme vidět v našich měřeních (graf 13) je tedy pravděpodobně zapříčiněn právě probíhajícím bojem strom vs. patogen, který jsme zachytili v jedné určité fázi.

Dalo by se předpokládat, že pokud bychom stromy hodnotili na škále symptomatickosti, namísto binárního označení symptomatický vs. asymptomatický, mohli bychom pozorovat trend rozšiřujících se rozptylů jednotlivých parametrů společně s rostoucí mírou nákazy. Podobně k problému přistupovali autoři práce [Guerra-Hernández et al., 2021](#), kde při terénním výzkumu pracovali se čtyřmi třídami podle míry defoliace. Z důvodu nízkého počtu hodnocených jedinců jsme přistoupili pouze k odlišení dvou tříd dle symptomů nákazy na kmeni.

Oproti tomu stromy hodnocené jako bezpříznakové můžeme považovat za jedince před nebo po selekci ve vztahu k nákaze komplexem *P. alni*. Jelikož je v řece Litavce přítomnost tohoto komplexu patogenů potvrzena, a protože všechny označené olše pocházejí z bezprostřední blízkosti toku, lze tvrdit, že všechny stromy přišly do kontaktu s patogenem. Asymptomatictí jedinci budou takoví, kteří jsou vůči nákaze díky své individualitě odolní – možná zabránili vstupu patogena, možná zastavili jeho šíření uvnitř pletiv (Oßwald et al., 2014). Každopádně tyto stromy nastolily v tomto vztahu jakousi rovnováhu, a tudíž i měřené hodnoty sledovaných parametrů budou vzájemně více podobné. Pokud by v tomto pozorování byla zahrnuta i kontrola s nákazou komplexu *P. alni* z nezasazeného území, bylo by zajímavé porovnat, zda se uvažované znaky listové asymptomatické olše liší od olší bez vystavení patogenu.

Při bližším pohledu na jednotlivé vybrané parametry (soubor grafů 12) je zřejmé, že průměrné hodnoty se výrazně neliší (což ostatně potvrdila i analýza t-testem). Jediný rozdíl vykazuje defoliace a to jasně dokazuje, že vyšší míra defoliace je průvodní symptom právě probíhajícího a pokročilého napadení olše lepkavé patogeny z komplexu *P. alni*, což potvrzuje většina studií ([Guerra-Hernández et al., 2021](#), [Černý et al.](#)). Velmi podobné analýzy, akorát na větším množství vzorků, provedli autoři práce [\[100\]](#) et al., 2021, kde sledoval napadení dubu *Quercus ilex subsp. Ballota* patogenem *Phytophthora cinnamomi*. Autoři rozlišovali u sledovaných stromů 4 stupně intenzity napadení, ale pokud by porovnávali pouze symptomatické a asymptomatické jedince, dokumentovali zásadní posun rozptylu sledovaných parametrů (v jejich případě leaf area index, obsah chlorofylu a karotenoidů, LMA, obsah vody a obsah anthokyanů) - tedy jeho zvýšení u jedinců symptomatických.

Velmi výrazné rozdíly v rozptylech jsou v našich datech patrné u relativního obsahu anthokyanů (AnthM), flavonoidů (FlvM) a dusík-flavonového indexu (NFI; soubor grafů 12D až 12F). Anthokyany plní v listech mnoho funkcí a jejich hladiny kolísají v závislosti na řadě faktorů (Close and Beadle, 2003). V kontextu této práce je nasnadě zdůraznit jejich roli jakožto antioxidantů – při působení stresoru, například v podobě patogena, se v rostlinných buňkách objevují zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou nenávratně poškodit mnohé buněčné

struktury, včetně DNA. Anthokyany, jakožto antioxidanty, pomáhají rostlině odbourávat ROS a proto při napadení pozorujeme jejich zvýšenou koncentraci (Close and Beadle, 2003). Naše pozorování neumožňuje porovnat hladiny anthokyanů mezi napadenými a nenapadenými jedinci, ale je z nich velmi dobře patrný rozdíl v rozptylu koncentrací u symptomatických a asymptomatických stromů (soubor grafů 12C). Symptomatictí jedinci vykazují výrazně širší rozptyl, což si opět vysvětlují právě probíhajícím bojem s postupující infekcí, který jsme zachytili v různých fázích vývoje. Příčina rozdílu tkví v principu fungování infekce patogenem rodu *Phytophthora* – nekrózy vodivých pletiv způsobí rostlině vodní stres a ten zapříčiní v listech vznik ROS, kterým se rostlina brání nárůstem obsahu antioxidantů, kam spadají právě anthokyany (Dorado et al., 2023a).

Flavonoidy jsou rozmanitou skupinou sekundárních metabolitů, kam mimo jiné patří i anthokyany a flavonoly. Obecně se jedná o fyziologicky aktivní látky, které celkově hrají důležitou roli v rostlinné odolnosti proti biotickým i abiotickým stresorům. Mohou sloužit jako fotoprotektanty, antioxidanty, nebo jako signální molekuly podporující další obranné mechanismy rostliny (Treutter, 2006). Lze předpokládat, že v případě aktivně probíhající infekce patogenem, budou hladiny flavonoidů v rostlině zvýšené. Z našich pozorování opět vyplývá, že symptomatické olše, právě bojující s patogeny komplexu *P. alni*, mají větší rozptyl hodnot obsahu flavonoidů v listech – kam se patrně promítají hladiny z celého těla rostliny (soubor grafů 12E).

Obsah dusíku v listech je velmi důležitým ukazatelem nutričních poměrů v napadeném stromu. Zejména proto, že se v této práci zabývám olší lepkavou – stromem s hlízkovými bakteriemi vážícími vzdušný dusík, a kořenovými patogeny komplexu *P. alni* způsobujícími nekrózy pletiv. Je tedy nasnadě, že strom čelící silnému napadení bude mít celkově snížený obsah dusíku v pletivech, což bylo zjištěno i na opadu symptomatických stromů *Alnus lusitanica* (Ferreira et al., 2022a). Tento jev v našich měřeních (soubor grafů 12F) pouze lehce naznačen – symptomatické stromy mají průměrnou hodnotu NFI index lehce nižší než asymptomatické. Také větší rozptyl NFI u symptomatických jedinců podporuje tvrzení o jejich silnějším napadení a rozdílných schopnostech bránit se.

Fluorescenční parametry se v tomto ohledu neukázaly příliš slibnými ukazateli, když tedy počítáme pouze s rozdílem rozptylů. Snad možná parametr „Psi<sub>o</sub>“, ovšem jeho interpretace je poměrně komplikovaná. Manuál FluorPenu tento paramet definuje jako  $Psio = 1 - VJ$  (tabulka 1), což se dá vyložit jako jednotka variabilní fluorescence v bodě J na OJIP křivce (2 ms). Přeneseně, podle vzorce  $Vj = (Fj - FO) / (Fm - FO)$ , to znamená proporcí z maximální intenzity fluorescence, kterou rostlina nedokáže zužítkovat daném v bodě. Toto nepřímou ukazuje na výkonnost elektron-transportního řetězce. Práce Strasser et al., n.d., detailně se zabývající fluorescenčními parametry, parametr  $\psi_0$  definuje jako „účinnost, s jakou zachycený exciton dokáže posunout elektron dále než na primární elektronový akceptor v elektron-transportním řetězci“ a dále to označuje za jeden z ukazatelů výtěžku primární fotosyntézy. Pokud mají asymptomatické olše nižší rozptyl Psi<sub>0</sub> znamená to, že jejich fotosyntetický aparát má poměrně stabilní výkonnost a opět to svědčí o jakémisi vyrovnáním se s přítomností patogenu.

Dalším parametrem s poměrně viditelným rozdílem je LMA, kde je patrný menší rozptyl hodnot asymptomatických stromů a zároveň lehce nižší průměrná hodnota než u symptomatických jedinců (soubor grafů 12N). LMA, neboli specifická listová hmotnost, je ekofyziologický parametr, který vypovídá o tom, jak moc rostlina investuje do zachycování světelného záření (Poorter et al., 2009). Bylo by zajímavé dále sledovat, zda symptomatické olše při boji s kořenovým patogenem *P. alni* skutečně investují více zdrojů do listů než asymptomatické. Výsledky této práce i studie [Ferreira et al., 2022](#) toto pouze naznačují, rozdíl však není průkazný.

Optické vlastnosti listoví vypovídají o biochemickém složení i vnitřní struktuře listu a jejich interpretace může být velmi komplexní. Z našich dat vyplývá signifikantní rozdíl v odrazivosti listů symptomatických a asymptomatických jedinců ve viditelné části spektra (graf 17). Do této části křivky se promítají především absorpční pásy chlorofylů (430 nm a 660 nm pro chlorofyl *a*, 450 nm a 650 nm pro chlorofyl *b*) (Albrechtová et al., 2017). Chlorofyly v daných vlnových délkách dopadající záření absorbují, a tudíž nižší hodnoty reflektance značí vyšší obsah chlorofylů u asymptomatických olší. Toto zjištění koresponduje s trendem k mírně vyššímu obsahu chlorofylu zjištěnému pomocí přístroje MPM a teorií, že asymptomatictí jedinci jsou zdravější a lépe se vypořádali s přítomností patogena. Podobné výsledky reportuje i (Croeser et al., 2022), kde autoři pozorovali rozdíl v reflektanci u rostlin infikovaných jinými patogeny rodu *Phytophthora* než *P. ×alni*, ovšem především ve vlnových délkách vypovídajících o obsahu vody.

#### 6.4 Využití získaných poznatků v managementu fytoftorového onemocnění

Klíčovou myšlenkou celé práce byla potenciální aplikace získaných poznatků v monitoringu a managementu fytoftorového onemocnění olše lepkavé. Z toho důvodu jsme zvolili neinvazivní metody s potenciálem pro velkoplošné využití v terénu. Současná praxe monitoringu ekosystémů dálkovým průzkumem pracuje nejčastěji se spektrálními vlastnostmi porostu (Abdulridha et al., 2016; Croeser et al., 2022; Gold et al., 2020; Guerra-Hernández et al., 2021; Hornero et al., 2021). My jsme se rozhodli hodnotit ne jenom optické vlastnosti, ale také fluorescenci chlorofylu a relativní obsah pigmentů v naději, že nalezneme nové parametry (nebo jejich kombinace) vypovídající o fyziologickém stavu rostliny typickém pro infekci patogenem rodu *Phytophthora*. I přesto se právě optické vlastnosti, specificky odrazivost v absorpčním pásu chlorofylu, ukázaly být zatím nejslibnější ukazatelem zájmového vztahu. Za další nejvíce slibné ukazatele fytoftorového onemocnění z listoví považují parametry LMA, WC, AnthM a ABS/RC. Ovšem pro jejich aplikaci v terénu je potřeba ještě další výzkum.

Průkopníky v monitoringu fytoftorového onemocnění za využití metod dálkového průzkumu země jsou v současnosti [Guerra-Hernández et al., 2021](#) a [Hornero et al., 2021](#). Obě jejich práce byly zaměřené na využití optických vlastností na úrovni porostu. První zmíněná studie se zajímala o rozlišení 4 kategorií míry defoliace pouze na základě spektrální odrazivosti koruny napadeného stromu. Dalším krokem by tedy přirozeně mělo být hledání konkrétních vegetačních indexů, které jsou na fytoftorové onemocnění citlivé. A právě o to se snaží autoři druhé výše uvedené práce. Za použití hyperspektrálních obrazových dat identifikovali řadu parametrů listoví (snímáno ze vzduchu nad úrovní korun stromů), v nichž se odráží nákaza patogenem rodu

*Phytophthora*. Jako citlivé parametry uvádějí obsah vody, chlorofylu, karotenoidů a anthokyanů, dále fluorescenci chlorofylu, LMA, a nárůst teploty koruny. Právě posední míněný parametr se ukázal být ze všech nejcitlivější, což odpovídá předchozím zjištění o uzavírání průduchů v důsledku omezeného příjmu vody při fytoftorovém onemocnění.

Inovativní metodou detekce napadení rostlin patogenem rodu *Phytophthora* by mohly být nanomateriály (Avila-Quezada and Rai, 2023), ovšem toto odvětví je stále na počátku svého praktického využití a převážně se zaměřením na zemědělsky významné druhy, jako je například *Phytophthora infestans* napadající brambory.

S probíhající klimatickou změnou dochází i k zásadním změnám na úrovni ekosystémů. To platí i pro břehové olšové lesy a jejich destruktory, patogeny rodu *Phytophthora*. Jak již bylo zmíněno dříve, stromy rodu *Alnus* mohou být napadeny širokou paletou patogenů rodu *Phytophthora* (Bregant et al., 2023). Ovšem fytoftorové onemocnění je rozšířené po celé Zeměkouli. Například *Phytophthora × cambivora*, vysoce hostitelsky nespécifický patogen dřevin, je hojně rozšířen nejen v Evropě, ale také východní Asii (především v Japonsku), Severní Americe, Austrálii a Chile. (Mullett et al., 2023). Zajímavostí je, že v případě Jižní Korey došlo napadení olší tamních olšových porostů do takových rozměrů, že patogeny komplexu *P. alni* podléhají podobným karanténním opatřením, jako třeba u nás *P. infestans* (Avila-Quezada and Rai, 2023).

V Evropě jsou olše v ohrožení kvůli plošnému rozšíření patogenů komplexu *P. alni*. Úbytek olší v ekosystému uvolňuje prostor pro jiné, invazní druhy N-fixujících dřevin, jako např. trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*). Takovýto posun ve složení břehových porostů, které jsou pro vodní ekosystémy klíčové, by vedl k zásadním změnám celého biotopu. Jeden z konkrétních aspektů, na které to bude mít dopad, je proces rozkladu listového opadu. Právě tímto se zabývá práce Alonso et al., 2024, kde autoři porovnávali míru dekompozice opadu o různém složení. Zařadili i listovní pocházející z olší (*Alnus lusitanica*) napadených patogenem *P. × alni* a nás nepřekvapí, že právě tyto listy byly rozkládány s nejvyšší intenzitou. Jak již bylo zmíněno dříve, v důsledku napadení patogenem rodu *Phytophthora* dochází k akumulaci asimilátů v listovní (Ferreira et al., 2022) a je tedy nasnadě, že právě tyto energeticky bohaté listy budou dekompozitoři preferovat.

To, jak olše ovlivňují mikrobiální společenstvo na stanovišti, rozebírá review Fuller et al., 2023. Již v úvodu jsem zmínila skupinu mikroorganismů PGPR, které svou aktivitou zasahují do vztahu strom-patogen. Jako velmi zajímavá možnost ochrany olšových porostů před fytoftorovým onemocněním se nabízí využití tzv. biocontrol agents (BCA) – tedy specificky vybrané PGPR, které mohou působit přímo na patogeny *P. alni* v půdě (například produkcí hydrolytických enzymů nebo kompeticí o zdroje), nebo podpořit včasné spuštění rostlinné imunity a hormonálních změn. V budoucím výzkumu by tedy mohlo být velmi přínosné identifikovat konkrétní BCA, které by byly schopny zasáhnout do vztahu *Phytophthora*-olše a umožnit tak ochranu olšových porostů.

V současné době je jedinou možností, jak zajistit management napadených olšových porostů, jejich likvidace. Metodický postup těchto prací s ohledem na minimalizaci dalšího šíření *P. alni* shrnuje Černý et al., 2021. Podle něj je potřeba klást důraz na sanitární opatření (dezinfekce pracovních nástrojů, techniky, obuvi) a odstraněný materiál považovat za infekční. Ideální je zlikvidovat jej žehem přímo na lokalitě.

Lze očekávat, že nárůst teplot a častější vlny veder zasáhnou i do vztahu strom-patogen. Zajímavá studie Dorado et al., 2023 se zabývala právě těmito faktory v kontextu fytoftorového onemocnění a jeho projevů v listoví nakažených stromů. Výsledky hovoří jasně: zvýšená teplota v kombinaci s napadením patogenem rodu *Phytohthora* ovlivní obsah řady sekundárních metabolitů v listoví. Toto zavdává podnět pro další sledování fyziologických projevů fytoftorového onemocnění v listoví.

Další důsledek posunu teplotních pásem bude korespondující změna areálu výskytu patogenů komplexu *P. alni*. Konkrétně *P. ×alni* je poměrně citlivá na mráz (Redondo et al., 2015), tudíž stále mírnější zimy a kratší periody mrazu umožní její šíření do vyšších zeměpisných šířek a nadmořských výšek (Corcobado et al., 2023). Postihnuto bude ovšem celé půdní mikrobiální společenstvo a vzhledem ke komplexitě vztahů v tomto prostředí bude jen velmi těžce předpověditelné, jaké následky to může mít na celý ekosystém (Riit et al., 2023).

## 7 Závěr

V závěru diplomové práce postupně hodnotím, zda experimenty a pozorování provedené v letech 2022 a 2023 vyvrací či potvrzují vznesené hypotézy o projevu vztahu *P. alni* a olše lepkavé ve fyziologických vlastnostech listoví. Přesné formulace hypotéz se nachází v kapitole 1.2.

Infekce *P. × alni* se ve své rané fázi na listoví olše lepkavé neprojeví. Žádný z měřených parametrů, na škále od funkčních znaků až po optické vlastnosti listoví, přesvědčivě nepotvrdil teorii o možnosti zachycení počátku nákazy olše lepkavé komplexem *P. alni* za použití právě zmiňovaných metod. Laboratorní experimenty v kombinaci s výsledky z terénního pozorování naznačují, že z určitých fluorescenčních parametrů (např. ABS/RC, DI<sub>0</sub>/RC, Psi<sub>0</sub>) je možné určit pokročilá stádia napadení olší *P. alni*. Tyto výsledky však nejsou konzistentní.

Česká i norská provenience olše lepkavé projevily zásadní rozdíly ve svých hodnotách fluorescenčních parametrů i obsahu pigmentů v listoví, ovšem tento rozdíl nebyl dán přítomností patogenu *P. × alni*. U obou proveniencí olše jsme i přes opakovanou inokulaci a závěrečnou pozitivní reizolaci patogenu pozorovali shodnou absenci reakce na všech zjišťovaných úrovních.

Stejně tak zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře se na funkčních a fluorescenčních znacích listoví nijak neodrazila ani v interakci s inokulací *P. × alni* a lze tedy předpokládat, že nezasahuje do vztahu olše a *P. × alni*.

Sterilita pěstebního substrátu ovlivnila fyziologii listoví olše lepkavé ve smyslu hodnot fluorescenčních parametrů ABS/RC a DI<sub>0</sub>/RC, obsahu vody a LMA. Na základě pozorování vitality rostlin lze usuzovat, že sterilní substrát bez kompetice s dalšími mikroorganismy podpořil rozvoj infekce *P. × alni* a naše měření tento vztah reflektují zejména vyšším rozptylem hodnot pro olše rostoucí ve sterilním substrátu s *P. × alni*.

Z terénního měření vyplynul slibný výsledek pro použití reflektance jakožto optického parametru vhodného k rozlišení napadení olší lepkavých patogenem *P. × alni* v přírodních podmínkách. Tento výsledek uspokojivě podporuje část vyslovené hypotézy a nastiňuje možnost využití monitoringu reflektance olšových porostů k hodnocení jejich vitality v kontextu fytoftorového onemocnění.

Celkově si tuto práci dovoluji uzavřít zamyšlením. Máme před sebou výzvu globálních rozměrů v podobě změny klimatu, která nevyhnutelně zasáhne všechny ekosystémy i aspekty lidského života. Role vědeckého bádání je tedy klíčová a musí být ve středu našeho zájmu přinášet poznání právě v kontextu probíhajících změn. Ekofyziologie rostlin, jakožto disciplína zabývající se dynamickými vztahy mezi rostlinami a jejich prostředím, bude nabírat na významu, a je tedy namístě rozvíjet spolupráce s dalšími vědními obory. V této práci jsme spojili expertízu hned tří kateder ze dvou univerzit, a to je pouhým začátkem budoucích společných výzkumů. Konkrétně fytoftorové onemocnění je problém, který se na první pohled může zdát okrajovým, ovšem s pozvolným posunem areálů mnoha organismů může začít nabírat velkých rozměrů. Včasné zachycení nákazy je klíčovým bodem v prevenci dalšího šíření, a aby to bylo co nejefektivnější, je

nasnadě využití nedestruktivních metod dálkového průzkumu. Věřím, že tato diplomová práce přispěla k pochopení daného problému a nastínila další možnosti směřování na cestě k jeho řešení.



## Seznam literatury

Abdulridha, J., Ehsani, R., de Castro, A., 2016. Detection and Differentiation between Laurel Wilt Disease, Phytophthora Disease, and Salinity Damage Using a Hyperspectral Sensing Technique. *Agriculture* 6, 56. <https://doi.org/10.3390/agriculture6040056>

Albrechtová, J., Kupková, L., Campbell, P.K.E., 2017. Metody hodnocení fyziologického stavu smrkových porostů: případové studie sledování vývoje stavu smrkových porostů v Krušných horách v letech 1998-2013, Vydání první. ed. Česká geografická společnost, Praha.

Avila-Quezada, G.D., Rai, M., 2023. Novel nanotechnological approaches for managing Phytophthora diseases of plants. *Trends Plant Sci.* 28, 1070–1080. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.03.022>

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>

Brasier, C.M., 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., Kirk, S.A., Delcan, J., Cooke, D.E.L., Jung, T., 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., Gibbs, J.N., 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathol.* 44, 999–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02658.x>

Bregant, C., Batista, E., Hilário, S., Linaldeddu, B.T., Alves, A., 2023. *Phytophthora* Species Involved in *Alnus glutinosa* Decline in Portugal. *Pathogens* 12, 276. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020276>

Bussotti, F., Gerosa, G., Digrado, A., Pollastrini, M., 2020. Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large scale plant ecological studies. *Ecol. Indic.* 108, 105686. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105686>

Černý, K., Chumanová, E., Havrdová, L., Haňáčková, Z., Brestovanská, T., Zýka, V., 2021. Invazní patogeny dřevin v životním prostředí: determinace chorob a možnosti omezení šíření a impaktu na lesní ekosystémy. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i., Průhonice.

Černý, K., Pešková, V., Modlinger, R., n.d. ROZŠÍŘENÍ FYTOFTOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ OLŠÍ V LESNÍCH POROSTECH ČR – PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY 2015.

- Cerovic, Z.G., Moise, N., Agati, G., Latouche, G., Ben Ghazlen, N., Meyer, S., 2008. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* 21, 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.012>
- Chandelier, A., Husson, C., Druart, P., 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>
- Chepsergon, J., Motaung, T.E., Bellieny-Rabelo, D., Moleleki, L.N., 2020. Organize, Don't Agonize: Strategic Success of *Phytophthora* Species. *Microorganisms* 8, 917. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060917>
- Clemenz, C., Fleischmann, F., Haberle, K.-H., Matyssek, R., Osswald, W., 2008. Photosynthetic and leaf water potential responses of *Alnus glutinosa* saplings to stem-base inoculation with *Phytophthora alni* subsp. *alni*. *Tree Physiol.* 28, 1703–1711. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.11.1703>
- Close, D.C., Beadle, C.L., 2003. The Ecophysiology of Foliar Anthocyanin. *Bot. Rev.* 69, 149–161. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2003\)069\[0149:TEOFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2003)069[0149:TEOFA]2.0.CO;2)
- Corcobado, T., Cech, T.L., Daxer, A., Ďatková, H., Janoušek, J., Patra, S., Jahn, D., Hüttler, C., Milenković, I., Tomšovský, M., Jung, M.H., Jung, T., 2023. *Phytophthora*, *Nothophytophthora* and *Halophytophthora* diversity in rivers, streams and riparian alder ecosystems of Central Europe. *Mycol. Prog.* 22, 50. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01898-1>
- Corcobado, T., Milenković, I., Saiz-Fernández, I., Kudláček, T., Plichta, R., Májek, T., Bačová, A., Ďatková, H., Dálya, L.B., Trifković, M., Mureddu, D., Račko, V., Kardošová, M., Ďurkovič, J., Rattunde, R., Jung, T., 2022. Metabolomic and Physiological Changes in *Fagus sylvatica* Seedlings Infected with *Phytophthora plurivora* and the A1 and A2 Mating Types of *P. ×cambivora*. *J. Fungi* 8, 298. <https://doi.org/10.3390/jof8030298>
- Croeser, L., Admiraal, R., Barber, P., Burgess, T.I., Hardy, G.E.S.J., 2022. Reflectance spectroscopy to characterize the response of *Corymbia calophylla* to *Phytophthora* root rot and waterlogging stress. *For. Int. J. For. Res.* 95, 312–330. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpab045>
- Dorado, F.J., Alías, J.C., Chaves, N., Solla, A., 2023a. Warming Scenarios and *Phytophthora cinnamomi* Infection in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Plants* 12, 556. <https://doi.org/10.3390/plants12030556>
- Dorado, F.J., Alías, J.C., Chaves, N., Solla, A., 2023b. Warming Scenarios and *Phytophthora cinnamomi* Infection in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Plants* 12, 556. <https://doi.org/10.3390/plants12030556>
- Ďurkovič, J., Bubeníková, T., Gužmerová, A., Fleischer, P., Kurjak, D., Čaňová, I., Lukáčik, I., Dvořák, M., Milenković, I., 2021. Effects of *Phytophthora* Inoculations on Photosynthetic Behaviour and Induced Defence Responses of Plant Volatiles in Field-Grown Hybrid Poplar Tolerant to Bark Canker Disease. *J. Fungi* 7, 969. <https://doi.org/10.3390/jof7110969>

- Evans, H.F., Oszako, T. (Eds.), 2007. Alien invasive species and international trade. Forest Research Institute, Warsaw.
- Ferreira, V., Pazianoto, L.H.R., Solla, A., 2022a. 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>
- Ferreira, V., Pazianoto, L.H.R., Solla, A., 2022b. 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>
- Fleischmann, F., Göttlein, A., Rodenkirchen, H., Lütz, C., Oßwald, W., 2004. Biomass, nutrient and pigment content of beech ( *Fagus sylvatica* ) saplings infected with *Phytophthora citricola* , *P. cambivora* , *P. pseudosyringae* and *P. undulata*. *For. Pathol.* 34, 79–92. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00349.x>
- Fuller, E., Germaine, K.J., Rathore, D.S., 2023. The Good, the Bad, and the Useable Microbes within the Common Alder (*Alnus glutinosa*) Microbiome—Potential Bio-Agents to Combat Alder Dieback. *Microorganisms* 11, 2187. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092187>
- Gold, K.M., Townsend, P.A., Chlus, A., Herrmann, I., Couture, J.J., Larson, E.R., Gevens, A.J., 2020. Hyperspectral Measurements Enable Pre-Symptomatic Detection and Differentiation of Contrasting Physiological Effects of Late Blight and Early Blight in Potato. *Remote Sens.* 12, 286. <https://doi.org/10.3390/rs12020286>
- Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A., Moya, I., 2004. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Appl. Opt.* 43, 4488. <https://doi.org/10.1364/AO.43.004488>
- Guerra-Hernández, J., Díaz-Varela, R.A., Álvarez-González, J.G., Rodríguez-González, P.M., 2021. Assessing a novel modelling approach with high resolution UAV imagery for monitoring health status in priority riparian forests. *For. Ecosyst.* 8, 61. <https://doi.org/10.1186/s40663-021-00342-8>
- Hornero, A., Zarco-Tejada, P.J., Quero, J.L., North, P.R.J., Ruiz-Gómez, F.J., Sánchez-Cuesta, R., Hernandez-Clemente, R., 2021. Modelling hyperspectral- and thermal-based plant traits for the early detection of *Phytophthora*-induced symptoms in oak decline. *Remote Sens. Environ.* 263, 112570. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2021.112570>
- Husson, C., Aguayo, J., Revellin, C., Frey, P., Ioos, R., Marçais, B., 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genet. Biol.* 77, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.013>
- Ingle, A.P., Rathod, D., Brestic, M., Kalaji, H.M., Rai, M., 2017. Biophysical Phenotyping as an Essential Tool for Understanding Host–Microbe Interaction, in: Varma, A., Sharma, A.K. (Eds.), *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 65–80. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_4)

- Jönsson, U., 2004. *Phytophthora* species and oak decline – can a weak competitor cause significant root damage in a nonsterilized acidic forest soil? *New Phytol.* 162, 211–222. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01016.x>
- 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>
- Kļaviņa, D., Striķe, Z., Ciseļonoka, L., Lekavičs, J., Burņeviča, N., Pārums, K., Saulīte-Berene, D., Rudāns, E., Gaitnieks, T., 2024. Phytosanitary assessment of black and grey alder stands in Latvia. *Scand. J. For. Res.* 39, 138–144. <https://doi.org/10.1080/02827581.2023.2290237>
- Lichtenthaler, H.K., 2021. Multi-colour fluorescence imaging of photosynthetic activity and plant stress. *Photosynthetica* 59, 364–380. <https://doi.org/10.32615/ps.2021.020>
- Macháčová, M., Tomášková, I., Corcobado, T., Nagy, Z., Milanović, S., Janoušek, J., Pešková, V., Čepl, J., Gezan, S., Nakládal, O., Zúmr, V., Kalyniukova, A., Milenković, I., Jung, T., 2024. Response of *Alnus glutinosa* to *Phytophthora* bark infections at ambient and elevated CO<sub>2</sub> levels. *Front. For. Glob. Change* 7, 1379791. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2024.1379791>
- Matsiakh, I., Menkis, A., 2023. An Overview of *Phytophthora* Species on Woody Plants in Sweden and Other Nordic Countries. *Microorganisms* 11, 1309. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051309>
- Milenković, I., Keča, N., Karadžić, D., Radulović, Z., Nowakowska, J., Oszako, T., Sikora, K., Corcobado, T., Jung, T., 2018. Isolation and Pathogenicity of *Phytophthora* Species from Poplar Plantations in Serbia. *Forests* 9, 330. <https://doi.org/10.3390/f9060330>
- 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., Jung, T., 2023. Phylogeography and population structure of the global, wide host-range hybrid pathogen *Phytophthora* × *cambivora*. *IMA Fungus* 14, 4. <https://doi.org/10.1186/s43008-023-00109-6>
- Multi Pigment Meter, 2020.
- Nave, C., Schwan, J., Werres, S., Riebesehl, J., 2021. *Alnus glutinosa* Threatened by Alder *Phytophthora*: A Histological Study of Roots. *Pathogens* 10, 977. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080977>
- Oßwald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A.C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R.J., Horta Jung, M., Pfanz, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L.B., Parke, J., Prospero, S., Werres, S., 2014. Strategies of attack and defence in woody plant– *Phytophthora* interactions. *For. Pathol.* 44, 169–190. <https://doi.org/10.1111/efp.12096>
- Parry, C., Blonquist, J.M., Bugbee, B., 2014. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship: The optical/absolute chlorophyll relationship. *Plant Cell Environ.* 37, 2508–2520. <https://doi.org/10.1111/pce.12324>

- Pfanz, H., Mombour, J., Wittmann, C., Fleischmann, F., Oßwald, W., 2015. Chlorophyll fluorescence for visualizing the spatial and temporal spread of *Phytophthora alni* subsp. *alni* in alder bark tissue. *Plant Pathol.* 64, 467–477. <https://doi.org/10.1111/ppa.12256>
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I.J., Villar, R., 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol.* 182, 565–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>
- PSI, 2021. FluorPen FP 110, PAR-FluorPen FP 110, Monitoring Pen MP 100 - Manual and User Guide.
- 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>
- Rial-Martínez, C., Souto-Herrero, M., Piñón-Esteban, P., García-González, I., Aguin-Casal, O., Salinero-Corral, C., Vázquez-Ruiz, R.A., 2023. First Report of Root Rot Caused by *Phytophthora lacustris* on Alder ( *Alnus lusitanica* ) in Spain. *Plant Dis.* 107, 3322. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0793-PDN>
- Riit, T., Cleary, M., Adamson, K., Blomquist, M., Burokienė, D., Marčiulygienė, D., Oliva, J., Poimala, A., Redondo, M.A., Strømeng, G.M., Talgø, V., Tedersoo, L., Thomsen, I.M., Uimari, A., Witzell, J., Drenkhan, R., 2023. Oomycete Soil Diversity Associated with *Betula* and *Alnus* in Forests and Urban Settings in the Nordic–Baltic Region. *J. Fungi* 9, 926. <https://doi.org/10.3390/jof9090926>
- Sáráandi-Kovács, J., Lakatos, F., Szabó, I., 2015. Post-epidemic Situation of a Previously *Phytophthora alni*-infected Common Alder Stand/ Egy korábban *Phytophthora alni* által fertőzött mézgaséger-állomány járvány utáni állapota. *Acta Silv. Lignaria Hung.* 11, 27–38. <https://doi.org/10.1515/aslh-2015-0002>
- Smith, F., Luna, E., 2023. Elevated atmospheric carbon dioxide and plant immunity to fungal pathogens: do the risks outweigh the benefits? *Biochem. J.* 480, 1791–1804. <https://doi.org/10.1042/BCJ20230152>
- Štochlová, P., Novotná, K., Černý, K., 2016. Variation in *Alnus glutinosa* susceptibility to *Phytophthora alni* infection and its geographic pattern in the Czech Republic. *For. Pathol.* 46, 3–10. <https://doi.org/10.1111/efp.12205>
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples 2000.
- Tkaczyk, M., Sikora, K., Galko, J., Kunca, A., 2023a. Occurrence of *Phytophthora* species in riparian stands of black alder ( *Alnus glutinosa* ) in Slovakia. *For. Pathol.* 53, e12800. <https://doi.org/10.1111/efp.12800>
- Tkaczyk, M., Szmidla, H., Sikora, K., 2023b. Occurrence of *Phytophthora* species in the rhizosphere of dying black alder *Alnus glutinosa* in central and northeastern Poland. *Sylwan* 167 7 452–460. <https://doi.org/10.26202/SYLWAN.2023040>

- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Tropiano, J.R., 2021. Drought Tolerance Compared Between Two *Eutrema salsugineum* Ecotypes and Their Recombinant Inbred Lines 2021.
- Trzewik, A., Maciorowski, R., Orlikowska, T., 2021. Pathogenicity of *Phytophthora*× *alni* Isolates Obtained from Symptomatic Trees, Soil and Water against Alder. *Forests* 13, 20. <https://doi.org/10.3390/f13010020>
- Tschaplinski, T.J., Blake, T.J., 1985. Effects of root restriction on growth correlations, water relations and senescence of alder seedlings. *Physiol. Plant.* 64, 167–176. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb02331.x>
- Vieites-Blanco, C., Colangelo, M., Camarero, J.J., Caballol, M., García Breijo, F.J., Štraus, D., Oliva, J., 2023. Pathogenicity of *Phytophthora* and *Halophytophthora* species on black alder and the host histological response. *Mycol. Prog.* 22, 71. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01923-3>
- Violle, C., Navas, M., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882–892. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x>