

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

**MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA GENU VIRULENCE PRO
SYRINGOMYCIN U PATOVARŮ FYTOPATOGENNÍ
BAKTERIE *PSEUDOMONAS SYRINGAE***

Bakalářská práce

Autor práce: Zuzana Reicheltová

Vedoucí práce: Ing. Jan Fousek, Ph.D.

Konzultant: Ing. Ivan Mráz, CSc.

2009

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra rostlinné výroby

Akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana REICHELTOVÁ**

Studijní program: **B4131 Zemědělství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

Název tématu: **Molekulární analýza genu virulence pro syringomycin
u patovarů fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae***

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem bakalářské práce je stanovení distribuce genu pro syringomycin mezi jednotlivými patovary bakterie *Pseudomonas syringae* pomocí molekulárních technik.

V rámci práce bude vytvořena sbírka bakteriálních kultur pocházejících z tuzemských i zahraničních zdrojů.

Z bakterií bude izolována kompletní genomová DNA, která poslouží pro skrining celkového souboru izolátů na přítomnost genu pro syringomycin pomocí PCR a hybridizačních technik. Získané geny budou osekvenovány a bude provedeno porovnání získaných dat pro jednotlivé bakteriální kmeny.

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného úkolu GAČR 522/07/P338.


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy: 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Nicola Sante Iacobellis et al.: Pseudomonas syringae and Related Pathogens: Biology and Genetics, Springer 2003. 724 s.
Kúdela a kol.: Rostlinolékařská bakteriologie. AV ČR. Academia Praha, 2002. 347 s.
Bednář a kol: Lékařská mikrobiologie. Marvil, 1999. 558 s. (Vybr. kapitoly)
Krumphanzl a kol: Mikrobiální technologie. Academia Praha, 1988. 360 s. (Vybr. kap.).
Watson a kol.: Rekombinantní DNA. Academia Praha, 1988. 293 s. (Vybr. kapitoly).
Kaprálek: Fyziologie bakterií. SPN Praha, 1986. 603 s. (Vybrané kapitoly).
Sedláček: Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, 2007. 270 s.
Průběžné studium vědeckých publikací týkajících se dané problematiky.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jan Fousek, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR
Konzultant bakalářské práce: Ing. Ivan Mráz, CSc.
Datum zadání bakalářské práce: 13. února 2008
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2009

UNIVERZITA
ČESKÝCH BUDĚJOVIC
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentska 13
270 05 České Budějovice


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 13. února 2008

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala Ing. Janu Fouskovi, Ph.D. za vedení této práce, jeho rady a ochotu.

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled.....	7
2.1. Přehled patovarů	7
2.2. <i>Hrp</i> geny a TTSS	11
2.3. Syringomycin	12
2.4. Použité molekulárně biologické metody	12
2.4.1. PCR- polymerázová řetězcová reakce	12
2.4.2. Elektroforetická separace DNA	13
2.4.3. Hybridizace DNA	13
2.4.4. Stanovení sekvence DNA- sekvenování	14
3. Cíle práce	16
4. Materiál a metody	17
4.1. Bakteriální kmeny <i>Ps</i>	17
4.1.1. Kultivační podmínky a živná média	17
4.2. Izolace bakteriální DNA.....	17
4.2.1. Izolace bakteriální DNA	17
4.3. PCR a elektroforéza.....	18
4.4. Hybridizace.....	19
4.5. Sekvenování	20
5. Výsledky a diskuze	21
5.1. Izolace bakteriální DNA.....	21
5.2. Identifikace genu pro syringomycin	21
5.3. Sekvenování	23
6. Závěr	24
7. Seznam použité literatury	25
8. Přílohy	30
8.1. Tabulky	30
8.2. Obrázky	34

1. Úvod

Cílem této práce je stanovení distribuce genu pro toxin syringomycin u vybraných patovarů fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae*. Celkem bylo k dispozici 15 sbírkových a 29 polních izolátů, u nichž byla určována distribuce výše uvedeného toxinu.

Tato práce vznikla na základě grantu 522/07/P338 (Molekulární analýza komplexního genomu u patovarů bakterie *Pseudomonas syringae* a návrh DNA-čipu pro jejich paralelní detekci) Grantové agentury České republiky řešeném na Ústavu molekulární biologie rostlin na Akademii věd v Českých Budějovicích, který si klade několik cílů. Hlavním z nich je prohloubení znalostí o daném organismu pro další zlepšení kontroly jeho výskytu v populacích hospodářsky významných plodin. Dalším cílem je otestování vhodnosti molekulárních technik pro rutinní využití v rámci rostlinolékařské praxe.

2. Literární přehled

2.1. Přehled patovarů

Pseudomonas syringae van Hall 1902 (dále *Ps*) je gram-negativní, přísně aerobní, nesporulující tyčinkovitá bakterie s polárním bičíkem. Patří do čeledi *Pseudomonaceae*, jež je zařazena do gama-podtřídy třídy Proteobacteria v oddělení Gracilicutes. Na živných půdách chudých na železo vytváří pigment fluorescein (Hirano, Upper, 2000; Kůdela *et al.*, 2002). Patovary *Ps* nejsou schopny tvořit oxidázu a většina z nich nevykazuje pektinolytickou aktivitu. Tvoří hladké slizovité kolonie (Olczak-Woltman *et al.*, 2007). Jedná se o široce rozšířeného patogena mnoha rostlinných druhů. *Ps* je rozdělena do asi 50 patovarů podle hostitelského okruhu, který je často velmi úzký (Feil *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2003). Pomocí hybridizace byly patovary na základě rozdílnosti DNA vymezeny do devíti genomospecií (tab. 2) (Gardan *et al.*, 1999). V apoplastu infikovaných rostlin se rychle množí a následně vyvolává řadu symptomů od skvrnitosti listů po nekrotické léze (Alfano *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2003).

***Pseudomonas syringae* pv. *apii* (Jagger 1921) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psa*)**

Původce bakteriální spály celeru (Simard *et al.*, 1961). Skvrny mají hranatý tvar, jsou malé, vodnaté, rezavé se žlutým prstencem okolo – tzv. halo. Postupně se vysušují a hnědnou. Vyskytují se pouze na listech, které příležitostně odumírají, ale většinou jsou pouze znetvořené. (Westcott, Horst, 2001; Anonymus, 2009).

***Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psat*)**

Psat způsobuje bakteriální hnědnutí báze plev obilí (obr. 1) (pšenice, ječmene, oves, žito, tritikále) a trav. Tvoří hnědé skvrny na stéblech, pluchách, a listech. Rovněž ničí semena, kterými se dokáže přenášet (Smith *et al.*, 1988).

***Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (Elliott 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psc*)**

Psc je původcem bakteriální gloriolové skvrnitosti ovsa, na kterém zpočátku tvoří malé, tmavě zelené vodnaté skvrny obklopené chlorotickým halo o průměru 1 cm (obr. 2) (Smith *et al.*, 1988). Produkuje tabtoxin. Jako první byla izolována z ovsa, ale je schopna způsobit infekci i na žitě nebo bojínku lučným (Barta, Willis, 2005).

***Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper 1919) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psg*)**

Zodpovědný za bakteriální spálu sóji. Známo nejméně 10 ras tohoto patogena. Šíří se semeny. Inhibuje klíčení a tvoří skvrny pokryté slizem, které postupně tmavnou a nekrotizují. Obklopuje je žlutavé halo (obr. 3a, b). V Evropě nemoc nezpůsobuje příliš velké ztráty (Smith *et al.*, 1988). *Psg* produkuje toxin coronatin (Ullrich *et al.*, 2000).

***Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* (Kawamura 1934) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psh*)**

Vyvolává listovou skvrnitost slunečnice, která se ale objevuje jen sporadicky. Tvoří hranaté tmavě hnědé skvrny obklopené chlorotickým halo (obr. 4a, b) (Kúdela *et al.*, 2002). Listy s infikovaným vaskulárním systémem jsou svraštělé vlivem pomalejšího růstu vodivých tkání (Smith *et al.*, 1988).

***Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith and Bryan 1915) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psl*)**

Napadá tykvovité rostliny, zejména okurky (Smith *et al.*, 1988). Způsobuje hranatou skvrnitost listů, při které dochází k vypadávání nekrotizovaného pletiva, tzv. dírkovitosti. Pro svůj vývoj vyžaduje vysokou vzdušnou vlhkost (Kúdela *et al.*, 2002). Typickými příznaky jsou mokvající léze na listech s halo nebo bez něj, léze na plodech, deformace plodů (obr. 5a, b) (Olczak-Woltman *et al.*, 2007).

***Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Young, Dye & Wilkie (dále *Psp*)**

Gloriolová spála fazolu je hospodářsky nejzávažnější choroba této plodiny. Po proniknutí patogena do cévních svazků propuká systémová infekce a dochází k malformaci listů (Kůdela *et al.*, 2002). Tvoří na listech vodnaté skvrny, obklopené halo (obr. 6a, b), které je způsobené produkovaným phaseolotoxinem (Joardar *et al.*, 2005). Květy vlivem patogena odumírají, mladé lusky sesychají a semena jsou pokryta slizem. Bakterie vstupuje do hostitele průduchy nebo poraněním. Pokud se dostane do vaskulárního systému rostliny, vadnou listy nebo i celá rostlina (Westcott, Horst, 2001). Je známo 9 ras tohoto patovaru (Güven *et al.*, 2004).

***Pseudomonas syringae* pv. *lisi* (Sackett 1916) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Pspi*)**

Jedná se o ekonomicky významného patogena hrachu. Symptomy se vyskytují na všech nadzemních orgánech, nejvíce na stoncích a palistech (obr. 7a, b). Rozšíření infekce po celé rostlině vede k uschnutí a předčasnému odumření rostliny. Zdrojem nákazy jsou infikovaná semena (Kůdela *et al.*, 2002). Známe 5 ras tohoto patovaru. Patogen může produkovat bakteriální sliz, který dodává lézím lesklý vzhled (Smith *et al.*, 1988).

***Pseudomonas syringae* pv. *striaefaciens* (Elliott 1927) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psst*)**

Původce bakteriální pruhovitosti ječmene a ovsa (Kůdela *et al.*, 2002). Klasickými symptomy jsou vodnaté léze srůstající v pruhy na listech, které následně nekrotizují (obr. 8). Je fyziologicky velmi podobná *Psc*, ale na rozdíl od ní neprodukuje tabtoxin (Barta, Willis, 2005).

***Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 (dále *Pss*)**

Od ostatních patovarů *Pseudomonas syringae* se odlišuje svou schopností napadat široký okruh rostlin (Little *et al.*, 1998). Vykazuje ledově krystalizační aktivitu. Mezi typické příznaky choroby patří nekróza korových pletiv peckovin,

skvrnitost listů u rajčete, pšenice, fazolu, hrachu a hniloba hroznů (obr. 9). V populaci *pv. syringae* jsou i nepatogenní kmeny (Kůdela *et al.*, 2002).

***Pseudomonas syringae pv. tabaci* (Wolf & Foster 1917) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Pst*)**

Tento patogen tabáku, ale i jiných rostlin (jako jsou rajčata, lilek, sója) produkuje tabtoxin, který se podílí na tvorbě halo okolo nekrotických skvrn (obr. 10, 11). Příznaky choroby jsou viditelné nejdříve na spodních listech a za teplého počasí se rychle šíří dál. Bakterie přežívá v rostlinných zbytcích a semenech a do rostlin vstupuje otvory průduchů (Kůdela *et al.*, 2002; Westcott, Horst, 2001).

***Pseudomonas syringae pv. tagetis* (Hellmers 1955) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psta*)**

Skvrnitost listů u druhů rodu *Tagetes*- aksamitník způsobena touto bakterií se vyskytuje jen sporadicky při nadměrných dešťových srážkách a nízkých teplotách na začátku léta na slunečnicích (Kůdela *et al.*, 2002; Westcott, Horst, 2001). Skvrny jsou velké, nekrotizující, může se vyskytovat halo. Vrcholové chlorózy způsobuje tagetitoxin výrazně odlišný od toxinů produkovaných jinými patovary *Ps* (Smith *et al.*, 1988).

***Pseudomonas syringae pv. theae* (Hori 1915) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psth*)**

Způsobuje spálu výhonků čajovníku. Na povrchu listů se shlukuje a vytváří biofilm, který chrání bakterie proti stresovým podmínkám. Produkuje polysacharid důležitý pro přežití bakterie za suchých podmínek (Tomihama *et al.*, 2007).

***Pseudomonas syringae pv. tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psto*)**

Způsobuje bakteriální tečkovitost rajčete. Patogen je schopný kolonizovat vaskulární pletiva a produkovat toxin coronatin a způsobovat tak silnou zakrslost rostlin. Na listech vytváří hnědé skvrny s halo splývající v nekrotické plochy nebo pruhy podél žilek, listy žloutnou a zmenšují se. Na stoncích a květech pak způsobuje velké nekrózy, na plodech zasahuje do epidermálních pletiv a tvoří tak povrchové

léze (obr. 12a, b, 13). Napadá jen nezralé plody, nerozšiřuje se ale do dužiny a je přenosná osivem. Symptomy na listech i plodech se mohou lišit barvou, velikostí a choroba tak může být snadno zaměnitelná s chorobami způsobenými jinými patogeny rajčete jako *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* nebo *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Způsobuje také choroby jiných plodin- květáku, zelí, čínského zelí (Cuppels, Ainsworth, 1995; Kúdela *et al.*, 2002; Little *et al.*, 1998; Westcott, Horst, 2001).

***Pseudomonas syringae* pv. *ulmi* (Šutić & Tešić 1958) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále *Psu*)**

Způsobuje skvrnitost listů a spálu výhonků jilmu. Za vlhka může způsobit kompletní uschnutí listů a vrcholů rostlin (Smith *et al.*, 1988). Choroba se projevuje malými nekrotickými skvrnami obklopenými žlutým halo. Léze jsou 0,1-3mm velké umístěné na spodních stranách listů (Moorman *et al.*, 1988).

2.2. *Hrp* geny a TTSS

V nehostitelských rostlinách nebo rezistentních odrůdách hostitelské rostliny se patogen nemnoží (nebo jen málo), ale podněcuje hypersenzitivní reakci (HR) (Jin *et al.*, 2003). Rostlina při ní vyvolá programovanou buněčnou smrt pletiv, která přišla do kontaktu s patogenem (Collmer *et al.*, 2000). Schopnost bakterie vyvolat HR nebo schopnost patogenity na hostitelích je závislá na speciálním proteinovém sekrečním systému typu III (dále TTSS). TTSS přenáší do cytoplasmy hostitelských buněk virulentní proteiny patogena.

TTSS kódují *hrp* (HR and pathogenicity) geny. Děvět z nich se nachází v živočišných bakteriálních patogenech a pro svou vzájemnou sekvenční homologii byly přejmenovány na geny *hrc* (HR and conserved). Pro průběh HR jsou důležité také geny *avr* (avirulence) a *hop* (Hrp-dependent outer protein) kódující efektorové proteiny (Alfano *et al.*, 1999; (Deng *et al.*, 1998). Genový cluster *hrp* obsahuje až 25 genů s rozdílnými úlohami. Pro správnou funkci *hrp* clusteru je ale nutná přítomnost všech těchto genů. Aktivace *hrp* genů je odezvou na nízký obsah živných látek

v mezibuněčném prostoru (Kůdela *et al.*, 2002). *Ps* tedy neexprimuje *hrp* geny dokud se nedostane do apoplastu rostliny nebo není pěstována na médiu, které napodobuje podmínky tohoto prostředí (Jin *et al.*, 2003).

2.3. Syringomycin

Další způsob zvýšení virulence je po *hrp* genech produkce toxinů. Tyto látky poškozují stěnu rostlinných buněk. Nejsou sice nezbytné pro patogenitu, ale ovlivňují vážnost choroby.

Syringomycin (obr. 14) je cyklický lipodepsinonapeptid, skládající se z hlavní hydrofilní peptidové části a části hydrofobní. Jsou produkovány 3 formy tohoto toxinu. Liší se pouze v délce hydrofobní části. Tato část toxinu se usadí v centru lipidové dvouvrstvy a druhá, hydrofilní, část na její hladině. Vytváří se pak kanálky o průměru 1 nm, které se synchronně otevírají a zavírají a propuští K^+ , H^+ a Ca^{2+} skrz membránu. Syringomycin tak způsobuje lyzi buněk. Produkce syringomycinu může být potlačena anorganickým fosfátem a to koncentrací 1 mM a více.

V clusteru *syr* genů se nachází šest otevřených čtecích rámců (ORF) kódujících proteiny důležité pro syntézu (*syrB1*, *syrB2*, *syrC* a *syrE*), transport membránami (*syrD*) a regulaci (*syrP*) syringomycinu. Zvláštní vlastností *syr* genů je přítomnost velkého ORF *syrE* (Bender *et al.*, 1999).

2.4. Použité molekulárně biologické metody

2.4.1. PCR- polymerázová řetězcová reakce

Tato metoda umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci DNA bez jejího předchozího klonování ve vektoru. Její podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových úseků DNA prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů.

V procesu se pravidelně střídají tři kroky: tepelná denaturace DNA, připojení primerů na protilehlé řetězce DNA svými 3'-konci proti sobě a syntéza nových vláken termostabilní polymerázou (např. *Taq*-polymeráza). Všechny kroky se odlišují svými nároky na teplotu. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a pohybuje se mezi 25 a 35 cykly. Výsledkem je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, jehož stačí malé množství.

K DNA- polymeráze, primerům a templátu se přidávají také hořčnaté ionty jako kofaktory a jednotlivé dNTP (2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty) (Šmarda *et al.*, 2005).

2.4.2. Elektroforetická separace DNA

Principem této techniky je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě. Nosičem bývá obvykle gel (v našem případě agaróza), který tvoří strukturu s póry, jejichž velikost lze ovlivnit koncentrací polymeru a složením roztoku. Velikost fragmentu DNA se následně stanoví srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s rychlostí pohybu fragmentu o známé velikosti-marker. DNA se v gelu zviditelní pomocí barviva a po dokončení elektroforézy je tak možno identifikovat polohu separovaných molekul (Šmarda *et al.*, 2005).

2.4.3. Hybridizace DNA

Jedná se o proces párování jednořetězcových molekul vyznačujících se úplnou nebo částečnou komplementaritou bází. Sonda – značená molekula nukleové kyseliny se známou sekvencí – se páruje s denaturovanými řetězci obsahujícími homologní pořadí nukleotidů a následně detekuje podle způsobu značení. Tím může být radiokativní značení, kdy jsou do molekuly začleněny nukleotidy

obsahující radioaktivní izotop. Signálem sondy je pak radioaktivní záření, které lze detekovat autoradiograficky. Při neradioaktivním způsobu značení jsou do sekvence sondy zabudovány chemicky modifikované nukleotidy nesoucí reportérskou molekulu (např. biotin, digoxigenin), která umožňuje přímou nebo nepřímou detekci sondy.

Tečková hybridizace (Dot blot hybridizace) umožňuje detekovat homologní sekvence DNA v bakteriálních buňkách *in situ* bez předcházející purifikace DNA. Vzorek DNA v roztoku se nanese na nylonovou membránu. Po navázání DNA na membránu a její denaturaci pomocí NaOH a vysoké teploty se inkubuje se sondou, přebytečná sonda se odmyje a detekuje. (Kůdela *et al.*, 2002; Šmarda *et al.*, 2005).

2.4.4. Stanovení sekvence DNA- sekvenování

Cílem je stanovení primární struktury (pořadí nukleotidů) v molekulách DNA. K tomuto účelu je využíváno tzv. Sangerovo sekvenování.

Základním požadavkem je příprava molekul DNA s přesně definovanými konci – nejčastěji se používají restriční fragmenty naklonované v klonovacím vektoru nebo fragmenty získané pomocí PCR. Při Sangerově sekvenování se pro syntézu komplementárních řetězců používá DNA-polymeráza. Syntéza je zahájena od místa připojení sekvenčně specifického primeru a ukončena v místě, v němž je do rostoucího řetězce inkorporován místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog 2',3' - dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP) bez 3'-OH skupiny. Po jeho začlenění do syntetizovaného řetězce dojde k ukončení syntézy DNA, DNA-polymeráza nemůže připojit další nukleotid. Reakce jsou prováděny ve čtyřech oddělených vzorcích obsahujících stanovovanou DNA, primer, DNA-polymerázu a směs 4 nukleotidů s jedním ze čtyř ddNTP.

K detekci reakčních produktů se používají čtyři různé fluorescenční značky, každá určená pro detekci produktů zakončených specifickou bází. Fluorofory mohou být připojené k primerům nebo jednotlivým terminátorům. Po proběhnutí reakce se vytvořené produkty analyzují plně automatizovaným přístrojem, kde dojde nejdříve ke kapilárové elektroforetické separaci a následně pomocí laserového detektoru a

počítače k vyhodnocení pořadí nukleotidů v daném vzorku. Chemická metoda sekvenování se vzhledem ke své náročnosti rutinně nepoužívá (Šmarda *et al.*, 2005).

3. Cíle práce

1. Vytvoření sbírky bakteriálních kultur pocházejících z tuzemských i zahraničních zdrojů
2. Stanovení distribuce genu pro syringomycin mezi jednotlivými patovary bakterie *Ps* pomocí molekulárních technik
3. Izolace kompletní genomové DNA ze sbírkových a polních vzorků *Ps*
4. Otestování sbírky metodou PCR
5. Osekvenování pozitivních PCR amplikonů a porovnání získaných dat s veřejnými databázemi
6. Příprava neradioaktivně značené sondy pro hybridizační testy a její testování

4. Materiál a metody

4.1. Bakteriální kmeny *Ps*

K analýze bylo použito 15 patovarů z Belgian co-ordinated collections of micro-organisms (BCCM/LMG), České sbírky mikroorganismů (CCM) a sbírky mikroorganismů z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze (RICP nebo CRI) (tab. 1) a 29 polních izolátů (tab. 5) pocházejících ze skleníků na Jižní Moravě. Byly uchovávány lyofilizované nebo zmražené v živných médiích s 15 % glycerolu při -60°C.

4.1.1. Kultivační podmínky a živná média

Bakterie byly naočkovány na Petriho misky s pevným C-médiem (2 g peptonu, 1 g kvasničného autolyzátu, 1 g NaCl, 1 g glukózy, 5 g agaru, 200 ml destilované vody, upraveno na pH 7,2 a sterilizováno autoklávováním při 121°C po dobu 20 minut) a umístěny do termostatu (25°C).

4.2. Izolace bakteriální DNA

4.2.1. Izolace bakteriální DNA

Pro izolaci byly vybrány co nejčerstvější kolonie, jejichž DNA je lépe izolovatelná. K izolaci DNA byl pak použit komerčně dostupný izolační kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega). Bylo postupováno podle přiloženého protokolu pro izolaci bakteriální DNA. Tato metoda využívá kolony se speciálně upravenou membránou, na které dochází v několika krocích k navázání a následné purifikaci DNA. Získaná DNA byla uchována při teplotě -25°C.

4.3. PCR a elektroforéza

Reakční směs byla připravena do celkového objemu 15 µl. Do 4,5 µl sterilní H₂O bylo přidáno 7,5 µl PPP Master Mixu (Top-Bio), 1 µl forward primeru, 1 µl reverse primeru (celkem 20 pmol) a 1 µl vyizolované DNA (100 ng). Byly použity primery SyrD1, SyrD2 a SyrB1 od firmy SIGMA-ALDRICH (tab. 3). Všechny reakce byly prováděny na termocykleru MJ Mini. V následující tabulce je uveden průběh amplifikačních programů u jednotlivých primerů.

Krok	SyrD1		SyrD2		SyrB1	
	Teplota (°C)	Doba trvání	Teplota (°C)	Doba trvání	Teplota (°C)	Doba trvání
1	95	3 min	95	3 min	95	3 min
2	94	45 s	94	45 s	93	1 min
3	55	45 s	65	15 s	55	30 s
4	72	30 s	72	1 min	72	45 s
5	25x kroky 2-4		25x kroky 2-4		25x kroky 2-4	
6	72	5 min	72	10 min	72	10 min
7	4		4		4	

Amplifikované PCR fragmenty byly rozděleny pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu (pufr 0,5x TBE, LE agarose od firmy Lonza) při 120 V po dobu cca 60 minut. DNA byla obarvena interkalačním činidlem SYBR Green[®], které bylo součástí vkladacího pufru (Xylen Cyanol/Bromphenol Blue) v poměru 1:10 000. Pro rovnoměrné zahřívání gelu byla elektroforetická vana umístěna během samotné separace na třepačku při rychlosti otáčení 50 ot./ min.

Výsledek byl zpracován dokumentačním systémem Kodak EDAS 290 a analyzován specializovaným softwarem Kodak 1D.

4.4. Hybridizace

Sonda byla připravena pomocí PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche diagnostics). Bylo postupováno podle návodu výrobce a výsledný objem činil 25 μ l. Přesný postup hybridizace (složení pufků pro hybridizaci viz tab. 4 v přílohách):

- napuštění nylonové membrány 2x SSC, následné nanesení vzorků (20 μ l od každého)
- odsátí přebytečné tekutiny z membrány vývěvou
- fixace vzorků 30 min v peci při 120°C + 10 min pod UV lampou
- prehybridizace cca 2 hodiny v hybridizačním pufku (20 ml) při 68°C v hybridizační peci
- denaturace 25 μ l sondy povařením ve vodní lázni (5 min), rychlé zchlazení na ledu
- přidání 7 ml hybridizačního pufku, hybridizace při 68°C přes noc
- promývání 2x5 min v pufku 2xSSC na třepačce při 20°C, 2x15 min v pufku 0,1xSSC při 68°C v hybridizační peci
- promytí 1 minutu v pufku 1 + Tween 20 (promývací pufek) při 20°C na třepačce
- inkubace v pufku 2 (30 min na třepačce při 20°C)
- reakce 2 μ l konjugátu (anti-DIG IgG-AP) + 10 ml pufku 2, 30 min na třepačce
- vymytí 2x15 min pufkem 1 při 20°C na třepačce
- stabilizace asi 2 minuty v pufku 3
- reakce s barvivem 200 μ l NBT/BCIP v 10ml pufku 3, inkubace 1 den
- promytí membrány pufkem 4 (cca 5 min)
- vysušení membrány

4.5. Sekvenování

PCR produkty byly přečištěny kitem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Následně byla namíchána reakce pro sekvenování: k 13 μl H_2O bylo přidáno po 1 μl primeru R nebo F (3,2 pmol) a 1 μl přečištěného PCR produktu. Samotné sekvenování bylo provedeno v laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin Akademie věd ČR v Českých Budějovicích za použití kitu Big Dye 3.1 (Applied Biosystems).

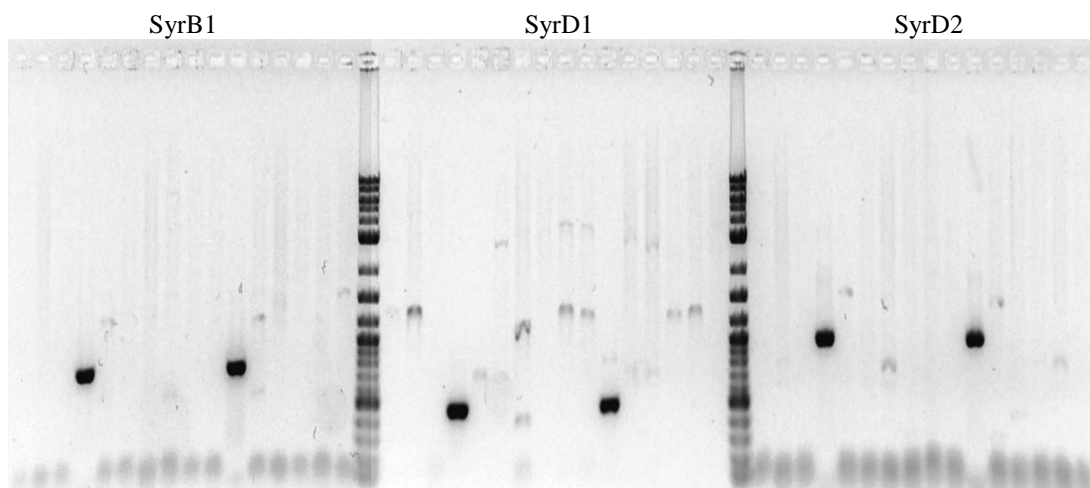
5. Výsledky a diskuze

5.1. Izolace bakteriální DNA

Použití Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) bylo pro izolaci DNA vyhovující a nebylo tedy třeba využití jiných postupů purifikace. Takto získaná DNA byla v dostatečném množství, koncentraci i čistotě ($OD_{260/280} > 1.9$) pro následující aplikace.

5.2. Identifikace genu pro syringomycin

Metodou PCR byla v naší sbírce s použitím primerů pro různé podjednotky genového clusteru pro syringomycin detekována jeho přítomnost u pv. *coronafaciens* a *syringae*.



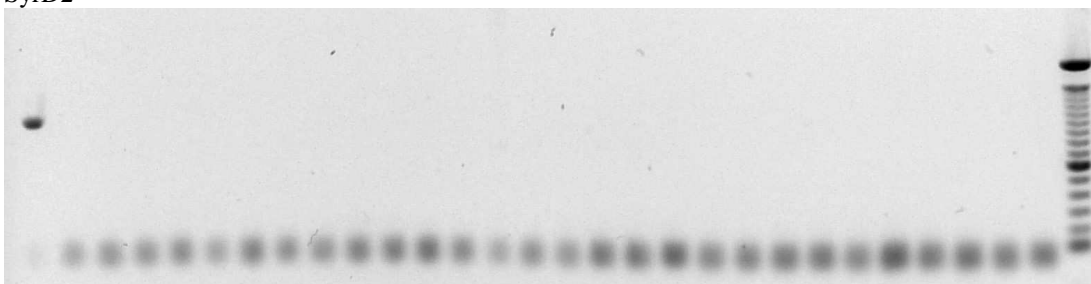
1- negativní kontrola, 2-16- vzorky *Ps* (dle tab. 1), M- 2log ladder (NEB)

Tento závěr potvrzuje předchozí práce (Bender *et al.*, 1999) jen částečně, neboť všechny s výjimkou několika studií (Vassilev *et al.*, 1996; Quigley, Gross, 1994) obecně předpokládají, že je tento toxin produkován výhradně v pv. *syringae*. Naše zjištění byla shodně potvrzena každou ze třech dvojic primerů, určených pro různé části tohoto genu. Vzhledem k tomuto neočekávanému výsledku, jsme se

rozhodli naše tvrzení ověřit ještě jiným způsobem. Využili jsme možnosti použít výsledky získané v naší laboratoři z paralelně probíhající studie genetické variability jednotlivých patovarů. Z těchto dat jsme nakonec vyvrátili možnost přítomnosti syringomycinu v pv. *coronafaciens*. Dospěli jsme k závěru, že sbírkový kmen LMG 5060 *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. vykazuje velmi podobný genetický profil s pv. *syringae* a to se všemi dvojicemi primerů používaných při metodě rep-PCR (Rademaker *et al*, 1997). Podezření bylo rovněž potvrzeno srovnáním sekvenčních dat z genů 16S, ITS 16-23S a GyrB (tato data budou zveřejněna jako součást jiné práce). Díky těmto výsledkům lze téměř s jistotou tvrdit, že původní determinace sbírkového kmene byla provedena nesprávně a celou dobu jsme pracovali s pv. *syringae*. Naše tvrzení bude ještě ověřeno dalšími dostupnými metodami. Tento fakt přímo ukazuje na obtížně proveditelnou spolehlivou identifikaci takto příbuzných organismů a na potřebu jejího zlepšení.

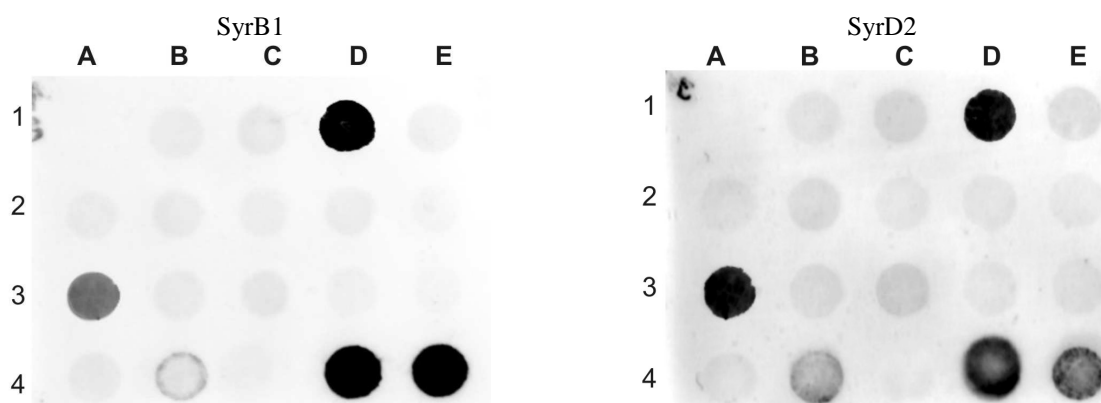
Pomocí PCR byl u polních izolátů rovněž zachycen kmen *Pss* CRI 8064 a byla u něho prokázána přítomnost všech námi sledovaných podjednotek syringomycinu.

SyrD2



1-19- vzorky *Ps* (dle tab. 5), M- 100bp ladder (Invitrogen)

Dot blot hybridizace s neradioaktivně značenou sondou z podjednotek B1 a D2 kopírovala výsledky PCR.



1A, 4C – negativní kontrola, 1B-4A – vzorky 1-15 (dle tab. 1), 4B,4D,4E – pozitivní kontrola

5.3. Sekvenování

Pozitivní vzorky získané amplifikací genu pro syringomycin byly osekvenovány za účelem porovnání vzájemné genetické podobnosti a potvrzení jejich pravosti srovnáním s veřejnými databázemi. Všechny sekvence pro daný toxin vykazovaly vysokou homologii (téměř 100%) jak mezi sebou, tak po porovnání s jinými daty.

6. Závěr

1. Byla vytvořena sbírka patovarů *Pseudomonas syringae*.
2. Molekulárními technikami (PCR, Dot blot hybridizace) byla stanovena distribuce genu pro syringomycin u jednotlivých izolátů bakterie *Pseudomonas syringae*.
3. Z polních a sbírkových vzorků *Ps* byla vyizolována genomová DNA pomocí izolační soustavy Wizard SV Genomic DNA Purification System. Vykazovala výborné vlastnosti.
4. Pomocí PCR byla pozitivně detekována na produkci toxinu syringomycinu pouze bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.
5. Produkty PCR byly osekvenovány a získané výsledky porovnány s veřejnými databázemi.
6. Byla připravena neradioaktivně značená sonda, která byla otestována na jednotlivých vzorcích hybridizačními zkouškami. Byl použit PCR DIG Probe Synthesis Kit. Výsledky odpovídaly datům získaným metodou PCR.

7. Seznam použité literatury

- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., et al.** (2000): The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *PNAS* **9**, 4856-4861.
- Barta, T.M., Willis, D.K.** (2005): Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. *Journal of Phytopathology* **153**, 492-499.
- Bender, C.L., Alarcón-Chaidez, F., Gross, D.C.** (1999): *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2**, 266-292.
- Collmer, A., Badel, J.L., Charkowski, A.O., et al.** (2000): *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS* **16**, 8770-8777.
- Cuppels, D.A., Ainsworth, T.** (1995): Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. *Applied and Environmental Microbiology* **10**, 3530-3536.

- Deng, W.-L., Preston, G., Collmer, A., et al.** (1998): Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease on plants. *Journal of Bacteriology* **17**, 4523-4531.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., et al.** (2005): Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *PNAS* **31**, 11064-11069.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., et al.** (1999): DNA relatedness among pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 459-478.
- Güven, K., Jones, J.B., Momol, M.T., Dickstein, E.R.** (2004): Phenotypic and genetic diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Phytopathology* **152**, 658-666.
- Hirano, S.S., Upper, Ch.D.** (2000): Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **3**, 624-653.
- Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J., He, S.-Y.** (2003): Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection* **5**, 301-310.

- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., et al.** (2005): Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *Journal of Bacteriology* **18**, 6488-6498.
- Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovsky, L.** (2002): Rostlinolékařská bakteriologie. Academia, ISBN 80-200-0899-3, 347.
- Little, E.L., Bostock, R.M., Kirkpatrick, B.C.** (1998): Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology* **10**, 3818-3823.
- Moorman, G.W., Lukezic, F.L., Levine, R.** (1988): *Pseudomonas syringae*, causal agent of a leaf spot on *Ulmus* sp. *Plant Disease* **10**, 72-801.
- Olczak-Woltman, H., Masny, A., Bartoszewski, G., et al.** (2007): Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathology* **56**, 373-382.
- Quigley, N.B., Gross, D.C.** (1994). Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Molecular Plant Microbe Interactions* **7**, 78–90.

Rademaker, J. L. W., F. J. de Bruijn (1997): Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *In* G. Caetano-Anollés, and P. M. Gresshoff (ed.), *DNA markers: protocols, applications and overviews*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y, 151-171.

Simard, J., Crete, R., Simard, T. (1961): Vegetable diseases on muck soils in the Montreal area in 1961. *Plant Disease Survey* **5**, 353-356.

Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., et al. (1988): European handbook of plant diseases. *Blackwell Scientific Publications*, p. 583, ISBN 0632012226.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., et al. (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, ISBN 978-80-210-3841-7, 188.

Tomihama, T., Nishi, Y., Arai, K. (2007): Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. *Journal Genetic Plant Pathology* **73**, 193-196.

Ullrich, M.S., Schergaut, M., Boch, J., Ullrich, B. (2000): Temperature-responsive genetic loci in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Microbiology* **146**, 2457-2468.

Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D., Iacobellis, N. S. (1996). Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathology* **45**, 316–322.

Westcott, C., Horst, R.K. (2001): Westcott's plant disease handbook. Springer, ISBN 0792386639, 1008.

ANONYMUS 1:

Celery bacterial leafspot, dostupný z www

<<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r104100311.html?printpage>> [cit. 15.3.2009].

8. Přílohy

8.1. Tabulky

Tabulka č. 1: Použité bakteriální kmeny *Pseudomonas syringae*

Kmen	Patovar
BCCM/LMG 2132	<i>apii</i>
BCCM /LMG 5095	<i>atrofaciens</i>
BCCM /LMG 5060	<i>coronafaciens</i>
RICP 7001	<i>glycinea</i>
BCCM /LMG 5067	<i>helianthi</i>
BCCM /LMG 5070	<i>lachrymans</i>
BCCM /LMG 2245	<i>phaseolicola</i>
BCCM /LMG 5079	<i>piri</i>
BCCM /LMG 2330	<i>striafaciens</i>
CCM 1247	<i>syringae</i>
BCCM /LMG 5393	<i>tabaci</i>
BCCM /LMG 5090	<i>tagetis</i>
BCCM /LMG 5092	<i>theae</i>
RICP 100	<i>tomato</i>
BCCM /LMG 2349	<i>ulmi</i>

Tabulka č. 2: Genomové skupiny *Pseudomonas syringae*

Patovar	Genomospecie
<i>apii</i>	3
<i>atrofaciens</i>	1
<i>coronafaciens</i>	4
<i>glycinea</i>	2
<i>helianthi</i>	7
<i>lachrymans</i>	2
<i>phaseolicola</i>	2
<i>psi</i>	1
<i>striafaciens</i>	4
<i>syringae</i>	1
<i>tabaci</i>	2
<i>tagetis</i>	7
<i>theae</i>	8
<i>tomato</i>	3
<i>ulmi</i>	2

Tabulka č. 3: Sekvence použitých primerů

	F	R
SyrD1	5' AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG 3'	5' GGCAATACCGAACAGGAACAC 3'
SyrD2	5' CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC 3'	5' TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC 3'
SyrB1	5' CTTCCGTGGTCTTGATGAGG 3'	5' TCGATTTTGCCGTGATGAGTC 3'

Tabulka č. 4: Složení jednotlivých hybridizačních pufrů

20x SSC	na 100 ml
3 M NaCl	17,53 g
0,3 M citronan sodný	8,82 g
pH	7
Pufr 1	na 1 l
0,1 M kyselina maleinová	11,6 g
0,15 M NaCl	8,76 g
pH	7,5
Pufr 2	
1% blotovací pufr 1	
Pufr 3	na 0,5 l
1 M Tris	6,05 g
3 M NaCl	2,92 g
0,5 M MgCl ₂	8,53 g
pH	9,5
Pufr 4	na 250 ml
1 M Tris	2,5 ml
0,5 M EDTA	0,5 ml
pH	8
Hybridizační pufr	na 250 ml
20x SSC	62,5 ml
10% blotovací roztok	25 ml
10% laurylsarcosyl	2,5 ml
10% SDS	0,5 ml
Promývací pufr	
Pufr 1	250 ml
Tween 20	0,75 ml

Tabulka č. 5: Použité polní izoláty

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CRI 8064
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8065
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8066
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8067
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8068
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8069
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8070
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8071
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8072
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8073
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8111
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8112
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8113
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8114
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8115
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8116
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8117
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8118
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8119
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8120
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8121
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8122
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8123
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8124
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8125
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8126
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8127
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 8128
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 8129

8.2. Obrázky

*Obrázek č. 1: Symptomy na pšenici způsobené *Psat**



Zdroj: www.seedquest.com [9.3.2009]

*Obrázek č. 2: Symptomy na ovsu způsobené *Psc**



Copyright: T. Tsukiboshi

Zdroj: <http://ss.niai.affrc.go.jp> [9.3.2009]

Obrázek č. 3: Symptomy na sóji způsobené *Psg*

a/



Bacterial blight on soybean, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.
Courtesy Joseph Krausz. TAES - 1996.

Zdroj: <http://plantpathology.tamu.edu> [9.3.2009]

b/



Zdroj: <http://nzdl.sadl.uleth.ca> [9.3.2009]

Obrázek č. 4: Symptomy způsobené *Psh*

a/



Zdroj: <https://kakibyو.dc.affrc.go.jp> [9.3.2009]

b/



Zdroj: <https://kakibyو.dc.affrc.go.jp> [9.3.2009]

Obrázek č. 5: Symptomy na okurce způsobené *Psl*

a/



Zdroj: <http://aggie-horticulture.tamu.edu> [9.3.2009]

b/



Zdroj: www.forestryimages.org [9.3.2009]

Obrázek č. 6: Symptomy na fazolu způsobené *Psp*

a/



Zdroj: www.forestryimages.org [9.3.2009]

b/



Zdroj: www.forestryimages.org [9.3.2009]

Obrázek č. 7: Symptomy na hrachu způsobené *Pspi*

a/



Zdroj: <http://nzdl.sadl.uleth.ca> [9.3.2009]

b/



Zdroj: www.forestryimages.org [9.3.2009]

Obrázek č. 8: Symptomy na ovsu způsobené *Psst*



Zdroj: www.agric.wa.gov.au [9.3.2009]

Obrázek č. 9: Symptomy na fazolu způsobené Pss



Zdroj: www.forestryimages.org [9.3.2009]

Obrázek č. 10: Symptomy na sóje způsobené Pst



Zdroj: <http://nzdl.sadl.uleth.ca> [9.3.2009]

Obrázek č. 11: Symptomy na tabáku způsobené Pst



Zdroj: www.forestryimages.org [9.3.2009]

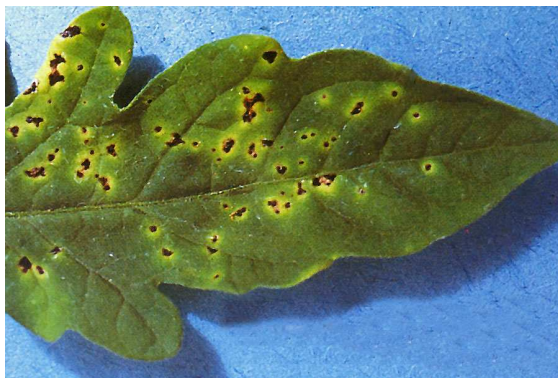
Obrázek č. 12: Symptomy na rajčeti způsobené *Psto*

a/



Zdroj: www.avrdc.org [9.3.2009]

b/



Zdroj: www.avrdc.org [9.3.2009]

Obrázek č. 13: Symptomy na huseníčku způsobené *Psto*



Zdroj: www.prl.msu.edu [9.3.2009]

