

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA, ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

OBOR ZEMĚDĚLSKÉ BIOTECHNOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Molekulární analýza genu virulence pro tabtoxin a coronatin u
patovarů fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae***

ADÉLA STAŇKOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jan Fousek, Ph.D.

Školitel: 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: **Adéla STAŇKOVÁ**

Studijní program: **B4131 Zemědělství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

Název tématu: **Molekulární analýza genu virulence pro tabtoxin
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 tabtoxin 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 skrínění celkového souboru izolátů na přítomnost genu pro tabtoxin 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.
Kůdela 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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZELENSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 08 BUDĚJOVICE

L.S.


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc.
děkan

doc. Ing. Jiří Dviš, CSc.
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 14. února 2007

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 archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 17.4.2009

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu Ing. Janu Fouskovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky vztahující se k bakalářské práci a za obětavost a ochotu při provádění pokusů v laboratoři v průběhu celé práce.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled	7
2.1 Patovary bakterie <i>Pseudomonas syringae</i>	7
2.2 Toxiny coronatin a tabtoxin.....	13
2.3 Hypersenzitivní reakce	13
2.4 Použité molekulární metody.....	14
2.4.1 Elektroforéza nukleových kyselin.....	14
2.4.1.1 Gelová elektroforéza.....	14
2.4.2 Polymerázová řetězová reakce.....	15
2.4.3 Hybridizace.....	16
2.4.4 Sekvenování.....	16
3. Cíl práce	18
4. Materiál a metody	19
4.1 Kmeny bakterie Ps.....	19
4.1.1 Kultivace a živná média	19
4.2 Izolace bakteriální genomové DNA	19
4.2.1 Izolace DNA.....	19
4.3 PCR	20
4.4 Hybridizace	21
4.4.1 Příprava sondy	21
4.4.2 Dot blot hybridizace	21
4.5 Sekvenování	22
5. Výsledky a diskuse	23
5.1 Izolace bakteriální DNA.....	23
5.2 Distribuce genů pro toxiny coronatin a tabtoxin	23
5.3 Sekvenování získaných genů.....	25
6. Závěr	26
7. Seznam použité literatury.....	27
8. Příloha	31
8.1 Tabulky.....	31
8.2 Obrázky	35

1. Úvod

Cílem této práce je stanovení distribuce genu pro toxiny coronatin a tabtoxin u vybraných patovarů fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* (dále jen *Ps*). Celkem bylo k dispozici 15 sbírkových a 29 polních izolátů, u nichž byla určována distribuce výše uvedených toxinů.

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 Patovary bakterie *Pseudomonas syringae*

Ps byla prvně izolována z nakaženého šejfku (*Syringa vulgaris* L.) M.W. Beijerinckem v roce 1899 a následovně charakterizována a pojmenována C.J.J. van Hallem. Druhové označení je tak spojené s hostitelem, ve kterém byla bakterie poprvé nalezena (Hirano and Upper, 2000).

Ps patří mezi pravé epifytické bakterie, které se vyskytují na širokém spektru rostlin po celém světě (Kůdela *et al.*, 2002). Je snadno identifikovatelná jako gram–negativní, přísně aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru s polárním bičíkem (Hirano and Upper, 2000) náležející do gama–podtřídy Proteobacteria,. Tento druh také patří k fluorescentním pseudomonádám, které s malými výjimkami produkují fluorescenční pigment na King B médiu, pozorovatelný pod UV světlem. Bakterie vytvářejí hladké, sliznaté kolonie na výživném agaru s 5% sacharózou a vyvolávají hypersenzitivní reakci na tabákových listech (Olczac–Woltman *et al.*, 2007).

Bakteriální druh *Ps* je dále taxonomicky rozdělen podle patogenní hostitelské preference na taxony nazývané patovary (Hwang *et al.*, 2005), kterých je známo více než 45 (Kokošková, 2006), každý z nich má různé hostitelské spektrum a můžeme zde nalézt polyfágní i hostitelsky velmi úzce specializované zástupce. Patovary jsou navíc rozděleny dle vlastností při DNA–DNA reasociační analýze do 9 genomových skupin nazývaných genomospecie (tab.1) (Kůdela *et al.*, 2002).

Ps produkuje čtyři základní toxiny: coronatin, phaseolotoxin, syringomycin a tabtoxin. Všechny čtyři přispívají k chloróze nebo nekróze (Hwang *et al.*, 2005). Důležitým diferenciacním biochemickým znakem patovarů *Ps* je neschopnost tvorby oxidázy. Tímto znakem se spolu s druhem *Pseudomonas viridiflava* odlišují od ostatních fytopatogenních a nefytopatogenních pseudomonád (Kůdela *et al.*, 2002).

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

Ps. apii je bakterie napadající celer (Westcott and Horst, 2001). Na celeru byla poprvé nalezena v Quebecu v roce 1923 (Simard *et al.*, 1961). Počáteční příznaky bakteriální listové skvrnitosti jsou malé, mokvavé skvrny, které jsou viditelné z obou stran listů (obr.1). Léze jsou obvykle omezeny listovými žilkami a jsou hranaté. Mokvavé skvrny rychle hnědnou a se stárnutím vysychají (Anonymus 2, 2009). Může také tvořit nepravidelné kruhové rezavé listové skvrny se žlutými halo (kruhy) příležitostně natolik početné, že mohou vyvolat opad listů, obvykle ale jen listy znetvoří (Westcott and Horst, 2001).

***Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále jen *Ps.at*)**

Ps.at způsobuje hnědé zbarvení na bázi plev a na stéblech pšenice a ječmene, zejména když od doby metání až do fáze mléčné zralosti trvají dešťové přeháňky (obr.2,3). Náchylnost pletiv dále značně stoupá od stádia mléčné do stádia voskové zralosti. Škodlivost choroby nebývá velká (Kůdela *et al.*, 2002).

Tato bakterie byla také objevena ve vzorcích semen a rostlin rostoucích v Severní a Střední Itálii (Alexandrova, 2008).

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

Ps.c produkuje tabtoxin a je příčinou bakteriální gloriolové skvrnitosti ovsu a jednočláskových rostlin. Choroba se nachází na celém světě, všude tam, kde je pěstován oves (Barta and Willis, 2005).

Na listové čepeli se tvoří zpočátku světle zelené, částečně také světle hnědé, většinou oválné skvrny, velké 1–2 mm. Uprostřed skvrny, okolo průduchu, je pletivo vkleslé, později šedne až hnědne a postupně usychá. Na obvodu této malé skvrny je světle zelená, později žlutá zóna (halo) ohraničená červenohnědým lemem. Chlorotická zóna se zvětšuje a léze navzájem splývají. Skvrny patrné i na plevách. Zasažen může být i celý klásek. Infikované obilky někdy vůbec nevyklíčí (Kůdela *et al.*, 2002).

Bakterie *Ps.c* také způsobuje nemoc obilí nazvanou „čokoládové skvrny“, která byla původně přisuzována *Ps. coronafaciens* pv. *zea* (Barta and Willis, 2005).

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

Fytopatogenní bakterie *Ps.g* infikuje sójové boby a způsobuje bakteriální spálu (Schenk *et al.*, 2006). Na listech nakažených *Ps.g* se vyskytuje hodně malých světle zelených skvrn (1–2 mm), které jsou obklopené žlutými halo. Přednostně produkuje fytoalexin coronatin (obr.4,5) (Joardar *et al.*, 2005).

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

Způsobuje listovou skvrnitost na slunečnici. Skvrny způsobené *Ps.h* jsou hranaté, tmavě hnědé, obklopené chlorotickými halo. Může dojít i ke kolonizaci cévních svazků, listy jsou pak svráštělé v důsledku nerovnoměrného růstu vaskulárních a parenchymatických pletiv (Kůdela *et al.*, 2002).

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

Bakteriální hranatá skvrnitost listů okurky se běžně vyskytuje ve všech pěstitelských oblastech v polních porostech. Raná infekce má za následek průkazný pokles výnosu a kvality plodů (Kůdela *et al.*, 2002). Na okurkách se příznaky objeví na listech jako malé, kulaté, nepravidelně kulovité, mokvající léze (obr.6,7). Skvrny se dále šíří a jsou omezeny většími žilkami, které dávají skvrnám hranatý zjev. Ve vlhkých podmínkách jsou mokvající skvrny pokryty bílým exudátem. Časem pletivo z těchto oblastí vypadává a zanechává v listech nepravidelné otvory (Anonymus 1, 2009). Chlorotická a nekrotická oblast na listech může být 20–50 % bez vlivu na životaschopnost hostitele. Překročí-li však 50 % celkové plochy listů způsobí smrt celé rostliny (Aksoy, 2006).

***Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále jen *Ps.p*)**

Ps.p způsobuje gloriolovou spálu na fazoli, která postihuje porosty v mnoha zemích (Joardar *et al.*, 2005). Příznaky onemocnění jsou typické mokvající léze, které se dalším vývojem obklopují žlutým halo. To bývá důsledkem produkovaného phaseolotoxinu s nespecifickým účinkem (obr.9) (Oguiza *et al.*, 2004). Choroba je šířena deštěm, daří se jí v nižších teplotách a je rozšířena v Evropě a v Severní Americe (Güven *et al.*, 2004). Původně malé vodnaté skvrny mohou splývat, hnědnout a vysychat (Kůdela *et al.*, 2002). Listy vadnou a hnědnou. Mladé lusky vadnou a netvoří semena (obr.8). Občas mají rostliny zakrnělé, zkroucené a skvrnitě vrcholové listy. V teplém počasí jsou skvrny hranaté, červenohnědé a bez halo. Skvrny na luscích jsou červené až hnědé se stříbřitým povlakem. Semena jsou malá, zvrásnělá s krémově zbarvenými skvrnami. Všechny pukající fazole jsou na tuto nákazu velmi citlivé (Westcott and Horst, 2001).

***Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett 1916) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále jen *Ps.p*)**

Bakteriální spála na hrachu je způsobená *Ps.p*. Byla ohlášena z mnoha zemí na celém světě a do Velké Británie byla zavlečena z nakažených semen (Arnold *et al.*, 1996). Je známo 7 ras, které lze určit podle reakce diferenciačního sortimentu hrachu po inokulaci patogenem. V Evropě převládá rasa 2, nejméně je rozšířená rasa 4 a 6. Na území ČR byl prokázán výskyt rasy 6. Převaha rasy 2 je vysvětlitelná tím, že u mnoha pěstovaných odrůd chybí gen rezistence R2, který působí antagonisticky právě proti jedincům z této skupiny.

Symptomy se vyskytují na všech nadzemních orgánech, ale nejcharakterističtější jsou na stoncích a palistech (obr.10). Lokalizace a typ příznaků závisí na průběhu počasí. Infekce se šíří směrem nahoru k palistům a jednotlivým lístkům zpeřených listů. Infekce květních a plodních stopek má za následek, že květy (celá květenství) a lusky usychají a odumírají. Infikovaná semena mají poblíž pupku vodnatou skvrnu nebo jsou scvrklá a hnědožlutě zbarvená. Hlavním zdrojem nákazy jsou semena (Kůdela *et al.*, 2002).

***Pseudomonas syringae* pv. *strifaciens* (Elliott 1927) Young, Dye & Wilkie 1978
(dále jen *Ps.st*)**

Nemoc nazvaná jako bakteriální proužkovitost ovsa je způsobena *Ps.st*. Onemocnění je charakterizováno mokvajícími lézemi, které srůstají a z velkých pruhů podél listů se později vytvoří nekrózy. Symptomy postrádají chlorotická halo (obr.11). I když jsou příznaky rozdílné od projevů *Ps.c*, jsou tyto dvě bakterie fyziologicky nerozeznatelné a jedinou výjimkou: *Ps.st* neprodukuje tabtoxin (Barta and Willis, 2005).

***Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 (dále jen *Ps.syr*)**

Způsobuje hnědé skvrny na listech divoké rýže (*Ziziane*), skvrny na listech a řapících fazole (obr.12,13). Tumory jsou formovány na bylinném výhonku, listech a květech, ale nikoli na podzemních částech. Malý nádor vytvářející se na listech je obklopen žlutou tkání s bakteriálním slizem vycházejícím ve velkém množství z cévních svazků. Mladé listy a lusky mohou být zdeformované a zkroucené. Starší tumory na větvích jsou měkké, houbovitě (porézní), zdrsňelé a pomalu tmavnou (Westcott and Horst, 2001).

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

Ps.tab se nachází na tabáku, rajčatech, lilku, sójových bobech a sporadicky se objevuje ve všech tabákových oblastech. Skvrny na listech jsou hnědé a obklopené chlorotickými halo (obr.14). Choroba se nejdříve objevuje na spodních listech a ve vlhkém počasí se velmi rychle rozšiřuje. Bakterie přetrvává několik měsíců po sklizni ve zbytcích odpadu a v semenech (Westcott and Horst, 2001). Patogen produkuje také nespecifický tabtoxin, který se podílí na vzniku chlorotického halo okolo nekrotických skvrn. Přítomnost toxinu lze pokládat za sekundární determinantu choroby. Svědčí o tom existence mutantů *Ps.tab*, které sice netvoří halo, ale zůstávají pro tabák patogenní, i když mají nižší virulenci (Kůdela *et al.*, 2002).

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

Tato bakterie byla poprvé vyizolována z *Tagetis erecta* Hellmersem roku 1955. Ve Spojených státech byla poprvé nalezena v roce 1978 na slunečnici (*Helianthus annuus*) (Krieg, 1997). Způsobuje bakteriální skvrnitost na slunečnicích a apikální chlorózu na několika rostlinách čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité) (Westcott and Horst, 2001 ; Song *et al.*, 2006).

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

Ps.the způsobuje bakteriální spálu vyskytující se na čajovníku (Tsuyoshi, 2005). Výskyt choroby souvisí s nízkými teplotami. Na povrchu listů se shlukuje a vytváří film, který chrání bakterie proti stresovým podmínkám. Rovněž produkuje polysacharid důležitý pro přežití bakterie za suchých podmínek (Tomihama *et al.*, 2007).

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

Ps.t způsobuje bakteriální tečkovitost rajčete. Vyskytuje se všude, kde se rajče pěstuje, pravděpodobně proto, že je dobře přenosná osivem. Patogen napadá všechny orgány rajčete. Na listech se objevují 1–3 mm velké, tmavé až černé skvrny, které jsou obvykle obklopeny výrazným žlutě zbarveným halo (obr.15,16). Skvrny na listové čepeli mohou splývat a vytvářet větší, souvislé tmavě hnědé nekrotické plochy, vyskytují se hlavně na jeho okraji. Vznikají také nekrotické pruhy podél hlavních a vedlejších žilek (Kúdela *et al.*, 2002). *Ps.t* produkuje coronatin, fyto toxin způsobující chlorózu a zakrslost, ten byl potvrzen ve všech 244 izolátech z rajčatových polí v Ontariu (Cuppels and Ainsworth, 1995).

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

Ps.u způsobuje skvrnitost listů a spálu výhonků na jilmu. V deštivém období může způsobovat celkové poničení listů a výhonků (Smith *et al.*, 1988).

2.2 Toxiny coronatin a tabtoxin

Coronatin je polyketidový fyto toxin vylučovaný *Ps*, který způsobuje chlorózu a léze v hostitelských buňkách. Struktura coronatinu napodobuje methyl jasmonát. Ten je důležitou signální molekulou, kterou syntetizují rostliny pod biologickým stresem. O tomto toxinu bylo zjištěno, že je spojen s indukcí tvorby přirozeného jasmonátu a dalších přibližně 50 genů reagujících na různá poranění nebo postupující infekci (Hwang *et al.*, 2005). Genový cluster pro coronatin je na rozdíl od ostatních toxinů jako jediný lokalizovaný na bakteriálním plazmidu. Tento fyto toxin produkuje rovněž *Ps artropurpurea* (na jílku vytrvalém), *Ps.g* (na sóji), *Ps morsprunorum* (na peckovinách) a *Ps.t* (na rajčeti) (Cuppels and Ainsworth, 1995).

Tabtoxin je dipeptid vázaný přes threonin k monocyklickému β -laktamu produkovaný *Ps.tab*, *Ps.c* a *Ps garcae*. Tato struktura inhibuje syntézu glutaminu, který je v buňkách využíván při detoxifikaci amoniaku. (Bender *et al.*, 1999). Po rozštěpení peptidové vazby se uvolní toxický tabtoxin- β -laktamový kruh, který v hostitelské rostlině způsobí chlorózu (Hwang *et al.*, 2005).

2.3 Hypersenzitivní reakce

Hodně gram-negativních fytopatogenních bakterií vyvolává prudké lokální nekrózy prostupující tkáněmi hostitele. Tato získaná obrana zjevně programující buněčnou smrt je známá jako hypersenzitivní reakce (dále jen HR). Schopnost bakterie vyvolat HR v nehostitelských rostlinách nebo patogenitu v jejich hostitelích je závislá na *hrp* genu, který může být univerzální ve fytopatogenní *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* a *Ralstonia* spp. (Deng *et al.*, 1998).

Hrp je genový shluk, kódující mnoho komponentů proteinového systému typu III., který se zdá být určující pro sekreci virulentních proteinů u rostlinných i živočišných patogenů. Devět *hrp* genů s homologní strukturou vyskytujících se u živočišných patogenů *Yersinia*, *Shigella* a *Salmonella* spp. bylo přejmenováno na *hrc*. *Hrp* geny byly studovány u *Ps.syr*, *Ps.p*, *Ps.t* a *Ps.g* (Deng *et al.*, 1998). V genovém shluku *hrp* bylo identifikováno až 25 genů, každý se specifickou úlohou v interakci s rostlinou. Úloha některých genů není dosud jasná. Přítomnost všech genů v *hrp*-

shluku je však nutná k tomu, aby bakterie byly schopné buď vyvolat HR, nebo začít chorobný proces. Shluk *hrp* byl objeven v letech 1985 a 1986 dvěma významnými skupinami vedenými Niepoldem a Lingrenem. Funkce *hrp*-genů byla potvrzena, když se podařilo přenést *hrp*-shluk z *Ps.syr* do buněk *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens*. Po klonování byly tyto bakterie schopné vyvolat HR v listech tabáku. Nestaly se však fytopatogeny, schopnost kolonizovat rostlinná pletiva a způsobit onemocnění postrádaly (Kúdela *et al.*, 2002).

Fytopatogenní *Ps* vyvoláva HR po uvedení proteinového efektoru do rostlinné buňky skrz sekreční systém typu III. (označovaný TTSS). Efektory typu III. jsou také přirozeným prostředkem patogenity. Růst a patogeneze *Ps.syr* je zcela zrušena v nepřítomnosti funkčního TTSS (Abramovitch and Martin, 2004).

2.4 Použité molekulární metody

2.4.1 Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza je nejpoužívanější separační technika při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nositeli náboje u nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě (Šmarda *et al.*, 2008).

2.4.1.1 Gelová elektroforéza

Elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, kterým je obvykle gel. Gely jsou tvořeny agarózou nebo polyakrylamidem, které vytváří síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Agaróзовые gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti zhruba 100 bp – 50 kb, polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul 10 bp – 1000 bp.

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Při posuzování elektroforetické pohyblivosti není třeba brát v úvahu velikost náboje, protože nukleové kyseliny mají náboj rovnoměrně rozložen a jeho velikost je na jednotku délky stejná. Velikost molekuly DNA (nebo fragmentu) o neznámé velikosti

lze tedy stanovit srovnáním jejich pohyblivosti se vzorkem o známé velikosti. Po dokončení elektroforézy se molekuly DNA snadno zviditelní obarvením vhodným barvivem. Používají se etidiumbromid, který po osvětlení UV fluoreskuje červeně, nebo skupiny kyanidových barviv s označením SYBR (pod UV zelený). V obou případech jsou molekuly DNA viditelné na gelu jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA (Šmarda *et al.*, 2008).

2.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě.

PCR je proces, při kterém se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu: denaturace dsDNA (94°C), připojení primer k odděleným řetězcům DNA (30–65°C) a syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65–75°C). Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Přesnost a úspěšnost PCR při amplifikaci určitého genu nebo části sekvence genomové DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při němž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Příliš vysoký počet cyklů významně zvyšuje množství nespecifických produktů PCR. V případě, že dojde k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují, což vede k nespecifické vazbě primerů a falešným výsledkům. Pro PCR je třeba pouze malé množství templátové DNA, proto mohou být nečistoty ve většině případů odstraněny dostatečným naředěním vzorku.

Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky DNA definované délky o velikost obvykle desítky až tisíce bp, analogické restričními fragmentům, jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou

v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (Šmarda *et al.*, 2008).

2.4.3 Hybridizace

Jako hybridizaci nukleových kyselin označujeme proces vytváření dvouřetězcových molekul z jednořetězců DNA nebo RNA za předpokladu, že se jejich sekvence vyznačují částečnou nebo úplnou komplementaritou bází. Principem hybridizace je odlišná pevnost kovalentních vazeb cukr–fosfátové kostry řetězce DNA a mnohem slabších vodíkových můstků, které vážou oba řetězce dsDNA prostřednictvím párování bází. Proto je možné nastavit takové podmínky, při kterých se oba řetězce oddělí, ale neohrozí stabilitu kovalentních vazeb žádného z nich. Tento proces se označuje jako denaturace. Denaturaci DNA lze snadno vyvolat zahřátím (Šmarda *et al.*, 2008).

K detekci komplementárních úseků DNA testovaného organismu se používá tzv. molekulární sonda (próba). Sondou je různě dlouhá molekula značené dsDNA, ssDNA nebo RNA o známé sekvenci (Kúdela *et al.*, 2002). Při radioaktivním značení jsou do sekvence sondy začleněny nukleotidy, obsahující některý z radioaktivních izotopů. Signálem sondy je radioaktivní záření, které lze detekovat autoradiograficky. Při neradioaktivním způsobu značení jsou do sekvence sondy zabudovány chemicky modifikované nukleotidy nesoucí reportérskou molekulu, která umožňuje přímou (na základě fluorescence) nebo nepřímou (detekce protilátkou, na kterou je navázán enzym nebo fluorescenční barvivo) detekci sondy (Šmarda *et al.*, 2008).

2.4.4 Sekvenování

Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Základní používanou metodou je Sangerovo enzymatické sekvenování s automatizací.

Enzymatická metoda využívá DNA, jejíž sekvence má být stanovena, jako matici pro syntézu komplementárních řetězců prostřednictvím DNA–polymerázy. Syntéza je zahájena v místě, kde se připojí primer pro sekvenování a ukončena v místě, v němž je do řetězce včleněn místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu (dNTP)

analog dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP). ddNTP totiž postrádá 3'-OH skupinu a DNA-polymeráza nemůže připojit další nukleotid. Významným pokrokem ve stanovování sekvence DNA enzymovou metodou je její automatizace. Při ní se pro separaci reakčních produktů, detekci, shromáždění dat z reakce a analýzu pořadí bází používají plně automatizované aparatury. Výhodou je zejména rychlost stanovení. Automatické sekvenování má ve srovnání se standardní enzymovou metodou několik odlišností – syntéza probíhá metodou asymetrické PCR v termocykleru s využitím Taq-DNA polymerázy a k detekci se používají čtyři různé fluorescenční značky. Takto označené fragmenty jsou separovány dle velikosti pomocí kapilární elektroforézy a následně detekovány pomocí citlivého čidla uvnitř automatického sekvenátoru. Délka takto získávaných sekvencí se pohybuje mezi 500 až 1 000 bázemi (Šmarda *et al.*, 2008).

3. Cíl práce

- 1) Vytvoření sbírky bakteriálních kultur pocházejících z tuzemských i zahraničních zdrojů.
- 2) Izolace kompletní genomové DNA ze sbírkových a polních vzorků *Ps*.
- 3) Stanovení distribuce genu pro coronatin a tabtoxin mezi jednotlivými patovary bakterie *Ps* pomocí molekulárních technik.
- 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 Kmeny bakterie *Ps*

Patovary, které byly k této práci použity (tab.2) byly získány z Belgian coordinated collections of micro-organisms, České sbírky mikroorganismů (CCM) a sbírky mikroorganismů z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze (RICP). Způsob jejich uchování je v lyofilizovaném stavu, jenž umožní tento vysušený materiál uchovat v biologicky neměnném stavu, nebo ve zmraženém stavu v živných médiích s 15 % glycerolu při -60°C . Dále byly k dispozici polní izoláty (tab.3).

4.1.1 Kultivace a živná média

Kultivace je u všech patovarů totožná a probíhala 48 hodin při 25°C (termostat) na pevném C-médium. C-médium je složeno z 2 g peptonu, 1 g kvasničného autolyzátu, 1 g NaCl, 1 g glukózy, 5 g agaru a 200 ml destilované vody. Dále bylo upraveno pH na 7,2 a sterilizováno autoklávováním při 121°C po dobu 20 min.

4.2 Izolace bakteriální genomové DNA

4.2.1 Izolace DNA

Bakteriální kolonie byly odebrány po 48 hodinách, protože je z nich v tomto stavu DNA lépe izolovatelná než ze starších kolonií.

Izolace DNA byla provedena pomocí izolační soustavy neboli kitu PCR kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega). Celý postup a jednotlivé kroky byly provedeny přesně dle návodu přiloženém k této soustavě. Izolace probíhá pomocí kolonek, jejíž součástí je upravená membrána, která DNA zachytí, a po přidání destilované vody se z této membrány uvolní. Takto získaná DNA je v dostatečném množství a čistotě. Vyizolovaná DNA je uchovávána při -25°C .

4.3 PCR

Reakční směs pro PCR byla připravena do celkového objemu 15 µl a obsahovala 7,5 µl PPP MasterMixu (Top–Bio), 1 µl forward a 1 µl revers primeru (Sigma Aldrich), 4,5 µl destilované vody a 1 µl vyizolované DNA (100 ng).

Pro každý z toxinů byly použity jiné dvojice primerů s odlišným amplifikačním programem (tab.4). Program amplifikace byl nastaven na termocycleru MJ Mini (BIO RAD). Pro toxin coronatin byla použita jedna dvojice primerů CorCf11F se sekvencí 5'GGCGCTCCCTCGCACTT 3' a CorCf11R se sekvencí 5'GGTATTGGCGG GGTGC 3' (dále jen COR).

Pro toxin tabtoxin byly použity dvě dvojice primerů. První primer TblA1F se sekvencí 5'CTGGTCACTGCGCTAGGC 3' a TblA1R se sekvencí 5'CGTGATTGACT CAGGGCACTAG 3' (dále jen TBL) a druhý primer TabA1F se sekvencí 5'GTGCCA ATATCCGAAAGCTT 3' a TabA1R se sekvencí 5'ACTTGTCAAAGTTCTCGCAC 3' (dále jen TAB).

Výsledné fragmenty z PCR byly rozděleny pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu (LE agarose, Lonza) s použitím 0,5x TBE pufru. Elektroforéza probíhala při napětí 120V po dobu cca 60 minut. Na DNA bylo navázáno interkalační činidlo SYBR Green, které pod UV světélkuje zeleně a umožňuje tak detekci DNA. Toto barvivo bylo součástí vkládacího pufru (Bromphenol Blue/ Xylene Cyanol). Vedle vzorků byl na agarózový gel přidán i DNA marker, podle kterého byly odečítány velikosti jednotlivých PCR produktů. Elektroforetická vana byla během samotného dělení umístěna na orbitální třepačku při 50 ot/min pro docílení rovnoměrného zahřívání gelu. Po proběhnutí elektroforézy byl gel zpracován dokumentačním systémem Kodak EDAS 290 a vyhodnocen softwarem Kodak 1D.

4.4 Hybridizace

4.4.1 Příprava sondy

Sonda byla připravena pomocí kitu PCR DIG Probe synthesis Kit (Roche diagnostics) do celkového objemu 25 μ l. Ke 13,2 μ l vody bylo přidáno 2,5 μ l pufru $MgCl_2$, 2,5 μ l PCR DIG, 5 μ l primerů (2,5 μ l forward + 2,5 μ l reverse), 1 μ l DNA (která byla předem naředěna 9 μ l vody s 1 μ l DNA) a 0,8 μ l enzyme mix.

4.4.2 Dot blot hybridizace

Dot blot hybridizace probíhala v několika krocích:

1. Nylonovou membránu napustit 2x SSC, nanést vzorky na vlhkou membránu (20 μ l PCR produktu), přebytečnou tekutinu odsát vývěvou
2. Fixovat vzorky 20 min. ve flowboxu pod UV nebo 30 min. v peci při 120°C
3. Prehybridizace 1 hod. 68°C v hybridizačním pufru (20 ml)
4. Denaturovat 25 μ l sondy 5 min., rychle zchladit, přidat do 7 ml hybridizačního pufru a inkubovat při 68°C
5. Promýt 2x 5 min. ve 2x SSC při 20°C a 2x 15 min. v 0,1x SSC a 68°C (50ml/100 cm ²)
6. Promýt 1 min. v pufru 1 + Tween 20 (promývací pufr) při 20°C
7. Inkubovat v pufru 2, 30 min. na třepačce při 20°C (100 ml)
8. Reakce s anti-DIG-AP IgG (zkumavka 3 v kitu) ředěné 1:5000 v pufru 2, 30 min. na třepačce při 20°C (2 μ l konjugátu + 10 μ l pufru 2)
9. Vymýt 2x 15 min. pufr 1 při 20°C
10. Stabilizovat 2 min. v pufru 3
11. Barevná reakce: 200 μ l X fosfátu + NBT ve 20 ml pufru 3
12. Promýt membránu 5 min. v pufru 4

Přesné složení jednotlivých pufků je uvedeno v příloze (tab.5).

4.5 Sekvenování

Sekvenování bylo provedeno ve specializovaném středisku na Ústavu molekulární biologie rostlin Akademie věd v Českých Budějovicích. Produkt PCR, který měl být osekvenován, byl nejprve přečištěn pomocí PCR Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Přečištění produktu bylo provedeno dle návodu výrobce. Reakční směs na sekvenci obsahovala 2 μ l templátu (25pg), 1 μ l primeru, 13 μ l vody. Primer byly naředěny do výsledné koncentrace 3,2 pmol (15 μ l vody s 1 μ l primeru).

5. Výsledky a diskuse

5.1 Izolace bakteriální DNA

Izolace bakteriální genomové DNA pomocí Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) byla naprosto dostačující a nebylo tedy potřeba DNA purifikovat jinými postupy. Takto získaná DNA byla v dostatečném množství, koncentraci i čistotě ($OD_{260/280} > 1.9$) pro následující aplikace.

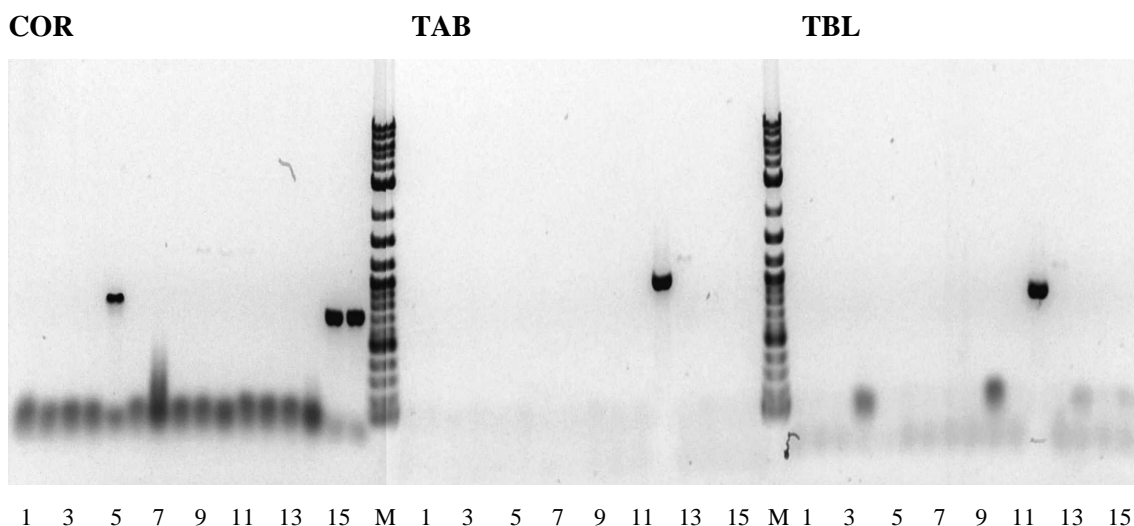
5.2 Distribuce genů pro toxiny coronatin a tabtoxin

Metodou PCR byly v naší sbírce s použitím primeru pro gen coronatinu pozitivně detekovány tři patovary (pv. *glycinea*, *tomato* a *ulmi*). Tento výsledek je ve shodě s předchozími pracemi (Bender *et al.*, 1999), které se zabývají fytotoxiny vyskytujícími se u *Pseudomonas syringae*. Coronatin by dle nich měly produkovat bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Z těchto patovarů byly k dispozici pouze pv. *glycinea* a pv. *tomato*. U obou těchto patovarů byla potvrzena přítomnost genu pro coronatin pomocí PCR. Výsledný produkt odpovídal předpokládané velikosti 655 bp. Zcela novým zjištěním je pozitivní nález u bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *ulmi* (produkt rovněž 655 bp). Tento výsledek není možno porovnat s jinými pracemi. Pravděpodobně je to způsobeno velkým zájmem zaměřeným na velmi devastující houbovou infekci (grafióza jilmu – *Ophiostoma novo-ulmi*) postihující tohoto hostitele. Je tedy pravděpodobné, že molekulární analýza genu virulence pro coronatin ani pro jiný toxin u tohoto patovaru nebyla zjišťována.

PCR analýzou genu pro tabtoxin byla detekována jeho přítomnost pouze u pv. *tabacii*, jehož produkt dosahoval při použití primeru TAB 1020 bp a primeru TBL 830 bp. Na rozdíl od našich výsledků se dle jiných autorů (Bender *et al.*, 1999) tento toxin může vyskytovat ještě pv. *garcae*, který nebyl součástí naší sbírky a u pv. *coronafaciens*. Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo tabtoxin u pv. *coronafaciens* detekovat, rozhodli jsme se toto negativní zjištění ještě ověřit. Použili jsme výsledky

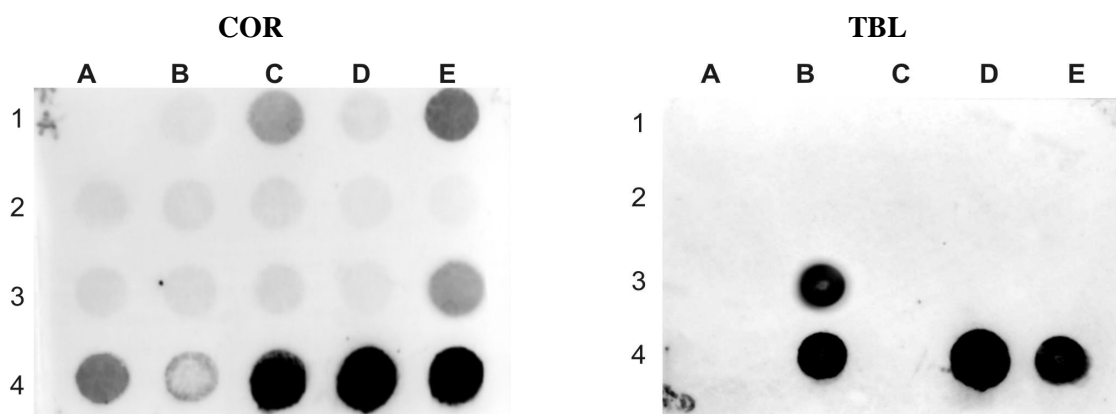
ze studie genetické variability jednotlivých patovarů, která také probíhá v naší laboratoři. Pomocí těchto dat a výsledků se nám podařilo zjistit, že sbírkový kmen BCCM/LMG 5060, který jsme považovali za *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*, vykazuje velmi podobný genetický profil s pv. *syringae* a to se všemi dvojicemi primerů používaných při metodě rep-PCR (Rademaker and Bruijn, 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 s velkou pravděpodobností tvrdit, že determinace sbírkového kmene byla provedena nesprávně a celou dobu jsme pracovali s pv. *syringae* (která tabtoxin neprodukuje). Tento fakt přímo ukazuje na obtížně proveditelnou spolehlivou identifikaci takto příbuzných organismů a na potřebu jejího zlepšení. Naše tvrzení bude ještě potvrzeno dalšími testy.

U polních izolátů nebyl pomocí PCR zachycen ani jeden z genů.



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

Výše uvedené závěry byly potvrzeny i pomocí dot blot hybridizace. V případě toxinu coronatinu se vyskytl pozitivní signál u pv. *atrofaciens*. Mohlo zde dojít k částečné homologii mezi značenou sondou a bakteriální DNA.



1A – negativní kontrola; 1B–4A – vzorky 1–15 (dle tab.1); 4C – pozitivní kontrola (COR)/negativní kontrola (TAB); 4B,4D,4E – pozitivní kontrola

5.3 Sekvenování získaných genů

Pozitivní vzorky získané amplifikací genu pro coronatin a tabtoxin 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) Získané izoláty byly metodou polymerázové řetězové reakce a Dot blot hybridizace podrobeny skríníngu na přítomnost genu pro toxiny coronatin a tabtoxin.
- 3) Izolace kompletní genomové DNA byla provedena pomocí izolační soustavy Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) a vykazovala výborné vlastnosti.
- 4) Molekulární metodou PCR byly jako pozitivní pro produkci coronatinu zjištěny fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a *Pseudomonas syringae* pv. *ulmi*. Gen pro produkci tabtoxinu byl zjištěn u fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.
- 5) Získané PCR amplikony byly osekvenovány ve specializovaném středisku Akademie věd v Českých Budějovicích. Ze získaných dat bylo možné potvrdit jejich genetickou podobnost a pravost v porovnání s veřejnými databázemi. Zjištěné sekvence pro toxiny coronatin a tabtoxin vykazovaly téměř 100 % homologii.
- 6) Pro hybridizační testy byla připravena pomocí kitu DIG Probe synthesis Kit (Roche diagnostics) neradioaktivně značená sonda, která byla dále testována s jednotlivými vzorky. Výsledky se shodovaly s těmi získanými metodou PCR.

7. Seznam použité literatury

- Abramovitch, R.B., Martin, G.B.** (2004): Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Cur. Opi. in Plant Biol.* **7**, 356–364.
- Aksoy, H.M.** (2006): Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* [(Smith and Bryan) Zouny, Dye and Wilkie] at Bafra Province Greenhouses. *Plant Path. J.* **5**, 80–82.
- Alexandrova, M., Zaccardelli, M., Stefani, E., Bazzi, C.** (2008): Testing for *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* and *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals in Italy, dostupné na [www](http://www3.interscience.wiley.com/journal/119245927/abstract)
<<http://www3.interscience.wiley.com/journal/119245927/abstract>>
[cit.15.3.2009]
- Arnold, D.L., Athey–Pollard, A., Gibbon, M.J., et al.** (1996): Specific oligonucleotide primers for the identification of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* yield one of two possible DNA fragments by PCR amplification: evidence for phylogenetic divergence. *Phys. and Mol. Plant Path.* **46**, 233–245.
- Barta, T.M., Willis, D.K.** (2005): Biological and Molecular Evidence that *Pseudomonas syringae* Pathovars *coronafaciens*, *striaefaciens* and *garcae* are Likely the Same Pathovar. *J. Phytopath.* **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. *Microb. and Mol. Bio. Revi.* **2**, 266–292.
- 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. *App. and Environ. Microb.* **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*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* Mutants To Elicit the Hypersensitive Response and Disease in Plants. *J. of Bact.* **17**, 4523–4531.
- Güven, K., Jones, J.B., Momol, M.T., et al.** (2004): Phenotypic and Genetic Diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Phytopath.* **152**, 658–666.
- Hirano, S.S., Upper, C.H.D.** (2000): Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* – a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microb. and Mol. Bio. Revi.* **3**, 624–653.
- Hwang, S.H., Morgan, R.L., Sarmat, S.F., et al.** (2005): Phylogenetic Characterization of Virulence and Resistance Phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *App. and Environ. Microb.* **9**, 5182–5191.
- 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. *J. of Bact.* **18**, 6488–6498.
- Kokošková, B.** (2006): Význam a diagnostika bakterie *Pseudomonas syringae* a patotvarů vyskytujících se na obilninách, dostupné na [www](http://aplikace.isvav.cvut.cz/resultDetail.do?rowId=RIV/00027006:_____/06:2893!RIV08-MZE-00027006)
<http://aplikace.isvav.cvut.cz/resultDetail.do?rowId=RIV/00027006:_____/06:2893!RIV08-MZE-00027006> [cit. 15.3.2009]
- Krieg, B.** (1997): An in Vitro Evaluation of a *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* Strain as a potential Biocontrol Agent, dostupné na [www](http://etd.lib.ttu.edu/theses/available/etd0129200931295012196662/unrestricted/31295012196662.pdf)
<<http://etd.lib.ttu.edu/theses/available/etd0129200931295012196662/unrestricted/31295012196662.pdf>> [cit. 15.3.2009]

- Kůdela, V., Novacky, A., Fucíkovsky, L.** (2002): Rostlinolékařská bakteriologie. 1.vydání. Praha, Academia, ISBN 80–200–0899–3, 347.
- Oguiza, J.A., Rico, A., Rivas, L.A., et al.** (2004): *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. *Microb.* **150**, 473–482.
- Olczac–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 Path.* **56**, 373–382.
- 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.
- Schenk, A., Berger, M., Keith, L.M., et al.** (2006): The *algT* Gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and New Insights into the Transcriptional Organization of the *algT*–*muc* Gene Cluster. *J. of Bact.* **23**, 8013–8021.
- Simard, J., Crete, R., Simard, T.** (1961): Vegetable diseases on Muck Soils in the Montreal area in 1961. *Plant Dis. Sur.* **5**, 353–356.
- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., et al.** (1988): European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications, ISBN 0632012226, 583.
- Song, E.S., Park, Y.J., Chae, S.C., et al.** (2006): Construction of a bacterial artificial chromosome library and characterization of *hrp/hrc* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pathovar *tagetis* LMG5090. *Biotech. letters* **28/13**, 969–977.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., et al. (2008): *Metody molekulární biologie*. 1.vydání. Brno, Masarykova univerzita, ISBN 978–80–210–3841–7, 188.

Tomihama, T., Nishi, Y., Arai, K. (2007): Epogallocatechin gallate, a major tea catechin, induces biofilm formation of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. *Gen. Plant Path.* **73**, 185–192.

Tsuyoshi, T. (2005): Susceptibility of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* to Copper Bactericide. *Chag. Ken. Hokoku* **100**, 11–19.

Westcott, C., Horst, R.K. (2001): *Westcott's Plant Disease Handbook*, 6.vydání. Springer, ISBN 0792386639, 1008.

ANONYMUS 1:

Angular Leaf Spot of Cucurbits *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, dostupný z www <<http://urbanext.illinois.edu/hortanswers/detailproblem.cfm?PathogenID=130>> [15.3.2009]

ANONYMUS 2:

Celery Bacterial Leafspot, dostupný z www <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r104100311.html?printpage>> [cit. 15.3.2009]

8. Příloha

8.1 Tabulky

Tabulka č.1: Genomové skupiny

Genomová skupina	Patovar
1	<i>atrofaciens</i>
1	<i>pisi</i>
1	<i>syringae</i>
2	<i>glycinea</i>
2	<i>lachrymans</i>
2	<i>phaseolica</i>
2	<i>tabaci</i>
2	<i>ulmi</i>
3	<i>apii</i>
3	<i>coronafaciens</i>
3	<i>tomato</i>
4	<i>striafaciens</i>
7	<i>helianthi</i>
7	<i>tagetis</i>
8	<i>theae</i>

zdroj: <<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/49/2/469>>

Tabulka č.2: 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>pisi</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.3: Polní izoláty *Pseudomonas syringae*

<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

Tabulka č.4: Programy jednotlivých primerů nastavené pro program PCR

	COR		TAB		TBL	
<i>Krok</i>	<i>Teplota (°C)</i>	<i>Čas</i>	<i>Teplota (°C)</i>	<i>Čas</i>	<i>Teplota (°C)</i>	<i>Čas</i>
1	95	3 min.	95	3 min.	95	3 min.
2	93	1 min.	93	1 min.	93	1 min.
3	60	30 s	53	30 s	58	30 s
4	72	55 s	72	1 min.	72	50 s
5	od 2. opakovat cyklus 25x		od 2. opakovat cyklus 25x		od 2. opakovat cyklus 25x	
6	72	10 min.	72	10 min.	72	10 min.
7	4	→	4	→	4	→

Tabulka č.5: Složení jednotlivých pufrů použitých při hybridizaci

20x SSC	100 ml
3M NaCl	17,53 g
0,3M citronan sodný	8,82 g
pH	7
Pufr 1	1 l
0,1M kys. maleinová	11,6 g
0,15M NaCl	8,76 g
pH	7,5
Pufr 2	
1% blotovacího pufru 1	
Pufr 3	0,5 l
1M Tris	6,05 g
3M NaCl	2,92 g
0,5M MgCl ₂	5,83 g
pH	9,5
Pufr 4	250 ml
1M Tris	2,5 ml
0,5M EDTA	0,5 ml
pH	8
Hybridizační pufr	250 ml
20c SSC	62,5 ml
10% blotovacího roztoku	25 ml
10% laurylsarcosyl	2,5 ml
10% SDS	0,5 ml
Promývací pufr	
Pufr 1	250 ml
Tween 20	0,75 ml

8.2 Obrázky



Obrázek č.1: *Ps. apii*

zdroj: <www.omafra.gov.on.ca/.../facts/00-093f4.jpg>



Obrázek č.2: *Ps. atrofaciens*

zdroj: <www.meleigi.com/3/br/1.files/image002.jpg>



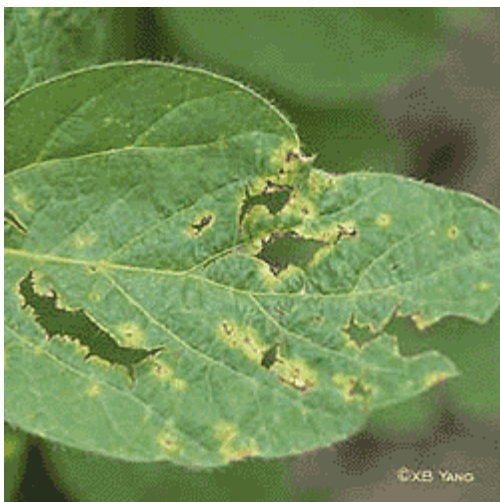
Obrázek č.3: *Ps. atrofaciens*

zdroj: <<http://www.seedquest.com/News/releases/2008/november/24384.htm>>



Obrázek č.4: *Ps. glycinea*

zdroj: <<http://www.infonetbiovision.org/res/res/files/1402.400x400.jpeg>>



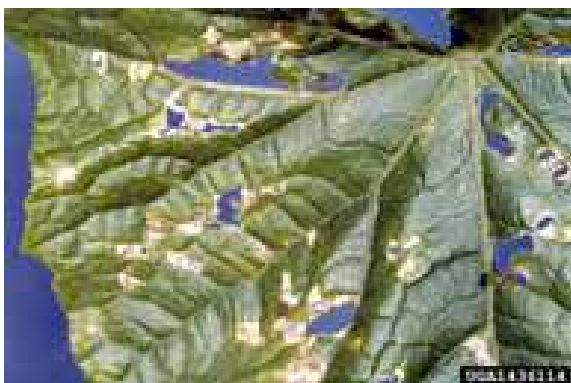
Obrázek č.5: *Ps.glycinea*

zdroj: <http://www.lgseeds.com/LG_Tech2/soy_bacterialblight.asp>



Obrázek č.6: *Ps.lachrymans*

zdroj: <<http://www.avrdc.org/LC/cucurbits/angular.html>>



Obrázek č.7: *Ps.lachrymans*

zdroj: <www.forestryimages.org/search/action.cfm?Start=1&q=cooperative>



ERROR: ioerror
OFFENDING COMMAND: image

STACK: