Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie

Bc. Ondřej Daniel

Společenstva aktinobakterií v zemědělské půdě na lokalitách s výskytem obecné strupovitosti brambor

Actinobacteral communities in agricultural soils at sites with occurence of potato common scab

Diplomová práce

Školitel: Ing. Jan Kopecký Ph.D.

Praha 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Práce byla podporována projektem MZe QH92151.

V Praze, 16. 7. 2013

Podpis

Na tomto místě bych rád poděkovala lidem, bez kterých by tato práce nikdy nemohla vzniknout. Děkuji hlavně svému školiteli Ing. Janu Kopeckému Ph.D., RNDr. Markétě Ságové - Marečkové Ph.D., za pomoc, věcné připomínky a bezpočet dobrých rad. Dále děkuji osazenstvu laboratoře č. 111 a č. 110. Děkuji také Ing. Marku Omelkovi Ph.D. za zpracování části statistických analýz.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na prozkoumání vztahů mezi chemickými vlastnostmi, aktinobakteriálními společenstvy zemědělských půd a výskytem obecné strupovitosti, která je způsobena zástupci rodu *Streptomyces*. Cílem monitorovací studie na třiceti třech lokalitách pokrývajících hlavní pěstitelské oblasti ČR bylo najít závislosti, na jejichž základě lze predikovat výskyt obecné strupovitosti. Další část práce se zabývala srovnáním společenstev aktinobakterií a výskytu streptomycet nesoucích gen *txtA* (gen biosyntetické dráhy fytotoxinu thaxtominu A) v půdách s vyšším a nižším výskytem strupovitosti.

V rámci monitorovací studie byla pro zjištění struktury aktinobakteriálních společenstev využita metoda analýzy polymorfismu délky terminálního restrikčního fragmentu (T-RFLP). V případě půd s odlišným výskytem obecné strupovitosti byla kvantifikace aktinobakterií a streptomycet nesoucích gen *txtA* provedena metodou PCR v reálném čase.

Monitorovací studie ukázala negativní korelace mezi mírou napadení obecnou strupovitostí a (i) obsahem využitelného fosforu v půdě a (ii) diverzitou aktinobakteriálního společenstva. Zjištěné výsledky monitorovací studie byly využity pro tvorbu modelu predikujícího výskyt obecné strupovitosti. Kvantifikace PCR v reálném čase ukázala, že se odlišuje četnost aktinobakterií a kmenů nesoucích gen *txtA* v půdách lišících se výskytem strupovitosti a v závislosti na odrůdě bramboru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aktinobakterie, *Streptomyces*, obecná strupovitost brambor, T-RFLP, qPCR, thaxtomin

ABSTRACT

The diploma thesis is focussed on understanding relationships between soil chemical characteristics, actinobacterial communities of agricultural field soils and occurrence of potato common scab, a disease caused by members of the genus *Streptomyces*. The aim of monitoring study, on thirty-three sites covering main potato-growing regions in the Czech Republic, was to find relationships suitable for prediction of common scab severity. The second part of the thesis compared actinobacterial communities and incidence of *Streptomyces* harboring a pathogenic determinant, gene *txtA* (gene of biosynthetic pathway of phytotoxin thaxtomin A), in soils differing in occurrence of common scab.

In the screening study, analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was employed to compare composition of soil actinobacterial communities. Real–time PCR was used to quantify total actinobacteria and streptomycetes harboring *txtA* gene in soils differing in scab incidence.

The screening study revealed negative correlations between the scab severity and (i) available phosphorus in soil and (ii) diversity of actinobaterial community. The results were used to design a model for scab prediction. A qPCR analysis showed difference in numbers of total actinobacteria and the strains harboring *txtA* gene in soils varying in occurrence of common scab and depending on potato variety.

KEYWORDS

Actinobacteria, *Streptomyces*, common scab, T-RFLP, qPCR, thaxtomin

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK **9**

1 ÚVOD **10**

2 PŘEHLED LITERATURY **12**

2.1 Aktinobakterie 12

2.2 Role aktinobakterií v půdním prostředí 13

2.3 Obecná strupovitost 16

2.4 Kmeny způsobující strupovitost a jejich rozšíření 17

2.5 Determinanty zodpovědné za virulenci 18

2.6 Ostrov patogenity 20

3 PŮDNÍ VLASTNOSTI OVLIVŇUJÍ VÝSKYT STRUPOVITOSTI **24**

4 CÍLE PRÁCE **27**

5 MATERIÁL A METODY **28**

5.1 Výběr lokalit 28

5.2 Analýzy půd 28

5.3 Izolace DNA 29

5.4 Analýza polymorfismů délky terminálních restrikčních fragmentů 29

5.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 29

5.4.2 Restrikční štěpení 30

5.4.3 Zpracování T-RFLP dat 30

5.4.4 Statistické vyhodnocení T-RFLP dat 31

5.5 Kvantifikace *genu txtA* 31

5.5.1 Navržení primerů pro kvantifikaci genu *txtA* 31

5.5.2 Optimalizace podmínek pro navržené primery 32

5.5.3 Trasnsfer a validace na real-time PCR 32

5.5.4 Ověření specifické amplifikace primerů StrepF a StrepR 33

5.5.5 Kvantifikace metodou real-time PCR 34

6 VÝSLEDKY **35**

6.1 Monitorovací studie a predikční model výskytu obecné strupovitosti brambor 35

6.1.1 Vlastnosti půd 35

6.1.2 Druhová bohatost aktinobakteriálních společenstev tuberosféry a volné půdy 36

6.1.3 Predikční model výskytu obecné strupovitosti 37
6.2 Faktory ovlivňující složení aktinobakteriálního společenstva 39
6.2.1 Místní specifita aktinobakteriálního společenstva 39
6.3 Vliv obhospodařování na složení aktinobakteriálních společenstev 40
6.3.1 Vliv odrůdy bramboru na složení aktinobakteriálních společenstev 40
6.4 Navržení primerů pro kvantifikaci genu *txtA* 41
6.4.1 Návrh primerů pro kvantifikaci *txtA* genu 41
6.5 Testování primerů pro kvantifikaci *txtA* genu 43
6.5.1 Testování amplifikace na sbírkových kmenech 43
6.5.2 Optimalizace protokolu primerových setů TxtA1 a TxtA3 43
6.5.3 Transfer a validace na real-time přístroji 43
6.5.4 Ověření specifity primerů pro kvantifikaci *txtA* 44
6.6 Analýza aktinobakteriálních společenstev supresivních a konduktivních půd 45
6.6.1 Lokalita Vyklantice (rok 2009) 45
6.6.2 Lokalita Vyklantice (rok 2010) 48
6.6.3 Lokalita Ždírec 50
6.7 Kvantifikace aktinobakterií a genu *txtA* na supresivních a konduktivních lokalitách 52
6.7.1 Kvantifikace aktinobakterií a *txtA* genu 52
7 DISKUZE 58
7.1 Aktinobakterie v půdním společenstvu 58
7.2 Výsledky monitorovací studie 58
7.3 Analýza aktinobakteriálních společenstev půd s výskytem nižší a vyšší strupovitosti 62
8 ZÁVĚR 65
9 SEZNAM LITERATURY 66
10 PŘÍLOHY 76

SEZNAM ZKRATEK

16S rDNA – označení ribozomální deoxyribonukleové kyselina se sidementačním koeficientem 16

ANOSIM – analýza podobnosti

ANOVA – analýza rozptylu

bacA – gen kódující produkt účastnící se

BSA – albumin kravského séra

cmolc/kg –

C_{org} – organický uhlík

Δ G – změna Gibbsovy energie

dNTPs – deoxynukleotid trifosfáty

eDNA – environmentální DNA

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-etan sulfonová kyselina

IPTG – isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranozid

nec1 – gen kódující nekrozní faktor A

$NO^{\cdot}$ – radikál oxidu dusnatého

NOS – syntáza oxidu dusnatého

NRPS – neribozomální peptidová syntetáza

pb – párů bazí

Phe – fenylalanin

qPCR – kvantitativní PCR

S_{tot} – celková síra

TE – TRIS- EDTA pufr

tomA – gen kódující tomatinázu A

T-RFLP – analýza polymorfismu délky terminálního restrikčního fragmentu

TRFs – terminální restrikční fragment (ekvivalentem je T-RFs v textu)

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

Trp – tryptofan

Trp-NO2 – 4-nitro-L-tryptofan

txtA, B, C, D,E, H, R – geny nacházející se v biosyntetické klastru thaxtominu

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galaktopyranozid

1 ÚVOD

Půdní prostředí je považováno za velice složitý, heterogenní, otevřený systém (nejen ve smyslu termodynamickém či ekologickém), který interaguje s ostatními sférami Země. Mikroorganismy jsou jeho nedílnou součástí.

Nejdůležitějšími místy pro život mikroorganismů je okolí půdních částic a póry půdních agregátů (Ranjard a Richaume, 2001), jejichž distribuce je nepravidelná. Z toho vyplývá, že výskyt bakterií v půdě je heterogenní. V rámci půdy existují „hot spots“, kde se vyskytuje vyšší biologická aktivita. Důvodem výskytu „hot spots“ jsou preferenční toky dostupných nutrientů, vody, přítomnost půdních agregátů, které jsou typické např. pro rhizosféru (Bundt *et al.*, 2001).

Role mikroorganismů v půdním ekosystému je rozmanitá: přispívají ke stabilizaci půdních agregátů (Ranjard a Richaume, 2001), účastní se biogeochemických cyklů makroelementů (např.: C, N, P, S, Ca) a mikroelementů půdy (např.: Mn, Fe, Si) (Madsen, 2008), zajišťují degradaci složitých přírodních biopolymerů a arteficiálních polutantů, účastní se biologicky významných procesů (např.: nitrifikace, denitrifikace, fixace volného dusíku), což plyne z jejich účasti v biogeochemických cyklech (Paul, 2007). Dále zodpovídají za udržení zdraví půdního prostředí.

Kvalitní půda je základem úspěšného pěstování, a přesto je její význam často přehlížen i nedoceněn. Pojem "kvalitní půda" se stal symbolem kvalitního a výnosného zemědělství. Přechod od produkčního k udržitelnému zemědělství vede ke zdůraznění významu půdy jako životního prostředí mnoha organismů. Celistvost půdního prostředí, ve kterém je zachována co největší rozmanitost organismů, podporuje zdraví, růst a výnosnost plodin.

Kvalita půdy je výsledkem komplexních vztahů mezi fyzikálními chemickými a biologickými složkami půdy (Janvier *et al.*, 2007). Především půdní mikroorganismy jsou hlavní skupinou zodpovědnou za udržení mnoha funkcí a zdraví půdního prostředí. Narušení komplexního prostředí půdy může vyústit v nerovnováhu, vedoucí ke snížení biologické diverzity a zvyšující riziko rozvoje patogenů.

Existují půdy, ve kterých je manifestace onemocnění zemědělských plodin potlačena. Jsou známy jako půdy supresivní. Vzhledem k tomu, že pravděpodobně existuje propojení mezi kvalitou a schopností půdy potlačit rostlinné patogeny (van Bruggen a Semenov, 2000), jsou supresivní půdy vhodným systémem pro zkoumání principů a zákonitostí komplexnosti půdního prostředí, které lze považovat za

prerekvizitu nutnou pro udržení kvality půdy. V rámci zkoumání supresivních půd lze v budoucnu pravděpodobně očekávat i nalezení bioindikátorů půdního zdraví.

Obecná strupovitost je významné celosvětově se vyskytující onemocnění brambor (Loria *et al.*, 1997). Předpokládá se, že se v budoucnu stane mnohem závažnějším onemocněním než doposud, což lze demonstrovat na vzniku nových druhů i kmenů, které jsou více agresivní (*S. turgidiscabies*) a lépe adaptované na podmínky prostředí (*S. acidiscabies*). Obecná strupovitost je z onemocnění, které je dobře známo proměnlivostí svých příznaků a je tedy velice těžko predikovatelné. Nalezení vztahů, které ovlivňují výskyt obecné strupovitosti, by přispělo ke snížení výskytu této choroby.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Aktinobakterie

Actinobacteria (synonymum aktinomycety) jsou jednou z největších taxonomických skupin v rámci domény *Bacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). V nedávné době bylo navrhnuto nové fylogenetické uspořádání, které rozděluje aktinobakterie na 6 tříd a 22 řádů (Gao a Gupta, 2012). Jedná se většinou o gram pozitivní bakterie, pro které je typický vysoký procentuální obsah G+C párů (57 -75 %) v jejich DNA (Lo *et al.*, 2002), i když byly nalezeny sladkovodní aktinobakterie, jejichž obsah G+C páru je v rozmezí 37 – 49 % (Ghai *et al.*, 2012). Pro aktinobakterie je typická morfologická, fyziologická a ekologická diverzita.

Jedná se o kosmopolitní skupinu bakterií, která se vyskytuje v půdě, vodě i ve vzduchu. Ve vodním prostředí se nejčastěji vyskytují rody *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* (Sigee, 2005). V troposférických mracích byly nejpočetnější zástupci rodů *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Saccharotrix* a *Kocuria* (Amato *et al.*, 2007). Přítomnost aktinobakterií ve vyšších vrstvách troposféry byla potvrzena v nedávné pyrosekvenační studii (DeLeon-Rodriguez *et al.*, 2013). V půdním prostředí jsou všudypřítomné. Jejich četnost se pohybuje v rozmezí 10E+06 – 10E+09 buněk/g půdy, přičemž tvoří průměrně asi 30 % (v rozmezí 1 % až 50 %) z celkového počtu mikroorganismů v půdě (Goodfellow a Williams, 1983). V půdě lze za nejpočetnější zástupce pokládat *Streptomyces* (až 70 %), *Nocardia*, *Micromonospora*, *Strepotosporangium* (Madigan a Martinko, 2006).

Z morfologického hlediska se jedná o rozmanité buňky kokoidního tvaru (*Micrococcus*), tyčinkovitě-kokoidního tvaru (*Arthrobacter*), filamentárního tvaru či se jedná o fragmentované mycelium (*Nocardia*) či značně větvené mycelium podobající se houbovému (*Streptomyces*). Co do tvaru lze za reprezentativního zástupce nejčastěji považovat bakterii filamentárního tvaru (Ventura *et al.*, 2007).

Doposud byly známy aktinobakterie hlavně jako zástupci chemoheterotrofů (Madigan a Martinko, 2006). Ovšem existují mezi nimi i zástupci chemoautotrofů (Grostern a Alvarez-Cohen, 2013). Nedávno byly objevení i zástupci fotoheterotrofů (Martinez-Garcia *et al.*, 2012) obsahující rhodopsin. Doposud nebyli nalezeni fotoautotrofní zástupci.

Ekologické funkce aktinobakterií jsou též rozmanité, interagují s rostlinami i živočichy. Mezi zástupci se vyskytují rostlinní komenzálové jako *Leifsonia* (Evtushenko *et al.,* 2000), živočišní komenzálové jako *Bifidobacterium* (Turroni *et al.*, 2011). Žijí v symbiotickém vztahu s rostlinami např. *Frankia* (Sellstedt a Richau, 2013), ovšem někteří z nich jsou považovány za fytopatogeny jako *Streptomyces* (Loria *et al.*, 2006) či primární patogeny živočichů jako *Rhodococcus* (Weinstock a Brown, 2002) a člověka jako *Mycobacterium* (Wagner a Young, 2004).

Většina aktinobakterií je saprofytických a jsou významnými producenty hydrolytických exoenzymů. Jsou tedy schopné degradovat celulózu, pentózany, chitin a další těžko rozložitelné látky (Sigee, 2005). Jejich hlavní a nejdůležitější úlohou v půdě a vodě je rozkládání humusu a organického materiálu, vstupují tak do biogeochemického cyklu uhlíku (Sigee, 2005). Další důležitá role aktinobakterií souvisí s jejich remediačními schopnosti. Díky nimž jsou schopny degradovat pesticidy, redukovat těžké kovy (Cr VI+) či degradovat ropu (Amoroso *et al.*, 2013). Rod *Streptomyces* se řadí mezi nejvýznamnější producenty antibiotik (Běhal, 2000).

2.2 Role aktinobakterií v půdním prostředí

Aktinobakterie jsou považovány za významnou skupinu bakterií nejenom v agroekosystémech. Účastní se rozkladu organické hmoty. Jsou významnými producenty rozličných hydrolytických exoenzymů (Ventura *et al.*, 2007). Prostřednictvím těchto hydrolytických exoenzymů jsou schopny rozložit jinak těžko rozložitelné sloučeniny (Sigee, 2005). A právě proto jsou aktinobakterie významnými hráči, kteří se účastní globálního cyklu uhlíku a obratu organického materiálu (Holmalahti *et al.*, 1994). Jsou druhou nejpočetnější složkou půdních rozkladačů. (McCarthy a Williams, 1992).

Půdy jsou důležitou zásobárnu uhlíku na naší planetě (Paul, 2007). Společně s organickým materiálem jsou důležitým faktorem ovlivňujícím složení bakteriálních i houbových společenstev. Významným zdrojem organického materiálu jsou jednoduché či složité sacharidy, které jsou v půdě všudypřítomné ať již ve formě exudátů, či ve formě stavebních materiálů prokaryotických a eukaryotických organismů, nebo nad povrchem půdy ve formě opadu. Jednodušší polysacharidy vstupující do půdy jsou velice rychle využívány mikroorganismy či rychle reagují v rámci chemických reakcí v půdě.

Za zdroje které jsou těžko rozložitelné, a tak hlavně přístupné pro aktinobakterie (nebereme v potaz houby) lze považovat celulózu, hemicelulózu, lignin a chitin.

Celulóza je složena z opakujících se jednotek glukózy, které jsou propojeny β-1,4-glykozidickými vazbami. Je považována za hlavní komponentu buněčné biomasy a tedy nejčastěji se vyskytující biopolymer. U aktinobakterií převládá aerobní degradace celulózy díky systému celuláz a hemiceluláz, které netvoří komplex na vnější straně buňky tzv. „celulosom“ (Anderson *et al.*, 2012). V poslední době na základě známých genomových sekvencí byly identifikovány předpokládané enzymy degradující celulózu a na jejich základě bylo zjištěno, že množství celulózu degradujících enzymů je u jednotlivých aktinobakterií všeobecně podhodnoceno (Anderson *et al.*, 2012). Z tohoto důvodu je pravděpodobně jejich důležitost při rozkladu organické hmoty vyšší, než se doposud myslelo. V nedávné době totiž byl objeven kmen *Streptomyces sp.* (ActE), jehož enzymová výbava je podobná houbě *Trichoderma reesei* (Takasuka *et al.*, 2013). Za kyselých a oligotrofických podmínek jsou aktinobakterie hlavní skupinou, která je zodpovědná za degradaci celulózy (Pankratov *et al.*, 2006).

Hemicelulóza je oproti celulóze molekula s nižší molekulovou hmotností skládající se z D-xylózy, D-manózy, D-galaktózy, D-glukózy dalších cukrů a oxidovaných forem těchto cukrů. Jednotlivé jednotky jsou propojeny β -1,4 či β -1,3 -glykosidickými vazbami (Metzler a Metzler, 2003). I když se jedná o chemicky rozdílnou molekulu ve srovnání s celulózou, některé aktinomycety (např.: *Thermomonospora*, *Streptomyces EC 1*) sekretují exoenzymy, které jsou schopné hemicelulózu degradovat (Godden *et al.*, 1989).

Ligninový polymer je složený z jednotek p-kumaryl alkoholu, koniferyl alkoholu a sinapyl alkoholu (DeAngelis *et al.*, 2011). Poměry jednotlivých složek udávají strukturní charakteristiku ligninu (DeAngelis *et al.*, 2011). Rozkladné procesy ligninu jsou velice dobře popsány u hub bílé hniloby. Při rozkladu ligninu nejprve dochází k tzv. „enzymatickému spalování“ (Kirk a Farrell, 1987), jedná se o nespecifickou oxidační depolymerizaci. Následně se u těchto hub rozkladu ligninu účastní dva typy enzymů a) proxidázy b) lakázy (Kirk a Farrell, 1987). U některých streptomycet byla potvrzena přítomnost lakázy, např.: *S. levadulae* (Suzuki *et al.*, 2003) a *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004). U následujících druhů bylo prokázáno, že dokáží degradovat lignin, jedná se o *S. viridisporus*, *Streptomyces sp.* UAH 15 a *S. cyaneus* (Berrocal *et al.*, 1997). K degradaci využívají nejenom lakázy, ale

pravděpodobně též peroxidázy (Berrocal *et al.*, 1997). Existuje ovšem i anaerobní způsob degradace ligninu, který provádějí též aktinobakterie (DeAngelis *et al.*, 2011).

Chitin je poslední z odolných polymerů skládá se z podjednotek N-acetylglukosaminu, které jsou provázány β-1,4-glykosidickými vazbami (Metzler a Metzler, 2003). Aktinobakterie patří mezi několik málo skupin mikroorganismů, které participují na rozkládání chitinu (Manucharova, 2009). Existují mezi nimi zástupci aktinobakterií a streptomycet, kteří jsou schopni degradovat stěnu houbových patogenů právě díky produkci chitinázy a v synergii společně s antibiotiky jsou schopny tyto patogeny zahubit (Yu *et al.*, 2008). Právě proto mohou být použity jako biokontrolní agens proti houbovým půdním patogenům (Hoster *et al.*, 2005).

Mezi hlavní faktory ovlivňující společenstva chitinolytických, pektinolytických a celulolytických aktinobakterií v odlišných půdách lze zařadit: teplotou, půdní vlhkost, dostupnost kyslíku, obsah solí a pH (Manucharova, 2009).

Další významnou úlohou aktinobakterií v půdě je tvorba sekundárních metabolitů. Streptomycety jsou hlavní skupinou, která je zodpovědná za syntézu antibiotik, protože z 12000 známých antibiotik v roce 1995 bylo 55 % produkováno rodem *Streptomyces*, 11 % dalšími aktinomycetami, 12 % nevláknitými aktinomycetami a 22 % jich pocházelo z vláknitých hub (Zhang a Demain 2005). Z chemického hlediska se jedná o nízkomolekulární organické látky (sekundární metabolity) produkované mikroorganismy (Běhal, 2000). V dnešní době se rozšířilo jejich pole působnosti a využívají se nejenom jako baktericidní a bakteriostatické látky, ale i jako protinádorová léčiva, imunosupresiva, enzymové inhibitory, antiparazitární látky atp. (Zhang a Demain, 2005). Není na místě uvádět strukturní kostry základních typů antibiotik, je jich totiž nepřeberné množství.

Otázka jakou funkci antibiotika plní v půdním prostředí je velice zajímavá. Za primární funkci antibiotik je považováno poškodit jiný organismus (Madigan a Martinko, 2006). Z ekologického hlediska se jedná o proces antibiózy, který je platný i v případě biologické kontroly půdních patogenů. Antibiotika v případě nízkých koncentrací (cca 100 x nižší než inhibiční koncentrace) ovlivňují globální transkripční vzory (Davies, 2006). Je zde tedy patrná duální funkce antibiotika. Antibiotika hrají významnou roli tedy i v rámci modulace půdních mikrobiálních společenstev, nejenom v případě antibiózy.

Na dostupnost antibiotik v půdě mají vliv půdní částice, koloidy, rostlinné tkáně a mikrobiální dekompozice (Thomashow *et al.*, 1997).

2.3 Obecná strupovitost

Obecná strupovitost je celosvětově rozšířené onemocnění bramboru (*Solanum tuberosum L.*), které většinou nepůsobí významné ztráty výnosu, ale významně snižuje kvalitu a prodejnost brambor (Loria *et al.*, 1997). V menší míře zhoršuje skladovatelnost brambor a také klíčivost sadby (Pulkrábek *et al.*, 2013). Ovšem výnosnost muže být postižena v případě, kdy patogen napadne mladé sazeničky (Hiltunen *et al.*, 2005), protože díky opožděnému vývoji hlíz u těchto sazeniček nedostačí hlízy dorůst do optimální velikosti (Kůdela *et al.*, 2002). V případě, kdy je mladá sazenička brambory masivně napadena původcem onemocnění, může dojít i k jejímu zaschnutí. Dalším problémem je, že patogen způsobující obecnou strupovitost napadá jak jednoděložné, tak dvouděložné rostliny, není tedy hostitelsky specifický (Lerat *et al.*, 2009). A proto se jedná o významné onemocnění, které bude zajisté v budoucnu způsobovat závažnější problémy než doposud.

Všeobecně se dá konstatovat, že se obecná strupovitost projevuje korkovitými lézemi hnědé barvy na slupce hlízy. Symptomy obecné strupovitosti se liší svojí variabilitou od povrchových až po hluboké jizvy či vystouplé léze (Loria *et al.*, 1997). Pokud je rostlina napadena více než jedním druhem streptomycet, může se společně vyskytovat několik symptomů pohromadě. Bylo prokázáno, že na jednom poli a na jedné rostlině a dokonce i v jedné lézi se může a vyskytuje vícero patogenních i nepatogenních druhů pospolu (Lehtonen *et al.*, 2004). Četnost a intenzita obecné strupovitosti se mění místo od místa, rok od roku a i u jednotlivých odrůd. Existují odrůdy, které vykazují slabou či silnější rezistenci vůči obecné strupovitosti, ovšem plně rezistentní odrůda se nevyskytuje. Genetický princip rezistence totiž nebyl doposud objasněn (Wilson *et al.*, 2009).

Pod pojmem obecná strupovitost se vyskytují v dnešní době tři typy onemocnění. Nejprve byla obecná strupovitost chápána jako jediná choroba, kdy za hlavní patogenní agens byl považován *S. scabiei* (Lambert a Loria, 1989a). Postupem času se obecná strupovitost začala objevovat i na polích s nižší hodnotou pH půdy. Od této doby rozeznáváme dále i „kyselou strupovitost“. Za hlavní patogenní agens lze považovat *S. acidiscabies* (Lambert a Loria, 1989b). Síťovitá forma strupovitosti je třetím z těchto onemocnění. Za hlavního zástupce je považován *S. reticuliscabiei* (Kůdela *et al.*, 2002). Ovšem je velice problematické rozlišit jednotlivé typy

strupovitosti, protože většina druhů pravděpodobně způsobuje rozdílné symptomy za rozdílných podmínek (Dees *et al.*, 2012). Jako příklad poslouží druh *S. europaeiscabiei*, který je původcem jak obecné, tak v jiných případech síťovité formy strupovitosti (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000).

2.4 Kmeny způsobující strupovitost a jejich rozšíření

Loria a kol. (2006) uvádí, že v dnešní době je známo kolem 11 zástupců rodu *Streptomyces* způsobujících strupovitost bramboru. Jedná se konkrétně o *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*, *S. stelliscabiei*, *S. reticuliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniciscabiei*, *S. niveiscabiei* (Loria *et al.*, 2006), dále o klastr objevený v USA *Streptomyces sp.* IdahoX (Wanner, 2007), *Streptomyces sp.* DS3024 (Hao *et al.*, 2009). Mezi další zástupce, kteří způsobují obecnou strupovitost lze zařadit i *S. bottropensis*, *S. aureofaciens* (Leiminger *et al.*, 2012).

Některé z výše uvedených druhů se vyskytují celosvětově, konkrétně se jedná o *S. scabiei*, který je považován za převažující druh způsobující strupovitost v USA (Wanner *et al.*, 2009). Za další celosvětově se vyskytující druh lze považovat *S. turgidiscabies*, který byl původně nalezený v Japonsku (Miyajima *et al.*, 1998). Nesmíme opomenout *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei*, které byly poprvé popsány ve Francii (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000) a vlastně rozdělily původní druh *S. scabiei* na tři nové druhy (*S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*). Reprezentativní zástupce „kyselé strupovitosti“ *S. acidiscabies*, byl původně objeven v USA (Lambert a Loria, 1989b), ale vyskytuje se též celosvětově. V dnešní době existuje pouze pár druhů, které byly prozatím nalezeny na jediném stanovišti např.: *S. luridiscabiei*, *S. puniciscabiei*, *S. niveiscabiei* (Park *et al.*, 2003). Vzhledem k prokázanému horizontálnímu přenosu genetické informace pro tyto streptomycety (Bukhalid *et al.*, 2002), lze předpokládat, že v budoucnu se objeví nové patogenní druhy či izoláty, které budou místně specifické.

Podrobné studie zabývající se distribucí a charakterizací jednotlivých druhů streptomycet způsobující strupovitost bramboru jsou známy z USA (Wanner, 2009), Kanady (St-Onge *et al.*, 2008) západní Evropy (Flores-González *et al.*, 2007), Francie (Bouchek-Mechiche *et al.*, 1998), Koreje (Song *et al.*, 2004), Norska (Dees *et al.*, 2013) České Republiky (Pánková *et al.*, 2012) a Německa (Leiminger *et al.*, 2012). Dvě poslední studie nám ozřejmí situaci v našem regionu.

V rámci České republiky bylo pro charakterizaci jednotlivých izolátů využito analýzy metyl esterů mastných kyselin. Problémem této metody je, že nemá dostatečnou rozlišovací schopnost pro identifikaci jednotlivých druhů streptomycet způsobující strupovitost. Na základě následně provedené „nested" PCR specifickými primery pro *S. scabiei* autoři identifikovali, že nejvíce agresivním a nejpočetnějším izolátem vyskytující se v ČR je *S. scabiei* (Pánková *et al.*, 2012). Na základě jimi popsaného postupu nejsou schopni rozlišit *S. europaeiscabiei* od *S. scabiei* ani využitím „nested" PCR. Je tedy patrné, že přesnost identifikace jednotlivých druhů je nedostatečná. A právě proto, bude vhodnější popsat studii Leimingera a kol. (2012).

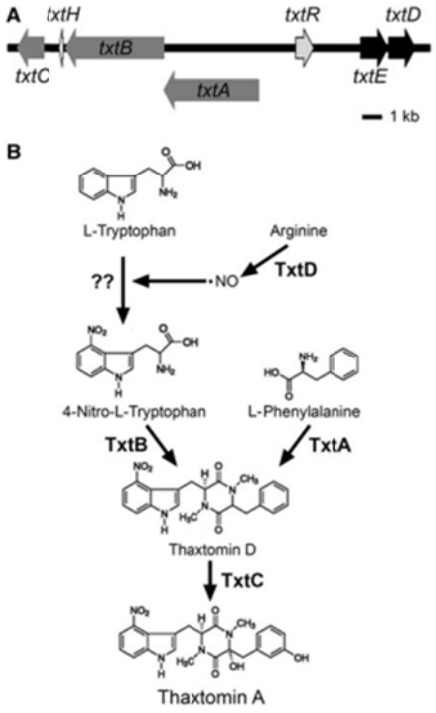
Studie Leimingera a kol. (2012) byla schopna rozlišit všechny hlavní druhy streptomycet způsobující strupovitost bramboru. Studie zjistila, že v rámci Německa jsou streptomycety způsobující strupovitost geneticky různorodé, ale nevyskytuje se mezi nimi druh *S. scabiei*. Za nejčastější druh způsobující obecnou strupovitost byl identifikován *S. europaeiscabiei*, jedná se o nejčastější druh v Evropě způsobující strupovitost (Flores-González *et al.*, 2007). Dále byly poprvé identifikovány druhy *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* a *S. stelliscabiei* jako původci strupovitosti v Německu (Leiminger *et al.*, 2012). Výsledky této studie také prokázaly, že na jedné lézi můžeme identifikovat více než jeden druh streptomycet, což je ve shodě jak uvádí Lehtonen a kol. (2004).

Je tedy patrné, že jednotlivé druhy streptomycet způsobující obecnou strupovitost jsou celosvětově rozšířené a jejich přesná identifikace je závislá na způsobu detekce. Dále je pravděpodobné, že na jednotlivých lokalitách mohou vzniknout nové druhy izolátů způsobující obecnou strupovitost.

2.5 Determinanty zodpovědné za virulenci

Pouze několik málo (asi 13) zhruba z 900 streptomycet lze považovat za fytopatogenní (Bignell *et al.*, 2010). Tyto streptomycety mají společnou vlastnost, a tou je schopnost syntézy molekul thaxtominu. Healy a kol. (2000) prokázal, že fytotoxin thaxtomin A je zodpovědný právě za tuto patogenitu streptomycet. Kromě thaxtominu A, který je považován za hlavní patogenní determinantu, existuje dalších 11 typů thaxtominu, které se navzájem odlišují v acylových skupinách (Bignell et al., 2010). Různé poměry jednotlivých variant thaxtominu mohou vysvětlovat rozdílné symptomy obecné strupovitosti (Hiltunen *et al.*, 2006)

Thaxtominy jsou jednoduché organické sloučeniny, jejich kostra je tvořena cyklickým dipeptidem (Loria *et al.*, 2008). Biosyntetická dráha molekuly thaxtominu a uspořádání biosyntetické klastru jsou zobrazeny na obrázku 1.



Obrázek 1: A) Genový klastr obsahující geny účastnící se syntézy thaxtominu A. B) biosyntetická dráha thaxtominu A (?? Doposud neobjasněno). Převzato z Bignell a kol. (2010).

Z **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** je patrné, že stavebními kameny pro sestavení kostry molekuly thaxtominu, jsou aminokyseliny fenylalanin (Phe) a tryptofan (Trp) (Loria *et al.*, 2008). Syntáza oxidu dusnatého (NOS) je enzym (produkt kódovaný genem *txtD*), který je zodpovědný za vznik radikálu oxidu dusnatého ($NO^{\bullet}$), který následně reaguje (za tuto reakci je pravděpodobně zodpovědná P450 monooxygenáza) s Trp za vzniku Trp-NO_2 (Kers *et al.*, 2005). Trp-NO_2 je následně cyklizován s Phe za vzniku N-metylovaného cyklického dipeptidu (thaxtominu D) (Loria *et al.*, 2008). Za cyklizaci Phe a Trp-NO_2 a tedy vzniku N-metylovaného cyklického dipeptidu (thaxtominu D) jsou zodpovědné produkty genů *txtA* a *txtB*. Jedná se neribozomální peptidové syntetázy (NRPS) (Loria *et al.*, 2008). Bylo potvrzeno, že produkt genu *txtB* je modul NRPS, který selektivně váže Trp-NO_2 (Bignell *et al.*, 2010). Jedná se tedy doposud o první NRPS, která je schopna využít molekulu s navázanou NO_2 skupinou (Bignell *et al.*, 2010). Další enzym (kódován *txtC*), který se přímo účastní syntézy enzymu, je zodpovědný za hydroxylaci molekuly thaxtominu D a vede ke vzniku

molekuly thaxtominu A (Loria *et al.*, 2008). Dalším genem, který je zapojený při syntéze molekul thaxtominu je gen *txtR*. Jedná se o aktivátor z rodiny *AraC*/*XylS*, který s navázanou molekulou celobiózy je zodpovědný za indukci produkce thaxtominu (Loria *et al.*, 2008). Nedávno objeveným genem v thaxtominovém biosyntetickém klastru, je gen *txtH* (Bignell *et al.*, 2010). Tento gen kóduje malé proteiny, které jsou asociované s genovými klastry NRPS a sideroforů (Bignell *et al.*, 2010). Mezi potvrzené virulentní determinanty u streptomycet způsobující obecnou strupovitost patří i gen *nec1*. Jedná se o gen, který svojí expresí vykazuje nekrogenní vlastnosti (Joshi *et al.*, 2007). Svou přítomností zvyšuje kolonizaci a tím i infektivitu *S. turgidiscabies* Car8, v případě jeho absence ke kolonizaci nedochází (Joshi *et al.*, 2007).

Významnou, i když ne prokázanou virulenční determinantou je produkt genu *tomA* (Kers *et al.*, 2005). Jedná se o homolog enzymu tomatinázy, které náleží do rodiny saponináz, které sekvestrují proteiny sekretované při napadení rostliny patogenem (Bignell *et al.*, 2010).

O dalších genech, které mají pravděpodobně souvislost s virulencí u streptomycet způsobující obecnou strupovitost a doposud tato souvislost nebyla prokázána, informuje Bignell a kol. (2010). Na základě komparativních genomových analýz s fytopatogeny či rostlinými symbionty, lze předpokládat nalezení dalších genů, které mohou mít vliv na virulenci streptomycet.

2.6 Ostrov patogenity

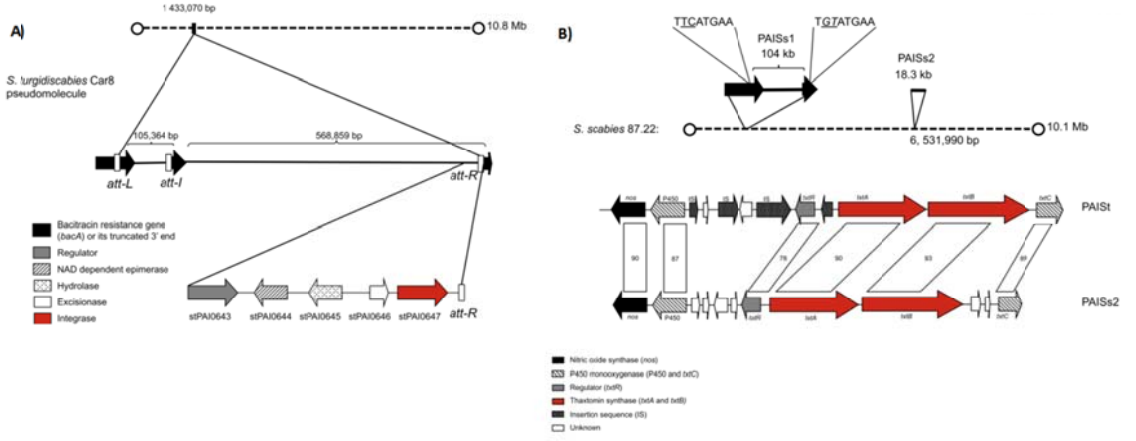
Genomické ostrovy jsou definovány jako relativně velké úseky DNA, které se svými charakteristikami (zastoupení jednotlivých nukleotidů) liší od zbytku lineárního chromosomu (Hacker a Carniel, 2001). Častým místem vložení těchto genomových ostrovů jsou lokusy tRNA. Tyto ostrovy obvykle vlastní geny kódující enzymy související právě s jejich mobilitou, jedná se o integrázy, transponázy. Dále jsou pro ně typické sekvenční motivy, jakou jsou přímé repetice či inserční sekvence. Mezi genomické ostrovy řadíme i ostrovy patogenity, které propůjčují svým majitelům ve většině případů patogenní vlastnosti.(Juhas *et al.*, 2009)

Na základě nízkého obsahu G+C párů (54 %) v genu *nec1* a přítomnosti otevřeného čtecího rámce, který vykazuje identitu k transponázám IS256 *S. aureus* se předpokládalo, že se gen *nec1* může vyskytovat na ostrově patogenity (Bukhalid *et al.*, 1998). Zjištění, že gen *nec1* společně s homologem transponázy a genovým klastrem

zodpovědným za syntézu thaxtominu je přenášen horizontálním genetickým přenosem mezi kmeny *S. scabiei*, *S. acidiscabies* a *S. turgidiscabies* potvrdilo myšlenku, že se jedná opravdu o část ostrova patogenity (Bukhalid *et al.*, 1998).

Celý ostrov patogenity byl následně zmapován studií Kers a kol. (2005) u *S. turgidiscabies* Car8. Kers a kol. (2005) dokázal přenos a místně specifickou integraci do genu SCO1326 (předpovídaná lipid kináza) u *S. coelicolor*, ovšem ani jeden ze vzniklých transkonjugantů neprodukoval thaxtomin. Naopak v případě *S. diastatochromogenes* (jedná o fylogeneticky totožný klastr se *S. scabiei*) bylo prokázáno, že přenesený ostrov patogenity propůjčuje kmenům v tomto klastru virulenční vlastnosti (Kers *et al.*, 2005). Toto zjištění naznačuje, že funkčnost ostrova patogenity závisí na genetickém pozadí recipienta a ne vždy vede k projevu fenotypické patogenity. Právě toto je možné vysvětlení, jak na jedné lézi může společně koexistovat patogenní a nepatogenní druh. V případě *S. diastatochromogenes* došlo k integraci do palindromatické sekvence situované na 3´ konce *bacA* genu (gen související s rezistencí vůči bacitracinu) (Kers *et al.*, 2005).

Ostrov patogenity *S. turgidiscabies* Car8 má velikost zhruba 674 kpb (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Tento ostrov patogenity se rozděluje na dvě oblasti. Jedná se o toxikogenní a patogenní oblast (Lerat *et al.*, 2009). Do toxikogenní oblasti ostrova patogenity spadají geny, které jsou součástí thaxtominového klastru (např.: *txtA*, *txtB*, *txtC*, *nos*, *txtR*) (Lerat *et al.*, 2009). Všechny fytopatogenní druhy streptomycet vlastní velice podobný genový shluk právě pro syntézu thaxtominu (obrázek 2).



Obrázek 2: A) Charakteristika ostrova patogenity *S. turgidiscabies* Car8. B) Charakteristika ostrovů patogenity *S. scabiei* 87.22. Převzato z Huguet-Tapia a kol. (2011).

V patogenní oblasti ostrova patogenity se nacházejí geny související s virulencí (např.: *nec1*, *tomA*), dále se v blízkosti *nec1* genu vyskytují čtyři otevřené čtecí rámce, vykazující podobnosti s transponázami (Lerat *et al.*, 2009). Reprezentativní výčet genů spadající do těchto dvou oblastí u *S. scabiei* uvádí Lerat a kol. (2009) a pro *S. stelliscabiei* uvádí Huguet-Tapia a kol. (2011).

Organizace ostrovů patogenity u druhů *S. turgidiscabies* a *S. scabiei* je rozdílná (obrázek 2). Rozdíly jsou způsobeny modulárním uspořádáním, které je typické pro ostrovy patogenity (Alfano *et al.*, 2000). Lerat a kol. (2009) uvádí, že geny *txtA* (toxikogenní oblast) a *nec1* (patogenní oblast) dělí více než 4900 kpb u *S. scabiei* (obrázek 2). Ostrov patogenity *S. turgidiscabies* Car8 se skládá ze dvou na sebe navazujících modulů (Huguet-Tapia *et al.*, 2011): z modulu I o velikosti 10,5 kpb a modulu II o velikosti 56,9 kpb (obrázek 2). Tyto moduly jsou ohraničeny 8 pb dlouhými palindromatickými sekvencemi, které slouží jako integrační místa (*att-L*, *att-I*, *att-R*) viz obrázek 2 (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Geny predikovaných tyrosinových rekombináz (IntSt) a excisionáz (XisSt) jsou umístěny před *att-R* integračním místem (obrázek 2) (Huguet-Tapia *et al.*, 2011).

Bylo prokázáno, že ostrov patogenity se integruje mechanismem místně specifické rekombinace (Kers *et al.*, 2005) a tím pádem se pravděpodobně na ostrově patogenity musí nacházet rekombináza. Na 3´ konci modulu II (56,9 kpb), byla predikována hypotetická integráza a vedle ní i excisionáza (obrázek 2). Předpokládá se, že excisionáza vyštepuje celý ostrov patogenity a v některých případech se integruje pouze modul I o velikosti 10,5 kpb (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Integrace pouze modulu II nebyla doposud prakticky ověřena (Huguet-Tapia *et al.*, 2011).

S. scabiei má na rozdíl od *S. turgidiscabies* dva ostrovy patogenity (obrázek 2). Modul I *S. turgidiscabies* je identický s prvním ostrovem patogenity (104 kpb) *S. scabiei* (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Na modulu I *S. turgidiscabies* jsou umístěny geny toxikogenní oblasti (Lerat *et al.*, 2009). Ostrov patogenity I *S. scabiei* je též vložen do 3´ konce genu *bacA* (Kers *et al.*, 2005). Na rozdíl od modulu I *S. turgidiscabies* došlo u ostrova patogenity I *S. scabiei* k degeneraci integrační sekvence i sekvence excisionázy, což naznačuje, že tento ostrov patogenity je již nastálo včleněn do genomu *S. scabiei* (Huguet-Tapia *et al.*, 2011).

Modul II *S. turgidiscabies* (57 kpb) vykazuje konzervovanou syntenii s ostrovem patogenity II *S. scabiei* (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Velikost ostrova patogenity II *S. scabiei* činí pouhých 18,3 kbp (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Na modulu II

S. turgidiscabies jsou umístěny geny odpovídající za syntézu thaxtominu A (Lerat *et al.*, 2009).

Oproti ostrovu patogenity II *S. scabiei* obsahuje modul II *S. turgidiscabies* konzerovovanou syntenii s: fas operonem *Rhodococcus fascians*; proteiny, které využívá při interakci s rostlinou symbiotická *Frankia sp. CcI*; s predikovanou biosyntetickou dráhu lantibiotika *S. griseus* (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Právě přítomnost biosyntetické dráhy lantibiotika může být jedním z důvodů, proč *S. turgidiscabies* vykazuje antagonismus vůči *S. scabiei* (Hiltunen *et al.*, 2009). Ovšem existují i opačné rozdíly, kdy ostrov patogenity *S. turgidiscabies* postrádá biosyntetickou, která se účastní syntézy koronatinu (Huguet-Tapia *et al.*, 2011).

Velkou genetickou variabilitu ostrovů patogenity a tedy i modulární vlastnost jednotlivých ostrovů patogenity potvrdila Aittamaa a kol. (2010), která na základě hybridizačních studií identifikovala čtyř různé typy uspořádání ostrovů patogenity u devíti kmenů *S. turgidiscabies*. Našla i dokonce kmen, který vykazoval pozitivní hybridizační signály se sondami navrženými z doposud známých sekvencí ostrova patogenity, ovšem nevykazoval doposud

3 PŮDNÍ VLASTNOSTI OVLIVŇUJÍ VÝSKYT STRUPOVITOSTI

Mezi hlavní chemické vlastnosti půdy ovlivňující výskyt strupovitosti patří půdní pH. Na výskyt obecné strupovitosti mají dále vliv i jednotlivé prvky, které jsou přítomny v půdě.

Ve většině případů byl vliv pH zkoumán u *S. scabiei*. Je známo, že obecná strupovitost se intenzivněji rozvine v půdách kde se pH pohybuje v rozmezí 5 – 8 (Goto, 1985), což je ve shodě se zjištěním, že minimální hodnota pH při in vitro růstu je u *S. scabiei* přibližně 5,0 (Lambert a Loria, 1989a). Ovšem existují i původci *S. acidiscabies*, kteří za in vitro podmínek rostou při pH 4.0 (Lambert a Loria, 1989b). Jedním z hlavních opatření, jak významně zabránit výskytu obecné strupovitosti, je udržovat půdní pH v rozmezí 5,0 – 5,2 (Lacey a Wilson, 2001), ovšem proti původci způsobujícímu „kyselou" strupovitost tedy *S. acidiscabies* je toto opatření neúčinné (Loria, 1991). Dalším patogenním druhem, který roste při nižší hodnotě pH je *S. turgidiscabies*, jehož hranice pH byla stanovena na 4,2 (Lindholm *et al.*, 1997). V poslední době se vyskytují i kmeny, které jsou adaptované na pH kolem 3,5 (*Park et al.*, 2003). Snížení půdního pH je jedním z opatření jak eliminovat obecnou strupovitost. Nižší pH půdy ovšem přispívá k rozvoji houbových patogenů a ovlivňuje též složení bakteriálního společenstva např. prospěšných rhizobakterií (Rouska *et al.*, 2010). Nadto může v důsledku nižšího pH být snížená přístupnost dusíku, vápníku, hořčíku, fosforu, draslíku, bóru a dokonce i síry, ale naopak se může zvýšit přístupnost železa, manganu, zinku, hliníku, mědi a kobaltu (Brady a Weil, 2008). Naopak Waterer (2002) zkoumal efekt vyššího pH na obecnou strupovitost a zjistil, že v rozmezí pH 7 - 9 došlo k poklesu výskytu strupovitosti bez značného postižení výtěžku bramborových hlíz. Krištůfek a kol. (2011) uvádí, že důležitější půdní charakteristikou je kationtová výměnná kapacita půdy, protože tato hodnota ovlivňuje poutání a uvolňování živin z půdy do rostliny.

Na výskyt obecné strupovitosti mají dále vliv prvky přítomné v půdě. Mezi minerální prvky, které jsou doposud spojovány s obecnou strupovitostí, patří vápník, dusík, fosfor, síra, měď, mangan (Keinath a Loria, 1989). Onemocnění bylo také pozitivně či negativně korelováno s obsahem a dostupností N, K, Mg, Cu, Ca, Na, Mn a Al v půdě (Lazarovits *et al.*, 2007).

Množství dusíku přímo neovlivňuje intenzitu napadení hlíz. Při aplikaci velkého množství dusíkatých hnojiv dochází ke značnému okyselování půdy, což nepřímo snižuje výskyt obecné strupovitosti (Keinath and Loria, 1989). Dusíkatá hnojiva můžou také nepřímo ovlivnit výskyt obecné strupovitosti, tím že dojde k opožděnému vývoji bramborových hlíz (Lapwood a Dyson, 1966). Třetí, i když hypotetický, efekt je inhibice původců obecné strupovitosti amoniakem, protože amoniak byl prokázán jako toxický pro jiné rostlinné patogeny např.: *Fusarium oxysporum* a *Sclerotinia sclerotiorum* (Waterer, 2002).

Množství fosforu podle Keinath a Loria (1989) má rovněž malý přímý efekt na výskyt obecné strupovitosti. Některé formy zásadité strusky obsahující vyšší obsah hydroxidu vápenatého zvyšují pH půd a tedy i výskyt strupovitosti (Wenzl a Reichard, 1976). Trojitý superfosfát (hnojivo) naopak redukuje výskyt obecné strupovitosti (Davis *et al.*, 1976).

Množství vápníku přímo neovlivňuje výskyt strupovitosti, ale ovlivňuje jí opět nepřímo skrze změnu pH (Keinath a Loria 1989). Pokud je vápník přidán do půdy ve formě uhličitanu vápenatého, dojde ke zvýšení pH půdy a půda se stane více náchylnou vůči obecné strupovitosti (Lambert and Manzer 1991). Zvýšený výskyt strupovitosti byl také spojován s vyšším množstvím vápníku obsaženého v hlízách (Davis *et al.*, 1976). Z práce (Goto, 1985) plyne, že spolehlivějším indikátorem při predikci výskytu strupovitosti je množství vyměnitelného vápníku než hodnota půdního pH. Ovšem role vápníku je sporná, protože Lambert a Manzer (1991) zjistili, že množství vápníku v místech strupů bylo několikrát vyšší než na zdravé části peridermu. Zdá se tedy, že zvýšené množství Ca je následkem výskytu obecné strupovitosti a ne faktorem, který o strupovitosti rozhoduje.

Keinath a Loria (1989) uvádějí, že použití draslíku neovlivňuje obecnou strupovitost. Ovšem navrhují, že poměr Ca/K je významným při predikování výskytu strupovitosti. Lacey a Wilson (2001) zjistili korelaci mezi půdním pH a kombinací výměnných kationtů (Ca, Mg, K). V případě, kdy hodnota kombinace vyměnitelných kationtů byla rovna či menší než 12 cmolc/kg nebyl pozorován výskyt strupovitosti (Lacey and Wilson 2001).

Síra stejně jako většina výše uvedených prvků přímo neovlivňuje výskyt obecné strupovitosti. Snížení výskytu strupovitosti je výsledkem snižování pH (Keinath a Loria, 1989). Dále bylo prokázáno zmírnění projevů obecné strupovitosti po použití síry či síranu vápenatého, ačkoliv efekt ošetření na půdu byl malý, protože půda měla vysokou

pufrovací kapacitu (Keinath a Loria, 1989). V půdě může být síra anaerobně redukována na sulfan, který je toxický pro všechny organismy a tedy i *S. scabiei* (Paul, 2007).

Sloučeniny mědi jsou prokazatelně toxické pro *S. scabiei*. Měď byla jedním z nejefektivnějších prvků dříve testovaných proti obecné strupovitosti (Pulkrábek *et al.*, 2013). Ovšem její nevýhodou je fytotoxicita pro brambory a z tohoto důvodu není komerčně využívána (Keinath a Loria, 1989).

Mangan má též přímý supresivní efekt na *S. scabiei*, ale jako měď může být toxický pro brambory (Keinath a Loria 1989). Ovšem informace o jeho vlivu na výskyt obecné strupovitosti jsou protikladné. Keinath a Loria (1989) uvádí, že výsledky pokusů nejsou dostatečně průkazné, aby potvrdily roli manganu při snížení obecné strupovitosti.

Železo a zinek mají negativní či neprůkazný efekt. Tyto prvky společně s mědí jsou zapojeny do biosyntézy ligninu (Metzler a Metzler, 2003) a mohou tedy hrát roli při suberizaci a lignifikaci a tak zvyšovat rezistenci hlíz.

Z výše uvedeného přehledu je patrné, že jednotlivé prvky pravděpodobně ovlivňují výskyt strupovitosti nepřímo a pozorované vlivy jsou specifické pro studovanou lokalitu.

4 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit vztahy mezi aktinobakteriálními společenstvy, vybranými půdními vlastnostmi a výskytem obecné strupovitosti na souboru půd, který zahrnoval různorodé půdní typy a hlavní pěstitelské oblasti brambor v ČR.

Dílčí cíle:

• zjistit, zda existují vlastnosti půdy a tuberosféry korelující s výskytem obecné strupovitosti brambor,

• popsat faktory ovlivňující složení aktinobakteriálního společenstva,

• pokusit se navrhnout primery pro kvantifikaci streptomycet nesoucích gen *txtA*,

• popsat (kvantifikací aktinobakterií a na jejich pozadí i genu *txtA*) společenstvo osidlující tuberosféru brambor na vybraných stanovištích lišících se výskytem obecné strupovitosti.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Výběr lokalit

Na základě rozdílných fyzikálně-chemických parametrů půd a způsobů obhospodařování bylo vybráno celkem 33 lokalit s výskytem obecné strupovitosti bramboru. V příloze č. 1 je uveden výčet jednotlivých lokalit (druhy odrůd a rok sběru společně s GPS koordináty). Celkově bylo analyzováno 41 volných půd a 52 tuberosfér.

Do analyzovaného soboru půd byly zahrnuty také půdy konduktivní (náchylné k onemocnění) a supresivní (se sníženým projevem onemocnění v porovnání s konduktivní půdou), protože nám byly známy dvě lokality (Vyklantice a Ždírec). Na těchto lokalitách se v těsné blízkosti na shodném půdním typu vyskytovala různá strupovitost

Z každé lokality byla odebrána půda bezprostředně sousedící (rádius 0,5 cm od peridermu) s hlízou bramboru (tuberosféra) a dále v místech mezi bramborovými řádky (volná půda). Pro každou lokalitu byla odebrána tří biologická opakování (vyjma lokalit Vyklantice a Ždírec). Odebrané půdy byly ihned transportovány do laboratoře, skladovány při -20 °C a následně zpracovány.

5.2 Analýzy půd

Na jednotlivých lokalitách byly analyzovány následující chemické prvky, celkový dusík (N_{tot}), organický uhlík (C_{org}), celková síra (S_{tot}), využitelný fosfor (P), hořčík (Mg), vápník (Ca) a draslík (K) z makroelementů.

C_{org}, N_{tot} a S_{tot} byly analyzovány přístrojem CNS (Elementar Analysensysteme, Německo) spálením 1 g homogenizované půdy (pro tuberosféru i volnou půdu) za vysoké teploty (1800 °C), následovala separace a detekce vzniklých plynů. Analýzy P Mg, Ca a K byl proveden výluh podle Melicha III dle postupu SOP 43 a SOP 42 firmou Agro-La (Česká republika) u vzorků použitých v monitorovací studii. V případě analýzy pokusných lokalit bylo množství P, Mg, Ca, K a stanoveno dle normy ČSN EN ISO 11885 metodou emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Analýza (emisní spektrometrie) byla provedena firmou Aquatest (Česká republika).

V případě vzorků z lokalit Vyklantice (rok 2010) a Ždírec (rok 2010) byla dále stanovena hodnota pH a to skleněnou elektrodou HI 2212 (Hanna Instruments, USA) z vodního výluhu půdy. Vodní výluh byl připraven ze 4 g půdy, k nimž bylo přidáno 10

ml vody. Takto připravená směs byla ponechána 12 hodin za laboratorní teploty a následně bylo měřeno pH.

5.3 Izolace DNA

Environmentální DNA (eDNA) byla izolovaná z 0,5 g volné půdy i tuberosféry modifikovanou Müllerovou metodou (disrupce prostřednictvím skleněných kuliček, extrakce fenol-chloroformem) podle metodiky Ságová-Marečková a kol. (2008). Získaná DNA byla rozpuštěna ve výsledném objemu 50 μL.

Následně byla smíchána s 1M roztokem HEPES:$CaCl_2$ (w/w) a inkubována za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Následovalo přečistění „GeneClean® Turbo kit" (MP Biomedicals, USA) dle postupu výrobce. Takto přečištěná DNA byla eluována 50 μL TE^{-1} pufru.

Integrita a množství získané eDNA byly ověřeny elektroforeticky na 1% agarózových gelech obarvených „SYBR® Safe DNA Gel Stain" (Life Technologies, USA). Koncentrace získané eDNA se pohybovala mezi 50-100 ng na 1μL.

5.4 Analýza polymorfismů délky terminálních restrikčních fragmentů

5.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Analýza polymorfismu délky terminálního restrikčního fragmentu (T-RFLP) byla zacílena na 16S rDNA skupiny *Actinobacteria*, proto byly pro amplifikaci eDNA použity následující primery: 16Seu27f (5´-AGAGTTTGATCMTGGCKCAG-3´; Čermák *et al.*, 2008) značený fluorescenční značkou FAM (6-karboxyfluorescein) a neznačený 16Sact1114r (5´-GAGTTGACCCCGGCRGT-3´; Kyselková *et al.*, 2008)

Amplifikace probíhaly za následujících reakčních podmínek: 100 ng eDNA, 1x Taq pufr (Top-BIO, Česká republika), 0,3 μM každého z páru primerů (Sigma-Aldrich, Německo), 0,2 mM každého z deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs, Top-BIO, Česká republika), 1,5 - 3 mM $MgCl_2$ (Top-BIO, Česká republika) a 0,6 mg/ml albumin z kravského séra (BSA, Thermo Scietific, USA) a 1 U Taq polymerázy (Top-BIO, Česká republika). V případě nulové amplifikace došlo ke změně koncentrace aditiva BSA až na 0,8 mg/ml.

PCR byla prováděna v termocykléru BioRad S1000™ (BioRad, USA) dle následujícího programu: počáteční denaturace při 94 °C po dobu 2 min, následovalo 35

cyklů: denaturace při 94 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při 57 °C po dobu 45 s, elongace při 72 °C po dobu 1 min a 30 s a cyklus konečné elongace po dobu 10 min při 72 °C.

Na jednotlivé lokality připadala tři biologická opakování pro tuberosféru a volnou půdu (vyjma lokalit Vyklantice a Ždírec). Výsledný produkt byl ověřen elektroforetickou separací na 1,5% agarózových gelech barvených „SYBR® Safe DNA Gel Stain“.

5.4.2 Restrikční štěpení

Alikvót PCR produktu (150 ng) byl přečištěn QIAquick PCR purifikačním kitem (Qiagen, Německo) dle návodu výrobce. Následovalo restrikční štěpení za přítomnosti 0,7 U restrikčního enzymu *Alu*I (New England Biolabs, USA). Po čtyřech hodinách byla přidána další 0,5 U *Alu*I. Štěpení probíhalo celkem 8 hodin při teplotě 37 °C. Následovala inaktivace při 80 °C po dobu 20 minut. Naštěpené vzorky byly přečištěny přes „Sigma Spin™ Post-Reaction Clean-Up Columns“ (Sigma-Aldrich, Česká republika) podle návodu výrobce. Fragmentační analýza byla provedena firmou Genomac International (Česká republika) na 96-ti kapilárním sekvenátoru (Applied Biosystems, USA).

5.4.3 Zpracování T-RFLP dat

Získané profily byly nejprve vyhodnoceny programem MegaBACE Genetic Profiler Software v. 1.5 (GE Healthcare Life Science, Velká Británie) ve kterém byla nastavena fixní hladina pro odstranění pozadí (40 relativních fluorescenčních jednotek).

K následné analýze dat byl využit aplet T-REX (http://trex.biohpc.org) (Culman *et al.*, 2009). Odstranění šumu a nespecifických „peaků“ bylo provedeno přístupem Abdo a kol. (2006). Slučování „peaků“ do „binů“ bylo provedeno na základě postupu Smith a kol. (2005), kdy definice „binu“ = 1,5. „Binnování“ je manuální řazení „peaků“, kdy v daném rozmezí „délky peaků“ sloučí všechny „peaky“ do jediného „peaku“ s nejvyšší intezitou signálu v daném „binu“. Takto zpracovaná data byla podrobena statistické analýze.

5.4.4 Statistické vyhodnocení T-RFLP dat

Ze získaných dat, byla vypočtena matice vzdálenosti (určení podobnosti mezi T-RFLP profily) s použitím manhattanské metriky (Legendre a Legendre, 1998). Výsledná matice vzdáleností byla graficky znázorněna Sammonovou projekcí. (Venables a Ripley, 2002). Hodnota stres vyjadřuje, jak těsně prokládá model vícerozměrného škálování objektů daná experimentální data (T-RFLP profily).

Analýza podobnosti (ANOSIM) byla provedena podle Warwick a kol. (1990) s použitím manhattanské matice vzdálenosti. Výsledný koeficient R nabývá hodnot z intervalu <-1,1>, kdy R = 0 indikuje podobnost definovaných skupin a R > 0 indikuje rozdílnost definovaných skupin (Warwick *et al.*, 1990). Korelační analýzy pro mnohorozměrná data (T-RFs vs. chemické parametry půd) byly provedeny dle Székely a kol. (2007). Výsledkem této korelační analýzy je zobecněný korelační koeficient R. Tento koeficient nabývá hodnot v intervalu <0,1>, kdy R = 0 indikuje nezávislá data a R = 1 indikuje lineární závislost mezi daty (Székely *et al.*, 2007). Pro výpočet matice vzdáleností, multidimenzionální škálování a korelační analýzy mnohorozměrných dat, bylo využito statistické prostředí R v. 2.15.0 (http://www.R-project.org). Pro analýzu podobnosti (ANOSIM) jednotlivých lokalit byl využit program PAST v. 1.98 (http://folk.uio.no/ohammer/past/). Postup multidimenzionálního škálování a korelační analýzy byly vypracovány Ing. Markem Omelkou Ph.D. (MFF UK).

5.5 Kvantifikace *genu txtA*

5.5.1 Navržení primerů pro kvantifikaci genu *txtA*

Na základě přístupného anotovaného genomu *S. scabiei* 87.22 (NC_013929.1), částečně anotovaných ostrovů patogenity fytopatogenních streptomycet (AF255732, AY707081) a 46 druhově a kmenově specifických sekvencích pro gen účastnící se biosyntézy thaxtominu A (*txtA*) byl sestrojen „alignment“ využitím algoritmu Muscle 3.6 (Edgar, 2004). Tento „alignment“ byl použit jako předloha pro navržení primerů detekujících původce obecné strupovitosti (příloha č. 2). Konkrétně bylo využito oblasti vykazující nejméně 98% homologii mezi jednotlivými sekvencemi. Primery byly navrženy za využití programu Primer3 v. 2.2.0 (Rozen a Skaletsky, 2000). Vhodnost navržených primerů byla následně ověřena *in silico* analýzou v programu Oligo7 v. 7 (Molecular Biology Insights, USA). Selektivita navržených primerů byla ověřena *in*

silico algoritmem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) v databázi GenBank.

5.5.2 Optimalizace podmínek pro navržené primery

Amplifikace navrženými primerovými páry (TxtA1, TxtA2, TxtA3) byla testována na třech typových kmenech *S. scabiei* (DSMZ 41658), *S. europaeiscabiei* (DSMZ 41802) a *S. stelliscabiei* (DSMZ 41803).

Primerové páry (TxtA1,TxtA3), byly nejprve testovány za následujících podmínek: 1x Dream Taq pufr (Thermo Fischer Scientific, USA), 1,5 - 2,5 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, USA), 0,2 μM každého z páru primerů, 0,2 mM každého z dNTPs (Thermo Scientific, USA), 50,0 - 100,0 ng DNA a 1,5 U Dream Taq polymerázy (Thermo Scientific, USA). PCR byla prováděna v termocykléru BioRad S1000™ (BioRad, USA) dle následujícího programu: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 3 min, následovalo 35 cyklů: denaturace při 95 °C po dobu 25 s, nasedání primerů při 50 °C po dobu 30 s, elongace při 72 °C po dobu 1 min a cyklus konečné elongace po dobu 5 min při 72 °C. Vzniklé produkty byly verifikovány na 1,5% agarózovém gelu barveném „SYBR® Safe DNA Gel Stain“

Pro upřesnění výsledné teploty nasedání primerů (TxtA1F, TxtA1R) bylo vyzkoušeno rozmezí teplot 44 - 56 °C. Výsledný protokol používaný pro PCR amplifikace zahrnoval následující kroky: 95 °C po dobu 3 min, 35krát: 95 °C po dobu 25 s, 44 - 56 °C po dobu 30 s, 72 °C po dobu 45 s a konečný krok 72 °C po dobu 5 min. Reakční směs měla následující složení: 1x Dream Taq pufr, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 μM každého z páru primerů, 0,2 mM každého z dNTPs, 1 U Dream Taq polymerázy a 50 ng DNA.

5.5.3 Trasnsfer a validace na real-time PCR

Transfer na real-time PCR byl proveden na přístroji StepOnePlus™ (Applied Biosystem, USA) při složení reakční směsi: 1x GoTaq® qPCR Master mix (Promega, USA) obsahuje „Syber Green I“ (specificky se váže na dvouřetězcovou DNA), dále 0,2 μM každého z páru primerů a 2,0 ng DNA. Výsledný protokol používaný pro PCR amplifikace zahrnoval následující kroky: 95 °C po dobu 3 min, 40krát: 95 °C po dobu 25 s, 60 °C po dobu 30 s, 72 °C po dobu 30 s a konečný krok 72 °C po dobu 5 min. Po

amplifikační části protokolu následoval program křivky tání (verifikace tvorby specifických produktů). Jednalo se o 95 °C po dobu 15 s, 60 °C po dobu 1 min, teplotní přírůstek po 0,5 °C do koncové teploty 95 °C.

5.5.4 Ověření specifické amplifikace primerů StrepF a StrepR

Pro amplifikaci úseku genu, jehož produkt se účastní syntézy thaxtominu A, byly použity primery StrepF (5´-GCAGGACGCTCACCAGGTAGT-3´; Qu *et al.*, 2008) a StrepR (5´-ACTTCGACACCGTTGTCCTCAA-3´; Qu *et al.*, 2008) Reakční směs obsahovala: 1x Dream Taq pufr, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,3 μM každého z páru primerů, 0,2 mM každého z dNTPs, 1 U Dream Taq polymerázy a 50 ng cílové DNA. Produkty byly elektroforeticky separovány, vyříznuty a purifikovány systémem „Wizard® SV Gel and PCR clean-up“ (Promega, USA). Přečištěné produkty byly následně klonovány prostřednictvím „pGEM-T® Easy vector system“ (Promega, USA), kdy ligační směs obsahovala 1x ligační pufr, 50 ng linearizovaného vektoru pGEMT-Easy, 3 jednotky T4 DNA ligasy a množství DNA odpovídající poměru 2:1 (insert:vektor). Reakce byla inkubována přes noc při 4 °C. Následně byla provedena transformace dle postupu výrobce. Buňky byly vysety na misky obsahující 100 μg/ml ampicilin, 80 μg/ml 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-gal) a 0,5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG). Následně byly inkubovány při 37 °C po dobu 16 hodin. Pozitivní kolonie (na základě selekce β-galaktosidasou) byly podrobeny PCR. Nejprve byla provedena jejich denaturace ve 20 μL vody po dobu 10 min při 95 °C. Následovala PCR za použití primerů M13F (5´-GTAAAACGACGGCCAGT-3´) a M13R (5´-GCGGATAACAATTTCACACAGG-3´). Reakční směs obsahovala 1x pufr Dream Taq, 2 mM $MgCl_2$, 0,25 μM každého z páru primerů, 0,2 mM každého z dNTPs, 1 U Dream Taq polymerázy a 5 μL lyzátu z kolonií. Amplifikace proběhla dle následujícího protokolu: počáteční denaturace 95 °C po dobu 5 min, 35krát: 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, závěrečná elongace při 72 °C 10 min. Výsledné produkty výše uvedené PCR byly verifikovány elektroforeticky, přečištěny QIAquick PCR purifikačním kitem (Qiagen, Německo) a následně sekvenovány. Sekvenace byly provedeny firmou Macrogen (Korejská republika).

5.5.5 Kvantifikace metodou real-time PCR

Počty kopií genů 16S rDNA (aktinobakterie) a *txtA* (streptomycety nesoucí gen txtA) ve vzorcích eDNA byly určeny na základě metody standardních křivek. Příprava standardů byla pro 16S rDNA aktinobakterií provedena z typového kmene *S.europaeiscabiei* (DSMZ 41802) primery 16S27f (5´-AGAGTTTGATCMTGGCKCAG-3´; Čermák *et al.*, 2008) a pH (5´-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3´; Bruce *et al.*, 1992). Pro přípravu standardu *txtA* byly použity primery StrepF a StrepR. Získané fragmenty byly klonovány prostřednictvím „pGEM-T® Easy vector system" a následně sekvenovány. Posouzení kvality a zpracování sekvencí bylo provedeno programem Staden Package v 2.0.0 (Staden *et al.*, 2000).

Pro stanovení počtu kopií genu *txtA* byly použity primery StrepF a StrepR, kdy amplifikační produkt měl velikost 71 párů bazí (pb). Protokol se skládal z počáteční denaturace 95 °C po dobu 10 min, 45krát: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s. Při stanovení počtu 16S rDNA genů aktinobakterií byly použity primery 235f (5´-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3´; Stach *et al.*, 2003) a 518r (5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´; Muyzer *et al.*, 1993), kdy amplifikační produkt byl o velikosti 283 pb. V případě kvantifikace kopií 16S rDNA genů aktinobakterií byla počáteční denaturace 95 °C po dobu 10 min, následována 45krát: 95 °C 15 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s. Reakční směs v obou případech obsahovala 1 x GoTaq® qPCR Master mix (Promega, USA), dále 0,2 µM každého primeru z páru a 2 ng vstupní DNA (pro stanovení *txtA*) a 0,2 ng vstupní DNA (pro stanovení 16S rDNA aktinobakterií). Vyhodnocení kalibračních křivek a nastavení „threshold" cyklu u real-time PCR bylo provedeno softwarem Step One™ v 2.1 (Applied Biosystems, USA). ($E > 90$ %, C_t tj. cykly našich vzorků se pohybovaly v rozmezí 9 – 30, C_t cykly negativních kontrol > 34)

6 VÝSLEDKY

První část kapitoly výsledky popisuje závislost mezi vybranými vlastnostmi půd, aktinobakteriálními společenstvy a výskytem obecné strupovitosti na základě provedené monitorovací studie. Druhá část se týká vymezení a zhodnocení vybraných faktorů, které potenciálně ovlivňují složení aktinobakteriálních společenstev zemědělských půd. Třetí oddíl pojednává o navrhování a testování primerů určených pro kvantifikaci genu *txtA*. Závěrem jsou uvedeny informace o komparativní analýze aktinobakteriálních společenstev půd lišících se výskytem obecné strupovitosti.

6.1 Monitorovací studie a predikční model výskytu obecné strupovitosti brambor

6.1.1 Vlastnosti půd

V rámci monitorovací studie bylo analyzováno celkem 33 lokalit (příloha 1). Vybrané agrochemické vlastnosti půd a hodnoty strupovitosti popisuje Tabulka 1. Ve zkoumaném souboru se vyskytují půdy s obsahem celkového půdního dusíku v rozmezí 0,085 - 0,395 %. Jedná se o půdy chudé až nadprůměrné co do množství celkového dusíku. Rozsah množství organického uhlíku se pohybuje v intervalu 1,17 - 4,46 %. Nejčastěji byly zkoumány půdy s nízkým obsahem organického uhlíku. Obsah celkové síry se pohybuje v nižších hodnotách intervalu typického pro půdy, konkrétně v rozmezí 168,96 - 855,25 ppm. Nejpočetnější skupinu tvořily půdy chudé na síru. Množství vyměnitelného fosforu se pohybovalo v rozmezí 40 - 321 mg/kg. Množství Mg, Ca, K bylo stanoveno v rozmezí 60 - 375 mg/kg pro hořčík, 670 - 13048 mg/kg pro vápník a 79 - 1539 mg/kg pro draslík. V případě Mg, Ca, K se jedná o hodnoty nízké až vysoké, tedy z celého spektra. Intenzita strupovitosti se pohybovala v intervalu 1 – 6,0.

hodnoty	N_{tot} [%]	C_{org} [%]	S_{tot} [ppm]	P [mg/kg]	Mg [mg/kg]	Ca [mg/kg]	K [mg/kg]	pH	Strupovitost (1-9)
minimální	0,085	0,961	158,400	40,000	60,000	670,000	79,000	4,18	1,00
maximální	0,395	4,666	914,100	321,000	375,000	13048,000	1539,000	7,46	6,00
medián	0,173	1,666	301,950	125,000	118,000	1613,000	179,000	5,49	3,00

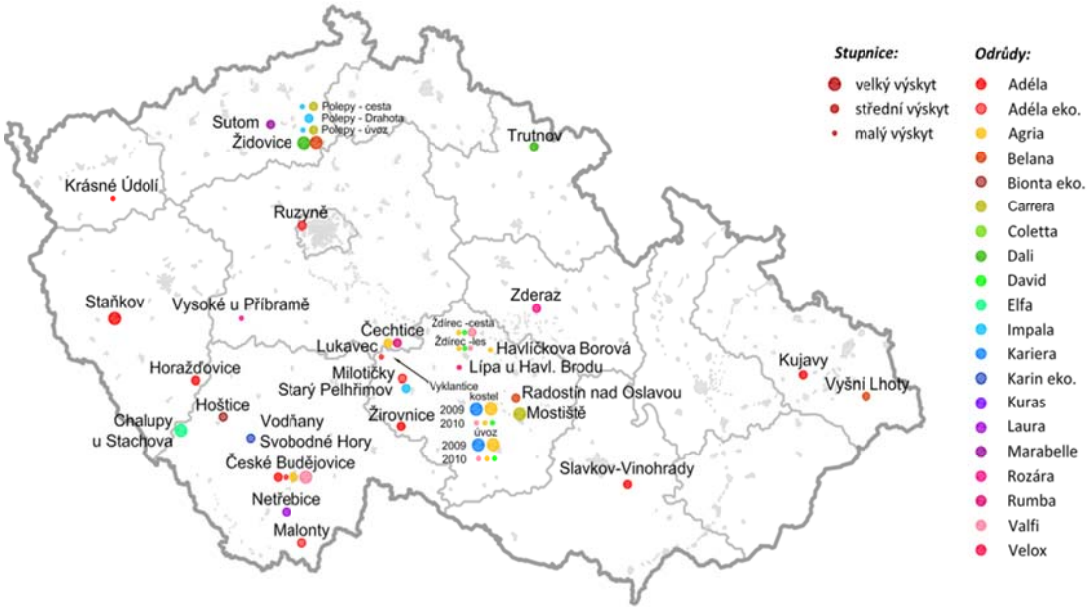
Tabulka 1: Informativní vlastnosti jednotlivých lokalit (n = 33) analyzovaných v rámci studie.

6.1.2 Druhová bohatost aktinobakteriálních společenstev tuberosféry a volné půdy

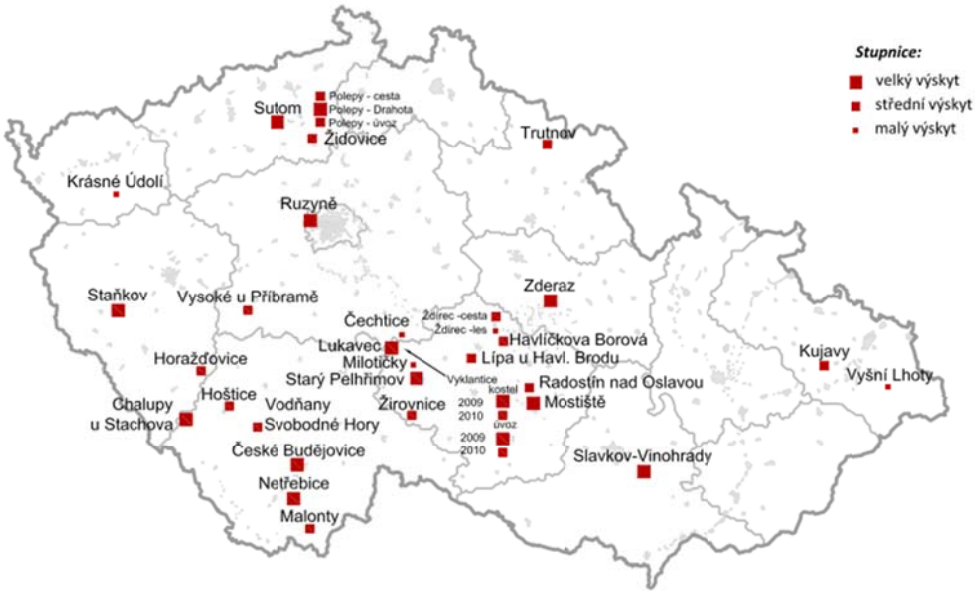
V rámci sledované studie byla určena druhová bohatost aktinobakteriálních společenstev na 33 lokalitách pro tuberosféru (půda v okolí hlízy bramboru) a volnou půdu (půda mezi bramborovými řádky). Jednotlivé lokality se lišily přítomností pěstovaných odrůd (celkem 19 odrůd, po dvou odrůdách na 4 lokalitách, třech odrůdách na 4 lokalitách) a způsoby obhospodařování (1 lokalita s konvenčním a ekologickým režimem, 7 lokalit s ekologickým režimem).

Druhová bohatost (pro tři biologická opakování) jednotlivých lokalit se pohybovala v rozmezí 10 - 55 OTU (průměr 31 OTU) pro volnou půdu a 16 - 51 OTU (průměr 33 OTU) pro tuberosféru. Druhová bohatost mezi tuberosférou a volnou půdou byla významně odlišná (ANOSIM; R = 0,030, p = 0,0017). Lokality byly na základě počtu zjištěných terminálně značených restrikčních fragmentů (T-RFs) rozděleny do 3 skupin. Do skupiny s nízkou druhovou bohatostí spadalo 5 půd a 19 tuberosfér. Skupina se střední druhovou bohatostí obsahovala 18 půd a 24 tuberosfér. Skupina s vysokou druhovou bohatostí obsahovala 18 půd a 9 tuberosfér.

Výsledek druhové bohatosti pro tuberosféru udává obrázek 3 a pro volnou půdu obrázek 4.



Obrázek 3: Schéma znázornění druhové bohatosti aktinobakteriálních společenstev tuberosféry jednotlivých lokalit.



Obrázek 4: Schéma znázornění výskytu strupovitosti aktinobakteriálních společenstev tuberosféry jednotlivých lokalit.

6.1.3 Predikční model výskytu obecné strupovitosti

U získaných dat o intenzitě strupovitosti, chemickém složení půdy a druhové bohatosti aktinobakteriálních společenstev byla provedena statistická analýza. Na hranici statistické významnosti se pohybovala závislost mezi počtem terminálních restrikčních fragmentů a množstvím vápníku v půdě ($p = 0{,}011$). Dále byly zjištěny dvě signifikantní korelace:

1) mezi výskytem strupovitosti a množstvím fosforu v půdě ($p < 0.001$)

2) mezi výskytem strupovitosti a počtem terminálních restrikčních fragmentů ($p = 0{,}001$)

První závislost (vysvětluje 24 % variability strupovitosti) lze popsat funkcí:

$$PS = e^{(3{,}434 - 0{,}601 \cdot \ln P)} \qquad 1.1$$

PS je predikce strupovitosti (stupnice 1-9); P je množství vyměnitelného fosforu v půdě [mg/kg]. Z funkce (1.1) plyne, že s rostoucím množstvím fosforu můžeme očekávat nižší výskyt strupovitosti.

Druhou uvedenou závislost (vysvětluje 21 % variability strupovitosti) lze popsat funkcí:

$$PS = e^{(1{,}444 - 0{,}0279 \cdot \mathrm{TRFs})} \qquad 1.2$$

PS je predikce strupovitosti (stupnice 1-9); T-RFs je počet terminálních restrikčních fragmentů aktinobakteriálního společenstva. Lze tedy předpokládat, že s rostoucím počtem terminálních restrikčních fragmentů, můžeme očekávat nižší strupovitost.

Kombinací výše uvedených funkcí byl navržen predikční model výskytu obecné strupovitosti (vysvětluje 33 % variability strupovitosti) popsaný funkcí:

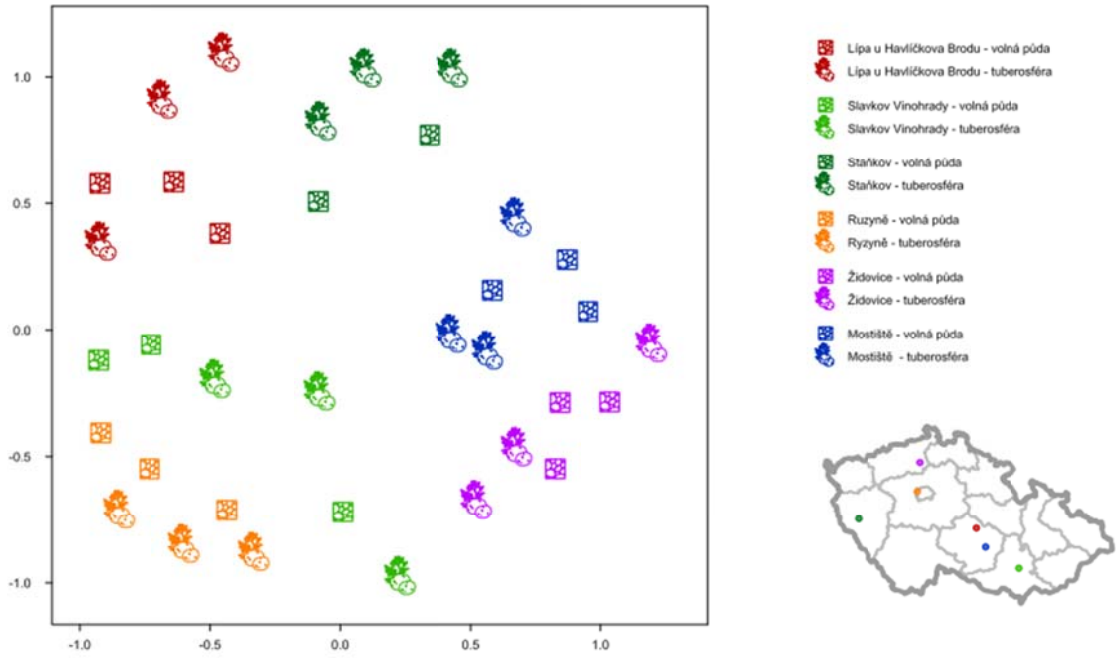
$$PS = e^{(3{,}563 - 0{,}0214 \cdot \mathrm{TRFs} - 0{,}4888 \cdot \ln P)} \qquad 1.3$$

PS je predikce strupovitosti (stupnice 1-9); P je množství vyměnitelného fosforu v půdě [mg/kg]; TRFs je počet terminálních restrikčních fragmentů aktinobakteriálního společenstva.

6.2 Faktory ovlivňující složení aktinobakteriálního společenstva

6.2.1 Místní specifita aktinobakteriálního společenstva

Analýza prokázala rozdíly ve složení aktinobateriálních společenstev jednotlivých lokalit. Na obrázku 5 jsou Sammonovou projekcí aktinobakteriálních profilů T-RFLP (stres = 0,085) zřetelně vymezeny jednotlivé lokality (pro názornost bylo zvoleno pouze 6 lokalit).



Obrázek 5: Sammonovo zobrazení aktinobakteriálních profilů vybraných lokalit.

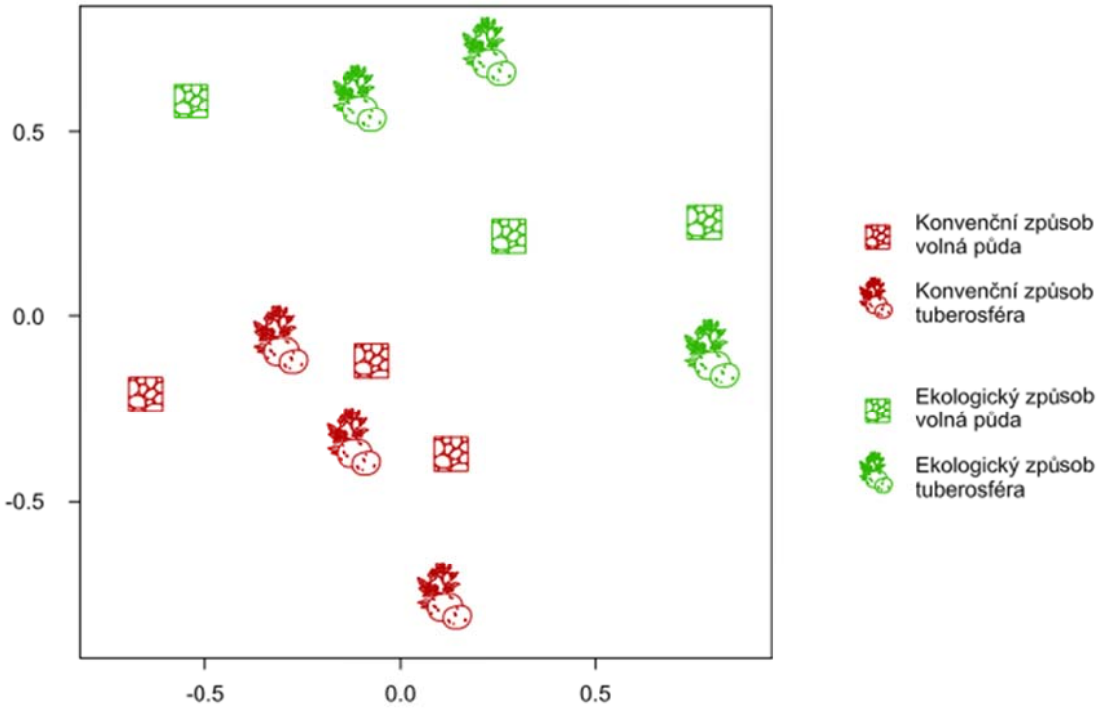
Výsledek je statisticky podpořen analýzou podobnosti (ANOSIM) mezi skupinami definovanými na základě stanovišť. Výsledky této analýzy shrnuje tabulka 2. Na základě hodnot statistické významnosti je patrné, že existují signifikantní rozdíly ve složení aktinobakteriálních společenstev jednotlivých lokalit. Aktinobakteriální společenstva jsou tedy významně ovlivněna lokalitou.

Lokalita	**Staňkov**	**Lípa u HB**	**Židovice**	**Mostiště**	**Slavkov**
Ruzyně	0,0026	0,0025	0,0025	0,0024	0,0023
Staňkov		0,0022	0,0023	0,0019	0,0026
Lípa u HB			0,0022	0,0016	0,0023
Židovice				0,0029	0,0034

Tabulka 2: Tabulka statistické významnosti (p) analýzy ANOSIM. (R = 0,9075).

6.3 Vliv obhospodařování na složení aktinobakteriálních společenstev

Pro analýzu byla zvolena lokalita České Budějovice 2009, na které se půda obdělávala konvenčním i ekologickým přístupem. Na obrázku 6 (stres = 0,016) je viditelná odlišnosti mezi aktinobakteriálními společenstvy.



Obrázek 6: Sammonovo zobrazení jednotlivých aktinobakteriálních profilů na lokalitě s odlišným způsobem obhospodařování.

Analýza podobnosti (ANOSIM) mezi skupinami definovanými na základě rozdílného způsobu obdělávání ($R = 0{,}4981$, $p < 0{,}002$) prokázala, že existuje signifikantní rozdíl mezi aktinobakteriálními společenstvy v závislosti na způsobu obhospodařování půdy na lokalitě České Budějovice.

6.3.1 Vliv odrůdy bramboru na složení aktinobakteriálních společenstev

Analýza podobnosti (ANOSIM) na základě vymezených skupin pro odlišné odrůdy neprokázala signifikantní statistickou rozdílnost pro odrůdy Agria a Valfi na lokalitě České Budějovice ($R = 0{,}4074$, $p = 0{,}1028$) odrůdy Belana a Dali ($R = 0{,}963$ $p = 0{,}1005$) na lokalitě Židovice ani pro odrůdy Agria a Kariera na stanovištích Vyklantice – kostel ($R = 0{,}3951$, $p = 0{,}064$) a Vyklantice - úvoz ($R = 0{,}0268$, $p =$

0,0256) pro rok 2009. Ke stejným závěrům se došlo i v případě odrůd Agria, David a Valfi na lokalitách Vyklantice – kostel a Vyklantice – úvoz (rok 2010). Statistické výsledky shrnuje Tabulka 3 a Tabulka 4.

odrůda	**Adéla**	**David**	**Valfi**
Adéla		0,6497	0,4546
David	0,6497		0,1464
Valfi	0,4564	0,1464	

Tabulka 3: Tabulka statistické významnosti (p) analýzy ANOSIM pro odlišné odrůdy na stanovišti Vyklantice – úvoz, rok 2010 (R = 0,3720).

odrůda	**Adéla**	**David**	**Valfi**
Adéla		0,0572	0,0809
David	0,0572		0,0894
Valfi	0,0809	0,0894	

Tabulka 4: Tabulka statistické významnosti (p) analýzy ANOSIM pro odlišné odrůdy na stanovišti Vyklantice – kostel, rok 2010 (R = 0,1875).

6.4 Navržení primerů pro kvantifikaci genu *txtA*

6.4.1 Návrh primerů pro kvantifikaci *txtA* genu

Na základě přístupného anotovaného genomu *Streptomyces scabiei* (NC_013929.1), ostrovů patogenity fytopatogenních streptomycet (AF255732, AY707081) a 43 kmenově specifických sekvencí pro gen *txtA* byl sestrojen „alignment“. Tento „alignment“ byl použit jako předloha pro navržení trojice primerových párů Tabulka 5, konkrétně bylo využito oblasti vykazující 98% homologii mezi jednotlivými sekvencemi v rámci genu *txtA*. Jedná se o gen, účastnící se biosyntézy thaxtominu A, který je prokázanou determinantou patogenity. Níže uvedená Tabulka 5 nás informuje o jejich základních vlastnostech a umožnuje predikci jejich chování.

Název	Zpětný (R) primer (směr 5´-› 3´)	Přímy (F) primer (směr 5´-› 3´)	lokalizace na genomu S. scabiei 87.22	velikost produktu (párů bazí)
TxtA1	TCGTGCTCAACTCCGTGAT	GCCGTCGTGAAGAACTCC	3607399-3607417 /r/; 3607153-3607170 /f/	255
TxtA2	TCGTCCTGCATCAGCTCTCC	AGTTCCTTCTCCTGCGCCAT	3607462-3607480 /r/; 3607183-3607202 /f/	298
TxtA3	CATGAGCTGGGGAGTCTGC	GGGTCCACGAGCAGTTCC	3607171-3607188 /f/; 3607439-3607457/r/	287

Tabulka 5: Sekvence navržených primerů pro část genu *txtA* .

název primeru	teplota tání [°C]	ΔG [kcal/mol]	intramolekulární vlásenka; ΔG [kcal/mol]	homodimer; ΔG [kcal/mol]	heterodimer 3´- koncový ΔG [kcal/mol]	heterodimer; ΔG [kcal/mol]
TxtA1R	58,3	- 29,5	Nevzniká	vzniká; -1,0	nevzniká	vzniká; -1,4
TxtA1F	57,3	- 28,6	Nevzniká	Nevzniká		
TxtA2R	61,0	- 31,7	vzniká; +0,4	Nevzniká	nevzniká	vzniká -2,2
TxtA2F	61,1	- 31,3	Nevzniká	vzniká; -5,7		
TxtA3R	59,6	- 30,0	Nevzniká	vzniká; -2,8	vzniká; -4,6	vzniká; -4,6
TxtA3F	59,5	- 29,1	vzniká; +0,9	vzniká; -0,2		

Tabulka 6: Základní vlastnosti navržených primerů.

Na základě tabulky 6 lze primerový pár TxtA2 vyloučit z pilotních amplifikací, protože pravděpodobnost vzniku homodimeru TxtA2F je podpořena zápornou hodnotou změny Gibbsovy energie.

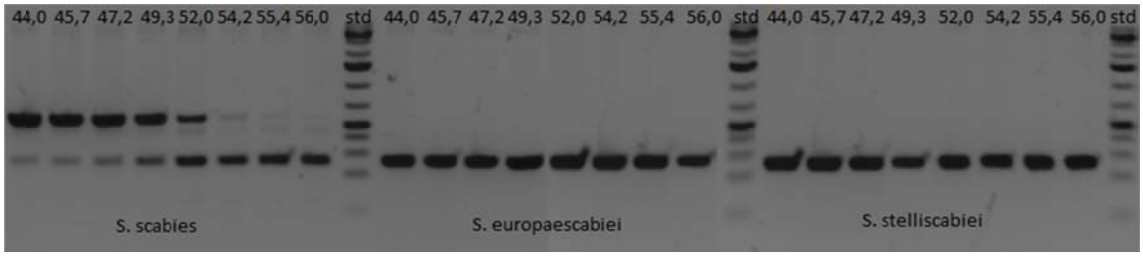
6.5 Testování primerů pro kvantifikaci *txtA* genu

6.5.1 Testování amplifikace na sbírkových kmenech

Navržené primery byly odzkoušeny na třech sbírkových kmenech *Streptomyces scabiei* (DSMZ 41658), *Streptomyces europaeiscabiei* (DSMZ 41802) a *Streptomyces stelliscabiei* (DSMZ 41803). Zkušební PCR vykazovaly nespecifickou amplifikaci pro kmen *S. scabiei* v případě primerových kombinací TxtA1 a TxtA3. Velké množství nespecifických produktů bylo typické pro primerový pár TxtA3. Z tohoto důvodu byl primerový pár vyřazen z následující optimalizace. Oproti tomu TxtA1 primerový pár vykazoval pouze jeden nespecifický produkt vznikající v majoritním množství (ve srovnání s cílovým produktem). Amplifikace *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei* primerovými páry TxtA1 a TxtA3 vykazovala vznik specifických produktů.

6.5.2 Optimalizace protokolu primerových setů TxtA1 a TxtA3

Následnou gradientovou PCR nebylo nikdy docíleno pouze jediného výsledného produktu pro kmen *S. scabiei* (obrázek 7). Z obrázku je patrno, že se zvyšující se teplotou množství nespecifického produktu klesá, ale stále je přítomen (přelomem je teplota 52,0 °C). Gradientová PCR potvrdila robustnost primerového páru TxtA1 za rozdílných teplot a specifičnost pro kmeny *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei*. Primery TxtA1 se tedy jeví jako vhodná volba pro detekci *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei*.

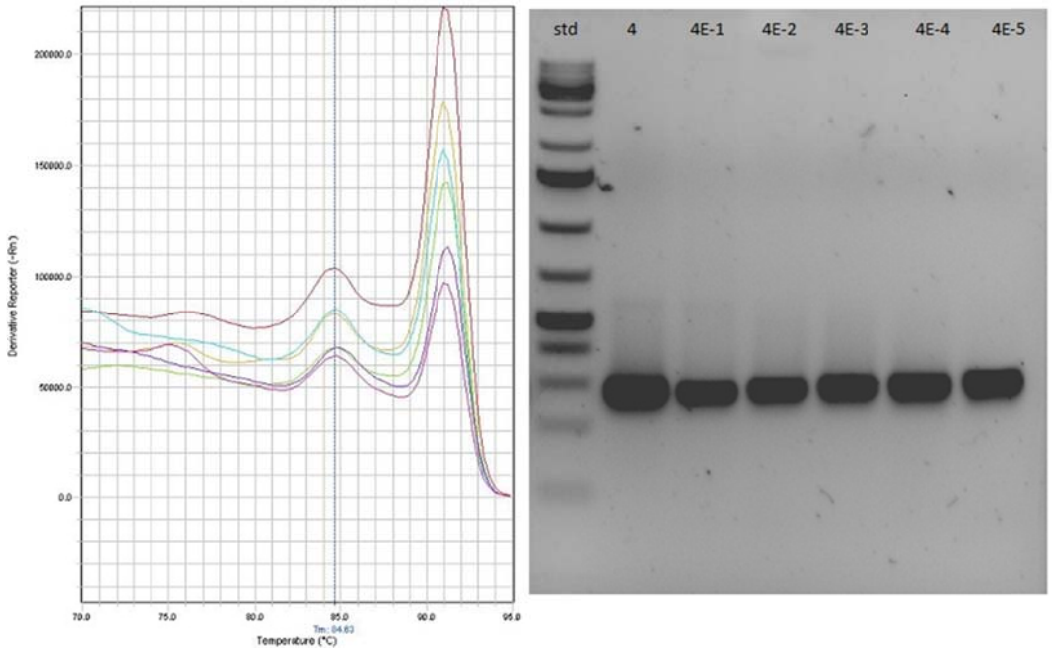


Obrázek 7: Kompilační obrázek gradientové PCR (teploty uvedeny v horní části obrázku) za použití primerů TxtA1F a TxTA1R pro sbírkové kmeny (uvedeny v dolní části obrázku). Požadovaný produktem je spodní proužek (255pb). std = standard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

6.5.3 Transfer a validace na real-time přístroji

Optimalizovaný protokol pro *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei* byl následně vyzkoušen real-time PCR přístroji. Z obrázku 8 je patrné, že real-time PCR *S.europaeiscabiei* nevykazovala tvorbu dimerů v rozmezí pěti řádů ředění. Toto zjištění

je ovšem v kontrastu s výsledkem křivky tání identických vzorků, kde je viditelný vrchol charakterizující tvorbu dimerů ($T_{m\ (dimeru)}$= 84,63 ^{o}C), kdy poměr specifického (požadovaného) a nespecifického (dimeru) produktu je 3:1.



Obrázek 8: Křivka tání jednotlivých vzorků ředící řady *S. europaeiscbiei* s vyznačeným vrcholem indikujícím nespecifickou amplifikaci (vlevo). Elektroforetická separace týchž vzorků bez přítomnosti primerových dimerů (vpravo). Velikost požadovaného produktu je 264 pb. Std= standard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder)

V případě reálných vzorků se potvrdila očekáváná přítomnost dimeru primerů a očekávané zvyšování tvorby nespecifickému produktu až k poměru 1:1.

6.5.4 Ověření specifity primerů pro kvantifikaci *txtA*

Na základě předešlých výsledků byly použity pro kvantifikaci genu *txtA* primery StrepF, StrepR (Qu et al., 2008). Klonovací analýzou byla ověřena jejich specifita. Z paralelně prováděné monitorovací studie byly vybrány půdy dvou lokalit s nejnižším a nejvyšším výskytem strupovitosti (Tabulka 7). Nejprve byla DNA amplifikována primery StrepF, StrepR poté klonována. Výsledky klonovací analýzy jsou uvedeny (Tabulka 7). Z této tabulky je patrné, že získané environmentální sekvence jsou v případě tuberosféry i půdy skoro identické se srovnávanou referenční sekvencí z genomu *S. scabiei 87.22*. Úspešnost klonování je vyšší pro tuberosféru. Vyhledáváním algoritmem BLAST byly zjištěny podobné sekvence. Největší podobnosti vykazovaly sekvence *S. scabiei* (FN554889.1), *S. acidiscabiei* (AF255732.1), *S. turgidiscabies*

(AY707081.1) se 100 % identitou (E-hodnota = 5E-08) a dále část klastru pro biosyntézu aktinomycinu u *S. anulatus* (HM038106.1) s 86% identitou (E-hodnotou = 1E-09).

Lokalita	Obdělávání	Odběr	Strupovitost podzim (1-9)	Klony odpovídající cílové sekvenci [%]	Porovnání sekvencí získaných klonů s referenční genomovou sekvencí *Streptomyces scabies 87.22* [počet]		
					Podobnost = 1,000	Podobnost = 0,986	Podobnost < 0,986
České Budějovice	ekologické	půda	-	67	20	0	0
		tuberosféra	1,05	87	24	2	0
Ždírec-cesta	konvenční	půda	-	47	14	0	0
		tuberosféra	6,22	73	19	3	0

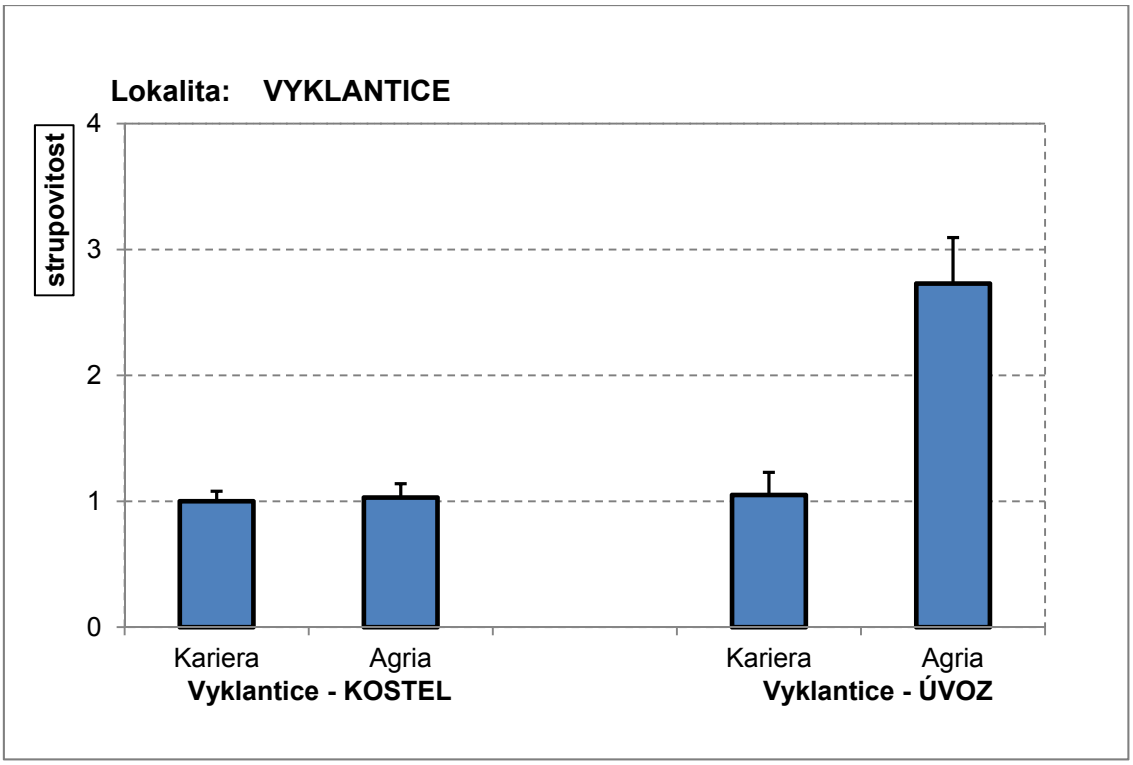
Tabulka 7: Ověření specifity primerů pro následnou real-time PCR na eDNA z kontrastních lokalit z hlediska výskytu strupovitosti. Pro každý odběr n = 30.

6.6 Analýza aktinobakteriálních společenstev supresivních a konduktivních půd

Analýza složení aktinobakteriálních společenstev prostřednictvím T-RFLP byla též provedena na lokalitách Vyklantice (rok 2009 a 2010) a Ždírec (rok 2010), v obou případech na dvojici polí s nízkým a vysokým výskytem strupovitosti.

6.6.1 Lokalita Vyklantice (rok 2009)

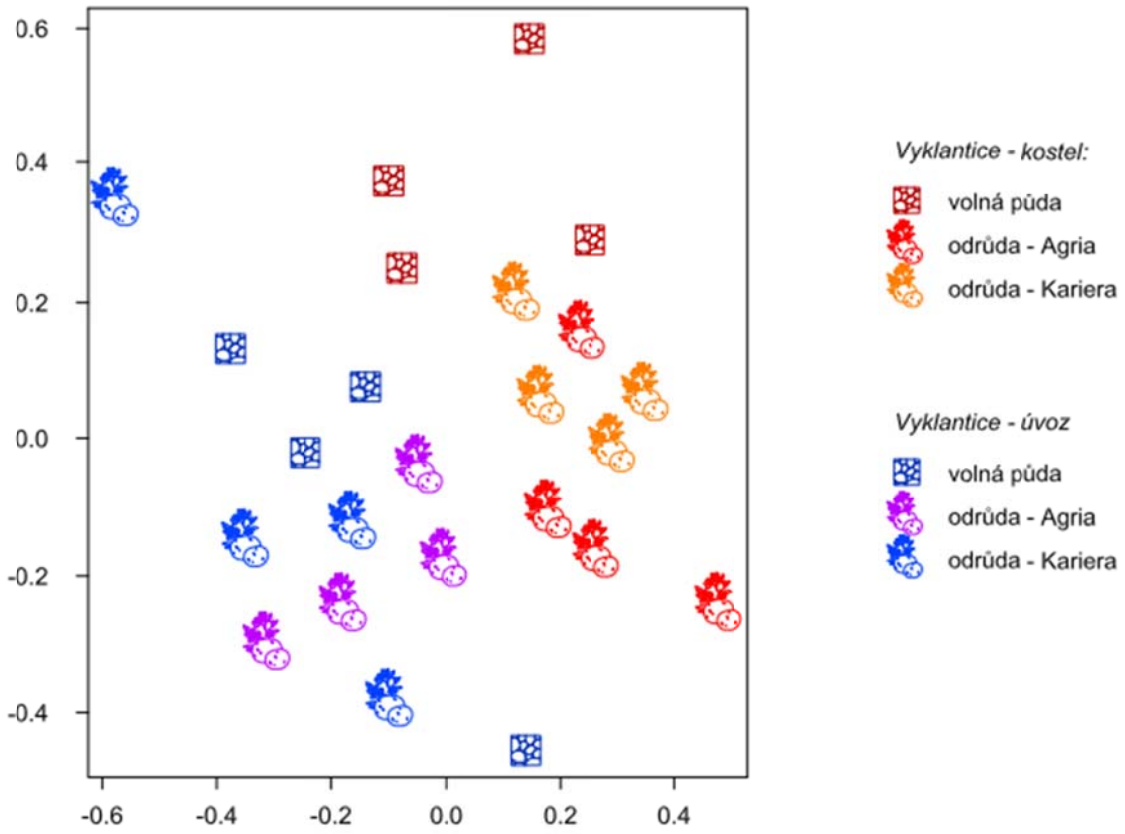
Na lokalitě Vyklantice se jednotlivá pole s nízkým výskytem strupovitosti a vysokým výskytem strupovitosti nacházejí v těsné blízkosti.



Obrázek 9: Výskyt strupovitosti na lokalitě Vyklantice (rok 2009).

Je patrné, že výskyt strupovitosti je vyšší na stanovišti Vyklantice – úvoz (obrázek 9). Odrůda Agria zde vykazuje více než dvojnásobně vyšší výskyt strupovitosti (2,73 ± 0,37) v porovnání s odrůdou Kariera (1 ± 0,18). Na stanovišti Vyklantice - kostel není tento rozdíl viditelný. Výsledky potvrzují schopnost stanoviště Vyklantice - kostel potlačovat výskyt onemocnění.

Sammonova projekce (stres = 0,024) T-RFLP profilů lokality Vyklantice (obrázek 10) potvrzuje odlišnost (ANOSIM, R = 0,1296, p < 0,0097) ve složení aktinobakteriálních společenstev mezi stanovišti kostel a úvoz. Dále je viditelné, že existují rozdíly mezi tuberosférou a volnou půdou (ANOSIM, R = 0,4945, p < 0,0119). Naopak aktinobakteriální společenstva jednotlivých odrůd se odlišují velice málo.

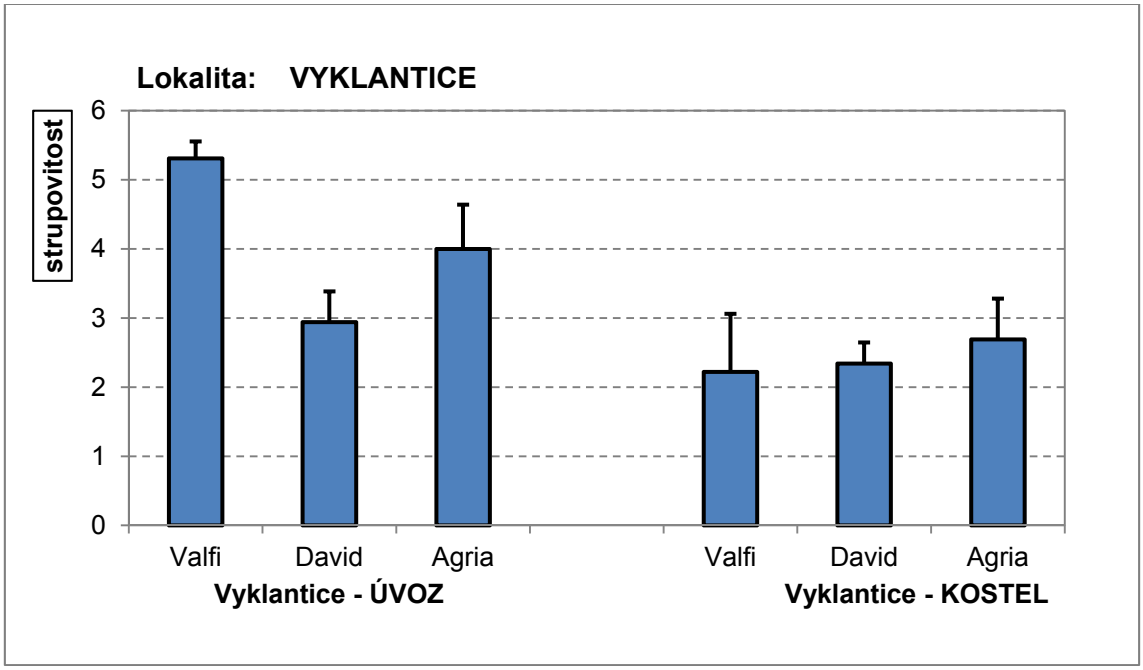


Obrázek 10: Sammonovo zobrazení jednotlivých aktinobakteriálních profilů lokality Vyklantice (rok 2009).

Na obou stanovištích byly analyzovány chemické vlastnosti půdy. Analýza (distanční korelace) potvrdila statisticky významnou korelaci mezi aktinobakteriálními společenstvy a množstvím organického uhlíku (R = 0,55, p = 0,049), celkového dusíku (R = 0,56, p = 0,029), vápníku (R = 0,58, p = 0,029), celkové síry (R = 0,62, p = 0,003) v tuberosféře. Mezi nekorelované veličiny patří množství fosforu (R = 0,51, p = 0,489), hořčíku (R = 0,52, p = 0,309).

6.6.2 Lokalita Vyklantice (rok 2010)

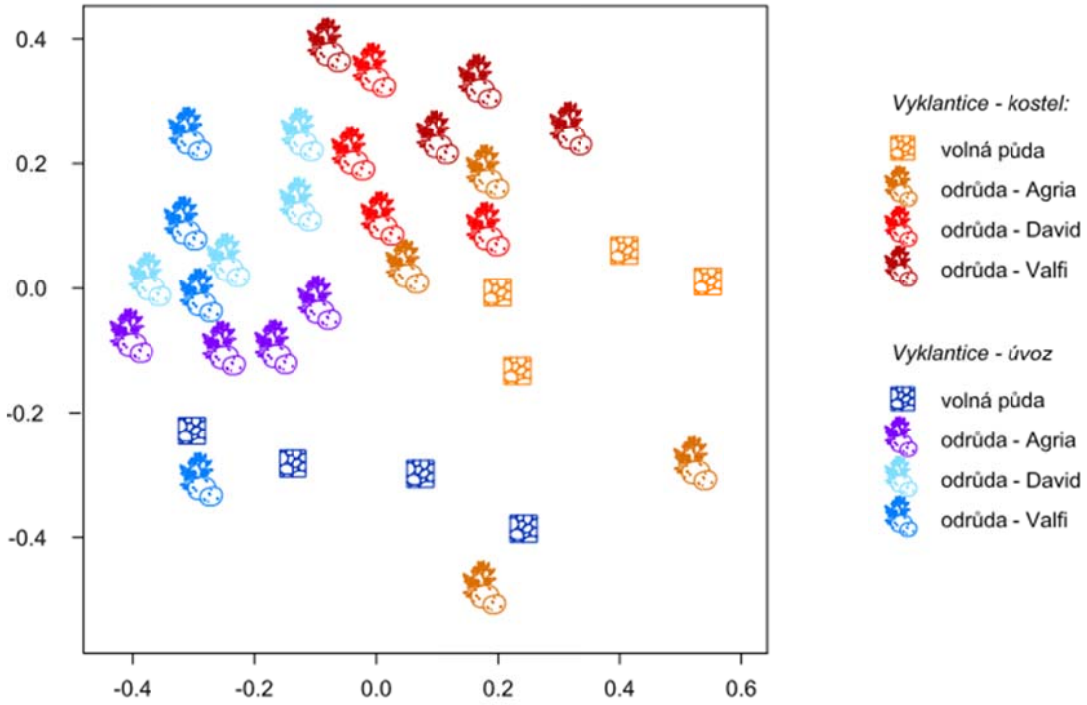
Lokalita Vyklantice byla podrobena analýze i rok poté. Výskyt strupovitosti popisuje obrázek 11.



Obrázek 11: Výskyt strupovitosti na lokalitě Vyklantice (rok 2010).

Ve srovnání s rokem 2009 je výskyt strupovitosti pro odrůdu Agria na stanovišti kostel přibližně dvojnásobný (2009 - 1,03 ± 0,11, 2010 - 2,69 ± 0,95). Naopak stanoviště úvoz vykazuje vyšší hodnotu výskytu strupovitosti pro odrůdu Agria v porovnání s rokem 2009. Pro toto stanoviště jsou patrné rozdíly. Nejvyšší výskyt strupovitosti byl zaznamenán u odrůdy Valfi (následována odrůdou Agria a David).

Na Sammonově projekci (stres = 0,082) T-RFLP profilů lokality Vyklantice (obrázek 12) je možno rozlišit aktinobakteriální společenstva na dvě skupiny odpovídající stanovištím. Opět je patrný rozdíl mezi aktinobakteriálními společenstvy tuberosféry a volné půdy (ANOSIM, R = 0,0085, p < 0,0085).



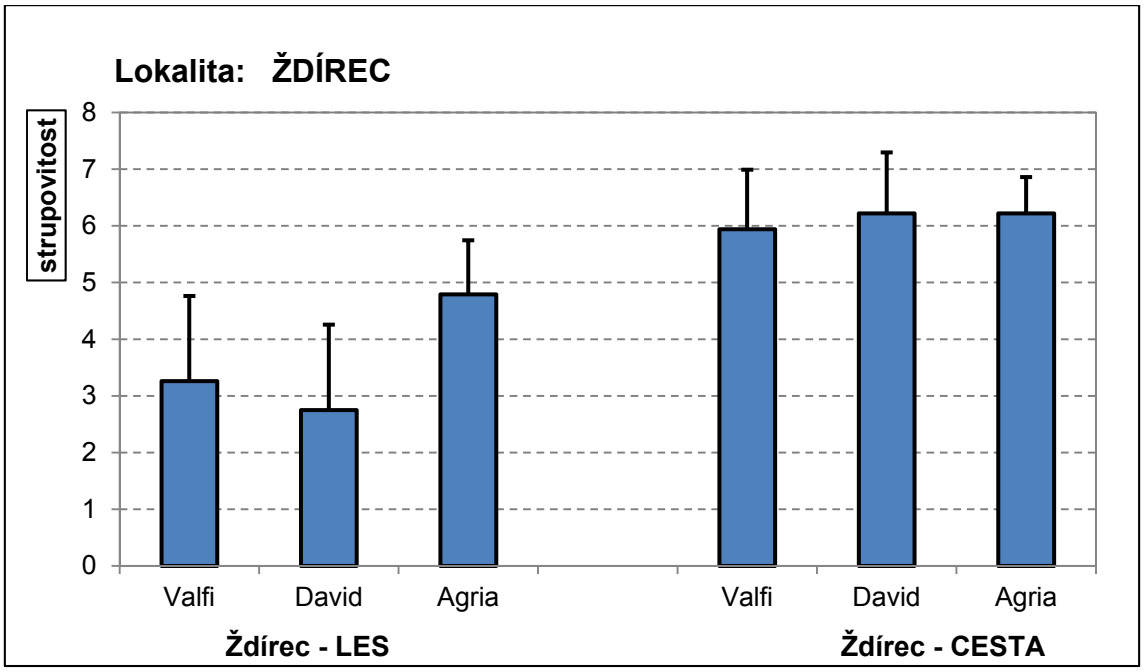
Obrázek 12: Sammonovo zobrazení jednotlivých aktinobakteriálních profilů lokality Vyklantice (rok 2010).

V případě lokality Vyklantice (rok 2010) byly zjištěny korelace mezi aktinobakeriálními společenstvy a množstvím celkového dusíku (R = 0,79, p = 0,001), organického uhlíku (R = 0,79, p = 0,001), vápníku (R =0,75, p = 0,001), využitelného fosforu (R = 0,78, p = 0,001) a hořčíku (R = 0,54, p = 0,006) v tuberosféře. Mezi nekorelované veličiny patří pouze množství celkové síry (R = 0,43, p = 0,357). Lze říci, že se jednalo o silnější závislosti v porovnání s analýzou z roku 2009.

V obou případech lze vypozorovat vlastnosti tuberosféry, které ovlivňují aktinobakteriální společenstva na dané lokalitě v rozdílných letech. Konkrétně se jedná o celkový dusík, organický uhlík. V případě Vyklantic 2010 je významným prvkem ovlivňující složení aktinobakteriálních společenstev i pH (R = 0,78, p = 0,001) a též množství využitelného fosforu (R = 0,78, p = 0,001).

6.6.3 Lokalita Ždírec

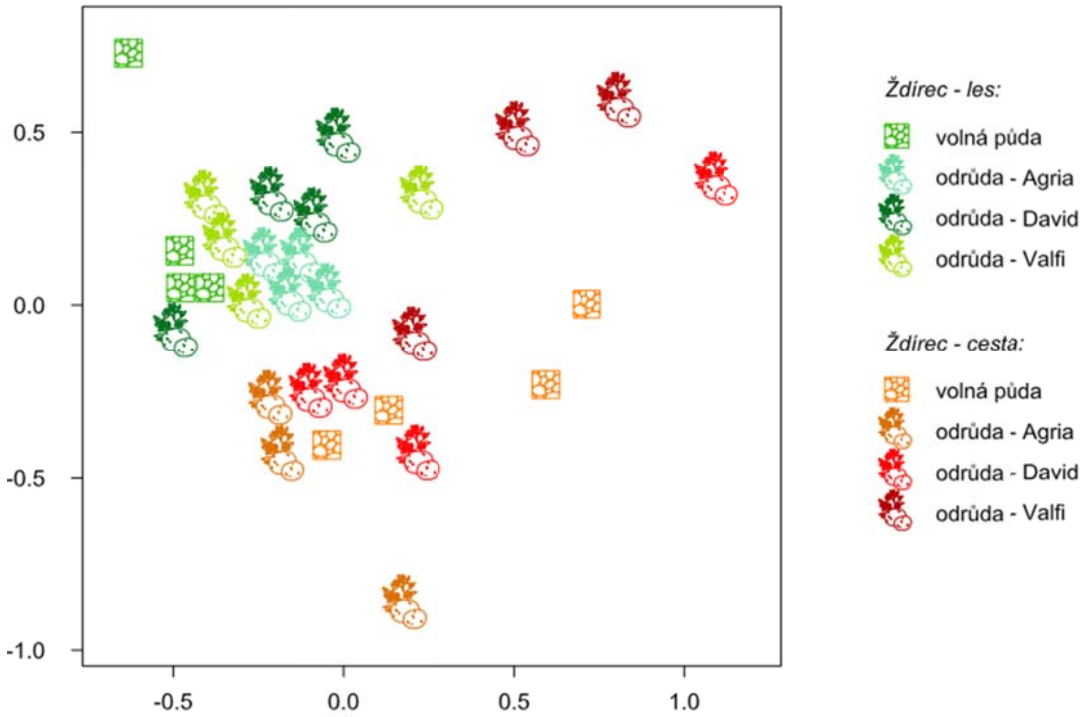
Další lokalitou, která byla podrobena analýze diverzity aktinobakteriálních společenstev je Ždírec. Obrázek 13 informuje o hodnotách strupovitosti pro stanoviště (les, cesta) a pěstované odrůdy.



Obrázek 13: Výskyt strupovitosti na lokalitě Ždírec (rok 2010).

Na stanovišti cesta je v průměru vyšší míra strupovitosti než na stanovišti les. V případě stanoviště les je nejvíce postižena odrůda Agria (4,89 ± 0,70), poté Valfi (3,26 ± 1,05) a nakonec David (2,75 ± 1,07). Na stanovišti cesta jsou jednotlivé odrůdy v podstatě stejnoměrně napadené obecnou strupovitostí. Výsledky naznačují schopnost stanoviště Ždírec - les potlačovat výskyt onemocnění. Dá se zde předpokládat paralela se stanovištěm Vyklantice – kostel.

Rozdíl ve složení aktinobakteriálních společenstev mezi stanovišti les a cesta je statisticky signifikantní (ANOVA, R = 0,5095, p = 0,001). Tuto analýzu podporuje i Sammonova projekce (obrázek 14), kdy je viditelný rozdíl ve složení aktinobakteriálních společenstvech jednotlivých stanovišť. Na stanovišti les jsou si aktinobakteriální společenstva více podobná než na stanovišti cesta.



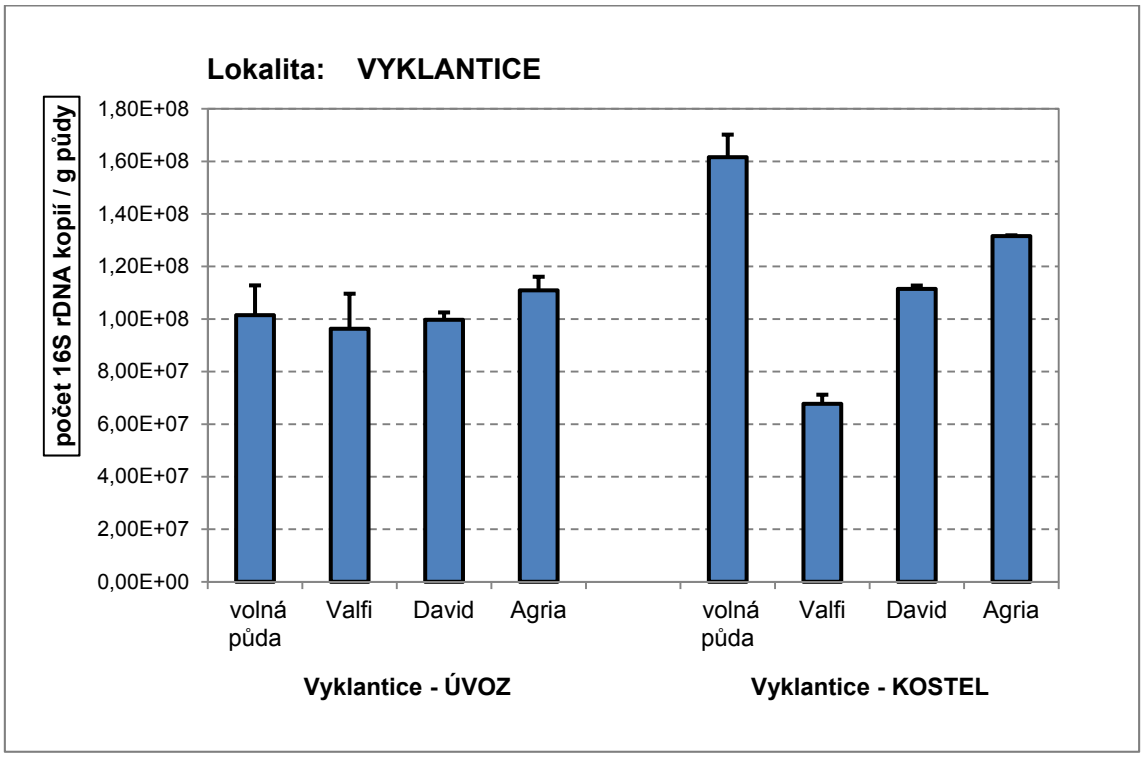
Obrázek 14: Sammonova projekce lokality Ždírec (rok 2010).

V případě lokality Ždírec byly zjištěny korelace (distanční korelace) mezi aktinobakeriálními společenstvy a množstvím celkového dusíku (R = 0,71, p = 0,001), organického uhlíku (R = 0,73, p = 0,001), vápníku (R = 0,77, p = 0,001) a využitelného fosforu (R= 0,64, p= 0,001), dále hořčíku (R = 0,65, p = 0,001), celkové síry (R = 0,70, p = 0,001) a železa (R = 0,65, p = 0,001) v tuberosféře. Oproti lokalitě Vyklantice existují silnější závislosti mezi chemickými vlastnostmi půdy a aktinobakteriálními společenstvy. V případě Ždírce je též významným prvkem ovlivňující složení aktinobakteriálních společenstev i pH (R = 0,63, p = 0,002), stejně jako v případě lokality Vyklantice (rok 2010).

6.7 Kvantifikace aktinobakterií a genu *txtA* na supresivních a konduktivních lokalitách

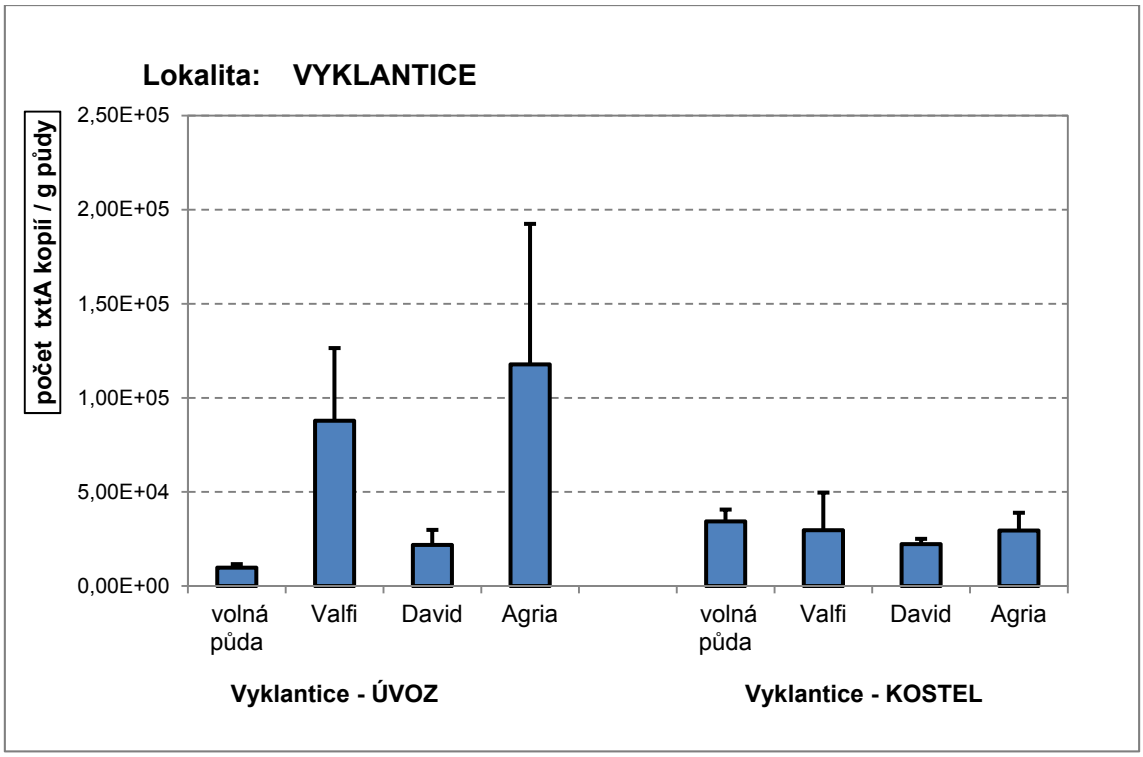
6.7.1 Kvantifikace aktinobakterií a *txtA* genu

Kvantitativní analýza byla provedena na lokalitách Vyklantice (rok 2010) a Ždírec. Množství kvantifikovaných kopií 16S rDNA genu (aktinobakterií) a *txtA* genu na lokalitě Vyklantice (rok 2010) jsou znázorněny na obrázku 15 a obrázku 16.



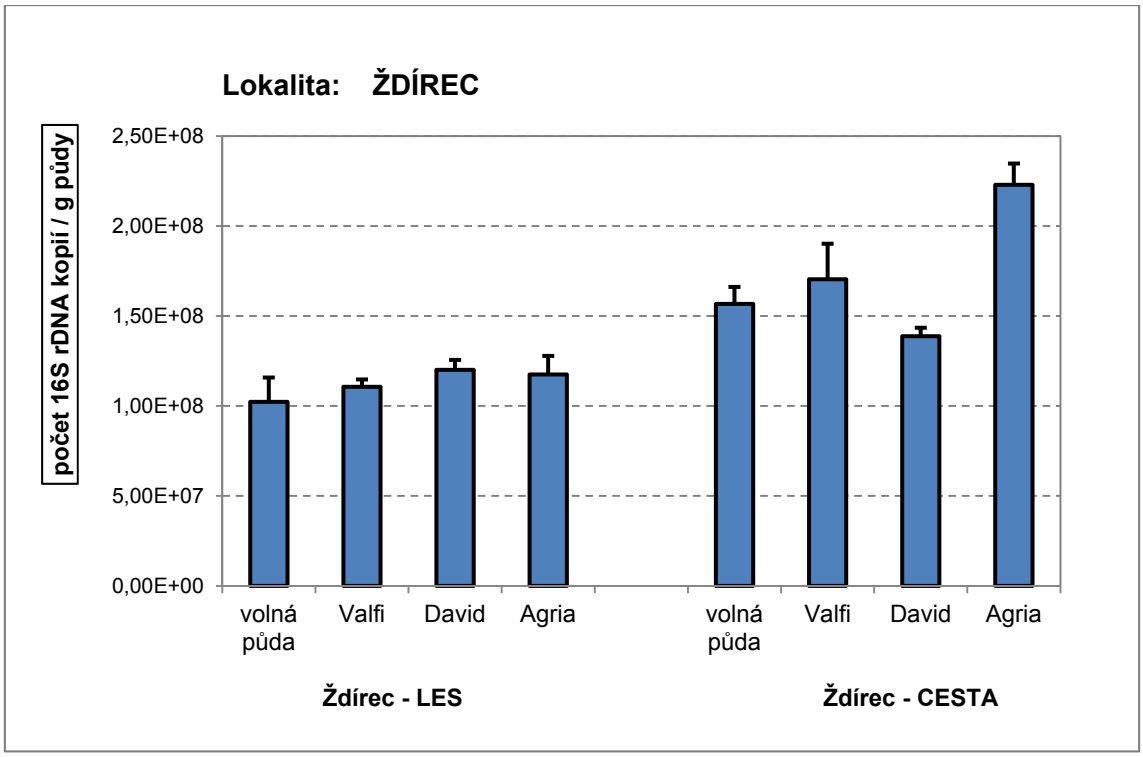
Obrázek 15: Množství 16S rDNA genu na lokalitě Vyklantice (rok 2010). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze čtyř biologických opakování pro volnou půdu, odrůdu Valfi, David a Agria.

V případě lokality Vyklantice je množství kopií 16S rDNA ve volné půdě nižší pro stanoviště Vyklantice - úvoz. Pro jednotlivé bramborové odrůdy je množství 16S rDNA kopií na stanovišti Vyklantice – úvoz nezávislé na odrůdě V případě stanoviště Vyklantice - kostel je závislost na odrůdě patrná. Nejvyšší množství kopií 16S rDNA je typické pro odrůdu Agria (1,32E+08 ± 9,28E+06), následuje David (1,11E+08 ± 2,64E+06) a nakonec Valfi (6,77E+07 ± 1,39E+06). Na lokalitě Vyklantice nebyly zjištěny korelace (distanční korelace) mezi počtem 16S rDNA genu a půdními faktory.



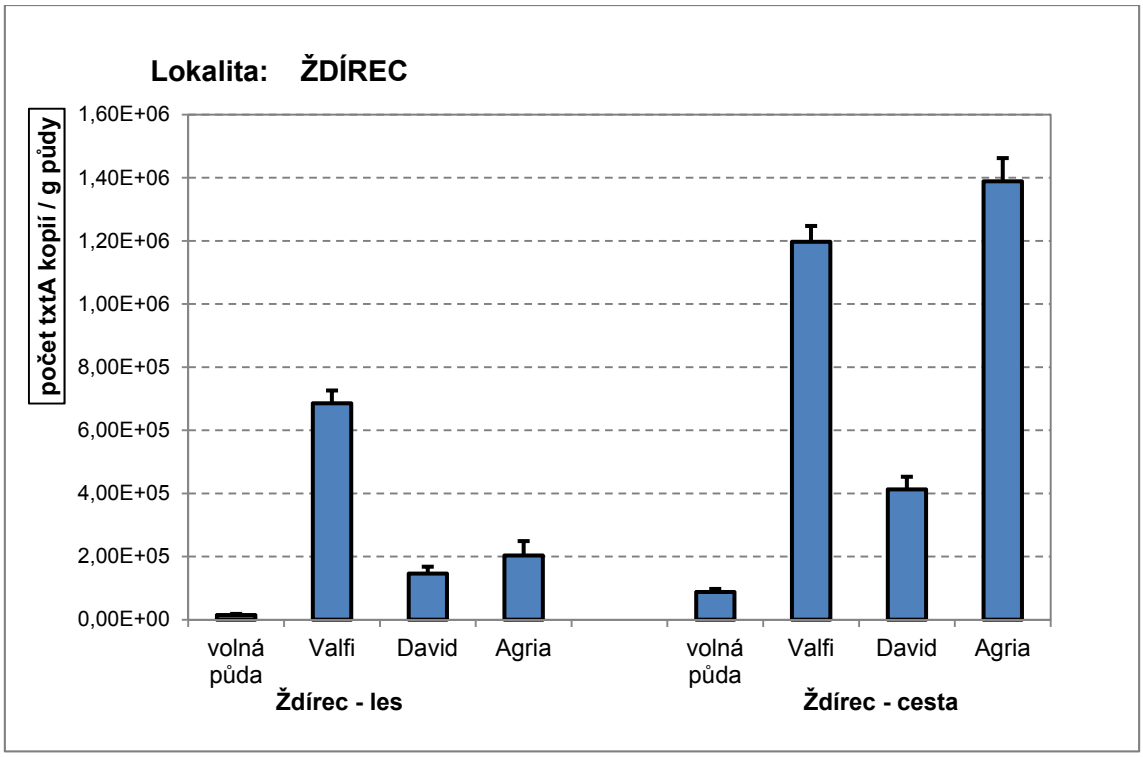
Obrázek 16: Počet kopií *txtA* genu na lokalitě Vyklantice (rok 2010). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze čtyř biologických opakování pro volnou půdu, odrůdu Valfi, David a Agria.

Množství kopií *txtA* genu nevykazuje závislost na odrůdě pro stanoviště Vyklantice - kostel. Na stanovišti Vyklantice - úvoz je patrný klesající trend v závislosti na odrůdě (Agria > Valfi > David). Množství *txtA* kopií bylo nejvyšší pro odrůdu Agria (1,18E+05 ± 7,46E+04), následovala odrůda Valfi (8,79E+04 ± 3,85E+04) a nakonec odrůda David (2,18E+04 ± 7,99E+03). Tato hodnota je srovnatelná množstvím kopií *txtA* u odrůdy David (2,23E+04 ± 2,79E+03) na stanovišti Vyklantice - kostel.



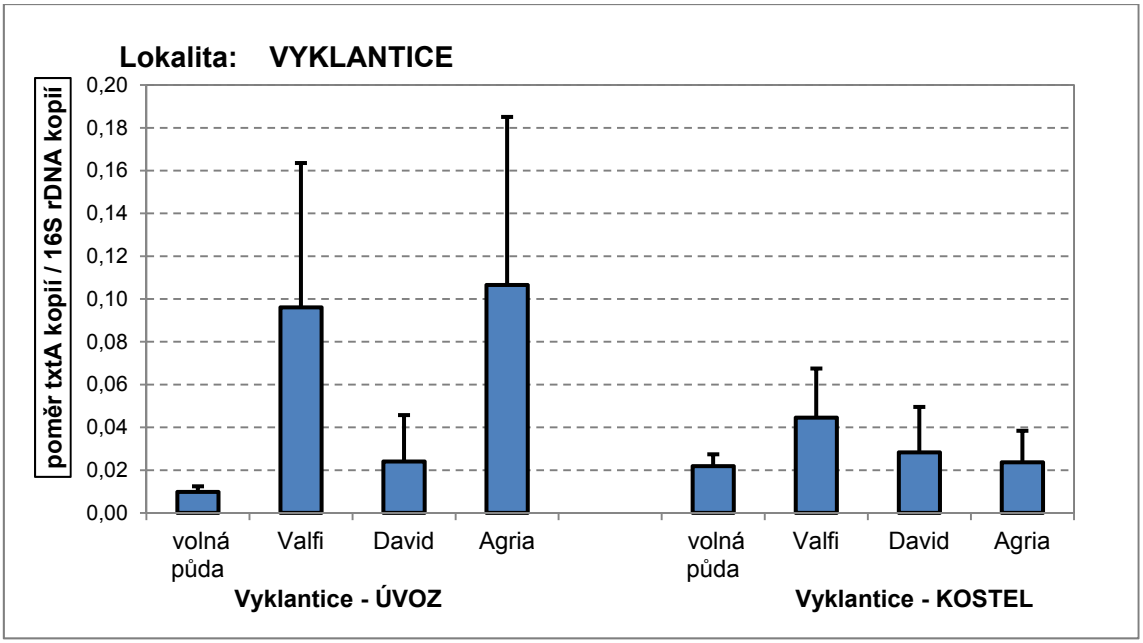
Obrázek 17: Počet kopií 16S rDNA genu na lokalitě Ždírec (rok 2010). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze čtyř biologických opakování pro volnou půdu, odrůdu Valfi, David a Agria

V případě stanoviště Ždírec - les je množství 16S rDNA skoro totožné pro volnou půdu i jednotlivé bramborové odrůdy. Množství 16S rDNA kopií je vyšší pro lokalitu Ždírec - cesta (1,57E+08 ± 9,38E+06) ve srovnání s lokalitou Ždírec-les (1,02E+08 ± 1,35E+07). Na stanovišti Ždírec - cesta je též patrný rozdíl v počtu 16S rDNA pro jednotlivé odrůdy. Existuje zde paralela s lokalitou Vyklantice - úvoz (Agria > Valfi > David). Množství 16S rDNA kopií činilo u odrůdy Agria (2,23E+08 ± 1,18E+07), následovala odrůda Valfi (1,70E+08 ± 1,97E+07). Nejnižší množství 16S r DNA kopií bylo zjištěno u odrůdy David (1,39E+08 ± 4,60E+06). Na lokalitě Ždírec (rok 2010) byly zjištěny korelace mezi počtem 16S rDNA aktinobakterií a množstvím celkového dusíku ($R = 0,60$, $p < 0,001$), organického uhlíku ($R = 0,59$, $p = 0,001$), celkové síry ($R = 0,53$, $p = 0,003$), vápníku ($R = 0,50$, $p = 0,005$) v tuberosféře. Další významnou korelaci je vztah mezi počtem 16S rDNA aktinobakterií pH ($R = 0,60$, $p < 0,001$) či množstvím *txtA* genu ($R = 0,56$, $p < 0.001$).



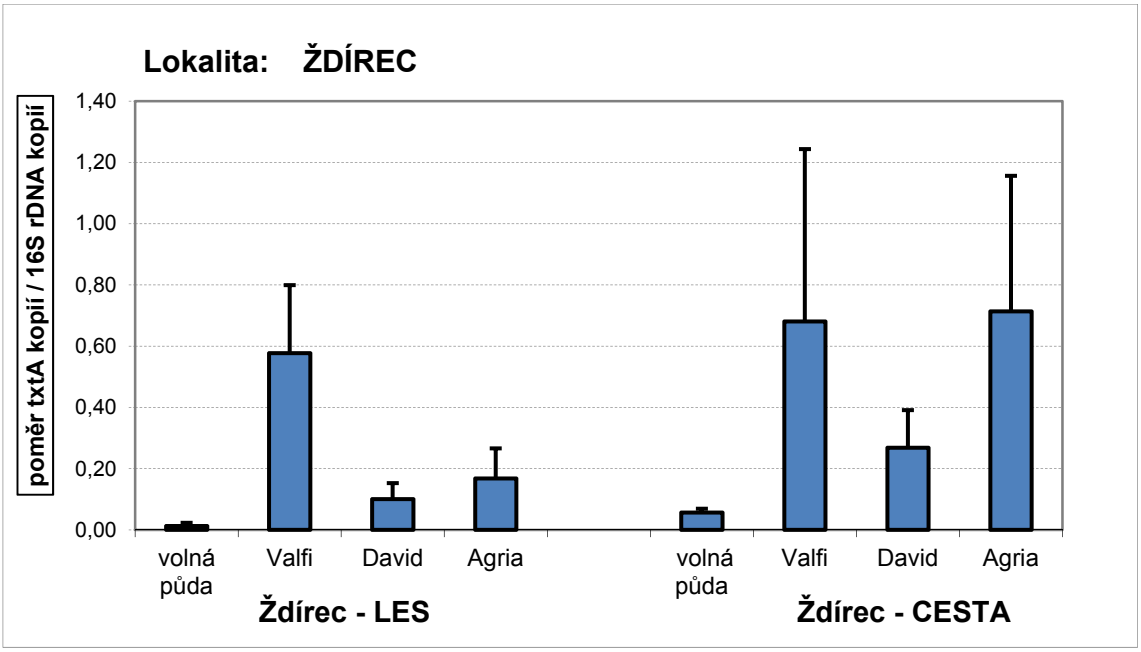
Obrázek 18: Počet kopií txtA genu na lokalitě Ždírec (2010). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze čtyř biologických opakování pro volnou půdu, odrůdu Valfi, David a Agria

Obrázek 18 popisuje poměry množství kopií *txtA* genu na lokalitě Ždírec. V případě stanoviště Ždírec - les je množství kopií *txtA* genu pro volnou půdu nižší než pro stanoviště Ždírec - cesta. Na tomto stanovišti je patrné, že je zde podobnost se stanovištěm Vyklantice - úvoz, co se týče množství *txt*A genu u jednotlivých odrůd (Agria > Valfi > David). Množství txtA genu pro odrůdu Agria bylo určeno na (1,39E+06 ± 7,33E+04), pro odrůdu Valfi (1,20E+06 ± 4,99E+04) a pro odrůdu David (4,13E+05 ± 4.00E+04). Na lokalitě Ždírec (rok 2010) byly zjištěny korelace mezi počtem *txtA* genu celkového dusíku ($R = 0,67$, $p < 0,001$), organického uhlíku ($R = 0,64$, $p < 0,001$), celkové síry ($R = 0,53$, $p = 0,003$), hořčíku ($R = 0,47$, $p = 0,009$) v tuberosféře. Další významnou korelací je vztah mezi počtem kopií *txtA* genu a pH ($R = 0,56$, $p = 0,001$) či počtem kopií aktinobakteriálních 16S rDNA genů ($R = 0,56$, $p < 0.001$).



Obrázek 19: Poměr počtu kopií *txtA* a 16S rDNA pro lokalitu Vyklantice.

Z obrázku 19 je patrné, že na stanovišti Vyklantice – kostel, je vyšší poměr (*txtA* vs. 16S rDNA) pro volnou půdu a odrůdu David při porovnání se stanovištěm Vyklantice – úvoz a naopak nižší poměr pro odrůdy Agria a Valfi. V případě stanoviště Vyklantice – úvoz jsou jednotlivé odrůdy uspořádaná ve stejném pořadí jako pro 16S rDNA a *txtA*.



Obrázek 20: Poměr počtu kopií *txtA* a 16S rDNA pro lokalitu Ždírec.

Z Obrázek 20 je patrné, že stanoviště Ždírec – cesta vykazuje vyšší poměr (*txtA* vs. 16S rDNA) pro volnou půdu a jednotlivé odrůdy. V rámci odrůd je viditelný trend známého sestupného poměru Agria > Valfi > David pouze pro stanoviště Ždírec - cesta. V případě stanoviště Ždírec - les je uspořádání odrůdu sestupné od Valfi přes Agrii a konče odrůdou David.

7 DISKUZE

7.1 Aktinobakterie v půdním společenstvu

Na základě dat klonovacích studií z databáze Greengenes bylo zjištěno, že půda je vždy osídlena devíti bakteriálními skupinami mezi které náleží i aktinobakterie (Youssef a Elshahed, 2008). Na základě porovnání četnosti jedenácti bakteriálních skupin v rámci 16S rDNA knihoven pro polní půdu, prérii a lesní půdu bylo zjištěno, že aktinobakterie jsou složkou společenstva, která reaguje na podmínky prostředí a mění své druhové složení i celkové množství. (Youssef a Elshahed, 2008).

Na základě kultivačních přístupů je odhadováno, že četnost aktinobakterií se pohybuje v rozmezí 1,00E+06 – 1,00E+09 buněk/g půdy, přičemž tvoří průměrně asi 30 % z celkového počtu mikroorganismů v půdě (Goodfellow *et al.*, 1983). Přesnější odhad počtu aktinobakterií umožnily až metody nezávislé na kultivaci. Relativní četnost aktinobakterií v 65 různých půdách byla určena metodou qPCR v rozmezí 7,1 % až 34,5 % všech bakterií (Fierer *et al.*, 2007).

7.2 Výsledky monitorovací studie

Rozdílná druhová bohatost aktinobakterií souvisí s jednotlivými typy půdního prostředí. Pro les je druhová četnost aktinobakterií vyšší než pro zemědělskou půdu (Roesch *et al.*, 2007). U zemědělské půdy s pěstovanou plodinou byla prokázána vyšší relativní četnost pro aktinobakterie v rhizosféře oproti volné půdě (Inceoğlu *et al.*, 2010). Diverzita a druhová bohatost aktinobateriálních společenstev na zemědělských půdách je ovlivňována množstvím uhlíku, dusíku, pH půdy a rostlinným pokryvem.

Provedená monitorovací studie si kladla za cíl vyhledat půdní či biologické vlastnosti rozhodující o výskytu obecné strupovitosti. Z chemických prvků bylo ve volné půdě analyzováno množství celkového dusíku (N_t), organického uhlíku (C_{org}), celkové síry (S_t), využitelného fosforu (P), využitelného hořčíku (Mg), využitelného vápníku (Ca), využitelného draslíku (K).

Z biologických vlastností byla zkoumána diverzita aktinobakteriálních společenstev metodou T-RFLP (analýza polymorfismu délky terminálního restrikčního fragmentu), protože aktinobakterie jsou jednou z hlavních složek půdního mikrobiálního společenstva, které je odlišná na jednotlivých lokalitách (Youssef a Elshahed, 2008).

Další důvod spočíval v tom, že patogen způsobující obecnou strupovitost náleží mezi aktinobakterie o kterých jsem předpokládal, že budou hlavní kompetující složkou bakteriálního společenstva.

Z výsledků monitorovací studie byla zjištěna statisticky významná negativní závislost mezi výskytem strupovitosti a množstvím využitelného fosforu ve volné půdě. Ostatní analyzované chemické vlastnosti půdy nevykazovaly statistickou závislost, což je dáno heterogenitou zkoumaných lokalit. Lokality byly vybrány s cílem pokrýt různé půdní typy a pěstitelsky významné oblasti. Pokud by byly analyzovány chemické vlastnosti tuberosféry, lze předpokládat, že by byl nalezen větší počet závislostí mezi vlastnostmi, protože nejvyšší populace patogenních *Streptomyces* se nachází v tuberosféře (Wang a Lazarovits, 2005). Ovšem problémem je přesné vzorkování tuberosféry, které je v dnešní době technicky nereplikovatelné. Výhodou výše zjištěných závislostí je možnost předpovědi výskytu strupovitosti bez závislosti na odrůdě.

Druhou zjištěnou závislostí je negativní závislost mezi počtem terminálních restrikčních fragmentů aktinobakteriálního společenstva a výskytem strupovitosti. Tento výsledek potvrdil předpoklad, že čím je v půdě bohatší společenstvo aktinobakterií, tím je sledovaný výskyt strupovitosti nižší. K analogickým závěrům došla studie Van Elsas a kol. (2012), která zjistila, že s vyšší diverzitou mikrobiálního společenstva v půdě se snižuje schopnost přežití bakteriálních patogenů. Bakteriální společenstva hrají tedy významnou roli při udržení „zdraví“ půdního prostředí.

Na základě výše zjištěných závislostí byl navržen model pro predikci strupovitosti, který vysvětluje 33 % variability výskytu strupovitosti. S rostoucím počtem aktinobakterií a obsahem využitelného fosforu v tuberosféře lze očekávat nižší výskyt strupovitosti. Vysvětlitelnost výše uvedeného modelu je oproti modelům Lazarovitse a kol. (2007) nižší. V rámci studie Lazarovitse a kol.*(*2007) byly navrženy tři modely, u kterých bylo procento variability vysvětlitelné modelem v rozmezí 80 - 88 %. Důvodem vyššího procenta variability vysvětlitelného u modelů Lazarovitse a kol. (2007) je identifikace vyššího počtu korelovaných vlastností půdního prostředí, konkrétně se jedná o kationtovou výměnnou kapacitu, pH, organický materiál, základní saturaci pro Ca, Mg, K, Na, dále množství výměnného hliníku a přístupného manganu. Modely jsou sestaveny na základě 10 lokalit (půdy stejného charakteru) a pouze jedné bramborové odrůdy (Lazarovits *et al.*, 2007).

I když je vysvětlitelnost modelu vytvořeného z monitorovací studie nižší, dá se předpokládat, že zjištěné závislosti jsou silnější a můžeme je zobecnit. A to z důvodu, že v rámci studie bylo analyzováno 33 rozdílných lokalit a 19 odrůd brambor.

Princip, jakým ovlivňuje fosfor výskyt obecnou strupovitosti je pravděpodobně nepřímý a závislý na pH, protože některé směsi sloučenin fosforu např. zásaditá struska, které obsahují vysoké procento $Ca(OH)_2$ mají vliv na zvýšení obecné strupovitosti (Wenzl a Reirchard, 1976). Tento předpoklad potvrzují i Keinath a Loria (1989), kteří tvrdí, že množství celkového fosforu v půdě má zanedbatelný přímý efekt na výskyt strupovitosti. Lazarovits a kol. (2007) též nezjistil vztah mezi množstvím fosforu v půdě a výskytem strupovitosti. Naopak důležitost pH při výskytu obecné strupovitosti byla prokázána Laceyem a Wilsonem (2001), kteří zjistili silnou negativní závislost mezi výskytem strupovitosti a pH či výskytem strupovitosti a kombinovaným množstvím vyměnitelných iontů vápníku, hořčíku a draslíku v půdě.

Závislost mezi fosforem a výskytem obecné strupovitosti byla zjištěna pouze v peridermu brambory, konkrétně se jedná o poměr akumulovaných prvků Ca/P v peridermu, který je v přímé souvislosti s intenzitou napadení hlíz (Davis, 1976; Krištůfek *et al.*, 2000). Ovšem role vápníku je sporná, protože Lambert a Manzer (1991) zjistili, že množství vápníku v místech strupů bylo několikrát vyšší než na zdravé části peridermu. Zdá se tedy, že zvýšené množství Ca je následkem výskytu obecné strupovitosti a ne faktorem, který o strupovitosti rozhoduje.

Z provedené T-RFLP analýzy plyne, že v tuberosféře je vyšší počet taxonů aktinobakterií oproti volné půdě. Získané výsledky jsou ve shodě se studiemi provedenými kultivačními (Bagyaraj a Rangaswami, 2007; Crawford *et al.*, 1993) a molekulárními technikami (Smalla *et al.*, 2001; İnceoğlu *et al.*, 2011), které dokázaly vyšší četnost aktinobakterií v rhizosféře oproti volné půdě (tzv. rhizosférní efekt). Lze tedy usuzovat na analogii mezi rhizosférou a tuberosférou. Avšak hlíza bramboru vzniká přeměnou stolonu (Kumar a Wareing, 1972), a proto nelze tuberosféru a rhizosféru považovat za stejná prostředí. Na základě těchto zjištění výše uvedené výsledky prokazují existenci tuberosferního efektu pro aktinobakterie.

Jednotlivá aktinobakteriální společenstva vykazují signifikantní rozdíly ve svém složení v souvislosti s lokalitou. Lze tedy předpokládat, že existuje významný vliv lokality na složení aktinobakteriálních společenstev. Tyto výsledky jsou ve shodě se studiemi Girvan a kol. (2003) a Ulrich a Becker (2006), které uvádějí, že klíčovým faktorem charakterizujícím složení bakteriálních populací zemědělských půd je půdní

typ a matečná hornina. Tento faktor lze generalizovat, protože půdní typ též ovlivňuje složení bakteriálních i houbových společenstev na loukách (Singh *et al.*, 2007).

Způsob obhospodařování lze zařadit mezi antropogenní faktory, které též ovlivňují složení aktinobakteriálního společenstva. Ekologický způsob obhospodařování se v našem případě od konvenčního odlišoval použitím organického hnojiva (ekologický), oproti anorganickým hnojivům (konvenční). Jenkins a kol. (2009) zjistil metodou T-RFLP rozdíly ve složení aktinobakteriálních společenstev v závislosti na použití organického a anorganického hnojiva. Použití anorganického hnojiva vedlo ke snížení pH i ke změně ve složení aktinobakteriálních společenstev (Jenkins *et al.*, 2009). Tyto pokusy byly prováděny na travnatých loukách po dobu více než sto let.

V rámci mé monitorovací studie nebyl zjištěn rozdíl ve složení aktinobakteriálních společenstev v souvislosti s rozdílnými odrůdami bramboru. Tento výsledek posiluje dříve uvedené tvrzení, že významnějším faktorem utvářejícím aktinobakteriální společenstva v případě zemědělské půdy s bramborovou monokulturou je lokalita. V případě, kdy pokládáme za kultivar (= odrůda) i transgenní brambory, je vliv kultivaru doposud nejednoznačný. Studie Heuer a kol. (2002) totiž nezjistila rozdíly ve složení aktinobakteriálních společenstev mezi transgenními kultivary (produkujícími T4 lysozym) a kontrolními rostlinami. Zmiňuje, že stáří rostliny, lokalita či rok ovlivňuje rhizosférní bakteriální komunitu transgenů (Heuer *et al.*, 2002). K opačným výsledkům došla studie (Weinert *et al.*, 2009), která zjistila rozdíly ve složení aktinobakteriáních společenstev u zeaxantinových transgenů a čtyř netransgenních odrůd.

V procesech, které jsou zodpovědné za rozdílné složení aktinobakteriálního společenstva, může hrát roli přímo transgenní rostlina nebo změna složení kořenových exudátů (Saha *et al.*, 2008). Inceoğlu a kol. (2011) došel na základě pyrosekvenační studie k závěru, že v případě mladých bramborových rostlin je prokazatelný efekt odrůdy na mikrobiální společenstva, ale s postupným stárnutím rostliny se stává bezvýznamným. Pro přesné určení vlivu bude třeba individuálních studií jednotlivých rostlin a odrůd.

7.3 Analýza aktinobakteriálních společenstev půd s výskytem nižší a vyšší strupovitosti

Pro zhodnocení polí s rozdílným výskytem strupovitosti bylo potřeba navrhnout primery, které by sloužily ke kvantifikaci streptomycet nesoucích geny pro syntézu thaxtominu prostřednictvím real-time PCR. Cílovou sekvencí pro navržení primerů byl zvolen gen *txtA*, který je prokázanou determinantou patogenity (Healy *et al.*, 2000). Při navrhování primerů se postupovalo podle následujících doporučení (Dorak, 2007): a) sekvence navrhovaného primeru má být rozmezí délky 18 – 24 nukleotidů b) teplota tání navrhovaných primerů by se neměla lišit víc než o dva stupně Celsia c) velikost amplikonu by neměla přesáhnout 250 párů bazí d) zamezení vzniku stabilních sekundárních struktur primerů e) zamezení tvorby dimerů primerů.

Navržené primerové páry splňují většinu uvedených podmínek. Předpokládaný produkt primerového páru TxtA2 přesahuje významně doporučenou velikost. Ovšem hlavní problém TxtA2 primerového páru tkví v tom, že je predikován stabilní homodimer pro TxTA2F primer (záporná hodnota změny Gibbsovy energie).

V případě primerů TxtA3, TxtA1 je velikost produktů na hranici maximální doporučené velikosti či ji částečně převyšuje. Lze předpokládat, že efektivita probíhající real-time PCR nebude významně ovlivněna. V případě primerového páru TxtA3 je problémem též tvorba 3´ koncového heterodimeru.

Z výsledků je patrné, že největší potenciál k úspěchu vykazoval primerový pár TxtA1, který docílil specifické amplifikace v případě *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei*. Vzhledem k tomu, že primerový pár byl navržen do adenylační domény neribozomální peptid syntetázy (Healy *et al.*, 2000), je překvapující, že vznikl pouze jeden nespecifický produkt. Streptomycety jsou totiž známými producenty sekundárních metabolitů, které jsou syntetizovány i neribozomálními peptid syntetázami (NRPS). Je známo, že jednotlivé moduly účastnící se jejich syntézy vykazují vzájemnou homologii (Ansari et al. 2004). Toto potvrzuje i výsledek provedené klonovací studie, kdy amplifikované úseky DNA (primery StrepF a StrepR) vykazovaly podobnost se sekvencí části klastru pro biosyntézu aktinomycinu.

Je známo, že ostrov patogenity vykazuje modulární uspořádání v rámci jednotlivých streptomycet způsobujících obecnou strupovitost (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Hybridizační analýza se sadou sond navržených na základě genomu *S. scabiei* a

ostrovu patogenity *S. turgidiscabies* ukázala, že gen *txtA* není dobrá determinanta patogenity, protože je sekvenčně variabilní (Aittamaa *et al.*, 2010). Z toho plyne, že je těžké navrhnout primery, které by identifikovaly všechny nositele biosyntetické dráhy thaxtominu A. Pro kvantifikaci nositelů genu *txtA* bylo nakonec využito primerů Qu a kol. (2008). Klonováním byla ověřena použitelnost primeru StrepF a StrepR na náhodně vybraných lokalitách s výrazně odlišným výskytem strupovitosti. Počet správně určených sekvencí odpovídajících sekvenci genu *txtA* byl v případě půdy nižší než u tuberosféry. Spolehlivější kvantifikace těmito primery dosáhneme tedy u tuberosféry. V případě tuberosféry je počet klonů identických se sekvencí genu *txtA* 87 % pro lokalitu s nejnižším výskytem strupovitosti a 73 % pro lokalitu s nejvyšším výskytem strupovitosti. Fierer a kol (2005) ve své studii uvádí, že reprezentativnost půdní knihovny pro 16S rDNA geny (ověření specifičnosti primerů) získané amplifikací primery 235f (aktinobakteriální) a 518r (Eubakteriální) je 60 %. Při porovnání mnou získaných výsledků s Fiererovými je kvantifikace *txtA* genu v normě.

Na základě pokusu s dvěma lokalitami, které jsou známy nižším a vyšším výskytem strupovitosti, se došlo k následujícím výsledkům. Z hodnot strupovitosti získaných na stanovišti kostel (lokalita Vyklantice) je patrné, že se jedná o supresivní půdu. U všech pěstovaných odrůd, které jsou známy rozdílnou rezistencí vůči strupovitosti, se vyskytovaly podobné hodnoty strupovitosti ve srovnání se stanovištěm úvoz. Naopak na stanovišti úvoz se intenzita strupovitosti jednotlivých odrůd liší. Dle provedených testů rezistence by měla být strupovitostí nejvíce napadená odrůda Agria, následně Valfi a nakonec David. Výsledky pokusu potvrzují, že nejvíce rezistentní je odrůda David. Ovšem odrůda Valfi je na studované lokalitě více náchylná ke strupovitosti než odrůda Agria, což je v rozporu s výsledky testů rezistence. Je známo, že rezistenční testy se nejčastěji provádějí v polních podmínkách, jejich zásadním problémem je variabilita výsledků hodnocení choroby a stupně napadení na jednotlivých lokalitách v jednotlivých letech (Pánková *et al.*, 2012). Lokalita hraje tedy významnou roli při vyhodnocování obecné strupovitosti.

Pro stanoviště kostel byl zjištěn vyšší počet kopií aktinobakteriálních 16S rDNA genů pro volnou půdu ve srovnání se stanovištěm úvoz. Z tohoto výsledku lze předpokládat, že bohatost aktinobakteriálního společenstva volné půdy má pravděpodobně souvislost s výskytem supresivních půd. Předpokládá se totiž, že bohatší

bakteriální společenstva zabraňují manifestaci patogenu, což potvrzují studie (Elsas *et al.*, 2012).

Z výsledků kvantifikace počtu kopií *txtA* genu je patrné, že existují rozdíly pro stanoviště kostel a úvoz. V případě tuberosféry je množství *txtA* genu na stanovišti kostel nižší ve srovnání se stanovištěm úvoz. Pro počty kopií *txtA* genu volné půdy toto ovšem neplatí. Vyšší počet kopií *txtA* genu byl zaznamenán pro stanoviště kostel. Přestože je vyšší výskyt patogenu ve volné půdě na stanovišti kostel, tak hodnota strupovitosti je nižší ve srovnání se stanovištěm úvoz. A právě toto zjištění je v souladu s definicí supresivní půdy. Supresivní půda je půda ve které se přítomnost patogenu neprojeví či projeví, ale v mnohem menší míře (Weller *et al.*, 2002). Z toho vyplývá, že v rámci volné půdy se pravděpodobně neuplatňuje kompetice, protože aktinobakterie ve volné půdě koexistují v jednotlivých nikách. Množství *txtA* genu pro jednotlivé bramborové odrůdy na stanovišti úvoz neodpovídá hodnotě strupovitosti. A nelze jej tedy využít jako predikční faktor pro výskyt strupovitosti. Ovšem je patrné, že bramborová odrůda může ovlivnit výskyt strupovitosti.

Výsledky pokusu na lokalitě Ždírec ukazují, že resistence jednotlivých odrůd na stanovišti cesta nejsou v souladu s rezistenčními testy. Shodný výsledek s rezistenčními testy vykazuje stanoviště les, na kterém je nejvýše postiženou odrůdou Agria, následuje Valfi a nakonec David. Co se týče počtu genů *txtA,* opětovně nekorespondují u jednotlivých odrůd s výskytem strupovitosti ani na jednom ze stanovišť. Důvodem proč tyto dvě hodnoty nekorespondují, může být vysvětlení, že aktinobakterie nesoucí gen *txtA* nemusí ve skutečnosti způsobovat obecnou strupovitost, protože gen t*xtA* není jedinou komponentou účastnící se syntézy thaxtominu. Dalším vysvětlením může být například existence streptomycet způsobujících obecnou strupovitost, ovšem nevlastnících gen *txtA* (Pánková *et al.*, 2012).

Z analýz pro jednotlivé odrůdy plyne, že s nižší množstvím *txtA* genu na stanovišti (les) koresponduje i s nižším výskytem strupovitosti. Naopak pro stanoviště s vyšším počtem množství *txtA* genu byl zaznamenán vyšší výskyt strupovitosti. Zdá se tedy, že na lokalitě Ždírec neexistuje supresivní půda, jak bylo původně předpokládáno.

8 ZÁVĚR

- Na základě monitorovací studie byly vytvořeny mapy poskytující informace o aktinobakteriálních společenstev půdy a tuberosféry a o výskytu strupovitosti u různých bramborových odrůd.
- Byly nalezeny faktory související s výskytem obecné strupovitosti. Na základě těchto faktorů byl vytvořen model pro predikci výskytu strupovitosti. V rámci tohoto modelu byla potvrzena jedna z hypotéz předpokládající nižší výskyt strupovitosti v případě vyšší diverzity aktinobakteriálního společenstva na lokalitě.
- Byl prokázán vliv lokality a způsobu obhospodařování na složení aktinobakteriálních společenstev v půdách s výskytem obecné strupovitosti. Vliv odrůdy bramboru na složení aktinobakteriálních společenstev nebyl prokázán.
- Byly navrženy specifické PCR primery pro selektivní amplifikaci *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei*.
- V rámci pokusu na dvou sousedních lokalitách lišících se výskytem strupovitosti byla zjištěna odlišnost ve složení aktinobakteriálních společenstev.
- Na stanovišti Vyklantice byly potvrzeny supresivní vlastnosti půdy na základě srovnání výskytu strupovitosti a počtu kopií genu *txtA* v půdě.

9 SEZNAM LITERATURY

Aittamaa, Marja, Panu Somervuo, Into Laakso, Petri Auvinen, a Jari P. T Valkonen. 2010. "Microarray based Comparison of Genetic Differences Between Strains of Streptomyces Turgidiscabies with Focus on the Pathogenicity Island." *Molecular Plant Pathology* 11 (6): 733–746.

Alfano, J R, A O Charkowski, W L Deng, J L Badel, T Petnicki-Ocwieja, K van Dijk, a A Collmer. 2000. "The Pseudomonas Syringae Hrp Pathogenicity Island Has a Tripartite Mosaic Structure Composed of a Cluster of Type III Secretion Genes Bounded by Exchangeable Effector and Conserved Effector Loci That Contribute to Parasitic Fitness and Pathogenicity in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9): 4856–4861.

Amato, Pierre, Marius Parazols, Martine Sancelme, Paolo Laj, Gilles Mailhot, a Anne-Marie Delort. 2007. "Microorganisms Isolated from the Water Phase of Tropospheric Clouds at the Puy de Dôme: Major Groups and Growth Abilities at Low Temperatures." *FEMS Microbiology Ecology* 59 (2): 242–254.

Amoroso, María Julia, Claudia Susana Benimeli, a Sergio Antonio Cuozzo. 2013. *Actinobacteria: Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes*. CRC Press.

Anderson, Iain, Birte Abt, Athanasios Lykidis, Hans-Peter Klenk, Nikos Kyrpides, a Natalia Ivanova. 2012. "Genomics of Aerobic Cellulose Utilization Systems in Actinobacteria." *PLoS ONE* 7 (6): e39331.

Ansari, Mohd Zeeshan, Gitanjali Yadav, Rajesh S. Gokhale, a Debasisa Mohanty. 2004. "NRPS-PKS: a Knowledge-based Resource for Analysis of NRPS/PKS Megasynthases." *Nucleic Acids Research* 32 (suppl 2): W405–W413.

Bagyaraj, D. J., a G. Rangaswami. 2007. Agricultural Microbiology PHI Learning Pvt. Ltd.

Běhal, Vladislav. 2000. "Bioactive Products from Streptomyces." In *Advances in Applied Microbiology*, Volume 47:113–156. Academic Press.

Berrocal, M. M., J. Rodríguez, A. S. Ball, M. I. Pérez-Leblic, a M. E. Arias. 1997. "Solubilisation and Mineralisation of [14C]lignocellulose from Wheat Straw by Streptomyces Cyaneus CECT 3335 During Growth in Solid-state Fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (3): 379–384.

Bignell, Dawn, José Huguet-Tapia, Madhumita Joshi, Gregg Pettis, a Rosemary Loria. 2010. "What Does It Take to Be a Plant Pathogen: Genomic Insights from Streptomyces Species." *Antonie van Leeuwenhoek* 98 (2): 179–194.

Bouchek-Mechiche, K., C. Guérin, B. Jouan, a L. Gardan. 1998. "Streptomyces Species Isolated from Potato Scabs in France: Numerical Analysis of 'Biotype-100' Carbon Source Assimilation Data." *Research in Microbiology* 149 (9): 653–663.

Bouchek-Mechiche, Pasco, Andrivon, a Jouan. 2000. "Differences in Host Range, Pathogenicity to Potato Cultivars and Response to Soil Temperature Among Streptomyces Species Causing Common and Netted Scab in France." *Plant Pathology* 49 (1) : 3–10.

Brady, Nyle C, a Ray R Weil. 2008. *The Nature and Properties of Soils*. 14th ed., Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall.

Bruce, K D, W D Hiorns, J L Hobman, A M Osborn, P Strike, a D A Ritchie. 1992. "Amplification of DNA from Native Populations of Soil Bacteria by Using the Polymerase Chain Reaction." *Applied and Environmental Microbiology* 58 (10): 3413–3416.

Bukhalid, R A, T Takeuchi, D Labeda, a Rosemary Loria. 2002. "Horizontal Transfer of the Plant Virulence Gene, Nec1, and Flanking Sequences Among Genetically Distinct Streptomyces Strains in the Diastatochromogenes Cluster." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 738–744.

Bukhalid, Raghida A., Soo Young Chung, a Rosemary Loria. 1998. "*Nec1* , a Gene Conferring a Necrogenic Phenotype, Is Conserved in Plant-Pathogenic *Streptomyces* Spp. and Linked to a Transposase Pseudogene." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (10): 960–967.

Bundt, M., F. Widmer, M. Pesaro, J. Zeyer, a P. Blaser. 2001. "Preferential Flow Paths: Biological 'hot Spots' in Soils." *Soil Biology and Biochemistry* 33 (6): 729–738.

Crawford, Don L., James M. Lynch, John M. Whipps, a Margaret A. Ousley. 1993. "Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen." *Applied and Environmental Microbiology* 59 (11): 3899–3905.

Čermák, Ladislav, Jan Kopecký, Jitka Novotná, Marek Omelka, Natalya Parkhomenko, Kamila Plháčková, a Markéta Ságová-Marečková. 2008. "Bacterial Communities of Two Contrasting Soils Reacted Differently to Lincomycin Treatment." *Applied Soil Ecology* 40 (2): 348–358.

Davies, Julian. 2006. "Are Antibiotics Naturally Antibiotics?" *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33 (7): 496–499.

Davis, J. R. 1976. "Fertilizer Effects on Common Scab of Potato and the Relation of Calcium and Phosphate-Phosphorus." *Phytopathology* 66 (10): 1236.

Davis, J. R., G. M. McMaster, R. H. Callihan, F. H. Nissley, a J. J. Pavek. 1976. "Influence of Soil Moisture and Fungicide Treatments on Common Scab and Mineral Content of Potatoes." *Phytopathology* 66 (2): 228.

DeAngelis, Kristen M., Martin Allgaier, Yaucin Chavarria, Julian L. Fortney, Phillip Hugenholtz, Blake Simmons, Kerry Sublette, Whendee L. Silver, and Terry C. Hazen. 2011. "Characterization of Trapped Lignin-Degrading Microbes in Tropical Forest Soil." *PLoS ONE* 6 (4): e19306.

Dees, Merete W, Panu Somervuo, Erik Lysøe, Marja Aittamaa, a Jari P. T Valkonen. 2012. "Species' Identification and Microarray-based Comparative Genome Analysis of Streptomyces Species Isolated from Potato Scab Lesions in Norway." *Molecular Plant Pathology* 13 (2): 174–186.

Dees, M. W., A. Sletten, a A. Hermansen. 2013. "Isolation and Characterization of Streptomyces Species from Potato Common Scab Lesions in Norway." *Plant Pathology* 62 (1): 217–225. doi:

DeLeon-Rodriguez, N., T. L. Lathem, L. M. Rodriguez-R, J. M. Barazesh, B. E. Anderson, A. J. Beyersdorf, L. D. Ziemba, M. Bergin, A. Nenes, a K. T. Konstantinidis.

2013. “Microbiome of the Upper Troposphere: Species Composition and Prevalence, Effects of Tropical Storms, and Atmospheric Implications.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (7) (January 28): 2575–2580.

Dorak, M. Tevfik. 2007.*Real-time PCR*. 2 nd ed., Taylor & Francis.

Elsas, Jan Dirk van, Mario Chiurazzi, Cyrus A. Mallon, Dana Elhottovā, Václav Krištůfek, a Joana Falcão Salles. 2012. “Microbial Diversity Determines the Invasion of Soil by a Bacterial Pathogen.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (4) (January 24): 1159–1164.

Evtushenko, L I, L V Dorofeeva, S A Subbotin, J R Cole, a J M Tiedje. 2000. “Leifsonia Poae Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated from Nematode Galls on Poa Annua, and Reclassification of ‘Corynebacterium Aquaticum’ Leifson 1962 as Leifsonia Aquatica (ex Leifson 1962) Gen. Nov., Nom. Rev., Comb. Nov. and Clavibacter Xyli Davis et Al. 1984 with Two Subspecies as Leifsonia Xyli (Davis et Al. 1984) Gen. Nov., Comb. Nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 Pt 1: 371–380.

Fierer, Noah, Mark A. Bradford, a Robert B. Jackson. 2007. “Toward an ecological classification of soil bacteria.” *Ecology* 88 (6): 1354–1364.

Flores-González, R., I. Velasco, a F. Montes. 2007. “Detection and Characterization of Streptomyces Causing Potato Common Scab in Western Europe.” *Plant Pathology* 57 (1): 162–169.

Gao, Beile, a Radhey S. Gupta. 2012. “Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1): 66–112.

Ghai, Rohit, Katherine D. McMahon, a Francisco Rodriguez-Valera. 2012. “Breaking a Paradigm: Cosmopolitan and Abundant Freshwater Actinobacteria Are Low GC.” *Environmental Microbiology Reports* 4 (1): 29–35.

Girvan, Martina S., Juliet Bullimore, Jules N. Pretty, A. Mark Osborn, a Andrew S. Ball. 2003. “Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1800–1809.

Godden, B, T Legon, P Helvenstein, a M Penninckx. 1989. “Regulation of the Production of Hemicellulolytic and Cellulolytic Enzymes by a Streptomyces Sp. Growing on Lignocellulose.” *Journal of General Microbiology* 135 (2): 285–292.

Goodfellow, M, a S T Williams. 1983. “Ecology of Actinomycetes.” *Annual Review of Microbiology* 37 (1): 189–216.

Goto, Kazushige. 1985. “Relationships Between Soil pH, Available Calcium and Prevalence of Potato Scab.” *Soil Science and Plant Nutrition* 31 (3): 411–418.

Grostern, Ariel, a Lisa Alvarez-Cohen. 2013. “RubisCO-based CO2 Fixation and C1 Metabolism in the Actinobacterium Pseudonocardia Dioxanivorans CB1190.” *Environmental Microbiology*: n/a–n/a.

Hacker, Jörg, a Elisabeth Carniel. 2001. “Ecological Fitness, Genomic Islands and Bacterial Pathogenicity.” *EMBO Reports* 2 (5): 376–381.

Hao, J. J., Q. X. Meng, J. F. Yin, a W. W. Kirk. 2009. “Characterization of a New *Streptomyces* Strain, DS3024, That Causes Potato Common Scab.” *Plant Disease* 93 (12): 1329–1334.

Healy, Frank G., Michael Wach, Stuart B. Krasnoff, Donna M. Gibson, a Rosemary Loria. 2000. “The txtAB Genes of the Plant Pathogen Streptomyces Acidiscabies Encode a Peptide Synthetase Required for Phytotoxin Thaxtomin A Production and Pathogenicity.” *Molecular Microbiology* 38 (4): 794–804.

Heuer, Holger, Reiner M. Kroppenstedt, Jana Lottmann, Gabriele Berg, a Kornelia Smalla. 2002. “Effects of T4 Lysozyme Release from Transgenic Potato Roots on Bacterial Rhizosphere Communities Are Negligible Relative to Natural Factors.” *Applied and Environmental Microbiology* 68 (3): 1325–1335.

Hiltunen, L H, T Ojanperä, H Kortemaa, E Richter, M J Lehtonen, a J P T Valkonen. 2009. “Interactions and Biocontrol of Pathogenic Streptomyces Strains Co-occurring in Potato Scab Lesions.” *Journal of Applied Microbiology* 106 (1): 199–212.

Hiltunen, L. H., A. Weckman, A. Ylhäinen, H. Rita, E. Richter, a J. P. T. Valkonen. 2005. “Responses of Potato Cultivars to the Common Scab pathogens,Streptomyces scabiesandS. Turgidiscabies.” *Annals of Applied Biology* 146 (3): 395–403.

Hiltunen, Lea H., Into Laakso, Vladimír Chobot, Kati S. Hakala, Anja Weckman, a Jari P. T. Valkonen. 2006. “Influence of Thaxtomins in Different Combinations and Concentrations on Growth of Micropropagated Potato Shoot Cultures.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (9): 3372–3379.

Holmalahti, Jussi, Atte von Wright, a Olavi Raatikainen. 1994. “Variations in the Spectra of Biological Activities of Actinomycetes Isolated from Different Soils.” *Letters in Applied Microbiology* 18 (3): 144–146.

Hoster, Frank, Jessica E Schmitz, a Rolf Daniel. 2005. “Enrichment of Chitinolytic Microorganisms: Isolation and Characterization of a Chitinase Exhibiting Antifungal Activity Against Phytopathogenic Fungi from a Novel Streptomyces Strain.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (4) : 434–442.

Huguet-Tapia, José C., Jonathan H. Badger, Rosemary Loria, a Gregg S. Pettis. 2011. “Streptomyces Turgidiscabies Car8 Contains a Modular Pathogenicity Island That Shares Virulence Genes with Other Actinobacterial Plant Pathogens.” *Plasmid* 65 (2): 118–124.

İnceoğlu, Özgül, Waleed Abu Al-Soud, Joana Falcão Salles, Alexander V. Semenov, a Jan Dirk van Elsas. 2011. “Comparative Analysis of Bacterial Communities in a Potato Field as Determined by Pyrosequencing.” *PLoS ONE* 6 (8): e23321.

Inceoğlu, Ozgül, Joana Falcão Salles, Leo van Overbeek, a Jan Dirk van Elsas. 2010. “Effects of Plant Genotype and Growth Stage on the Betaproteobacterial Communities Associated with Different Potato Cultivars in Two Fields.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (11): 3675–3684.

Janvier, Céline, François Villeneuve, Claude Alabouvette, Véronique Edel-Hermann, Thierry Mateille, a Christian Steinberg. 2007. “Soil Health through Soil

Disease Suppression: Which Strategy from Descriptors to Indicators?" *Soil Biology and Biochemistry* 39 (1): 1–23.

Joshi, Madhumita, Xin Rong, Simon Moll, Johan Kers, Christopher Franco, a Rosemary Loria. 2007. "*Streptomyces Turgidiscabies* Secretes a Novel Virulence Protein, Nec1, Which Facilitates Infection." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (6): 599–608.

Juhas, Mario, Jan Roelof Van Der Meer, Muriel Gaillard, Rosalind M. Harding, Derek W. Hood, a Derrick W. Crook. 2009. "Genomic Islands: Tools of Bacterial Horizontal Gene Transfer and Evolution." *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2) (: 376–393.

Keinath, A. P., a R. Loria. 1989. "Management of Common Scab of Potato with Nutrients." In *Englehard A. W. (Ed) Soilborne Plant Pathogens: Management of Disease with Macro and Micro Nutrients*. Vol. 1989c. St Paul: Minnesota: Minnesota: The American Phytopathological Society.

Kers, Johan A., Kimberly D. Cameron, Madhumita V. Joshi, Raghida A. Bukhalid, Joanne E. Morello, Michael J. Wach, Donna M. Gibson, a Rosemary Loria. 2005. "A Large, Mobile Pathogenicity Island Confers Plant Pathogenicity on Streptomyces Species." *Molecular Microbiology* 55 (4): 1025–1033.

Kirk, T K, a R L Farrell. 1987. "Enzymatic 'Combustion': The Microbial Degradation of Lignin." *Annual Review of Microbiology* 41: 465–505.

Krištůfek, V, J. Diviš, M. Ságová-Marečková, a J. Kopecký. 2011. "Markery Pro Určení Náchylnosti Brambor k Obecné Strupovitosti a Možná Opatření v Pěstitelské Praxi." Bramborářství 19 (5): 19-21

Krištůfek, V., J. Diviš, I. Dostálková, a J. Kalčík. 2000. "Accumulation of Mineral Elements in Tuber Periderm of Potato Cultivars Differing in Susceptibility to Common Scab." *Potato Research* 43 (2): 107–114.

Kůdela, Václav, Anton Novacky, a Leopold Fucikovsky. 2002. *Rostlinolékařská Bakteriologie*. Vol. 2002. Academia.

Kumar, D., a P. F. Wareing. 1972. "Factors Controlling Stolon Development in the Potato Plant." *New Phytologist* 71 (4): 639–648.

Lacey, M. J., a C. R. Wilson. 2001. "Relationship of Common Scab Incidence of Potatoes Grown in Tasmanian Ferrosol Soils with pH, Exchangeable Cations and Other Chemical Properties of Those Soils." *Journal of Phytopathology* 149 (11/12): 679–683.

Lambert, D. H., a R. Loria. 1989a. "Streptomyces Scabies Sp. Nov., Nom. Rev." *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (4): 387–392.

Lambert, D. H., a R. Loria. 1989b. "Streptomyces Acidiscabies Sp. Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (4): 393–396.

Lambert, D. H., a F. E. Manzer. 1991a. "Relationship of Calcium to Potato Scab." *Phytopathology* 81 (6): 632–636.

Lapwood, D. H., a P. W. Dyson. 1966. "An Effect of Nitrogen on the Formation of Potato Tubers and the Incidence of Common Scab (streptomyces Scabies)." *Plant Pathology* 15 (1): 9–14.

Lazarovits, George, Jacquelyn Hill, Greg Patterson, Kenneth L. Conn, a Nigel S. Crump. 2007. "Edaphic Soil Levels of Mineral Nutrients, pH, Organic Matter, and Cationic Exchange Capacity in the Geocaulosphere Associated with Potato Common Scab." *Phytopathology* 97 (9): 1071–1082.

Lehtonen, M. J., H. Rantala, J. F. Kreuze, H. Bång, L. Kuisma, P. Koski, E. Virtanen, K. Vihlman, a J. P. T. Valkonen. 2004. "Occurrence and Survival of Potato Scab Pathogens (Streptomyces Species) on Tuber Lesions: Quick Diagnosis Based on a PCR-based Assay." *Plant Pathology* 53 (3): 280–287.

Leiminger, J., M. Frank, C. Wenk, G. Poschenrieder, A. Kellermann, a A. Schwarzfischer. 2012. "Distribution and Characterization of Streptomyces Species Causing Potato Common Scab in Germany." *Plant Pathology*.

Lerat, Sylvain, Anne-marie Simao-beaunoir, a Carole Beaulieu. 2009. "Genetic and Physiological Determinants of Streptomyces Scabies Pathogenicity." *Molecular Plant Pathology* 10 (5): 579–585.

Lerat, Sylvain, Anne-Marie Simao-Beaunoir, a Carole Beaulieu. 2009. "Genetic and Physiological Determinants of Streptomyces Scabies Pathogenicity." *Molecular Plant Pathology* 10 (5): 579–585.

Lindholm, Päivi, Hanna Kortemaa, Mirkka Kokkola, Kielo Haahtela, Mirja Salkinoja-Salonen, a Jari P. T. Valkonen. 1997. "*Streptomyces* Spp. Isolated from Potato Scab Lesions Under Nordic Conditions in Finland." *Plant Disease* 81 (11): 1317–1322.

Lo, C. W., N. S. Lai, H. Y. Cheah, N. K. I. Wong, a C. C. Ho. 2002. "Actinomycetes Isolated from Soil Samples from the Crocker Range Sabah." *ASEAN Review on Biodiversity and Environmental Conservation*. http://www.arbec.com.my/pdf/art21julysep02.pdf. staženo 16.5.2013

Loria, R. "Potato Scab Factsheet. Vegetable MD Online. Cornell University," http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato_Scab.htm. staženo 10.6.2013

Loria, Rosemary, Dawn Bignell, Simon Moll, José Huguet-Tapia, Madhumita Joshi, Evan Johnson, Ryan Seipke, a Donna Gibson. 2008. "Thaxtomin Biosynthesis: The Path to Plant Pathogenicity in the Genus Streptomyces." *Antonie van Leeuwenhoek* 94 (1): 3–10.

Loria, Rosemary, Raghida A. Bukhalid, Barbara A. Fry, a Russell R. King. 1997. "Plant Pathogenicity in the Genus Streptomyces." *Plant Disease* 81 (8) (August): 836–846.

Loria, Rosemary, Johan Kers, a Madhumita Joshi. 2006. "Evolution of Plant Pathogenicity in Streptomyces." *Annual Review of Phytopathology* 44 (1): 469–487.

Madigan, Michael T, a John Martinko. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. 11 th ed. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings.

Madsen, Eugene L. 2008. *Environmental Microbiology: From Genomes to Biogeochemistry*. 1st ed. Malden, MA; Oxford: Blackwell Pub.

Machczynski, Michael C., Erik Vijgenboom, Bart Samyn, a Gerard W. Canters. 2004. “Characterization of SLAC: a Small Laccase from Streptomyces Coelicolor with Unprecedented Activity.” *Protein Science* 13 (9): 2388–2397.

Manucharova, N. A. 2009. “The Microbial Destruction of Chitin, Pectin, and Cellulose in Soils.” *Eurasian Soil Science* 42 (13) (December 1): 1526–1532.

Martinez-Garcia, Manuel, Brandon K. Swan, Nicole J. Poulton, Monica Lluesma Gomez, Dashiell Masland, Michael E. Sieracki, a Ramunas Stepanauskas. 2012. “High-throughput Single-cell Sequencing Identifies Photoheterotrophs and Chemoautotrophs in Freshwater Bacterioplankton.” *The ISME Journal* 6 (1): 113–123.

McCarthy, Alan J., a Stanley T. Williams. 1992. “Actinomycetes as Agents of Biodegradation in the Environment — a Review.” *Gene* 115 (1–2): 189–192.

Metzler, David E, a Carol M Metzler. 2003. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells Vol. 2 Vol. 2*. Amsterdam: Acad. Press.

Miyajima, K., F. Tanaka, T. Takeuchi, a S. Kuninaga. 1998. “Streptomyces Turgidiscabies Sp. Nov.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (2) (: 495–502.

Pánková, Iveta, Vladimíra Sedláková, Petr Sedlák, a Václav Krejzar. 2012. “The Occurrence of Plant Pathogenic Streptomyces Spp. in Potato-growing Regions in Central Europe.” *American Journal of Potato Research* 89 (3): 207–215.

Pankratov, T. A., S. N. Dedysh, a Academician G. A. Zavarzin. 2006. “The Leading Role of Actinobacteria in Aerobic Cellulose Degradation in Sphagnum Peat Bogs.” *Doklady Biological Sciences* 410 (1): 428–430.

Park, Duck Hwan, Jeom Soon Kim, Soon Wo Kwon, Calum Wilson, Yong Man Yu, Jang Hyun Hur, a Chun Keun Lim. 2003. “Streptomyces Luridiscabiei Sp. Nov., Streptomyces Puniciscabiei Sp. Nov. and Streptomyces Niveiscabiei Sp. Nov., Which Cause Potato Common Scab Disease in Korea.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (6): 2049–2054.

Paul, Eldor. 2007. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 3rd ed. Burlington, Mass.: Academic Press.

Pulkrábek, J. “Okopaniny.” *Okopaniny*. http://etext.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul_key=5&idkapitola=233. staženo 7.6.2013

Qu, Xinshun, Leslie A Wanner, a Barbara J Christ. 2008. “Using the TxtAB Operon to Quantify Pathogenic Streptomyces in Potato Tubers and Soil.” *Phytopathology* 98 (4): 405–412.

Ranjard, Lionel, a Agnès Richaume. 2001. “Quantitative and Qualitative Microscale Distribution of Bacteria in Soil.” *Research in Microbiology* 152 (8): 707–716.

Roesch, Luiz F W, Roberta R Fulthorpe, Alberto Riva, George Casella, Alison K M Hadwin, Angela D Kent, Samira H Daroub, Flavio A O Camargo, William G Farmerie, a Eric W Triplett. 2007. “Pyrosequencing Enumerates and Contrasts Soil Microbial Diversity.” *The ISME Journal* 1 (4): 283–290.

Rousk, Johannes, Erland Bååth, Philip C. Brookes, Christian L. Lauber, Catherine Lozupone, J. Gregory Caporaso, Rob Knight, a Noah Fierer. 2010. "Soil Bacterial and Fungal Communities Across a pH Gradient in an Arable Soil." *The ISME Journal* 4 (10): 1340–1351.

Saha, N, A Ulrich, R Becker, a S Wirth. 2008. "Assessing the Changes in Bacterial Diversity in Rhizosphere and Phyllosphere of Transgenic and Non-transgenic Potato Plant." *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 17 (1): 87-95.

Sellstedt, Anita, a Kerstin H. Richau. 2013. "Aspects of Nitrogen-fixing Actinobacteria, in Particular Free-living and Symbiotic Frankia." *FEMS Microbiology Letters* 342 (2): 179–186.

Sigee, David C. 2005. *Freshwater Microbiology Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. Chichester: Wiley.

Singh, Brajesh K., Stacey Munro, Jacqueline M. Potts, a Peter Millard. 2007. "Influence of Grass Species and Soil Type on Rhizosphere Microbial Community Structure in Grassland Soils." *Applied Soil Ecology* 36 (2–3): 147–155.

Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer, a G. Berg. 2001. "Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10): 4742–4751.

Song, Jaekyeong, Seong-Chan Lee, Jun-Won Kang, Hyung-Jin Baek, a Joo-Won Suh. 2004. "Phylogenetic Analysis of Streptomyces Spp. Isolated from Potato Scab Lesions in Korea on the Basis of 16S rRNA Gene and 16S–23S rDNA Internally Transcribed Spacer Sequences." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (1): 203–209.

Stackebrandt, Erko, Fred A. Rainey, a Naomi L. Ward-Rainey. 1997. "Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria Classis Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (2): 479–491.

St-Onge, Renée, Claudia Goyer, Robert Coffin, a Martin Filion. 2008. "Genetic Diversity of Streptomyces Spp. Causing Common Scab of Potato in Eastern Canada." *Systematic and Applied Microbiology* 31 (6–8): 474–484.

Suzuki, Takashi, Kohki Endo, Masaaki Ito, Hiroshi Tsujibo, Katsushiro Miyamoto, a Yoshihiko Inamori. 2003. "A Thermostable Laccase from Streptomyces Lavendulae REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (10): 2167–2175.

Takasuka, Taichi E., Adam J. Book, Gina R. Lewin, Cameron R. Currie, a Brian G. Fox. 2013. "Aerobic Deconstruction of Cellulosic Biomass by an Insect-associated Streptomyces." *Scientific Reports* 3.

Thomashow, Linda S., Robert F. Bonsall, a David M. Weller. 1997. "Antibiotic Production by Soil and Rhizosphere Microbes in Situ." *Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, DC*: 493–499.

Turroni, Francesca, Douwe van Sinderen, a Marco Ventura. 2011. "Genomics and Ecological Overview of the Genus Bifidobacterium." *International Journal of Food Microbiology* 149 (1): 37–44. Ulrich, Andreas, a Regina Becker. 2006. "Soil Parent

Material Is a Key Determinant of the Bacterial Community Structure in Arable Soils." *FEMS Microbiology Ecology* 56 (3): 430–443.

Van Bruggen, A.H.C., a A.M. Semenov. 2000. "In Search of Biological Indicators for Soil Health and Disease Suppression." *Applied Soil Ecology* 15 (1): 13–24.

Van Elsas, Jan Dirk, Mario Chiurazzi, Cyrus A Mallon, Dana Elhottovā, Václav Krištůfek, a Joana Falcão Salles. 2012. "Microbial Diversity Determines the Invasion of Soil by a Bacterial Pathogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (4): 1159–1164.

Ventura, Marco, Carlos Canchaya, Andreas Tauch, Govind Chandra, Gerald F. Fitzgerald, Keith F. Chater, a Douwe van Sinderen. 2007. "Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (3): 495–548.

Wagner, D., a L. S. Young. 2004. "Nontuberculous Mycobacterial Infections: A Clinical Review." *Infection* 32 (5): 257–270.

Wang, Aixia, a George Lazarovits. 2005. "Role of Seed Tubers in the Spread of Plant pathogenicStreptomyces and Initiating Potato Common Scab Disease." *American Journal of Potato Research* 82 (3): 221–230.

Wanner, Leslie. 2009. "A Patchwork of Streptomyces Species Isolated from Potato Common Scab Lesions in North America." *American Journal of Potato Research* 86 (4): 247–264.

Wanner, Leslie A. 2007. "A New Strain of Streptomyces Causing Common Scab in Potato." *Plant Disease* 91 (4): 352–359.

Waterer, D. 2002. "Impact of High Soil pH on Potato Yields a Grade Losses to Common Scab." *Canadian Journal of Plant Science* 82 (3) (July): 583–586.

Weinert, Nicole, Remo Meincke, Christine Gottwald, Holger Heuer, Newton C. M. Gomes, Michael Schloter, Gabriele Berg, a Kornelia Smalla. 2009. "Rhizosphere Communities of Genetically Modified Zeaxanthin-Accumulating Potato Plants and Their Parent Cultivar Differ Less Than Those of Different Potato Cultivars." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12): 3859–3865.

Weinstock, David M., a Arthur E. Brown. 2002. "Rhodococcus Equi: An Emerging Pathogen." *Clinical Infectious Diseases* 34 (10): 1379–1385.

Weller, D.M., J.M. Raaijmakers, B.B. McSpadden Gardener, a L.S. Thomashow. 2002. *Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens*. Vol. 40.

Wenzl, H, a T. Reichard. 1976. "Der Einfluß von Mineraldüngern Auf Kartoffelschorf (Streptomyces Scabies [Thaxt.] Waksman et Henrici Und Spongospora Subterranea [Wallr.] Lagerh.)." *Bodenkultur* 1976: 130–137.[In german only]

Wilson, C. R., G. A. Luckman, R. S. Tegg, Z. Q. Yuan, A. J. Wilson, A. Eyles, a A. J. Conner. 2009. "Enhanced Resistance to Common Scab of Potato through Somatic Cell Selection in Cv. Iwa with the Phytotoxin Thaxtomin A." *Plant Pathology* 58 (1): 137–144.

Youssef, Noha H., a Mostafa S. Elshahed. 2008. “Diversity Rankings Among Bacterial Lineages in Soil.” *The ISME Journal* 3 (3): 305–313.

Yu, Jicheng, Qiu Liu, Qiao Liu, Xiangdong Liu, Qiang Sun, Jianfang Yan, Xiaohui Qi, a Shengdi Fan. 2008. “Effect of Liquid Culture Requirements on Antifungal Antibiotic Production by Streptomyces Rimosus MY02.” *Bioresource Technology* 99 (6) : 2087–2091.

Zhang, Lixin, a Arnold L. Demain. 2005. *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Springer.

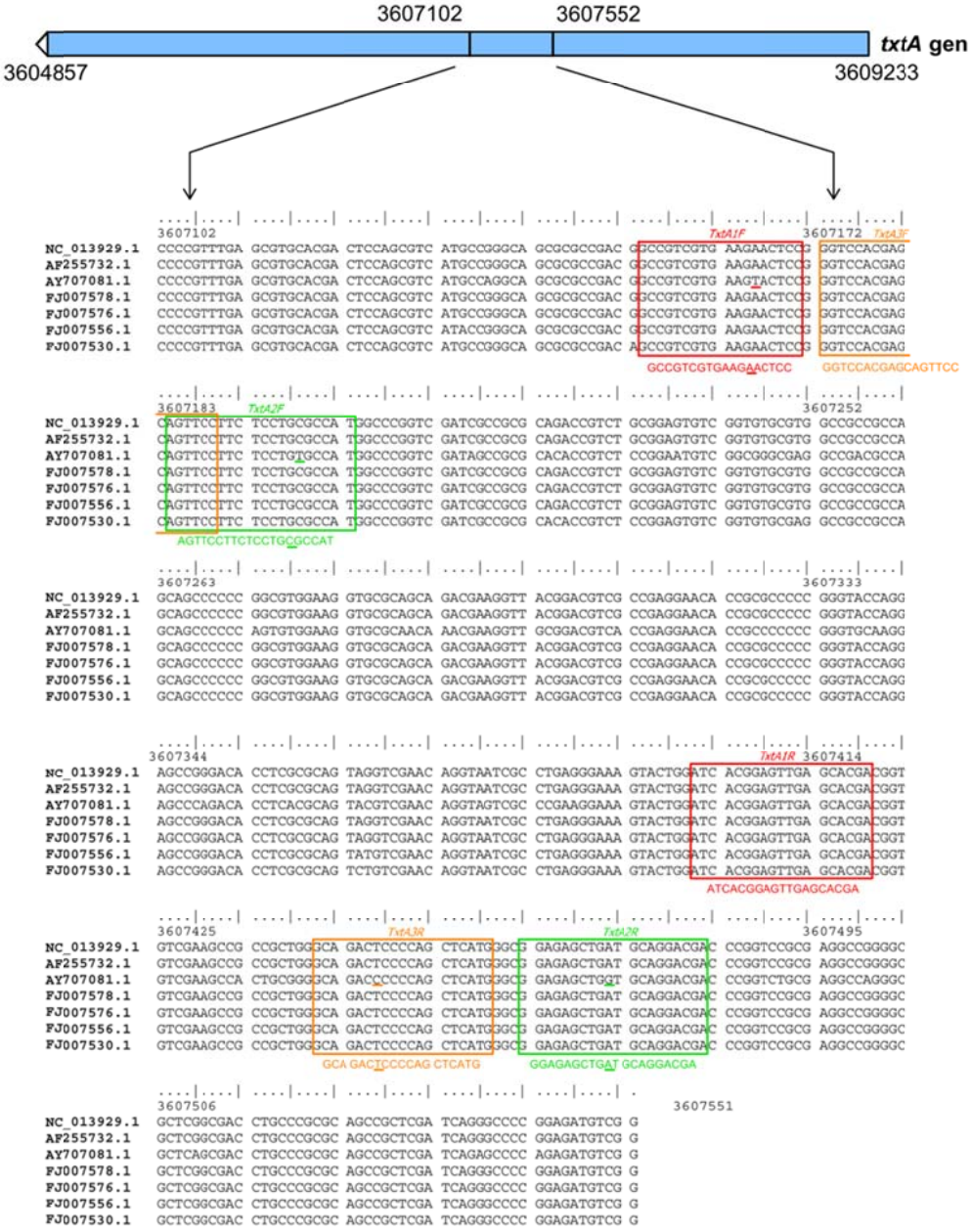
10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Seznam lokalit v rámci monitorovací studie s GPS koordinátami.

Příloha 2: Schématické znázornění txtA genu. Ve výseku je uveden alignment (ze 7 skupin reprezentativních sekvencí), který byl použit pro návrh primerových párů TxtA1, TxtA2,TxtA3.

Lokalita	Odrůda	Rok	GPS souřadnice
Čechtice	Agria	2010	N49°37'23.94" E15°2'7.2"
Čechtice	Rumba		N49°37'23.83" E15°2'9.59"
České Budějovice	Adéla	2009	N48°58'30.96" E14°26'40.02"
České Budějovice	Adéla eko.		N48°58'30.96" E14°26'40.02"
České Budějovice	Agria	2010	N48°58'30.96" E14°26'40.02"
České Budějovice	Valfi		N48°58'30.96" E14°26'40.02"
Chalupy u Stach	Elfa	2010	N49°6'36.42" E13°38'29.4"
Havlíčkova Borová	Agria	2009	N49°39'2.76" E15°44'35.82"
Havlíčkova Borová	Agria	2010	N49°38'36.6" E15°45'45.42"
Horažďovice	Adéla	2010	N49°20'16.68" E13°41'39.06"
Hoštice	Bionta eko.	2010	N49°11'53.46" E13°55'18.36"
Krásné Údolí	Adéla	2010	N50°4'8.64" E12°55'17.88"
Kujavy	Adéla	2010	N49°41'31.8" E17°58'52.6"
Lípa u Havl. Brodu	Velox	2009	N49°33'25.08" E15°32'15.18"
Lukavec	Adéla eko.	2009	N49°33'26.88" E14°58'36.18"
Malonty	Adéla eko.	2010	N48°41'54.54" E14°35'19.5"
Milotičky	Adéla eko.	2010	N49°28'33.72" E15°8'30.42"
Mostiště	Coletta	2009	N49°23'18.16" E15°59'59.05"
Netřebice	Laura	2010	N48°49'20.88" E14°27'5.1"
Polepy-cesta	Carrera	2010	N50°30'38.5" E14°16'9.6"
Polepy-cesta	Impala	2010	N50°30'39.7" E14°16'6.2"
Polepy-drahota	Impala	2010	N50°30'48.5" E14°16'21.2"
Polepy-úvoz	Carrera	2010	N50°30'41.6" E14°16'11.6"
Polepy-úvoz	Impala	2010	N50°30'42.7" E14°16'8.7"
Radostín nad Oslavou	Belana	2010	N49°27'21.54" E15°57'36.3"
Ruzyně	Adéla eko.	2009	N50°4'54.18" E14°18'5.01"
Slavkov-Vinohrady	Adéla	2010	N49°8'0.03" E16°48'52.04"
Staňkov	Adéla	2009	N49°33'4.38" E13°3'36.84"
Starý Pelhřimov	Impala	2009	N49°26'10.38" E15°10'32.28"
Sutom	Marabelle	2010	N50°30'10.0" E13°58'22.0"
Trutnov	Dali	2010	N50°33'43.92" E15°53'22.02"
Vodňany Svobodné Hory	Karin eko.	2010	N49°7'19.14" E14°8'3.6"
Vyklantice-kostel	Kariera	2009	N49°33'47.8" E15°3'31.0"
Vyklantice-kostel	Agria		N49°33'47.8" E15°3'31.0"
Vyklantice-kostel	Agria	2010	N49°33'47.8" E15°3'31.0"
Vyklantice-kostel	David		N49°33'47.8" E15°3'31.0"
Vyklantice-kostel	Valfi		N49°33'47.8" E15°3'31.0"
Vyklantice-úvoz	Kariera	2009	N49°33'42.5" E15°3'17.5"
Vyklantice-úvoz	Agria		N49°33'42.5" E15°3'17.5"
Vyklantice-úvoz	Agria	2010	N49°33'42.5" E15°3'17.5"
Vyklantice-úvoz	David		N49°33'42.5" E15°3'17.5"
Vyklantice-úvoz	Valfi		N49°33'42.5" E15°3'17.5"
Vyšní Lhoty	Belana	2010	N49°37'33.1 E18°26'20.8"

Lokalita	Odrůda	Rok	GPS souřadnice
Vysoké u Příbramě	Rozára	2010	N49°38'20.64" E13°57'13.86"
Zderaz	Rozára	2010	N49°51'30.24" E16°2'9.24"
Ždírec-cesta	Agria	2010	N49°37'36.9" E15°37'56.2"
Ždírec-cesta	David		N49°37'36.9" E15°37'56.2"
Ždírec-cesta	Valfi		N49°37'36.9" E15°37'56.2"
Ždírec-les	Agria	2010	N49°37'47.9" E15°37'58.0"
Ždírec-les	David		N49°37'47.9" E15°37'58.0"
Ždírec-les	Valfi		N49°37'47.9" E15°37'58.0"
Židovice	Dali	2009	N50°27'4.26" E14°14'2.88"
Židovice	Belana		N50°27'4.21" E14°14'3.69"
Žirovnice	Adéla	2009	N49°16'3.9" E15°10'23.76"


3607102
3607552
txtA gen
3604857
3609233
TxtA1F
TxtA3F
GCCGTCGTGAAGAACTCC
GGTCCACGAGCAGTTCC
TxtA2F
AGTTCCTTCTCCTGCGCCAT
TxtA1R
ATCACGGAGTTGAGCACGA
TxtA3R
TxtA3R
GCA GACTCCCCAG CTCATG
GGAGAGCTGAT GCAGGACGA