

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Veronika Batková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Bakteriální a houbová společenstva
na povrchu ovoce**

Bakalářská práce

Veronika Batková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Veronika Batková

Název práce: Bakteriální a houbová společenstva na povrchu ovoce

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil CSc.

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: NGS, sekvenování, mikrobiom ovoce

Počet stran: 65

Počet příloh: 4

Jazyk: Čeština

SOUHRN

Bakteriální a houbová společenstva ovlivňují rovnováhu všech ekosystémů. Jsou jedním z klíčových faktorů pro správný růst a výživu rostlin. Pro detekci mikroorganismů a studium mikrobiálních společenstev se v současnosti uplatňuje hlavně metoda PCR a 'high throughput sequencing'.

Cílem této práce byla identifikace druhů bakterií a hub vyskytujících se na povrchu poškozených plodů meruněk pomocí PCR amplifikace variabilních oblastí 16S rDNA bakterií a ITS oblastí u hub a identifikace mikroorganismů na základě analýzy sekvencí získaných Sangerovým sekvenováním a sekvenováním nové generace.

Pomocí konvenčního přístupu, který zahrnoval Sangerovo sekvenování se na povrchu plodu meruňky nepodařilo identifikovat žádný fytopatogenní mikroorganismus. Pomocí sekvenování nové generace bylo na povrchu plodů meruněk s poškozením a bez poškození detekováno devět rodů hub, ale nebyl prokázán jejich přímý vliv na poškození plodu.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Veronika Batková

Title: Bacterial and fungal communities on fruit surface

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: prof. RNDr. Milan Navrátil CSc.

The year of presentation: 2020

Keywords: NGS, sequencing, fruit microbiome

Number of pages: 65

Number of appendices: 4

Language. Czech

SUMMARY

Bacterial and fungal communities affect the balance of all ecosystems. They are one of the key factors for good plant growth and nutrition. Nowadays, PCR and 'high throughput sequencing' are mainly used to detect microorganisms and study microbial communities.

The aim of this work was to identify species of bacteria and fungi occurring on the surface of damaged apricot fruits by PCR amplification of variable regions of 16S rDNA bacteria and ITS regions of fungi, and identification of microorganisms based on sequence analysis obtained by Sanger sequencing and next generation sequencing.

Using a conventional approach using Sanger sequencing, no phytopathogenic microorganism could be identified on the surface of the apricot fruit. Using next-generation sequencing, nine genera of fungi were detected on the surface of apricot fruits with and without damage, but their direct effect on fruit damage was not proven.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za jeho trpělivost, vstřícnost a čas, který mi při tvorbě práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat paní Janě Veselské za její pomoc a odborné rady při práci v laboratoři.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. Mikrobiom.....	3
3.1.1 Mikrobiom rostlin.....	3
3.1.2 Studium mikrobiomu	6
3.2 Mikrobiom rhizosféry	8
3.3 Endomikrobiom	10
3.4 Mikrobiom fylosféry.....	12
3.5 Mikrobiom plodu.....	13
4. MATERIÁL A METODY.....	17
4.1 Biologický materiál	17
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	17
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	18
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	19
4.4.1 Izolace DNA	19
4.4.2 PCR amplifikace taxonomicky významných oblastí bakterií a hub	19
4.3.1 PCR amplifikace V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA	19
4.4.3 PCR amplifikace ITS1 +ITS2 oblastí	20
4.4.4 Elektroforetická separace PCR produktů.....	21
4.4.5 Izolace PCR produktů z gelu	21
4.4.6 Klonování PCR produktu	22
4.4.7 Ověření úspěšnosti ligace pomocí PCR reakce	23
4.4.8 Sangerovo sekvenování	23
4.4.9 NGS	24
4.4.10 Bioinformatická analýza sekvencí DNA	24
5. VÝSLEDKY.....	25
5.1 Izolace DNA.....	25

5.2 Identifikace bakterií a hub pomocí PCR amplifikace V3+V4 variabilních oblastí	
16S rDNA a ITS1+ITS2 oblastí a konvenčního sekvenování.....	25
5.2.1 Identifikace bakterií pomocí sekvenace variabilních oblastí V3+V4 16Sr DNA	
genu	25
5.2.2 Identifikace hub pomocí sekvenace oblastí ITS1+ITS2	28
5.3 Identifikace houbových společenstev pomocí Swift Amplicon 16S+ ITS Panel kitu	
a NGS sekvenování	30
6. DISKUZE	35
7. ZÁVĚR.....	39
8. LITERATURA	40
9. PŘÍLOHY	48

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Variabilní oblasti 16S rDNA.....	8
Obrázek 2: Organizace eukaryotní rDNA	8
Obrázek 3: Detekce V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA pomocí primerů S-D-Bact-0785-a-A-21 a S-D-Bact-0008-a-S-6.....	26
Obrázek 4: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (V3+V4 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R.....	26
Obrázek 5: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (V3+V4 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R.....	26
Obrázek 6: Detekce ITS1+ITS2 oblastí hub pomocí primerů ITS1 a ITS4	28
Obrázek 7: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (ITS1+ITS2 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R.....	28
Obrázek 8: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (ITS1+ITS2 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R.....	29
Obrázek 9: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (ITS1+ITS2 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R.....	29
Obrázek 10: A–Plod meruňky s hnědou skvrnou PM-2; B–Řez plodem meruňky s hnědou skvrnou PM-2.....	35
Obrázek 11: Sluneční úžeh na plodech meruňky.....	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Primery použité pro amplifikaci V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA.	20
Tabulka 2: Podmínky PCR reakce.....	20
Tabulka 3: Primery použité pro amplifikaci ITS1+ITS2 oblastí.	20
Tabulka 4: Podmínky PCR reakce.....	21
Tabulka 5: Složení ligační směsi	22
Tabulka 6: Podmínky PCR reakce.....	23
Tabulka 7: Podmínky PCR reakce.....	24
Tabulka 8: Očekávané velikosti produktů u použitých primerů.....	25
Tabulka 9: Délky kontigů složených ze sekvencí V3+V4 variabilních oblastí	27
Tabulka 10: Délky kontigů složených ze sekvencí ITS1+ITS2 oblastí.....	30
Tabulka 11: Rody hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém PM-Zd plodu (B). ..	31
Tabulka 12: Druhy hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém PM-Zd plodu (B)..	31

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Rody hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém plodu PM-Zd (B).....	32
Graf 2: Druhy hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém plodu PM-Zd (B).....	33

1. ÚVOD

Mikroorganismy jsou hlavními faktory, které ovlivňují fungování a rovnováhu všech ekosystémů a přispívají ke koloběhu živin a k primární produkci. Termín mikroorganismy zahrnuje bakterie, kvasinky, houby a v některých případech i viry. Studium mikrobiálních společenstev v konkrétních ekologických nikách je klíčové pro pochopení jejich vzájemného působení. Mikrobiomy jsou studovány v rámci humánní a veterinární medicíny, studie na lidech a jiných savcích prokázaly roli mikrobiomu v řadě fyziologických procesů, které jsou životně důležité pro zdraví hostitele, včetně energetické homeostázy, metabolismu, imunologické aktivity a neurobehaviorálního vývoje. Poznatky o mikrobiomech jsou nezbytné pro pochopení fungování zemědělských ekosystémů, které se uplatní v ochraně plodin před chorobami a škůdci, zvýšení produktivity rostlin a zlepšení absorpce živin.

Studium mikrobiomů je spojeno s rozvojem metod jejich detekce a identifikace. Existenci mikroorganismů prokázali jako první Robert Hooke a Anthony van Leeuwenhoek již v roce 1665 a ještě téhož roku své poznatky publikovali v knize *Micrographia*. Objev mikroorganismů umožnila výroba jednoduchých mikroskopů. Právě ve spojení s užíváním mikroskopů již bylo popsáno velké množství mikroorganismů a jejich význam pro lidské zdraví, zemědělství, průmysl a původ a vznik života na Zemi.

V současné době se předpokládá, že se na Zemi vyskytuje až jeden bilion druhů mikroorganismů, ale ne všechny druhy se zatím podařilo popsat. Např. v jednom gramu půdy se může vyskytovat až několik tisíc druhů mikroorganismů, ale jen méně než 1 % těchto druhů bylo dosud kultivováno a popsáno.

Diagnostika mikroorganismů byla založena na jejich izolaci a kultivaci na různých typech médií podle jejich fyziologických a nutričních potřeb. Dnes se více a více uplatňuje detekce pomocí PCR, tato metoda totiž na rozdíl od kultivace umožňuje identifikovat i nekultivovatelné mikroorganismy přímo ve vzorcích. V současné době se ke studiu mikrobiálních společenstev kromě klasických metod využívá i 'high throughput sequencing'. Nespornou výhodou této metody je možnost analýzy všech genomů organismů, které se nacházejí ve vzorku.

2. CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma 'Bakteriální a houbová společenstva na povrchu ovoce'.
2. Zvládnutí používaných metod: odběr vzorku, izolace DNA, PCR, sekvenování, bioinformatika.
3. Identifikace fytopatogenních mikroorganismů na povrchu plodů meruněk.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Mikrobiom

Mikrobiom je definován jako skupina všech mikroorganismů fyzicky se vyskytujících na, anebo v těle lidí, jiných organismů nebo v určitých prostředích. Složení společenstev mikroorganismů se velmi liší v závislosti na charakteristikách prostředí. (Marchesi *et Ravel*, 2015) do mikrobiomu zahrnují jen bakterie, kvasinky, houby a viry, Beule (2018) spektrum mikroorganismů rozšiřuje o améby a bičíkovce.

V současné době se studuje především lidský mikrobiom. Touto tematikou se zabývá např. 'The Human Microbiome Project'. Jedná se o velké množství navzájem propojených studií z celého světa, jejichž cílem je poznat kompletní složení lidského mikrobiomu a jeho vliv na genetické a metabolické procesy v těle (Turnbaugh *et al.*, 2007). Ukazuje se, že i nepatogenní mikroorganismy mohou přispět k rozvoji a zdraví jednotlivců, u kterých se vyskytují. Například mikrobiom v lidském střevě byl spojen se zdravou funkcí mozku, imunitního systému, trávicího traktu, ale také s řadou onemocnění od rakoviny až po metabolické a psychiatrické poruchy (Ritpitakphong *et al.*, 2016). Výsledky tohoto projektu nám mohou poskytnout také informace o evoluci člověka, o vlivu rychle se vyvíjejících technologií a změn životního stylu na mikroevoluci lidí a rovněž jejich vliv na náchylnost k různým chorobám (Turnbaugh *et al.*, 2007).

3.1.1 Mikrobiom rostlin

Studium mikroorganismů spojených s rostlinami má dlouhou historii, která sahá až k definici rhizosféry podle Lorenze Hiltnera v roce 1904 (Hartmann *et al.*, 2008). Přestože jedny z prvních studií rostlinného mikrobiomu byly prováděny na kořenech rostlin, dnes nejsou opomíjeny ani studie mikroorganismů kolonizujících povrch plodů, listů, květů, stonků a endogenních mikroorganismů vyskytujících se v rostlinných pletivech (Abdelfattah *et al.*, 2016). Domnívám se, že konkrétní mikrobiom rostlin (rostlinných orgánů) je primárně dán kompatibilitou hostitelské rostliny a mikroorganismů a je dále ovlivněn řadou biotických a abiotických faktorů. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující mikrobiom podzemní části rostlin patří pH půdy, její salinita, typ půdy, struktura půdy, půdní vlhkost a půdní organická hmota (Fierer, 2017). Zatímco faktory jako jsou vnější podmínky (světlo, teplo, množství vody, živiny) ovlivňují hlavně mikrobiom nadzemních částí rostlin (Hardoim *et al.*, 2015). Je také známo, že další faktory související s hostitelem, jako je stáří rostlin a zdravotní stav rostlin, ovlivňují strukturu mikrobiálních společenstev prostřednictvím produkce specifických kořenových exudátů, které např. u bakterie *Azoarcus* sp. kmen BH72 vyvolávají zvýšenou transkripci genů, jejichž produkty se uplatňují při endofytické kolonizaci rostlin mikroorganismy (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015).

Jednotlivé mikroorganismy rostlinného mikrobiomu můžeme podle jejich vlivu na rostliny rozdělit na prospěšné, neutrální nebo patogenní. Mezi asi nejznámější prospěšné mikroorganismy

patří hlízkovité bakterie, které jsou schopny fixovat vzdušný dusík. Jedná se o endofytické gramnegativní půdní bakterie, které žijí v symbióze s rostlinami z čeledi bobovitých (Spaink, 2000). Tyto bakterie, které jsou na základě symbiotického chování souhrnně nazývané „rhizobia“, patří do čeledí *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* a *Bradyrhizobiaceae* (Madigan *et al.*, 2003) a mají schopnost indukovat tvorbu hlízek v hostitelské rostlině pomocí produkce specifických signálních molekul tzv. „nod faktorů“ (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991). Další z řady prospěšných bakterií jsou některé přirozeně epifytické bakterie, které mohou vykazovat příznivé účinky na rostlinu jako je zvýšená produkce fytohormonů a s ní spojená podpora růstu. Druhy bakterií *Azospirillum* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* sp. a *Xanthomonas* sp. jsou schopny produkovat auxiny, cytokininy nebo gibereliny (Bulgarelli *et al.*, 2013; Costacurta *et al.*, 1995). Některé bakterie ovlivňující růst rostlin mohou sekretovat 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deaminázu (ACCD), která snižuje hladinu stresového hormonu ethylenu. Mezi kmeny bakterií, které dokáží zvýšit hladinu ACCD patří například zástupci rodů *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp. a *Bacillus* sp. (Rascovan *et al.*, 2016). Řada přirozeně se vyskytujících rostlinných mikroorganismů zlepšuje absorpci živin, podporuje biosyntézu antimikrobiálních sloučenin a přímo nebo zprostředkovaně inhibuje rostlinné patogeny (Bulgarelli *et al.*, 2013). Carrión *et al.* (2018) uvádějí, že proteobakterie *Paraburkholderia graminis* vyskytující v rhizosféře rostlin dokáže potlačit růst houbových patogenů produkcí těkavých organických sloučenin obsahujících síru, které mají fungicidní účinek. Další příklad působení přirozeně se vyskytujících mikroorganismů uvádí Durán *et al.* (2018) - endofytické mikroorganismy patřící do rodů *Serratia* a *Enterobacteras* podle něj potlačují růst houby *Gaeumannomyces graminis*, která je zodpovědná u obilovin za černání pat stébel. Stejný účinek na některé patogeny vyskytující se v půdě mají tzv. supresivní půdy, ve kterých je přítomen mikrobiom, který je schopný růst těchto patogenů potlačit (Santhanam *et al.*, 2015). Mezi takové mikroorganismy patří zejména zástupci rodů *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* a *Pantoea* (Expósito *et al.*, 2017; Schlatter *et al.*, 2017).

Celosvětově roste obava z patogenů trvale se vyskytujících v životním prostředí. Studie, které se zabývají touto tematikou, se zaměřují zejména na lidské patogeny, zatímco rostlinným patogenům byla dosud věnovaná jen malá pozornost (Guilbaud *et al.*, 2016). Jedním z významných rostlinných patogenů je bakterie *Pseudomonas syringae*. Patovary *P. syringae* napadají širokou škálu hospodářsky významných druhů peckovin, dále okurky, olivy nebo kiwi a prostřednictvím produkce fytotoxických sloučenin, proteinů a fytohormonů způsobují chlorózy nebo nekrózy listů a dřeva (Ashorpour *et al.*, 2008; Koh *et al.*, 2014; Izadiyan *et al.*, 2017; Mansfield *et al.*, 2012). Mezi další patogeny, které způsobují významné ekonomické ztráty, patří *Ralstonia solanacearum*, která je podle Genin *et al.* (2010) nejničivější patogenní bakterií rostlin na světě. Druh *R. solanacearum* se představuje velkou skupinu kmenů, které se liší výskytem,

spektrům hostitelů a patogenním projevem. *R. solanacearum* dokáže infikovat až 250 druhů rostlin a je původcem hnědé hniloby brambor, vadnutí rajčat, tabáku, lilku a některých okrasných rostlin. Významným patogenem, který napadá řadu ovocných stromů, keřů a okrasných rostlin a vyvolává u nich bakteriální spálu je *Erwinia amylovora*. Tento patogen je nebezpečný zejména pro mladé ovocné stromy, u kterých může způsobit i jejich úhyn (Mansfield *et al.*, 2012).

Přestože mezi mikrobioty fylosféry dominují bakterie nad archeí a houbami, právě přítomnost některých hub může hrát klíčovou roli ve zdraví rostlin a jejich produkci (Bulgarelli *et al.*, 2013). Houby představují jednu z nejrozmanitějších skupin eukaryot s potenciálně miliony druhů. Jako většina organismů, které nejsou schopny fotosyntézy, jsou i houby závislé na existenci rostlin, které jim poskytují uhlík jakožto zdroj energie. Vztah mezi houbami a rostlinami bývá většinou vzájemně prospěšný, mnoho druhů hub je saprofytických, tj. žijí na odumřelých rostlinných materiálech, rozkládají je a recyklují živiny, které jsou poté znovu dostupné pro rostliny. V průběhu evoluce začaly některé houby aktivně interagovat rostlinami. Většina z těchto interakcí je pro rostlinu výhodná, např. pro jejich růst a vývoj, jako v případě symbióz, mykorhiz a endofytických hub (Grayer *et al.*, 2001).

Některé rostliny přirozeně hostí rezervoár endofytických hub, které u nich nezpůsobují žádné choroby. Právě naopak, endofytické houby hrají zásadní roli při ochraně rostliny proti patogenům a mohou mít i pozitivní vliv na růst rostlin (Saminathan *et al.*, 2018). Nejznámější kořenové epifytické mikroorganismy jsou houby vytvářející ektomykorhizy, většinou se podílejí na zvýšení mobilizace a absorpce živin v půdě, zatímco hostitelská rostlina jim poskytuje sacharidy, tento typ symbiózy je dominantní zejména mezi kořeny dřevin a zástupci oddělení *Basidiomycota* a *Ascomycota* (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015; Landeweert *et al.*, 2001). Symbiotické houby rovněž přispívají k obraně rostlin proti patogenům, např. vyvoláním systémově získané rezistence nebo indukované systémové rezistence. Některé houbové endofyty dokonce modulují rezistenci hostitelských rostlin, např. endofyt *Colletotrichum tropicale*, vyskytující se v listech kakaovníku (*Theobroma cacao*), indukuje expresi stovek hostitelských obranných genů, což má za následek celkové zlepšení jejich odolnosti (Busby *et al.*, 2016).

Část hub se dále vyvinula opačným směrem, porušily rovnováhu vzájemného prospěchu, aby se staly patogeny rostlin (Grayer *et al.*, 2001). Houbové patogeny na rozdíl od bakteriálních jsou jedinečné svou invazivností a často přímo pronikají buněčnou stěnou, aby získaly přístup k buněčnému obsahu (Mellersh *et al.*, 2002). Mezi nejčastěji se vyskytujícími patogenními houbami na světě patří tzv. padlí (oddělení *Ascomycota*, řád *Erysiphales*), které napadá listy, stonky, květy a plody téměř 10 000 druhů krytosemenných. Každoroční opatření plodin proti padlí zahrnuje obrovské výdaje na fungicidy a vývoj rezistentních odrůd (Glawe, 2008). Významné ekonomické ztráty vyvolávají i druhy *Cladosporium* sp. nebo *Alternaria alternata* (Abdelfattah *et al.*, 2016). Rostlinné patogeny ale nemusí mít nutně jen negativní význam, *Alternaria* sp. byla použita při studiu klíčových aspektů etiologie, epidemiologie a kontroly chorob rostlin a houba *Cladosporium*

fulvum byla důležitým genetickým modelem pro pochopení molekulární podstaty hostitelské rezistence (Glawe, 2008; Rivas *et al.* Thomas, 2005).

Ochrana spotřebitele a ochrana životního prostředí mají přednost před jakýmkoli jinými výrobními nebo ekonomickými důvody. Ochrana rostlin před patogeny, škůdci a plevely se postupně přeorientovala od masového používání pesticidů k racionálnímu používání pesticidů v integrované a ekologické produkci, u kterého má zdravý uživatel a ochrana životního prostředí přednost před produktivními nebo ekonomickými stránkami rostlinné výroby. V tomto novém scénáři ochrany plodin se zavádějí i mikrobiální pesticidy a v současné době několik prospěšných mikroorganismů tvoří součást nové generace mikrobiálních pesticidů a mnoha dalších přírodních produktů mikrobiálního původu (Montesinos, 2003).

3.1.2 Studium mikrobiomu

Jako první se studiu lidského mikrobiomu věnoval Theodor Escherich. Prokázal, že ihned po narození dochází ke kolonizaci těla novorozence mikroorganismy. Přestože je mateřské mléko sterilní a je první potravou novorozence, pozoroval přítomnost koků, bacilů a kvasinek na obarvených sklíčkách s první stolicí novorozence i na sklíčkách se stolicí kojenců (Flamm, 2011).

U rostlin se většina studií zaměřuje na rhizosféru, tedy exogenní mikrobiom, přestože mikroorganismy jsou schopny kolonizovat i rostlinná pletiva, kde tvoří endogenní mikrobiom (Berg *et al.*, 2014). V současné době čelí rostlinná výroba mnoha výzvám, jako je změna klimatu, demografický vývoj a růst poptávky po udržitelné produkci. A protože mikroorganismy prokázaly potenciál pro použití jako biofertilizátory nebo biopesticidy, roste zájem o tento alternativní způsob výživy a ochrany plodin v agrotechnických postupech (Mitter *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2013). Většina rostlin interaguje s mikroorganismy, které jsou často nezbytné pro jejich růst a přežití. Berg *et al.*, (2014) dokonce považují mikroorganismy, které kolonizují různé části rostlin, za „druhý genom rostliny“. V tomto ohledu mnoho studií v posledních desetiletích dokázalo, že interakce mezi rostlinami a mikroorganismy jsou rozhodující nejen pro lepší pochopení problematiky růstu rostlin, ale také pro zajištění udržitelné rostlinné výroby v měnícím se světě. Dalším důležitým důvodem pro studium mikrobiální diverzity je nedostatek znalostí o existujících a vyhynulých mikroorganismech. Neexistuje totiž shoda v tom, kolik druhů mikroorganismů na světě existuje (Fakruddin, 2015).

U bakterií a hub převažuje symptomatická diagnostika na hostitelích a fenotypová diagnostika získaných bakteriálních a houbových izolátů. Kultivační metody nám primárně poskytují kvalitativní data, i když lze získat i kvantitativní informace, například počet kolonií. Výhoda kultivačních metod spočívá v tom, že úspěšná izolace poskytuje objektivní důkaz přítomnosti mikroorganismu a kultury, která je k dispozici pro další charakterizaci. Tradiční kultivace mikroorganismů ale zachycují jen omezenou část diverzity, která je ve vzorku, pokud nejsou

použity rozmanité kultivační přístupy, které poskytují různé nutriční podmínky a nemaskují přítomnost pomalu rostoucích mikroorganismů (Sanzani *et al.*, 2014). Navíc kultivační metody nemusí být dostatečně citlivé pro detekci mikroorganismů u presymptomatických infekcí a nemohou tak detekovat několik sezónně aktivních patogenů přenášených v půdě, mezi které patří někteří zástupci rodu *Phytophthora* sp. Jedná se totiž o sezónně aktivní efemerní organismy, které mohou být v hostitelských tkáních nebo půdách rychle nahrazeny jinými mikroorganismy. Velikost jejich populace může ve velmi krátkém časovém období kolísat z nedetekovatelné až k velmi vysoké hodnotě (Cooke *et al.*, 2007). Bylo prokázáno, že kultivovatelné bakterie představují menší zlomek z celkového mikrobiomu (Giovannoni *et al.*, 1990), přičemž se odhaduje, že pouze 1–10 % půdních bakterií je kultivovatelných (Hugenholtz *et al.*, 1996). Morfologické charakteristiky jako tvar buněk, buněčná stěna, Gramovo barvení atd. samy o sobě nemusí být dostatečné pro spolehlivou diagnostiku mikrobů (Fakruddin, 2015). Další klasifikace a rozřazení do rodů a druhů se provádí pomocí řady biochemických testů. Nicméně sekvenování 16S rDNA dokázalo, že tyto biochemické testy nemusí být spolehlivé (Batt, 2016).

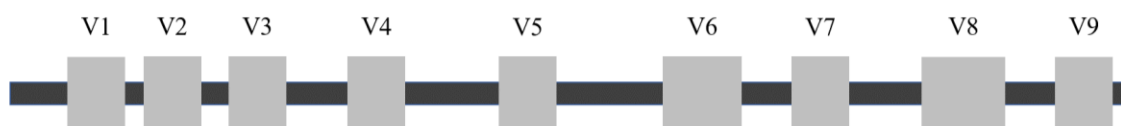
Detekce fytopatogenních hub může být u některých hostitelských organismů provedena přímo díky typickým příznakům infekce. Pokud nejsou specifické projevy infekce jednoznačné, využívají kultivační metody vlhké komory, které mohou podpořit růst a sporulaci patogenu z pletiv hostitele nebo izolaci patogenu na kultivačních médiích. Tato technika je vhodná pro patogeny v hostitelských tkáních, protože je možné fyzicky zabránit v růstu kontaminujícím mikroorganismům. Ve složitých vzorcích prostředí, jako je půda nebo voda, však mohou rychleji rostoucí saprofytické organismy skrývat přítomnost primárního patogenu (Sanzani *et al.*, 2014). Jako vzorek pro identifikaci druhů mohou sloužit plodnice hub nebo houbové kultury. Nicméně drtivá většina hub nevytváří žádné plodnice a nemůže být tedy kultivována pomocí dostupných technik. Právě molekulární identifikace pomáhá objasnit stále málo popsanou diverzitu hub v komplexních prostředích jako je rhizosféra, půda, sedimenty a voda (Ren *et al.*, 2019). Molekulární identifikaci a genomickou analýzu cílového druhu mohou komplikovat společně se vyskytující mikroorganismy ve vzorku; při kultivaci hub je běžná přítomnost endosymbiotických bakterií, ale bylo dokázáno, že plodnice mohou být napadeny i prokaryoty, protisty, jinými houbami a mikroskopickými vodními bezobratlými (hlístice, chvostoskoci a larvy dvoukřídlých) (Tedersoo *et al.*, 2016).

Ve srovnání s těmito metodami má metagenomický přístup schopnost odhalit dříve skrytou rozmanitost společenstva mikroorganismů (Wei *et al.*, 2018). Metagenomika představuje soubor molekulárně biologických metod, které pracují s veškerou genetickou informací ze vzorku a poskytují tak daleko větší množství informací o biodiverzitě než postupy založené na kultivaci; jinak řečeno se jedná o sekvenční a funkční analýzu všech mikrobiálních genomů obsažených ve vzorku prostředí (Riesenfeld *et al.*, 2004; Daniel, 2005). Tyto studie mikrobiomů nám mohou poskytnout znalosti, které povedou k zásadnímu pokroku ve strategiích biologické kontroly,

produktech biologické kontroly a posklizňových opatření (Gilbert *et al.*, 2011).

Kromě sekvenování celkové extrahované DNA nebo RNA prostřednictvím cDNA jsou často používány přístupy, které zahrnují amplifikaci jednotlivých genů před sekvenováním. Ribozomální operon je díky své přítomnosti ve všech organismech a díky přiměřené konzervovanosti často používán jako zlatý standard při identifikaci. Přístupy na bázi ampliconů zaměřené na variabilní specifické markery, např. 16S rDNA ITS nebo 18S rDNA se běžně používají při identifikaci bakterií, archeí a hub (Schöler *et al.*, 2017).

PCR amplifikace 16S rDNA je nyní nejčastěji používanou metodou pro stanovení složení bakteriálních společenstev zejména proto, že obsahuje jak vysoce konzervované oblasti pro návrh primerů, tak hypervariabilní oblasti pro identifikaci fylogenetických charakteristik mikroorganismů (Yang *et al.*, 2016). Nebylo však dosaženo shody ohledně toho, které z 9 variabilních oblastí 16S rDNA by měly být zacíleny při studiích bakterií (Obrázek 1) (Sperling *et al.*, 2017). Ke studiu mikrobiální diverzity a bakteriálních společenstev v pletivech a na povrchu rostlin se používají hlavně V3 a V4 variabilní oblasti (Eichmeier *et al.*, 2019; Klindworth *et al.*, 2013).



Obrázek 1: Variabilní oblasti 16S rDNA (zhotoveno podle Swift Amplicon 16S + ITS Panel; <https://swiftbiosci.com/swift-amplicon-16s-its-panel/>).

Vnitřní transkribované mezerníky (ITS) jsou primární volbou pro identifikaci hub. Dva vysoce variabilní mezerníky: ITS1+ITS2 jsou obvykle druhově specifické, zatímco vmezežený 5.8S gen je vysoce konzervovaný (Obrázek 2). Těchto vlastností se využívá i při identifikaci několika dalších skupin eukaryot, včetně rostlin a živočichů (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013).



Obrázek 2: Organizace eukaryotní rDNA (zhotoveno podle Swift Amplicon 16S + ITS Panel; <https://swiftbiosci.com/swift-amplicon-16s-its-panel/>).

3.2 Mikrobiom rhizosféry

Termín rhizosféra poprvé použil rostlinný fyziolog Lorenz Hiltner, rhizosféru popisuje jako oblast okolo kořene rostliny, která je obývána jedinečnou populací mikroorganismů ovlivněných kořenovými exudáty (Hartmann *et al.*, 2008). Kořeny rostlin vylučují širokou škálu sloučenin, které jsou rozhodujícími faktory pro interakci s mikroorganismy. Jedná se o řadu organických

a anorganických sloučenin, které zahrnují cukry, mastné kyseliny, CO₂, různé anionty a kationty, terpenoidy, thiazoly, cyklické adenosinové estery, aminokyseliny a proteiny (Badri *et al.*, 2009, Rasmann *et al.*, 2012). Jednou z důležitých funkcí těchto sloučenin je zahájení chemotaxe, která rostlinám umožní přitahovat mikroorganismy (Bais *et al.*, 2006). Kromě sloučenin, které se uvolňují při vzniku prospěšných interakcí, vylučují rostliny i inository a bithienyl a jeho deriváty, které odpuzují patogenní mikroorganismy z okolí rhizosféry (Rasmann *et al.*, 2012). Podle Egamberdieva *et al.*, (2008) se v rhizosféře vyskytuje až 10¹¹ mikrobiálních buněk na gram půdy a více než 30 000 prokaryotických druhů (Mendes *et al.*, 2011). Většina těchto mikroorganismů hraje zásadní roli při podpoře růstu rostlin, a to hlavně díky zvýšenému přísunu živin, které jsou v půdě špatně dostupné, jako např. fosfor, dusík, železo a zinek. Hlavními mechanismy zvýšení příjmu živin jsou zvýšení rozpustnosti fosfátů a rozpustnosti solí zinku z nerozpustných sloučenin, fixace dusíku a vazba železa prostřednictvím produkce sideroforů. Mikroorganismy mají rovněž zásadní vliv při přežití a toleranci rostlin vůči biotickým a abiotickým faktorům. Činí tak řadou mechanismů jako je biofertilizace, stimulace růstu kořenů, kontrola abiotického stresu, rhizoremediace a kontrola chorob prostřednictvím inhibice růstu některých patogenů. Tyto mechanismy byly intenzivně studovány u rhizobakterií spadajících do kmenů *Proteobacteria* a *Firmicutes* (rody *Pseudomonas* a *Bacillus*) a u hub patřících do oddělení *Deuteromycetes* (rod *Trichoderma*) (Ali *et al.*, 2017).

V mikrobiomu rhizosféry se ale nevyskytují pouze prospěšné bakterie, ať už pro zdraví rostlin nebo člověka (Ali *et al.*, 2017). V rhizosféře se mohou vyskytovat i bakterie úzce související s nozokomiálními infekcemi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia* a *Streptomonas maltophilia*. Byly detekovány i druhy, které mohou způsobovat kožní infekce (*Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* sp.) nebo infekce močových cest (*Proteus vulgaris*, *Burkholderia cepacia*) (Berg *et al.*, 2005).

Existuje jen několik skupin půdních patogenních bakterií, pravděpodobně proto, že bakterie tvořící spory v půdě, nemohou dlouho přežít. Příkladem patogenních bakterií vyskytujících se v půdě je *Ralstonia solanacearum* způsobující hnědou hnilobu brambor a *Agrobacterium tumefaciens* vytvářející nádory v pletivech dvouděložných rostlin (Mendes *et al.*, 2013).

Dalšími mikroorganismy, které mají klíčový vliv v rhizosféře jsou houby, které se vyskytují spolu s rostlinami v mutualistickém vztahu. Symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin neboli mykorhiza, je v přírodě velmi rozšířená. U kořenů stromů v mírných pásmech se setkáváme zejména s ektomykorhizou, což znamená, že houbový organismus neproniká do pletiv symbiotické rostliny, zatímco při endomykorhize část houbových hyf proniká do buněk rostliny. Význam mykorhizy byl dlouho podceňován, ale v poslední době se ukazuje, že 70-90 % všech rostlin je mykorhizních (Parniske, 2008). Tyto vztahy vytváří řada hub, ale pro zemědělství jsou nejdůležitější tzv. abruskulární mykorhizní houby (AMH), kde s rostlinami žijí v symbióze zástupci čeledi *Glomeromycota*. AMH jsou v symbióze s více než 80 % čeledí rostlin, které

zahrnují mnoho druhů plodin (Gosling *et al.*, 2006). AMH zajišťují svému hostiteli absorpci fosfátových iontů (Sanders *et al.*, 1971), zvyšují odolnost hostitelské rostliny vůči hmyzu (Gange *et al.*, 1994) a půdním patogenům (Newsham *et al.*, 1995), zlepšují odolnost vůči suchu (Augé *et al.*, 1994) a zvyšují toleranci k zasolení půdy a přítomnosti těžkých kovů (Shetty *et al.*, 1995; Mohammad *et al.*, 2003). Na druhé straně houby přijímají uhlík z hostitelské rostliny, který jim umožňuje růst a dokončit tak jejich životní cyklus (Gosling *et al.*, 2006).

Kromě hub, které jsou pro rostliny prospěšné, je velké množství hub přítomných v rhizosféře parazitárních a způsobují vážné choroby, které mohou vést až k smrti rostlin (Ali *et al.*, 2017). Téměř všechny patogenní houby přítomné v rhizosféře jsou nekrotrofní, což znamená, že zabíjejí hostitelské rostliny svými toxiny a následně získávají živiny z mrtvých organismů. Rostliny napadené houbovými půdními patogeny mohou mít řadu příznaků, ale zároveň mohou být obtížně diagnostikovatelné, protože většina symptomů je pozorovatelná pouze pod zemí a projevy napadení na nadzemní části rostlin mohou být podobné těm, které jsou způsobeny abiotickými faktory zahrnujícími sucho, stres nebo nedostatek živin. Půdní houbové patogeny mohou způsobovat také rozklad semen a kořenovou hnilobu. Jakmile je kořen infikován, může se patogen šířit na další kořeny, jako např. u zoosporických hub rodu *Pythium* a *Phytophthora* nebo se infekce může šířit prostřednictvím prorůstání mycelia, jako je tomu u rodů *Rhizoctonia* a *Gaeumannomyces* (Mendes *et al.*, 2013).

3.3 Endomikrobiom

Endofyty neboli organismy, které žijí uvnitř rostlinných pletiv, jsou součástí mikrobiomu každé rostliny. Německý botanik, Anton de Bary, který je považován za otce rostlinné patologie, vytvořil v roce 1886 termín endofyt, pomocí kterého popsal endofytní houby jako parazitické druhy žijící uvnitř rostlinných pletiv. Wilson (1995) jako endofyty označuje organismy (nejčastěji houby, bakterie či řasy), které jsou schopné alespoň část svého životního cyklu žít uvnitř rostliny, aniž by způsobovaly její poškození nebo jakékoliv viditelné známky onemocnění.

Potenciální přínos některých endofytických mikroorganismů spočívá v ochraně rostlin před patogeny a hmyzem, zvýšení tolerance stresu, modulaci vývoje rostlin a potlačení růstu plevelů. Konkrétní mechanismy, kterými endofytické mikroorganismy plní tyto funkce u rostlin se liší v závislosti na mikroorganismu a rostlině (White *et al.*, 2019). Endofyty mohou rovněž ovlivnit závažnost symptomů choroby, a tedy i závažnost onemocnění rostlin, ale i přes rostoucí počet studií je základní mechanismus interakcí stále nejasný. Jedním z uvažovaných mechanismů je indukce systémové rezistence hostitele (Busby *et al.*, 2016).

Mezi endofytní mikroorganismy jsou řazeny i zástupci bakterií. Některé endofytní bakterie mohou zvýšit schopnost tolerance k xenobiotickým sloučeninám vyskytujícím se v půdě a urychlit jejich degradaci. Například u rostlin rostoucích v půdě kontaminované ropou byla popsána endofytická společenstva s vyšší četností bakterií degradujících uhlovodíky než u rostlin na nekontaminované

půdě (Porras-Alfaro *et al.* Bayman, 2011).

Přítomnost jiných bakteriálních endofytů se u rostlin někdy ani nemusí projevit. Z pletiv bezpříznakových rostlin révy vinné, kukuřice a rýže bylo izolováno 129 bakteriálních druhů, které náležely do 54 rodů, přičemž nejčastěji byli detekováni zástupci rodů: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* a *Agrobacterium*. *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* byly detekovány v kořenech kukuřice, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* a *Bacillus* ve stonku kukuřice, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rhodococcus* ve stonku révy vinné (Hallmann *et al.*, 1997), *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* v kořenech révy vinné (Burns *et al.*, 2015) a čeledě *Rhizobiaceae*, *Comamonadaceae*, *Streptomyetaceae* a *Bradyrhizobiaceae* v kořenech rýže (Edwards *et al.*, 2015).

Podle Fishera *et al.* Petriniho (1992) můžeme rozdělit endofytické houby do dvou kategorií: jedna zahrnuje převážně saprofytní organismy a druhá potenciální patogeny. Toto rozdělení se ale nedá aplikovat na všechny houbové endofyty, některé z nich s komplexními životními cykly mohou totiž spadat do obou kategorií. I když je daný endofyt schopen infikovat více hostitelů, jeho interakce mohou vykazovat funkční nebo ekologickou specifitu: endofyt jednoho hostitelského druhu schopný kolonizovat jiný druh nemusí interagovat s oběma druhy stejným způsobem. Velké množství literatury rostlinné patologie udává, že houbové patogeny s komplexními životními cykly osídlují rozličné hostitelské druhy v různých životních stádiích a že jejich interakce s těmito hostiteli se výrazně liší (Arnold, 2007). Mnoho hub běžně uváděných jako endofyty jsou fytopatologové považovány za minoritní nebo sekundární patogeny. Jejich častý výskyt ve zdravých i nemocných rostlinách jenom zdůrazňuje to, že není možné přesně stanovit hranice mezi endofyty, fakultativními patogeny a latentními patogeny (Stone *et al.*, 2004). Fisher *et al.* Petrini (1992) např. zjistili, že druhy *Alternaria alternata*, *Epicoccum purpurascens* a *Cladosporium tenuissimum*, které byly dříve popisovány jako saprofyti nebo jen slabí paraziti rýže, jsou schopné kolonizovat i živá pletiva mladých rostlin rýže. Dalším významnými endofyty jsou vréckovýtrusné houby z rodu *Colletotrichum* napadající řadu hostitelů (jahodník, celer, lilek, rajče, paprika, broskvoň, borůvka, réva vinná aj.). Velmi významnými endofyty a zároveň patogeny jsou zástupci rodu *Fusarium*, kteří jsou původci tzv. fusariového vadnutí. Fusaria jsou sice častými, ale zřídka dominantními složkami endomikrobiomu (Stone *et al.*, 2004). Mezi typické endofytické houbové patogeny dřevin patří původci antraknóz, jako je antraknóza platanu (*Apiognomonia veneta*) a antraknóza buku (*Apiognomonia errabunda*).

Houbové endofyty, které musí pronikat a přetrvávat v hostitelských pletivech, s větší pravděpodobností vykazují určitý stupeň specifity i s ohledem na houby, které se mohou přechodně vyskytovat na povrchu jejich hostitele. Tyto endofyty pak mohou uplatňovat svou antimikrobiální aktivitu nebo produkovat sekundární metabolity pouze za přítomnosti elicitorů nebo substrátů organismu, ve kterém se vyskytují. Příkladem je entomopatogenní houba

Beauveria bassiana způsobující plísňová onemocnění hmyzu (Arnold, 2007). Bing et Lewis, (1991) prokázali, že *Beauveria bassiana* může růst jako endofyt, a přitom chránit kukuřici před zavíječem kukuřičným. U rostlin kakaovníku bylo prokázáno, že některé endofytické houby mohou snížit poškození patogeny *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri* a *Moniliophthora perniciosa*; u divokých banánů endofyty *Cordana* sp. a *Nodulosporium* sp. inhibovaly růst patogenu *Colleotrichum* pomocí produkce sekundárních metabolitů (Porrás-Alfaro et Bayman, 2011).

3.4 Mikrobiom fylosféry

Na povrchu rostlin se nacházejí stovky druhů bakterií, kvasinek a hub. Bakterie jsou ale zdaleka nejpočetnějšími kolonizátory, na povrchu listů se může vyskytovat až 10^7 buněk na cm^2 (Lindow et Leveau, 2002). Toto mikroprostředí, tzv. fylosféra je oblast, kterou tvoří nadzemní orgány rostlin a atmosféra a podléhá kombinovanému regulačnímu vlivu obou těchto složek (Marendiak et al., 1987). Obecně platí, že mikroorganismy vyskytující se na nadzemních částech rostlin pochází z půdy, osiva a vzduchu a přizpůsobují se životu v rostlinných pletivech nebo na jejich povrchu, kde na složení mikrobiální komunity má vliv několik faktorů včetně půdy, podmínek prostředí a agrotechniky (Hardoim et al., 2015; Stone et al., 2018). Heterogenní prostředí tvořené fylosférou podporuje koexistenci širokého spektra mikroorganismů včetně prokaryot (bakterie a méně často archebakterie), eukaryot (houby a oomycety) a virů. Bakteriálním epifytním společenstvům obecně dominují *Proteobacteria* (např. *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*), houbovým epifytním společenstvům dominují *Ascomycota* (např. *Auerobasidium*, *Cladosporium*, *Taphrina*) (Vacher et al., 2016). Strukturní analýza fylosféry révy vinné potvrdila výskyt rodů *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea* a *Metylobacterium* (Zarraonaindia et al., 2015, (Kecskeméti et al., 2016). Studiu mikrobiomu na listech kukuřice se věnovali Wallace et al. (2018) zjistili, že mezi dominantní zástupce patřily rody *Sphingomonas* a *Methylobacterium*. Steven et al. (2018) detekovali v květech jabloně nejčastěji druhy rodu *Pseudomonas* a čeledi *Enterobacteriaceae*s. Podobně četné studie provedené na květech jabloní, mandlí, grapefruitu, tabáku nebo na květech dýně zjistily, že se nejčastěji vyskytovali zástupci rodu *Pseudomonas* (Alekkett et al., 2014). Právě bakterie *Pseudomonas syringae* je jedním z nejvíce prostudovaných patogenů rostlin, způsobuje choroby obrovského ekonomického významu, jelikož napadá širokou škálu rostlin (Mansfield et al., 2012). *Pseudomonas syringae* je schopna růst epifyticky a proniknout do pletiv listů přes stomata nebo ranami, kde při vhodných podmínkách katalyzuje tvorbu ledu pomocí svých nukleárně aktivních ledových jader a způsobuje tak mrazové poškození u rostlin (Vacher et al., 2016; Hattlrich, 1989).

Kromě bakterií je povrch listů masivně kolonizován kvasinkami a vláknitými houbami. Mezi jedny z nejběžnějších patogenů na světě patří patogeny způsobující padlí: *Erysiphe*, *Podosphaera*, *Phyllactinia* a *Blumeria*. Tyto druhy po proniknutí kutikulou a po rozrušení buněčné stěny

získávají zdroje z rostlinných buněk, při infekci rostou jejich mycelia na povrchu listů, kde vytvářejí šedé povlaky (Glawe, 2008).

Mnoho horizontálně přenášených endofytů pravděpodobně začíná růst na povrchu listů před proniknutím do pletiva rostliny. Mohou se tedy v rámci svého vývoje přeorientovat z epifytního organismu na endofytní. Tato změna je v některých případech možná i naopak. Z endofytů se mohou stát epifyty, pokud jsou vystaveny vnějšímu prostředí, např. při poškození pletiva a mohou pomoci ochránit exponované části před vnějším prostředím díky vytvoření biofilmu nebo překrytím odhaleného místa svými hyfami (Porrás-Alfaro *et al.*, 2011).

O četných nepatogenních mikroorganismech vyskytujících se na povrchu rostlin se toho obecně ví jen velmi málo, hrají důležitou roli při udržování velikosti populace škodlivých mikroorganismů a některé jsou dnes používány jako biologická kontrola pro ochranu rostlin před chorobami nebo mrazem.

Fylosféru rostlin, zejména plodin mohou osidlovat i lidské patogenní bakterie jako *Escherichia coli* nebo *Salmonella enteritica*. S trendem větší spotřeby čerstvé ovoce a zeleniny a celosvětové distribuce těchto produktů z různých oblastí s různými hygienickými podmínkami budou spotřebitelé vystaveni vyššímu riziku expozice lidským patogenům (Lindow *et al.*, 2002).

3.5 Mikrobiom plodu

Mikroorganismy jsou nedílnou součástí plodů ovoce a zeleniny, kde se nachází jako epifyty na jejich povrchu nebo jako endofyty v pletivech. Většina těchto mikroorganismů není patogenní, ale bylo potvrzeno, že v některých případech konzumace tepelně neupravené zeleniny a ovoce je rizikovým faktorem pro infekci střevními patogeny jako *Escherichia coli* O157:H7, která byla izolována z listů špenátu nebo salátu a *Salmonella typhimurium* a *S. newport* byly detekovány na rajčatech a salátu (Heaton *et al.*, 2008). Expozice nepatogenním mikroorganismům vyskytujícím se na povrchu plodů může u lidí také ovlivnit vývoj alergií. Kromě vlivu na lidské zdraví, mají tyto mikroorganismy vliv i na rychlost znehodnocení potravin (Leff *et al.*, 2013). Příčiny a mechanismy znehodnocování plodin mikroorganismy a podmínky správného skladování spolu s biologickou a posklizňovou biologickou kontrolou jsou v poslední době velmi intenzivně studovány.

Z předchozích studií, které se zaměřily na kultivovatelná bakteriální a houbová společenstva a jejich vliv na produkci vyplynulo několik klíčových závěrů: (1) existuje několik faktorů, jako je kultivar a fyziologický stav rostliny a patogenu, které ovlivňují kolonizaci rostliny mikroorganismy (např. u potravinových patogenů přítomných na salátu) (Critzler *et al.*, 2010; Mitra *et al.*, 2009; Klerks *et al.*, 2007), (2) podmínky při pěstování a skladování mohou ovlivnit složení přítomných bakteriálních společenstev (Ponce *et al.*, 2008; Rastogi *et al.*, 2012; Rudi *et al.*, 2002; Lopez-Velasco *et al.*, 2011; Granado *et al.*, 2008; Ottosen *et al.*, 2009) a (3) nepatogenní mikroorganismy mohou inhibovat růst patogenních mikroorganismů na povrchu plodů (Liao *et al.*

Fett, 2001; Critzer *et al.*, 2010; Enya *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2009; Teplitski *et al.*, 2011). Již zmíněné rozdíly v podmínkách při pěstování, transportu a skladování ovoce mohou ovlivnit rozmanitost a složení mikrobiálních společenstev (Nguyen-the *et al.*, 1994; Gram *et al.*, 2002). Předpokládá se, že plody vyvíjející se blíž k zemi budou mít ve svém mikrobiomu vyšší zastoupení půdních mikroorganismů nebo u plodů skladovaných při nižších teplotách bude větší podíl psychrofilních bakterií (Nguyen-the *et al.*, 1994; Rudi *et al.*, 2002; Lopez-Velasco *et al.*, 2011).

Většina studií mikroorganismů spojených s rostlinnou produkcí se zaměřila na relativně malý počet patogenních bakterií. Tyto studie zdaleka nepokrývají celkovou rozmanitost a složení mikrobiálních společenstev přítomných na plodech (Leff *et al.*, 2013). Interakce mezi různými druhy mikroorganismů mohou ovlivnit strukturu mikrobiálních společenstev, které obývají povrch plodů a svým vlivem na rostlinu mohou ovlivnit řadu ekologických a evolučních procesů. Biogeografická distribuce mikrobiálních společenstev byla až doposud studována hlavně na plodech révy vinné, které jsou základním zdrojem pro výrobu vína. Jen málo studií se zabývalo mikrobiomem plodů slivoní, jabloní, hrušní, třešní nebo jahodníků (Vepštaitě-Monstavičě *et al.*, 2018).

Přestože většina bakterií na povrchu hroznů nemůže přežít za extrémních podmínek, které panují během procesu fermentace vína, jsou užitečné pro zdraví rostliny, kvalitu plodů, výnos, a dokonce i proces výroby vína. Jejich metabolické aktivity na povrchu hroznů hrají důležitou roli na začátku kvašení (Nisiotou *et al.*, 2007; Verginer *et al.*, 2010). V posledních letech byly studie zaměřené zejména na vliv mikrobiomu povrchu hroznů na proces výroby vína, zatímco obecné složení mikrobiomu povrchu hroznů bylo studováno velmi málo. Až nedávno byly zkoumány změny v mikrobiomu v závislosti na vinicích (Portillo *et al.*, 2016). Zhang *et al.* (2019) se věnovali studiu fylogenetické skladby bakteriálního mikrobiomu u 12 klonů 6 odrůd révy vinné (každou odrůdu zastupovaly 2 klony). Analýzou 12 klonů získali cca 440 000 sekvencí, ve kterých bylo detekováno 933 bakteriálních rodů, které náležely do 45 kmenů. U všech klonů byly přítomny rody *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Lactococcus*. Nejpočetnější a často se vyskytující byly kmeny *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* a *Firmicutes*. Kmeny *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* a *Planctomycetes* se vyskytovaly klonově specificky. Přestože je známo, že na utváření mikrobiomu plodů révy vinné má vliv životního prostředí, kultivar a konkrétní podmínky vinice, stále je třeba prozkoumat několik dalších aspektů. Mezzasalma *et al.*, (2018) studovali mikrobiom tří odrůd révy vinné, které se pěstují po celém světě: Cabernet Sauvignon, Syrah a Sauvignon Blanc, a to ve třech sbírkách genových zdrojů, které byly charakterizovány různými klimatickými podmínkami (severní Itálie a severní Španělsko). Analýza 16S rRNA pomocí High Throughput Sequencing půdního mikrobiomu révy vinné dokázala, že všechny vzorky hroznů sdílely, bez ohledu na místo odběru vzorků (úpatí italských Alp, Lombardie a sever Španělska), některé bakteriální taxony, zejména rody *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* a další rody patřící

do třídy *Aplhaproteobacteria*. Autoři rovněž potvrdili, že půda představuje primární rezervoár mikroorganismů pro mikrobiom hroznů, který je až ze 60 % tvořen rody vyskytujícími se jak v půdě, tak na povrchu hroznů. Zároveň je možné odvodit zeměpisný původ a kultivar révy vinné na základě složení mikrobiomu hroznů, a to s vysokou přesností, až 75 % (9 z 12 testovaných vzorků). Čerstvé hrozny révy vinné jsou během sklizně nebo přepravy náchylné na kontaminaci některými houbami, které mohou urychlovat jeho rozklad nebo produkovat mykotoxiny a vyvolávat např. alergie. Tournas *et al.* (2005) analyzovali 251 vzorků čerstvého ovoce zahrnujících plody révy vinné, jahody, borůvky, maliny, ostružiny a některé citrusy. Ovoce zakoupené na trhu povrchově sterilizovali, 14 dní inkubovali bez jakéhokoliv média a následně hodnotili výskyt hub. Procento kontaminovaných vzorků kolísalo v závislosti na druhu ovoce. Nejběžnějšími houbami izolovanými ze vzorků malin, ostružin, borůvek a jahod byly *Botrytis cinerea*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium* a *Fusarium* následované kvasinkami rodu *Trichoderma* a *Aureobasidium*. 35 % testovaných vzorků hroznů bylo kontaminováno houbami *Alternaria*, *Botrytis cinerea* a *Cladosporium*. U plodů citrusů vykazovalo přítomnost hub 83 % vzorků, jednalo se především o rody *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* a *Fusarium*.

V posledních letech je velmi intenzivně studován mikrobiom plodů jabloní, a to zejména v souvislosti s posklizňovými opatřeními a využitím biopesticidů. Posklizňové patogeny totiž způsobují velké ztráty v produkci jablek. Bylo již popsáno více než 90 druhů hub, které způsobují hniloby jablek během skladování (Leibinger *et al.*, 1997); patří mezi ně houba *Pezizula malicorticis*, která způsobuje kruhovou hnědou hnilobu jablek, *Penicillium expansum* způsobující modrou hnilobu jablek a *Botrytis cinerea* (plíseň šedá). Ke kontrole posklizňových patogenů se převážně používají syntetické fungicidy. Nicméně vznik patogenů rezistentních k fungicidům a poptávka veřejnosti po snížení používání pesticidů vedla ke hledání alternativních strategií (Janisiewicz *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1993). Proto bylo rozsáhle studováno použití bakteriálních kmenů nebo kvasinek k potlačení posklizňových patogenů (Janisiewicz *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Roberts, 1990; Roberts, 1994). Společnost Bionext vyvinula slibný antagonistický biokontrolní prostředek NEX0101 obsahující jako aktivní složku kvasinku *Candida oleophila*. Působení těchto kvasinek je založeno na kolonizaci poranění, hlavním cílem NEX0101 je původce modré hniloby jablek *Penicillium expansum* a plíseň šedá způsobená *Botrytis cinerea* (Vorstermans *et al.*, 2007). Účinnost biologických kontrolních agens *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* a *Candida* sp. studovali i Zhou *et al.* (1999) na plodech broskvoní. Zralé plody – broskve byly poraněny a společně inokulovány izoláty *Pseudomonas syringae* a *Pseudomonas fluorescens* nebo izolátem *Candida* sp. v kombinaci s konidiemi *Monilia fructicola* nebo sporangiosporami *Rhizopus stolonifer*. Broskve inokulované *M. fructicola* byly 100% infikovány do 3 dnů. Broskve inokulované *M. fructicola* a *P. syringae* byly infikovány pouze z 5 %. Oproti tomu broskve inokulované *P. fluorescens* nebo *Candida* sp. byly infikovány stejně vážně jako broskve, na které nebyly aplikovány žádné biokontrolní agens. Ve spojených

státech se *Candida oleophila* a *Pseudomonas syringae* běžně používají jako posklizňové fungicidy proti peniciliové hnilobě u jabloní, třešní, hrušní a citrusů už od začátku 90. let, konkrétně jako přípravky Bio-Save 10 a Bio-Save 11 (Leibinger *et al.*, 1997).

Na povrchu plodů jsou přítomny rovněž i nepatogenní houby. Abdelfattah *et al.* (2016) dokonce prokázali, že diverzita houbové mikrobioty u sklizených jablek se v rámci jednotlivých částí plodu liší. Ve vzorcích ze slupek byl dominantní rod *Penicillium*, zatímco ve vzorcích ze stopek a zbytku kalichu převažovaly houby rodu *Alternaria*. *Ascomycota* představovala více než 90 % identifikovaných druhů, *Basidiomycota* 8 % a *Chytridiomycota* 0,1 %.

Kromě řady druhů hub se na povrchu plodů jabloní vyskytují i bakterie. Ottesen *et al.* (2009) uvádějí, že při analýze 16S rDNA z fylosféry plodů jabloní identifikovali kmeny *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Actinobacteria*.

Vedle révy vinné a jaderovin je mikrobiom plodu studován i u peckovin. Pěstování peckovin je v České republice důležitým odvětvím ovocnářství a má dlouholetou tradici, zejména pak pěstování meruněk, broskvoní a slivoní (Polák *et al.*, 2010). Plody peckovin obecně patří k rychle se kazícímu ovoci a jeho doba skladování je často ovlivněna houbovou nebo bakteriální infekcí. Moniliová hniloba ovocných stromů se vyskytuje ve všech oblastech pěstování ovoce na světě. Tato choroba každoročně způsobuje značné ztráty v produkci peckovin. Typické příznaky jsou podobné na všech druzích ovocných stromů, které napadá a zahrnují hnědnutí a usychání květů, hnilobu plodů a nádory. Mezi více než 32 druhy tohoto rodu jsou pro produkci ovoce nejdůležitější *M. laxa*, *M. fructigena* a *M. fructicola* (Poniatowska *et al.*, 2013). V Severní Americe hnědou hnilobu způsobuje hlavně *M. fructicola* a v menší míře potom *M. laxa*, zatímco v Evropě jsou hlavním původci hnědé hniloby *M. fructigena* a *M. laxa* (Côté *et al.*, 2004). Poniatowska *et al.* (2013) získali celkem 670 izolátů *Monilia* spp. z infikovaného ovoce. Byly shromážděny z různých komerčních ovocných sadů peckovin a jabloní v Polsku. Pomocí multiplex PCR se jim podařilo identifikovat 20 izolátů získaných ze švestek, broskví a jablek jako *M. polystroma*, 5 izolátů ze švestek jako *M. fructicola*. Zbývající izoláty byly identifikovány jako *M. fructigena* nebo *M. laxa*.

Dalším omezujícím faktorem pro produkci peckovin je ale podle Ivanové *et al.* (2012) suchá skvrnitost listů peckovin. Primárními patogeny způsobujícími tuto chorobu je bakterie druhu *Xanthomonas pruni* spolu s *Xanthomonas campestris*, ale identické příznaky mohou být způsobeny i houbovým patogenem známým jako *Stigmia carpophila*. U některých druhů *Prunus* sp. (*P. amygdalus*, *P. armeniaca*, *P. avium*, *P. cerasus*, *P. communis*, *P. domestica*, *P. dulcis*, *P. italica*, *P. laurocerasus*, *P. persica*) se mohou typické příznaky jako u suché skvrnitosti listů objevit i po působení jiných faktorů, které způsobují poškození listů, jako je padlí nebo jiné houby, které napadají listy, škůdci, nutriční problémy a poškození v důsledku nepříznivých půdních nebo povětrnostních podmínek. Tyto infekce listů mohou vést až k defoliaci, která během raného vývoje ovoce může způsobit opad nezralých plodů (Ivanová *et al.*, 2012).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Plody meruněk byly zaslány ze sadu ve Velkých Pavlovicích dne 2.7.2018. Jednalo se o zdravé plody bez známek napadení nebo poškození (PM-Zd) a o plody, u kterých se vyskytovaly hnědé skvrny na slupce plodu (PM-2). Zdravé plody bez známek poškození byly analyzovány pracovníky laboratoře. Vzorčky byly uchovávány v -80 °C.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Amresco, kat. č. 0491B70)
- Ampicilin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Duchefa Biochemie, A0104)
- Deionizovaná voda
- Ethidium bromid 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Biotium, kat. č. 40042)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0241)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific kat. č. SM0323)
- Good View Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, kat. č. HGV-2)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 278475)
- IPTG (Promega, kat. č. V3953)
- MyTaq Red DNA polymeráza (Bioline, kat. č. BIO-21107)
- Primery S-D-Bact-0785-a-A-21, S-D-Bact-0008-a-S-16, ITS1, ITS4, M13F a M13R (Generi Biotech)
- SOC médium (Sigma-Aldrich, kat. č. S1797)
- X-Gal (Thermo Scientific, kat. č. #R0404)

Použité soupravy

- Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337455)
- DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, kat. č. 69104)
- MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, kat. č. MS-102-3001)
- pGEM-T Vector system kit (Promega, kat. č. A1360)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 28704)
- Swift Amplicon 16S+ ITS Panel (Biosciences, kat. č. AL-51648)

Použité roztoky a jejich příprava

- 50x TAE pufr (242 g Tris base rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH_2O , přidat 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplnit do 1 000 ml), dále naředěno na 1x.

- LB médium (10 g kaseinového hydrolyzátu, 5 g kvasničného autolyzátu, 5 g peptonu a 10 g NaCl v 1 000 ml deionizované vody).

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Váhy EK 200G (A&D Co. Ltd.)
- Analytické váhy AE 24 Q (Mettler)
- Inkubátor 1500 (Flow Laboratories)
- Dokumentační systém G-Box včetně softwaru GeneSnap (Syngene)
- Elektroforetická komůrka HU10 Mini - Plus Horizontal (Scie - Plas)
- Fluorometr DyNA Quant 200 (Hoefer)
- Genetický analyzátor ABI PRISM 3790 (PE Applied Biosystems, USA)
- Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)
- Chladnička kombinovaná ERB 3445 (Electrolux)
- Keramické kuličky Lysing Matrix M (MP Biomedicals)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Mikrovlnná trouba (OTF)
- Mini centrifuga PrismTM mini (Labnet)
- Mini centrifuga SpectrafugeTM mini - centrifuge (Labnet)
- Hlubokomrazicí box (Scholeller)
- NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Stolní centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- Termoblok Mixing Block MB - 102 (BIOER)
- Termocykler T personal (Biometra)
- Termocykler T100 Thermal Cyclor (BIO RAD)
- UV transiluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Vortex IKA MS2 mini shaker (Gemini BV)
- Výrobník šupinkového ledu Ice Flaker (Brema)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu Power Station 300 (Labnet)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace DNA

Z plodů meruněk uchovávaných při -80 °C byla odříznuta cca 50 mg slupky (blanitý exokarp), na které byly pozorovatelné patologické změny v podobě hnědých skvrn. Izolace DNA byla provedena za použití DNeasy Plant Mini Kit.

Cca 50 mg vzorku bylo homogenizováno ve 2ml zkumavce s přídavkem 400 µl pufru AP1 a 4 µl RNasy A pomocí keramické kuličky o průměru 6,35 mm (Lysing Matrix M, MP Biomedicals) v homogenizátoru FastPrep-24 (MP Biomedicals) po dobu 60 s při 4 m·s⁻¹. Homogenát byl v průběhu 10min inkubace při 65 °C 2-3x zamíchán převrácením. Po inkubaci bylo k homogenátu přidáno 130 µl pufru P3, po promíchání byl vzorek inkubován 5 min na ledu. Lyzát byl centrifugován 5 min při 20 000 g. Následně byl supernatant přepipetován do filtrační kolony umístěné do 2ml sběrné zkumavky a centrifugován 2 min při 20 000 g. Filtrát byl přemístěn do čisté 2 ml zkumavky. Bylo přidáno 1,5 objemu pufru AW1 a roztok byl dobře promíchán pipetováním. 650 µl roztoku bylo přemístěno do DNeasy Mini spin vazebné kolony a do nové 2ml centrifugační zkumavky. Roztok v koloně byl centrifugován 1 min při 6000 g a filtrát byl následně vylit do odpadu. DNeasy mini spin vazebná kolona byla přemístěna do nové 2ml centrifugační zkumavky a bylo přidáno 500 µl AW2 pufru, byla provedena centrifugace 1 min při 6000 g. Roztok, který protekl, byl vylit do odpadu. Na kolonu bylo přidáno 500 µl pufru AW2, a vše bylo centrifugováno 2 min při 20 000 g. DNeasy mini spin vazebná kolona byla přemístěna do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a do ní bylo napipetováno 30 µl deionizované vody přímo na membránu kolony. Proběhla inkubace 5 min při pokojové teplotě a následně byla provedena centrifugace 1 min při 6000 g, při které došlo k uvolnění DNA. Koncentrace izolované DNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop. Izolovaná DNA byla následně uchovávána při -80 °C.

4.4.2 PCR amplifikace taxonomicky významných oblastí bakterií a hub

Pro identifikaci druhů bakterií byly použity V3+V4 variabilní oblasti 16S rDNA a pro identifikaci druhů hub ITS1+ITS2 oblasti.

4.3.1 PCR amplifikace V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA

Pro identifikaci druhů bakterií v poškozeném plodu PM-2 byla provedena amplifikace V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA. K amplifikaci DNA byly použity primery S-D-Bact-0785-a-A-21 a S-D-Bact-0008-a-S-16 (Tabulka 1) (Klindworth *et al.*, 2013).

Tabulka 1: Primery použité pro amplifikaci V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA.

Primer	Sekvence (5' - 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Literatura
S-D-Bact-0008-a-S-16 (F)	AGAGTTTGATCMTGGC	~ 750	Klindworth <i>et al.</i> , 2013
S-D-Bact-0785-a-A-21 (R)	GACTACHVGGGTATCTAATCC		

PCR reakční směs byla připravena smícháním 5 μ l 5x koncentrovaného MyTaq Red Reaction Buffer, 15,8 μ l deionizované vody, 0,5 μ l S-D-Bact-0785-a-A-21 primeru (20 pmol· μ l⁻¹), 0,5 μ l S-D-Bact-0008-a-S-16 primeru (20 pmol· μ l⁻¹), 0,2 μ l MyTaq Red DNA polymerázy (5U· μ l⁻¹). Směs byla promíchána a rozpipetována do 0,2ml PCR mikrozkušavek po 22 μ l. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 3 μ l izolované DNA. Celý postup byl proveden za sterilních podmínek v laminárním boxu na ledu. Mikrozkušavky byly promíchány, stočeny na mikrocetřifuze a následně byly vloženy do termocykléru, kde proběhla PCR reakce, jejíž časový a teplotní profil byl následující:

Tabulka 2: Podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95	5 min	1
PCR amplifikace	94	30 s	35
	55	30 s	
	72	30 s	
Závěrečná elongace	72	5 min	1

4.4.3 PCR amplifikace ITS1 +ITS2 oblastí

Pro identifikaci neznámých druhů hub v poškozeném plodu byla provedena amplifikace ITS1+ITS2 oblastí z izolované DNA. K amplifikaci DNA byly použity primery ITS1 a ITS4 (Tabulka 3) (White *et al.*, 1990).

Tabulka 3: Primery použité pro amplifikaci ITS1+ITS2 oblastí.

Primer	Sekvence (5' - 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Literatura
ITS1 (F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	cca 710-850	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

PCR reakční směs byla připravena smícháním 5 μ l 5x koncentrovaného MyTaq Red Reaction Buffer, 15,8 μ l deionizované vody, 0,5 μ l ITS1 primeru (20 pmol· μ l⁻¹), 0,5 μ l ITS4 primeru

(20 pmol·μl⁻¹) a 0,2 μl MyTaq Red DNA polymerázy (5U·μl⁻¹). Směs byla promíchána a rozpipetována do 0,2ml PCR mikrozkušavek po 22 μl. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 3 μl izolované DNA. Celý postup byl proveden za sterilních podmínek v laminárním boxu na ledu. Mikrozkušavky byly promíchány, stočeny na mikrocentrifuze a následně byly vloženy do termocykléru, kde proběhla PCR reakce, jejíž časový a teplotní profil byl následující:

Tabulka 4: Podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95	5 min	1
PCR amplifikace	94	30 s	35
	52	30 s	
	72	60 s	
Závěrečná elongace	72	7 min	1

4.4.4 Elektroforetická separace PCR produktů

Výsledky PCR byly analyzovány v 1% agarosovém gelu v TAE pufru. Bylo použito 50 ml předem připraveného 1% agarosového gelu, do kterého byly po rozpuštění přidány 2 μl fluorescenčního barviva Good View. Do jamek byly naneseny 2 μl standardu molekulové hmotnosti Gene Ruler 100bp DNA a jednotlivé PCR produkty vždy po 4 μl. Elektroforetická separace probíhala cca 45 min při 80 V. PCR produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru při 302 nm (G:Box, Syngene).

Pro izolaci PCR produktů pomocí QIAquick Gel Extraction Kit byly použit obdobný postup. Elektroforetická separace byla provedena v 75 ml 1% agarosového gelu, do kterého bylo přidáno 5 μl ethidium bromidu (5 mg·ml⁻¹). Do jamek byly naneseny 2 μl standardu molekulové hmotnosti Gene Ruler 100bp DNA a jednotlivé PCR produkty vždy po 10 μl. Elektroforetická separace probíhala cca 45 min při 80 V. PCR produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru při 365 nm.

4.4.5 Izolace PCR produktů z gelu

Izolace PCR produktů z gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (podle QIAquick Spin Handbook 07/2002, QIAGEN, Germany).

Oblasti gelu, kde se nacházely PCR produkty byly z gelu vyřezány pomocí sterilních skalpelů a umístěny do 1,5ml mikrozkušavek. Mikrozkušavky byly zváženy před a po vložení vyřezané části gelu, aby byla zjištěna hmotnost gelu s PCR produktem. Poté byl přidán pufr QG v objemovém poměru 3:1 (např. 3 ml pufru : 1 g gelu). Mikrozkušavky s gelem a s QG pufrem byly inkubovány 10 min při 50 °C v dry-bloku, dokud se gel úplně nerozpustil. Po inkubaci byl k směsi postupně přidán 1 objem isopropanolu a roztok byl přenesen na kolonu, byla provedena

centrifugace 1 min při 15 000 g a roztok, který kolonou protekl, byl vylit do odpadu. Na kolonku bylo napipetováno 500 μ l QG pufru, byla provedena centrifugace 1 min při 15 000 g. Roztok, který kolonou protekl, byl vylit do odpadu. Na kolonu bylo přidáno 750 μ l PE pufru, byla provedena centrifugace 1 min při 15 000 g a roztok, který kolonou protekl, byl vylit do odpadu. Kolonka centrifugována ještě jednou 1 min při 15 000 g, aby došlo k jejímu úplnému vysušení. Takto vysušená kolonka byla umístěna do nové 1,5ml zkumavky. Izolovaná DNA byla z kolonky uvolněna 30 μ l deionizované vody, která byla napipetována přímo na membránu kolony a centrifugována 1 min při 15 000 g.

4.4.6 Klonování PCR produktu

Klonování bylo provedeno pomocí pGEM-T kitu (Promega). Kultivační médium LB bylo připraveno rozpuštěním 10 g kaseinového hydrolyzátu, 5 g kvasničného autolyzátu, 5 g peptonu a 10 g NaCl v 1 000 ml deionizované vody a bylo autoklávováno při 120 °C po dobu 20 min. Před rozlitím do Petriho misek byl k médiu přidán ampicilin (byla 100 μ g·ml⁻¹). Byla připravena ligační směs dle tabulky č. 6 a inkubovaná přes noc při 4 °C.

Tabulka 5: Složení ligační směsi.

Chemikálie	1 reakce
pGEM-T ligační pufr	5 μ l
Ligáza	1 μ l
pGEM-T plazmid	0,5 μ l
PCR produkt	3,5 μ l

Po inkubaci byla ligační směs promíchána s rozmrazenými kompetentními buňkami *E. coli* DH5 α – 50 μ l kompetentních buněk s 20 μ l ligační směsí. Následovala 20min inkubace na ledě. Transformace kompetentních buněk byla provedena teplotním šokem, buňky byly spolu s ligační směsí inkubovány 45 s při 42 °C a poté ihned umístěny na led, kde byly ponechány minimálně 2 min. Ke transformovaným buňkám bylo přidáno 850 μ l SOC média a buňky byly inkubovány 1,5 h na rotační třepačce při teplotě 37 °C. Suspenzní kultura byla sedimentována po dobu 2 min při 5000 g, následně bylo odpipetováno cca 850 μ l supernatantu a sediment byl resuspendován pipetováním v 50 μ l SOC média. Resuspendované buňky byly přeneseny na povrch tuhého LB média, na které bylo předem aplikováno 50 μ l X-Gal (20 mg·ml⁻¹) a 4 μ l IPTG (200 mg·ml⁻¹), a byly rozetřeny bakteriologickou kličkou. Buňky v Petriho miskách byly inkubovány při 37 °C přes noc. Transformované kolonie byly přeočkovány do nových Petriho misek s LB médiem a byly kultivovány přes noc při 37 °C.

4.4.7 Ověření úspěšnosti ligace pomocí PCR reakce

Reakční směs byla připravena smícháním 5 μl 5x koncentrovaného MyTaq Red Reaction pufru, 19,55 μl deionizované vody, 0,125 μl primeru M13F (20 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 0,125 μl primeru M13R (20 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a 0,2 μl MyTaq Red polymerázy (5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Reakční směs byla promíchána a přepipetována do 0,2ml PCR zkumavek po 25 μl . Do zkumavek byly pomocí sterilních párátek z jednotlivých kolonií přeneseny transformované bakterie. Mikrozkušavky byly promíchány, stočeny na mikrocentrifuze a následně byly vloženy do termocykléru, kde proběhla PCR reakce, jejíž časový a teplotní profil byl následující:

Tabulka 6: Podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95	5 min	1
PCR amplifikace	95	30 s	35
	55	30 s	
	72	30 s	
Závěrečná elongace	72	10 min	1

Výsledky PCR amplifikace byly vizualizovány pomocí elektroforetické separace v 1% agarosovém gelu.

4.4.8 Sangerovo sekvenování

Izolace PCR produktů z gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (podle QIAquick Spin Handbook 07/2002, QIAGEN, Germany) obdobně jako v kapitole 4.5.

Vzorky byly značeny pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu podle návodu výrobce. Koncentrace PCR produktů byla změřena pomocí fluorometru. Pro oboustranné sekvenační značení amplifikovaných fragmentů bylo použito cca 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ templátové DNA, 2 μl primeru M13F (1,6 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 2 μl primeru M13R (1,6 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 1 μl BigDye reakční směsi a 1 μl Sequencing pufru. Připravená PCR směs byla rozpipetována po 4 μl do 0,2ml PCR zkumavek a k ní bylo přidáno 6 μl vzorku naředěného na požadovanou koncentraci. Mikrozkušavky byly promíchány, stočeny na mikrocentrifuze a následně byly vloženy do termocykléru, kde proběhla PCR reakce, jejíž časový a teplotní profil byl následující:

Tabulka 7: Podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	96	1 min	1
PCR amplifikace	96	10 s	35
	50	5 s	
	60	4 min	

Sekvenační analýza byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3790 (PE Applied Biosystems, USA) na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR v Olomouci.

4.4.9 NGS

Z plodu meruňky PM-2 uchovávaného při -80 °C bylo odříznuto cca 50 mg slupky, na které byly pozorovatelné patologické změny v podobě hnědých skvrn. Izolace DNA byla provedena za použití DNeasy Plant Mini Kit (viz kapitola 4.2). Koncentrace izolované DNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop. Příprava DNA knihovny, purifikace DNA pomocí magnetických kuliček a indexování bylo provedeno pracovníky laboratoře pomocí Swift Amplicon 16S+ ITS Panel podle pokynů výrobce.

NGS sekvenování bylo provedeno na Ústavu experimentální botaniky AV ČR pomocí přístroje MiSeq Illumina za použití MiSeq Reagent Kit v3 (2 x 300 cyklů).

4.4.10 Bioinformatická analýza sekvencí DNA

Sekvenační výstupy ze Sangerova sekvenování byly složeny do konečné sekvence pomocí programu Seqman (DNASTAR, Lasergene). Složené sekvence byly porovnávány se sekvencemi v databázi NCBI pomocí algoritmu BLAST (BLASTN, www.ncbi.nih.gov/BLAST).

NGS výstupy byly analyzovány pomocí programu Geneious Prime 2020.1.1. U čtení získaných pomocí forward primeru byla provedena kontrola kvality čtení, trimování algoritmem BBduk (default) a filtrování na velikost 140 až 301 nt. Genom hostitele byl odfiltrován namapováním čtení na sekvence HF969271 (*Prunus armeniaca*) a KU535463 (*Citrus tachibana*). Sekvence byly namapovány pomocí programu Geneious (Sensitivity: low, 5 opakování). Nepoužitá čtení byla identifikována pomocí algoritmu BlastN porovnáním s databází UNITE.

5. VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA

Z cca 50 mg slupky (PM-2), na které byly pozorovatelné patologické změny v podobě hnědých skvrn byla izolována DNA. Její koncentrace byla změřena pomocí spektrofotometru a činila 40,89 ng·μl⁻¹, poměr absorbancí 260/280 nm vyjadřující míru znečištění měl hodnotu 1,95.

5.2 Identifikace bakterií a hub pomocí PCR amplifikace V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA a ITS1+ITS2 oblastí a konvenčního sekvenování

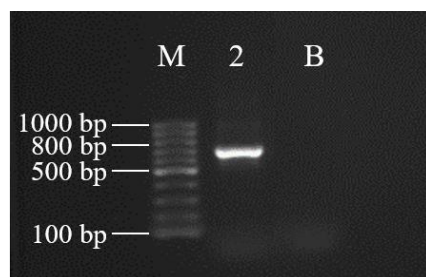
V3+V4 variabilní oblasti 16S rDNA byly amplifikovány pomocí primerů S-D-Bact-0785-a-A-2 a S-D-Bact-0008-a-S-16; ITS1+ITS2 oblasti hub byly amplifikovány pomocí primerů ITS1 a ITS4. Velikost PCR produktů byla stanovena pomocí elektroforetické separace v 1% agarosovém gelu. V3+V4 PCR produkty měly velikost cca 800 bp, ITS1+ITS2 PCR produkty cca 750 bp (Obr. 3, 6; Tab. 8, 9, 10).

Tabulka 8: Očekávané velikosti produktů u použitých primerů.

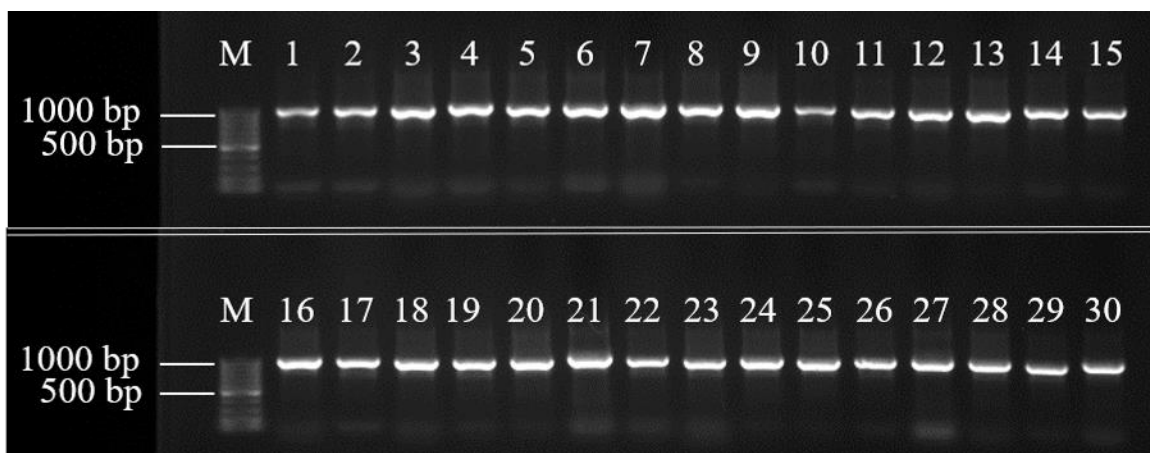
Primery	Délka sekvence [bp]
S-D-Bact-0008-a-S-16 (F)	~ 750
S-D-Bact-0785-a-A-21 (R)	
ITS1 (F)	710–850
ITS4 (R)	
M13F (ITS1+ITS2)	800–900
M13R (ITS1+ITS2)	
M13F (V3+V4)	800–900
M13R (V3+V4)	

5.2.1 Identifikace bakterií pomocí sekvenace variabilních oblastí V3+V4 16S rDNA genu

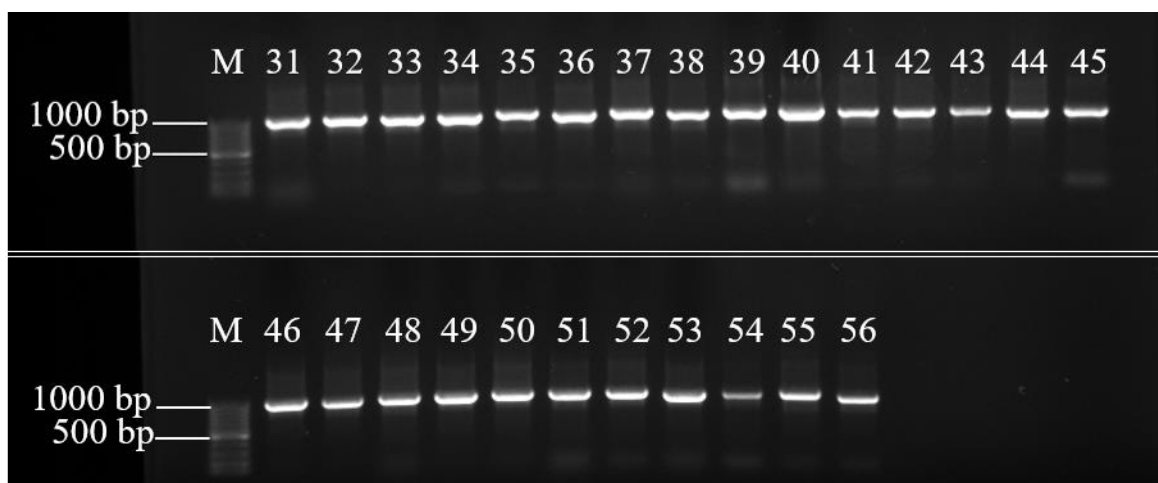
PCR produkty byly úspěšně zaklonovány do plazmidu pGEM-T, který byl transformován tepelným šokem do bakterií *Escherichia coli* kmene DH5α. Úspěšnost ligace byla testována celkem u 56 kolonií, přičemž všechny byly pozitivní na přítomnost ligovaného segmentu o velikosti cca 1 000 bp (Obrázek 4 a 5). Všech 56 pozitivních kolonií bylo označeno pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu a sekvenováno za použití primerů M13F/M13R. Velikost PCR produktů byla 719-796 bp (Tabulka 9).



Obrázek 3: Detekce V3+V4 variabilních oblastí 16S rDNA pomocí primerů S-D-Bact-0785-a-A-21 a S-D-Bact-0008-a-S-6. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; 2 – plod PM-2; B – negativní kontrola.



Obrázek 4: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (V3+V4 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; kolonie: 1–30.



Obrázek 5: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (V3+V4 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; kolonie: 31–56.

Pět sekvencí V3+V4 variabilních oblastí se nepodařilo složit do kontigu z důvodu nedostatečné kvality čtení, nebo z důvodu absence přesahu. Tyto sekvence byly vyřazeny. Zbylé sekvence byly složeny do kontigu a jednotlivé kontigy byly porovnány se sekvencemi v databázi NCBI pomocí algoritmu BLAST.

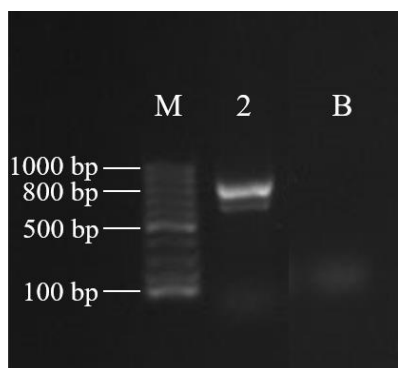
Na základě porovnání sekvencí s databází NCBI, z celkového počtu 48 sekvencí V3+V4 variabilních oblastí mělo 36 sekvencí největší shodu s kompletním genomem chloroplastů nebo mitochondrií u rostlin čeledi *Rosaceae* (*Cotoneaster schantungensis*, *Prunus avium*, *Spiraea martini*, *Phoenix dactylifera*, *Rhamnus taquetia*) s hodnotami pokrytí od 93 % do 100 %, E value 0 a s procentuální identitou od 93,70 % do 100 %. 12 sekvencí vykazovalo největší shodu s genem pro 16S rRNA nekultivovatelných sinic rodu *Trichodesmium* s hodnotami pokrytí od 96 % do 100 %, E value 0 a s procentuální identitou od 99,06 % do 100 % (Příloha 1).

Tabulka 9: Délky kontigů složených ze sekvencí V3+V4 variabilních oblastí.

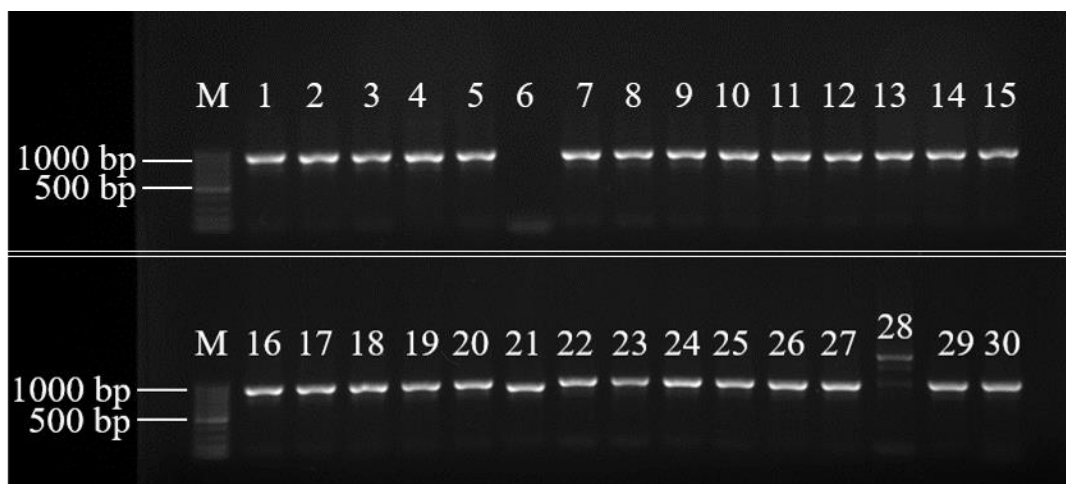
Číslo vzorku	Délka sekvence [bp]	Číslo vzorku	Délka sekvence [bp]
1	732	25	734
2	771	26	772
3	773	27	719
4	731	28	736
5	737	29	739
6	772	30	786
7	738	31	738
8	796	32	781
9	730	33	731
10	730	34	787
11	739	35	779
12	772	36	779
13	773	37	784
14	738	38	749
15	730	39	730
16	731	40	733
17	731	41	732
18	739	42	772
19	730	43	777
20	747	44	780
21	731	45	772
22	727	46	776
23	772	47	737
24	770	48	772

5.2.2 Identifikace hub pomocí sekvenace oblastí ITS1+ITS2

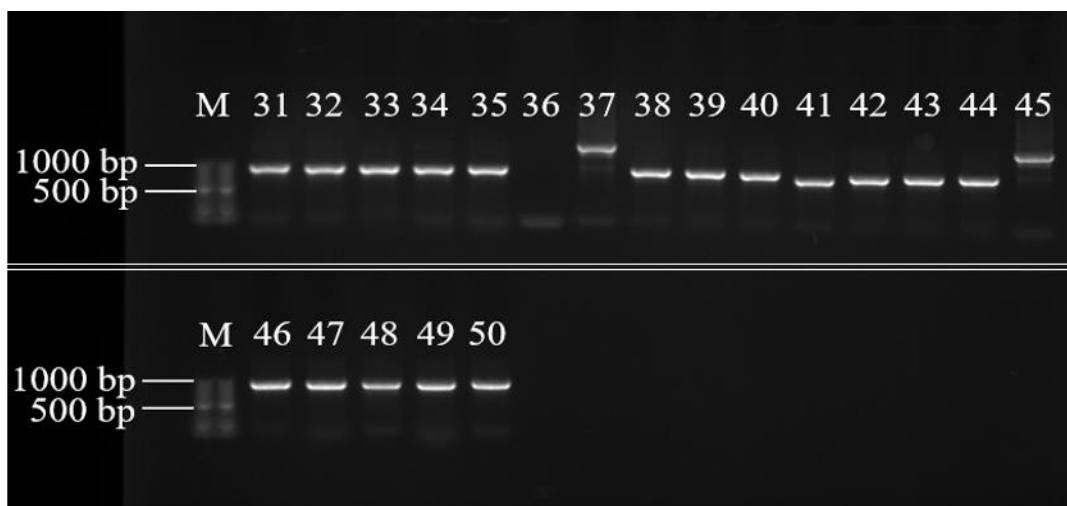
PCR produkty byly úspěšně zaklonovány do plazmidu pGEM-T, který byl transformován tepelným šokem do bakterií *Escherichia coli* kmene DH5 α . Úspěšnost ligace byla testována u 50 kolonií, přičemž 48 jich bylo pozitivních na přítomnost ligovaného segmentu o velikosti cca 1 000 bp (Obrázek 7, 8 a 9). Tyto PCR produkty byly značeny pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu a sekvenovány Sangerovým sekvenováním za použití primerů M13F/M13R. Velikost PCR produktů byla 601-746 bp (Tabulka 10).



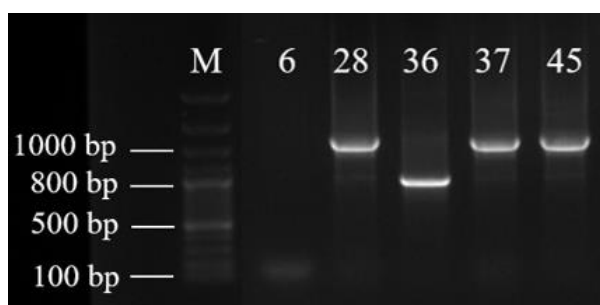
Obrázek 6: Detekce ITS1+ITS2 oblastí hub pomocí primerů ITS1 a ITS4. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; 2 – plod PM-2; B – negativní kontrola.



Obrázek 7: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (ITS1+ITS2 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; kolonie: 1–30.



Obrázek 8: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (ITS1+ITS2 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; kolonie: 31–50.



Obrázek 9: Test úspěšnosti klonování PCR produktů (ITS1+ITS2 oblasti) a jejich amplifikace pomocí primerů M13F/M13R. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti; kolonie: 6–45.

Jednu sekvenci ITS1+ITS2 oblastí se nepodařilo složit do kontigu z důvodu nedostatečné kvality čtení a absence přesahu, proto byla tato sekvence vyřazena z dalších analýz. Zbylé sekvence byly složeny do kontigu a jednotlivé kontigy byly porovnány se sekvencemi v databázi NCBI pomocí algoritmu BLAST.

Všech 47 sekvencí (primery ITS1 a ITS4) vykazovalo největší shodu se sekvencí genu pro ribozomální RNA (rRNA) malé podjednotky ribozómu rostlin rodu *Prunus* (*Prunus sibirica* a *Prunus armeniaca*) s hodnotami pokrytí od 90 % do 100 %, E value 0 a s procentuální identitou od 96,31 % do 100 % (Příloha 2).

Tabulka 10: Délky kontigů složených ze sekvencí ITS1+ITS2 oblastí.

Číslo vzorku	Délka sekvence [bp]	Číslo vzorku	Délka sekvence [bp]
1	682	25	679
2	681	26	683
3	683	27	690
4	681	28	676
5	681	29	682
6	684	30	691
7	676	31	698
8	689	32	681
9	691	33	684
10	682	34	692
11	682	35	687
12	652	36	680
13	680	37	677
14	647	38	601
15	685	39	681
16	680	40	681
17	602	41	683
18	683	42	692
19	610	43	682
20	691	44	681
21	682	45	699
22	703	46	681
23	692	47	746
24	680		

5.3 Identifikace houbových společenstev pomocí Swift Amplicon 16S+ ITS Panel kitu a NGS sekvenování

Pro NGS sekvenování byl vybrán vzorek DNA izolované z poškozeného plodu PM-2. ITS1+ITS2 eukaryotní oblasti byly amplifikovány a použity na přípravu sekvenační knihovny pomocí kitu Swift Amplicon 16S+ ITS Panel. Získané sekvence byly analyzovány pomocí programu Geneious Prime 2020.1.1. Celkem bylo získáno 210 137 sekvencí v párovém čtení. U 210 137 čtení získaných pomocí forward primeru byla provedena kontrola kvality čtení a po trimování algoritmem BBDuk (default) a filtrováním na velikost 140 až 301 nt bylo získáno 148 118 čtení. Následně bylo provedeno odfiltrování genomu hostitele namapováním čtení na 2 sekvence. Na sekvenci HF969271 (*Prunus armeniaca*) bylo namapováno 68 823 a na sekvenci KU535463 (*Citrus tachibana*) byla namapována 1 sekvence. Nepoužitá čtení byla identifikována pomocí algoritmu BlastN porovnáním s databází UNITE. Proti databázi UNITE bylo identifikováno 147 sekvencí vyhovujících parametrům: minimální délka 140 nt, pokrytí (Query coverage)

97–100 %, pairwise identity 95–100 % (Tabulka 11, 12, Graf 1A, Graf 2A a Příloha 3). Identifikované skupiny hub a jejich četnost byly porovnány s údaji získanými ze zdravého plodu meruňky (PM-Zd), které mi byly poskytnuty pracovníky laboratoře (Tabulka 11, 12, Graf 1B, Graf 2B a Příloha 4).

Tabulka 11: Rody hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém PM-Zd plodu (B).

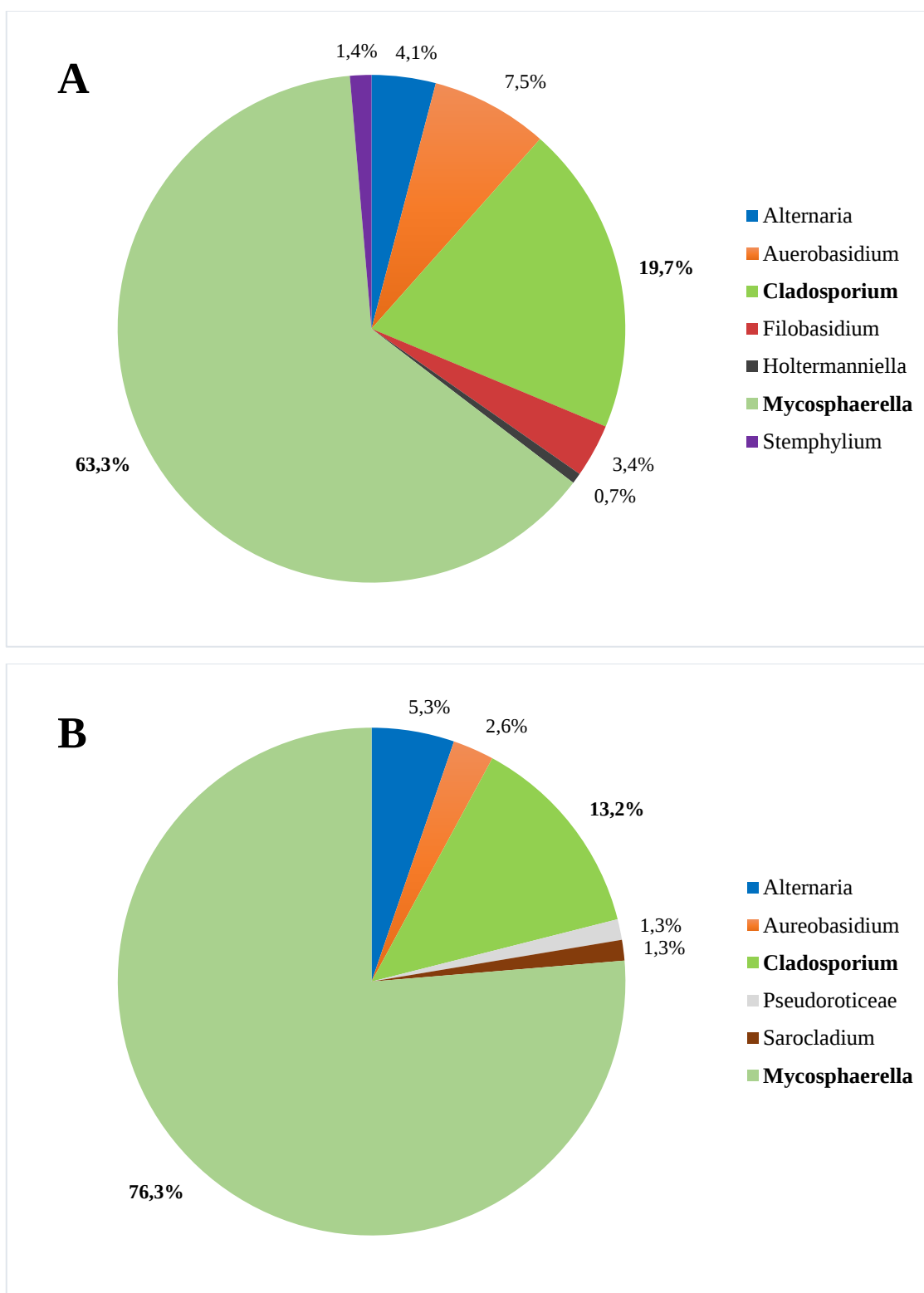
Rod	A		B	
	Počet	Výskyt [%]	Počet	Výskyt [%]
<i>Alternaria</i>	6	4,1 %	4	5,3 %
<i>Auerobasidium</i>	11	7,5 %	2	2,6 %
<i>Cladosporium</i>	29	19,7 %	10	13,2 %
<i>Filobasidium</i>	5	3,4 %	0	0,0 %
<i>Holtermanniella</i>	1	0,7 %	0	0,0 %
<i>Mycosphaerella</i>	93	63,3 %	58	76,3 %
<i>Pseudoroticeae</i>	0	0,0 %	1	1,3 %
<i>Sarocladium</i>	0	0,0 %	1	1,3 %
<i>Stemphylium</i>	2	1,4 %	0	0,0 %

Nejvíce zastoupené rody jsou zvýrazněny tučně.

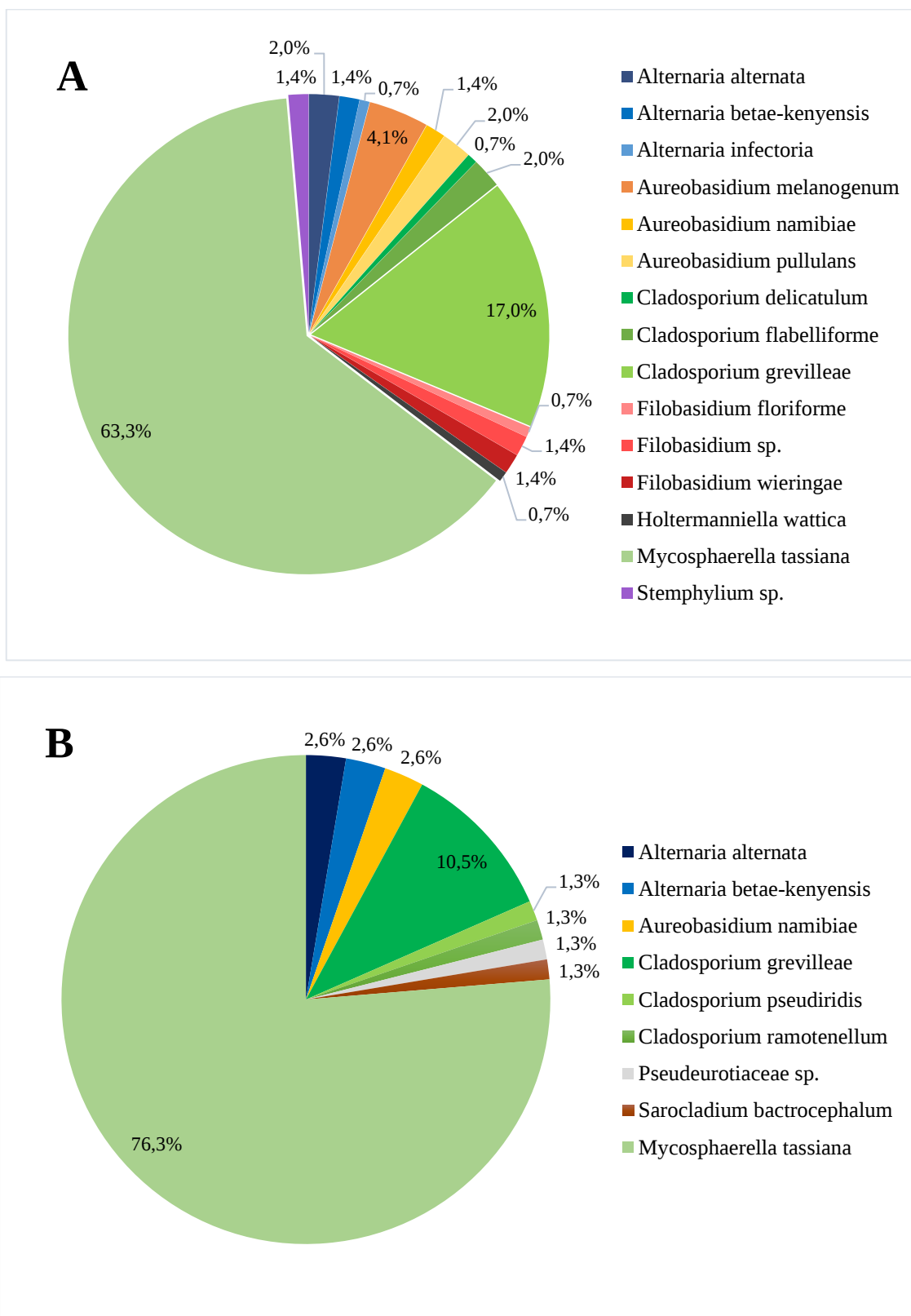
Tabulka 12: Druhy hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém PM-Zd plodu (B).

Druh	A		B	
	Počet	Výskyt [%]	Počet	Výskyt [%]
<i>Alternaria alternata</i>	3	2,0 %	2	2,6 %
<i>Alternaria betae-kenyensis</i>	2	1,4 %	2	2,6 %
<i>Alternaria infectoria</i>	1	0,7 %	0	0,0 %
<i>Aureobasidium namibiae</i>	2	1,4 %	2	2,6 %
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	6	4,1 %	0	0,0 %
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3	2,0 %	0	0,0 %
<i>Cladosporium grevilleae</i>	25	17,0 %	8	10,5 %
<i>Cladosporium delicatulum</i>	1	0,7 %	0	0,0 %
<i>Cladosporium flabelliforme</i>	3	2,0 %	0	0,0 %
<i>Cladosporium pseudiridis</i>	0	0,0 %	1	1,3 %
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	0	0,0 %	1	1,3 %
<i>Filobasidium floriforme</i>	1	0,7 %	0	0,0 %
<i>Filobasidium</i> sp.	2	1,4 %	0	0,0 %
<i>Filobasidium wieringae</i>	2	1,4 %	0	0,0 %
<i>Holtermanniella wattica</i>	1	0,7 %	0	0,0 %
<i>Mycosphaerella tassiana</i>	93	63,3 %	58	76,3 %
<i>Pseudeurotiaceae</i> sp.	0	0,0 %	1	1,3 %
<i>Sarocladium bactrocephalum</i>	0	0,0 %	1	1,3 %
<i>Stemphylium</i> sp.	2	1,4 %	0	0,0 %

Nejvíce zastoupené druhy jsou zvýrazněny tučně.



Graf 1: Rody hub identifikované v poškodeném PM-2 (A) a zdravém plodu PM-Zd (B).



Graf 2: Druhy hub identifikované v poškozeném PM-2 (A) a zdravém plodu PM-Zd (B).

V poškozeném pletivu blanitého exokarpu bylo detekováno celkem 7 rodů hub: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Mycosphaerella* a *Stemphylium*, které byly reprezentovány 13 druhy. V pletivu blanitého exokarpu zdravého plodu bylo detekováno 6 rodů hub: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Pseudoroticeae* a *Sarocladium*, které byly reprezentovány 8 druhy.

Nejvíce zastoupené jsou v obou případech, tj. poškozený plod PM-2 a zdravý plod PM-Zd, rody *Mycosphaerella* a *Cladosporium*, přičemž četnost zachycených sekvencí zástupců r. *Mycosphaerella* je 1,6x vyšší u plodu meruňky s hnědou skvrnou (PM-2) než u zdravého plodu (PM-Zd); v případě zástupců r. *Cladosporium* 2,9x vyšší. Rod *Mycosphaerella* byl u poškozeného i zdravého plodu zastoupen jediným druhem, a to *Mycosphaerella tassiana* (PM-2: 93 sekvencí, tj. 63,3 % z celkového počtu sekvencí; PM-Zd: 58, 76,3 %).

U druhého nejvíce zastoupeného rodu *Cladosporium* (PM-2: 29 sekvencí, 19,7 %; PM-Zd: 10, 13,2 %) bylo detekováno 5 druhů, přičemž nejvíce byl zastoupen druh *C. grevilleae* (PM-2: 25, 17 %; PM-Zd: 8, 10,5 %). Zbývající druhy byly zachyceny jen ojediněle; u poškozeného plodu byly detekovány druhy *C. delicatulum* (1, 0,7 %) a *C. flabelliforme* (3, 2 %), u zdravého plodu druhy *C. pseudiridis* (1; 1,3 %) a *C. ramotenellum* (1, 1,3 %).

Méně zastoupené jsou v obou případech rody *Aureobasidium* (PM-2: 11 sekvencí; 7,5 %; PM-Zd: 2; 2,6 %) a *Alternaria* (PM-2: 6; 4,1 %; PM-Zd: 4; 5,3 %). Rod *Aureobasidium* je zastoupen druhem *A. pullulans* (PM-2: 11; 7,5 %; PM-Zd: 2; 2,6). Rod *Alternaria* je pak zastoupen 3 druhy, a to *A. alternata* (PM-2: 3; 2 %; PM-Zd: 2; 2,6 %), *A. betae-kenyensis* (PM-2: 2; 1,4 %; PM-Zd: 2; 2,6 %) a *A. infectoria*, která se vyskytovala pouze u plodu meruňky a hnědou skvrnou PM-2 (PM-2: 1; 0,7 %; PM-Zd: 0; 0 %).

Pouze u plodu meruňky s hnědou skvrnou (PM-2) byli nalezeni zástupci rodu *Filobasidium* (PM-2: 5 sekvencí; 3,4 %): *F. floriforme* (PM-2: 1; 0,7 %), *F. sp.* (PM-2: 2; 1,4 %) a *F. wieringae* (PM-2: 2; 1,4 %).

Zbylé rody byly zachyceny pouze ojediněle, v případě plodu meruňky s hnědou skvrnou se jednalo o rody *Holtermanniella*, která byla zastoupena jediným druhem: *H. wattica* (1 sekvence, 0,7 %) a r. *Stemphylium*, který byl rovněž zastoupen jedním druhem: *Stemphylium sp.* (2, 1,4 %). U zdravého plodu se sporadicky vyskytovaly rody *Pseudoroticeae* (1, 1,3 %) a r. *Sarocladium*, zastoupený druhem *S. bactrocephalum* (1, 1,3 %).

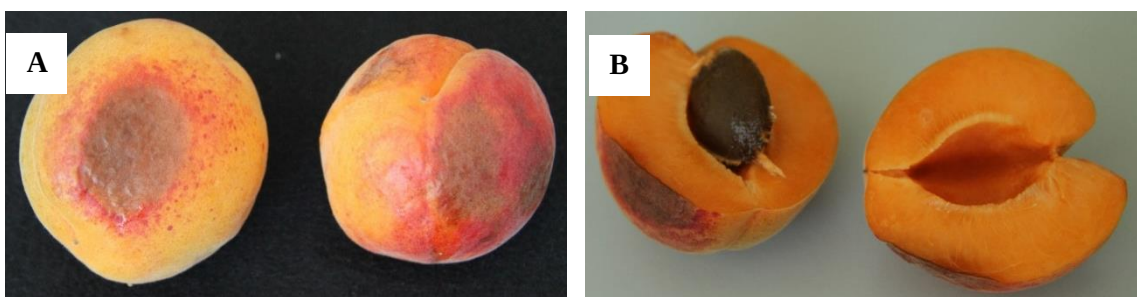
6. DISKUZE

Cílem práce bylo identifikovat patogenní mikroorganismy, které se mohly podílet na poškození povrchu plodu (blanitý exokarp) meruňky, kde vznikla hnědá skvrna (Obrázek 10A, 10B). Pro jejich identifikaci byly použity dva přístupy: konvenční přístup a sekvenování nové generace.

Pomocí konvenčního přístupu, který nám umožňuje analyzovat pouze cca 50 sekvencí se nepodařilo detekovat žádný fytopatogenní mikroorganismus. Podíl sekvencí fytopatogenních mikroorganismů byl příliš malý vzhledem k amplifikovaným sekvencím 16S rDNA chloroplastů a ITS oblastí hostitelské buňky.

Naproti tomu, pomocí NGS bylo získáno a analyzováno cca 200 000 sekvencí, ve kterých bylo detekováno 147 sekvencí reprezentujících 7 rodů hub. Sekvence hub tedy tvořily cca 0,073 % všech sekvencí. V případě konvenčního přístupu založeném na PCR amplifikaci, klonování PCR produktů a sekvenování dle Sangera bychom měli být schopni v 50 získaných sekvencích nalézt jen 0,036 sekvencí hub, což neumožňuje houbám specifické sekvence detekovat. Pravděpodobnost výskytu sekvencí mikroorganismů v cca 50 analyzovaných sekvencích je tedy mnohem menší, než pravděpodobnost jejich výskytu v cca 200 000 sekvencích, které byly získány pomocí sekvenování nové generace.

Použité univerzální primery amplifikovaly prokaryotní 16S rDNA a ITS variabilní oblasti eukaryotní DNA, které se rovněž vyskytují v chloroplastech a mitochondriích buněk hostitelské rostliny. Za předpokladu, že mikroorganismy by mohly být přítomny i v buňkách blanitého exokarpu, byl pro izolaci DNA použit blanitý exokarp a přilehlá pletiva, to ale způsobilo kontaminaci DNA hostitelské rostliny. Kontaminaci DNA z hostitelské rostliny je možné zabránit odběrem bakterií a hub (spor, hyf) z povrchu plodu v ultrazvukové lázni (<https://patentimages.storage.googleapis.com/3e/13/a1/91748f9c3cbad8/US20100255573A1.pdf>).



Obrázek 10: A–Plod meruňky s hnědou skvrnou PM-2; B–Řez plodem meruňky s hnědou skvrnou PM-2 (foto Šafářová).



Obrázek 11: Sluneční úžeh na plodech meruňky (zdroj: <https://izahradkar.cz/zahrada/ochrana-rostlin/choroby/rostliny-poskozuje-slunce-svetlo-vysoke-teploty/>).

Nejpočetnějším druhem u obou vzorků (PM-2, PM-Zd) je *Mycosphaerella tassiana*. Zástupci komplexu *Mycosphaerella* jsou ekologicky vysoce adaptabilní a patří mezi nejběžnější patogeny rostlin, u kterých způsobují řadu onemocnění, které negativně ovlivňují pěstování řady hospodářsky významných plodin. Podle Braun *et al.* (2003) se *Mycosphaerella tassiana* může běžně vyskytovat bez jakýchkoliv příznaků na plodech třešní a meruněk. Crous *et al.* (2011) však uvádějí, že infekce houbami rodu *Mycosphaerella* se často projevuje tvorbou nekrotických skvrn na povrchu plodů ovocných dřevin, ale také nádorů. *M. citri* způsobuje skvrny na listech citrusů (Pretorius *et al.*, 2003), *M. ambiphylla* a *M. cryptica* jsou zodpovědné za skvrny na listech a kmenech eukalyptu (Cortinas *et al.*, 2006) a *M. graminicola* napadá pšenici, kde na listech vytváří čárkovité červené až hnědé skvrny ohraničené žilnatinou, na klasech se projevuje hnědofialovými skvrnami, které se od špiček plev postupně rozšiřují (Goodwin *et al.*, 2001). Druhým nejčastějším druhem bylo *Cladosporium grevilleae*. *Cladosporium* je jedním z největších a nejrozmanitějších rodů třídy *Hyphomycetes*. Vyskytuje se v rozmanitých podmínkách od půdy, po rostliny, v potravinách, barvách, textiliích a vzduchu. Velký význam má rod *Cladosporium* při skladování ovoce a obilovin. Znehodnocuje totiž kontaminované plody skladované při nízkých teplotách a také vyvolává škody na obilovinách, jako jsou ječmen, oves, žito a pšenice (Mousa, 2017). Ztráty způsobené těmito houbami na skladovaných jablkách jsou velké, přestože nevyvolávají přímé poškození plodů, ale zhoršují jeho vzhled, kvalitu a prodejní hodnotu. Na kontaminovaných plodech se vytváří mělké hnilobné okrsky nebo tmavě šedé sazovité povlaky (Ruehle, 1930). Současný výzkum se zabývá vztahem mezi kadeřavkou švestkovou (*Taphrina pruni*), která způsobuje puchrovitost švestek a houbou *Cladosporium delicatulum*. Amanuel Baharvandi *et al.* (2015) prokázali, že *C. delicatulum* je destruktivní parazit *T. pruni*, momentálně se studuje možné využití *C. delicatulum* pro biologickou kontrolu *T. pruni*. Někteří zástupci rodu *Cladosporium* patří mezi mykoparazity. Konkrétně *C. gallicola* a *C. uredinicla* parazitují na rzi a padlí, těchto vlastností se u nich využívá při biologické kontrole. Přestože druhy *Cladosporium* nejsou uváděny jako producenti mykotoxinů, mohou ohrožovat zdraví lidí, a to zejména u pacientů se závažným astmatem, u kterých způsobují plísňové alergie (Segers *et al.*, 2015).

Rod *Alternaria* zahrnuje přibližně 280 druhů (Gannibal, 2016). *Alternaria alternata*, která se vyskytovala v obou vzorcích je známá jako původce skvrnitosti listů u více než 100 hostitelských druhů rostlin, ale také jako původce posklizňových chorob, např. hniloby jablek. Mimo jiné vyvolává i infekce horních cest dýchacích u lidí (Woudenberg *et al.*, 2015). Jako první o *A. alternata* jakožto původci chorob broskví v Japonsku informovali Inoue *et Nasu* (2000), kteří pozorovali hnědé až černé skvrny na plodech, větvičkách a listech. Houba se vyskytuje běžně v prostředí jabloňových a hrušňových sadů, kde dochází k napadení poraněného nebo poškozeného ovoce. Na plodech se objevují okrouhlé hnědé až černé skvrny, mírně propadlé se suchým a lesklým povrchem (Ostrý, 2008).

Některé druhy hub r. *Alternaria* produkují mykotoxiny, jako např. kyselinu teniazonovou, alternariol, alternariol-monomethylether a altenuen, které mají hematotoxické, genotoxické a mutagenní účinky. Nejvýznamnějším producentem alternariových mykotoxinů je *Alternaria alternata*, jejíž mykotoxiny kontaminují různé kulturní rostliny a potraviny. Prostřednictvím vzdušného přenosu spor kontaminuje zejména obiloviny, jablka a rajčata (Ramires *et al.*, 2018). Produkované mykotoxiny jsou toxické pro teplokrevné živočichy. Halaby *et al.*, (2001) zdokumentovali případ houbové infekce způsobené druhem *Alternaria infectoria*, která u příjemce transplantované ledviny zapříčinila vznik plicních infiltrátů a kožních lézí.

Zástupci rodu *Aureobasidium* se vyskytují převážně v půdě, včetně antarktických půd, ve vodě nebo ve dřevě (Chi *et al.*, 2009). Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je *Aureobasidium pullulans* – druh známý zejména svým biotechnologickým významem jako producent biologicky rozložitelného extracelulárního polysacharidu pullulanu (poly- α -1-6-maltotriosa), který se hojně využívá v medicíně, potravinářském průmyslu a dalších oborech (Zalar *et al.*, 2008). Některé kmeny *A. pullulans* se používají k výrobě cyklického peptidu, aureobasidinu A, který má specifickou antifungální aktivitu a využívá se tak jako biofungicidní prostředek v zemědělství (Gostinčar *et al.*, 2014). Velký význam v biotechnologii má i využití *A. pullulans* pro výrobu amyláz, celuláz, lipáz a jiných enzymů (Chi *et al.*, 2009). U kojenců byla hlášena invazivní infekce *A. pullulans*, která v extrémních případech končila smrtí (Hawkes *et al.*, 2005).

Rody *Filobasidium*, *Holtermanniella* a *Stemphylium* se vyskytovaly pouze u vzorku se skvrnami. Zástupci rodu *Filobasidium* patří k hlavním rodům dosud identifikovaných hub v antarktických stanovištích, obecně byly studie rozmanitosti hub v antarktickém prostředí prováděny hlavně za použití vzorků půdy, vody, ledu, sněhu, mořských sedimentů, permafrostu aj. (Ferreira *et al.*, 2019). Mimo Antarktidu je možné setkat se s houbami rodu *Filobasidium* např. při čištění odpadních vod z vinařství (Santos *et al.*, 2014).

Holtermanniella wattica je v současnosti intenzivně studována, konkrétně její schopnost akumulovat lipidy, čehož se hojně využívá při získávání oleochemických produktů jako jsou biopaliva nebo produkty pro chemický průmysl (Filippucci *et al.*, 2016).

Rod *Stemphylium* je zodpovědný za choroby cukrové řepy (Woudenberg *et al.*, 2017), luštěnin,

cibule, chřestu, petržele aj. Jednotlivé kmeny produkují širokou škálu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé pravděpodobně hrají roli během infekce hostitelské rostliny. Tyto metabolity mají biologické aktivity, jako jsou cytotoxické a antibakteriální účinky, které by v budoucnu mohly být využity ve farmaceutickém průmyslu (Olsen *et al.*, 2018).

Rody *Pseudeuroticeae* a *Sarocladium* se vyskytovaly pouze u vzorku plodu bez známek poškození. Rod *Sarocladium* v současné době zahrnuje 10 druhů. Ekonomicky nejvýznamnějším druhem je *S. oryzae*, který způsobuje hnilobu rýže a produkuje antimikrobiální metabolity kyselinu helvolovou a cerulenin. Jediným mykoparazitickým druhem rodu *Sarocladium* je *S. mycophilum* (Giraldo *et al.*, 2015).

Z výsledků vyplývá, že žádná z detekovaných hub pravděpodobně není příčinou primárního poškození plodů meruněk. Hnědé skvrny viditelné na povrchu plodů jsou identické se skvrnami, které byly způsobeny slunečním úžehem (Obrázek 10, 11).

Vysoké zastoupení rodu *Mycosphaerella* na povrchu plodů je možné odůvodnit tím, že se tyto houby na meruňkách běžně bezpříznakově vyskytují. Druhý nejpočetnější rod *Cladosporium* a rod *Alternaria* se často pouze uchycují na povrchu zdravých plodů rostlin na cukerných látkách vylučovaných savým hmyzem. Vyšší zastoupení obou fytopatogenních hub na poškozeném pletivu souvisí s tím, že poškození vytváří lepší prostředí pro záchyt a růst houbových patogenů.

7. ZÁVĚR

V rámci své bakalářské práce jsem vypracovala literární rešerši na téma 'Bakteriální a houbová společenstva na povrchu ovoce'. V experimentální části jsem se zabývala izolací DNA ze vzorku plodu meruňky a jejím sekvenováním za účelem zjištění příčin vzniku hnědých skvrn na povrchu plodů meruněk a detekcí patogenních mikroorganismů, které mohly poškodit exokarp plodu a způsobit tak vznik hnědých skvrn na ovoci. Použila jsem dva přístupy: konvenční přístup a sekvenování nové generace.

- Konvenční přístup je pro tento typ studií nevhodný, pomocí tohoto přístupu nebyly detekovány žádné mikroorganismy, protože jejich podíl ve vzorku byl příliš malý. Ve vzorku převažovala DNA hostitelské rostliny, která byla amplifikovaná pomocí použitých primerů. Primery S-D-Bact-0785-a-A-21 a S-D-Bact-0008-a-S-16 amplifikují V3+V4 variabilní oblasti prokaryotní 16S rDNA a primery ITS1, ITS4 amplifikují ITS1+ITS2 variabilní oblasti eukaryotní DNA, které se vyskytují i v DNA chloroplastů a mitochondrií hostitelské rostliny, která byla ve vzorku přítomna ve velkém množství.
- Sekvenování nové generace umožnilo analýzu cca 200 000 sekvencí získaných z poškozeného pletiva blanitého exokarpu, v rámci kterých se podařilo identifikovat 7 rodů hub: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Mycosphaerella* a *Stemphylium*, které byly reprezentovány 13 druhy.
- V pletivu blanitého exokarpu zdravého plodu bylo pracovníky laboratoře detekováno 6 rodů hub: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Pseudoroticeae* a *Sarocladium*, které byly reprezentovány 8 druhy.
- V poškozeném pletivu bylo zaznamenáno vyšší zastoupení rodů *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Mycosphaerella* a *Stemphylium* než v pletivu zdravého plodu.
- Nebyl prokázán přímý vliv přítomných mikroorganismů na poškození plodů meruněk.

Za účelem eliminace kontaminace DNA z hostitelské rostliny by v budoucnu měl být odběr mikroorganismů z povrchu plodu prováděn pomocí ultrazvukové lázně.

Pro detekci většího množství mikroorganismů by bylo možné upravit podmínky trimování a zvýšit hloubku čtení, např. provést čtení až 2 mil. sekvencí.

Z výsledků vyplývá, že primární poškození plodů meruněk v podobě hnědých skvrn bylo pravděpodobně způsobeno slunečním úžehem bez účasti houbových patogenů. Vliv detekovaných houbových patogenů na poškození plodů meruňky je potřeba potvrdit biologickým testem.

8. LITERATURA

- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S., Schena, L. (2016): Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research* 3: 16047.
- Aleklett, K., Hart, M., Shade, A. (2014): The microbial ecology of flowers: An emerging frontier in phyllosphere research¹. *Botany* 92: 253–266.
- Ali, M.A., Naveed, M., Mustafa, A., Abbas, A. (2017): The good, the bad, and the ugly of rhizosphere microbiome. In *Probiotics and Plant Health* pp. 253–290.
- Amanelah Baharvandi, H., Zafari, D. (2015): Identification of *Cladosporium delicatulum* as a mycoparasite of *Taphrina pruni*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48: 688–697.
- Arnold, A.E. (2007): Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51–66.
- Ashorpour, M., Kazempour, M.N., Ramezanie, M. (2008): Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* the causal agent of bacterial canker on olives (*Olea europaea*) in Iran. *ScienceAsia* 34: 323–326.
- Augé, R.M., Duan, X., Ebel, R.C., Stodola, A.J.W. (1994): Nonhydraulic signalling of soil drying in mycorrhizal maize. *Planta* 193: 74–82.
- Badri, D. V., Vivanco, J.M. (2009): Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* 32: 666–681.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G. (2006): The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–266.
- Batt, C.A. (2016): Microorganism. Reference Module in Food Science, Elsevier: 8–9.
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann et al. (2013): Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 914–919.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005): The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 7: 1673–1685.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., Smalla, K. (2014): Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 5: 1–8.
- Beule, A.G. (2018): The Microbiome - The unscheduled parameter for future therapies. *Laryngo- rhinologie* 97: 279–S311.
- Bing, L.A., Lewis, L.C. (1991): Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology* 20: 1207–1211.
- Braun, U., Crous, P.W., Dugan, F., Groenewald, J.Z. (Ewald), Sybren De Hoog, G. (2003): Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress* 2: 3–18.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen (2013): Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807–838.
- Burns, K.N., Kluepfel, D.A., Strauss, S.L. (2015): Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry* 91: 232–247.
- Busby, P.E., Ridout, M., Newcombe, G. (2016): Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology* 90: 645–655.

- Carrión, V.J., Cordovez, V., Tyc (2018): Involvement of Burkholderiaceae and sulfurous volatiles in disease-suppressive soils. *ISME Journal* 12: 2307–2321.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., Zhang, T. (2009): Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 793–804.
- Cooke, D.E.L., Schena, L., Cacciola, S.O. (2007): Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology* 89: 13–28.
- Cortinas, M.N., Crous, P.W., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2006): Multi-gene phylogenies and phenotypic characters distinguish two species within the *Colletogloeopsis zuluensis* complex associated with *Eucalyptus* stem cankers. *Studies in Mycology* 55: 133–146.
- Costacurta, A., Vanderleyden, J. (1995): Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 21: 1–18.
- Côté, M.J., Tardif, M.C., Meldrum, A.J. (2004): Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* 88: 1219–1225.
- Critzer, F.J., Doyle, M.P. (2010): Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 125–130.
- Crous, P.W., Tanaka, K., Summerell, B.A., Groenewald, J.Z. (2011): Additions to the *Mycosphaerella* complex. *IMA Fungus* 2: 49–64.
- Daniel, R. (2005): The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3: 470–478.
- Durán, P., Tortella, G., Viscardi, S. (2018): Microbial community composition in take-All suppressive soils. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–15.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C. (2015): Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 911–920.
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S. (2008): High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology* 10: 1–9.
- Eichmeier, A., Kiss, T., Necas, T. (2019): High-throughput sequencing analysis of the bacterial community in stone fruit phloem tissues infected by “*Candidatus Phytoplasma prunorum*”. *Microbial Ecology* 77: 664–675.
- Enya, J., Shinohara, H., Yoshida, S. (2007): Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microbial Ecology* 53: 524–536.
- Expósito, R.G., de Bruijn, I., Postma, J., Raaijmakers, J.M. (2017): Current insights into the role of Rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology* 8: 1–12.
- Fakruddin, M. (2015): Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Microbes in Soil and Their Agricultural Prospects* 42: 123–151.
- Ferreira, E.M.S., de Sousa, F.M.P., Rosa, L.H., Pimenta, R.S. (2019): Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles* 23: 151–159.
- Fierer, N. (2017): Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 15: 579–590.
- Filippucci, S., Tasselli, G., Scardua, A. (2016): Study of *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia adeliensis*, *Solicoccozyma aerea*, and *Solicoccozyma terricola* for their lipogenic aptitude from different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels* 9: 1–14.

- Fisher, P.J., Petrini, O. (1992): Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 120: 137–143.
- Flamm, H. (2011): Der österreichische pädiater Theodor Escherich als bakteriologe und sozialhygieniker: Zur 100. Wiederkehr seines Todestages am 15. Feber 1911. *Wiener Klinische Wochenschrift* 123: 157–171.
- Gange, A.C., West, H.M. (1994): Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and foliar-feeding insects in *Plantago lanceolata* L. *New Phytologist* 128: 79–87.
- Gannibal, P.B. (2016): Distribution of *Alternaria* species among sections. 2. Section *Alternaria*. *Mycotaxon* 130: 941–949.
- Genin, S. (2010): Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187: 920–928.
- Gilbert, J.A., Dupont, C.L. (2011): Microbial metagenomics: Beyond the genome. *Annual Review of Marine Science* 3: 347–371.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. (1990): Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60–63.
- Giraldo, A., Gené, J., Sutton, D.A. (2015): Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 34: 10–24.
- Glawe, D.A. (2008): The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46: 27–51.
- Goodwin, S.B., Zismann, V.L. (2001): Phylogenetic analyses of the ITS region of ribosomal DNA reveal that *Septoria passerinii* from barley is closely related to the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* 93: 934–946.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D. (2006): Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113: 17–35.
- Gostinčar, C., Ohm, R.A., Kogej, T. (2014): Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: Biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics* 15: 549.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M. (2002): Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78: 79–97.
- Granado, J., Thürig, B., Kieffer, E. (2008): Culturable fungi of stored 'golden delicious' apple fruits: A one-season comparison study of organic and integrated production systems in Switzerland. *Microbial Ecology* 56: 720–732.
- Grayer, R.J., Kokubun, T. (2001): Plant-fungal interactions: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56: 253–263.
- Guilbaud, C., Morris, C.E., Barakat, M., Ortet, P., Berge, O. (2016): Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiology Ecology* 92:146.
- Halaby, T., Boots, H., Vermeulen, A. (2001): Phaeohyphomycosis caused by *Alternaria infectoria* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1952–1955.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee (1997): Bacterial endophytes in agricultural crops. *NRC Canada Can. J. Microbiol* 43: 895–914.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G. (2015): The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 293–320.
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M. (2008): Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312: 7–14.

- Hattlrich, M.J. (1989): Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Disease* 73: 784.
- Hawkes, M., Rennie, R., Sand, C., Vaudry, W. (2005): *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 51: 209–213.
- Heaton, J.C., Jones, K. (2008): Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: A review. *Journal of Applied Microbiology* 104: 613–626.
- Herman P. Spaink, Douglas M. Sheeley, Anton A. N. van Brussel (1991): A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 56–58.
- Hugenholtz, P., Pace, N.R. (1996): Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology* 14: 190–197.
- Inoue, K., Nasu, H. (2000): Black spot of peach caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Journal of General Plant Pathology* 66: 18–22.
- Ivanová, H., Kaločiová, M., Bolvanský, M. (2012): Shot-hole disease on *Prunus persica* - the morphology and biology of *Stigmata carpophila*. *Folia Oecologica* 39: 21–27.
- Izadiyan, M., Taghavi, S.M. (2017): Diversity of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Journal of Plant Pathology* 99: 487–491.
- Janisiewicz, W.J., Peterson, D.L., Bors, R. (1994): Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease* 78: 466–470.
- Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B., Reineke, A. (2016): Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes? *PLoS ONE* 11: 1–23.
- Kim, D.S., Cook, R.J., Weller, D.M. (1997): *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551–558.
- Klerks, M.M., Franz, E., Van Gent-Pelzer, M. (2007): Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *ISME Journal* 1: 620–631.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T. (2013): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41: 1–11.
- Koh, H.S., Kim, G.H., Lee (2014): Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea and a multiplex PCR assay for haplotype differentiation. *Plant Pathology Journal* 30: 96–101.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D. (2001): Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 248–254.
- Leff, J.W., Fierer, N. (2013): Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PLoS ONE* 8: 1–9.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. (1997): Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103–1110.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C. (1990): Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781–784.
- Liao, C.H., Fett, W.F. (2001): Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection* 64: 1110–1115.

- Lindow, S.E., Leveau, J.H.J. (2002): Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 238–243.
- Lopez-Velasco, G., Welbaum, G.E., Boyer, R.R., Mane, S.P., Ponder, M.A. (2011): Changes in spinach phyloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1203–1214.
- Madigan et al. (2000): *Brock biology of microorganisms*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. 991 pp
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S. (2012): Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 614–629.
- Marendiak, D., S. Leitgeb et Kopčanová, L. *Poľnohospodárska mikrobiológia*. Bratislava: Príroda, 1987.
- Marchesi, J.R., Ravel, J. (2015): The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3: 1–3.
- Mellersh, D.G., Foulds, I. V., Higgins, V.J. (2002): H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant Journal* 29: 257–268.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. (2013): The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 634–663.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I. (2011): Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097–1100.
- Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Guzzetti, L. (2018): Geographical and cultivar features differentiate grape microbiota in Northern Italy and Spain vineyards. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–13.
- Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, A. (2009): Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. *Journal of Food Protection* 72: 1521–1530.
- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Sessitsch, A. (2016): Plant–microbe partnerships in 2020. *Microbial Biotechnology* 9: 635–640.
- Mohammad, M.J., Malkawi, H.I., Shibli, R. (2003): Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on growth and nutrient uptake of Barley grown on soils with different levels of salts. *Journal of Plant Nutrition* 26: 125–137.
- Montesinos, E. (2003): Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 6: 245–252.
- Mousa, A.A. (2017): Nanotools for molecular identification two novels *Cladosporium cladosporioides* species (Cladosporiaceae) collected from tomato phyloplane. *Journal of Yeast and Fungal Research* 8: 11–18.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H., Watkinson, A.R. (1995): Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution* 10: 407–411.
- Nguyen-the, C., Carlin, F. (1994): The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 371–401.
- Nisiotou, A.A., Nychas, G.J.E. (2007): Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2765–2768.
- Olsen, K.J.K., Rossman, A., Andersen, B. (2018): Metabolite production by species of *Stemphylium*. *Fungal Biology* 122: 172–181.
- Ostry, V. (2008): *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs . *World Mycotoxin Journal* 1: 175–188.

- Ottesen, A.R., White, J.R., Skaltsas, D.N. (2009): Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop. *Journal of Food Protection* 72: 2321–2325.
- Parniske, M. (2008): Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763–775.
- Polák et al. (2010): Šárka peckovin - současný stav problematiky v České republice a v Evropě. VÚRV, v.v.i. Praha 2010, ISBN: 978-80-7427-039-0
- Ponce, A.G., Agüero, M. V., Roura, S.I. (2008): Dynamics of indigenous microbial populations of butter head lettuce grown in mulch and on bare soil. *Journal of Food Science* 73: 257-263.
- Poniatowska, A., Michalecka, M., Bielenin, A. (2013): Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 135: 855–865.
- Porras-Alfaro, A., Bayman, P. (2011): Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 49: 291–315.
- Portillo, M. del C., Franquès, J., Araque, I. (2016): Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology* 219: 56–63.
- Pretorius, M.C., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Braun, U. (2003): Phylogeny of some cercosporoid fungi from Citrus. *Sydowia* 55: 286–305.
- Ramires, F.A., Masiello, M., Somma, S. (2018): Phylogeny and mycotoxin characterization of alternaria species isolated from wheat grown in Tuscany, Italy. *Toxins* 10: 1–15.
- Rascovan, N., Carbonetto, B., Perrig, D. (2016): Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific Reports* 6: 1–12.
- Rasmann, S., Ali, J.G., Helder, J., van der Putten, W.H. (2012): Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. *Journal of Chemical Ecology* 38: 615–628.
- Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J.J. (2012): Leaf microbiota in an agroecosystem: Spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME Journal* 6: 1812–1822.
- Reinhold-Hurek, B., Bünge, W., Burbano, C.S., Sabale (2015): Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annual Review of Phytopathology* 53: 403–424.
- Ren, F., Dong, W., Yan, D.H. (2019): Organs, cultivars, soil, and fruit properties affect structure of endophytic mycobiota of pinggu peach trees. *Microorganisms* 7: 1–15.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. (2004): Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics* 38: 525–552.
- Ritpitakphong, U., Falquet, L., Vimoltust, A. (2016): The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen. *New Phytologist* 210: 1033–1043.
- Rivas, S., Thomas, C.M. (2005): Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* 43: 395–436.
- Roberts, R.G. (1990): Postharvest biological control of grey mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80: 526-530.
- Roberts, R.G. (1994): Integrating biological control into postharvest disease management strategies. *HortScience* 29: 758–762.
- Rudi, K., Flateland, S.L., Hanssen, J.F., Bengtsson, G., Nissen, H. (2002): Development and evaluation of a 16S ribosomal DNA array-based approach for describing complex microbial communities in ready-to-eat vegetable salads packed in a modified atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1146–1156.

- Ruehle, G.D. (1930): *Cladosporium* species from Apple fruit and the perfect stage of *Cladosporium* herbarum. *Phytopathology* 10: 854.
- Saminathan, T., García, M., Ghimire, B. (2018): Metagenomic and metatranscriptomic analyses of diverse watermelon cultivars reveal the role of fruit associated microbiome in carbohydrate metabolism and ripening of mature fruits. *Frontiers in Plant Science* 9: 1–13.
- Sanders, F.E., Tinker, P.B. (1971): Mechanism of absorption of phosphate from soil by endogone mycorrhizas. *Nature* 233: 278–279.
- Santhanam, R., Luu, V.T., Weinhold, A. (2015): Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 5013–5120.
- Santos, C., Lucas, M.S., Dias, A.A. (2014): Winery wastewater treatment by combination of *Cryptococcus laurentii* and Fenton's reagent. *Chemosphere* 117: 53–58.
- Sanzani, S.M., Li Destri Nicosia, M.G., Faedda, R. (2014): Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. *Journal of Phytopathology* 162: 1–13.
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L. (2017): Disease suppressive soils: New insights from the soil microbiome. *Phytopathology* 107: 1284–1297.
- Schöler, A., Jacquiod, S., Vestergaard, G., Schulz, S., Schlöter, M. (2017): Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes. *Biology and Fertility of Soils* 53: 485–489.
- Segers, F.J.J., Meijer, M., Houbraken, J. (2015): Xerotolerant *Cladosporium sphaerospermum* are predominant on indoor surfaces compared to other *cladosporium* species. *PLoS ONE* 10: 1–15.
- Shetty, K.G., Hetrick, B.A.D., Schwab, A.P. (1995): Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. *Environmental Pollution* 88: 307–314.
- Shi, X., Wu, Z., Namvar, A. (2009): Microbial population profiles of the microflora associated with pre- and postharvest tomatoes contaminated with *Salmonella typhimurium* or *Salmonella montevideo*. *Journal of Applied Microbiology* 107: 329–338.
- Spaink, H.P. (2000): Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257–88
- Sperling, J.L., Silva-Brandão, K.L., Brandão, M.M. (2017): Comparison of bacterial 16S rRNA variable regions for microbiome surveys of ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* 8: 453–461.
- Steven, B., Huntley, R.B., Zeng, Q. (2018): The influence of flower anatomy and apple cultivar on the apple flower phytobiome. *Phytobiomes Journal* 2: 171–179.
- Stone, B.W.G., Weingarten, E.A., Jackson, C.R. (2018): The Role of the Phyllosphere Microbiome in Plant Health and Function. *Annual Plant Reviews online* 1: 533–556.
- Stone et al. (2004): Endophytic fungi. *Biodiversity of Fungi*, Publisher: Elsevier Academic Press, pp.241-270
- Tedersoo, L., Liiv, I., Kivistik, P.A. (2016): Genomics and metagenomics technologies to recover ribosomal DNA and single-copy genes from old fruitbody and ectomycorrhiza specimens. *MycKeys* 13: 1–20.
- Teplitski, M., Warriner, K., Bartz, J., Schneider, K.R. (2011): Untangling metabolic and communication networks: Interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiology* 19: 121–127.
- Tournas, V.H., Katsoudas, E. (2005): Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology* 105: 11–17.

- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P. (1991): Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351: 670–673.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M. (2007): The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 449: 804–810.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A.J. (2016): The Phyllosphere: Microbial jungle at the plant–climate interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 47: 1–24.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M. (2015): The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206: 1196–1206.
- Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., Stanevičienė, R. (2018): Distribution of apple and blackcurrant microbiota in Lithuania and the Czech Republic. *Microbiological Research* 206: 1–8.
- Verginer, M., Leitner, E., Berg, G. (2010): Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8344–8350.
- Vorstermans, B., Laer, S., Creemers, P., Pujos, P., Jijakli, H. (2007): Improving control of storage diseases on apple by combining biological and physical post-harvest methods. *Bulletin OILB/SROP* 30: 423–426.
- Wallace, J.G., Kremling, K.A., Kovar, L.L., Buckler, E.S. (2018): Quantitative genetics of the maize leaf microbiome. *Phytobiomes Journal* 2: 208–224.
- Wei, Y.J., Wu, Y., Yan, Y.Z. (2018): High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. *PLoS ONE* 13: 1–17.
- White, J.F., Kingsley, K.L., Zhang, Q. (2019): Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Management Science* 75: 2558–2565.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*: 315–322.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S., Chalutz, E. (1993): A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae* 53: 183–189.
- Wilson, D. (1995): Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos* 73: 274.
- Woudenberg, J.H.C., Hanse, B., van Leeuwen, G.C.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2017): *Stemphylium* revisited. *Studies in Mycology* 87: 77–103.
- Woudenberg, J.H.C., Seidl, M.F., Groenewald, J.Z., de Vries (2015): *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82: 1–21.
- Yang, B., Wang, Y., Qian, P.Y. (2016): Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17: 1–8.
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G.S., Uršič, V. (2008): Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61: 21–38.
- Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P. (2015): The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *mBio* 6: 176.
- Zhang, J., Wang, E.T., Singh, R.P. (2019): Grape berry surface bacterial microbiome: impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. *Journal of Applied Microbiology* 126: 204–214.
- Zhou, T., Northover, J., Schneider, K.E. (1999): Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 375–381.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Výsledky porovnání získaných sekvencí V3+V4 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
1	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,73%	NC_045840.1
2	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	99,33%	KM873113.1
3	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	99%	0	99,87%	NC_044768.1
4	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,73%	NC_045840.1
5	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,86%	KM873113.1
6	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,74%	NC_044768.1
7	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,73%	KM873113.1
8	Spiraea martini plastid, partial genome	93%	0	95,70%	KY419987.1
9	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	100%	0	99,73%	NC_045840.1
10	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	100%	0	99,73%	NC_045840.1
11	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99,59%	KM873113.1
12	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,74%	NC_044768.1
13	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	99%	0	99,87%	NC_044768.1
14	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	100,00%	KM873113.1
15	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	100%	0	99,73%	NC_045840.1
16	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	100%	0	99,59%	NC_045840.1
17	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,86%	NC_045840.1
18	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99,59%	KM873113.1
19	Phoenix dactylifera cultivar Naghal mitochondrion, complete genome	100%	0	93,70%	MH176158.1
20	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,06%	KM873113.1
21	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,73%	NC_045840.1

Příloha 1: Výsledky porovnání získaných sekvencí V3+V4 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN – pokračování.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
22	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,72%	NC_045840.1
23	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,87%	NC_044768.1
24	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,87%	NC_044768.1
25	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	100%	0	99,73%	NC_045840.1
26	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,87%	NC_044768.1
27	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,86%	NC_045840.1
28	Rhamnus taquetii chloroplast, complete genome	100%	0	99,19%	NC_045855.1
29	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99,73%	KM873113.1
30	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	99%	0	99,87%	NC_044768.1
31	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99,73%	KM873113.1
32	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	99%	0	99,74%	NC_044768.1
33	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	99%	0	99,86%	NC_045840.1
34	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,75%	NC_044768.1
35	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,74%	NC_044768.1
36	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	99%	0	99,87%	NC_044768.1
37	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,87%	NC_044768.1
38	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	100,00%	NC_044768.1
39	Cotoneaster schantungensis chloroplast, complete genome	100%	0	99,86%	NC_045840.1
40	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,73%	KM873113.1
41	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,86%	KM873113.1
42	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,74%	NC_044768.1
43	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,87%	NC_044768.1

Příloha 1: Výsledky porovnání získaných sekvencí V3+V4 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN – pokračování.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
44	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	99%	0	99,74%	NC_044768.1
45	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,74%	NC_044768.1
46	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,87%	NC_044768.1
47	Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,73%	KM873113.1
48	Prunus avium cultivar summit mitochondrion, complete genome	100%	0	99,74%	NC_044768.1

Příloha 2: Výsledky porovnání získaných sekvencí ITS1+ITS2 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
1	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,42%	MG735463.1
2	Prunus armeniaca cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,68%	MG735475.1
3	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,27%	MG735463.1
4	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,85%	MG735461.1
5	Prunus armeniaca cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,68%	MG735475.1
7	Prunus armeniaca cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,25%	MG735475.1
8	Prunus armeniaca cultivar kezimayirou small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	96,31%	MG735476.1
9	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,12%	MG735461.1
10	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,27%	MG735461.1

Příloha 2: Výsledky porovnání získaných sekvencí ITS1+ITS2 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN – pokračování.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
11	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,85%	MG735461.1
12	Prunus armeniaca cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,53%	MG735475.1
13	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	97,11%	MG735463.1
14	Prunus armeniaca cultivar huanna small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,41%	MG735477.1
15	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	98,60%	MG735461.1
16	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	98,82%	MG735461.1
17	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,24%	MG735461.1
18	Prunus armeniaca cultivar caopixing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	97,67%	MG735468.1
19	Prunus armeniaca cultivar qiuhong small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,24%	MG735459.1
20	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,01%	MG735463.1
21	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	97,97%	MG735461.1
22	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	98,68%	MG735463.1
23	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0	98,84%	MG735463.1
24	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,13%	MG735463.1
25	Prunus armeniaca cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,26%	MG735475.1
26	Prunus armeniaca cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,41%	MG735475.1
27	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,41%	MG735461.1

Příloha 2: Výsledky porovnání získaných sekvencí ITS1+ITS2 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN – pokračování.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
28	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	100,00%	MG735461.1
29	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,12%	MG735463.1
30	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,71%	MG735461.1
31	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,13%	MG735463.1
32	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	98,40%	MG735463.1
33	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,97%	MG735461.1
34	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,98%	MG735463.1
35	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	98,97%	MG735475.1
36	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,85%	MG735461.1
37	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,12%	MG735461.1
38	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,41%	MG735463.1
39	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,51%	MG735463.1
40	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,83%	MG735463.1
41	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,53%	MG735475.1
42	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	99,27%	MG735463.1
43	<i>Prunus armeniaca</i> cultivar Pinaizi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99,12%	MG735475.1
44	<i>Prunus sibirica</i> cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,39%	MG735463.1

Příloha 2: Výsledky porovnání získaných sekvencí ITS1+ITS2 oblastí s databází NCBI pomocí algoritmu BLASTN – pokračování.

Kolonie	Organismus	Query cover	E value	Per. Identity	Accession number
45	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,24%	MG735463.1
46	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0	98,98%	MG735463.1
47	Prunus sibirica cultivar shanxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98,54%	MG735463.1
48	Prunus armeniaca cultivar chuanzhihongxing small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0	99,85%	MG735461.1

Příloha 3: Druhy hub identifikované pomocí Swift Amplicon 16S+ ITS Panel kitu a NGS sekvenování a jejich accession number a SH code.

Identifikované druhy hub	Accession number/SH code
<i>Alternaria alternata</i>	KF465761 SH2179670.08FU
<i>Alternaria betae-kenyensis</i>	KP124419 SH2180558.08FU
<i>Alternaria infectoria</i>	AF347034 SH2127280.08FU
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	FJ150886 SH2149989.08FU
<i>Aureobasidium namibiae</i>	KT693730 SH2149997.08FU
<i>Aureobasidium pullulans</i>	AJ244232 SH1515060.08FU
<i>Cladosporium delicatulum</i>	HM148081 SH2320203.08FU
<i>Cladosporium flabelliforme</i>	HM148092 SH2320220.08FU
<i>Cladosporium grevilleae</i>	JF770450 SH2320233.08FU
<i>Filobasidium floriforme</i>	AF190007 SH2525150.08FU
<i>Filobasidium</i> sp.	EU266556 SH2076881.08FU
<i>Filobasidium wieringae</i>	AF444373 SH1631613.08FU
<i>Holtermanniella wattica</i>	FJ473373 SH2039839.08FU
<i>Mycosphaerella tassiana</i>	EF679363 SH1572792.08FU
<i>Stemphylium</i> sp.	DQ491516 SH2179673.08FU

Příloha 4: Druhy hub identifikované ze zdravého plodu meruňky bez známek poškození pracovníky laboratoře pomocí Swift Amplicon 16S+ ITS Panel kitu a NGS sekvenování a jejich accession number a SH code.

Identifikované druhy hub	Accession number/SH code
<i>Alternaria alternata</i>	KF465761 SH2179670.08FU
<i>Alternaria betae-kenyensis</i>	KP124419 SH2180558.08FU
<i>Aureobasidium namibiae</i>	KT693730 SH2149997.08FU
<i>Cladosporium grevilleae</i>	JF770450 SH2320233.08FU
<i>Cladosporium pseudiridis</i>	EF679383 SH2320385.08FU
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	EF679384 SH2320230.08FU
<i>Pseudeurotiaceae sp.</i>	EF679363 SH1572792.08FU
<i>Sarocladium bactrocephalum</i>	JF495199 SH1647619.08FU
<i>Mycosphaerella tassiana</i>	HG965006 SH1911891.08FU